

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Tamara Siber, univ. mag. ing. agr.

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE KVATERNIH PIRIDINIJEVIH
SPOJEVA NA FITOPATOGENE POLIFAGNE VRSTE GLJIVA
RODOVA *FUSARIUM*, *BOTRYOTINIA* I *SCLEROTINIA***

- DOKTORSKI RAD -

Osijek, 2025.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Tamara Siber, univ. mag. ing. agr.

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE KVATERNIH PIRIDINIJEVIH
SPOJEVA NA FITOPATOGENE POLIFAGNE VRSTE GLJIVA
RODOVA *FUSARIUM*, *BOTRYOTINIA* I *SCLEROTINIA***

- Doktorski rad -

Mentorica: prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

Komentorica: doc. dr. sc. Valentina Bušić

Povjerenstvo za ocjenu:

- 1. Jasenka Ćosić, redovita profesorica u trajnom izboru, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednica**
- 2. Mirjana Brmež, redovita profesorica u trajnom izboru, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, članica**
- 3. Dajana Gašo-Sokač, redovita profesorica, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, članica**

Osijek, 2025.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Tamara Siber, univ. mag. ing. agr.

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE KVATERNIH PIRIDINIJEVIH
SPOJEVA NA FITOPATOGENE POLIFAGNE VRSTE GLJIVA
RODOVA *FUSARIUM*, *BOTRYOTINIA* I *SCLEROTINIA***

- Doktorski rad -

Mentorica: prof. dr. sc. Karolina Vrandečić
Komentorica: doc. dr. sc. Valentina Bušić

**Javna obrana doktorske disertacije održana je 3. veljače 2025. godine pred
Povjerenstvom za obranu:**

- 4. Jasenka Ćosić, redovita profesorica u trajnom izboru, Fakultet
agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednica**
- 5. Mirjana Brmež, redovita profesorica u trajnom izboru, Fakultet
agrobiotehničkih znanosti Osijek, članica**
- 6. Dajana Gašo-Sokač, redovita profesorica, Prehrambeno-tehnološki fakultet
Osijek, članica**

Osijek, 2025.

Zahvala

Na početku želim izraziti posebnu zahvalnost mojoj mentorici, prof. dr. sc. Karolini Vrandečić, čija stručnost, znanje, podrška, savjeti i prije svega strpljenje nisu bili samo temelj ovog rada, već i poticaj u svim fazama mog istraživanja. Iako ste mi pružili slobodu da istražujem i razvijam neke vlastite ideje, znala sam da ste uz mene u važnim trenucima.

Posebno hvala mojoj komentorici, doc. dr. sc. Valentini Bušić, koja je uvijek bila dostupna, prisutna i strpljiva. Hvala Vam ne samo na stručnim savjetima i konstruktivnim komentarima, već i na pravim riječima u pravom trenutku.

Hvala članovima povjerenstva na uloženom vremenu, trudu, komentarima i smjernicama, što su pomogli da moj rad i trud dobiju svoj završni oblik.

Hvala i mojoj katedri na podršci tijekom cijelog procesa, a posebno prof. dr. sc. Jasenki Ćosić, koja je, kako sama kaže, bila "dosadna" te me svojim upornim poticajima gurala da što prije završim. Vaša pristupačnost i spremnost na savjete u svakom trenutku bili su mi od velike pomoći.

Posebnu zahvalnost želim uputiti prof. dr. sc. Mirjani Brmež, mentorici mojih diplomskih radova, koja je i dalje prisutna i dostupna. Vaša podrška i razumijevanje bili su mi od neprocjenjive važnosti.

Hvala prof. dr. sc. Andrijani Rebekić i prof. dr. sc. Aniti Liška na nesebičnom vremenu, strpljenju i stručnoj pomoći koju su mi pružile.

Zahvaljujem se divnim ljudima, svojim kolegama i prijateljima. Josipa, Marija, Ankica, Monika, Elena, Magdalena, Gorane, Domagoj i Ante, neizmjereno vam hvala na riječima utjehe, podršci i pomoći kada god je bilo potrebno.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj prijateljici Martini i strini Milici, koje su bezuvjetno preuzimale brigu o mojoj djeci kad god je bilo potrebno. Zauvijek ću vam biti zahvalna na tome.

Želim zahvaliti svojoj obitelji, a posebno svojim roditeljima. Znam da vam je sada srce najveće i najponosnije. Hvala vam na svojoj ljubavi, razumijevanju i bezuvjetnoj podršci, čak i u trenucima kada sam vam bila najdalja.

Na kraju, želim zahvaliti onima koji su najvažniji i bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo isto, bez kojih moj put ne bi bio ovako poseban i vrijedan. Od srca zahvaljujem svom suprugu Josipu i mojim dječacima Karlu, Bartolu i Marku. Hvala vam što ste bili uz mene do samog kraja, što ste vjerovali u mene čak i onda kada sama nisam. Vaša ljubav, podrška i razumijevanje značili su mi više nego što riječi mogu opisati. Volim vas beskrajno.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Zaštita bilja

UDK:

Znanstveno područje: biotehničke znanosti

Znanstveno polje: poljoprivreda

Grana: fitomedicina

ANTIFUNGALNO DJELOVANJE KVATERNIH PIRIDINIJEVIH SPOJEVA NA FITOPATOGENE POLIFAGNE VRSTE GLJIVA RODOVA *FUSARIUM*, *BOTRYOTINIA* I *SCLEROTINIA*

Tamara Siber, univ. mag. ing. agr.

Disertacija je izrađena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentorica: prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Komentorica: doc. dr. sc. Valentina Bušić, Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek

Biljne bolesti uzrokovane rodovima *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia* značajno smanjuju prinose i kvalitetu usjeva. Njihova otpornost i patogenost čine kontrolu izazovnom. Kvaterne piridinijeve soli, odnosno nikotinamidni i izonikotinamidni derivati, manje su toksični i štetni za okoliš od komercijalnih fungicida. Cilj istraživanja bio je ispitati antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih spojeva na *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*. U *in vitro* uvjetima analizirano je djelovanje na porast micelija, vijabilnost konidija/sklerocija i rast kličnih cijevi pri koncentracijama od 10 i 100 µg/mL. Rezultati *in vitro* istraživanja pokazali su značajno bolje antifungalno djelovanje na porast micelija *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* i *B. cinerea* u usporedbi s kontrolom. Protiv *F. culmorum* 100 µg/mL bila je najučinkovitija za nikotinamidne spojeve, dok je djelovanje izonikotinamidnih spojeva bilo neovisno o koncentraciji. Analiza varijance potvrdila je statistički značajno inhibitorno djelovanje na klijavost konidija *B. cinerea* pri čemu su niže koncentracije (10 µg/mL) bile učinkovitije. Inhibitorno djelovanje na sklerocije *S. sclerotiorum* bilo je veće pri višim koncentracijama (100 µg/mL). Istraživanje je također uključivalo *in vivo* testove na prirodnim supstratima (mrkva, pšenica, rajčica) kako bi se ispitalo antifungalno djelovanje odabranih spojeva. *In vivo* testovi na rajčici i mrkvi nisu pokazali potpunu inhibiciju porasta micelija pri 100 µg/mL. Nikotinamidni derivat (12) pokazao je najbolje antifungalno djelovanje, ali bez značajne razlike od kontrole. Nikotinamidni derivati (8), (9), (10) i izonikotinamidni derivat (12) pokazali su jednako djelovanje kao komercijalni fungicid na porast micelija *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*. *F. culmorum* bio je najmanje osjetljiv na sve spojeve. Kvaterne piridinijeve soli imaju potencijal za razvoj ekološki prihvatljivijih fungicida što zahtijeva daljnje istraživanje i optimizaciju.

Broj stranica: 169

Broj slika: 23

Broj tablica: 37

Broj literaturnih navoda: 242

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antifungalno djelovanje, nikotinamidni derivati, izonikotinamidni derivati, *Fusarium*, *Botryotinia*, *Sclerotinia*

Datum obrane: 3. veljače 2025. godine

Povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek – predsjednica
2. prof. dr. sc. Mirjana Brmež, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek – članica
3. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek – članica

Disertacija je pohranjena u: Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Postgraduate university study: Agricultural sciences

Course: Plant protection

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Agriculture

Branch: Phytomedicine

ANTIFUNGAL EFFECT OF QUATERNARY PYRIDINIUM COMPOUNDS ON PHYTOPATHOGENIC POLYPHAGOUS FUNGI OF THE GENERA *FUSARIUM*, *BOTRYOTINIA*, AND *SCLEROTINIA*

Tamara Siber, M. Eng. Sc., Agriculture

Thesis performed at Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Supervisor: Prof. Karolina Vrandečić, PhD, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Co-supervisor: Valentina Bušić, PhD, Assistant professor, Faculty of Food Technology Osijek

Plant diseases caused by the genera *Fusarium*, *Botryotinia*, and *Sclerotinia* significantly reduce crop yields and quality. Their resistance and pathogenicity make control challenging. Quaternary pyridinium salts, including nicotinamide and isonicotinamide derivatives, are less toxic and environmentally harmful than commercial fungicides. This study investigated the antifungal activity of quaternary pyridinium compounds against *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *S. sclerotiorum*, and *B. cinerea*. The effects on mycelial growth, conidial/sclerotial viability, and germ tube development were evaluated in vitro at 10 and 100 µg/mL. The results showed significantly better antifungal activity on *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, and *B. cinerea* than the control. For *F. culmorum*, nicotinamide compounds at 100 µg/mL exhibited the highest efficacy, whereas isonicotinamide compounds showed concentration-independent effects. Similarly, analysis of variance confirmed a statistically significant inhibition of *B. cinerea* conidial germination, with 10 µg/mL proving more effective. Higher concentrations (100 µg/mL) inhibited *S. sclerotiorum* sclerotia better. *In vivo*, tests on carrots, wheat, and tomatoes did not show complete inhibition of mycelial growth at 100 µg/mL. The nicotinamide derivative (12) had the best antifungal effect but with no significant difference to the control. Nicotinamide derivatives (8), (9), (10) and isonicotinamide derivative (12) had a similar effect on mycelial growth of *S. sclerotiorum* and *B. cinerea* as commercially available fungicides, while *F. culmorum* was the least sensitive to all compounds. Quaternary pyridinium salts show potential as environmentally friendly fungicides that require further research and optimization.

Number of pages: 169

Number of figures: 23

Number of tables: 37

Number of references: 242

Original in: Croatian

Keywords: Antifungal activity, nicotinamide derivatives, isonicotinamide derivatives, *Fusarium*, *Botryotinia*, *Sclerotinia*

Date of the thesis defense: February 3rd, 2025.

Reviewers:

1. Prof. Jasenka Ćosić, PhD, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek – president
2. Prof. Mirjana Brmež, PhD, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek – member
3. Prof. Dajana Gašo- Sokač, PhD, Faculty of Food Technology Osijek – member

Thesis deposited in: National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

KAZALO

1. UVOD	1
1.1. Pregled literature	3
1.1.1. Fitopatogene gljive roda <i>Fusarium</i>	3
1.1.2. Fitopatogene gljive roda <i>Sclerotinia</i>	8
1.1.3. Fitopatogene gljive roda <i>Botryotinia</i>	12
1.1.4. Kvaterne piridinijeve soli	18
1.1.5. Biološki aktivni derivati vitamina B3	18
1.2. Ciljevi istraživanja i hipoteze.....	22
2. MATERIJAL I METODE RADA	23
2.1. Izolacija i molekularna identifikacija patogena.....	24
2.2. Ispitivani spojevi	26
2.3. In vitro uvjeti istraživanja	26
2.3.1. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija.....	26
2.3.2. Utjecaj sintetiziranih spojeva na klijavost konidija i dužinu kličnih cijevi izolata <i>B. cinerea</i>	28
2.4. In vivo uvjeti istraživanja	30
2.4.1. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija <i>B. cinerea</i> – in vivo test na plodovima rajčice	30
2.4.2. Utjecaj sintetiziranih spojeva na rast klijanaca pšenice inokuliranih patogenom <i>F. culmorum</i> – in vivo test na pšenici.....	32
2.4.3. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija <i>S. sclerotiorum</i> – in vivo test na mrkvi	36
2.5. Statistička obrada podataka	38
3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	40
3.1. Rezultati in vitro istraživanja.....	40
3.1.1. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija <i>S. sclerotiorum</i>	40
3.1.2. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija <i>F. oxysporum</i>	47
3.1.3. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija <i>F. culmorum</i>	53
3.1.4. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija <i>B. cinerea</i>	60
3.1.5. Efektivno vrijeme (ET ₅₀) porasta micelija <i>S. sclerotiorum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F.</i>	

<i>culmorum</i> i <i>B. cinerea</i> pod utjecajem kvaternih piridinijevih soli	67
3.1.6. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na klijavost konidija i dužinu kličnih cijevi <i>B. cinerea</i>	79
3.2. Rezultati <i>in vivo</i> istraživanja	87
3.2.1. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija <i>S. sclerotiorum</i> – <i>in vivo</i> test na mrkvi	87
3.2.2. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija <i>B. cinerea</i> – <i>in vivo</i> test na plodovima rajčice	95
3.2.3. Utjecaj derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija <i>F. culmorum</i> <i>in vivo</i> test na klijancima pšenice	96
4. RASPRAVA	111
5. ZAKLJUČCI	131
6. LITERATURA	135
7. SAŽETAK	162
8. SUMMARY	164
9. PRILOG	166

1. UVOD

Biljne bolesti predstavljaju važnu globalnu prepreku u proizvodnji hrane i ugrožavaju njezinu sigurnost, s izravnim posljedicama po zdravlje ljudi. Infekcije fitopatogenim gljivama mogu znatno smanjiti prinose usjeva i rezultirati bitnim ekonomskim gubitcima u poljoprivrednoj proizvodnji (Wilson i Talbot, 2009.). Procjenjuje se da je svake godine pogođeno ili uništeno oko 40 % ukupne poljoprivredne proizvodnje zbog utjecaja biljnih bolesti, štetnih kukaca i korova. Unatoč sjetvi otpornih kultivara i primjeni bioloških i alternativnih mjera kontrole, upotreba fungicida i dalje ostaje ključna u zaštiti bilja (Wang i sur., 2013.). Svake se godine u svijetu primijeni oko tri milijarde tona sredstava za zaštitu bilja kako bi se suzbili štetni organizmi, ali unatoč tomu ukupni gubitci usjeva i dalje rastu (Messing i Brodeur, 2018.).

Kao i svi drugi mikroorganizmi, fitopatogene gljive pokazuju izvanrednu sposobnost promjene i prilagodbe. Neprestano se pojavljuju virulentniji/patogeniji i na fungicide rezistentni patogeni (Wang i sur., 2013.). Fitopatogene gljive, poput vrsta rodova *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Botryotinia* i nekih drugih, predstavljaju veliku opasnost za brojne važne kultivirane biljke, znatno smanjuju količinu uroda, njegovu kvalitetu i povećavaju ekonomsku štetu. Vrste su iz tih rodova polifagne, fakultativne gljive koje parazitiraju na više stotina biljnih vrsta diljem svijeta, uključujući i mnoge korove (Bolton i sur., 2006.). Te gljive mogu preživjeti u nepovoljnim uvjetima formiranjem struktura za konzervaciju, poznatih kao sklerocije (npr. *Sclerotinia* spp., *Botryotinia* spp.) i hlamidospore (*Fusarium* spp.), koje omogućavaju održavanje, prezimljavanje te širenje parazita.

Kada je riječ o pesticidima, i dalje je primjetna prisutnost njihovih neželjenih ostataka u vodi, tlu i općenito u okolišu. Prema istraživanju Ferrando (1995.) pesticidi uzrokuju otprilike tri milijuna trovanja i 200 000 umrlih godišnje, s najvećim brojem slučajeva na području Azije i Pacifika. Ovi podatci upućuju na ozbiljan globalni zdravstveni problem, posebno u regijama s visokom upotrebom pesticida i slabijim regulativama. U određenom udjelu poljoprivrednih proizvoda, bilo biljnog ili životinjskog podrijetla, utvrđeni su ostatci pesticida koji premašuju maksimalno dopuštene razine (MDK). Europska je komisija 11. prosinca 2019. godine predstavila „Europski zeleni plan” (EGD) kao inovativnu strategiju za postizanje održivosti europskog gospodarstva. Glavni je cilj plana zaštita i očuvanje prirodnih resursa EU-a te osiguranje zaštite zdravlja ljudi od rizika i utjecaja povezanih s okolišem. Očuvanje i obnova ekosustava te biološke raznolikosti, s promicanjem „od polja

do stola”: pravednog, zdravog i ekološki održivog prehrambenog sustava, ističu se kao ključna područja u tom strateškom planu. Međusobna dopuna i povezanost tih strategija iznimno su važne. Uzajamna povezanost jasno pokazuje ozbiljnost problema gubitka biološke raznolikosti i klimatskih promjena koje predstavljaju neizravnu prijetnju egzistenciji i sigurnosti hrane. Strateški plan „Od polja do stola” naglašava hitnost smanjenja ovisnosti poljoprivrede o pesticidima i gnojivima, promiče zdravu prehranu te najavljuje niz mjera za primjenu alternativnih sredstava za zaštitu bilja. Postavljeni strateški ciljevi, koji uključuju smanjenje ukupne upotrebe pesticida za 50 % i pesticida visokog rizika za 50 %, planiraju se ostvariti na razini Europske unije do 2030. godine (Fetting, 2020.).

Kemijska industrija stvara veliku količinu otpada, stoga postaje sve važnije provoditi kemijske procese na ekološki održiv način. Uzimajući u obzir ozbiljno onečišćenje okoliša, znanstvena je odgovornost usmjerena prema razvoju kemijskih spojeva i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju upotrebu i proizvodnju opasnih tvari (Bušić i sur., 2022.a).

Nikotinamid je važan heterociklički spoj koji uz nikotinsku kiselinu čini vitamin B3. Kemijski je derivat piridina. Taj bijeli kristalični prašak topljiv je u vodi i glicerolu, prisutan je u životinjskim proizvodima, cjelovitim žitaricama i mahunarkama (Sauve, 2008.). Derivati piridina izuzetno su važni kemijski spojevi s obzirom na njihova fizikalno-kemijska svojstva i obimnu biološku primjenu što uključuje djelovanje na fitopatogene gljive, bakterije, viruse i stanice raka. Kroz prilagodbu supstituenata na piridinskoj jezgri, ovi spojevi mogu biti usmjereni na različite biološke ciljeve, a njihova učinkovitost varira od umjerene do izvrsne (Altaf i sur., 2015.). Brojna znanstvena istraživanja potvrđuju njihovu antimikrobnu (Ammar i sur., 2011., Thomas i sur., 2011., Asif, 2014., Bušić i sur., 2017.), antifungalnu (Wu i sur., 2012.b, Wu i sur., 2013., Siber i sur., 2019., Bušić i sur., 2022b.), insekticidnu (Zhu i sur., 2008., Wu i sur., 2012.a) te herbicidnu djelotvornost (Jeschke i sur., 1993., Gesing i sur., 2001., Zhao i sur., 2020., Wu i sur., 2017.).

Rastuća potreba za alternativnim sredstvima za zaštitu bilja (SZB) proizlazi iz zabrinutosti za ljudsko zdravlje, očuvanje okoliša (smanjenje biološke raznolikosti) te porasta otpornosti biljnih patogena na SZB. S obzirom na rastući pritisak invazivnih vrsta i društvene zahtjeve za smanjenjem upotrebe SZB-a, pridaje se prednost biološkim mjerama kontrole i drugim ekološki prihvatljivijim pristupima (Messing i Brodeur, 2018.). Takvim pristupom, putem postupnih promjena, može se pozitivno utjecati na prevenciju i smanjenje rizika za ljudsko zdravlje te na smanjenje onečišćenja okoliša. Stoga su istraživanja o utjecaju kvaternih

piridinijevih spojeva na fitopatogene gljive vrlo važna jer bi unaprjeđenje tih mjera omogućilo razvoj novih ekološki prihvatljivih fungicida. Novi spojevi, posebice derivati vitamina B3, manje toksični i štetni za okoliš u usporedbi s većinom komercijalnih fungicida koji su danas prisutni na tržištu.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih spojeva (derivata vitamina B3) na odabrane fitopatogene polifagne vrste gljiva roda *Fusarium*, *Sclerotinia* i *Botryotinia* primjenom *in vitro* i *in vivo* testova te inhibitorni utjecaj navedenih spojeva na porast micelija, sporulaciju patogena, vijabilnost konidija/sklerocija te rast kličnih cijevi.

Odabrane vrste rodova *Fusarium*, *Botryotinia*, i *Sclerotinia* imaju iznimno važan utjecaj na poljoprivrednu proizvodnju jer uzrokuju biljne bolesti koje smanjuju prinos i kvalitetu usjeva u znatnoj mjeri. Njihova važnost i složena kontrola rezultat su njihove patogenosti, životnog ciklusa i sposobnosti preživljavanja nepovoljnih uvjeta. Razumijevanje biologije i ekologije tih patogena ključno je za razvoj učinkovitih mjera zaštite i smanjenje ekonomskih gubitaka. Pronalaženje novih i učinkovitijih djelatnih tvari za zaštitu bilja od uzročnika bolesti jedan je od iznimno važnih elemenata uspješne kontrole patogena.

1.1. Pregled literature

1.1.1. Fitopatogene gljive roda *Fusarium*

Rod *Fusarium* jedan je od najraširenijih i ekonomski najvažnijih rodova gljiva. Prvi ga je put opisao njemački prirodoslovac i botaničar Johann Henrich Friedrich Link 1809. godine, a u Friesovoj je taksonomiji naveden tek 1821. godine. U to vrijeme sistematika vrsta roda *Fusarium* temeljila se isključivo na morfološkim karakteristikama pojedine vrste i tvrdilo se da ima oko tisuću vrsta pripadnika tog roda (Summerell, 2019.). Razvoj znanosti, a posebno razvoj molekularnih metoda identifikacije, doveli su do zaključka da je rod *Fusarium* mnogo složeniji nego što se do tada smatralo. Trenutačna sistematika u obzir uzima nekoliko kriterija kao što su morfološke i molekularne karakteristike te specijalizaciju prema domaćinu. Vrste roda *Fusarium* ne stvaraju samo važan problem uzrokujući bolesti, već proizvode brojne mikotoksine koji mogu imati negativan utjecaj i uzrokovati bolesti kod ljudi, posebice kod imunokompromitiranih osoba (Desjardins, 2006., O'Donnell i sur., 2013.). Stoga u otkrivanju *Fusarium* vrsta može pomoći i informacija o vrsti metabolita koje proizvode određene vrste (Stepanić i sur., 2011.). Na temelju navedenih kriterija

utvrđeno je da se rod *Fusarium* sastoji od najmanje 200 vrsta raspoređenih u 20 kompleksa (Al-Hatmi i sur., 2016.). Brojni autori tvrde da je poznato i 300 *Fusarium* vrsta, ali manje od pola nije službeno opisano (Aoki i sur., 2014., Abdel-Azeem i sur., 2019., Cobo-Díaz i sur., 2019.).

Prema Mycobank mrežnoj bazi, jednoj od najrelevantnijih, poznato je i više od 1600 *Fusarium* vrsta (<https://www.mycobank.org/>). Prema trenutačnoj sistematici sve vrste roda *Fusarium* pripadaju porodici *Nectriaceae*, redu *Hypocreales*, razredu *Sordariomycetes* te pododjelu *Ascomycota* (<https://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

Gljive roda *Fusarium* globalno su rasprostranjene u različitim klimatskim područjima. Zahvaljujući velikoj sposobnosti prilagodbe, pojedine su vrste prisutne u tropskom i suptropskom području, pojedine na području umjerene klime, dok su neke ograničene na specifična područja i združene s određenim zajednicama biljaka (Lević, 2008.).

Vrste roda *Fusarium* napadaju velik broj kultiviranih biljaka (pšenica, ječam, kukuruz, krumpir, rajčica, krastavci) među kojima se, po važnosti, u našoj zemlji mogu izdvojiti kukuruz i pšenica.

Vrste tog roda uzrokuju različite tipove bolesti kao što su: truljenje sjemena, palež klijanaca (pšenica, ječam, kukuruz), trulež korijena (*Fusarium* root rot FRR), korijenova vrata (*Fusarium* crown rot FCR), donjeg dijela stabljike, palež klasova (*Fusarium* head blight FHB-strna žita), trulež klipa (kukuruz), venuće biljaka (*Fusarium* wilt – rajčica, krastavci, karanfil). Izvor zaraze može biti kontaminirano sjeme, tlo zaraženo patogenom ili alternativni biljni domaćini. Fusarioze se očituju kroz različite simptome, uključujući zaostajanje u rastu, žutilo i venuće lišća te pojavu crvenkastih promjena na ksilemskim žilama (vidljivih kao crte ili točkice na poprečnom presjeku stabljike). Također, u vlažnim uvjetima, česta je pojava bijele, ružičaste ili narančastožute prevlake micelija na vanjskoj strani zahvaćenih stabljika, klasova ili klipova domaćina. Mogu se primijetiti i oštećenja korijena ili propadanje stabljike (Okungbowa i Shittu, 2012.). Međutim, pojedine *Fusarium* vrste mogu istovremeno uzrokovati višestruke simptome i različite tipove bolesti što ovisi o domaćinu i okolišu.

Palež klasova, trulež klipa, truljenje sjemena i zrna uzrokovane su različitim *Fusarium* vrstama i najčešće ograničene na usjeve žitarica. Tako je na pšenici najčešći uzročnik bolesti *Fusarium graminearum* Schwabe, na kukuruzu je to *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, dok je na sirku *Fusarium thapsinum* Klittich, J. F. Leslie, P. E. Nelson &

Marasas. Iako se trulež stabljike javlja na velikom broju domaćina, njezina pojava najznačajnija je na kukuruzu, sirku, pšenici i ječmu (Brown i Proctor, 2013.).

Uobičajeni uzročnici venuća biljaka obično pripadaju kompleksu vrsta *Fusarium oxysporum* Schltdl. (*formae speciales*). Tako patogen *F. oxysporum* f. sp. *niveum* inficira lubenicu, a salata i rajčica podložne su infekcijama *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* i *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Zhang i sur., 2005.). Zaraza se širi iz korijena na nadzemne provodne organe biljaka. Dolazi do začepljenja provodnog sustava te smanjenja ili potpunog zaustavljanja protoka vode i hranjivih tvari iz korijena prema nadzemnim dijelovima biljke. Posljedično dolazi do pojave venuća dijela ili cijele biljke (Baayen i sur., 2000.).

Najrasprostranjenije bolesti koje uzrokuju vrste *Fusarium* vjerojatno su truleži korijena i donjeg dijela stabljike. Otkrivanje uzročnika tih bolesti može biti izazovno u mnogim slučajevima jer se mogu pojaviti u biljkama koje su već pogođene drugim abiotским čimbenicima ili su istodobno zaražene slabijim patogenima ili saprofitima. Vrste poput *Fusarium pseudograminearum* O'Donnell & T. Aoki, *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. i *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. uzrokuju trulež korijena i donjeg dijela stabljike, rezultirajući nedostatnim ili neučinkovitim korijenskim sustavom te povećanom osjetljivošću na polijeganje i propadanje (Brown i Proctor, 2013.).

F. graminearum često uzrokuje palež klasa i ubraja se među deset najvažnijih biljnih patogena zbog njegove ekonomske važnosti kao i *F. oxysporum* (uzročnik venuća i truleži stabljike) (Dean i sur., 2012.). Ipak, *F. oxysporum* predstavlja kompleks vrsta koji čine brojne *formae speciales* s različitim specifičnostima domaćina (Gordon i Martyn, 1997.).

F. culmorum na pšenici uzrokuje trulež korijena i palež klasa. Ako patogen napadne biljku neposredno nakon sjetve, dolazi do propadanja klijanaca prije ili biljčica nakon nicanja. Ako zaraženi klijanci niknu, na mladim klijancima, njihovim koleoptilima i korijenju javlja se promjena boje. Ako infekcija nastupi kasnije tijekom vegetacije, pojavljuju se smeđe lezije na prvim dvama ili trima internodijima glavne vlati, a pri visokoj vlažnosti zraka mogu se uočiti crvenkastoružičaste sporodohije. Na zaraženim klasićima najprije se pojave svjetlosmeđe mrlje koje kasnije potamne.

Tijekom četverogodišnjeg istraživanja na području Osječko-baranjske županije, Ćosić i Jurković (2001.) utvrdili su da je *F. culmorum* jedna od najpatogenijih vrsta za pšenicu. Brojni znanstvenici također ističu da je *F. culmorum* s *F. graminearum* i *F.*

pseudograminearum jedan od glavnih patogena pšenice u svijetu (Aoki i sur. 2014., Hogg i sur., 2010., Miedaner i sur., 2008., Wang i sur., 2006., Wagacha i Muthomi, 2007.). Kombinacija različitih preventivnih mjera, uključujući rotaciju usjeva, odabir zdravog sjemena, pravilnu gnojidbu, upravljanje vlagom te biološku, kemijsku i genetsku kontrolu, ključna je za učinkovito suzbijanje fuzarioza (Dweba i sur., 2017.). Primjena je fungicida česta mjera zaštite od uzročnika fuzarioza, posebno u intenzivnim sustavima uzgoja žitarica. Djelatne tvari kao što su azoksistrobin, propikonazol, protiokonazol, tebukonazol ili njihove kombinacije često se koriste za suzbijanje folijarnih bolesti i bolesti klasa pšenice, najčešće početkom ili do sredine cvatnje (Freije i Wise, 2015., Bolanos-Carriel, 2020.). Uspoređujući djelovanje strobilurinskih i triazolnih fungicida, istraživanja potvrđuju veću učinkovitost triazolnih fungicida. Pirgozliev i sur. (2002.) tvrde da je djelatna tvar azoksistrobin manje učinkovita u smanjenju FHB-a u usporedbi s metkonazolom. Također, Paul i sur. (2018.) otkrili su da su triazolni fungicidi primijenjeni na pšenicu u stadiju cvatnje učinkovitiji u smanjenju FHB-a nego strobilurinski fungicidi. Međutim, iako smanjuju zarazu, učinkovitost triazolnih fungicida, kao što su tebukonazol, metkonazol i protiokonazol, obično ne prelazi 52 % (Paul i sur., 2008.).

Prema podacima iz Fitosanitarnog informacijskog sustava (FIS), u Hrvatskoj su trenutačno dopušteni fungicidi za suzbijanje *Fusarium* vrsta koji sadržavaju sljedeće djelatne tvari: azoksistrobin, trifloksistrobin, piraklostrobin, tebukonazol, protiokonazol, metkonazol, difenokonazol, bromkonazol, tritikonazol, mefentriflukonazol, spiroksamin, fluksapiroksad, biksafen, benzovindiflupir, fludioksonil, fluorpiram i sedaksan (<https://fis.mps.hr/fis/>). U Hrvatskoj je trenutačno registrirano i nekoliko bioloških fungicida čija je primjena dopuštena u ekološkoj proizvodnji, a temelje se na različitim mikrobiološkim agensima uključujući *Pseudomonas* sp., *Trichoderma harzianum* Rifai T-22, *Bacillus amyloliquefaciens* (ex Fukomoto) soj MBI600 i *Pythium oligandrum* (<https://fis.mps.hr/fis/>).

Prema Lehoczki-Krsjak i sur. (2015.) pravovremena primjena fungicida u preporučenim dozama, vremenski uvjeti tijekom primjene i pokrivenost fungicidom bitno utječu na učinkovitost zaštite od paleži klasa. Kada je u pitanju pšenica, Paul i sur. (2018.) navode najbolju učinkovitost primjene fungicida u fazi cvatnje. D'Angelo i sur. (2014.) navode da je primjena fungicida do šest dana nakon cvjetanja gotovo jednako učinkovita kao i primjena u fazi cvatnje pšenice.

Pretjerana uporaba fungicida, osobito onih s istim mehanizmom djelovanja, neizbježno

potiče razvoj *Fusarium* sojeva otpornih na fungicide i ubrzava pojavu rezistentnosti patogena (Rojas i sur., 2018.). S obzirom na sve navedeno i na dosadašnja saznanja o brojnim neželjenim posljedicama primjene fungicida, sve je veći interes za primjenu biološke kontrole.

Biološka kontrola omogućuje zamjenu ili dopunu mjera zaštite u integriranim sustavima upravljanja bolestima. Taj pristup također nudi mogućnost primjene tijekom kasnijih fenofaza razvoja kada primjena klasičnih kemijskih fungicida više nije učinkovita ili je čak zabranjena (Jensen i sur., 2016.). U radu Legrand i sur. (2017.) navodi se nekoliko bioloških agensa koji pokazuju vrlo dobru učinkovitost u zaštiti od FHB-a i FCR-a. Posebno se navodi gljiva *Clonostachys rosea* koja se pokazala jednako učinkovitom u smanjenju intenziteta bolesti i broja zaraženih zrna *Fusarium* vrstama kao i kod biljaka tretiranih tebukanozolom (Xue i sur., 2014.).

Prema istraživanju Pavlovskaya i sur. (2020.), u *in vitro* uvjetima, ispitan je inhibicijski učinak triju vrsta rodova *Trichoderma* (*Trichoderma atrobrunneum* F.B. Rocha, P. Chaverri & W. Jaklitsch, *T. harzianum*, *Trichoderma lixii* (Pat.) P. Chaverri) na patogene *F. oxysporum* i *Fusarium fujikuroi* Nirenberg. Nakon deset dana *T. atrobrunneum* pokazuje potpunu inhibiciju porasta micelija na objema *Fusarium* vrstama. Također, *T. lixii* pokazuje značajan potencijal kao bioagens s inhibicijom rasta *F. oxysporum* od 59 % te potpunom inhibicijom rasta *F. fujikuroi* od 100 %.

Slično navedenom, Davari i Ezazi (2022.) utvrdili su visoku sposobnost *T. harzianum* za inhibiciju porasta micelija vrsta roda *Fusarium*. Tretmani endofitnom gljivom *Serendipita indica* (Sav. Verma, Aj. Varma, Rexer, G. Kost & P. Franken) M. Wei, Waller, A. Zuccaro & Selosse utječu na smanjenje intenziteta pojave truleži krune korijena i fuzarijske paleži klasa pšenice do 70 % (Rabiey i Shaw, 2016.). Slični rezultati dobiveni su i primjenom benefitnih bakterija poput *B. amyloliquefaciens*, *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) (Baffoni i sur., 2015., Zheng i sur. 2020.) i *Pseudomonas fluorescens* Migula (Wang i sur., 2015.). Sredstva za biološku kontrolu također se mogu primijeniti na ostatke usjeva kako bi se smanjila razina inokuluma u tlu.

Prema Abaya i sur. (2021.a) endofitna gljiva *Simplicillium lamellicola* (F.E.V. Sm.) Zare & W. Gams pokazuje antagonističko djelovanje. Istraživanje upućuje na značajno smanjenje dužine lezija (do 87 %) na klijancima pšenice nakon infekcije gljivom *F. graminearum*. Isti autori istraživali su učinak istog endofita *S. lamellicola* na dvjema sortama pšenice,

primjenom u cvjetanju tri dana prije inokulacije patogenom. Rezultati pokazuju smanjenje broja zaraženih klasića pšenice za 75 – 88 % kod umjereno otporne sorte i za 68 % kod osjetljive sorte (Abaya i sur., 2021.b).

Brojnim istraživanjima utvrđeno je da eterična ulja imaju izvanrednu sposobnost inhibicije porasta micelija različitih *Fusarium* vrsta što otvara mogućnost njihove uporabe kao alternativnih sredstava za kontrolu tih patogena (Davari i Ezazi, 2022., Palfi i sur., 2019., Muñoz Castellanos i sur., 2020., Timofte i sur., 2018.). Prema istraživanju Perczak i sur. (2019.) eterična ulja kao što su cimet, oregano, palmarosa (tropska ruža) i metvica značajno inhibiraju rast micelija *F. culmorum* i *F. graminearum*, s inhibicijskim učinkom u rasponu od 90,99 do 99,99 %.

1.1.2. Fitopatogene gljive roda *Sclerotinia*

Prvi opis gljive *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary dala je M. A. Libert još 1837. godine pod nazivom *Peziza sclerotiorum* Lib. Kada je Fuckel (1870.) opisao rod *Sclerotinia*, promijenio je naziv iz *P. sclerotiorum* u *Sclerotinia libertiana* Fuckel (*P. sclerotiorum* i *Sclerotinia sclerotii* Fuckel navedeni su kao sinonimi). Taj su naziv mikolozi prihvatili i upotrebljavali sve dok Wakefield (1924.) nije uputio na nepravilnost naziva prema Međunarodnom kodeksu botaničke nomenklature. Također, netočno je navedeno da je naziv *S. sclerotiorum* prvi put upotrijebio G. E. Massee 1895. godine (Bolton i sur., 2006.). Naziv *S. sclerotiorum* (Lib.) Massee rabio se sve do 1979. godine kada je Purdy utvrdio da je naziv *S. sclerotiorum* prvi put spomenuo de Bary 1884. godine. Stoga se danas taj patogen navodi pod nazivom *S. sclerotiorum*. Postoji više naziva za bolest uzrokovanu tim patogenom, uključujući vodenastu meku trulež, pamučnu trulež, pamučnu meku trulež, trulež stabljike, prijelom stabljike, trulež cvjetanja, trulež krune korijena, trulež *sclerotinia*, a najpoznatiji je naziv bijela plijesan ili bijela trulež (Hossain i sur., 2023.). *Sclerotinia* je rod gljiva koji sadržava oko 270 poznatih vrsta (<https://www.mycobank.org/>). Prema trenutačnoj sistematici vrste roda *Sclerotinia* pripadaju porodici *Sclerotiniaceae*, redu *Helotiales*, razredu *Leotiomyces*, pododjelu *Ascomycota* (<https://www.indexfungorum.org/Names/>).

Najvirulentniji predstavnik roda *Sclerotinia* jest vrsta *S. sclerotiorum* koja ima široku ekološku rasprostranjenost i izuzetno širok raspon domaćina (Lehner i sur., 2017). Prema Boland i Hall (1994.) utvrđeno je da je 408 vrsta biljaka (najčešće dvosupnice) iz 278 rodova i 75 porodica osjetljivo na infekciju tim patogenom. Novija istraživanja navode i više od 500

različitih vrsta biljaka koje mogu biti domaćini *S. sclerotiorum*. Najvažniji domaćini te vrste uključuju suncokret, uljanu repicu, duhan, soju, kupus, mrkvu, rajčicu i krastavce. Osim navedenih, osjetljive su i biljke poput graha, krumpira, bamije, nevena, graška te različite vrste cvijeća (Prova i sur., 2017., Prova i sur., 2018., Huzar-Novakowski i sur., 2017., Young i sur., 2004., Derbyshire i Denton-Giles, 2016., Islam i sur., 2021.). Gljiva *S. sclerotiorum* patogen je kojemu pogoduje hladnije vrijeme s visokom relativnom vlagom te optimalnom temperaturom 15 – 21 °C (Euteneuer i sur., 2019.). Kao nekrotrof, taj patogen može izazvati razgradnju staničnih stijenki zahvaljujući svojoj sposobnosti proizvodnje različitih litičkih enzima (endopektinaza, eksopektinaza, celulaze, hemicelulaze i proteaze) kao i oksalne kiseline koja ima ključnu ulogu u patogenezi (Rollins i Dckman, 2001., Albert i sur., 2022.).

Bolesti uzrokovane tim patogenom ne samo da smanjuju prinos već dovode i do propadanja usjeva. Kod uljarica, poput soje, uljane repice i suncokreta, smanjuju kvalitetu zrna, sadržaj ulja, težinu zrna i broj sjemenki u glavi (Bolton i sur., 2006., Saharan i Mehta, 2008., Peltier i sur., 2012., Jurković i sur., 2017.). Prema Van Becelaere i Miller (2004.) u Europi, SAD-u i Argentini, kada se bolest pojavi u epidemijskim razmjerima, štete koje nastaju kao posljedica truleži glava suncokreta mogu dosegnuti i do 100 %. Gubitci uzrokovani *S. sclerotiorum* variraju ovisno o zemljopisnom položaju i vrsti usjeva. Često dolazi do smanjenja prinosa za više od 35 %, dok u umjerenim klimatskim područjima gubitci mogu prelaziti 50 % (Alkoorane i sur., 2017.). Ni i sur. (2014.) također ističu ekonomsku važnost pojave *S. sclerotiorum* na uljanoj repici u Kini gdje godišnje *S. sclerotiorum* zarazi gotovo 4 – 7 milijuna hektara. *S. sclerotiorum* uzročnik je i jedne od najdestruktivnijih bolesti mrkve tijekom rasta i skladištenja nakon žetve pri čemu se bilježe gubitci mrkve i do 50 % (Kora i sur., 2003., Elsherbiny i Taher, 2018.).

S. sclerotiorum ima širok raspon domaćina i uzrokuje različite simptome ovisno o biljnoj vrsti i zahvaćenom organu. Unatoč tomu, bijeli paučinasti micelij, poznat kao bijela plijesan, lako je prepoznatljiv na svakom domaćinu. Prvi znak infekcije na lišću, peteljka, stabljikama i reproduktivnim organima očituje se kao vodenaste lezije s izraženim rubom. Lezije postaju izbijeljene i nekrotične, dok se za vrijeme vlažnog vremena razvija bijeli paučinasti micelij što dovodi do venuća i raspadanja tkiva.

Zaraza korijena mrkve patogenom *S. sclerotiorum* obično potječe od zaraženog lišća na polju i širi se putem korijenske krune (Finlayson i sur., 1989.). Simptomi zaraze mrkve najčešće

se pojavljuju nakon berbe, posebno tijekom skladištenja (Higgins i sur., 2023.). Na kruni korijena mrkve primjećuju se prozirne nakupine koje kasnije postaju pljesnive i prekrivene bijelim paučinastim micelijem koji se razvija u bijele, a zatim u crne sklerocije (Le Clerc i sur., 2020.).

Kao posljedica truleži korijena ili stabljike suncokreta, prvi nadzemni simptom venuća postaje vidljiv. Iznenadno venuće može se dogoditi prije ili tijekom cvatnje. Patogen također napada glavu suncokreta, uzrokujući truljenje unutarnjeg dijela glavice, raspadanje tkiva i formiranje velikih sklerocija (Mathew i sur., 2020.).

Pri infekciji uljane repice simptomi se pojavljuju na glavnoj stabljici, granama ili mahunama u obliku izbijeljenih, sivkastih lezija. Također, jedan od simptoma jest i prisutnost crnih sklerocija unutar zaraženih stabljika. Biljke uljane repice rano cvjetaju, a zaraženi dijelovi biljnog tkiva venu što rezultira polijeganjem tijekom cvatnje i zriobe sjemena (Derbyshire i Denton-Giles, 2016.).

Taj patogen, kako i samo ime navodi, proizvodi sklerocije. Na površini ili unutar zaraženog tkiva pojavljuju se konzervacijski organi, odnosno sklerocije koje služe za prezimljavanje i širenje parazita (Bolton i sur., 2006., Hossain i sur., 2023.). Oblik sklerocija može varirati, najčešće su okrugle ili cilindrične, a njihova se veličina kreće od 2,0 do 20,0 mm (Prova i sur., 2018., Jahan i sur., 2022., Islam i sur., 2021.). Brojna istraživanja potvrđuju dugotrajnu vitalnost sklerocija što je jedan od glavnih razloga za otežanu kontrolu *S. sclerotiorum*. Cook i suradnici (1975.) utvrdili su da 78 % sklerocija može preživjeti do tri godine u neobrađenu tlu, dok su Ćosić i sur. (2012.) utvrdili da su sklerocije zadržale 100 % vitalnosti nakon istog razdoblja. Sklerocije mogu ostati sposobne klijati i uzrokovati infekciju do sedam godina (Williams i Stelfox, 1980.). Sklerocije smještene na dubini od 10 do 30 cm ostaju vitalne dulje u usporedbi s onima na dubini od 5 cm (Ćosić i sur., 2012., Cook i sur., 1975.). S druge strane Duncan i sur. (2006.) zaključili su da se vitalnost sklerocija smanjuje s povećanjem dubine tla.

Bolesti koje uzrokuje patogen *S. sclerotiorum* predstavljaju važan izazov za njihovu kontrolu. Teškoće u suzbijanju tog patogena proizlaze iz njegove sposobnosti stvaranja sklerocija otpornih na kemijsku i biološku razgradnju, njihove dugotrajne vitalnosti te proizvodnje askospora koje se prenose na velike udaljenosti. Dodatno, nedostatak otpornih kultivara, genetska varijabilnost patogena i sve češća pojava rezistentnosti na fungicide također otežavaju kontrolu *S. sclerotiorum* (Smolińska i Kowalska, 2018.). Uspješna

kontrola tog patogena zahtijeva primjenu niza mjera kojima bi se smanjili zaraza i širenje bolesti. Ekološki su najprihvatljivije agrotehničke mjere kojima se osigurava smanjenje broja sklerocija u tlu (rotacija usjeva, obrada tla, drenaža tla, prorjeđivanje biljaka). Kod mrkve se obrezivanje lišća pokazalo vrlo učinkovitim u smanjenju zaraze, bez negativnog utjecaja na prinos (McDonald i sur., 2008.). Primjena tih mjera može smanjiti mogućnost zaraze i održavati zdravlje usjeva. Zbog širokog raspona domaćina patogena, važno je praćenje i uklanjanje korova kao domaćina na polju (Mazumdar, 2021.).

Primjena fungicida često ostaje najučinkovitiji pristup u kontroli *S. sclerotiorum* (Vieira i sur., 2003., Paula Junior i sur., 2009., Derbyshire i Denton-Giles, 2016.). Primjena fungicida tijekom cvatnje uljane repice pokazala se kao učinkovita mjera za sprječavanje infekcije askosporama na poljima koja su prethodno pogođena bolestima uzrokovanim tim patogenom. Prema istraživanju Liu i sur. (2021.) fungicidi koji se mogu koristiti za suzbijanje tog patogena uključuju fludioksonil, metkonazol, karbendazim i boskalid. Preporučuje se kombinacija metkonazola s fludioksonilom.

Wang i sur. (2023.) istraživanjem su potvrdili snažan inhibicijski učinak fluksapiroksada na *S. sclerotiorum* pri umjerenim koncentracijama. Također, njihova istraživanja pokazuju da nema unakrsne rezistencije s drugim aktivnim tvarima poput tebukonazola, prokloraza, dimetklona, karbendazima, procimidona, piraklostrobina, boskalida, fluazinama, fludioksonila i ciprodinila.

U Hrvatskoj su trenutačno dopušteni fungicidi za suzbijanje patogena *S. sclerotiorum* koji sadržavaju djelatne tvari kao što su tebukonazol, metkonazol, protiokonazol, difenkonazol, mefentriflukonazol, trifloksistrobin, azoksistrobin, piraklostrobin, boskalid, fluksapiroksad, izofetamid, fludioksonil, kabendazim, fluorpiram i ciprodil (<https://fis.mps.hr/fis/>).

S obzirom na nedostatak otpornih kultivara i ekološki prihvatljivih pristupa, naglašen je potencijal biološke kontrole. U Hrvatskoj su registrirani različiti biološki fungicidi koji se koriste mikrobiološkim agensima: *T. harzianum* T-22, *B. amyloliquefaciens* soj MBI600 i *P. oligandrum* (<https://fis.mps.hr/fis/>).

Istraživanja pokazuju da antagonistički organizmi i eterična ulja imaju važan inhibicijski učinak na porast micelija *S. sclerotiorum* te doprinose smanjenju broja sklerocija u tlu. Istraživanje je pokazalo da prirodni fungicid na bazi eteričnog ulja metvice značajno smanjuje rast micelija i klijanje sklerocija *S. sclerotiorum* na mrkvi tijekom skladištenja. Iako komercijalni fungicid ima bolji dugotrajan inhibicijski učinak, prirodni fungicid ostaje

preporučljivo rješenje za kratkotrajno skladištenje mrkve (Ojaghian i sur., 2020.). Pokazalo se da eterična ulja timijana i limunske trave značajno inhibiraju rast *S. sclerotiorum*. Ulje timijana rezultiralo je 100 % inhibicijom porasta micelija, slično kao pri primjeni fungicida. Eterično ulje limunske trave također je značajno inhibiralo porast micelija patogena do 78,15 % (Mboussi i sur., 2023.). Pansera i sur. (2012.) utvrdili su inhibiciju porasta micelija i utjecaj na morfološka svojstva *S. sclerotiorum* primjenom eteričnog ulja limunske trave i pri manjim koncentracijama te ulja kadulje pri većim koncentracijama.

Istraživanja upućuju i na pozitivno djelovanje antagonističkih gljiva *T. harzianum* i *Trichothecium roseum* u inhibiciji klijanja sklerocija i porasta micelija *S. sclerotiorum*. Osim što inhibira rast micelija, *T. harzianum* također znatno poboljšava rast i razvoj mrkve (Singh, 1991., Patkowska i sur., 2020.).

Primjena antagonističkih bakterija rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kod mrkve pokazala je inhibitorni učinak na rast micelija tog patogena. Vrste *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn i *Pseudomonas arsenicoxydans* pokazale su se kao najučinkovitije u inhibiciji porasta micelija te gljive (Meyer, 2022.). Prskanje uljane repice tijekom cvatnje bakterijama *B. subtilis* i *Bacillus cereus* Frankland and Frankland učinkovito suzbija trulež stabljike. Primjena tih bakterija smanjila je pojavu bolesti za 11,8 % (Hu i sur., 2014.). Istraživanje Kamal i sur. (2015.) pokazalo je da dvije primjene *B. cereus* u razmaku od sedam dana bitno smanjuju pojavu truleži stabljike uljane repice, na 9,3 %, dok je u kontrolnoj skupini, bez primjene *B. cereus*, pojava bolesti dosegla 29,8 %.

Zaštita od *S. sclerotiorum* zahtijeva sveobuhvatan pristup i primjenu više mjera kontrole. Prema brojnim istraživanjima, biološka sredstva pokazala su važan potencijal u suzbijanju tog patogena. Međutim, za dugoročnu i učinkovitu kontrolu potrebno je primjenjivati plodored, otporne kultivare te biološku i kemijsku zaštitu.

1.1.3. Fitopatogene gljive roda *Botryotinia*

Rod *Botryotinia* smatra se jednim od najistraživanijih rodova gljiva (Garfinkel, 2021). Prema klasifikaciji Hennebert iz 1973. u okviru roda *Botrytis* identificirano je 22 vrste. Imenovanje vrsta roda *Botrytis* temelji se na njihovim domaćinima jer većina vrsta, osim *Botrytis cinerea* Pers., ima ograničen broj domaćina te zarazi jednu ili više vrsta unutar istog roda (Jarvis, 1977.). Identifikacija vrsta roda *Botrytis* oslanjala se na morfološke karakteristike, uključujući morfologiju kolonije, oblik i veličinu konidija te veličinu sklerocija (Hennebert,

1973.). Ipak, mnoge različite vrste imaju slične morfološke, biološke i epidemiološke karakteristike. Simptomi uzrokovani različitim vrstama često su slični.

Za određivanje uzroka bolesti obično nije dovoljno oslanjati se samo na morfološke karakteristike. Iako se *Botrytis* vrste ponekad mogu razlikovati na temelju morfoloških karakteristika, najpouzdanije metode identifikacije vrste obično su molekularne metode (Garfinkel, 2021.). Identifikacija vrsta može biti korisna za otkrivanje potencijalnih izvora zaraze što je važno pri donošenju odluka o mjerama kontrole (Holz i sur., 2007). Na temelju morfoloških i molekularnih karakteristika do danas je otkriveno i priznato više od 34 vrste tog roda (Williamson i sur., 2007., Ferrada i sur., 2016, Garfinkel i sur., 2017, Zhong i sur., 2019). Prema trenutačnoj sistematici vrste roda *Botryotinia* pripadaju porodici *Sclerotiniaceae*, redu *Helotiales*, razredu *Leotiomyces*, pododjelu *Ascomycota* (<https://www.indexfungorum.org/Names/>).

Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel, poznata i kao *B. cinerea* u anamorfnom stadiju, predstavlja glavni i najčešće izolirani patogen unutar roda *Botryotinia*. Taj patogen prvi je put opisala Christiaana Hendrik Persoon 1794. godine (Bojkov, 2022.). Vrste roda *Botrytis* dijele morfološke sličnosti s drugim rodovima gljiva iz porodice *Sclerotiniaceae* pri čemu je spolni stadij izrazito sličan spolnom stadiju vrsta *Sclerotinia*. Stoga je nastajala zbunjenost u taksonomiji, posebno zbog sličnosti simptoma koje izazivaju *Botryotinia* spp. i *Botrytis* spp. s onima koje uzrokuje *Sclerotinia* spp. (Garfinkel, 2021.). Međutim, Gregory je 1949. godine potvrdio da su *B. fuckeliana* i *B. cinerea* zapravo ista gljiva u različitim stadijima, odnosno u teleomorfnom i anamorfnom stadiju svojeg životnog ciklusa.

Kada je riječ o patogenu *B. cinerea*, njegova prilagodba na različite klimatske uvjete očituje se u njegovoj širokoj distribuciji na različitim zemljopisnim područjima, protežući se od tropskih i suptropskih područja do hladnih umjerenih te sjevernih i južnih područja. *B. cinerea* uzrokuje velike gubitke pri uzgoju na otvorenom i usjevima uzgajanim u zaštićenim prostorima u svim fenofazama razvoja biljaka (Williamson i sur., 2007.). Prema istraživanju istih autora *B. cinerea* napada više od 500 vrsta biljaka, dvosupnice i jednosupnice koje su gospodarski vrlo važne. Prema istraživanju Elad i sur. (2016.) vrsta *B. cinerea* napada 596 rodova biljaka i više od 1400 biljnih vrsta. Singh i sur. (2024.) navode čak 616 rodova koji su domaćini tom patogenu. Većina tih domaćina pripada dvosupnicama, s 447 rodova, a jednosupnice čine 128 rodova.

Gubitci prinosa rajčice kao posljedica zaraze vrstom *B. cinerea* često se javljaju u zemljama

mediteranske regije. Gubitak prinosa rajčice javlja se pri uzgoju na otvorenom, ali ozbiljnije štete najviše nastaju u zaštićenom uzgoju (Aissat i sur., 2008., Baptista i sur., 2012.).

Gubitak prinosa uslijed zaraze *B. cinerea* može biti 20 – 40 %, posebno pri optimalnim uvjetima, 15 – 20 °C i vlažnosti zraka iznad 90 % (Carisse i Van der Heyden, 2015., Jia i sur., 2011., Utkhede i Mathur, 2006.). U zaštićenim uvjetima uzgoja jake infekcije nastaju kombinacijom visoke temperature (oko 25 °C), rana na stabljikama (nastalih uslijed odstranjivanja lišća i rezidbe) i visoke koncentracije konidija u zraku (Carisse i Van der Heyden, 2015.).

Botrytis vrste poznate su kao nekrotrofi jer primjenjuju strategiju izazivanja smrti stanica domaćina prije nego što razgrade biljno tkivo kako bi si osigurale pristup hranjivim tvarima (Williamson i sur., 2007.). Istraživanja također opisuju i sistemične, asimptomatske infekcije unutar domaćina uzrokovane vrstom *Botrytis deweyae* van Kan, R.B. Terhem & Grant-Downt. što sugerira na mogućnost da se gljiva ponaša i kao endofit (Van Kan i sur., 2014., Shaw i sur., 2016.). *B. cinerea* često i lako inficira domaćina putem rana i prirodnih otvora na tkivu. Međutim, patogen posjeduje specijalizirane strukture i mehanizme prodora u zdravo, neoštećeno tkivo domaćina. Konidije dospjele na površinu biljke kličaju stvarajući klične cijevi koje se dalje razvijaju u apresorij. Na kraju apresorija formira se infektivna hifa koja prodire u domaćina (Veloso i van Kan, 2018., Singh i sur., 2024.).

Tijekom zimskih mjeseci *B. cinerea* može preživjeti u ostacima usjeva kao saprofit. Njegova sposobnost preživljavanja obuhvaća različite strukture kao što su micelij s konidijama ili sklerocijima. Te strukture ostaju unutar odumrlog tkiva domaćina, zaraženih biljnih ostataka ili u tlu nakon završetka vegetacijske sezone (Elmer i Michailides, 2007., Grant-Downton, 2016.). Različite strukture preživljavanja omogućuju patogenu širenje na usjeve i skladišna područja u idućim godinama. U povoljnim vremenskim uvjetima te strukture proizvode konidije koje se šire zrakom do površine biljke domaćina, pokrećući primarne infekcije (Cole i sur., 1996., Williamson i sur., 1995.). Također, u višegodišnjim usjevima odumrlo lišće, cvijeće i mumificirani plodovi sadržavaju masu micelija koji se često može smjestiti unutar krošnje usjeva što olakšava stvaranje konidija i pokretanje infekcija (Williamson i sur., 2007.)

B. cinerea smatra se jednim od najdestruktivnijih patogena u poljoprivredi, posebice kada je riječ o voću, povrću i cvijeću prije berbe te nakon žetve u njihovu skladištenju i transportu (Jarvis, 1977., Williamson i sur., 2007.). Napada različite dijelove biljke domaćina tijekom

različitih stadija njezina razvoja, od faze klijanja pa sve do sazrijevanja ploda. Može zaraziti stabljiku, cvijeće, lišće, plodove, a može biti prisutan i u sjemenu (Yahaya i sur., 2015.). Ipak, najveće štete nanosi zrelim, starijim, oslabljenim ili ozlijeđenim tkivima domaćina. Zbog zahtjeva za visokom vlažnošću i umjerenim temperaturama (s vrlo slabim ili nikakvim rastom iznad 30 °C), prisutnost *B. cinerea* na polju obično je ograničena na umjerene klimatske zone (Schumacher, 2017.).

S obzirom na velik broj biljnih domaćina, *B. cinerea* uzrokuje i mnogo nespecifičnih simptoma (Sarven i sur., 2020.). Simptomi uključuju propadanje ploda, meku trulež ploda, pojavu žutosmeđih lezija na lišću i stabljici koje se mogu proširiti u koncentrične prstenove te venuće. Karakterističan simptom tog patogena jest nakupina konidiofora i konidija u obliku sive prevlake. Pojavi tog simptoma obično prethode povoljni uvjeti za njegov razvoj, poput hladnih do umjerenih temperatura (10 – 25 °C) uz visoku vlažnost zraka (Williamson i sur., 2007., Quesada-Ocampo, 2015.). Istraživanje Ciliberti i sur. (2015.) upućuje na to da su temperatura i vlažnost zraka važniji čimbenik za jaču infekciju nego različiti sojevi *B. cinerea*.

Na rajčici taj patogen izaziva sivu plijesan često se pojavljujući na zrelim plodovima, ali može se proširiti i na lišće i stabljike. Najčešći simptom na zreлом i starijem lišću rajčice i plodovima jest pojava meke truleži koja dovodi do razgradnje parenhimskog tkiva biljke. Nakon toga javlja se formiranje sive prevlake (Sarven i sur., 2020., Rhouma i sur., 2023.). Najznačajnije štete u stakleničkom uzgoju rajčica obično su posljedica pojave bolesti na stabljikama. Često su rane nastale rezidbom ili berbom glavno mjesto infekcije putem kojih se patogen može proširiti duž cijele stabljike (Sarven i sur., 2020.). Na stabljikama se javljaju svjetlosmeđe lezije koje se brzo šire. Nakon mirovanja, lezije na stabljikama postaju bijele praćene pojavom velikih crnih sklerocija (Williamson i sur., 2007.). Siva plijesan na zrelim plodovima rajčice obično se pojavljuje nakon berbe (Sarven i sur., 2020.).

Različiti načini infekcije, sposobnost zaraze širokog spektra biljnih domaćina, visok reprodukcijski potencijal te dulja sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima u obliku sklerocija čine temelj za širenje *B. cinerea* kao patogena (Williamson i sur., 2007.). S obzirom na navedeno, opravdano je što se taj patogen nalazi na drugom mjestu među deset najvažnijih biljnih patogena (Dean i sur., 2012.). Osim toga, zbog svoje izražene tendencije razvoja otpornosti na fungicide, taj patogen postaje sve važniji u poljoprivredi i predmet je opsežnijeg znanstvenog istraživanja (Amselem i sur., 2011.).

S obzirom na raširenost i sposobnost infekcije različitih biljnih vrsta, *B. cinerea* uzrokuje ozbiljne bolesti i može napasti gotovo sve dijelove biljke prije i nakon žetve. To predstavlja izazove u kontroli tog patogena (Hua i sur., 2018., Fillinger i Elad, 2016.).

Prema istraživanju Liang i sur. (2022.) samo oko 0,1 % djelatnih tvari fungicida postiže potpunu zaštitu od ciljanog patogena, dok se 90 % primijenjenog fungicida razgrađuje tijekom primjene putem fotolize, isparavanja, razgradnje, ispiranja i otjecanja u okoliš. Unatoč stalnim upozorenjima o negativnim učincima primjene fungicida na ljudsko zdravlje i okoliš, njihova uporaba i dalje je česta metoda kontrole tog patogena (Zemmouri i sur., 2022.). *B. cinerea* razvija rezistentnost na nekoliko djelatnih tvari među kojima su procimidon, zoksamid dikarboksimidi i benzamidi (Adnan i sur., 2018.; Adnan i sur., 2019.). U istraživanju Jelenić i sur. (2024.) ispitala se osjetljivost različitih djelatnih tvari fungicida na *B. cinerea*. Rezultati istraživanja upućuju na činjenicu da su i pri najvećim primijenjenim koncentracijama pirimetanil, boskalid i fenheksamid inhibirali rast pojedinih izolata patogena manje od 90 %, dok je djelatna tvar fenpirazamin inhibirala rast patogena manje od 40 %.

Za suzbijanje patogena *B. cinerea* u Hrvatskoj su trenutačno registrirani fungicidi koji sadržavaju djelatne tvari poput azoksistrobina, piraklostrobina, trifloksistrobina, ciprodinila, pirimetanila, tebukonazola, protiokonazola, boskalida, izofetamida, fluopirama, fenheksamida, dimetomorfa, folpeta i fludioksonila. Osim toga, registrirano je nekoliko bioloških fungicida pogodnih za ekološku proizvodnju, uključujući one na bazi *Trichoderma atroviride* P. Karsten, kalijeva hidrogenkarbonata, *P. oligandrum*, sojeva M1, *B. amyloliquefaciens* i *B. subtilis* soj IAB/BS03 (<https://fis.mps.hr/fis/>).

Brojna istraživanja usmjerena na ispitivanje antifungalne aktivnosti antagonističkih organizama, biljnih ekstrakta i eteričnih ulja protiv *B. cinerea* naglašavaju mogućnost smanjenja potrebe za kemijskim fungicidima. Među ostalim, takva su istraživanja važna za smanjenje pojave rezistentnosti tog patogena. Značajan antagonistički učinak protiv *B. cinerea* pokazuju vrste roda *Trichoderma* te bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Bacillus* (Percival i sur., 2016., Hajji-Hedfi i sur., 2023., Malevu i sur., 2022.).

Antagonistički organizmi koriste svoje metabolite kako bi se borili protiv patogena radi prevencije, smanjenja i kontrole bolesti. Bakterije roda *Bacillus* privukle su veliku pozornost kao agensi za biokontrolu zbog njihove sposobnosti proizvodnje različitih antibiotika širokog spektra, toksina, enzima i endospora. Stoga se neki sojevi roda *Bacillus* rabe za

biokontrolu putem komercijalno dostupnih proizvoda (Blake i sur., 2021., Kieseewalter i sur., 2020.). Istraživanja također pokazuju da se siva plijesan na plodovima rajčice može učinkovito kontrolirati uporabom sojeva roda *Bacillus* nakon berbe (Hernández i sur., 2021. Hua i sur., 2018.).

Prema istraživanju Abbey i sur. (2019.) primjena biofungicida i njihova kombinacija s fungicidima pokazuje potencijal kao alternativa za kontrolu *B. cinerea* i smanjenje primjene kemijskih fungicida. Samo primjenom biofungicida na bazi eteričnog ulja čajevca i bakterije *B. subtilis* razvoj bolesti smanjio se za više od 42 %. U tretmanu koji uključuje biofungicide i kemijske fungicide, pojava *B. cinerea* bila je manja za više od 69 %. Istraživanje Bu i sur. (2021.) ističe mogućnost uporabe *B. subtilis* za preventivnu kontrolu sive plijesni na plodovima rajčice tijekom skladištenja. Prema njihovu istraživanju, suspenzija kulture *B. subtilis* u koncentraciji od 10^8 cfu/ml pokazala je inhibicijski učinak više od 86,57 %. Također, 48 sati nakon primjene kulture *B. subtilis* te nakon toga suspenzije spora *B. cinerea* postignuta je 100 %-tna kontrola.

U istraživanju Hajji-Hedfi i sur. (2023.) utvrđen je inhibicijski učinak *Trichoderma longibrachiatum* Rifai i *Pseudomonas* sp. na porast *B. cinerea* na sadnicama i plodovima rajčice. Rezultati pokazuju da je došlo do inhibicije rasta *B. cinerea* do 50 %, a autori ističu učinkovitu kontrolu primjenom *T. longibrachiatum* i *Pseudomonas* sp. za suzbijanje *B. cinerea* i u uvjetima skladištenja.

U istraživanju koje su proveli Tekiner i sur. (2020.) ispitan je inhibicijski učinak različitih izolata *T. harzianum*, *B. cereus*, *Bacillus megaterium* de Bary, *B. subtilis*, *Paenibacillus polymxa*, *Pantoea agglomerans* Beijerinck protiv triju različitih izolata *B. cinerea*. Rezultati su pokazali visok inhibicijski učinak *T. harzianum*. Također, izolat *B. subtilis* pokazao je visoku učinkovitost na inhibiranje porasta različitih izolata *B. cinerea* od 64, 29 %, 71, 43 % i 80,36 %.

Brojna istraživanja pokazuju visoko inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na porast micelija *B. cinerea* što navodi na potencijalnu sigurnu alternativu kemijskim fungicidima. Osim što mogu inhibirati razvoj fitopatogenih gljiva, eterična ulja mogu pružiti i dodatne koristi, uključujući poboljšanje rasta biljaka ili sprječavanje pojave drugih bolesti (Verdeguer i sur., 2020). Jelenić i sur. (2020.) proveli su *in vitro* istraživanje volatilnog djelovanja devet različitih eteričnih ulja (paprene metvice, ružmarina, kadulje, lavande, gospine trave, mravinca, timijana, smilja i stolisnika) na porast micelija patogena *B. cinerea*. Rezultati su

potvrdili da ulja paprene metvice i timijana imaju pozitivan učinak na inhibiciju porasta *B. cinerea*.

1.1.4. Kvaterne piridinijeve soli

Sprječavanje onečišćenja okoliša zbog potrebe za očuvanjem ekosustava i bioraznolikosti postavljeno je u prvi plan. Stoga kemičari modificiraju svoje sintetske postupke u skladu s načelima „*zelene kemije*“. Nažalost, otapala bez kojih se mnoge reakcije ne mogu izvesti imaju štetne učinke na zdravlje i okoliš, ali i na sigurnost same sinteze zbog svoje zapaljivosti i hlapljivosti (Bušić i sur., 2022.a).

Klasični sintetski put za dobivanje kvaternih piridinijevih soli uključuje reakciju kvaternizacije tercijarnih amina s organskim halogenidima (Bušić i sur., 2022.b). Također, u ranijim istraživanjima za reakciju kvaternizacije na piridinu kao nukleofilu autori najčešće navode da su upotrijebljena otapala poput acetona, bezvodnog benzena, dimetilformamida, suhog diklorometana i acetonitrila koja su poznata kao toksična i opasna otapala (Gašo-Sokač i sur., 2010., Pidlypnyi i sur., 2014., Marek i sur., 2015., Pernak i Rogoza, 2000., Zorbaz i sur., 2018., Lee i sur., 2021.). Međutim, sve je veći naglasak na upotrebi sigurnijih i ekološki prihvatljivijih otapala i metoda sinteze spojeva koji bi trebali biti u skladu s metodama „*zelene kemije*“. Duboka eutektička otapala postala su zanimljiva tema istraživanja zbog njihove primjenjivosti kao zelenih otapala u sintezi piridinijevih spojeva (Azizi i sur., 2013., Singh i sur. 2013., Alomso i sur., 2016., Khandelwal i sur., 2016., Shaabani i sur., 2016.). Duboka eutektička otapala klasificirana su kao „*zelena otapala*“ zbog svojeg ekološki prihvatljivog utjecaja na okoliš: biokompatibilna su, biorazgradiva, niske su hlapljivosti, nezapaljiva su i netoksična te lako dostupan polazni materijali što omogućuje lakšu pripremu uz visoku čistoću i niže troškove. Takva bi otapala mogla supstituirati hlapljiva organska otapala te na taj način smanjiti ili ukloniti stvaranje opasnih tvari u okolišu.

1.1.5. Biološki aktivni derivati vitamina B3

Poznato je da se derivati nikotinske kiseline i nikotinamida rabe već 65 godina zbog njihova širokog antimikrobnog spektra (Asif, 2014.). Supstituirana nikotinska kiselina pripada heterociklima kojima se u posljednja tri desetljeća posvećuje velika pozornost kao potencijalnim biomolekulama. Derivati nikotinske kiseline pokazuju antibakterijsko (Srivastava i sur., 2005., Kumar i sur., 2011.), antioksidacijsko (Saini i Mehta, 2022.),

protuupalno (Labanauskas i sur., 2004., Hosni i Abdulla, 2008.) i antikarcinogeno djelovanje (Şahin i sur., 2021.) te su povezani s različitim biološkim svojstvima poput pesticidnih, odnosno insekticidnih (Diaz i sur., 2009., When i sur., 2010., Sattar i sur., 2019.) i antifungalnih aktivnosti (Patel i Shaikh, 2010., Kumar i sur., 2011.).

Kozlevčar i sur. (1999.) navode da su derivati nikotinamida važna grupa heterocikličkih spojeva koji privlače sve veću pozornost u području zaštite bilja zbog njihova fungicidnog djelovanja. Također, navode da kompleksi bakrova (II) acetata i nikotinamida pokazuju snažno fungicidno djelovanje.

Među fungicidima s nikotinamidnom strukturnom jedinicom koji su dostupni na tržištu, istaknut je boskalid, jedan od vodećih spojeva širokog spektra djelovanja i inhibitora sukcinat dehidrogenaze (SDHI) koji se često rabe za prevenciju i kontrolu brojnih fitopatogenih gljiva (Wang i sur., 2022.). Boskalid je posebno učinkovit protiv fitopatogenih gljiva iz pododjela *Ascomycota*. Taj fungicid primjenjuje se za zaštitu različitih usjeva od ekonomski značajnih patogena, uključujući *Alternaria solani*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, različite vrste *Monilinia*, *Erysiphe necator* i druge (Stević, 2020.).

Prema Bušić i sur. (2020.) kvaterne soli nikotinamida pripravljene su u eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida. Primijenjena je metodologija koja je pokazala nekoliko prednosti: ekološku održivost, biorazgradivost, jednostavno pročišćavanje, jednostavnu pripremu i ekonomičnost. Ispitivani spojevi pokazali su antifungalno djelovanje na porast micelija *B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria radicina* i *F. graminearum*.

Bušić i sur. (2022.b) ispitali su djelotvornost 11 novih piridinijevih derivata i njihovo antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *B. cinerea*, *F. culmorum*, *Macrophomina phaseolina* i *S. sclerotiorum* u *in vitro* uvjetima. Sinteza piridinijevih spojeva provedena je reakcijama kvaternizacije različitim metodama: konvencionalnom metodom i metodom pod utjecajem mikrovalnog i ultrazvučnog zračenja. Uobičajena otapala, poput acetona i etanola, koja se rabe u reakcijama kvaternizacije, zamijenjena su ekološki prihvatljivijom alternativom – dubokim eutektičkim otapalima. Svi sintetizirani spojevi pokazali su izvrsnu inhibiciju porasta micelija svih navedenih fitopatogenih gljiva.

Wu i sur. (2013.) sintetizirali su i analizirali seriju derivata nikotinamida koji sadržavaju 1,3,4-oksadiazolnu jedinicu kako bi otkrili nove biološki aktivne spojeve s dobrim antifungalnim djelovanjem. Istraživanjem je otkriveno da je nova serija derivata

nikotinamida koji sadržavaju 1,3,4-oksadiazolnu jedinicu pokazala slabo do umjereno antifungalno djelovanje na porast micelija *F. graminearum*, *F. oxysporum* i *Cytospora mandshurica*. Većina sintetiziranih spojeva pokazala je slično djelovanje kao himeksozol ili veće od himeksozola na testiranim gljivama, dok su pojedini spojevi pokazali značajne izgleda za daljnju optimizaciju.

U istraživanju koje su proveli Ye i sur. (2014.) dizajnirano je i sintetizirano 38 derivata nikotinamida kao potencijalnih inhibitora suksinat-dehidrogenaze (SDHI). Ispitivanje spojeva provedeno je *in vitro* na dvjema fitopatogenim gljivama, *Rhizoctonia solani* i *S. sclerotiorum*, ispitivanjem inhibicije porasta micelija. U odnosu na komercijalne fungicide, boskalid i karbendazim, većina spojeva pokazala je umjerenu aktivnost.

Prema Wang i sur. (2016.) prekomjerna uporaba benzimidazolnih fungicida koji se koriste u cijelom svijetu protiv destruktivnih gljiva *R. solani*, *B. cinerea*, *F. graminearum* i *Magnaporthe oryzae* dovela je do niza problema, ozbiljnih onečišćenja okoliša, a razvoj je novih benzimidazolnih fungicida visoke aktivnosti, dobre selektivnosti i ekoloških svojstva izuzetno važan. Stoga je pripravljena serija benzimidazolnih fenilhidrazonskih derivata te je utvrđeno njihovo antifungalno djelovanje *in vitro* i *in vivo* na dvjema fitopatogenim gljivama (*R. solani* i *M. oryzae*). Benzimidazolni derivat s 2,4-difluorfenilhidrazinskom jedinicom pokazao je najveće antifungalno djelovanje *in vitro* na porast micelija *R. solani*.

Bušić i sur. (2019.) također su istraživali deset novih derivata izonikotinamida dobivenih reakcijama kvaternizacije izonikotinamida s metil-jodidom i devet različito supstituiranih 2-bromacetofenona pod utjecajem mikrovalnog zračenja. Antifungalno djelovanje svih spojeva ispitivano je u dvjema različitim koncentracijama na porast micelija *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *M. phaseolina* i *S. sclerotiorum*, *in vitro*. Iz antifungalnog je testa utvrđeno da određeni spojevi imaju umjereno do slabo djelovanje na porast micelija *M. phaseolina* i *F. culmorum*. Vrlo visoka stopa inhibicije primijećena je kod porasta micelija *S. sclerotiorum*.

Wang i sur. (2022.) ispitivali su antifungalno djelovanje serije od 20 derivata *N*-(1*H*-pirazol-5-il)nikotinamida na nekoliko fitopatogenih gljiva, uključujući *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*, i u *in vitro*, i u *in vivo* uvjetima. Rezultati su pokazali izuzetno dobru inhibiciju porasta micelija *S. sclerotiorum* za većinu sintetiziranih spojeva, dok je inhibicija porasta micelija *B. cinerea* bila niža. *In vivo* testovi na listovima uljane repice (*Brassica napus* L.) također su pokazali snažnu inhibiciju porasta micelija *S. sclerotiorum*. Derivat s F₂CH- skupinom na pirazolnom prstenu i klorom kao supstituentskom skupinom na piridinu pokazao je

obećavajuće antifungalno djelovanje protiv patogena *S. sclerotiorum*.

Prema nedavnom istraživanju Peng i sur. (2022.) sintetizirano je i ispitano antifungalno djelovanje 15 derivata tetrahydrogeranil kvaternih amonijevih soli na rast micelija deset fitopatogenih gljiva, uključujući dvije vrste roda *Fusarium*. Spojevi su testirani u koncentraciji od 0,25 mg/mL. Rezultati istraživanja pokazali su da sintetizirani spojevi imaju bolji antifungalni učinak u usporedbi s pozitivnom kontrolom (fungicidima), s izvrsnom inhibicijom porasta micelija *F. oxysporum* te značajnom inhibicijom porasta micelija *F. verticillioides*. Istraživanje je istaknulo važnost strukture spojeva za njihovo antifungalno djelovanje. Nadalje, Yan i sur. (2022.) sintetizirali su petnaest novih derivata piridin karboksamida i ispitali njihovo antifungalno djelovanje. Sintetizirani spojevi ispitani su u *in vitro* i *in vivo* uvjetima na rast micelija osam patogena, uključujući *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*.

In vitro ispitivanje pokazalo je da pojedini sintetizirani spojevi imaju umjereno do dobro antifungalno djelovanje na porast micelija svih ispitivanih patogena. Posebno je spoj 6-klor-N-(2-(fenilamino)fenil)nikotinamid pokazao dobro *in vivo* antifungalno djelovanje protiv porasta micelija patogena *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* te najbolje antifungalno djelovanje protiv patogena *B. cinerea*.

1.2. Ciljevi istraživanja i hipoteze

Ciljevi ovog istraživanja bili su sljedeći:

1. utvrditi antifungalno djelovanje serije kvaternih piridinijevih soli na porast micelija fitopatogenih gljiva rodova *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia*
2. utvrditi antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih soli na vijabilnost konidija/sklerocija i rast kličnih cijevi
3. utvrditi antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih soli na porast micelija i sporulaciju u *in vivo* testu
4. utvrditi razlike u antifungalnom djelovanju između kvaternih piridinijevih soli i komercijalnih fungicida na porast micelija.

Postavljene su sljedeće hipoteze:

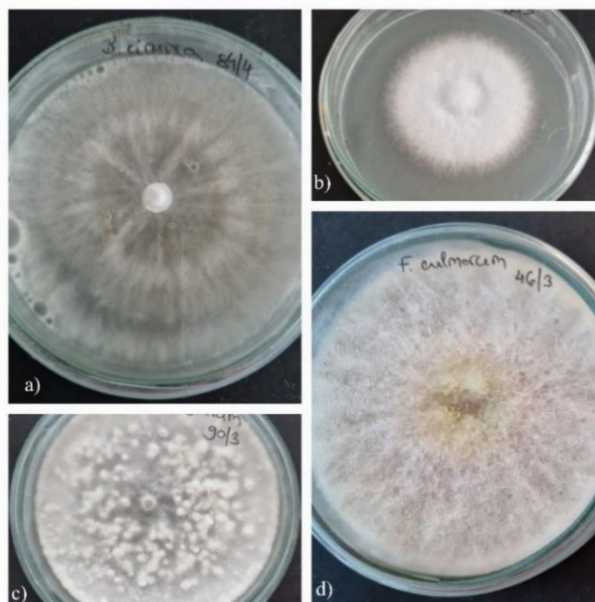
1. Kvaterne piridinijeve soli međusobno se razlikuju u antifungalnom djelovanju na porast micelija fitopatogenih gljiva rodova *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia*.
2. Kvaterne piridinijeve soli razlikuju se u antifungalnom djelovanju na vijabilnost konidija/sklerocija i rast kličnih cijevi.
3. Kvaterne piridinijeve soli razlikuju se u antifungalnom djelovanju na porast micelija i sporulaciju u *in vivo* testu.
4. Postoje razlike u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnih fungicida na porast micelija.

2. MATERIJAL I METODE RADA

In vitro testovi provodili su se u Centralnoj agrobiotehničkoj analitičkoj jedinici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Hrvatska. Kvaterne piridinijeve soli koje su se primjenjivale u svim antifungalnim testovima sintetizirane su u Laboratoriju za organsku kemiju i biokemiju na Katedri za fundamentalnu kemiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, Hrvatska.

Antifungalnim testovima ispitano je djelovanje 12 sintetiziranih spojeva iz skupine nikotinamida, koncentracije 10 µg/mL (1-12a) i 100 µg/mL (1-12). Iz skupine izonikotinamida ispitano je 11 sintetiziranih spoja u istim koncentracijama 10 µg/mL (1-11a) i 100 µg/mL (1-11). Istraživanje je provedeno u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih spojeva ispitivalo se na polifagnim gljivama rodova *Fusarium*, *Sclerotinia* i *Botryotinia* (slika 1.). Vrste su navedenih rodova sljedeće:

1. rod *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. oxysporum*)
2. rod *Botryotinia* (*B. cinerea*)
3. rod *Sclerotinia* (*S. sclerotiorum*).



Slika 1. Izolati korišteni u pokusu sedam dana od naciepljivanja: a) *B. cinerea*, b) *F. culmorum*, c) *S. sclerotiorum* i d) *F. oxysporum*

(Izvor: T. Siber)

2.1. Izolacija i molekularna identifikacija patogena

Za potrebe istraživanja antifungalnog učinka kvaternih piridinijevih spojeva, izolacija odabranih vrsta obavljena je sa zrna i biljnih dijelova koji su pokazivali simptome bolesti. Vrste *Fusarium* (*F. culmorum* i *F. oxysporum*) izolirane su sa zrna pšenice, *B. cinerea* izolirana je s ploda rajčice, dok je *S. sclerotiorum* izolirana sa stabljike rajčice.

Izolacija i determinacija vrsta

Biljni dijelovi ispirani su pod tekućom vodom, sterilnim skalpelom uzeti su dijelovi tkiva koji su zatim dezinficirani u 96 %-tnom etanolu 30 sekundi te isprani u sterilnoj destiliranoj vodi. Biljni dijelovi posušeni su filter-papirom, nakon čega su stavljani u Petrijeve zdjelice na hranjivu podlogu za uzgoj gljiva, krumpirov dekstrozni agar (KDA). Sve Petrijeve zdjelice inkubirane su u klima-komori na 22 °C i svjetlosnom režimu 12 sati dan / 12 sati noć. Pregled je obavljen trećeg, petog i sedmog dana. Kada su se razvili reproduktivni organi (micelij/konidije), subkultivacijom na čisti KDA dobivene su čiste kulture.

Morfološka identifikacija

Morfološka je identifikacija do roda obavljena na temelju reproduktivnih struktura (konidije ili sklerocije) uzimajući u obzir i kulturalne karakteristike gljiva. Budući da je slijedila molekularna identifikacija, nisu provedena biometrijska mjerenja.

Ekstrakcija DNA, amplifikacija i sekvenciranje

Za ekstrakciju DNA (dezoksiribonukleinske kiseline) korišten je micelij izolata sastrugan s ruba kolonije stare deset dana, uzgojene na KDA podlozi.

Ukupan DNA iz izolata vrsta *Fusarium* izdvojen je primjenom OmniPrep™ for Fungi PCR kompleta (G-Biosciences Co., SAD). Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase chain reduction*, PCR) za vrste *Fusarium* provedena je s pomoću para početnica translacijskog elongacijskog faktora TEF -1 α i EF2 (Karlsson i sur., 2016.). Za vrstu *S. sclerotiorum* korišten je par početnica (unutarnja prepisujuća razmaknica jezgrine ribosomske DNA) ITS1 i ITS4 (White i sur, 1990.) (tablica 1.). PCR reakcijska smjesa sastavljena je od 12,5 μ L EmeraldAmp® PCR ReadyMixa, 0,5 μ L svake početnice, 11 μ L vode bez nukleaze i 0,5 μ L genomske DNA. PCR program bio je sljedeći: početni korak denaturacije na 95 °C u trajanju pet minuta, zatim 35 ciklusa denaturacije na 94 °C tijekom 30 s, renaturacije na 55 °C

tijekom 45 s i elongacije na 72 °C tijekom jedne minute i 30 sekundi, nakon čega je uslijedio završni korak elongacije na 72 °C tijekom deset minuta (tablica 2.).

Ukupan DNA iz izolata *B. cinerea* izdvojena je korištenjem Extract-N-Amp™ Plant PCR kompleta (Sigma-Aldrich, Merck, Saint Louis, MO, SAD). PCR reakcija za izolat *B. cinerea* provedena je korištenjem parova početnica kao i za izolat *S. sclerotiorum*, ITS1/ITS4 (White i sur., 1990.) PCR reakcijska smjesa sastavljena je od 12,5 µL EmeraldAmp® PCR ReadyMixa, 0,5 µL svake početnice, 6,5 µL vode bez nukleaze i 5 µL genomske DNA. PCR program bio je sljedeći: početni korak denaturacije na 94 °C tijekom četiri minute, zatim 35 ciklusa pojačanja s denaturacijom na 94 °C tijekom 35 s, renaturacija na 52 °C tijekom 55 s i elongacija na 72 °C tijekom jedne minute. Završni korak elongacije proveden je na 72 °C tijekom deset minuta (tablica 2.). PCR reakcije provedene su korištenjem MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems). PCR produkti vizualizirani su na UV svjetlu na 1 % agaroznom gelu korištenjem Kodak EDAS 290 sustava s UV transiluminatorom (UVITEC). Pročišćavanje PCR produkata provedeno je s pomoću Wizard® SV Gel i PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, SAD), a sekvenciranje PCR produkata provedeno je s pomoću Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska). Sekvence su uređene u DNADynamo (Blue Tractor Software, North Wales, UK) i uspoređene sa sekvencama iz GenBank®.

Tablica 1. Početnice korištene za PCR i sekvenciranje

Izolati	Početnice	Sekvence
<i>B. cinerea</i>	ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
<i>S. sclerotiorum</i>	ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
<i>F. culmorum</i>	EF1 TEF -1α	ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC
<i>F. oxysporum</i>	EF2	GGA RGT ACC AGT SAT CAT G

Tablica 2. PCR program amplifikacije za ITS i EF1 α regije (*F. culmorum*, *F. oxysporum* i *S. sclerotiorum* prema Karlsson i sur. (2016.) za ITS regiju (*B. cinerea*) prema Aktaruzzaman i sur. (2017.)

ITS1/ITS4 i EF1 TEF -1 α /EF2						
Početna denaturacija 95 °C	Ciklus 35 x	Denaturacija 94 °C	Renaturacija 55 °C	Elongacija 72 °C	Završen ciklus	Elongacija 72 °C
5 min		30 s	45 s	1 min 30 s		10 min
ITS1/ITS4 (<i>B. cinerea</i>)						
Početna denaturacija 94 °C	Ciklus 35 x	Denaturacija 94 °C	Renaturacija 52 °C	Elongacija 72 °C	Završen ciklus	Elongacija 72 °C
4 min		4 min	55 s	1 min		10 min

2.2. Ispitivani spojevi

Kvaterne piridinijeve soli korištene u istraživanju sintetizirane su na Zavodu za primijenjenu kemiju i ekologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, na Katedri za fundamentalnu kemiju, te okarakterizirani spektroskopskim metodama (Bušić i sur., 2017., Siber i sur. 2019., Bušić i sur., 2019.).

Kvaterne piridinijeve soli dobivene su reakcijom kvaternizacije konvencionalnom sintezom u etanolu (Siber i sur., 2019.) te s pomoću alternativnih metoda: mikrovalnom sintezom (Siber i sur. 2019., Bušić i sur., 2019.) te sintezom u dubokim eutektičkim otapalima (Bušić i sur., 2020., Bušić i sur., 2022.). Kao nukleofili korišteni su nikotinamid i izonikotinamid u kombinaciji s različitim elektrofilima: alkil-halogenidi (metil-jodid), alkil-dihalogenidi (dibrompropan i dijodpropan) te i različito supstituirani 2-bromacetofenoni (4-Cl, 4-Br, 4-H, 4-CH₃, 4-F, 4-OCH₃, 4-Ph, 2-OCH₃, 4-NO₂). Strukture nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata prikazane su u tablicama 3. i 4. (vidjeti prilog).

2.3. In vitro uvjeti istraživanja

2.3.1. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija

In vitro testovi utjecaja sintetiziranih spojeva na porast micelija provedeni su prema metodi Wu i sur. (2013.). Antifungalni test porasta micelija proveden je u četirima ponavljanjima za svaku ispitanu patogenu vrstu (*F. culmorum*, *F. oxysporum*, *B. cinerea* i *S.*

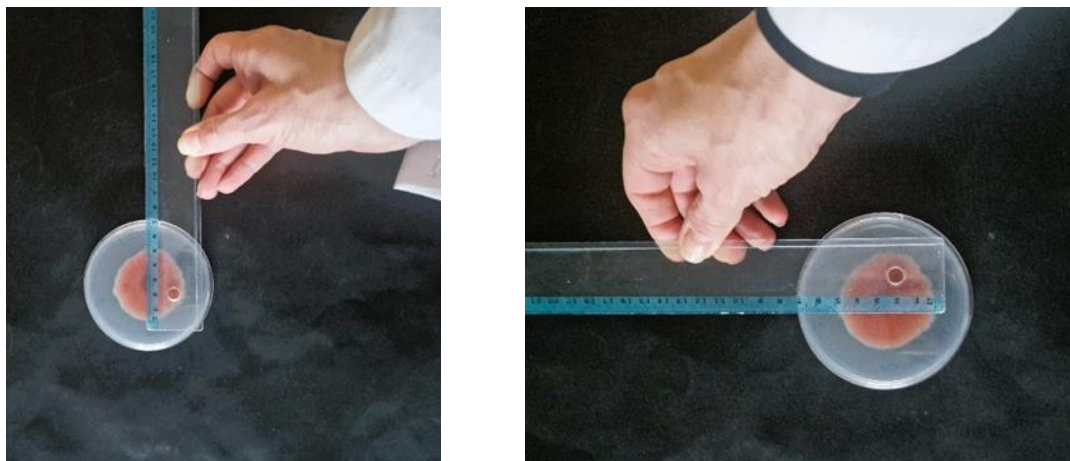
sclerotiorum) i svaki sintetizirani spoj u dvjema koncentracijama. Za antifungalne testove koristila se hranjiva podloga (KDA) i sterilizirane Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Nakon autoklaviranja, podloga je ohlađena na 50 – 60 °C. U 49 mL hranjive podloge umiješao se 1 mL sintetiziranog spoja određene koncentracije.

Za negativnu kontrolu korišten je 1 % DMSO (dimetilsulfoksid), dok su za pozitivnu kontrolu korišteni komercijalni fungicidi, ovisno o vrsti patogena. Za patogene *F. culmorum* i *F. oxysporum* primijenjen je fungicid s aktivnim tvarima difenkonazol i tebukonazol u koncentraciji 0,4 %, odnosno 1400 µg/ml (400 µg difenkonazola i 1000 µg tebukonazola). Za *S. sclerotiorum* korišten je fungicid s istim djelatnim tvarima, ali u preporučenim manjim dozama. U pozitivnoj kontroli primijenjen je fungicid u koncentraciji 0,2 %, odnosno 700 µg/ml (200 µg difenkonazola i 500 µg tebukonazola). U pozitivnoj kontroli za *B. cinerea* primijenjen je fungicid s aktivnom tvari fenheksamid u koncentraciji 0,1 %, odnosno 500 µg/ml djelatne tvari.

Svaka od četiriju Petrijevih zdjelica ispunjena je s 12,5 mL KDA i određenog spoja. Isječak čistog micelija gljive stare do deset dana uzimao se kružnim rezačem promjera 4 mm s KDA podloge i steriliziranom iglom prenosio u središte prethodno ispunjene Petrijeve zdjelice. Nacjepljivanje i svi navedeni postupci odrađeni su u sterilnim uvjetima, u laminaru.

Zatim je uslijedila njihova inkubacija u Aralab klima-komori 22 ± 1 °C, uz 12 sati svjetla / 12 sati mraka i 70 % relativne vlažnosti zraka.

Prvo mjerenje porasta micelija svake gljive bilo je 48 sati nakon inokulacije. Mjerenja su se provodila do 168 sati (ovisno o vrsti patogena) u dvama (okomitim) smjerovima kako bi mjerenje bilo preciznije (slika 2.). Za svaki tretman izračunavao se prosječan porast micelija izražen u milimetrima te inhibicijski učinak spoja.



Slika 2. Mjerenje porasta micelija u dvama različitim smjerovima (Izvor: T. Siber)

In vitro inhibicijski učinak ispitivanih spojeva na patogene izračunan je prema formuli koju navode Wu i sur. (2013.):

$$I (\%) = \frac{C - T}{C - 4} \times 100$$

pri čemu je:

I (%) – postotak inhibicije porasta micelija na ispitivanim spojevima

C – promjer rasta gljive na čistom KDA

T – promjer rasta gljive na tretiranom KDA.

Na temelju mjerenja porasta micelija prvi put nakon 48 h, a zatim svakih 24 h do 144 h, izračunana je vrijednost ET_{50} za svaki sintetizirani spoj. ET_{50} označava vrijeme potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta.

2.3.2. Utjecaj sintetiziranih spojeva na klijavost konidija i dužinu kličnih cijevi izolata *B. cinerea*

Ispitivanje inhibicijskog učinka sintetiziranih spojeva na klijavost konidija i dužinu kličnih cijevi provedeno je za *B. cinerea*. Pokus je postavljen u dvama ponavljanjima za svaki sintetizirani spoj u koncentracijama 10 µg/mL i 100 µg/mL. Kao negativna kontrola korišten je 1 %-tni DMSO, dok je za pozitivnu kontrolu korišten komercijalni fungicid u preporučenoj dozi, odnosno količina djelatne tvari iznosila je 500 µg/mL. Također je postavljena kontrolna varijanta s destiliranom vodom. Izolat *B. cinerea* uzgajao se na KDA podlozi s dodatkom antibiotika (streptomycin). Sljedećih sedam dana izolat je inkubiran u Aralab klima-komori na $22 \pm ^\circ\text{C}$. Neprekidno osvjetljenje u klima-komori bilo je postavljeno u trajanju tri dana kako bi se potaknulo stvaranje konidija. Za *in vitro* test klijavosti konidija korištene su konidije stare do deset dana prema modificiranoj metodi koju navode Cao i sur. (2016.). Nakon skidanja s KDA podloge, konidije su filtrirane, a

zatim razrijeđene do koncentracije 1×10^8 spora po mililitru sterilne vode (slike 3. i 4.). Koncentracija spora određena je s pomoću Neubauerova hemocitometra.



Slika 3. Struganje konidija *B. cinerea*

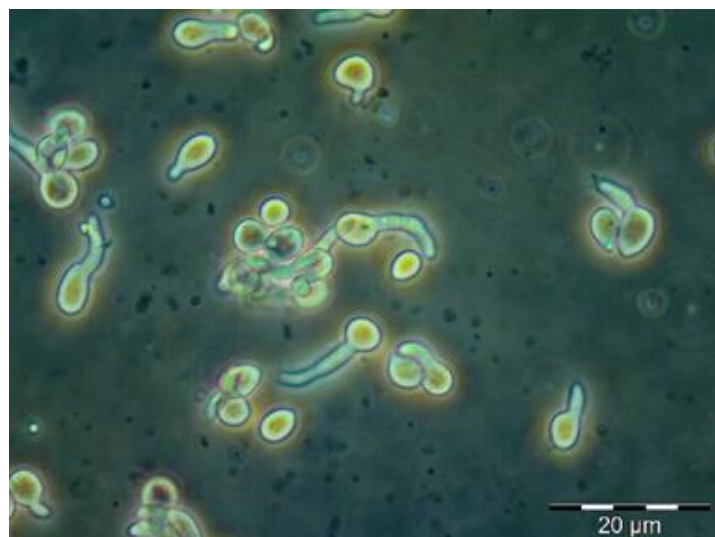


Slika 4. Filtriranje konidija *B. cinerea*

(Izvor: T. Siber)

Dobivena suspenzija konidija (0,784 mL) i određena koncentracija spoja (0,016 mL) nanosili su se pipetom u Petrijeve posudice promjera 60 mm na čistu KDA podlogu. Nakon toga, posudice su inkubirane u klima komori na 25 °C i 90 % relativne vlage zraka, tijekom četiri sata. Identičan postupak ponavljen je za pozitivnu i negativnu kontrolu gdje su korišteni komercijalni fungicid i 1%-tni DMSO. Također, postavljena je i kontrolna varijanta s destiliranom vodom.

Od 100 kondija po tretmanu (4 ponavljanja po 25 konidija), bilježio se broj iskljalih konidija i mjerila dužina kličnih cijevi s pomoću Olympusova mikroskopa BX41 (slika 5.). Konidije su se smatrale klijavima ako je klična cijev jednaka ili veća od dužine konidija (Qin i sur., 2010.).



Slika 5. Klijavae konidije *B.cinerea* (Izvor: T. Siber)

Prema formuli koju navode Youssef i sur. (2019.) izračunavao se postotak smanjenja/inhibicije klijavih konidija:

$$\text{smanjenje(\%)} \text{ klijavih konidija} = \frac{g_c - g_t}{g_c} \times 100$$

pri čemu je:

gc – prosječna klijavost konidija izolata u kontroli

gt – prosječna klijavost konidija izolata na određenoj koncentraciji sintetiziranog spoja.

Zatim se izračunavala prosječna dužina klične cijevi za svaku koncentraciju spoja te u kontrolnoj varijanti. Za vrijednosti prosječne dužine klične cijevi određivao se postotak (%) inhibicije rasta klične cijevi za obje koncentracije spoja i kontrole (čisti KDA):

$$\% In = (dc - dt) / dc \times 100$$

pri čemu je:

% In – postotak inhibicije rasta klične cijevi

dc – prosječna dužina klične cijevi izolata na kontroli

dt – prosječna dužina klične cijevi izolata pri određenoj koncentraciji sintetiziranog spoja.

2.4. *In vivo* uvjeti istraživanja

Za *in vivo* test primjenjivali su se spojevi koji su pokazali dobar inhibicijski učinak u *in vitro* testovima.

In vivo test porasta micelija i sporulacija primjenjivao se ovisno o vrsti gljive. Testovi su se provodili na prirodnim supstratima na kojima se provodila umjetna infekcija, a supstrati su sljedeći:

rod *Fusarium* (*F. culmorum*) – pšenica

rod *Botryotinia* (*B. cinerea*) – plod rajčice

rod *Sclerotinia* (*S. sclerotiorum*) – mrkva.

2.4.1. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija *B. cinerea* – *in vivo* test na plodovima rajčice

In vivo test utjecaja sintetiziranih spojeva na porast micelija *B. cinerea* proveden je

odabranim spojevima koji su pokazali najbolji antifungalni učinak u *in vitro* testu. *In vivo* test proveden je prema modificiranoj metodi koju navode Hao i sur. (2020.) na neoštećenim plodovima rajčice (sorta *Endeavour*) srednje veličine. Izolat *B. cinerea* uzgojen je na KDA podlozi s dodatkom antibiotika. Za umjetnu infekciju korišten je izolat prethodno inkubiran sedam dana. Prije umjetne infekcije, rajčice su sterilizirane 1 %-tnom otopinom NaClO (natrijev hipoklorit) tijekom dvije minute, a zatim isprane destiliranom vodom i osušene na sobnoj temperaturi (slika 6.). Na osušanim i dezinficiranim plodovima rajčice napravljena je ranica s pomoću igle.



Slika 6. Dezinfekcija i sušenje plodova rajčice (Izvor: T. Siber)

U svaku se ranu s pomoću mikropipete ubrizgavala određena koncentracija odabranog piridinijskih spoja. Ubrizgavanje 1 %-tnog DMSO-a u plodove rajčica predstavljalo je negativnu kontrolu, dok je pozitivna kontrola bila rajčica u koju je ubrizgan komercijalni fungicid u preporučenoj dozi (količina djelatne tvari iznosila je 500 µg/mL). Dva do tri sata nakon tretmana kružnim rezačem promjera 4 mm uzimao se isječak micelija KDA rastuće kulture i sterilnom iglom stavljao na rane plodova. Svaki je tretman postavljen u četiri ponavljanja, s po četiri rajčice. Plodovi rajčice stavljeni su na vlažan upijajući papir u plastične posudice kako bi zadržali vlažnost, a svaka je posudica stavljena u plastičnu vrećicu (slika 7.).



Slika 7. Ubrizgavanje sintetiziranog spoja (Izvor: T. Siber)

Sve su posudice inkubirane na sobnoj temperaturi tijekom razdoblja praćenja i mjerenja porasta micelija. Promjer porasta micelija mjerio se 48, 72, 96, 120 i 144 sati nakon umjetne infekcije.

2.4.2. Utjecaj sintetiziranih spojeva na rast klijanaca pšenice inokuliranih patogenom *F. culmorum* – *in vivo* test na pšenici

Utjecaj odabranih sintetiziranih spojeva na razvoj *F. culmorum* ispitan je na klijancima pšenice (sorta *Sofru*) prema modificiranoj metodi Mesterhazy (1978.). *F. culmorum* uzgojen je na KDA podlozi s dodatkom antibiotika te inkubiran u klima-komori na $22 \pm ^\circ\text{C}$, uz 12h svjetla / 12h mraka, u trajanju do deset dana. Nakon uzgoja čiste kulture *F. culmorum*, uslijedila je priprema suspenzije spora koja je poslužila za kontaminaciju supstrata (pijesak). Suspenzija spora dobivena je skidanjem micelija s čiste kulture s pomoću dezinficiranog skalpela te homogenizacijom uz dodatak destilirane vode. Suspenzija je postavljena do koncentracije od 1×10^5 , a koncentracija je spora određena s pomoću Neubauerova hemocitometra.

Prije postavljanja pokusa, pijesak je steriliziran u sušioniku na $130 ^\circ\text{C}$ tijekom pet sati.

Pokus je postavljen u sedam tretmana, u trima ponavljanjima, po 15 zrna pšenice:

1. zrna pšenice tretirana DMSO-om i posijana u kontaminirani pijesak (DMSO/KP)
2. zrna tretirana fungicidom posijana u kontaminirani pijesak (F/KP)
3. zrna pšenice tretirana sintetiziranim spojem i posijana u kontaminirani pijesak (S/KP)
4. zrna pšenice posijana u kontaminirani pijesak (ZP/KP)
5. zrna pšenice posijana u sterilni pijesak (ZP/SP)

6. zrna pšenice tretirana sintetiziranim spojem i posijana u sterilni pijesak (S/SP)

7. zrna pšenice tretirana DMSO-om i posijana u sterilni pijesak (DMSO/SP).

Posudice označene tretmanima DMSO/KP, F/KP, S/KP i ZP/KP zalijevane su suspenzijom inokuluma, dok su posudice označene tretmanima ZP/SP, S/SP i DMSO/SP bile zalijevane destiliranom vodom. Sve su posudice bile pokrivene aluminijskom folijom i ostavljene na sobnoj temperaturi 24 sata kako bi se postigla što uspješnija kontaminacija pijeska patogenom.

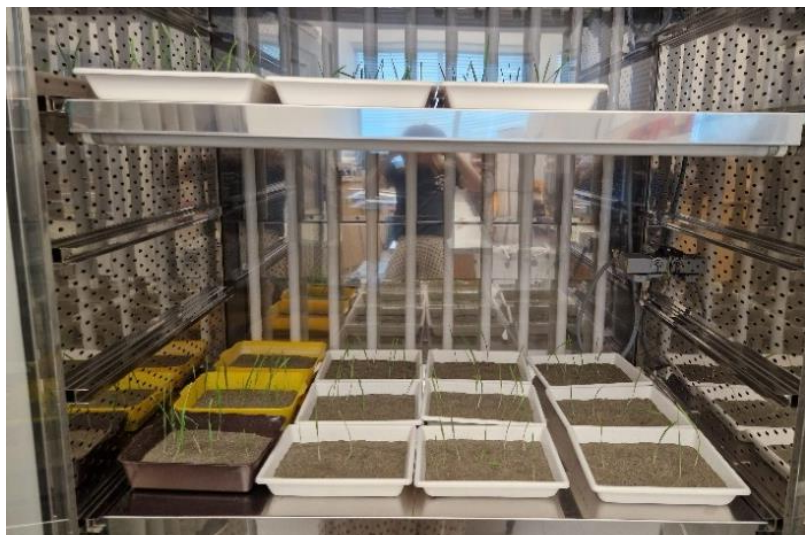
Nakon 24 sata uslijedila je dezinfekcija zdravih zrna pšenice u 70 %-tnom etanolu u trajanju deset minuta. Zrna su zatim isprana destiliranom vodom te posušena. Dezinficirana i posušena zrna pšenice natopljena su u 49 mL destilirane vode i 1 mL određenog piridinijeva spoja ili 50 mL destilirane vode u trajanju 4 h (slika 8.).



Slika 8. Dezinficirana zrna pšenice natopljena u određeni ispitivani spoj

(Izvor: T. Siber)

Nakon 4 h zrna su pšenice posijana u kontaminirani, odnosno sterilni pijesak. Zrna potopljena u 1 %-tnom DMSO-u te posijana u kontaminirani pijesak predstavljaju negativnu kontrolu, dok su zrna tretirana komercijalnim fungicidom i posijana u kontaminirani pijesak pozitivna kontrola. Kako bi se omogućilo zadržavanje vlage, posudice su bile prekrivene aluminijskom folijom. Postavljen pokus bio je pod folijom na sobnoj temperaturi 48 h, odnosno do pojave prvih klijanaca. Uslijedilo je skidanje aluminijske folije i stavljanje posudica u komoru za rast na temperaturu 22 °C i svjetlosni režim 12 sati dan / 12 sati noć te 70 % relativne vlage zraka (slika 9.).



Slika 9. Nakon pojave prvih klijanaca posudice s pokusom prebačene u komoru za rast
(Izvor: T. Siber)

Sljedećih jedanaest dana praćen je rast. Ocjenjivanje zdravih i bolesnih klijanaca te ostala mjerenja potrebna za dobivanje rezultata pokusa uslijedila su jedanaest dana od sjetve pšenice. Nakon prebrojavanja iskljalih biljaka (određivanje klijavosti), biljke su izvađene iz posudica te isprane vodom kako bi se odstranio pijesak s korijena (slika 10.).



Slika 10. Prebrojavanje i ispiranje iskljalih biljaka (Izvor: T. Siber)

Intenzitet zaraze klijanaca ocijenjen je skalom od 0 do 5 (0 = zdrav klijanac; 5 = visok stupanj zaraze, nema klice). Indeks bolesti izračunan je prema McKinney (1923.) metodi s pomoću sljedeće formule:

$$I = \sum \frac{n \times k}{N \times k} \times 100$$

pri čemu je:

n – broj biljaka u svakoj kategoriji

k – ocjena svake kategorije

N – ukupan broj ispitanih biljaka

K – najveća ocjena na skali (u ovom slučaju pet).

Sve su biljke fotografirane po tretmanima i ponavljanjima, a dužina biljke i korijena pšenice određivala se s pomoću programskog softvera *ImageJ*.

Usljedilo je odvajanje korijena od biljke te vaganje svježe mase korijena i svježe mase vlati za svaki tretman (slika 11.). Suha masa korijena i vlati određena je ponovnim vaganjem nakon procesa liofilizacije u trajanju od 24 h. Nakon toga uslijedile su analiza i obrada dobivenih rezultata pokusa.



Slika 11. Priprema biljaka za određivanje dužine biljke i korijena pšenice, odvajanje korijena od biljke (Izvor: T. Siber)

2.4.3. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija *S. sclerotiorum* – *in vivo* test na mrkvi

Izolat *S. sclerotiorum* uzgajao se na KDA podlozi s dodatkom antibiotika. Za umjetnu infekciju korišten je izolat prethodno inkubiran sedam dana. Prema modificiranoj metodi Hao i sur. (2020.) *in vivo* test utjecaja odabranih sintetiziranih spojeva na *S. sclerotiorum* proveden je na mrkvi srednje veličine (sorta *Napoli*). Prije umjetne infekcije mrkve su sterilizirane 1 %-tnom otopinom NaClO (natrijev hipoklorit) tijekom dvije minute, a zatim su isprane destiliranom vodom i osušene na sobnoj temperaturi. Na osušanim i dezinficiranim mrkvama napravljene su rane s pomoću steriliziranog skalpela. U svaku ranu primijenjena je određena koncentracija sintetiziranog spoja s pomoću mikropipete. Primjena 1 %-tnog DMSO-a u rane mrkve predstavljala je negativnu kontrolu, dok je pozitivna kontrola bila mrkva na koju je primijenjen komercijalan fungicid u preporučenoj dozi. Količina primijenjene djelatne tvari iznosila je 700 µg/ml (200 µg difenkonazola i 500 µg tebukonazola) (slika 12.). Također je postavljena čista kontrola s destiliranom vodom. Tri sata nakon tretmana kružnim rezačem uzet je isječak micelija KDA kulture stare sedam dana i sterilnom iglom umetnut u usjekline na mrkvi. Svaki je tretman ponavljen četiri puta, s četirima komadima mrkve u svakom ponavljanju. Vlažnost je mrkve održavana stavljanjem na vlažan upijajući papir u plastične posudice pri čemu je sterilna vata, po potrebi vlažena sterilnom vodom, postavljena u središte svake posudice (slika 14.). Inkubacija je provedena na sobnoj temperaturi. Promjer porasta micelija mjerio se 48 sati, 120 sati i 168 sati nakon umjetne infekcije.



Slika 12. Primjena sintetiziranog spoja



Slika 13. Postavljeni pokus

(Izvor: T. Siber)

Test klijavosti sklerocija

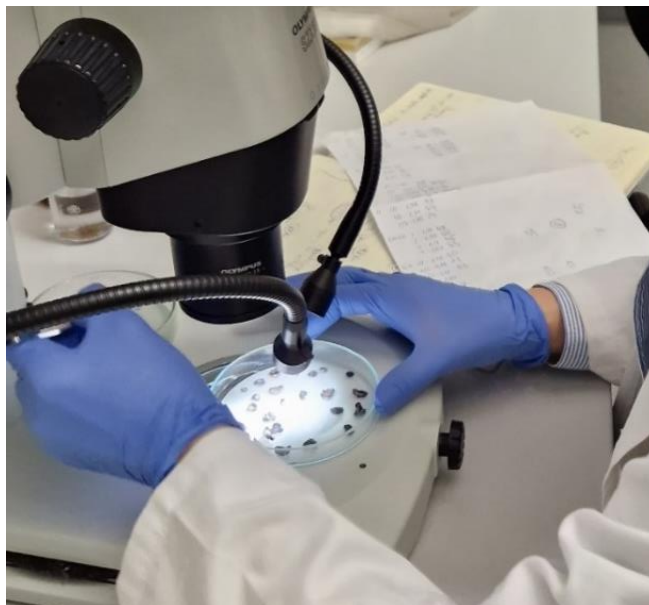
Utjecaj sintetiziranih spojeva na klijavost sklerocija ispitan je prema modificiranoj metodi Li i sur. (1993.). Sklerocije su prikupljene s prirodnog supstrata (mrkve) posljednji dan mjerenja porasta micelija *S. sclerotiorum*, odnosno 168 sati nakon inokulacije mrkve. Sklerocije su prikupljene iz svakog ponavljanja i tretmana sa spojevima određene koncentracije, kao i one iz negativne, pozitivne i čiste kontrole, te su prebrojane i pohranjene u hladnjak na 4 °C tijekom tri mjeseca. Nakon tri mjeseca sklerocije su bile potopljene u sterilnu destiliranu vodu 30 minuta. Svaki je tretman bio postavljen u četiri ponavljanja, s deset sklerocija u svakom ponavljanju. Sklerocije su zatim postavljene na vlažan filter-papir u Petrijeve zdjelice i inkubirane na sobnoj temperaturi uz vlaženje filter-papira prema potrebi (slika 14.). Nakon sedam dana uslijedilo je brojenje iskljalih sklerocija s pomoću Olympus SZX10 stereo mikroskopa (slika 15.).

Iz dobivenih podataka o broju iskljalih sklerocija izračunavala se inhibicija klijavosti (%) s pomoću formule koju navode Li i sur. (1993.):

$$\% \text{ inhibicije klijanja} = \frac{\text{broj klijavih sklerocija u kontroli} - \text{broj klijavih sklerocija u tretmanu}}{\text{broj klijavih sklerocija u kontroli}} \times 100$$



Slika 14. Postavljanje sklerocija na klijanje (Izvor: T. Siber)



Slika 15. Brojanje iskljalih sklerocija (Izvor: T. Siber)

2.5. Statistička obrada podataka

Statističke analize podataka *in vitro* i *in vivo* napravljene su s pomoću statističkog SAS programa (SAS 9.4 for Windows, 2017 i SAS Enterprise Guide 7.1.) te SPSS ver. 27.0. (SPSS ver 27.0., IBM Corporation, Armonk, NY, 2020.). Podatci su izraženi kao aritmetička sredina (M), standardna pogreška aritmetičke sredine (SPM) te 95 % granice pouzdanosti za parametar ET_{50} .

Za usporedbu među skupinama u *in vitro* istraživanju, odnosno razlike utjecaja spojeva na porast micelija po različitim satima od inokulacije u odnosu na kontrole (čisti KDA i fungicid) ispitane su *t*-testom, dok je za usporedbu među skupinama u *in vivo* istraživanju korištena jednosmjerna analiza varijance (ANOVA). Kako bi se ispitalo između kojih grupa točno postoji razlika, kao *post-hoc* test odabran je Tukeyjev test višestruke usporedbe (Rowe, 2015.). Analiza varijance u odnosu na neke druge parametrijske testove, npr. *t*-test, omogućava korekciju vjerojatnosti na višestruko istovremeno testiranje (npr. Bonferronijeva korekcija).

Svi primijenjeni testovi bili su dvosmjerni. Statistički značajnim smatrane su *p* vrijednosti manje ili jednake 0,05.

ET_{50} , odnosno razdoblje (izraženo u satima) potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta te 95 %-tni interval pouzdanosti izračunani su Finney probit metodom

(SPSS ver 27.0.) pri čemu su podatci o vremenu porasta micelija po uzorku logaritmirani te je provedena nelinearna regresija s uklapanjem krivulje. Ako se 95 % intervala pouzdanosti za ET_{50} analiziranih fungicida ne preklapa, smatra se da fungicidi imaju statistički značajno različito antifungalno djelovanje.

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno u *in vitro* uvjetima gdje su testirane ukupno 23 kvaterne piridinijeve soli u dvjema različitim koncentracijama. Na temelju dobivenih podataka o inhibiciji rasta micelija patogena, otkriveni su spojevi koji su pokazali inhibicijski učinak na neke ili sve ispitivane patogene. Nakon toga, provedeno je *in vivo* istraživanje kako bi se procijenio inhibicijski učinak odabranih spojeva na patogene. *In vivo* istraživanje provedeno je na prirodnom supstratu, na odabranim domaćinima za svaku vrstu patogena. Slijedom toga, u ovom poglavlju prvo su prikazani rezultati *in vitro*, zatim *in vivo* istraživanja.

3.1. Rezultati *in vitro* istraživanja

Kako bi se ispitalo (cilj 1.) razlikuju li se kvaterne piridinijeve soli međusobno u antifungalnom djelovanju na porast micelija fitopatogenih gljiva *F. culmorum*, *F. oxysprum*, *S. sclerotiorum* i *B. cinerea* te (cilj 4.) postoji li razlika u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnih fungicida na porast micelija navedenih fitopatogenih gljiva, proveden je *t*-test. Rezultati su u nastavku prikazani zasebno za derivate nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) te derivate izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i koncentracija 100 µg/mL) za pojedine vrste fitopatogenih gljiva kao i za različita vremena inkubacije.

3.1.1. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija *S. sclerotiorum*

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i 100 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija S. sclerotiorum

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i 100 µg/mL) uspoređeno je s kontrolom (čisti KDA) i komercijalnim fungicidom za fitopatogenu gljivu *S. sclerotiorum*. Rezultati istraživanja pokazali su da ni kod jednoga derivata nikotinamida s primijenjenom koncentracijom od 10 µg/mL nije utvrđeno potpuno (100 %) suzbijanje porasta micelija (tablica 5.). Međutim, svi derivati nikotinamida s primijenjenom koncentracijom 10 µg/mL imali su statistički značajno bolje antifungalno djelovanje u odnosu na kontrolu (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije. S druge strane, usporedbom tih spojeva i komercijalnog fungicida, odnosno pozitivne kontrole, isti su bili statistički značajno manje učinkoviti u suzbijanju porasta micelija *S. sclerotiorum* ($p \leq 0,05$).

Tablica 5. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *S. sclerotiorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		10,33 ± 0,471 Aa	20,83 ± 1,546 Aa	38,33 ± 3,300 Aa	53,50 ± 4,248 Aa	56,50 ± 4,098 Aa
(2)		10,00 ± 0,408 Aa	14,50 ± 1,541 Aa	16,83 ± 2,045 Aa	24,50 ± 3,182 Aa	26,68 ± 3,243 Aa
(3)		9,68 ± 0,3119 Aa	17,50 ± 1,339 Aa	32,68 ± 3,381 Aa	46,33 ± 6,213 Aa	49,00 ± 6,445 Aa
(4)		10,50 ± 0,645 Aa	21,83 ± 0,312 Aa	43,68 ± 0,773 Aa	62,33 ± 0,312 Aa	64,68 ± 0,825 Aa
(5)		11,33 ± 0,589 Aa	22,83 ± 1,359 Aa	42,33 ± 3,454 Aa	58,33 ± 4,492 Aa	60,18 ± 4,492 Aa
(6)		10,68 ± 0,118 Aa	18,68 ± 1,027 Aa	32,68 ± 3,230 Aa	48,50 ± 5,319 Aa	50,00 ± 4,800 Aa
(7)		9,68 ± 0,425 Aa	12,83 ± 1,007 Aa	21,18 ± 3,777 Aa	43,00 ± 4,637 Aa	46,00 ± 4,861 Aa
(8)		10,18 ± 0,773 Aa	20,18 ± 1,830 Aa	34,68 ± 2,585 Aa	47,68 ± 4,105 Aa	50,00 ± 4,021 Aa
(9)		9,83 ± 0,920 Aa	15,50 ± 2,677 Aa	15,60 ± 3,273 Aa	19,60 ± 4,155 Aa	36,18 ± 10,453 Aa
(10)		11,00 ± 0,204 Aa	20,18 ± 0,425 Aa	41,83 ± 0,921 Aa	64,50 ± 1,021 Aa	67,33 ± 0,921 Aa
(11)		8,00 ± 0,204 Aa	15,33 ± 0,312 Aa	32,83 ± 1,359 Aa	51,00 ± 1,594 Aa	55,33 ± 1,390 Aa
(12)		9,33 ± 0,514 Aa	20,38 ± 0,944 Aa	43,18 ± 0,656 Aa	64,33 ± 1,312 Aa	71,18 ± 1,505 Aa
kontrola (čisti KDA) a		28,33 ± 0,514	59,68 ± 1,027	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Primjenom derivata nikotinamida u koncentraciji od 100 µg/mL (tablica 6), nijedan spoj nije potpuno (100 %) suzbio porast micelija. Ipak, svi spojevi pokazali su statistički značajno bolje antifungalno djelovanje u odnosu na kontrolu (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije.

S druge strane, usporedbom derivata nikotinamida primijenjenih u koncentraciji od 100 µg/mL i komercijalnog fungicida, odnosno pozitivne kontrole gotovo svi derivati nikotinamida bili su statistički značajno manje učinkoviti u suzbijanju porasta micelija patogena *S. sclerotiorum* ($p \leq 0,05$). Za neke je spojeve utvrđena podjednaka učinkovitost za različito vrijeme inkubacije. Na primjer, spojevi (9) i (10) nisu se statistički značajno razlikovali u antifungalnom djelovanju od komercijalnog fungicida 48 sati nakon inkubacije.

Slično tomu, spoj (10) bio je podjednako učinkovit u suzbijanju porasta micelija kao i komercijalni fungicid tijekom svih pet dana mjerenja. Srednja vrijednost porasta micelija patogena s navedenim spojem u koncentraciji od 100 µg/mL kretala se od 5,00 do 6,50 mm, dok je za komercijalni fungicid iznosila 4,00 mm tijekom svih pet mjerenja. Treba istaknuti antifungalno djelovanje spoja (12). Iako je postojala statistička razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu, taj spoj pokazao je blagi porast tijekom svih pet dana mjerenja. Njegovo antifungalno djelovanje bilo je do 70 % učinkovitije od kontrole (čisti KDA).

Usporedbom srednjih vrijednosti porasta micelija može se zaključiti da primjena veće koncentracije (100 µg/mL) većina derivata nikotinamida ima bolje antifungalno djelovanje na micelij patogena *S. sclerotiorum* u odnosu na njihovo djelovanje pri manjoj koncentraciji (10 µg/mL).

Tablica 6. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *S. sclerotiorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		7,95 ± 0,542 Aa	25,33 ± 2,569 Aa	50,50 ± 3,780 Aa	54,68 ± 3,393 Aa	55,83 ± 3,381 Aa
(2)		7,33 ± 0,513 Aa	17,18 ± 3,319 Aa	34,00 ± 8,042 Aa	35,33 ± 8,353 Aa	36,18 ± 8,520 Aa
(3)		8,68 ± 0,425 Aa	24,18 ± 1,124 Aa	48,50 ± 1,429 Aa	52,68 ± 1,247 Aa	53,50 ± 1,339 Aa
(4)		8,38 ± 0,239 Aa	18,00 ± 0,707 Aa	25,50 ± 1,620 Aa	27,83 ± 1,830 Aa	28,83 ± 1,852 Aa
(5)		7,68 ± 0,312 Aa	18,18 ± 1,048 Aa	34,18 ± 2,469 Aa	35,83 ± 2,552 Aa	37,18 ± 2,435 Aa
(6)		10,83 ± 0,514 Aa	22,18 ± 1,124 Aa	36,68 ± 2,164 Aa	39,50 ± 2,700 Aa	40,00 ± 2,669 Aa
(7)		9,83 ± 0,471 Aa	19,50 ± 1,275 Aa	29,18 ± 1,161 Aa	32,83 ± 1,783 Aa	33,50 ± 1,620 Aa
(8)		9,18 ± 0,656 Aa	15,00 ± 2,354 Aa	11,50 ± 1,744 Aa	13,18 ± 2,202 Aa	23,50 ± 4,967 Aa
(9)		6,50 ± 0,500 a	14,83 ± 0,717 Aa	28,83 ± 0,825 Aa	32,18 ± 0,921 Aa	32,68 ± 0,717 Aa
(10)		5,00 ± 0,000 a	6,13 ± 0,718 a	6,33 ± 0,943 a	6,50 ± 1,061 a	6,50 ± 1,061 a
(11)		5,75 ± 0,479 Aa	8,68 ± 2,249 Aa	31,68 ± 5,825 Aa	36,18 ± 6,520 Aa	36,50 ± 6,445 Aa
(12)		7,18 ± 0,425 Aa	11,83 ± 1,390 Aa	17,50 ± 2,072 Aa	19,33 ± 2,601 Aa	20,33 ± 2,418 Aa
kontrola (čisti KDA) a		28,33 ± 0,514	59,68 ± 1,027	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiri ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Antifungalno djelovanje derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i 100 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija S. sclerotiorum

Kao što se može vidjeti u tablici 7., ni u jednoga derivata izonikotinamida s primijenjenom koncentracijom od 10 µg/mL nije utvrđeno potpuno (100 %) suzbijanje porasta micelija patogena *S. sclerotiorum*. Ipak, svi su derivati izonikotinamida s primijenjenom koncentracijom od 10 µg/mL imali značajno bolje antifungalno djelovanje u odnosu na kontrolu (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije. Usporedbom tih spojeva s komercijalnim fungicidom dobivene su također statistički značajne razlike među njima pri čemu je većina derivata izonikotinamida imala značajno slabije antifungalno djelovanje. Izuzetak je spoj (12) koji je bio podjednako učinkovit kao i komercijalni fungicid 48, 72 i 96 sati nakon inkubacije. Srednja vrijednost porasta micelija patogena djelovanjem tog spoja u koncentraciji od 10 µg/mL kretala se od 6,00 do 9,33 mm, dok je za komercijalni fungicid tijekom svih pet mjerenja iznosila 4,00 mm.

Kao i kod derivata izonikotinamida s primijenjenom koncentracijom od 10 µg/mL, ni kod istih derivata s primijenjenom koncentracijom od 100 µg/mL nije utvrđeno potpuno (100 %) suzbijanje porasta micelija (tablica 8.).

Svi derivati izonikotinamida s primijenjenom koncentracijom 100 µg/mL u odnosu na kontrolu (čisti KDA) imali su značajno bolje antifungalno djelovanje bez obzira na vrijeme inkubacije. Usporedbom tih spojeva s komercijalnim fungicidom dobivene su također statistički značajne razlike među njima pri čemu je većina derivata izonikotinamida imala značajno slabije antifungalno djelovanje. Ponovno je izuzetak spoj (12) koji je bio podjednako učinkovit kao i komercijalni fungicid 48, 96, 120 i 144 h nakon inokulacije. Primjenom veće koncentracije spoja (12), srednja vrijednost porasta micelija kretala se od 4,75 do 9,0 mm, dok je kod primjene fungicida iznosila od 4,00 do 7,00 mm.

Tablica 7. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *S. sclerotiorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		11,75 ± 0,629 Aa	18,00 ± 0,408 Aa	23,88 ± 0,658 Aa	30,00 ± 0,408 Aa	37,33 ± 0,717 Aa
(2)		12,13 ± 0,427 Aa	17,50 ± 0,289 Aa	24,25 ± 0,250 Aa	30,08 ± 0,435 Aa	36,13 ± 0,427 Aa
(3)		10,88 ± 0,427 Aa	17,25 ± 0,433 Aa	23,13 ± 0,375 Aa	28,50 ± 0,354 Aa	36,00 ± 0,540 Aa
(4)		11,88 ± 0,125 Aa	18,00 ± 0,204 Aa	23,83 ± 0,312 Aa	31,25 ± 1,031 Aa	39,50 ± 0,540 Aa
(5)		11,50 ± 0,500 Aa	17,38 ± 0,375 Aa	24,33 ± 0,472 Aa	34,33 ± 0,236 Aa	40,33 ± 0,850 Aa
(6)		11,88 ± 0,427 Aa	16,00 ± 0,540 Aa	24,33 ± 0,472 Aa	31,18 ± 1,196 Aa	37,18 ± 1,359 Aa
(7)		12,88 ± 0,375 Aa	18,63 ± 0,239 Aa	24,88 ± 0,315 Aa	30,25 ± 0,250 Aa	37,83 ± 0,312 Aa
(8)		12,38 ± 0,375 Aa	17,75 ± 0,323 Aa	23,50 ± 0,289 Aa	31,18 ± 0,312 Aa	39,38 ± 0,427 Aa
(9)		12,50 ± 0,204 Aa	18,33 ± 0,236 Aa	26,00 ± 0,204 Aa	27,83 ± 0,850 Aa	29,33 ± 0,312 Aa
(10)		12,60 ± 0,542 Aa	19,50 ± 0,540 Aa	27,68 ± 0,850 Aa	32,18 ± 0,656 Aa	38,68 ± 0,425 Aa
(12)		6,00 ± 0,817 a	8,68 ± 1,546 a	9,33 ± 2,014 a	9,68 ± 2,249 Aa	18,68 ± 2,718 Aa
kontrola (čisti KDA) a		59,33 ± 3,325	87,00 ± 3,000	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	4,00 ± 1,155	7,00 ± 1,000	8,25 ± 0,250

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Tablica 8. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *S. sclerotiorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		13,13 ± 0,315 Aa	19,13 ± 0,315 Aa	25,00 ± 0,000 Aa	33,50 ± 0,500 Aa	41,13 ± 0,515 Aa
(2)		11,13 ± 0,125 Aa	17,00 ± 0,456 Aa	23,00 ± 0,408 Aa	30,50 ± 0,890 Aa	35,00 ± 0,204 Aa
(3)		14,13 ± 0,718 Aa	19,75 ± 0,722 Aa	29,18 ± 0,118 Aa	37,00 ± 0,707 Aa	46,68 ± 0,656 Aa
(4)		14,13 ± 0,239 Aa	20,75 ± 0,250 Aa	27,33 ± 0,236 Aa	34,50 ± 0,354 Aa	43,00 ± 0,540 Aa
(5)		13,13 ± 0,515 Aa	20,50 ± 0,000 Aa	27,50 ± 0,540 Aa	37,43 ± 0,587 Aa	39,33 ± 1,359 Aa
(6)		14,25 ± 0,433 Aa	20,13 ± 0,473 Aa	26,13 ± 0,315 Aa	32,50 ± 0,540 Aa	39,50 ± 0,354 Aa
(7)		15,83 ± 0,728 Aa	24,50 ± 0,000 Aa	33,00 ± 0,707 Aa	42,13 ± 0,425 Aa	48,50 ± 1,620 Aa
(8)		12,75 ± 0,433 Aa	19,50 ± 0,204 Aa	27,675 ± 0,514 Aa	33,50 ± 0,204 Aa	40,88 ± 0,554 Aa
(9)		11,75 ± 0,144 Aa	18,50 ± 0,204 Aa	24,50 ± 0,289 Aa	30,63 ± 0,473 Aa	41,50 ± 0,736 Aa
(10)		12,38 ± 0,239 Aa	19,00 ± 0,456 Aa	26,68 ± 0,624 Aa	33,33 ± 0,624 Aa	41,00 ± 0,408 Aa
(12)		4,75 ± 0,479 a	6,00 ± 0,408 Aa	6,75 ± 0,629 a	7,00 ± 0,408 a	9,00 ± 0,707 a
kontrola (čisti KDA) a		59,33 ± 3,325	87,00 ± 3,000	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	6,00 ± 0,000	7,00 ± 1,000	8,25 ± 0,250

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

3.1.2. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija *F. oxysporum*

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i 100 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija F. oxysporum

Slično analizi za fitopatogenu gljivu *S. sclerotiorum*, antifungalno djelovanje derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i koncentracija 100 µg/mL) uspoređeno je *t*-testom s kontrolom (čisti KDA) i komercijalnim fungicidom na porast micelija fitopatogene gljive *F.oxysporum*.

Kao što se može vidjeti u tablicama 9. i 10., ni jedan derivat nikotinamida nije u potpunosti (100 %) suzbio porast micelija fitopatogene gljive *F. oxysporum*, bez obzira na primijenjenu koncentraciju i vrijeme inkubacije. Pri primjeni u koncentraciji od 10 µg/mL, svi derivati nikotinamida pokazali su statistički značajno bolje antifungalno djelovanje od kontrole (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije. Spoj (4) izdvojio se kao najučinkovitiji, pokazujući najbolje antifungalno djelovanje i najmanji porast micelija tijekom svih pet mjerenja.

Spoj (1) imao je najslabije antifungalno djelovanje nakon 72, 96, 120 i 144 sata inkubacije. Neki spojevi pokazuju bolje antifungalno djelovanje s pomoću duljeg vremena inkubacije u odnosu na prvih 48 sati inkubacije. Na primjer, spoj (12) pokazuje vrlo dobar učinak tek 144 sata nakon inokulacije. Svi derivati nikotinamida primijenjeni u koncentraciji 10 µg/mL imali su značajno slabije djelovanje od komercijalnog fungicida.

Slični rezultati dobiveni su i za primijenjenu koncentraciju od 100 µg/mL (tablica 10.). Spoj (1) pokazao je vrlo dobro antifungalno djelovanje primjenom više koncentracije nakon 96 sati, 120 sati i 144 sata inkubacije. Svi derivati nikotinamida primijenjeni u koncentraciji 100 µg/mL imali su statistički značajno slabije antifungalno djelovanje na porast micelija *S. sclerotiorum* u odnosu na komercijalni fungicid.

Spoj (1) pokazao je vrlo dobro antifungalno djelovanje pri višoj koncentraciji nakon 96 sati, 120 sati i 144 sata inkubacije. Kod primjene spoja (1) povećanjem koncentracije povećava se i njegovo antifungalno djelovanje.

Najbolje antifungalno djelovanje 48 sati nakon inkubacije primijećeno je kod spojeva (3), (5), (6) i (9). Spojevi (5) i (6) zadržali su antifungalno djelovanje bez obzira na vrijeme inkubacije.

Tablica 9. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. oxysporum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		15,67 ± 0,236 Aa	23,32 ± 0,236 Aa	29,67 ± 0,624 Aa	36,00 ± 0,408 Aa	44,00 ± 1,155 Aa
(2)		14,25 ± 0,250 Aa	22,25 ± 0,250 Aa	29,00 ± 0,707 Aa	33,67 ± 0,236 Aa	42,67 ± 0,624 Aa
(3)		14,75 ± 0,479 Aa	21,32 ± 0,471 Aa	29,32 ± 1,247 Aa	35,00 ± 0,408 Aa	42,32 ± 0,943 Aa
(4)		13,67 ± 0,471 Aa	21,32 ± 0,624 Aa	26,67 ± 0,236 Aa	31,75 ± 0,479 Aa	37,32 ± 0,236 Aa
(5)		14,32 ± 0,236 Aa	21,67 ± 0,236 Aa	27,67 ± 0,471 Aa	32,32 ± 0,236 Aa	39,75 ± 0,479 Aa
(6)		15,50 ± 0,289 Aa	22,00 ± 0,408 Aa	28,32 ± 0,236 Aa	34,67 ± 0,850 Aa	39,32 ± 0,471 Aa
(7)		16,50 ± 0,500 Aa	25,32 ± 0,471 Aa	30,67 ± 0,850 Aa	36,67 ± 0,850 Aa	41,67 ± 0,624 Aa
(8)		15,67 ± 0,471 Aa	22,00 ± 0,408 Aa	27,00 ± 0,000 Aa	32,67 ± 0,236 Aa	37,67 ± 0,471 Aa
(9)		13,75 ± 0,629 Aa	22,25 ± 0,479 Aa	28,32 ± 0,624 Aa	34,67 ± 1,178 Aa	39,00 ± 0,816 Aa
(10)		14,50 ± 0,500 Aa	21,00 ± 0,000 Aa	26,67 ± 0,236 Aa	34,00 ± 0,816 Aa	39,67 ± 0,624 Aa
(11)		16,00 ± 0,408 Aa	22,32 ± 0,236 Aa	28,67 ± 0,236 Aa	36,00 ± 0,408 Aa	45,00 ± 1,633 Aa
(12)		16,25 ± 0,250 Aa	22,32 ± 0,471 Aa	28,67 ± 0,236 Aa	34,32 ± 0,624 Aa	40,32 ± 0,943 Aa
kontrola (čisti KDA) a		21,00 ± 0,408	29,32 ± 0,471	42,00 ± 0,408	50,32 ± 0,624	61,67 ± 1,312
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,50 ± 0,500	7,50 ± 0,289	9,00 ± 0,000	10,32 ± 0,236

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Tablica 10. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. oxysporum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		13,33 ± 0,472 Aa	20,00 ± 0,000 Aa	24,68 ± 0,943 Aa	29,68 ± 0,471 Aa	35,68 ± 0,236 Aa
(2)		14,00 ± 0,577 Aa	21,25 ± 0,479 Aa	28,00 ± 0,408 Aa	31,33 ± 0,624 Aa	37,68 ± 0,471 Aa
(3)		12,00 ± 0,000 Aa	21,68 ± 0,236 Aa	29,33 ± 0,624 Aa	34,33 ± 0,624 Aa	40,65 ± 0,624 Aa
(4)		14,68 ± 0,471 Aa	20,68 ± 0,471 Aa	28,00 ± 0,707 Aa	34,00 ± 0,816 Aa	40,00 ± 1,080 Aa
(5)		12,25 ± 0,479 Aa	19,33 ± 0,471 Aa	26,33 ± 0,471 Aa	30,75 ± 0,479 Aa	35,00 ± 0,408 Aa
(6)		12,33 ± 0,236 Aa	17,68 ± 0,850 Aa	25,68 ± 0,624 Aa	32,68 ± 0,471 Aa	38,00 ± 0,408 Aa
(7)		13,00 ± 0,408 Aa	19,68 ± 0,471 Aa	26,33 ± 0,471 Aa	32,00 ± 0,707 Aa	38,68 ± 1,650 Aa
(8)		12,50 ± 0,289 Aa	20,33 ± 0,236 Aa	26,33 ± 0,236 Aa	31,00 ± 0,707 Aa	36,00 ± 0,408 Aa
(9)		12,25 ± 0,479 Aa	21,00 ± 0,408 Aa	27,68 ± 0,471 Aa	32,00 ± 0,707 Aa	37,68 ± 0,236 Aa
(10)		16,25 ± 0,479 Aa	23,50 ± 0,645 Aa	31,33 ± 0,471 Aa	37,50 ± 0,500 Aa	44,68 ± 0,943 Aa
(11)		14,25 ± 0,479 Aa	22,00 ± 0,408 Aa	30,00 ± 0,408 Aa	36,68 ± 0,624 Aa	44,33 ± 0,471 Aa
(12)		15,00 ± 0,408 Aa	22,75 ± 0,479 Aa	29,75 ± 0,479 Aa	37,00 ± 0,577 Aa	44,00 ± 0,408 Aa
kontrola (čisti KDA) a		21,00 ± 0,408	29,33 ± 0,471	42,00 ± 0,408	50,33 ± 0,624	61,68 ± 1,312
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,50 ± 0,500	7,50 ± 0,289	9,00 ± 0,000	10,33 ± 0,236

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Antifungalno djelovanje derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i 100 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija F. oxysporum

Antifungalno djelovanje derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i koncentracija 100 µg/mL) također je uspoređeno *t*-testom s kontrolom (čisti KDA) i komercijalnim fungicidom.

Na temelju rezultata prikazanih u tablicama 11. i 12. ni jedan od spojeva derivata izonikotinamida nije u potpunosti (100 %) suzbio porast micelija fitopatogene gljive *F. oxysporum* bez obzira na primijenjenu koncentraciju i vrijeme inkubacije. Kada je riječ o primijenjenoj koncentraciji od 10 µg/mL, svi su derivati izonikotinamida imali bolje antifungalno djelovanje od kontrole (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije. Spojevi (12) i (4) imali su najveći utjecaj na smanjeni porast micelija patogena, odnosno najbolje antifungalno djelovanje tijekom svih pet mjerenja.

Derivati izonikotinamidni pokazuju razinu antifungalne aktivnosti protiv fitopatogene gljive *F. oxysporum* i pri nižim koncentracijama. S druge pak strane njihova učinkovitost nije dostigla razinu komercijalnog fungicida, odnosno imali su statistički značajno slabiji učinak od komercijalnog fungicida (tablica 11.).

Slični rezultati dobiveni su i za primijenjenu koncentraciju od 100 µg/mL (tablica 12.) pri kojoj svi derivati izonikotinamida pokazuju bolje antifungalno djelovanje od kontrole (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije. Najbolje antifungalno djelovanje pri koncentraciji od 100 µg/mL pokazali su spojevi (7), (9) i (3) 48 sati nakon inokulacije. Spoj (12) imao je najbolje antifungalno djelovanje pri mjerenju porasta micelija 72 sata nakon inokulacije te 144 sata nakon inokulacije.

Tablica 11. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. oxysporum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		16,68 ± 0,236 Aa	25,25 ± 0,479 Aa	36,00 ± 0,000 Aa	45,68 ± 0,471 Aa	54,00 ± 0,408 Aa
(2)		17,25 ± 0,250 Aa	25,00 ± 0,471 Aa	36,00 ± 0,000 Aa	44,68 ± 0,236 Aa	53,33 ± 0,471 Aa
(3)		18,00 ± 0,577 Aa	25,00 ± 0,408 Aa	34,68 ± 0,236 Aa	43,75 ± 0,479 Aa	52,50 ± 0,289 Aa
(4)		16,75 ± 0,250 Aa	22,75 ± 0,479 Aa	30,00 ± 0,408 Aa	37,68 ± 0,471 Aa	44,33 ± 0,624 Aa
(5)		18,25 ± 0,250 Aa	24,68 ± 0,236 Aa	33,68 ± 0,236 Aa	43,33 ± 0,624 Aa	50,33 ± 0,850 Aa
(6)		17,25 ± 0,479 Aa	24,25 ± 0,479 Aa	32,00 ± 0,408 Aa	39,68 ± 0,471 Aa	50,00 ± 0,816 Aa
(7)		19,33 ± 0,471 Aa	26,00 ± 0,577 Aa	35,33 ± 0,471 Aa	44,33 ± 0,471 Aa	52,33 ± 0,236 Aa
(8)		18,68 ± 0,471 Aa	26,00 ± 0,577 Aa	33,68 ± 0,471 Aa	42,75 ± 0,479 Aa	51,00 ± 0,408 Aa
(9)		17,00 ± 0,408 Aa	23,75 ± 0,250 Aa	32,68 ± 0,236 Aa	41,00 ± 0,408 Aa	48,33 ± 0,624 Aa
(10)		17,33 ± 0,236 Aa	25,00 ± 0,408 Aa	34,00 ± 0,408 Aa	43,68 ± 0,850 Aa	53,50 ± 0,645 Aa
(12)		14,00 ± 0,408 Aa	23,33 ± 0,471 Aa	29,00 ± 0,577 Aa	35,75 ± 0,479 Aa	43,68 ± 0,236 Aa
kontrola (čisti KDA) a		21,00 ± 0,408	29,33 ± 0,471	42,00 ± 0,408	50,33 ± 0,624	61,68 ± 1,312
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,50 ± 0,500	7,50 ± 0,289	9,00 ± 0,000	11,00 ± 0,707

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiri ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine. Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Tablica 12. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. oxysporum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		16,00 ± 0,408 Aa	22,50 ± 0,500 Aa	30,50 ± 0,500 Aa	38,68 ± 0,236 Aa	45,50 ± 0,500 Aa
(2)		16,00 ± 0,408 Aa	22,5 ± 0,289 Aa	32,00 ± 0,408 Aa	39,50 ± 0,289 Aa	47,50 ± 0,500 Aa
(3)		14,50 ± 0,289 Aa	21,75 ± 0,250 Aa	28,25 ± 0,250 Aa	34,68 ± 0,236 Aa	43,00 ± 0,408 Aa
(4)		15,00 ± 0,000 Aa	22,50 ± 0,289 Aa	28,50 ± 0,289 Aa	35,75 ± 0,250 Aa	44,00 ± 0,408 Aa
(5)		15,00 ± 0,408 Aa	22,00 ± 0,408 Aa	28,00 ± 0,408 Aa	34,75 ± 0,479 Aa	42,50 ± 0,500 Aa
(6)		14,75 ± 0,479 Aa	21,33 ± 0,236 Aa	28,68 ± 0,624 Aa	35,33 ± 0,624 Aa	43,68 ± 0,850 Aa
(7)		14,50 ± 0,289 Aa	21,68 ± 0,236 Aa	27,33 ± 0,236 Aa	34,33 ± 0,624 Aa	42,00 ± 0,707 Aa
(8)		14,75 ± 0,250 Aa	21,00 ± 0,408 Aa	27,00 ± 0,408 Aa	33,25 ± 0,479 Aa	41,00 ± 0,408 Aa
(9)		14,50 ± 0,289 Aa	21,50 ± 0,289 Aa	29,33 ± 0,471 Aa	36,00 ± 0,408 Aa	44,00 ± 0,408 Aa
(10)		14,68 ± 0,236 Aa	21,00 ± 0,408 Aa	27,00 ± 0,408 Aa	32,75 ± 0,250 Aa	41,00 ± 0,408 Aa
(12)		14,68 ± 0,236 Aa	20,33 ± 0,236 Aa	28,68 ± 0,850 Aa	35,00 ± 0,707 Aa	40,33 ± 0,850 Aa
kontrola (čisti KDA) a		21,00 ± 0,408	29,33 ± 0,471	42,00 ± 0,408	50,33 ± 0,624	61,68 ± 1,312
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,50 ± 0,500	7,5 ± 0,289	9,00 ± 0,000	11,00 ± 0,707

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

3.1.3. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija *F. culmorum*

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida na porast micelija F. culmorum

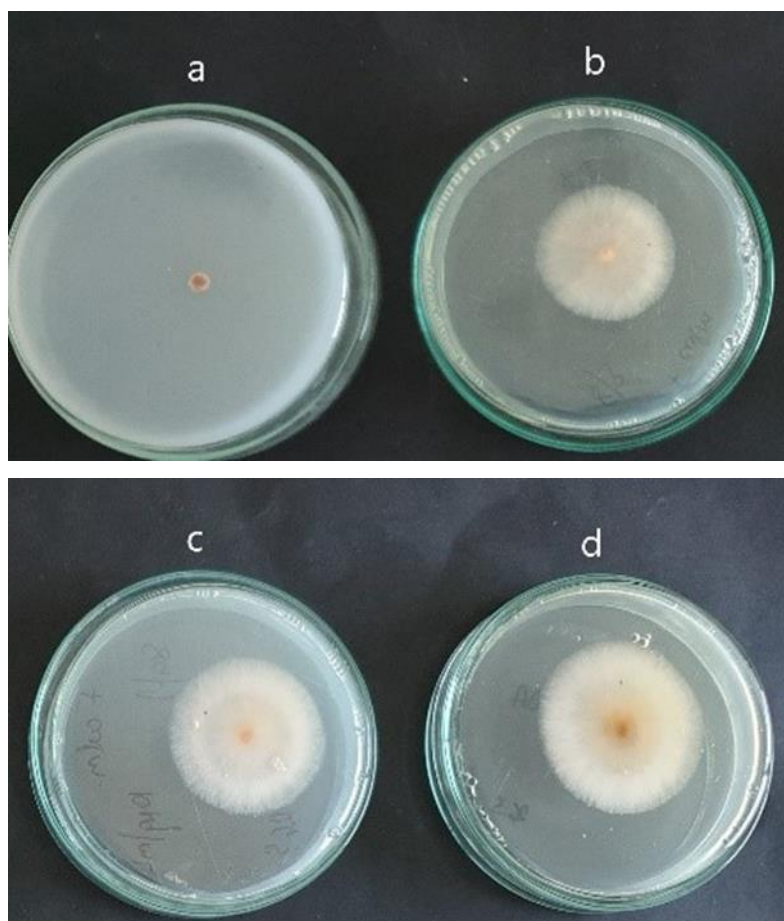
Kao što se može vidjeti u tablicama 13. i 14., ni jedan derivat nikotinamida nije u potpunosti (100 %) suzbio porast micelija fitopatogene gljive *F. culmorum*, bez obzira na primijenjenu koncentraciju i vrijeme inkubacije.

Kada je riječ o primijenjenoj koncentraciji od 10 µg/mL (tablica 13.), statistički značajno slabiji porast gljive u odnosu na kontrolu (čisti KDA) utvrđen je kod primjene nikotinamidnih derivata (1), (4), (5) i (6). Nakon 72 sata inkubacije, nije bilo razlike u porastu micelija u odnosu na kontrolu (čisti KDA) samo kod primjene spojeva (1) i (12). Nakon 96 sati inkubacije utvrđene su značajne razlike između spojeva i obiju kontrola. Međutim, nakon 144 sata inkubacije ni jedan spoj nije pokazao razliku u odnosu na kontrolu (čisti KDA). U usporedbi s komercijalnim fungicidom, svi spojevi u koncentraciji od 10 µg/mL imali su značajno slabiji inhibitorni učinak bez obzira na vrijeme inkubacije.

Kada je riječ o primijenjenoj koncentraciji od 100 µg/mL (tablica 14), 48 sati od inokulacije sedam od 12 derivata nikotinamida imalo je bolje antifungalno djelovanje na porast micelija *F. culmorum* od kontrole (čisti KDA). Izuzetci su spojevi (7), (8), (10), (11) te (12) za koje nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Treba istaknuti da je u odnosu na iste spojeve, ali primijenjene u manjoj koncentraciji (10 µg/mL), veći broj spojeva u koncentraciji od 100 µg/mL imao bolji inhibitorni učinak od kontrole (čisti KDA) nakon 48 sati inkubacije (slika 14.). Nadalje, rezultati nakon 72 sata od inokulacije pokazuju da se spojevi (5), (8), (10), (11) te (12) nisu statistički značajno razlikovali u inhibiciji micelija od kontrole (čisti KDA). No, 96 sati od inokulacije svi nikotinamidni piridinijevi spojevi imali su značajno bolje djelovanje na porast micelija od kontrole.

Slično kao i kod koncentracije od 10 µg/mL, gotovo svi derivati nikotinamida u primijenjenoj koncentraciji od 100 µg/mL nisu imali inhibitoran učinak na porast micelija 120 sati i 144 sati od inokulacije.



Slika 16. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida različitih koncentracija na porast *F. culmorum* primjenom: a) pozitivna kontrola, b) 8 (100 $\mu\text{g/mL}$) c) 8 (10 $\mu\text{g/mL}$), d) čisti KDA, 72 h nakon inokulacije
(Izvor: T. Siber)

Tablica 13. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. culmorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		24,00 ± 0,817 Aa	47,33 ± 0,472 A	78,00 ± 0,707 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(2)		25,68 ± 0,472 A	49,33 ± 0,624 Aa	74,00 ± 0,408 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(3)		27,67 ± 0,624 A	50,00 ± 0,707 Aa	79,68 ± 1,650 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(4)		24,33 ± 0,472 Aa	49,33 ± 1,027 Aa	79,00 ± 0,707 Aa	89,25 ± 0,750 A	90,00 ± 0,000 A
(5)		24,00 ± 0,000 Aa	48,33 ± 0,472 Aa	78,33 ± 0,624 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(6)		21,68 ± 0,472 Aa	44,00 ± 1,080 Aa	78,33 ± 1,650 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(7)		26,33 ± 0,472 A	47,68 ± 0,236 Aa	69,00 ± 1,080 Aa	87,33 ± 0,472 Aa	90,00 ± 0,000 A
(8)		25,33 ± 0,624 A	49,00 ± 0,408 Aa	73,33 ± 1,700 Aa	89,00 ± 0,707 A	87,00 ± 3,000 A
(9)		25,00 ± 0,408 A	48,00 ± 0,408 Aa	71,68 ± 0,472 Aa	89,50 ± 0,50 A	90,00 ± 0,000 A
(10)		27,33 ± 0,236 A	49,25 ± 0,479 Aa	73,33 ± 0,850 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(11)		30,00 ± 0,408 A	50,68 ± 0,624 Aa	78,68 ± 1,179 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(12)		29,00 ± 0,577 A	51,75 ± 0,250 A	77,33 ± 0,236 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
kontrola (čisti KDA) a		31,33 ± 2,095	54,68 ± 1,247	87,50 ± 0,866	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	5,75 ± 0,250	7,25 ± 0,479	10,00 ± 0,408

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiri ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Tablica 14. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. culmorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		19,25 ± 0,479 Aa	40,33 ± 0,624 Aa	61,68 ± 1,247 Aa	89,50 ± 0,500 A a	90,00 ± 0,000 A
(2)		20,75 ± 0,479 Aa	42,25 ± 0,479 Aa	70,00 ± 0,408 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(3)		19,325 ± 0,472 Aa	42,00 ± 0,817 Aa	68,50 ± 0,646 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(4)		21,00 ± 0,408 Aa	42,00 ± 0,707 Aa	69,33 ± 0,624 Aa	86,50 ± 2,021 A	90,00 ± 0,000 A
(5)		19,50 ± 0,289 Aa	39,50 ± 0,500 A	67,75 ± 0,479 Aa	86,00 ± 2,309 A	90,00 ± 0,000 A
(6)		18,50 ± 0,289 Aa	36,00 ± 0,408 Aa	62,33 ± 0,850 Aa	82,00 ± 0,408 Aa	90,00 ± 0,000 A
(7)		26,68 ± 0,624 A	49,33 ± 0,472 Aa	69,75 ± 0,479 Aa	85,75 ± 2,462 A	90,00 ± 0,000 A
(8)		25,00 ± 0,707 A	51,00 ± 1,080 A	74,68 ± 1,027 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(9)		24,00 ± 0,707 Aa	44,00 ± 1,414 Aa	72,00 ± 1,080 Aa	83,68 ± 1,434 Aa	90,00 ± 0,000 A
(10)		31,33 ± 0,472 A	53,00 ± 0,408 A	79,33 ± 0,850 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(11)		29,75 ± 0,479 A	54,00 ± 0,408 A	79,00 ± 0,408 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(12)		31,75 ± 0,250 A	52,70 ± 0,750 A	76,00 ± 0,707 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
kontrola (čisti KDA) a		31,33 ± 2,095	54,68 ± 1,247	87,50 ± 0,866	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	5,75 ± 0,250	7,25 ± 0,479	10,00 ± 0,408

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.
 Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$),
 t-test.

Antifungalno djelovanje derivata izonikotinamida na porast micelija F. culmorum

Kao što se može vidjeti u tablicama 15. i 16., ni jedan od spojeva derivata izonikotinamida nije u potpunosti (100 %) suzbio porast micelija fitopatogene gljive *F. culmorum* bez obzira na primijenjenu koncentraciju i vrijeme inkubacije.

Kada je riječ o primijenjenoj koncentraciji od 10 µg/mL, 48 sati od inokulacije gotovo svi spojevi imali su značajno slabije antifungalno djelovanje na porast micelija fitopatogene gljive roda *F. culmorum* u odnosu na kontrolu (čisti KDA) (tablica 15.). Izuzetak su tri spoja, odnosno (7), (8) te (10). Slično tomu, 72 sata od inokulacije gotovo svi derivati izonikotinamida značajno su se razlikovali od kontrole (čisti KDA). Dva spoja, odnosno (9) i (12), nisu se značajno razlikovala u porastu micelija od kontrole (čisti KDA). U sljedećem mjeranju, 96 sati od inokulacije, utvrđena je značajna razlika između kontrole (čisti KDA) i svih spojeva, osim spojeva (4) i (6). Nakon 120 i 144 sati od inokulacije porast micelija primjenom derivata izonikotinamida u koncentraciji od 10 µg/mL nije se statistički značajno razlikovao od kontrole (čisti KDA). Svi ispitivani spojevi imali su značajno slabije antifungalno djelovanje na porast micelija fitopatogene gljive *F. culmorum* od komercijalnog fungicida.

Kada je riječ o koncentraciji od 100 µg/mL (tablica 16.), svi ispitivani spojevi imali su statistički značajno manji porast micelija nego u kontroli (čisti KDA) 72 sata, 96 sati te 120 sati od inokulacije. Nakon 48 sati inkubacije, spojevi (3), (4), (6) te (7) imali su statistički značajno bolji porast micelija u odnosu na kontrolu (čisti KDA) što znači da su ti spojevi djelovali stimulatивно na rast gljive. Kod svih ostalih spojeva nije bilo razlika u porastu micelija u odnosu na navedenu kontrolu. U posljednjem mjeranju za spojeve (3), (4), (5), (6), (10) te (12) nisu utvrđene značajne razlike u porastu gljive u odnosu na kontrolu (čisti KDA), dok je primjenom spojeva (1), (2), (7), (8) i (9) porast micelija bio statistički značajno manji u odnosu na kontrolu (čisti KDA).

Tablica 15. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. culmorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72h	96 h	120 h	144 h
(1)		42,50 ± 0,957 Aa	66,00 ± 1,080 Aa	85,33 ± 0,472 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(2)		37,68 ± 0,850 Aa	59,33 ± 1,312 Aa	81,33 ± 0,850 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(3)		36,00 ± 0,408 Aa	59,33 ± 0,236 Aa	83,33 ± 1,179 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(4)		41,00 ± 0,707 Aa	67,00 ± 0,408 Aa	88,00 ± 0,817 A	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(5)		37,68 ± 1,179 Aa	60,00 ± 1,414 Aa	86,33 ± 1,929 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(6)		43,00 ± 0,707 Aa	66,00 ± 1,080 Aa	88,00 ± 0,817 A	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
(7)		27,68 ± 0,624 A	46,00 ± 0,408 Aa	70,33 ± 1,434 Aa	88,50 ± 1,50 A	90,00 ± 0,000 A
(8)		27,25 ± 0,250 A	47,25 ± 0,750 Aa	73,33 ± 0,236 Aa	88,25 ± 1,750 A	89,25 ± 0,750 A
(9)		33,68 ± 0,850 Aa	54,68 ± 1,027 A	78,33 ± 1,247 Aa	88,75 ± 1,250 A	90,00 ± 0,000 A
(10)		25,68 ± 0,624 A	46,00 ± 0,707 Aa	71,33 ± 1,247 Aa	88,00 ± 1,225 A	90,00 ± 0,000 A
(12)		33,68 ± 0,472 Aa	57,00 ± 0,817 A	84,33 ± 0,624 Aa	90,00 ± 0,000 A	90,00 ± 0,000 A
kontrola (čisti KDA) a		26,68 ± 1,434	54,68 ± 1,247	88,00 ± 0,707	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	5,75 ± 0,250	7,25 ± 0,479	9,25 ± 0,854

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Tablica 16. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *F. culmorum*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		30,00 ± 0,000 A	46,33 ± 0,236 Aa	62,33 ± 1,027 Aa	79,33 ± 0,624 Aa	87,00 ± 0,707 Aa
(2)		31,00 ± 0,408 A	46,33 ± 0,236 Aa	62,33 ± 0,236 Aa	78,43 ± 1,564 Aa	88,33 ± 0,472 Aa
(3)		32,33 ± 0,850 Aa	49,00 ± 1,225 Aa	66,68 ± 2,095 Aa	82,68 ± 2,014 Aa	89,33 ± 0,472 A
(4)		31,33 ± 0,236 Aa	47,35 ± 1,546 Aa	63,00 ± 2,121 Aa	81,68 ± 0,943 Aa	87,33 ± 1,886 A
(5)		29,68 ± 0,236 A	46,00 ± 0,408 Aa	61,65 ± 0,850 Aa	80,33 ± 0,850 Aa	89,68 ± 0,236 A
(6)		32,33 ± 0,472 Aa	49,33 ± 0,624 Aa	67,33 ± 0,850 Aa	82,68 ± 1,027 Aa	89,00 ± 0,408 A
(7)		21,75 ± 0,250 Aa	34,65 ± 0,472 Aa	52,33 ± 0,850 Aa	71,50 ± 0,957 Aa	80,75 ± 0,479 Aa
(8)		23,25 ± 0,479 A	36,50 ± 0,646 Aa	52,75 ± 0,854 Aa	70,50 ± 1,040 Aa	82,75 ± 0,479 Aa
(9)		22,50 ± 0,646 A	35,75 ± 1,031 Aa	51,75 ± 1,601 Aa	70,00 ± 2,041 Aa	77,00 ± 0,408 Aa
(10)		24,00 ± 0,408 A	39,25 ± 0,479 Aa	59,68 ± 0,472 Aa	82,68 ± 0,472 Aa	87,33 ± 1,027 A
(12)		25,33 ± 0,624 A	42,68 ± 0,472 Aa	62,33 ± 0,624 Aa	76,33 ± 0,850 Aa	86,33 ± 0,4715
kontrola (čisti KDA) a		26,68 ± 1,434	54,68 ± 1,247	88,00 ± 0,707	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (difenkonazol, tebukonazol)		4,00 ± 0,000	5,00 ± 0,000	5,75 ± 0,250	7,25 ± 0,479	9,25 ± 0,854

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiri puta ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

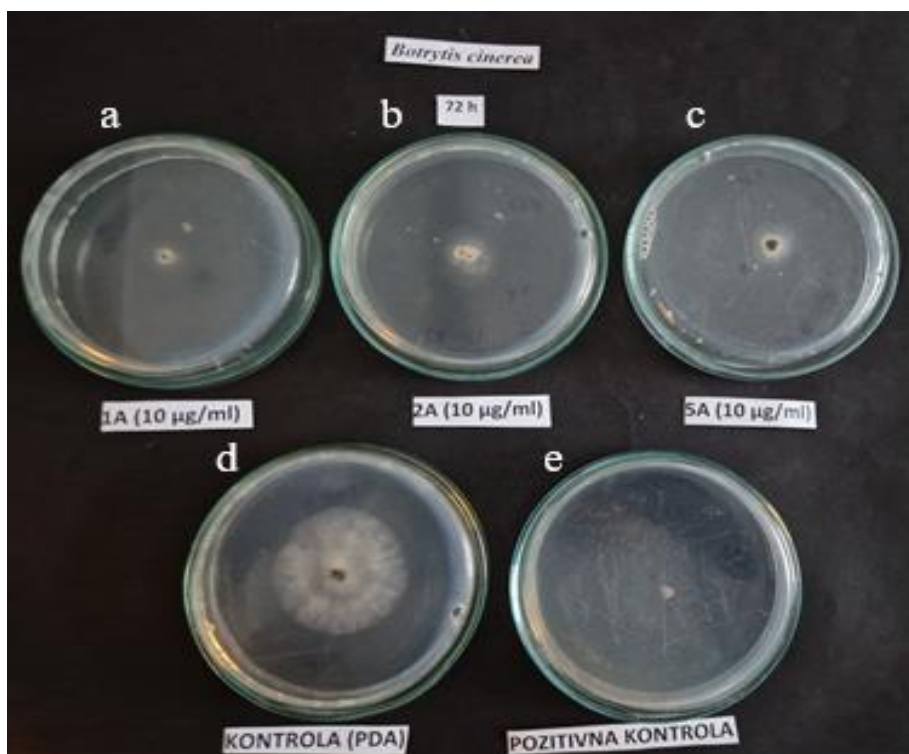
Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

3.1.4. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija *B. cinerea*

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida na porast micelija B. cinerea

Kao što se može vidjeti u tablicama 17. i 18., ni jedan derivat nikotinamida nije u potpunosti (100 %) suzbio porast micelija fitopatogene gljive *B. cinerea*, bez obzira na primijenjenu koncentraciju i vrijeme inkubacije.

Kada je riječ o primijenjenoj koncentraciji od 10 µg/mL, svi su spojevi imali značajno bolje antifungalno djelovanje na porast micelija *B. cinerea* u odnosu na kontrolu (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije (tablica 17., slika 17.). Izuzetak je spoj (11) koji se 144 sati od inokulacije nije značajno razlikovao od kontrole (čisti KDA). Spoj (4) pokazao je najbolje antifungalno djelovanje tijekom svih pet mjerenja.



Slika 17. Antifungalno djelovanje na porast *B. cinerea* primjenom derivata nikotinamida (10 µg/mL): a) 1, b) 2, c) 5, d) čisti KDA, e) pozitivna kontrola, 72 h nakon inokulacije (Izvor: T. Siber)

Slični su rezultati dobiveni za spojeve primijenjene u koncentraciji od 100 µg/mL (tablica 18.), odnosno kod svih spojeva utvrđen je značajno slabiji porast gljive *B. cinerea* u odnosu na kontrolu (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije.

Kada je riječ o usporedbi s komercijalnim fungicidom, gotovo svi derivati nikotinamida primijenjeni u koncentraciji od 100 µg/mL imali su značajno lošije antifungalno djelovanje na porast micelija *B. cinerea*, bez obzira na vrijeme inkubacije. Izuzetci su bili spojevi (8) i (9) kod kojih se porast micelija 48 sati od inokulacije nije značajno razlikovao od pozitivne kontrole te spoj (11) kod kojeg se, također, nakon 144 sati od inokulacije, porast micelija nije statistički značajno razlikovao od pozitivne kontrole.

Tablica 17. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *B. cinerea*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		13,00 ± 0,707 Aa	23,33 ± 1,247 Aa	34,68 ± 0,472 Aa	49,00 ± 0,408 Aa	59,33 ± 0,624 Aa
(2)		12,68 ± 0,624 Aa	27,68 ± 0,850 Aa	39,33 ± 0,624 Aa	49,00 ± 1,080 Aa	51,68 ± 1,650 Aa
(3)		14,00 ± 0,817 Aa	29,68 ± 0,624 Aa	40,33 ± 0,474 Aa	47,00 ± 0,000 Aa	49,33 ± 0,943 Aa
(4)		7,00 ± 0,408 Aa	20,68 ± 1,785 Aa	30,33 ± 1,027 Aa	40,33 ± 0,236 Aa	45,68 ± 1,179 Aa
(5)		6,75 ± 0,479 Aa	21,33 ± 0,624 Aa	30,33 ± 0,850 Aa	43,75 ± 0,479 Aa	49,00 ± 1,225 Aa
(6)		14,00 ± 0,408 Aa	26,33 ± 0,236 Aa	38,00 ± 1,472 Aa	43,33 ± 3,704 Aa	46,68 ± 3,793 Aa
(7)		12,68 ± 0,236 Aa	25,68 ± 0,236 Aa	40,68 ± 0,236 Aa	55,68 ± 0,472 Aa	65,33 ± 1,434 Aa
(8)		11,00 ± 0,408 Aa	20,68 ± 0,943 Aa	35,00 ± 0,817 Aa	42,00 ± 0,408 Aa	48,68 ± 1,027 Aa
(9)		11,00 ± 0,817 Aa	25,68 ± 0,850 Aa	36,68 ± 1,700 Aa	58,68 ± 1,247 Aa	72,33 ± 0,624 Aa
(10)		12,33 ± 0,624 Aa	24,33 ± 0,850 Aa	36,33 ± 0,236 Aa	47,00 ± 0,817 Aa	53,68 ± 0,850 Aa
(11)		25,68 ± 5,133 Aa	46,18 ± 3,923 Aa	66,83 ± 2,918 Aa	89,68 ± 0,236 Aa	90,00 ± 0,000 A
(12)		12,00 ± 0,408 Aa	20,50 ± 0,866 Aa	32,68 ± 1,650 Aa	48,68 ± 0,850Aa	56,68 ± 1,027 Aa
kontrola (čisti KDA) a		25,00 ± 1,080	53,68 ± 0,943	81,33 ± 0,850	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (fenheksamid)		4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	5,00 ± 0,707	6,00 ± 1,414	19,33 ± 2,779

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Tablica 18. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *B. cinerea*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		8,33 ± 0,236 Aa	13,00 ± 2,550 Aa	29,68 ± 0,624 Aa	37,00 ± 2,677 Aa	43,00 ± 3,342 Aa
(2)		8,00 ± 0,408 Aa	15,68 ± 0,236 Aa	26,33 ± 0,624 Aa	37,33 ± 0,472 Aa	42,00 ± 0,707 Aa
(3)		11,33 ± 0,624 Aa	24,00 ± 1,080 Aa	35,00 ± 0,707 Aa	50,33 ± 1,312 Aa	53,33 ± 0,624 Aa
(4)		8,00 ± 0,408 Aa	19,68 ± 0,850 Aa	31,68 ± 0,624 Aa	42,00 ± 1,080 Aa	50,33 ± 1,027 Aa
(5)		8,25 ± 0,250 Aa	20,68 ± 0,236 Aa	31,33 ± 0,850 Aa	50,00 ± 1,472 Aa	54,00 ± 0,817 Aa
(6)		8,75 ± 0,479 Aa	25,68 ± 0,472 Aa	42,33 ± 0,943 Aa	60,00 ± 0,408 Aa	80,58 ± 1,687 Aa
(7)		9,33 ± 0,472 Aa	24,68 ± 0,472 Aa	42,00 ± 0,408 Aa	57,68 ± 0,236 Aa	78,75 ± 0,250 Aa
(8)		7,00 ± 1,225 a	24,68 ± 1,841 Aa	39,68 ± 2,718 Aa	52,00 ± 3,189 Aa	70,68 ± 3,859 Aa
(9)		4,68 ± 0,476 a	21,33 ± 1,027 Aa	40,33 ± 2,718 Aa	54,00 ± 3,082 Aa	74,00 ± 3,894 Aa
(10)		9,68 ± 0,624 Aa	24,68 ± 0,850 Aa	41,00 ± 1,780 Aa	57,00 ± 1,472 Aa	78,68 ± 0,943 Aa
(11)		11,38 ± 1,725 Aa	14,88 ± 2,105 Aa	18,38 ± 3,287 Aa	20,25 ± 4,479 Aa	23,00 ± 5,638 a
(12)		7,33 ± 0,943 Aa	19,68 ± 1,247 Aa	34,33 ± 0,943 Aa	53,00 ± 2,160 Aa	69,00 ± 2,121 Aa
kontrola (čisti KDA) a		25,00 ± 1,080	53,68 ± 0,943	81,33 ± 0,850	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (fenheksamid)		4,00 ± 0,000	4,00 ± 0,000	5,00 ± 0,707	6,00 ± 1,414	19,33 ± 2,779

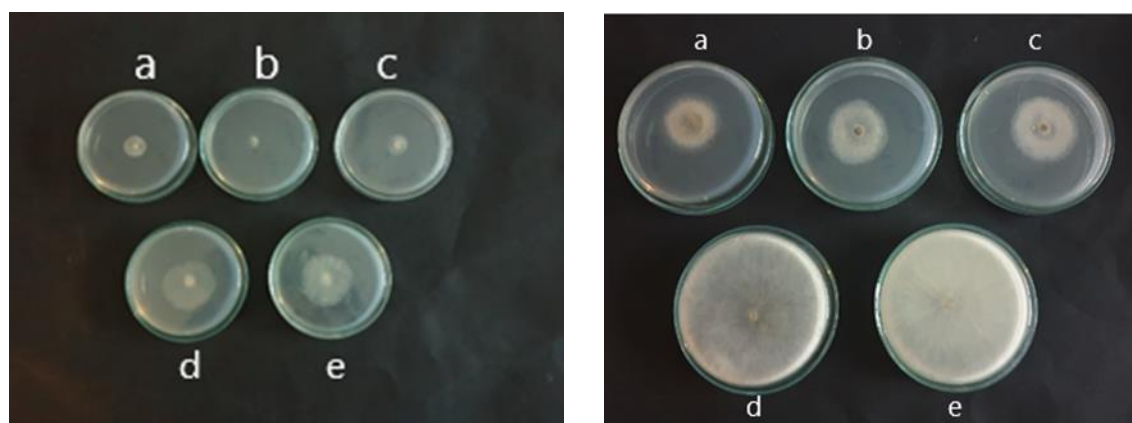
U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Antifungalno djelovanje derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i 100 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija B. cinerea

Slično rezultatima za derivate nikotinamida, ni jedan derivat izonikotinamida nije u potpunosti (100 %) suzbio porast micelija fitopatogene gljive *B. cinerea*, bez obzira na primijenjenu koncentraciju i vrijeme inkubacije (tablice 19. i 20.).

Svi su spojevi imali značajno manji porast micelija fitopatogene gljive roda *B. cinerea* u odnosu na kontrolu (čisti KDA), bez obzira na primijenjenu koncentraciju i vrijeme inkubacije (slika 18.). Nasuprot tomu, svi su spojevi imali značajno lošije antifungalno djelovanje od komercijalnog fungicida (tablice 19. i 20.).



Slika 18. Antifungalno djelovanje derivata izonikotinamida (10 µg/mL) na porast micelija *B. cinerea* a) 9, b) 11, c) 12, d) DMSO, e) čisti KDA, 48 i 96 h nakon inokulacije

(Izvor: T. Siber)

Tablica 19. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) na porast micelija (mm) *B. cinerea*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		12,50 ± 0,289 Aa	33,68 ± 0,472 Aa	50,68 ± 0,471 Aa	66,58 ± 0,253 Aa	80,33 ± 0,624 Aa
(2)		11,33 ± 0,236 Aa	26,00 ± 0,707 Aa	44,33 ± 0,236 Aa	60,00 ± 0,408 Aa	75,00 ± 1,080 Aa
(3)		9,68 ± 0,472 Aa	27,00 ± 1,080 Aa	45,00 ± 0,408 Aa	60,68 ± 0,850 Aa	75,00 ± 1,080 Aa
(4)		14,00 ± 0,707 A	34,00 ± 1,633 Aa	56,68 ± 2,494 Aa	71,00 ± 2,273 Aa	84,33 ± 1,650 Aa
(5)		9,33 ± 0,624 Aa	27,00 ± 2,273 Aa	44,68 ± 1,650 Aa	63,00 ± 0,408 Aa	74,33 ± 2,953 Aa
(6)		10,33 ± 0,624 Aa	25,68 ± 1,929 Aa	46,50 ± 2,901 Aa	64,00 ± 2,483 Aa	81,33 ± 1,650 Aa
(7)		10,00 ± 0,577 Aa	29,68 ± 1,027 Aa	45,75 ± 0,750 Aa	61,33 ± 0,472 Aa	79,00 ± 0,817 Aa
(8)		9,25 ± 0,750 Aa	26,33 ± 1,886 Aa	43,68 ± 2,392 Aa	56,33 ± 2,249 Aa	67,25 ± 3,326 Aa
(9)		14,00 ± 0,408 Aa	38,00 ± 1,080 Aa	54,00 ± 0,707 Aa	64,68 ± 1,700 Aa	83,00 ± 1,225 Aa
(10)		10,00 ± 0,408 Aa	24,00 ± 0,707 Aa	44,33 ± 0,850 Aa	57,25 ± 0,750 Aa	75,33 ± 0,850 Aa
(12)		9,75 ± 0,479 Aa	20,68 ± 0,850 Aa	40,00 ± 0,707 Aa	58,75 ± 0,629 Aa	77,33 ± 0,236 Aa
kontrola (čisti KDA) a		15,33 ± 0,236	46,00 ± 0,408	70,00 ± 0,707	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (fenheksamid)		4,00 ± 0,000	5,75 ± 1,181	6,00 ± 1,414	6 ± 1,414	6 ± 1,414

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($p \leq 0,05$), t-test.

Tablica 20. Utjecaj derivata izonikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija (mm) *B. cinerea*

Spoj	h od inokulacije	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
(1)		9,68 ± 1,179 Aa	24,00 ± 2,160 Aa	43,68 ± 1,312 Aa	58,00 ± 1,780 Aa	77,33 ± 1,312 Aa
(2)		10,33 ± 0,472 Aa	22,68 ± 0,472 Aa	42,68 ± 0,624 Aa	56,33 ± 0,624 Aa	76,68 ± 0,850 Aa
(3)		9,33 ± 0,943 Aa	25,33 ± 0,624 Aa	40,68 ± 0,472 Aa	55,68 ± 1,546 Aa	73,68 ± 1,929 Aa
(4)		15,00 ± 0,408 A	31,68 ± 0,236 Aa	48,33 ± 0,850 Aa	62,68 ± 0,624 Aa	81,33 ± 1,027 Aa
(5)		13,33 ± 0,472 Aa	29,68 ± 0,236 Aa	46,33 ± 0,236 Aa	62,33 ± 0,850 Aa	81,68 ± 0,476 Aa
(6)		13,33 ± 0,624 Aa	29,00 ± 0,817 Aa	48,00 ± 0,4082	61,33 ± 0,472 Aa	82,68 ± 0,236 Aa
(7)		9,33 ± 0,943 Aa	20,33 ± 2,055 Aa	38,68 ± 2,321 Aa	50,68 ± 2,656 Aa	71,00 ± 1,780 Aa
(8)		6,00 ± 0,408 Aa	10,00 ± 0,408 Aa	20,33 ± 1,650 Aa	28,68 ± 2,055 Aa	42,68 ± 2,867 Aa
(9)		10,68 ± 0,472 Aa	24,00 ± 1,080 Aa	41,33 ± 1,179 Aa	55,00 ± 0,817 Aa	72,68 ± 1,546 Aa
(10)		9,00 ± 0,408 Aa	21,68 ± 0,472 Aa	40,68 ± 0,236 Aa	54,68 ± 0,472 Aa	77,00 ± 0,408 Aa
(12)		11,33 ± 1,027 Aa	24,68 ± 2,494 Aa	41,00 ± 1,414 Aa	53,00 ± 1,080 Aa	74,33 ± 0,943 Aa
kontrola (čisti KDA) a		15,33 ± 0,236	46,00 ± 0,408	70,00 ± 0,707	90,00 ± 0,000	90,00 ± 0,000
pozitivna kontrola A (fenheksamid)		4,00 ± 0,000	5,75 ± 1,181	6,00 ± 1,414	6,00 ± 1,414	6,00 ± 1,414

U stupcima su prikazane srednja vrijednost četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($P \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (čisti KDA) slovom a ($P \leq 0,05$), t-test.

3.1.5. Efektivno vrijeme (ET_{50}) porasta micelija *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* i *B. cinerea* pod utjecajem kvaternih piridinijevih soli

Na temelju mjerenja porasta micelija u intervalima od 48 h, 72 h, 96 h, 120 h i 144 h, izračunana je vrijednost ET_{50} za svaki sintetizirani spoj. ET_{50} označava vrijeme (u satima) potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta. Uz ET_{50} , određivane su i pripadajuće 95 %-tne granice pouzdanosti, koristeći Finney probit metodu.

*Efektivno vrijeme (ET_{50}) porasta micelija patogena *S. sclerotiorum* pod utjecajem derivata nikotinamida i izonikotinamida*

Najjače antifungalno djelovanje nikotinamidnih spojeva (8) i (10) na porast micelija patogena *S. sclerotiorum* potvrđeno je efektivnim vremenom porasta (ET_{50}). U tretmanima sa spojevima (8) i (10) potrebno je najviše vremena da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta, odnosno 914,37 sati za spoj (8) i 30746,98 sati za spoj (10). Vrijednost ET_{50} za kontrolu (čisti KDA) najmanja je, a iznosi 43,01 sata.

Za komercijalni fungicid procjena ET_{50} nije bila moguća jer tijekom svih sati mjerenja nije bilo porasta (tablica 21.). To se potvrđuje rezultatom o statistički značajno najboljem antifungalnom djelovanju komercijalnog fungicida na porast micelija *S. sclerotiorum* gdje je utvrđeno 100 %-tno suzbijanje porasta micelija, bez obzira na vrijeme inkubacije (tablica 6.).

Značajno sporiji porast micelija *S. sclerotiorum* primjenom svih derivata izonikotinamida u odnosu na kontrolu (čisti KDA) potvrđuje vrijednost ET_{50} koji za primijenjene spojeve iznosi najmanje 132,72 sata u odnosu na vrijednost ET_{50} za kontrolu (čisti KDA) koja iznosi 43,01 sata (tablica 22.).

Tablica 21. Efektivno vrijeme (ET₅₀) porasta micelija *S. sclerotiorum* pod utjecajem derivata nikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Nikotinamidni derivati	Koncentracija spoja (µg/mL)	ET ₅₀ * (donja - gornja granica)
(1)	10	110,14 (103,49 – 118,24)
	100	103,30 (95,76 – 112,35)
(2)	10	366,84 (246,45 – 879,34)
	100	158,83 (126,33 – 285,91)
(3)	10	126,171 (114,28 – 144,45)
	100	106,95 (100,68 – 114,39)
(4)	10	98,59 (95,15 – 102,24)
	100	236,64 (195,83 – 318,01)
(5)	10	102,53 (96,19 – 109,88)
	100	156,09 (139,33 – 183,78)
(6)	10	123,15 (113,13 – 137,37)
	100	145,60 (133,42 – 163,26)
(7)	10	142,02 (126,59 – 168,50)
	100	189,324 (165,06 – 231,07)
(8)	10	122,10 (113,64 – 133,36)
	100	914,37 (332,33 – 1752971,05)
(9)	10	365,41 (184,80 – 59710288,64)
	100	178,46 (160,17 – 206,81)
(10)	10	97,64 (94,38 – 101,08)
	100	30746,98 (1869,73-1,800E+36)
(11)	10	116,95 (112,19 – 122,46)
	100	153,95 (130,74 – 209,19)
(12)	10	96,25 (93,26 – 99,37)
	100	454,23 (308,87 – 940,09)
kontrola (čisti KDA)		43,01 (38,41 – 46,16)
pozitivna kontrola (difenkonazol, tebukonazol)	0,2 %	**

* Vrijednosti prikazuju razdoblje u satima potrebno da micelij dosegne 50 % svog maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48 h, 72 h, 96 h, 120 h i 144 h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of – Fit Test (Probit). ** Program nije napravio procjenu ET₅₀ vrijednosti jer tijekom svih sati mjerenja nije bilo porasta; vrijednosti su bile iste.

Tablica 22. Efektivno vrijeme (ET₅₀) porasta micelija *S. sclerotiorum* pod utjecajem derivata izonikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Izonikotinamidni derivati	Koncentracija spoja (µg/mL)	ET ₅₀ * (donja – gornja granica)
(1)	10	197,18 (170,58 – 243,77)
	100	173,70 (154,20 – 205,29)
(2)	10	201,22 (172,96 – 251,77)
	100	205,20 (176,25 – 256,87)
(3)	10	200,89 (173,63 – 248,63)
	100	147,123 (134,75 – 165,02)
(4)	10	182,64 (161,03 – 218,31)
	100	163,54 (146,29 – 190,90)
(5)	10	168,32 (151,33 – 194,57)
	100	166,65 (148,87 – 194,92)
(6)	10	193,32 (168,03 – 237,01)
	100	186,34 (161,61 – 229,87)
(7)	10	198,10 (170,31 – 247,99)
	100	132,72 (122,67 – 146,68)
(8)	10	186,59 (163,60 – 225,21)
	100	169,88 (151 – 199,52)
(9)	10	281,20 (216,45 – 444,18)
	100	176,14 (156,66 – 207,37)
(10)	10	181,75 (159,33 – 219,73)
	100	170,05 (151,85 – 198,94)
(12)	10	848,46 (385,13 – 12482,26)
	100	16657,85 (1578,56 – 1,029E+15)
kontrola (čisti KDA)		43,01 (38,41 – 46,16)
pozitivna kontrola (difenkonazol, tebukonazol)	0,2 %	**

* Vrijednosti prikazuju razdoblje u satima potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48 h, 72 h, 96 h, 120 h i 144 h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of -Fit Test (Probit). ** Program nije napravio procjenu ET₅₀ vrijednosti jer tijekom svih sati mjerenja nije bilo porasta, vrijednosti su bile iste.

*Efektivno vrijeme (ET_{50}) porasta micelija *F. oxysporum* pod utjecajem derivata nikotinamida i izonikotinamida*

Rezultate antifungalnog djelovanja derivata nikotinamida na porast micelija *F. oxysporum* potvrđuju i vrijednosti ET_{50} (tablica 23.). Vrijednosti ET_{50} kod svih primijenjenih nikotinamidnih piridinijevih spojeva, pri objema koncentracijama, bile su značajno veće u odnosu na kontrolu (čisti KDA). Za primijenjene spojeve minimalna vrijednost ET_{50} iznosila je 151,02 sata spoj (10), dok je za kontrolu (čisti KDA) vrijednost ET_{50} iznosila 100,71 sat. Značajno slabije antifungalno djelovanje svih spojeva u odnosu na komercijalni fungicid, koje je potvrđeno antifungalnim testovima porasta micelija, također je vidljivo iz ET_{50} koji je za komercijalni fungicid iznosio 1558,15 sati.

Slične vrijednosti ET_{50} zabilježene su i kod primjene izonikotinamidnih spojeva (tablica 24.). Vrijednosti ET_{50} kod svih primijenjenih izonikotinamidnih spojeva, pri objema koncentracijama, bile su veće u odnosu na kontrolu (čisti KDA), za koju ET_{50} vrijednost iznosi 100,71 sati, dok su se vrijednosti ET_{50} za sve primijenjene spojeve kretale od najmanje 117,91 do najveće 179,12 sati. Svi spojevi pokazali su znatno slabije antifungalno djelovanje u odnosu na komercijalni fungicid što je vidljivo iz procjene ET_{50} vrijednosti koja je za komercijalni fungicid iznosila 1558,15 sati.

Tablica 23. Efektivno vrijeme (ET_{50}) porasta micelija patogena *F. oxysporum* pod utjecajem derivata nikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Nikotinamidni derivati	Koncentracija spoja ($\mu\text{g/mL}$)	ET_{50} * (donja – gornja granica)
(1)	10	158,06 (141,28 – 184,93)
	100	215,16 (180,28 – 283,20)
(2)	10	165,82 (147,38 – 195,80)
	100	196,48 (167,42 – 250,90)
(3)	10	164,34 (146,31 – 193,50)
	100	164,84 (147,55 – 192,18)
(4)	10	195,16 (166,73 – 247,93)
	100	177,77 (155,49 – 216,04)
(5)	10	186,88 (160,96 – 233,90)
	100	206,95 (175,51 – 266,02)
(6)	10	181,57 (157,10 – 225,46)
	100	181,19 (159,47 – 217,36)
(7)	10	164,99 (144,89 – 199,57)
	100	186,21 (162,17 – 227,77)
(8)	10	202,46 (169,92 – 266,98)
	100	205,29 (174,06 – 264,20)
(9)	10	176,79 (154,76 – 214,60)
	100	183,78 (160,36 – 224,14)
(10)	10	180,92 (157,68 – 221,30)
	100	151,02 (135,97 – 174,48)
(11)	10	156,96 (140,73 – 182,56)
	100	154,18 (139,28 – 177,02)
(12)	10	180,31 (155,86 – 224,43)
	100	154,42 (139,08 – 178,23)
kontrola (čisti KDA)		100,71 (95,32 – 106,86)
pozitivna kontrola (difenkonazola i tebukonazol)		0,4 % 1558,15 (635,36 – 18228,99)

*Vrijednosti prikazuju razdoblje u satima potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48 h, 72 h, 96 h, 120 h i 144 h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of-Fit Test (Probit).

Tablica 24. Efektivno vrijeme (ET_{50}) rasta micelija *F. oxysporum* pod utjecajem derivata izonikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Izonikotinamidni derivati	Koncentracija spoja ($\mu\text{g/mL}$)	ET_{50} * (donja – gornja granica)
(1)	10	117,91 (110,74 – 126,99)
	100	148,18 (134,24 – 169,32)
(2)	10	119,93 (112,25 – 129,82)
	100	141,36 (129,34 – 158,86)
(3)	10	123,30 (114,80 – 134,58)
	100	163,78 (146,08 – 192,20)
(4)	10	154,91 (138,87 – 180,31)
	100	160,39 (143,39 – 187,50)
(5)	10	130,63 (120,41–144,96)
	100	167,87 (148,47–200,03)
(6)	10	135,62 (124,47–151,60)
	100	159,11 (142,97–184,29)
(7)	10	122,30 (113,56–134,04)
	100	169,55 (150,06–201,69)
(8)	10	126,84 (117,28–140,01)
	100	177,81 (155,59–215,90)
(9)	10	135,83 (124,77–151,63)
	100	157,67 (141,80–182,38)
(10)	10	122,33 (114,25–132,89)
	100	179,12 (156,49–218,12)
(12)	10	157,12 (141,28–181,83)
	100	172,26 (151,87–206,36)
kontrola (čisti KDA)		100,71 (95,32–106,86)
pozitivna kontrola (difenkonazol, tebukonazol)	0,4 %	1558,15 (635,36–18228,99)

* Vrijednosti prikazuju vremenski period u satima potreban da miceliji dosegne 50 % svog maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48h, 72h, 96h, 120h i 144h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of -Fit Test (Probit).

*Efektivno vrijeme (ET_{50}) porasta micelija *F. culmorum* pod utjecajem derivata nikotinamida i izonikotinamida piridinijevih spojeva*

Porast micelija *F. culmorum* kod primjene gotovo svih derivate nikotinamida pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ nije se statistički značajno razlikovalo od kontrole (čisti KDA), što potvrđuje i vrijednost ET_{50} . Vrijednost ET_{50} za kontrolu (čisti KDA) iznosila je 58,07 sati (tablica 25). Vrijednosti ET_{50} svih spojeva primijenjenih u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ kretale su se od 61,18 sati za spoj (12) do 65,52 sata za spoj (7). Vrijednosti ET_{50} za spojeve primijenjene u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ iznosile su od 59,41 sata za spoj (10) do najveće vrijednosti od 70,55 sati za spoj (1). Značajno slabije antifungalno djelovanje svih spojeva pri obje koncentracije u odnosu na komercijalni fungicid potvrđeno je najvećom vrijednošću ET_{50} za komercijalni fungicid, koja iznosi 4066,40 sati potrebnih da micelij dosegne 50 % svog maksimalnog porasta.

U tablici 26 prikazane su vrijednosti ET_{50} pod utjecajem derivate derivata izonikotinamida pri objema koncentracijama (10 i 100 $\mu\text{g/mL}$). ET_{50} vrijednost za sve spojeve primijenjene u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ kretala se od najmanjih 51,29 sati za spoj (6) do najvećih 64,96 sati za spoj (10). Vrijednosti ET_{50} za spojeve primijenjene u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ kretale su se od najmanjih 62,14 sati za spoj (6) do najveće ET_{50} vrijednosti od 78,87 sati za spoj (9). ET_{50} vrijednosti spojeva također potvrđuju značajno slabije ili jednako djelovanje na porast u odnosu na kontrolu (čisti KDA) čija ET_{50} vrijednost iznosi 58,43 sata. Najveća vrijednost ET_{50} , odnosno najviše sati potrebnih da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta pod utjecajem komercijalnog fungicida, iznosi 4066,40 sati.

Tablica 25. Efektivno vrijeme (ET₅₀) porasta micelija *F. culmorum* pod utjecajem derivata nikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Nikotinamidni derivati	Koncentracija spoja (µg/mL)	ET ₅₀ * (donja – gornja granica)
(1)	10	63,86 (60,57 – 66,98)
	100	70,55 (65,66 – 75,19)
(2)	10	63,46 (59,89 – 66,79)
	100	67,76 (63,80 – 71,53)
(3)	10	61,60 (58,09 – 64,86)
	100	68,66 (64,69 – 72,44)
(4)	10	63,41 (60,54 – 66,14)
	100	68,41 (64,73 – 71,90)
(5)	10	63,71 (60,50 – 66,74)
	100	70,02 (66,19 – 73,69)
(6)	10	65,42 (61,92 – 68,75)
	100	70,02 (66,19 – 73,69)
(7)	10	65,52 (61,62 – 69,16)
	100	64,67 (60,82 – 68,25)
(8)	10	64,39 (57,61 – 70,32)
	100	63,39 (60,15 – 66,43)
(9)	10	64,50 (60,77 – 67,99)
	100	66,36 (62,68 – 69,83)
(10)	10	63,02 (59,30 – 66,47)
	100	59,41 (55,74 – 62,75)
(11)	10	60,90 (57,28 – 64,25)
	100	59,99 (56,87 – 62,89)
(12)	10	61,18 (57,66 – 64,44)
	100	59,93 (56,08 – 63,43)
kontrola (čisti KDA)		58,07 (54,31 – 61,49)
pozitivna kontrola (difenkonazol, tebukonazol)	0,4 %	4066,40 (971,09 – 1468012,74)

* Vrijednosti prikazuju razdoblje u satima potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48 h, 72 h, 96 h, 120 h i 144 h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of -Fit Test (Probit).

Tablica 26. Efektivno vrijeme (ET₅₀) rasta micelija *F. culmorum* pod utjecajem derivata izonikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Izonikotinamidni derivati	Koncentracija spoja (µg/mL)	ET ₅₀ * (donja – gornja granica)
(1)	10	51,92 (48,60 – 54,86)
	100	64,93 (60,53 – 68,95)
(2)	10	55,30 (51,86 – 58,39)
	100	64,97 (60,23 – 69,27)
(3)	10	55,92 (52,67 – 58,86)
	100	62,62 (57,86 – 66,90)
(4)	10	52,30 (49,60 – 54,73)
	100	63,10 (58,21 – 67,48)
(5)	10	54,71 (50,91 – 58,07)
	100	64,49 (59,60 – 68,90)
(6)	10	51,29 (47,97 – 54,20)
	100	62,14 (58,20 – 65,73)
(7)	10	64,28 (59,79 – 68,40)
	100	77,92 (74,96 – 80,84)
(8)	10	63,66 (59,78 – 67,26)
	100	76,66 (72,67 – 80,54)
(9)	10	58,40 (54,76 – 61,71)
	100	78,87 (75,64 – 82,04)
(10)	10	64,96 (61,10 – 68,57)
	100	70,76 (66,41 – 74,87)
(12)	10	57,37 (54,23 – 60,24)
	100	69,67 (66,95 – 72,27)
kontrola (čisti KDA)		58,43 (54,72 – 61,82)
pozitivna kontrola (difenkonazol, tebukonazol)	0,4 %	4066,40 (971,09 – 1468012,74)

* Vrijednosti prikazuju razdoblje u satima potrebno da micelij dosegne 50 % maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48h, 72h, 96h, 120h i 144h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of -Fit Test (Probit).

Efektivno vrijeme (ET₅₀) porasta micelija B. cinerea pod utjecajem derivata nikotinamida i izonikotinamida

Značajno slabiji porast micelija *B. cinerea* uz primjenu derivata nikotinamida u odnosu na kontrolu (čisti KDA) potvrđuju i vrijednosti ET₅₀ prikazane u tablici 27. Vrijednosti ET₅₀ za derivate nikotinamida, primijenjene u koncentraciji 10 µg/mL kreću se između 65,53 i 135,85 sati, dok su za iste spojeve u koncentraciji 100 µg/mL između 92,83 i 649,11 sati. ET₅₀ za kontrolu (čisti KDA) iznosi 61,49 sati. ET₅₀ vrijednost spoja (11) pri koncentraciji 10 µg/mL iznosi 65,53 sata, što potvrđuje rezultate o slabom antifungalnom djelovanju ovog spoja, koji se značajno ne razlikuje od kontrole (čisti KDA). Značajno slabije antifungalno djelovanje gotovo svih primijenjenih spojeva u odnosu na komercijalni fungicid vidljivo je iz vrijednosti ET₅₀ za komercijalni fungicid koja iznosi 497,92 sata.

Za spojeve primijenjene u koncentraciji 100 µg/mL, sve vrijednosti ET₅₀ bile su značajno niže, uključujući i vrijednost za komercijalni fungicid, u odnosu na vrijednost ET₅₀ spoja (11). Dobivena vrijednost ET₅₀ za spoj (11) pokazuje da je potrebno najviše vremena da micelij dosegne 50 % svog porasta. Prema rezultatima mjerenja porasta micelija tijekom četiri dana (tablica 18), spoj (11) je pokazao statistički značajno različite vrijednosti u usporedbi s komercijalnim fungicidom. Međutim, petog dana razlike više nisu bile statistički značajne. Rezultati upućuju na to da spoj (11) djeluje sporije, ali pruža dugotrajnije antifungalno djelovanje u odnosu na komercijalni fungicid koji postiže bržu, ali potencijalno kraću inhibiciju.

Slične vrijednosti ET₅₀ zabilježene su i kod derivata izonikotinamida pri objema koncentracijama (tablica 28.). Vrijednosti ET₅₀ za sve primijenjene izonikotinamidne spojeve bile su veće u odnosu na ET₅₀ vrijednost kontrole (čisti KDA) koja iznosi 68,93 sata. Vrijednosti ET₅₀ za sve spojeve primijenjene u koncentraciji 10 µg/mL kreću se od 89,29 sati za spoj (4) do 98,74 sata za spoj (8).

Vrijednosti ET₅₀ svih spojeva bile su znatno niže u odnosu na vrijednost ET₅₀ komercijalnog fungicida pri čijem je djelovanju potrebno najviše vremena da micelij dosegne 50 % svojeg porasta, odnosno 497,92 sata.

Tablica 27. Efektivno vrijeme (ET₅₀) porasta micelija *B. cinerea* pod utjecajem derivata nikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Nikotinamidni derivati	Koncentracija spoja (µg/mL)	ET ₅₀ * (donja – gornja granica)
(1)	10	111,56 (106,37 – 117,62)
	100	146,69 (136,71 – 160,17)
(2)	10	114,138 (107,94 – 121,68)
	100	149,65 (139,03 – 164,20)
(3)	10	117,07 (109,80 – 126,30)
	100	115,42 (109,71 – 122,26)
(4)	10	135,85 (127,59 – 146,63)
	100	127,98 (121,16 – 136,52)
(5)	10	127,84 (121,14 – 136,20)
	100	117,92 (112,66 – 124,14)
(6)	10	127,89 (118,77 – 140,25)
	100	92,83 (89,40 – 96,39)
(7)	10	100,28 (96,35 – 104,54)
	100	94,69 (91,79 – 97,70)
(8)	10	129,03 (121,17 – 139,20)
	100	101,67 (96,87 – 106,97)
(9)	10	97,73 (94,40 – 101,26)
	100	101,033 (96,98 – 105,39)
(10)	10	116,84 (110,69 – 124,34)
	100	95,14 (91,18 – 99,30)
(11)	10	65,53 (59,64 – 70,85)
	100	649,11 (274,59 – 252803,14)
(12)	10	116,10 (110,59 – 122,65)
	100	105,53 (102,06 – 109,29)
kontrola (čisti KDA)		61,49 (58,90 – 63,94)
pozitivna kontrola (fenheksamid)		497,72 (292,77 – 2162,46)

* Vrijednosti prikazuju razdoblje u satima potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48 h, 72 h, 96 h, 120 h i 144 h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of -Fit Test (Probit).

Tablica 28. Efektivno vrijeme (ET_{50}) porasta micelija *B. cinerea* pod utjecajem derivata izonikotinamida

95 % razina pouzdanosti (porast micelija u satima)		
Izonikotinamidni derivati	Koncentracija spoja ($\mu\text{g/mL}$)	ET_{50} * (donja – gornja granica)
(1)	10	84,69 (81,94 – 87,45)
	100	94,66 (90,99 – 98,48)
(2)	10	93,32 (90,25 – 96,51)
	100	95,99 (92,95 – 99,18)
(3)	10	92,96 (89,95 – 96,07)
	100	97,59 (94,38 – 100,97)
(4)	10	80,29 (77,10 – 83,43)
	100	85,74 (82,84 – 88,66)
(5)	10	92,90 (89,96 – 95,93)
	100	87,71 (84,07 – 91,43)
(6)	10	89,81 (85,99 – 93,72)
	100	87,43 (83,51 – 91,43)
(7)	10	90,40 (87,56 – 93,29)
	100	103,20 (98,55 – 108,38)
(8)	10	98,74 (95,25 – 102,46)
	100	161,69 (149,94 – 177,92)
(9)	10	81,75 (79,01 – 84,47)
	100	97,84 (94,47 – 101,41)
(10)	10	95,29 (92,21 – 98,52)
	100	97,06 (94,03 – 100,24)
(12)	10	97,23 (94,26 – 100,38)
	100	102,21 (94,54 – 111,42)
kontrola (čisti KDA)		68,93 (65,87 – 71,89)
pozitivna kontrola (fenheksamid)	0,1 %	497,72 (292,77 – 2162,46)

* Vrijednosti prikazuju razdoblje u satima potrebno da micelij dosegne 50 % svojeg maksimalnog porasta. Mjerenje porasta micelija za svaki tretman provedeno je 48 h, 72 h, 96 h, 120 h i 144 h nakon inokulacije patogena. Pearson Goodness of -Fit Tes t (Probit).

3.1.6. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na klijavost konidija i dužinu kličnih cijevi *B. cinerea*

Kako bi se utvrdilo djeluju li kvaterne piridinijeve soli na vijabilnost konidija i rast kličnih ciljevi (cilj 2.), nakon provedenog pokusa na temelju dobivenih podataka o broju isključanih konidija po svakom tretmanu izračunala se inhibicija klijavosti konidija. Za izračun se koristila formula navedena na stranici 27.

Rezultati su prikazani u tablicama 29. i 30. Utvrđeno je da obje serije kvaternih piridinijevih soli imaju inhibitorno djelovanje na klijavost konidija fitopatogene gljive *B. cinerea*.

Tablica 29. Inhibicijski utjecaj nikotinamidnih derivata na klijavost konidija *B. cinerea*

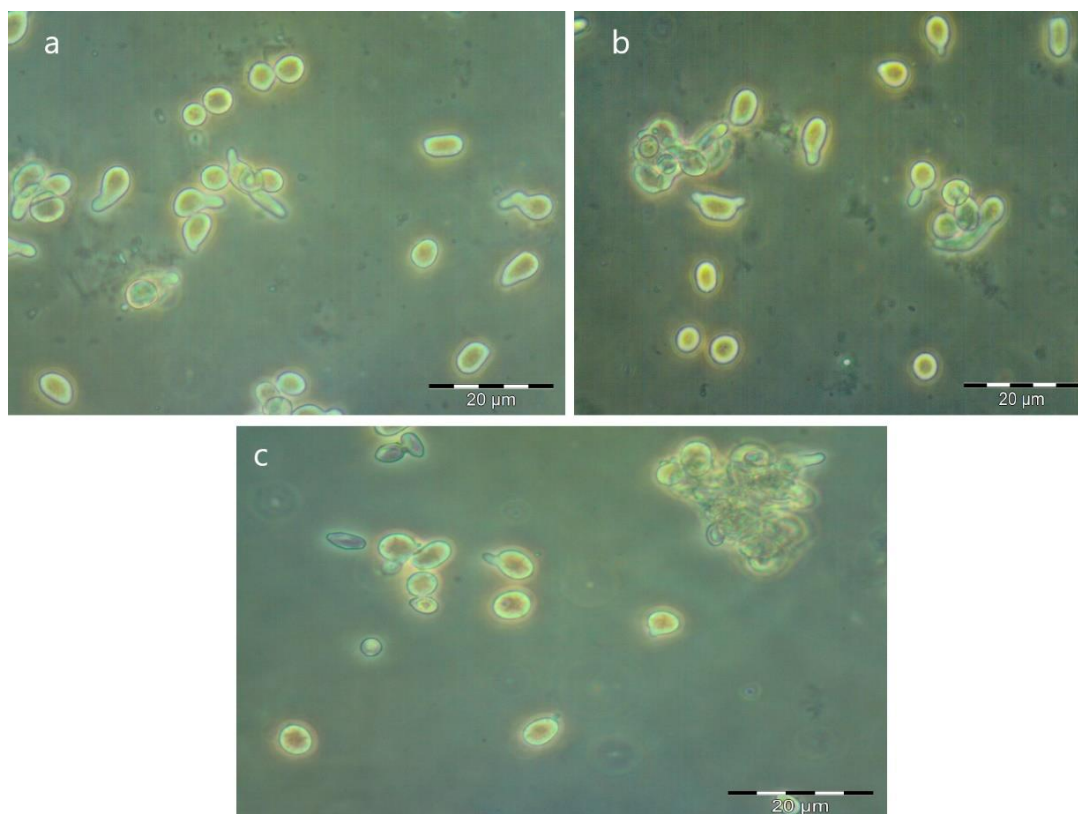
Nikotinamidni derivati	Inhibicija klijavosti konidija <i>B. cinerea</i> (%)	
	koncentracija 10 µg/mL	koncentracija 100 µg/mL
(1)	36 Aa	50 a
(2)	24 A	44 a
(3)	66 a	38
(4)	50 a	22 A
(5)	59 a	4 A
(6)	38 Aa	16 Aa
(7)	50 a	54 a
(8)	74 a	43 a
(9)	63 a	44 a
(10)	58 a	39 a
(11)	47 a	54 a
(12)	65 a	38
kontrola (destilirana voda) a	0	
pozitivna kontrola (fenheksamid) A	71	

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiriju ponavljanja. Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom a ($P \leq 0,05$). Analiza varijance (ANOVA)

Između inhibicije klijavosti konidija primjenom spojeva (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10) i (12) u koncentraciji 10 µg/mL i pozitivne kontrole (fungicid) nisu utvrđene statistički značajne razlike (slika 19.). Postotak inhibicije klijavosti konidija primjenom navedenih spojeva kretao se od 50 do 66 %.

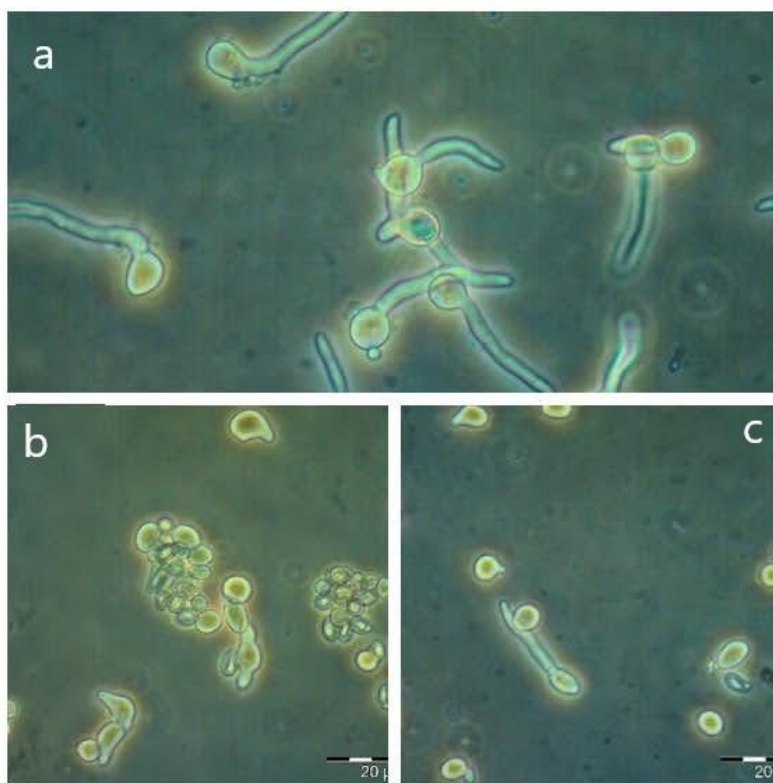
Najveća inhibicija klijavosti kod derivata nikotinamida primijenjenih u koncentraciji od 10 µg/mL utvrđena je za spoj (8) i bila je veća i od one utvrđene za pozitivnu kontrolu, a iznosila je 74 %. Inhibicija klijavosti konidija *B. cinerea* primjenom spojeva (1), (2) i (6) bila je

značajno niža u odnosu na pozitivnu kontrolu (fungicid), s postotkom inhibicije 36 %, 24 % i 38 % (tablica 29.).



Slika 19. Klijavost konidija *B. cinerea*: a) pozitivna kontrola (fungicid), b) spoj 9, c) spoj 10 koncentracija 10 µg/mL (Izvor: T. Siber)

Analizom varijance utvrđen je statistički značajno veći postotak inhibicije klijavosti konidija za sve nikotinamidne spojeve, osim spoja (2), primijenjene u koncentraciji od 10 µg/mL, u odnosu na čistu kontrolu (destilirana voda).



Slika 20. Klijavost konidija *B. cinerea*: a) kontrola (destilirana voda), b) spoj 7, c) spoj 11 koncentracija 100 µg/mL (Izvor: T. Siber)

Najveća inhibicija klijavosti pri primijenjenoj koncentraciji od 100 µg/mL utvrđena je za spojeve (11), (7) te (1). Kod osam od 12 spojeva utvrđeno je da je postotak inhibicije klijavosti konidija manji pri primjeni veće koncentracije spojeva (tablica 29., slika 20.).

Analizom varijance utvrđena je statistički značajna razlika za gotovo sve derivate nikotinamida primijenjene u koncentraciji od 100 µg/mL u odnosu na čistu kontrolu (destilirana voda) pri čemu je inhibicijski učinak navedenih spojeva bio značajno bolji. U usporedbi s pozitivnom kontrolom (fungicid), tri derivata nikotinamida primijenjena u koncentraciji 100 µg/mL, odnosno (4), (5) i (6), imala su značajno slabije inhibitorno djelovanje na klijavost konidija *B. cinerea* koje je iznosilo 22 %, 4 % i 16 %.

Kada je riječ o izonikotinamidnim derivatima, pri koncentraciji od 10 µg/mL najveća inhibicija klijavosti konidija s 82 % utvrđena je za spoj (3) i bila je veća i od one utvrđene za pozitivnu kontrolu (tablica 30.). No u većoj primijenjenoj koncentraciji istog spoja inhibitorni se učinak smanjio na samo 28 %. Spojevi (4), (5), (6), (7), (10) i (12), primijenjeni u koncentraciji od 10 µg/mL, nisu pokazali statistički značajne razlike u inhibiciji klijavosti

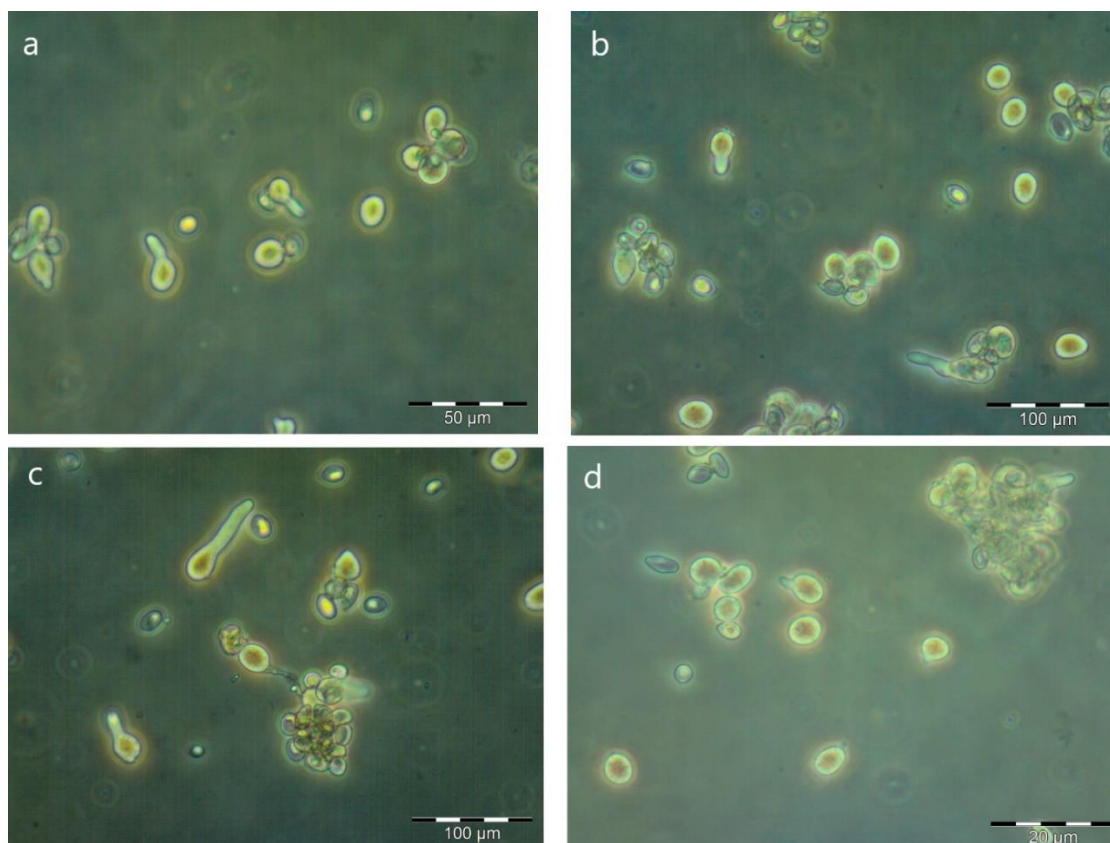
konidija *B. cinerea* u usporedbi s pozitivnom kontrolom (fungicid) (slika 21.). Analizom varijance utvrđena je statistički značajna razlika u djelovanju sedam derivata izonikotinamida primijenjenih u koncentraciji od 10 µg/mL u odnosu na kontrolu (sterilna voda) pri čemu je klijavost konidija u tretmanima sa spojevima bila statistički značajno slabija, a postotak se inhibicije klijavosti kretao između 46 % i 82 %. U usporedbi s pozitivnom kontrolom (fungicid), tri nikotinamidna derivata primijenjena u koncentraciji od 10 µg/mL, odnosno (1), (2), (8) i (9), imala su značajno slabiji inhibični učinak na klijavost konidija *B. cinerea*.

Najveća inhibicija klijavosti pri primijenjenoj koncentraciji od 100 µg/mL utvrđena je za spoj (6) i bila je podjednaka onoj utvrđenoj za pozitivnu kontrolu (fungicid). Osim navedenog spoja, značajne razlike u postotku inhibicije klijavosti konidija nisu utvrđene ni između pozitivne kontrole i spojeva (5), (7), (8), (9) i (10). Svi spojevi primijenjeni u koncentraciji od 100 µg/mL imali su značajno jači inhibični učinak na klijavost konidija od čiste kontrole (destilirana voda). U usporedbi s komercijalnim fungicidom pet spojeva, odnosno (1), (2), (3), (4) te (12), značajno je slabije inhibiralo klijavost konidija u odnosu na fungicid.

Tablica 30. Inhibicijski utjecaj izonikotinamidnih derivata na klijavost konidija *B. cinerea*

Izonikotinamidni derivati	Inhibicija klijavosti konidija <i>B. cinerea</i> (%)	
	koncentracija 10 µg/mL	koncentracija 100 µg/mL
(1)	42 A	42 Aa
(2)	30 A	45 Aa
(3)	82 a	28 Aa
(4)	55 a	34 Aa
(5)	58 a	49 a
(6)	46 a	69 a
(7)	57 a	63 a
(8)	17 A	49 a
(9)	19 A	39 a
(10)	62 a	55 a
(12)	68 a	13 Aa
kontrola (destilirana voda) a	0	
pozitivna kontrola (fenheksamid) A	71	

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiriju ponavljanja. Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom a ($P \leq 0,05$). Analiza varijance (ANOVA)



Slika 21. Klijavost konidija *B. cinerea*: a) spoj 3 (10 µg/mL), b) spoj 6 (100 µg/mL)
c) spoj 12 (10 µg/mL), d) pozitivna kontrola (fungicid)
(Izvor: T. Siber)

Primjenom spojeva u većoj koncentraciji (100 µg/mL) ni kod nikotinamidnih derivata, ni kod izonikotinamidnih derivata nije postignuta 100 %-tna inhibicija klijavosti konidija. Povećanje koncentracije kod pojedinih spojeva dovodi do slabijeg inhibitornog djelovanja na klijavost konidija *B. cinerea*.

Usporedba inhibicije dužine klične cijevi konidija B. cinerea primjenom derivata nikotinamida, komercijalnog fungicida i kontrole (destilirana voda)

Nakon prebrojanih klijavih konidija, uslijedilo je mjerenje dužine klične cijevi za svaki tretman. Na temelju dobivenih podataka izračunavala se inhibicija dužine klične cijevi kako bi se istražio utjecaj nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata na dužinu klične cijevi.

Kako bi se usporedila dužina klične cijevi pri primjeni derivata nikotinamida u odnosu na komercijalni fungicid i čistu kontrolu (destilirana voda) proveden je *t*-test (tablica 31.).

Primjenom spojeva (2) i (11) u koncentraciji 10 µg/mL utvrđene su statistički značajne

razlike u dužini klične cijevi u odnosu na kontrolu (destilirana voda) pri čemu su navedeni spojevi pokazali značajno slabiji učinak u odnosu na kontrolu. Ni jedan nikotinamidni derivat nije se značajno razlikovao u inhibiciji dužine klične cijevi od pozitivne kontrole u primijenjenoj koncentraciji od 10 µg/mL.

Drugim riječima, u primijenjenoj koncentraciji od 10 µg/mL većina je spojeva bila podjednako učinkovita u inhibiciji dužine klične cijevi kao i komercijalni fungicid. Za spojeve (2) i (11) pri primijenjenoj koncentraciji 10 µg/mL može se reći da imaju stimulacijski učinak na dužinu klične cijevi.

Usporedbom derivata nikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) i kontrole (destilirana voda), s obzirom na inhibiciju dužine klične cijevi, utvrđeno je da postoje značajne razlike kod primjene spojeva (2), (3), (4), (5), (6) te (11) u odnosu na čistu kontrolu (destilirana voda). Navedeni spojevi djeluju stimulacijski na rast kličnih cijevi konidija *B. cinerea*. Osim toga, spojevi (4) i (6) imali su značajno slabiji inhibični učinak od komercijalnog fungicida.

Za ostalih osam spojeva nije utvrđena značajna razlika u inhibiciji, ni u usporedbi s kontrolom, ni u usporedbi s komercijalnim fungicidom. Ako se usporede dvije primijenjene koncentracije (koncentracija 10 µg/mL i koncentracija 100 µg/mL) s obzirom na inhibiciju dužine klične cijevi, razlika među njima vidljiva je za spojeve (1), (3), (4), (5), (6) i (9). Pritom je inhibično djelovanje spoja (1) bilo bolje pri primijenjenoj koncentraciji 100 µg/mL, dok je za ostale spojeve inhibično djelovanje bilo bolje pri primijenjenoj koncentraciji 10 µg/mL.

Tablica 31. Inhibicijski utjecaj derivata nikotinamida na dužinu klične cijevi konidija *B. cinerea*

Nikotinamidni derivati	Inhibicija klične cijevi (%)	
	koncentracija 10 µg/mL M ± SPM	koncentracija 100 µg/mL M ± SPM
(1)	1,96 ± 4,68	23,59 ± 4,88
(2)	-7,24 ± 10,86 Aa	-2,33 ± 5,67
(3)	24,83 ± 4,58	-10,88 ± 6,12 a
(4)	4,08 ± 6,93	-26,84 ± 8,33 Aa
(5)	22,05 ± 3,66	-15,63 ± 4,79 a
(6)	11,82 ± 3,56	-16,68 ± 7,38 Aa
(7)	12,15 ± 5,14	11,89 ± 4,42
(8)	13,18 ± 11,35	9,57 ± 4,43
(9)	19,73 ± 3,09	-0,25 ± 7,87
(10)	12,70 ± 3,94	13,03 ± 3,99
(11)	-5,05 ± 8,89 Aa	7,42 ± 6,66
(12)	16,42 ± 5,22	11,20 ± 5,42
kontrola (destilirana voda) a	0,00 ± 4,87	0,00 ± 4,87
pozitivna kontrola (fenheksamid) A	16,88 ± 5,36	16,88 ± 5,36

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiri ponavljanja (M) i standardna pogreška aritmetičke sredine (SPM). Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom a ($p \leq 0,05$).

Usporedba inhibicije dužine klične cijevi konidija B. cinerea primjenom derivata izonikotinamida, komercijalnog fungicida i kontrole (destilirana voda)

Slično kao i za nikotinamidne derivate (koncentracija 10 µg/mL i koncentracija 100 µg/mL), analiza je ponovljena i za izonikotinamidne derivate primijenjene u objema ispitivanim koncentracijama.

Rezultati prikazani u tablici 32. pokazuju da se ni jedan izonikotinamidni derivat primijenjen u koncentraciji 10 µg/mL nije značajno razlikovao u učinku na rast klične cijevi od kontrole (destilirana voda) i komercijalnog fungicida. Isti rezultati dobiveni su i za spojeve primijenjene u koncentraciji od 100 µg/mL.

Usporedbom inhibicije dužine klične cijevi za derivate izonikotinamida s obzirom na koncentraciju, vidljivo je da se inhibitorni učinak spojeva (5), (6), (9) i (12) razlikovao s obzirom na primijenjenu koncentraciju. Pritom je inhibitorni učinak na dužinu klične cijevi za spoj (12) bio bolji pri primijenjenoj koncentraciji 10 µg/mL, dok je za ostale spojeve inhibitorni učinak bio bolji pri primijenjenoj koncentraciji 100 µg/mL. Također, može se zaključiti da spojevi (5), (6) i (9), primijenjeni u koncentraciji 10 µg/mL, imaju stimulacijski učinak na porast klične cijevi.

Tablica 32. Inhibicijski utjecaj derivata izonikotinamida na dužinu klične cijevi konidija *B. cinerea*

Izonikotinamidni derivati	Inhibicija klične cijevi (%)	
	koncentracija 10 µg/mL M ± SPM	koncentracija 100 µg/mL M ± SPM
(1)	3,77 ± 5,03	13,77 ± 4,64
(2)	3,36 ± 4,54	8,03 ± 5,54
(3)	14,67 ± 8,11	8,87 ± 3,95
(4)	6,29 ± 5,07	-3,36 ± 6,37
(5)	-22,52 ± 7,88	11,21 ± 3,67
(6)	-13,55 ± 6,71	12,32 ± 5,88
(7)	-8,11 ± 5,02	4,65 ± 5,80
(8)	-17,42 ± 6,45	15,52 ± 4,68
(9)	-9,59 ± 4,34	7,08 ± 5,40
(10)	19,99 ± 7,27	10,07 ± 6,11
(11)	19,95 ± 8,69	12,90 ± 6,71
(12)	22,03 ± 5,74	-4,94 ± 6,39
kontrola (destilirana voda) a	0,00 ± 4,87	0,00 ± 4,87
pozitivna kontrola (fenheksamid) A	16,88 ± 5,36	16,88 ± 5,36

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiriju ponavljanja (*M*) i standardna pogreška aritmetičke sredine (*SPM*). Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom *A* ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom *a* ($p \leq 0,05$).

3.2. Rezultati *in vivo* istraživanja

3.2.1. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija *S. sclerotiorum* – *in vivo* test na mrkvi

Testovima *in vivo* (cilj 3.) cilj je bio utvrditi antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih soli na porast micelija i sporulaciju te postoji li razlika u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnog fungicida (difenkonazol i tebukonazol) na porast micelija *S. sclerotiorum* (cilj 4.). *In vivo* test na mrkvi proveden je s pomoću odabranih spojeva iz obiju skupina piridina. Spojevi su odabrani na temelju rezultata dobivenih *in vitro* istraživanjem. Rezultati su u nastavku prikazani zasebno za derivate nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) te derivate izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i koncentracija 100 µg/mL) kao i za različita vremena inkubacije.

Usporedba derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) i komercijalnog fungicida

Utvrđena je statistički značajna razlika između nikotinamidnih piridinijevih spojeva (koncentracija 10 µg/mL) i komercijalnog fungicida, 144 sata nakon inokulacije [$F(8, 27) = 15,73$, $p \leq 0,001$], kao i za 168 sati nakon inokulacije [$F(8, 27) = 17,73$, $p \leq 0,001$]. Deskriptivna statistika kao i usporedba pojedinih spojeva prikazana je u tablici 33.

Rezultati prikazani u tablici 33. pokazali su da većina nikotinamidnih derivata primijenjenih u koncentraciji od 10 µg/mL nije postigla potpuno (100 %-tno) suzbijanje porasta micelija, osim spoja (7). Međutim, u usporedbi s kontrolom (destilirana voda), ti su spojevi gotovo uvijek pokazivali bolji učinak nakon 144 sata i 168 sati od inokulacije. Jedinu izuzetak bio je spoj (10) koji se nije značajno razlikovao od kontrole u pogledu antifungalnog djelovanja.

U usporedbi s komercijalnim fungicidom, svi nikotinamidni derivati, osim spoja (7), pokazali su statistički značajno slabiju učinkovitost u suzbijanju porasta micelija patogena *S. sclerotiorum* u ($p \leq 0,05$). Spoj (7) izdvojio se s najboljim antifungalnim djelovanjem, a njegova učinkovitost bila je jednaka učinkovitosti komercijalnog fungicida tijekom cijelog razdoblja inkubacije, uključujući mjerenja nakon 144 i 168 sati od inokulacije.

Kada se uspoređuju nikotinamidni derivati primijenjeni u koncentraciji od 10 µg/mL, svi su se značajno razlikovali od spoja (10). Spojevi (1), (4), (5), (6), (7) i (12) pokazali su bolje antifungalno djelovanje nakon 144 sata ($p < 0,01$) i 168 sati ($p \leq 0,01$) nakon inokulacije u usporedbi s navedenim spojem. Usporedbom drugih nikotinamidnih derivata nisu utvrđene statistički značajne razlike u njihovu antifungalnom djelovanju.

Tablica 33. Usporedba antifungalnog djelovanja derivata nikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija (mm) *S. sclerotiorum* na mrkvi

spoj \ vrijeme od inokulacije	144h M ± SPM	168h M ± SPM
(1)	18,63 ± 5,31 Aa	26,63 ± 6,87 Aa
(4)	8,88 ± 3,14 Aa	10,31 ± 3,45 Aa
(5)	8,63 ± 2,18 Aa	11,06 ± 3,42 Aa
(6)	18,00 ± 6,21 Aa	23,88 ± 8,43 Aa
(7)	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
(10)	39,25 ± 4,60 A	53,13 ± 5,98 A
(12)	10,00 ± 2,67 Aa	11,50 ± 3,94 Aa
kontrola (destilirana voda) a	40,00 ± 4,08	53,50 ± 3,99
pozitivna kontrola (difenkonazol, tebukonazol) A	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
usporedba spojeva (Tukeyjev test)	1, 4, 5, 6, 7, 12 > 10 7 > 1, 4, 5, 6, 12	1, 4, 5, 6, 7, 12 > 10 7 > 1, 4, 5, 6, 12

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiriju ponavljanja (M) i standardna pogreška aritmetičke sredine (SPM). Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom a ($p \leq 0,05$). Značajne razlike među spojevima, odnosno Tukeyjev test ($p \leq 0,05$), označene su brojkama navedenim uz pripadajuće spojeve.

Usporedba derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL i koncentracija 100 µg/mL) i komercijalnog fungicida (koncentracija 10 µg/mL)

Analizom varijance (ANOVA) derivati izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) uspoređeni su međusobno kao i s komercijalnim fungicidom te je utvrđena statistički značajna razlika među njima za tri mjerenja nakon inokulacije, odnosno za 120 sati [$F(7, 120) = 13,07, p \leq 0,001$], za 144 sata [$F(7, 120) = 13,76, p \leq 0,001$] kao i za 168 sati nakon inokulacije [$F(7, 120) = 17,27, p \leq 0,001$]. Deskriptivna statistika, kao i usporedba pojedinih spojeva primijenjenih u koncentraciji 10 µg/mL, prikazana je u tablici 34. Usporedbom antifungalnog djelovanja između izonikotinamidnih derivata pri koncentraciji 10 µg/mL utvrđeno je da su spojevi (10) i (12) imali statistički značajno bolje djelovanje na suzbijanje porasta micelija *S. sclerotiorum* u odnosu na spojeve (4), (5) i (6). Također, spoj (12) bio je statistički značajno učinkovitiji od ostalih spojeva.

Tablica 34. Usporedba antifungalnog djelovanja derivata izonikotinamida (koncentracija 10 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija (mm) patogena *S. sclerotinia* na mrkvi

vrijeme od inokulacije	120 h	144 h	168 h
spoj	M ± SPM	M ± SPM	M ± SPM
(1)	18,25 ± 1,81 A	29,88 ± 5,08 A	39,69 ± 4,99 A
(4)	29,88 ± 6,21 A	41,81 ± 7,51 A	50,88 ± 7,29 A
(5)	26,06 ± 3,03 A	37,13 ± 2,24 A	49,13 ± 5,43 A
(6)	23,63 ± 1,92 A	35,75 ± 3,50 A	49,06 ± 4,36 A
(7)	23,81 ± 4,32 A	34,13 ± 6,08 A	44,44 ± 7,89 A
(10)	0,00 ± 0,00 a	12,75 ± 4,21 Aa	14,38 ± 4,76 Aa
(12)	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
kontrola (destilirana voda) a	25,63 ± 2,69	37,69 ± 3,71	50,25 ± 4,57
pozitivna kontrola (difenkonazola i tebukonazol) A	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
usporedba spojeva (Tukeyjev test)		4, 5, 6 < 10 1, 4, 5, 6 < 12	1, 4, 5, 6, 7 < 10 1, 4, 5, 6, 7 < 12

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine.

Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom a ($p \leq 0,05$). Značajne razlike među spojevima, odnosno Tukeyjev test ($p \leq 0,05$), označene su brojkama navedenim uz pripadajuće spojeve.

U usporedbi s pozitivnom kontrolom, odnosno komercijalnim fungicidom većina izonikotinamidnih derivata primijenjenih u koncentraciji 10 µg/mL imala je slabije ili podjednako antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *S. sclerotiorum* u odnosu na kontrolu (destilirana voda) tijekom cijelog inkubacijskog razdoblja. Jedini izonikotinamidni derivat koji je potpuno (100 %) suzbio porast micelija tijekom cijelog inkubacijskog razdoblja (120, 144 i 168 sati nakon inokulacije) bio je spoj (12) (tablica 34., slika 22.) te spoj (10), 120 sati nakon inokulacije.



Slika 22. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida (10 µg/mL) na porast micelija *S. sclerotiorum* na mrkvi: a) kontrola (destilirana voda), b) spoj 12, c) pozitivna kontrola (fungicid), 120 h nakon inokulacije (Izvor: T. Siber)

Slični rezultati dobiveni su i za izonikotinamidne derivate u koncentraciji od 100 µg/mL, odnosno utvrđene su statistički značajne razlike među spojevima za 120 sati [$F(7, 120) = 18,84, p \leq 0,001$], za 144 sati [$F(7, 120) = 17,91, p \leq 0,001$] kao i za 168 sati nakon inokulacije [$F(7, 120) = 14,70, p \leq 0,001$]. Deskriptivna statistika, kao i usporedba pojedinih spojeva primijenjenih u koncentraciji 100 µg/mL, prikazana je u tablici 35.

Izonikotinamidni spojevi (1), (4), (5), (7), (8), (10) i (12) primijenjeni u koncentraciji 100 µg/mL imali su statistički značajno slabije ili podjednako djelovanje na porast micelija *S. sclerotiorum* u odnosu na kontrolu (destilirana voda) tijekom cijelog inkubacijskog razdoblja (tablica 35.). Osim toga, zabilježene su statistički značajne razlike između svih spojeva i komercijalnog fungicida pri čemu su svi spojevi imali značajno slabije antifungalno djelovanje.

Povećanjem koncentracije spoja (12) (100 µg/mL), njegovo antifungalno djelovanje bilo je statistički značajno slabije u usporedbi s komercijalnim fungicidom (slika 23.). Također, antifungalno djelovanje spoja (10) pri koncentraciji od 100 µg/mL bilo je statistički značajno slabije u odnosu na kontrolu (destilirana voda) što sugerira da antifungalno djelovanje tih spojeva ovisi o primijenjenoj koncentraciji.

Tablica 35. Usporedba antifungalnog djelovanja derivata izonikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) i komercijalnog fungicida na porast micelija (mm) patogena *S. sclerotinia* na mrkvi

vrijeme od inokulacije spoj	120 h M ± SPM	144 h M ± SPM	168 h M ± SPM
(1)	30,19 ± 2,64 A	40,56 ± 2,70 A	40,56 ± 2,70 A
(4)	29,00 ± 1,82 A	37,94 ± 2,44 A	37,94 ± 2,44 A
(5)	31,63 ± 1,52 A	44,19 ± 2,31 A	44,19 ± 2,31 A
(6)	35,81 ± 1,67 Aa	47,56 ± 2,27 Aa	47,56 ± 2,27 A
(7)	29,56 ± 1,57 A	45,00 ± 3,15 A	45,00 ± 3,15 A
(8)	22,63 ± 2,13 A	30,44 ± 3,16 A	30,44 ± 3,16 A
(9)	36,06 ± 2,88 Aa	49,13 ± 2,78 Aa	49,13 ± 2,78 Aa
(10)	25,88 ± 2,94 A	34,81 ± 3,93 A	34,81 ± 3,93 A
(12)	12,38 ± 3,21 Aa	17,81 ± 5,03 Aa	26,75 ± 7,47 Aa
kontrola (destilirana voda) a	25,63 ± 2,69	37,69 ± 3,71	50,25 ± 4,57
pozitivna kontrola (difenkonazola i tebukonazol) A	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
usporedba spojeva (Tukeyjev test)	1, 4, 5, 6, 7, 9, 10 < 12 6, 9 < 8	1, 4, 5, 6, 7, 9, 10 < 12 6, 9 < 8	4, 5, 6, 7, 9, < 12 6, 9 < 8

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiriju ponavljanja i standardna pogreška aritmetičke sredine. Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom a ($p \leq 0,05$). Značajne razlike među spojevima, odnosno Tukeyjev test ($p \leq 0,05$), označene su brojkama navedenim uz pripadajuće spojeve.

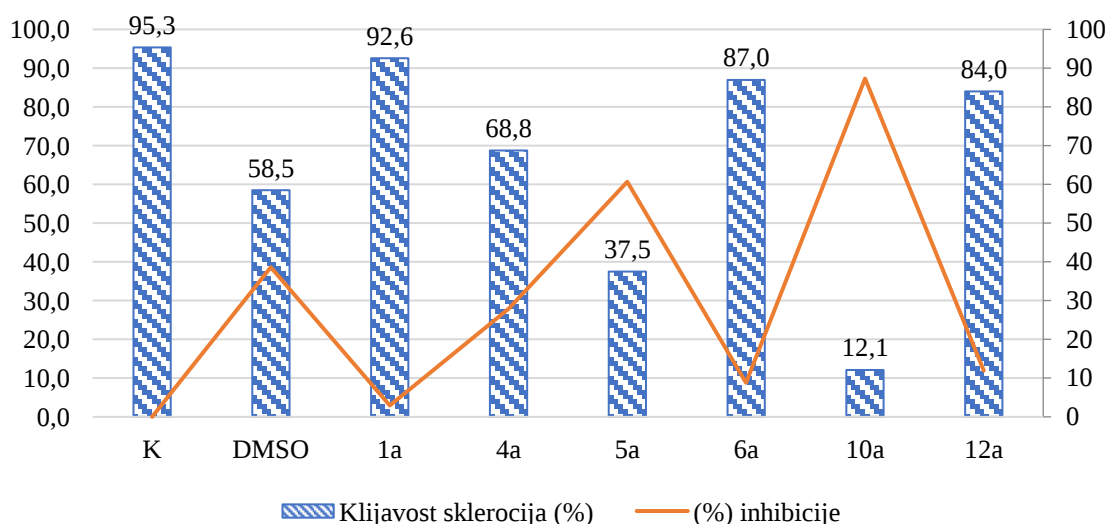


Slika 23. Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida (100 µg/mL) na porast micelija *S. sclerotiorum* na mrkvi: a) kontrola (destilirana voda), b) pozitivna kontrola (fungicid), c) spoj 12, 120 h nakon inokulacije (Izvor: T. Siber)

Rezultati pokazuju da spoj (12) ima statistički značajno bolje antifungalno djelovanje u usporedbi sa spojevima (5), (6), (7) i (9). Također, spoj (8) pokazao je statistički značajno bolje djelovanje u odnosu na spojeve (6) i (9). Rezultati potvrđuju hipotezu da postoje razlike u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli na porast micelija pri čemu je komercijalni fungicid znatno učinkovitiji u inhibiranju porasta micelija *S. sclerotiorum* u usporedbi s većinom nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata. Ipak, među nikotinamidnim spojevima – spoj (7), a među izonikotinamidnim spojevima – spoj (12), pokazali su antifungalno djelovanje jednako onomu komercijalnog fungicida pri koncentraciji od 10 µg/mL.

Test klijavosti sklerocija

Kako bi se utvrdilo djeluju li kvaterne piridinijeve soli na vijabilnost sklerocija patogena *S. sclerotiorum* (cilj 4.), nakon provedenog pokusa *in vivo* na prirodnom supstratu (mrkvi) te prikupljenim sklerocijama, proveden je test klijavosti sklerocija. Na temelju broja iskljalih sklerocija za svaki tretman izračunani su postotak klijavosti i inhibicija klijavosti sklerocija (grafikon 1. i 2.).



Stupci prikazuju prosječan postotak klijavih sklerocija u četirima ponavljanjima po tretmanima.

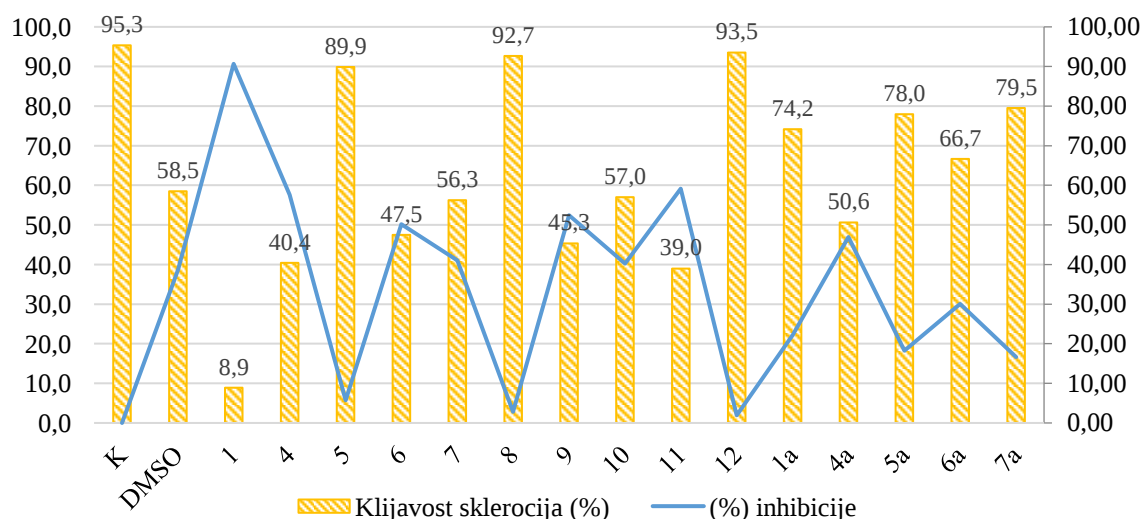
Oznake: K – kontrola (destilirana voda), negativna kontrola (DMSO), 1a, 4a, 5a, 6a, 10a, 12a – spojevi koncentracije 10 µg/mL.

Grafikon 1. Utjecaj derivata nikotinamida na klijavost sklerocija patogena *S. sclerotiorum*

Na grafikonu 1. prikazani su rezultati testa klijavosti sklerocija pod utjecajem različitih nikotinamidnih derivata primijenjenih u koncentraciji 10 µg/mL. Sklerocije iz kontrolne varijante (destilirana voda) pokazale su najveći postotak klijavosti – 95,3 %. Slično kontrolnoj varijanti, tretman spoj (1) u koncentraciji od 10 µg/mL pokazao je vrlo slab inhibitorni učinak na klijavost sklerocija s inhibicijom od 2,92 %.

Spojevi (6) i (12) primijenjeni u istoj koncentraciji od 10 µg/mL također su pokazali slab inhibitorni učinak od 8,80 % i 11,90 %. Suprotno tomu, spoj (4) u koncentraciji od 10 µg/mL utjecao je na niži postotak klijavosti sklerocija od 68,8 % u odnosu na kontrolu, s inhibicijom 27,90 %. Spoj (5) u istoj koncentraciji pokazao je značajan utjecaj na inhibiciju klijavosti sklerocija od 60,67 %, s postotkom klijavih sklerocija od 37,5 %. Najbolji inhibicijski učinak, 87,31 %, imao je spoj (10), s postotkom klijavosti sklerocija od 12,1 %.

Važno je napomenuti da primjenom pozitivne kontrole (komercijalni fungicid) i spoja (7) u koncentraciji od 10 µg/mL na prirodnom supstratu (mrkva) nije bilo porasta micelija te patogen *S. sclerotiorum* nije formirao sklerocije.



Stupci prikazuju prosječan postotak klijavosti sklerocija u četirima ponavljanjima po tretmanima.

Oznake: K – kontrola (destilirana voda), negativna kontrola (DMSO), 1a, 4a, 5a, 6a, 7a, 12a – spojevi koncentracije 10 µg/mL; 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 – spojevi koncentracije 100 µg/mL.

Grafikon 2. Utjecaj derivata izonikotinamida na klijavost sklerocija patogena *S. sclerotiorum*

Rezultati testa klijavosti sklerocija pod utjecajem različitih izonikotinamidnih derivata primijenjenih u koncentracijama od 10 µg/mL i 100 µg/mL prikazani su grafikonom 2. Usporedbom kontrole (destilirana voda) s postotkom klijavosti sklerocija od 95,3 % i spojeva (5), (8) i (12) primijenjenih u koncentraciji od 100 µg/mL, utvrđeno je da se spojevi nisu bitnije razlikovali od kontrole. Navedeni spojevi pokazali su najslabije inhibicijsko djelovanje na klijanje sklerocija u usporedbi s ostalim primijenjenim spojevima u objema koncentracijama, s inhibicijom od 5,74 %, 2,82 % i 1,92 %.

Dobro inhibitorno djelovanje na klijanje sklerocija pokazali su spojevi (4), (6), (9) i (11) primijenjeni u koncentraciji 100 µg/mL, a nakon njihove primjene, postotak iskljajalih sklerocija nije prelazio 50 %. Inhibicijski učinak navedenih spojeva iznosio je 57,60 %, 50,20 %, 52,46 % i 59,12 %.

Najbolje inhibitorno djelovanje na klijanje sklerocija pokazao je spoj (1) primijenjen u koncentraciji od 100 µg/mL, postići inhibiciju od 90,66 %. Međutim, utjecaj spoja (1) na klijavost sklerocija *S. sclerotiorum* ovisi o njegovoj koncentraciji. Primjena istog spoja u nižoj koncentraciji od 10 µg/mL utjecala je na slabije inhibicijsko djelovanje na klijavost sklerocija te je iznosila 22,21 %.

Također, kao i kod testa utjecaja derivata nikotinamida na klijavost sklerocija, u tretmanu s pozitivnom kontrolom (komercijalni fungicid) na prirodnom supstratu (mrkva) patogen *S. sclerotiorum* nije formirao sklerocije.

Iako većina derivata izonikotinamida u primijenjenoj koncentraciji od 100 µg/mL u *in vivo* testu na mrkvi pokazuje slabije djelovanje na porast micelija u odnosu na kontrolu (destilirana voda). Isti spojevi imaju bolje inhibitorno djelovanje na klijanje sklerocija u odnosu na spojeve primijenjene u koncentraciji 10 µg/mL.

3.2.2. Utjecaj sintetiziranih spojeva na porast micelija *B. cinerea* – *in vivo* test na plodovima rajčice

Kako bi se utvrdilo **(a)** razlikuju li se kvaterne piridinijeve soli međusobno u antifungalnom djelovanju na porast micelija fitopatogene gljive *B. cinerea* te **(b)** postoji li razlika u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnog fungicida na porast micelija fitopatogene gljive *B. cinerea*, provedena je analiza varijance (ANOVA) uz Tukeyjev test višestruke usporedbe.

In vivo test na plodovima rajčice proveden je s pomoću odabranih spojeva iz skupine nikotinamdnih piridina. Spojevi su odabrani na temelju rezultata dobivenih *in vitro* istraživanjem. Rezultati su u nastavku prikazani za nikotinamidne derivate (koncentracija 100 µg/mL) i to zasebno za različita vremena inkubacije. Pritom je ANOVA-om utvrđena statistički značajna razlika među spojevima za 96 sati [$F(5, 81) = 129,44, p \leq 0,001$], za 120 sati [$F(5, 79) = 88,92, p \leq 0,001$] kao i za 144 sati [$F(5, 78) = 102,533, p \leq 0,001$]. Rezultati su prikazani u tablici 35. Tukeyjevim testom višestruke usporedbe provjereno je među kojim spojevima postoje statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$).

Rezultati istraživanja prikazani u tablici 35. pokazali su da ni kod jednoga nikotinamidnog derivata s primijenjenom koncentracijom od 100 µg/mL nije utvrđena potpuna inhibicija porasta micelija patogena *B. cinerea*. Osim toga, 96 i 120 sati od inokulacije nikotinamidni derivati nisu se međusobno značajno razlikovali u svojem antifungalnom djelovanju od kontrole (destilirana voda). No odmakom vremena inkubacije, odnosno 144 sata od inokulacije, tri spoja: (2), (9) te (10), imala su značajno slabiji inhibitorni učinak na porast micelija od kontrole (destilirana voda) ($p \leq 0,05$). Značajna razlika Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi utvrđena je i za spojeve (10) i (12) pri čemu je spoj (12) imao značajno bolje antifungalno djelovanje 120 i 144 sata nakon inokulacije, dok je spoj (9) pokazao

najbolje djelovanje 96 sati nakon inokulacije.

Tablica 35. Utjecaj derivata nikotinamida (koncentracija 100 µg/mL) na porast micelija *B. cinerea*

Spoj \ h od inokulacije	96 h M ± SPM	120 h M ± SPM	144 h M ± SPM
(2)	29,00 ± 1,47 A	37,25 ± 2,04 A	45,33 ± 1,70 Aa
(9)	26,67 ± 1,08 A	37,00 ± 1,83 A	43,86 ± 2,14 Aa
(10)	27,21 ± 1,16 A	39,77 ± 2,04 A	46,62 ± 2,32 Aa
(12)	27,00 ± 0,94 A	34,71 ± 1,89 A	37,86 ± 2,39 A
kontrola (destilirana voda) a	25,58 ± 0,62	32,83 ± 1,25	35,08 ± 1,62
pozitivna kontrola (fenheksamid) A	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
usporedba kvaternih piridinijevih soli (Tukeyjev test)	—	—	10 > 12

U stupcima su prikazane srednje vrijednosti četiriju ponavljanja (M) i standardna pogreška aritmetičke sredine (SPM). Značajne razlike između spojeva i pozitivne kontrole prikazane su slovom A ($p \leq 0,05$), a značajne razlike između spojeva i kontrole (destilirana voda) slovom a ($p \leq 0,05$). Značajne razlike među spojevima, odnosno Tukeyjev test ($p \leq 0,05$), označene su brojkama navedenim uz pripadajuće spojeve.

Općenito, rezultati pokazuju da se duljim vremenom inkubacije inhibitorno djelovanje derivata nikotinamida na *B. cinerea* pri koncentraciji od 100 µg/mL smanjuje. Usporedno s komercijalnim fungicidom, svi su nikotinamidni derivati pokazali značajno slabiji inhibitorni učinak, bez obzira na trajanje inkubacije.

3.2.3. Utjecaj derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija *F. culmorum* in vivo test na klijancima pšenice

Kako bi se utvrdilo razlikuju li se kvaterne piridinijeve soli međusobno u antifungalnom djelovanju na porast micelija fitopatogene gljive *F. culmorum*, odnosno razlikuju li se u djelovanju na klijance pšenice umjetno zaražene s navedenim patogenom, proveden je *in vivo* test na klijancima pšenice (cilj 1.). Kako bi se utvrdilo postoji li razlika u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnog fungicida na klijance pšenice zaražene fitopatogenom *F. culmorum*, provedena je analiza varijance (ANOVA) uz Tukeyjev test višestruke usporedbe (cilj 4.).

Proveden je *in vivo* test na klijancima pšenice posijanim u pijesak kontaminiran gljivom *F. culmorum*, s pomoću odabranih spojeva iz skupine nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata. Odabir spojeva temeljio se na rezultatima dobivenim *in vitro* istraživanjem.

Intenzitet infekcije klijanaca pšenice ocijenjen je skalom od 0 do 5, nakon čega je izračunan indeks bolesti. Taj indeks pruža uvid u stupanj bolesti i pokazuje utječu li odabrani nikotinamidni i izonikotinamidni derivati na smanjenje intenziteta zaraze s *F. culmorum* (tablice 36. i 37.).

Podatci iz tablice 36. jasno pokazuju da različiti spojevi imaju različitu učinkovitost u smanjenju paleži klijanaca pšenice. Tretman ZP/KP (zrno pšenice / kontaminirani pijesak) predstavlja kontrolnu varijantu bez primjene spojeva, za što je utvrđen najviši indeks bolesti (14,2). Tretman F/KP (fungicid/kontaminirani pijesak) predstavlja pozitivnu kontrolu, odnosno sjeme tretirano kemijskim fungicidom i posijano u kontaminiran pijesak. U tom tretmanu utvrđen nizak indeks bolesti 2,2 objašnjava se visokom učinkovitošću fungicida. Indeks bolesti od 6,7 utvrđen je za tretmane (1) i (10) što je niže od kontrole ZP/KP, ali više od pozitivne kontrole F/KP. Za tretman (4) utvrđen je isti indeks bolesti kao i kod pozitivne kontrole F/KP. Najučinkovitiji su spojevi (2a) i (4a) kod kojih je utvrđen indeks bolesti 0,9.

Tablica 36. Utjecaj derivata nikotinamida (10 i 100 µg/mL) na intenzitet bolesti

Tretman	Indeks bolesti
(1)	6,7
(10)	6,7
(12)	11,6
(4)	2,2
(2a)	0,9
(4a)	0,9
ZP/KP	14,2
F/KP	2,2

Tretmani: S/KP – primijenjeni spoj / kontaminirani pijesak, ZP/KP – zrno pšenice / kontaminirani pijesak, F/KP – fungicid / kontaminirani pijesak. Oznake: 1, 10, 12, 4 – spojevi koncentracije 100 µg/mL; 2a, 4a – spojevi koncentracije 10 µg/mL

Podatci prikazani u tablici 37. upućuju na različito djelovanje izonikotinamidnih derivata u smanjenju intenziteta paleži klijanaca pšenice. Najveći indeks bolesti 14,2 utvrđen je u kontrolnoj varijanti ZP/KP, dok je kod primjene fungicida (pozitivna kontrola F/KP) utvrđen najniži indeks bolesti 2,2. Indeks bolesti 12 utvrđen je kod primjene spoja (7)/KP što je niže od kontrole ZP/KP, ali značajno više od pozitivne kontrole F/KP, upućujući na slabije djelovanje na smanjenje bolesti. Za tretman (9)/KP utvrđen je indeks bolesti 3,5 što je niže od kontrole ZP/KP i bliže utvrđenom indeksu za pozitivnu kontrolu F/KP. Također, dobru

učinkovitost na smanjenje intenziteta bolesti pokazao je i spoj (7a)/KP pri nižoj koncentraciji s utvrđenim indeksom bolesti 4,9 što je niže od kontrole ZP/KP i spoja (7)/KP.

Tablica 37. Utjecaj derivata izonikotinamida (10 i 100 µg/mL) na intenzitet bolesti

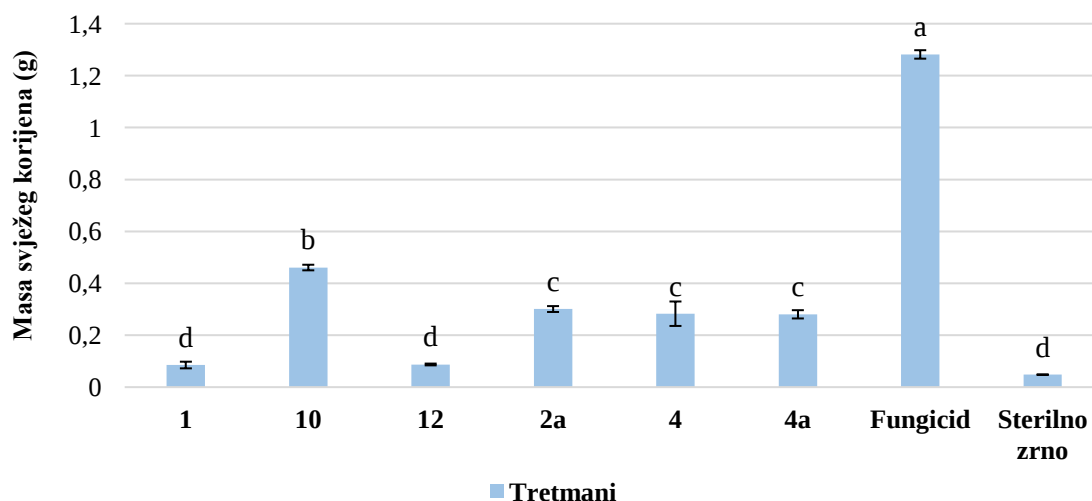
Tretman	Indeks bolesti
(10)	5,8
(7)	12
(8)	5,3
(9)	3,5
(10a)	8,9
(7a)	4,9
ZP/KP	14,2
F/KP	2,2

Tretmani: S/KP – primijenjeni spoj / kontaminirani pijesak, ZP/KP – zrno pšenice / kontaminirani pijesak, F/KP – fungicid / kontaminirani pijesak. Oznake: 10, 7, 8, 9 – spojevi koncentracije 100 µg/mL; 10a, 7a – spojevi koncentracije 10 µg/mL

Rezultati u nastavku prikazuju utjecaj nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata (koncentracija 10 i 100 µg/mL) na masu svježeg i suhe biljke i korijena te dužinu biljke i korijena. Tukeyjevim testom višestruke usporedbe provjereno je među kojim spojevima postoje statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$).

Kao što se može vidjeti na grafikonu 3., primjenom većine nikotinamidnih derivata ANOVA-om uz Tukeyjev *post-hoc* test utvrđena je statistički značajno veća masa svježeg korijena pšenice nakon primjene spojeva u odnosu na kontrolu (sterilno zrno). Izuzetak su spojevi (1) i (12) u primijenjenoj koncentraciji 100 µg/mL za koje nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Usporedbom s fungicidnim tretmanom kod svih ispitanih spojeva utvrđena je značajno manja masa svježeg korijena. Kada se uspoređi utjecaj derivata nikotinamida na masu svježeg korijena pšenice, nisu utvrđene statistički značajne razlike između spojeva (1) i (12) primijenjeni u koncentraciji 100 µg/mL, kao ni između spoja (2a) pri koncentraciji 10 µg/mL te spoja (4a) primijenjenog u koncentraciji 10 µg/mL i spoja (4) primijenjenog u koncentraciji 100 µg/mL.



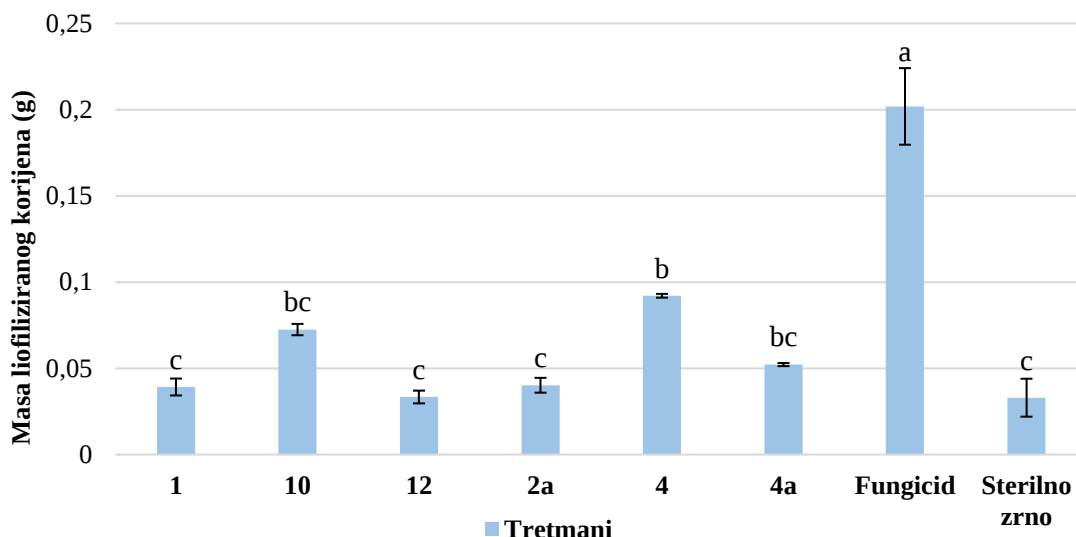
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 1, 10, 12, 4 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 2a, 4a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 3. Utjecaj derivata nikotinamida na masu svježeg korijena pšenice

Kao što je prikazano grafikonom 4., ANOVA-om uz Tukeyjev *post-hoc* test utvrđena je statistički značajno veća masa liofiliziranog korijena pšenice nakon primjene spojeva u odnosu na kontrolu samo za spoj (4) u primijenjenoj koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$. Za ostale spojeve nisu utvrđene razlike.

Usporedbom s fungicidnim tretmanom, kod svih ispitanih spojeva utvrđena je značajno manja masa liofiliziranog korijena. Ako se uspoređi utjecaj pojedinih derivata nikotinamida na masu liofiliziranog korijena, primjenom spojeva (1) i (12) primijenjenih u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$, spoja (2a) primijenjenog u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ nisu utvrđene statistički značajne razlike.



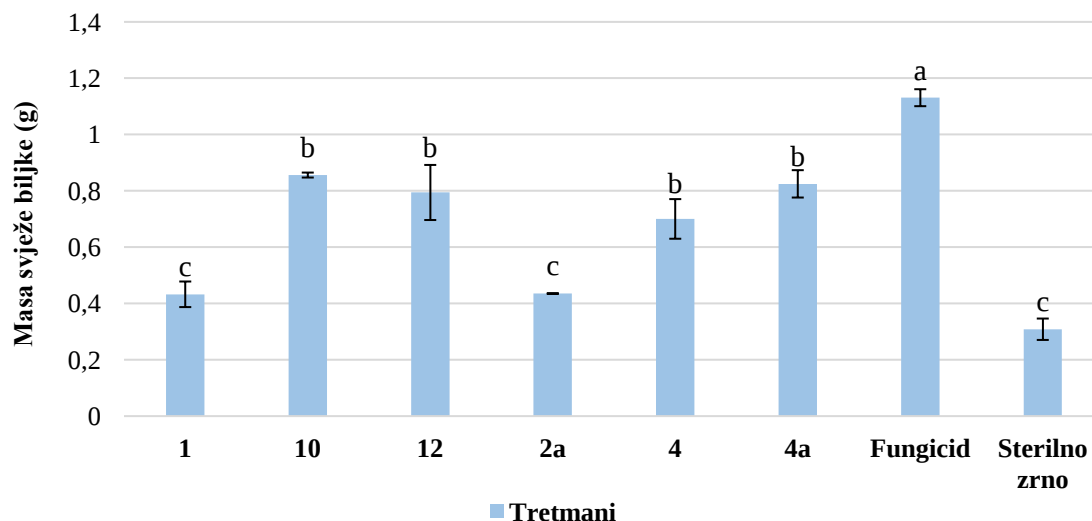
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 1, 10, 12, 4 – spojevi koncentracije 100 µg/mL; 2a, 4a – spojevi koncentracije 10 µg/mL

Grafikon 4. Utjecaj derivata nikotinamida na masu liofiliziranog korijena pšenice

Usporedbom nikotinamidnih derivata i kontrole (sterilno zrno), s obzirom na masu svježe biljke pšenice ANOVA-om uz Tukeyjev *post-hoc* test, utvrđena je statistički značajno veća masa svježe biljke pšenice u odnosu na kontrolu (sterilno zrno) za tri spoja, odnosno (10), (12), (4) primijenjena u koncentraciji 10 µg/mL (4a) i 100 µg/mL (grafikon 5.).

Ako se uspoređi utjecaj pojedinih derivata nikotinamida na masu svježe biljke pšenice, podjednako djelovanje su imali spojevi (1) primijenjen u koncentraciji 100 µg/mL i (2a) primijenjen u koncentraciji 10 µg/mL, zatim spoj (4a) primijenjen u koncentraciji 10 µg/mL i koncentraciji 100 µg/mL te spojevi (10) i (12) primijenjeni u koncentraciji od 100 µg/mL.



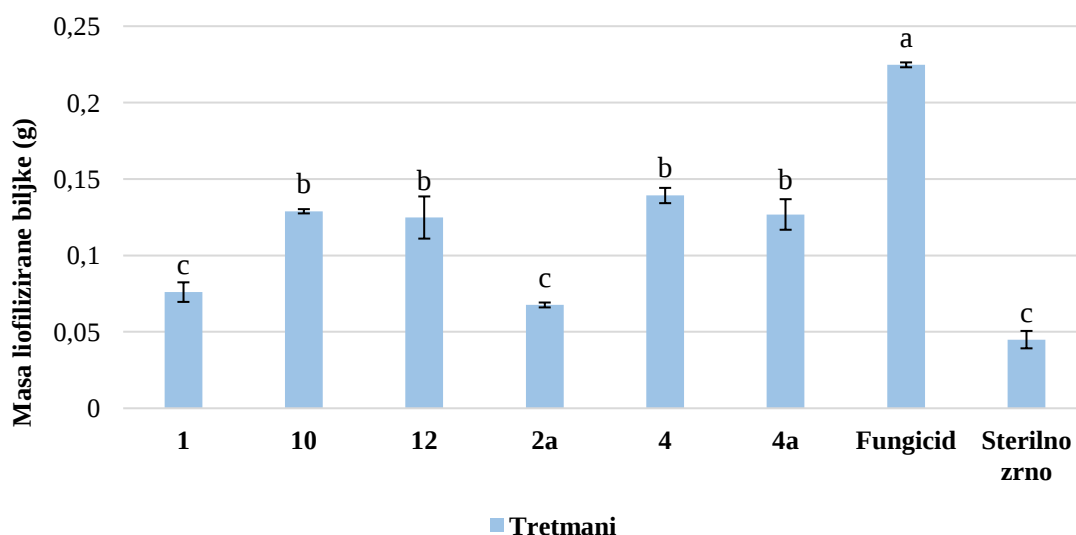
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 1, 10, 12, 4 – spojevi koncentracije 100 µg/mL; 2a, 4a – spojevi koncentracije 10 µg/mL

Grafikon 5. Utjecaj derivata nikotinamida na masu svježe biljke pšenice

Usporedbom nikotinamidnih derivata i kontrole (sterilno zrno), s obzirom na masu liofilizirane biljke pšenice ANOVA-om uz Tukeyjev *post-hoc* test, utvrđena je statistički značajno veća masa liofilizirane biljke pšenice za četiri spoja, (4a) primijenjen u koncentraciji 10 µg/mL i koncentraciji 100 µg/mL, (10) primijenjen u koncentraciji 100 µg/mL i (12) primijenjen u koncentraciji 100 µg/mL (grafikon 6.). Nadalje, u usporedbi s fungicidnim tretmanom, kod svih ispitanih spojeva utvrđena je značajno manja masa liofilizirane biljke pšenice.

Ako se uspoređi utjecaj pojedinih nikotinamidni derivata na masu liofilizirane biljke pšenice, nisu utvrđene statistički značajne razlike između spoja (1) primijenjenog u koncentraciji 100 µg/mL i spoja (2a) primijenjenog u koncentraciji 10 µg/mL, te između spojeva (4a) primijenjenog u koncentraciji 10 µg/mL, spojeva (10) i (12) primjenjenih u koncentraciji 100 µg/mL.



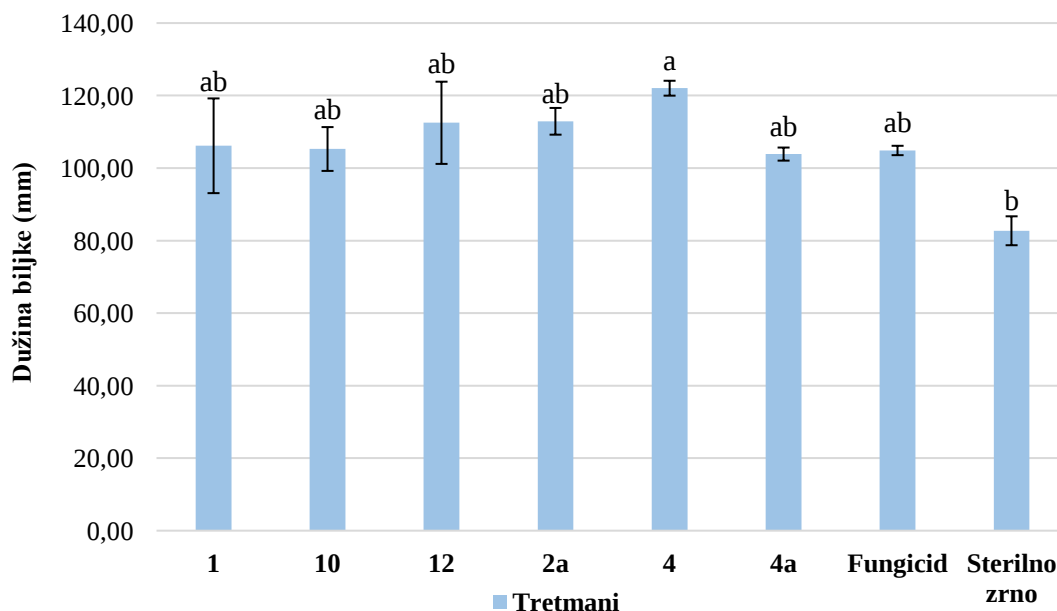
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 1, 10, 12, 4 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 2a, 4a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 6. Utjecaj derivata nikotinamida na masu liofilizirane biljke pšenice

Usporedbom utjecaja derivata nikotinamida i kontrole (sterilno zrno), s obzirom na dužinu biljke pšenice ANOVA-om uz Tukeyjev *post-hoc* test, utvrđena je statistički značajno veća dužina biljke pšenice u odnosu na kontrolu samo za spoj (4), primijenjen u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ (grafikon 7.).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u dužini biljke pšenice između djelovanja ispitanih spojeva i fungicida. Također, analiza je pokazala da svi nikotinamidni derivati imaju podjednak učinak na dužinu biljke pšenice.



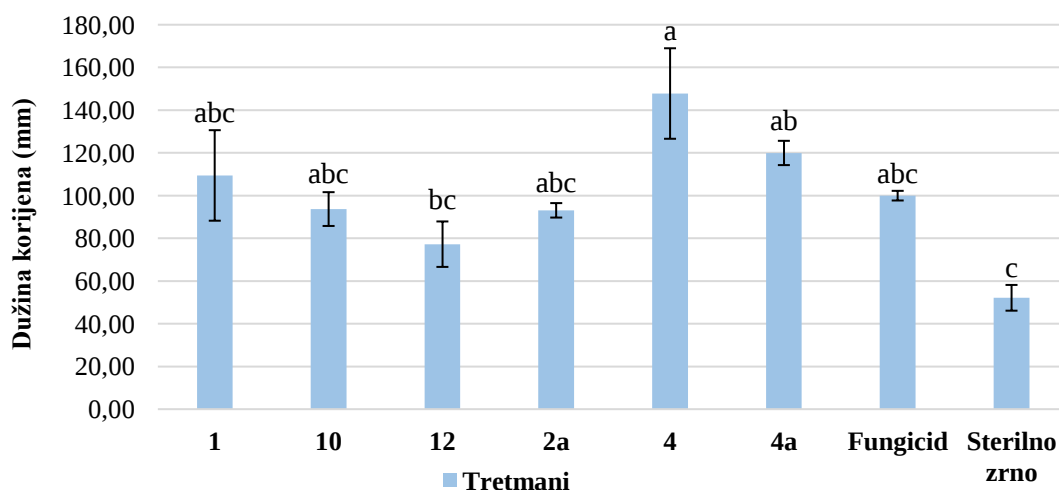
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 1,10,12,4 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 2a, 4a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$.

Grafikon 7. Utjecaj derivata nikotinamida na dužinu biljke pšenice

Statistički značajna razlika u većoj dužini korijena biljke pšenice utvrđena je za sve primjenjene spojeve u odnosu na kontrolni tretman (sterilno zrno). S druge strane, između fungicidnog tretmana i ispitanih nikotinamidnih derivata nije utvrđena statistički značajna razlika u dužini korijena biljke pšenice, osim za spoj (4) primijenjen u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ (grafikon 8).

Svi nikotinamidni derivati pokazali su podjednako djelovanje na dužinu korijena, osim spoja (12) primijenjenog u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$, kod kojeg je utvrđena statistički značajno manja dužina korijena u odnosu na ostale ispitane spojeve.



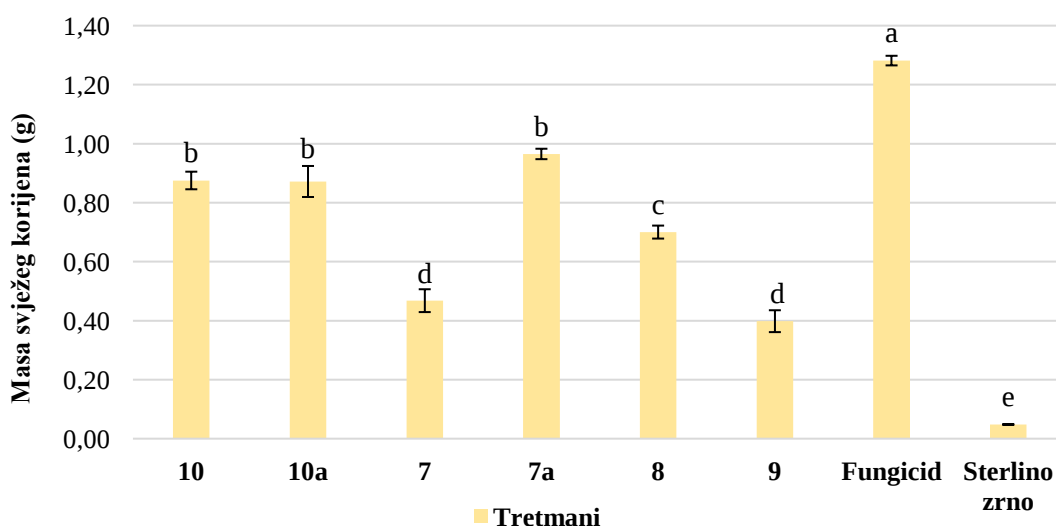
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 1, 10, 12, 4 – spojevi koncentracije 100 µg/mL; 2a, 4a – spojevi koncentracije 10 µg/mL

Grafikon 8. Utjecaj derivata nikotinamida na dužinu korijena biljke pšenice

Utjecaj derivata izonikotinamida na masu svježeg korijena pšenice prikazan je na grafikonu 9. ANOVA analiza, uz Tukeyjev post-hoc test, pokazala je da su svi ispitani spojevi statistički značajno povećali masu svježeg korijena pšenice u odnosu na kontrolni tretman (sterilno zrno). Za sve ispitane spojeve utvrđena je statistički značajno manja masa svježeg korijena pšenice u usporedbi s fungicidnim tretmanom.

Kada se uspoređi utjecaj pojedinih spojeva na masu svježeg korijena pšenice, statistički značajne razlike nisu utvrđene između spoja (9) i (7) primijenjeni u koncentraciji 100 µg/mL, te između spoja (10) primijenjenog u koncentraciji 10 i 100 µg/mL i spoja (7a) primijenjenog u koncentraciji 10 µg/mL.



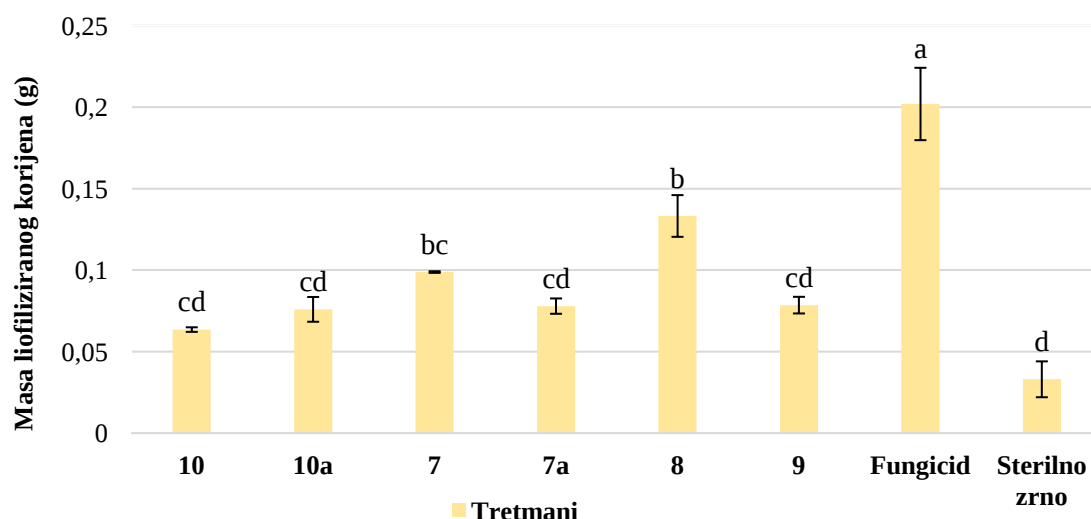
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 10, 7, 8, 9 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 10a, 7a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 9. Utjecaj derivata izonikotinamida na masu svježeg korijena pšenice

Usporedbom derivata izonikotinamida i kontrole (sterilno zrno), s obzirom na masu liofiliziranog korijena pšenice ANOVA-om uz Tukeyjev *post-hoc* test, utvrđena je statistički značajno veća masa liofiliziranog korijena pšenice u odnosu na kontrolu (sterilno zrno) za spojeve (7) i (8) primijenjene u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ (grafikon 10.).

Primjenom svih ispitanih spojeva utvrđena je statistički značajno manja masa liofiliziranog korijena pšenice nego kod fungicidnog tretmana. Kod usporedbe utjecaja različitih izonikotinamidnih derivata na masu liofiliziranog korijena pšenice, spojevi (10), (9) primijenjeni u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ i (10a) i (7a) primijenjeni u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ pokazali su podjednako djelovanje.



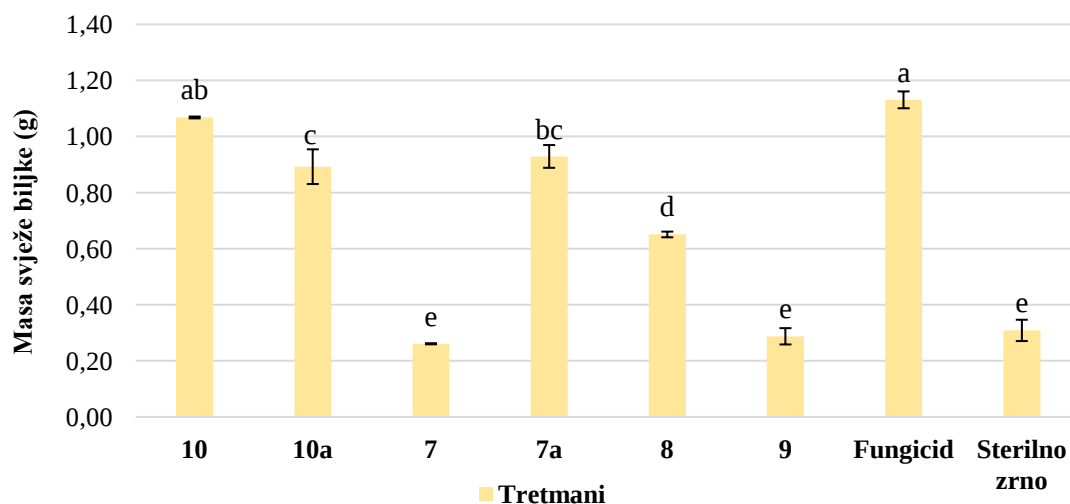
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 10, 7, 8, 9 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 10a, 7a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 10. Utjecaj derivata izonikotinamida na masu liofiliziranog korijena pšenice

Usporedbom derivata izonikotinamida i kontrole (sterilno zrno), s obzirom na masu svježe biljke pšenice, utvrđena je statistički značajno veća masa svježe biljke pšenice kod većine ispitanih spojeva u odnosu na kontrolu (sterilno zrno). Izuzetak su spojevi (7) i (9), primijenjeni u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$, za koje nije utvrđena značajna razlika (grafikon 11.).

Nakon primjene pet od šest spojeva, utvrđena je statistički značajno manja masa svježe biljke pšenice nego kod fungicidnog tretmana. Iznimka je spoj (10) za koji nije utvrđena statistički značajna razlika.

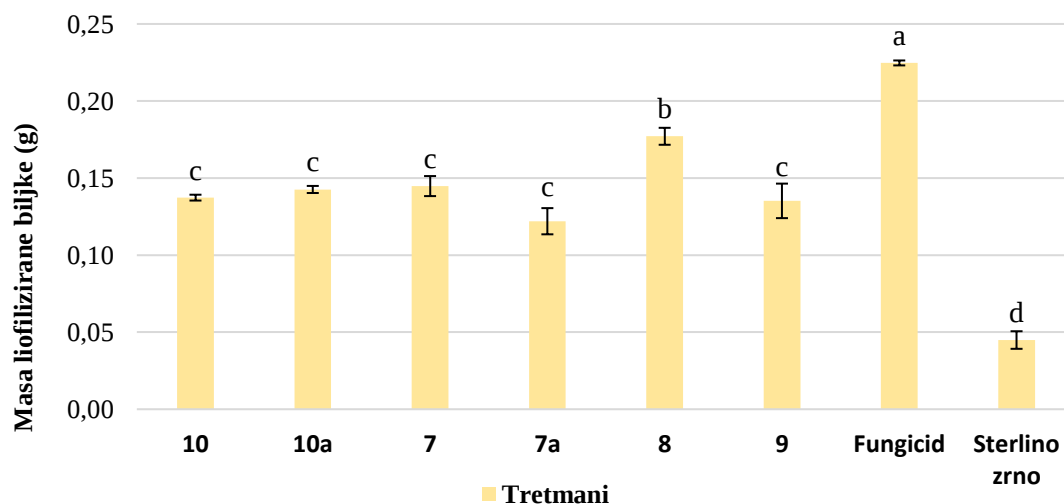


Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 10, 7, 8, 9 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 10a, 7a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 11. Utjecaj derivata izonikotinamida na masu svježe biljke pšenice

Kako je prikazano na grafikonu 12., ANOVA-om uz Tukeyjev post-hoc test utvrđeno je da svi ispitani spojevi imali statistički značajno veću masu liofilizirane biljke pšenice u odnosu na kontrolni tretman (sterilno zrno). Međutim, masa liofilizirane biljke kod svih spojeva bila je statistički značajno manja u usporedbi s fungicidnim tretmanom. Kada se uspoređuje utjecaj različitih izonikotinamidnih derivata na masu liofilizirane biljke, rezultati su slični za sve spojeve. Izuzetak je spoj (8) primjenjeni u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ koji je imao statistički značajno veću masu liofilizirane biljke pšenice u odnosu na ostale spojeve.



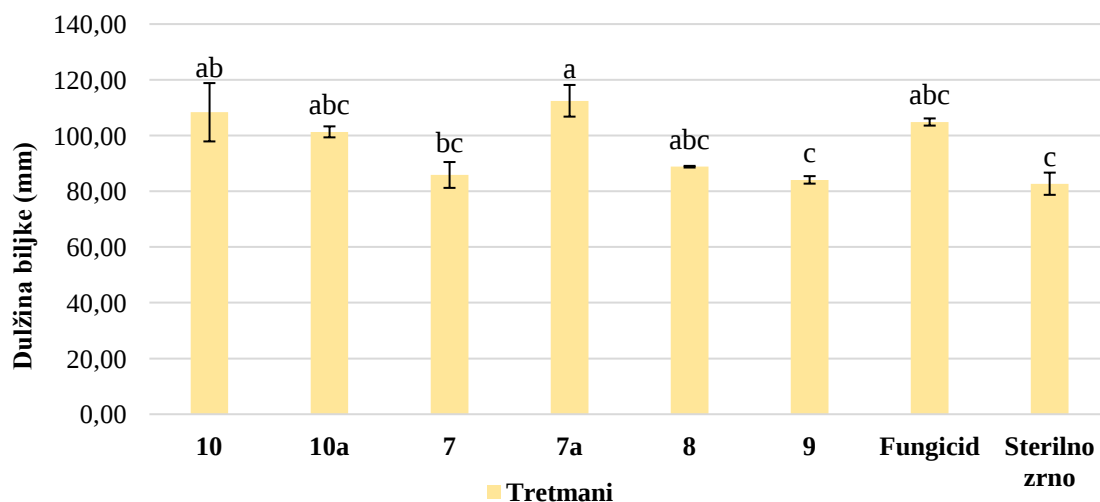
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 10, 7, 8, 9 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 10a, 7a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 12. Utjecaj derivata izonikotinamida na masu liofilizirane biljke pšenice

Usporedbom utjecaja derivata izonikotinamida i kontrole (sterilno zrno) na dužinu biljke pšenice utvrđena je statistički značajno veća dužina biljke za spoj (7a) primijenjen u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ i spoj (10) primijenjen u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$.

Usporedba utjecaja različitih izonikotinamidnih derivata na dužinu biljke pšenice pokazuje podjednako djelovanje spoja (10a) primjenog u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ i spoja (8) u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ u odnosu na fungicidni tretman. Iznimka je spoj (7a) u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$, koji jedini pokazuje statistički značajnu veću dužinu biljke pšenice u usporedbi s fungicidnim tretmanom (grafikon 13).



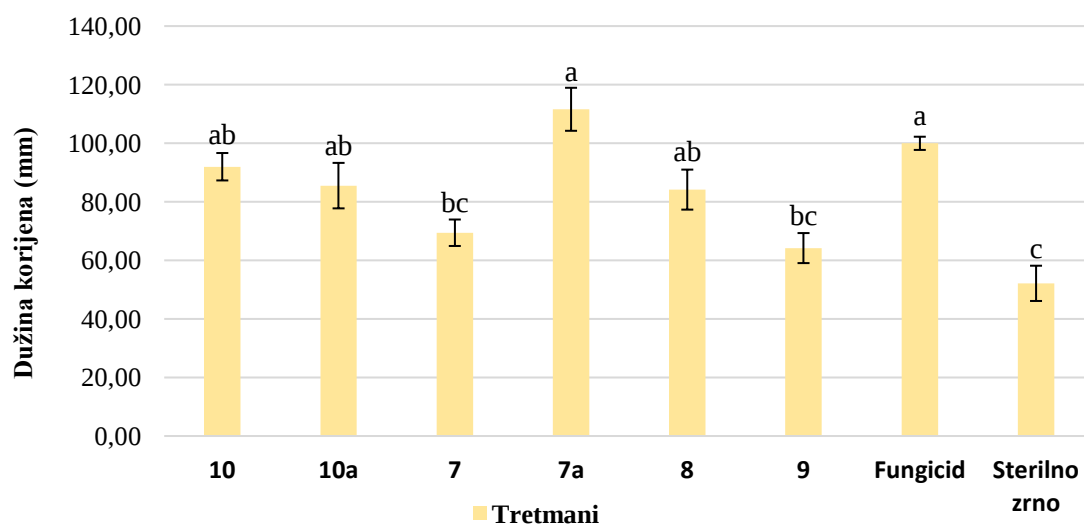
Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 10, 7, 8, 9 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 10a, 7a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 13. Utjecaj derivata izonikotinamida na dužinu biljke pšenice

Usporedbom utjecaja derivata izonikotinamida i kontrole (sterilno zrno) na dužinu korijena pšenice utvrđena je statistički značajno veća dužina korijena pšenice za većinu spojeva, osim za spojeve (7) i (9) primijenjene u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$.

U usporedbi s fungicidnim tretmanom, statistički značajno veća dužina korijena zabilježena je samo za spoj (7a) u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$. Spojevi (10) i (8) primijenjeni u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$ i spoj (10a) primijenjen u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ u nisu pokazali statistički značajnu razliku u dužini korijena u odnosu na fungicidni tretman (grafikon 14). Kada se usporede pojedini spojevi prema njihovom utjecaju na dužinu korijena pšenice, slične vrijednosti su zabilježene za spojeve (7) i (9) primijenjeni u koncentraciji 100 $\mu\text{g/mL}$, te za spoj (10) primijenjen u koncentracijama od 10 $\mu\text{g/mL}$ i 100 $\mu\text{g/mL}$ (grafikon 14).



Stupci prikazuju srednje vrijednosti triju ponavljanja po tretmanima i standardnu pogrešku aritmetičke sredine dobivenu Tukeyjevim testom ($P \leq 0,05$). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima prema Tukeyjevu HSD testu ($P \leq 0,05$).

Oznake: 10, 7, 8, 9 – spojevi koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$; 10a, 7a – spojevi koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$

Grafikon 14. Utjecaj derivata izonikotinamida na dužinu korijena pšenice

4. RASPRAVA

Odabrane vrste rodova *Fusarium*, *Sclerotinia* i *Botryotinia* fakultativni su polifagi i predstavljaju neke od najznačajnijih uzročnika biljnih bolesti. Zbog širokog spektra domaćina, brzog širenja i sposobnosti brzog prilagođavanja različitim ekološkim uvjetima, te gljive uzrokuju značajne gubitke u poljoprivrednoj proizvodnji širom svijeta (Bolton i sur., 2006). Njihova važnost i složena kontrola rezultat su njihove patogenosti, životnog ciklusa i sposobnosti preživljavanja nepovoljnih uvjeta u obliku trajnih spora/struktura. Za uspješno suzbijanje tih patogenih gljiva ključan je integriran pristup, odnosno primjena preventivnih mjera, biološka kontrola i, po potrebi, primjena fungicida.

Iako fungicidi imaju važnu ulogu u prevenciji i kontroli biljnih patogena, istraživanja jasno potvrđuju problem otpornosti patogena na fungicide što je uglavnom posljedica njihove česte i intenzivne primjene, a neizostavan je problem koji je posljedica uporabe fungicida onečišćenje okoliša (Zhang i sur., 2009., Wang i sur., 2013.). Zbog toga je sve veći naglasak na smanjenju upotrebe kemijskih fungicida i primjeni alternativnih metoda za kontrolu biljnih patogena, uključujući biološku kontrolu i druge ekološki prihvatljivije pristupe.

Brojna istraživanja usmjerena su na otkrivanje i sintezu novih fungicidnih spojeva koji su ekološki prihvatljiviji, imaju novu strukturu i visoko biološko djelovanje (Messing i Brodeur, 2018., Zubrod i sur., 2019., Zhang i sur., 2024.).

Zbog svoje biološke aktivnosti i značajnog inhibitornog djelovanja na neke važne enzime, sve veća pozornost usmjerena je na istraživanje djelovanja različitih nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata (Walcourt i sur., 2004., Guan i sur., 2014., Tcherniuk i sur., 2017.).

Razlika između nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata očituje se u različitom položaju karboksamidne skupine ($-CONH_2$) na piridinskom prstenu (vidjeti prilog, tablica 3. i 4.) te u njihovim kemijskim i biološkim svojstvima što utječe na njihovu primjenu u različitim znanstvenim područjima.

Prema dostupnoj literaturi, antifungalno djelovanje izonikotinamidnih derivata na značajne fitopatogene gljive još uvijek je nedovoljno istraženo područje. Derivati se izonikotinamida češće istražuju u medicinskom području u usporedbi s derivatima nikotinamida. Njihova kemijska i biološka svojstva omogućuju inhibiciju različitih sojeva bakterija, uključujući one otporne na antibiotike, te također pokazuju potencijal za inhibiranje tumorskih stanica

različitih vrsta karcinoma (Hasmann i Schemainda, 2003., Mishra i sur., 2010., Dang i sur., 2019., Paruch i sur., 2022.).

Zadani su ciljevi ovog istraživanja bili: utjecaj kvaternih piridinijevih soli, odnosno nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata na porast micelija patogena iz rodova *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia* (cilj 1.), utjecaj istih na klijanje konidija/sklerocija i rast kličnih cijevi patogena iz roda *Botryotinia* i *Sclerotinia* (cilj 2.). Također, cilj je utvrditi razlikuju li se kvaterni piridinijeve soli međusobno u antifungalnom djelovanju na porast micelija navedenih fitopatogenih gljiva te postoji li razlika u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnog fungicida na porast micelija navedenih fitopatogenih gljiva (cilj 4.).

Na temelju rezultata dobivenih *in vitro* istraživanja, utvrđeno je (cilj 3.) antifungalno djelovanje odabranih spojeva *in vivo* na prirodnim supstratima te su uspoređeni s kemijskim fungicidima.

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija S. sclerotiorum

U brojnim istraživanjima ispitano je antifungalno djelovanje različitih nikotinamidnih derivata na patogen *S. sclerotiorum* u cilju pronalaska fungicida inhibitora suksinat-dehidrogenaze koji imaju nisku fitotoksičnost s jednakim djelovanjem kao i često primjenjivan komercijalni fungicid boskalid (Cheng i sur., 2021., Wang i sur., 2022., Yan i sur., 2024.).

U istraživanju za ovaj doktorski rad *in vitro* antifungalni testovi pokazali su značajno smanjenje porasta micelija *S. sclerotiorum* primjenom svih nikotinamidnih derivata, u objema koncentracijama (10 i 100 µg/mL) u usporedbi s kontrolom (čisti KDA).

Također, utvrđeno je da većina nikotinamidnih derivata ima bolje antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *S. sclerotiorum* povećanjem koncentracije (100 µg/mL) što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Bušić i sur. (2022.b). U navedenom istraživanju ispitano je inhibitorno djelovanje 11 novih piridinijevih derivata u dvjema koncentracijama (10 i 100 µg/mL). Antifungalno djelovanje sintetiziranih spojeva ispitano je u *in vitro* uvjetima na porast micelija četiriju patogena, uključujući i *S. sclerotiorum*. Dobiveni rezultati Bušić i sur. (2022.b) potvrdili su da su svi sintetizirani spojevi pokazali izvrsnu inhibiciju porasta micelija patogena *S. sclerotiorum* u koncentraciji 100 µg/mL koja

se 48 sati nakon inokulacije kretala od 79,62 do 90,76 %.

Prema rezultatima istraživanja ovog doktorskog rada nikotinamidni derivati (9) i (10) pokazali su podjednako djelovanje u suzbijanju porasta micelija patogena *S. sclerotiorum* nakon 48 sati inkubacije pri koncentraciji 100 µg/mL, bez statistički značajnih razlika u odnosu na komercijalni fungicid (tablica 6.). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem su u skladu s istraživanjem Bušić i sur. (2022.b) koji su također utvrdili bolju inhibiciju porasta istog patogena pri većoj koncentraciji od 100 µg/mL u usporedbi s komercijalnim fungicidom.

Istraživanje Ye i sur. (2014.) pokazalo je da 38 nikotinamidnih derivata (potencijalnih inhibitora suksinat dehidrogenaze) imaju antifungalno djelovanje slično učinku komercijalnih fungicida protiv patogena *R. solani* i *S. sclerotiorum*, što je slično s rezultatima istraživanja ovog doktorskog rada.

Antifungalna aktivnost tih derivata utvrđena je na porast micelija *R. solani* i *S. sclerotiorum* u *in vitro* uvjetima. Većina je ispitivanih derivata pokazala umjerenu aktivnost protiv *S. sclerotiorum*, dok se 3-klor-4-fluorfenilni derivat nikotinamida izdvojio visokim antifungalnim djelovanjem s IC₅₀ vrijednostima, usporedivim s komercijalnim fungicidima boskalidom i karbendazimom.

S druge strane, naše prethodno istraživanje pokazalo je da je deset nikotinamidnih spojeva s različitim elektrofilima imalo jednako antifungalno djelovanje na patogen *S. sclerotiorum* kao i komercijalni fungicid, neovisno o koncentraciji (10 µg/mL i 100 µg/mL) (Siber i sur., 2019.).

Istraživanje koje su proveli Yan i sur. (2024.) dodatno potvrđuje značajno antifungalno djelovanje nikotinamidnih derivata. Ispitivanjem dvadeset i četiriju nikotinamidna derivata, otkriveno je njihovo snažno djelovanje u suzbijanju porasta micelija patogena *R. solani* i *S. sclerotiorum*. Osobito se istaknuo spoj 2-klor-*N*-(2-(2,4-diklorfenoksi)fenil)nikotinamid koji je pokazao visoku antifungalnu aktivnost uz nisku citotoksičnost. Navedeni spoj 2-klor-*N*-(2-(2,4-diklorfenoksi)fenil)nikotinamid istaknuo se visokim antifungalnim djelovanjem i niskom citotoksičnošću, što ukazuje na njegov potencijal kao ekološki prihvatljiv fungicid s djelovanjem sličnim komercijalnom fungicidu boskalidu. Istraživanjima u okviru ovog doktorskog rada nije utvrđen značajan utjecaj vremena inkubacije na antifungalno djelovanje nikotinamidnih piridinijevih spojeva pri objema primijenjenim koncentracijama (tablice 5. i 6.). Većina istraživanja drugih autora temelji se na rezultatima dobivenim nakon

jednog ili dvaju mjerenja (najčešće nakon prvih 24 ili 48 sati, 5 ili 7 dana inkubacije) (Singh i sur., 2011., Luo i sur., 2018., Yan i sur., 2022.). Stoga istraživanje u okviru ovog doktorskog rada, s kontinuiranim mjerenjima porasta micelija od 48 do 144 sata inkubacije, svaka 24 sata, omogućuje detaljnije praćenje promjena u djelovanju ispitivanih spojeva. Slično rezultatima ovog doktorskog rada, istraživanje Cheng i sur. (2021.) pokazalo je da vrijeme inkubacije do 48 h nije značajno utjecalo na inhibiciju porasta micelija *S. sclerotiorum*. Inhibicija porasta micelija iznosila je 95,23 % nakon 24 sata i 93,78 % nakon 48 sati inkubacije.

Wei i sur. (2022.) ističu da su prirodni produkti (poput biljnih alkaloida, flavonoida i terpena) najbolji izvori za otkrivanje novih sredstava za zaštitu bilja. Iz nikotinamida, izoliranog iz prirodnog izvora, sintetizirali su nove derivate nikotinamida. Utvrdili su antifungalno djelovanje spojeva (S)-2-(2-kloronikotinamido)propil-benzoata u koncentraciji od 50 µg/mL na porast micelija deset patogenih gljiva, uključujući *S. sclerotiorum*. Slično rezultatima dobivenim ovim istraživanjem, većina ispitanih spojeva pokazala je dobro antifungalno djelovanje protiv *S. sclerotiorum*. Snažno inhibitorno djelovanje protiv *S. sclerotiorum* pokazala su dva spoja: (S)-2-(2-klornikotinamido)propil-4-klor-benzoat i (S)-2-(2-klornikotinamido)propil-2,3-diklor-benzoat, s inhibicijom većom od 80 %. Ostali ispitani spojevi imali su umjereno djelovanje, manje od 50 %. Također, istaknuli su da spoj (S)-2-(2-klornikotinamido)propil-2-metil-benzoat pokazuje snažno antifungalno djelovanje, nefitotoksičnost i može se koristiti kao fungicid na usjevima. Osim antifungalnog djelovanja, navedeni spojevi pokazuju dobro herbicidno djelovanje i nisku fitotoksičnost na jednosupnice i dvosupnice.

Usporedba istraživanja Wang i sur. (2022.) i istraživanja ovog doktorskog rada upućuje na različite pristupe u razvoju nikotinamidnih spojeva s antifungalnim svojstvima, ali s visokim antifungalnim djelovanjem protiv patogena *S. sclerotiorum*. Wang i sur. (2022.) ispitali su antifungalno djelovanje 20 spojeva *N*-(1*H*-pirazol-5-il)nikotinamida na pet fitopatogenih gljiva (*Physalospora piricola*, *Valsa mali*, *Gaeumannomyces graminis*, *B. cinerea* i *S. sclerotiorum*) u *in vitro* i u *in vivo* uvjetima. Njihovi rezultati upućuju na vrlo jako antifungalno djelovanje protiv *S. sclerotiorum* pri čemu je inhibicija porasta bila 84 %. Također, utvrdili su da spojevi s klorom kao supstituentskom skupinom na piridinskom prstenu pokazuju pojačanu antifungalnu aktivnost. U ovom istraživanju ispitivani derivati izonikotinamida, u koncentracijama od 10 µg/mL i 100 µg/mL, pokazali su značajno bolje

antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *S. sclerotiorum* u usporedbi s kontrolom (čisti KDA). Vrijeme inkubacije nije negativno utjecalo na njihovu učinkovitost (tablica 7. i 8.). Slične rezultate dobili su Bušić i sur. (2019.), koji su u *in vitro* uvjetima ispitivali antifungalno djelovanje deset novih derivata izonikotinamida, sintetiziranih kvaternizacijom izonikotinamida metil-jodidom i devet različito supstituiranih 2-bromacetofenona uz pomoć mikrovalnog zračenja. Svi spojevi pokazali su učinkovito antifungalno djelovanje protiv *S. sclerotiorum* u odnosu na čistu kontrolu (KDA). Najbolju inhibiciju porasta micelija protiv *S. sclerotiorum*, 48 sati nakon inkubacije, pokazao je spoj 4-karbamoil-1-(2-(4-klorfenil)-2-oksoetil)piridin-1-ijev bromid s najvećom inhibicijom, 93,2 % inhibicije pri koncentraciji od 100 µg/mL, što je bilo jednako inhibiciji postignutoj komercijalnim fungicidom. Navedena istraživanja upućuju na to da modifikacije izonikotinamida, bilo kroz piridinske prstene (Wang i sur., 2022.) ili kvaternizaciju (Bušić i sur., 2019.), pojačavaju antifungalno djelovanje.

Uspoređujući inhibicijsko djelovanje spojeva i komercijalnog fungicida, Bušić i sur. (2019.) navode da većina primijenjenih izonikotinamidnih spojeva 48 sati nakon inokulacije ima podjednako djelovanje na patogen *S. sclerotiorum* kao i komercijalni fungicid.

Nasuprot tomu, u ovom istraživanju većina spojeva pri objema koncentracijama imala je statistički značajno slabije antifungalno djelovanje u usporedbi s komercijalnim fungicidom. Samo je spoj (12) pri objema koncentracijama pokazao podjednako djelovanje kao i komercijalni fungicid tijekom svih pet mjerenja. Srednja vrijednost porasta micelija za spoj (12) kretala se od 4,75 do 9,0 mm pri koncentraciji od 100 µg/mL, dok se promjer micelija pri primjeni fungicida kretao od 4,00 do 8,25 mm tijekom cijelog vremena inkubacije (tablica 8.). S druge strane, ako se uzme u obzir djelovanje spojeva na porast micelija nakon 48 h, kako je u većini istraživanja prikazano (Singh i sur., 2011., Luo i sur., 2018., Wang i sur. 2018., Yan i sur., 2022.), može se utvrditi da kvaterni piridinijevi spojevi primijenjeni u ovom istraživanju imaju vrlo dobro djelovanje u inhibiciji porasta micelija *S. sclerotiorum*. Porast micelija *S. sclerotiorum* prvih 48 sati inkubacije, ovisno o spoju, kretao se od 6,00 do 12,60 mm za koncentraciju 10 µg/mL, odnosno 4,75 do 15,85 mm za koncentraciju 100 µg/mL. Usporedbom rezultata porasta micelija primjenom kvaternih piridinijevih spojeva s kontrolama, gdje je na čistoj kontroli (KDA) iznosio 59,33 mm, a na pozitivnoj kontroli (komercijalni fungicid) 4,00 mm u prvih 48 sati, može se zaključiti da testirani spojevi imaju vrlo dobru učinkovitost.

Općenito, kada se uspoređi antifungalno djelovanje nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata na porast micelija patogena *S. sclerotiorum*, primjećuje se da su srednje vrijednosti porasta micelija pri primjeni spojeva u objema koncentracijama vrlo slične.

Primjena nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata značajno je smanjila porast micelija patogena *S. sclerotiorum* u usporedbi s kontrolom (čisti KDA). Većina spojeva pokazala je slabije antifungalno djelovanje u odnosu na komercijalni fungicid. Ipak, ističu se spojevi (12) i (10), primijenjeni u koncentraciji od 100 µg/mL, koji se nisu statistički značajno razlikovali u antifungalnom djelovanju od komercijalnog fungicida tijekom većine promatranog razdoblja inkubacije.

Ti rezultati upućuju na potencijal tih spojeva u suzbijanju *S. sclerotiorum*, no i potrebu za daljnjim istraživanjima. Važno je napomenuti da jača ili slabija učinkovitost spojeva nije nužno povezana s primijenjenim koncentracijama.

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija F. oxysporum i F. culmorum

Ispitivanjem antifungalnog djelovanja derivata nikotinamida i izonikotinamida na fitopatogene gljive roda *Fusarium* (*F. oxysporum* i *F. culmorum*) dobiveno je nekoliko ključnih rezultata. Ni jedan ispitivan spoj nije potpuno suzbio rast patogena, bez obzira na koncentraciju ili vrijeme inkubacije. Međutim, pri koncentraciji od 10 µg/mL svi nikotinamidni derivati pokazali su bolje antifungalno djelovanje na porast micelija *F. oxysporum* u usporedbi s kontrolom (čisti KDA) pri čemu se spoj (4) istaknuo kao najučinkovitiji (tablica 9.).

Većina spojeva pokazala je slično djelovanje na patogen *F. oxysporum* tijekom cijelog razdoblja inkubacije iako su kod nekih spojeva primijećene razlike u antifungalnom djelovanju s vremenom inkubacije. Na primjer, bolje antifungalno djelovanje spoja (12) postignuto je s pomoću duljeg vremena inkubacije.

Za razliku od *F. oxysporum*, većina nikotinamidnih derivata pokazala je slabije ili jednako djelovanje na porast micelija *F. culmorum* pri koncentraciji od 10 µg/mL u usporedbi s kontrolom (čisti KDA) (tablica 13.).

Primjenom koncentracije od 100 µg/mL, derivati nikotinamida pokazali su bolje djelovanje protiv obaju patogena (tablica 10. i 14.). U ovom istraživanju najbolje antifungalno

djelovanje protiv *F. oxysporum* pri većoj koncentraciji pokazali su spojevi (3), (5) i (6) nakon 48 sati inkubacije (tablica 10.). Za patogen *F. culmorum*, statistički značajno bolje antifungalno djelovanje pokazali su spojevi (8), (10), (11) i (12) pri koncentraciji od 100 µg/mL tek 96 sati nakon inkubacije. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Bušića i sur. (2022.b) gdje su svi primijenjeni nikotinamidni derivati imali slabije antifungalno djelovanje na porast micelija *F. culmorum* pri nižoj koncentraciji od 10 µg/mL, s inhibicijskim djelovanjem od 19,57 % do 44,48 %.

Međutim, primjenom koncentracije od 100 µg/mL utvrđeno je bolje inhibicijsko djelovanje koje je iznosilo do 48,93 %. Utvrđeno je da je pri koncentraciji od 100 µg/mL učinkovitost spojeva u inhibiciji porasta micelija povezana s vremenom inkubacije. Osim toga, svi spojevi imali su značajno lošije antifungalno djelovanje od pozitivne kontrole, bez obzira na vrijeme inkubacije. Naposljetku, usporedbom spojeva primijenjenih u dvjema koncentracijama, oni primijenjeni u većoj koncentraciji (100 µg/mL) u pravilu su bili učinkovitiji od onih primijenjenih u manjoj koncentraciji (10 µg/mL).

Iz rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da nikotinamidni derivati spojevi pokazuju bolje antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *F. oxysporum* nego na porast micelija *F. culmorum*. Ti su nalazi u skladu s našim prethodnim istraživanjem (Siber i sur., 2019.) što dodatno potvrđuje učinkovitost nikotinamidnih derivata. Također, razlike u djelovanju na različite vrste patogena upućuju na specifičnost mehanizma djelovanja tih spojeva.

Prema rezultatima istraživanja Peng i sur. (2022.) 15 derivata tetrahidrogeranil kvaternih amonijevih soli imalo je bolje antifungalno djelovanje u usporedbi s pozitivnom kontrolom (fungicidima), s inhibicijom porasta micelija *F. oxysporum* od 100 % te inhibicijom porasta micelija *F. veticillioides* od 93,28 %. No u istraživanju ovog doktorskog rada antifungalno djelovanje svih nikotinamidnih derivata, primijenjenih u koncentraciji 10 i 100 µg/mL, imalo je statistički značajno slabije antifungalno djelovanje na oba patogena u odnosu na komercijalni fungicid. Navedeni autori u svojem istraživanju naglašavaju utjecaj strukture spojeva na antifungalno djelovanje pri čemu su kvaterne amonijeve soli s dugim alkilnim lancima pokazale veće antifungalno djelovanje što je alkilni lanac bio dulji. Također, uvođenje jodidnog aniona u strukturu spoja pozitivno je utjecalo na antifungalno djelovanje svih spojeva.

S druge strane, Wu i sur. (2013.) ispitivali su antifungalno djelovanje 11 novih derivata nikotinamida koji sadrže 1,3,4-oksadiazolni prsten na porast micelija patogenih gljiva *F. graminearum*, *C. mandshurica* i *F. oxysporum*. Novi derivati primijenjeni su u samo jednoj koncentraciji od 50 µg/mL, a rezultati upućuju na to da većina sintetiziranih nikotinamidnih derivata ima slabo do umjereno antifungalno djelovanje protiv *F. graminearum*, *F. oxysporum* i *C. mandshurica*. Inhibitorno djelovanje protiv *F. oxysporum* kretalo se od 10,3 % do 63,2 %. Četiri spoja pokazala su podjednako ili veće antifungalno djelovanje u odnosu na pozitivnu kontrolu, himeksazol, što ističe njihove značajne izgleda za daljnju optimizaciju. Međutim, treba naglasiti da je inhibicijsko djelovanje fungicida himeksazola iznosilo 56,12 %. Autori ističu da bi uvođenje skupine poput 4-klor-6-metilne skupine na benzenskom prstenu te acetiliranje aminoskupine moglo pojačati antifungalno djelovanje.

Ispitivanje antifungalnog djelovanja na rast micelija patogena *F. oxysporum* pokazalo je da su svi ispitani izonikotinamidni derivati imali značajno bolje antifungalno djelovanje u usporedbi s kontrolom (čisti KDA) pri objema ispitanim koncentracijama. Za patogen *F. culmorum*, bolje antifungalno djelovanje istih spojeva postignuto je povećanjem njihove koncentracije (tablica 16.). Pri nižoj koncentraciji antifungalno djelovanje na porast micelija *F. culmorum* bilo je slično kao na kontroli (čisti KDA) (tablica 15.). Ti su rezultati u skladu s našim prethodnim istraživanjem (Bušić i sur. 2019.) gdje je utvrđeno umjereno do slabo antifungalno djelovanje većine spojeva na patogen *F. culmorum*, posebice pri nižoj koncentraciji od 10 µg/mL. Ipak, svi su spojevi pokazali statistički značajno bolje djelovanje u odnosu na kontrolu (KDA) pri objema ispitanim koncentracijama protiv patogena *F. oxysporum*. Također, naglašava se važnost antifungalnog djelovanja piridinkarboksamidne skupine na pojedine patogene.

Nikotinamidni spojevi, među ostalim, djeluju i kao aktivatori obrambenog sustava biljke (Sidiq i sur., 2021.). U istraživanju koje su proveli Sidiq i sur. (2021.) potvrđeno je da nikotinamid mononukleotid (NMN) pojačava otpornost ječma na napad *F. graminearum*. Osim toga, predtretman nikotinamidom suzbija razvoj *F. graminearum* na pšenici te značajno smanjuje akumulaciju mikotoksina deoksinivalenola (DON) i ergosterol peroksida u pšenici.

U istraživanju ovog doktorskog rada antifungalnog djelovanja izonikotinamidnih derivata na porast micelija patogena *F. oxysporum*, spojevi (12) i (4) pokazali su najbolju učinkovitost pri koncentraciji od 10 µg/mL (tablica 11). Većina spojeva pokazala je bolje

antifungalno djelovanje s pomoću duljeg vremena inkubacije. Pri koncentraciji od 100 µg/mL, spoj (12) INa-DBP pokazao je najbolje djelovanje nakon 72 i 144 sata (tablica 12.). Svi ispitani izonikotinamidni piridinijevi spojevi imali su značajno manje antifungalno djelovanje na porast micelija obaju patogena u usporedbi s komercijalnim fungicidom pri koncentracijama od 10 i 100 µg/mL.

Istraživanje ovog doktorskog rada potvrdilo je da većina primijenjenih nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata pokazuje značajno antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *F. oxysporum*. Unatoč tomu, njihovo je djelovanje na patogen *F. culmorum* ograničeno, posebice pri nižim koncentracijama. Prema dobivenim rezultatima, usporedbom dviju skupina spojeva, nikotinamidni i izonikotinamidni derivati imaju podjednako antifungalno djelovanje na patogen *F. oxysporum*, a nikotinamidni derivati pokazuju bolje djelovanje protiv patogena *F. culmorum* u odnosu na izonikotinamidne derivate.

Također, može se zaključiti da antifungalno djelovanje svih spojeva ovisi o vrsti patogena. U istraživanju Bušić i sur. (2022.b.) potvrđene su značajne razlike u antifungalnom djelovanju istih spojeva na različite patogene. Prema navedenom istraživanju, spoj *N*-(3-brom)propil-4-hidroksiiminometilpiridinijev bromid pokazao je vrlo dobro inhibicijsko djelovanje protiv patogena *S. sclerotiorum* pri objema primijenjenim koncentracijama, dok je na patogene *F. culmorum* i *M. phaseolina* isti spoj imao gotovo stimulacijski učinak. Yan i sur. (2022.) također potvrđuju različito antifungalno djelovanje 15 sintetiziranih piridin-karboksamida na osam različitih biljnih patogena.

Ti rezultati pokazuju da su, iako spojevi pokazuju određenu razinu antifungalne aktivnosti, potrebna daljnja istraživanja kako bi se optimizirale strukture spojeva za bolje antifungalno djelovanje na različite vrste patogena, na razini usporedivoj s komercijalnim fungicidima.

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na porast micelija B. cinerea

Ispitivanjem antifungalnog djelovanja derivata nikotinamida i izonikotinamida na gljivi *B. cinerea* nije utvrđeno potpuno (100 %-tno) antifungalno djelovanje ni za jedan spoj. Ipak, pri objema primijenjenim koncentracijama (10 µg/mL i 100 µg/mL), nikotinamidni i izonikotinamidni derivati pokazali su statistički značajno bolje antifungalno djelovanje u usporedbi s kontrolom (čisti KDA). Spoj (11), primijenjen u koncentraciji od 10 µg/mL, pokazao je najslabije antifungalno djelovanje 144 sata nakon inokulacije pri čemu se učinkovitost smanjivala s produljenjem vremena inkubacije.

Slično istraživanje proveli su Wang i sur. (2018.) koji su ispitivali antifungalno djelovanje sedam nikotinamidnih derivata u dozi od 50 µg/mL na fitopatogene gljive, uključujući *F. oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *R. solani*, *A. solani* i *B. cinerea*. Njihovi rezultati također potvrđuju antifungalno djelovanje nikotinamidnih derivata na porast micelija *B. cinerea*. Izdvojili su dva nikotinamidna spoja koja su ostvarila inhibiciju porasta micelija veću od 90 % s vrijednostima EC₅₀ od 13,99 µg/mL što je usporedivo s komercijalnim fungicidom boskalidom čija je vrijednost iznosila 7,36 µg/mL. U ovom istraživanju spoj (4) pokazao je najbolje antifungalno djelovanje protiv *B. cinerea* u svih pet mjerenja, primijenjen u koncentraciji od 10 µg/mL (tablica 17.). Slično rezultatima Wang i sur. (2018.), nije zabilježena 100 %-tna inhibicija rasta micelija *B. cinerea* ni za jedan ispitivani spoj.

Antifungalno djelovanje *N*-(1H-pirazol-5-il)nikotinamida na porast micelija patogena *B. cinerea* ispitivali su Wang i sur. (2022.). Istraživanje je provedeno u *in vitro* i *in vivo* uvjetima primjenom koncentracije 50 mg/L. Dobiveni rezultati pokazali su da je inhibicija porasta micelija *B. cinerea* za sve spojeve bila niža u usporedbi s inhibicijom ostalih ispitivanih patogena, s postotkom inhibicije koji je iznosio manje od 10 % i najviše 66,7 %. Uspoređujući inhibicijsko djelovanje spojeva s primijenjenim boskalidom, svi spojevi imali su značajno slabije inhibitorno djelovanje na *B. cinerea*. U ovom istraživanju, spojevi (8) i (9) postigli su slične rezultate u usporedbi s pozitivnom kontrolom kada su primijenjeni u koncentraciji od 100 µg/mL, 48 sati nakon inokulacije (tablica 18.), što upućuje na potencijal njihova daljnjeg istraživanja.

Slični rezultati prikazani su i u istraživanju Yan i sur. (2022.) koji su ispitivali antifungalno djelovanje 15 piridin-karboksamida kao potencijalnih inhibitora suksinat-dehidrogenaze. Njihovo istraživanje obuhvatilo je patogene *F. solani*, *S. sclerotiorum*, *Phytophthora*

capsica, *F. oxysporum*, *Cytospora ambiens*, *F. graminearum*, *Alternaria alternata* i *B. cinerea*. Većina ispitanih spojeva pokazala je slabo do umjereno antifungalno djelovanje na sve vrste patogena, dok su se pojedini spojevi istaknuli boljom inhibicijom, poput spoja 6 – klor-*N*-(2-(fenilamino)fenil)nikotinamida, koji je postigao 76,9 % inhibicije porasta micelija *B. cinerea*. Također, kao i u ovom istraživanju, ni jedan ispitivani spoj nije postigao 100 %-tnu inhibiciju porasta micelija patogena *B. cinerea*.

U istraživanju ovog doktorskog rada povećanje koncentracije primijenjenih spojeva dovelo je do povećanja antifungalnog djelovanja pri čemu su svi spojevi pokazali statistički značajno bolje djelovanje u odnosu na kontrolu (čisti KDA). Slične rezultate zabilježili su Bušić i sur. (2020.) koji su ispitivali antifungalno djelovanje kvaternarnih soli nikotinamida na četirima patogenima, uključujući *B. cinerea*. Pri koncentraciji od 10 µg/mL ispitivani su spojevi pokazali slabu inhibiciju porasta micelija, dok je veća koncentracija od 100 µg/mL značajno poboljšala inhibiciju svih patogena. Među ispitivanim fitopatogenim gljivama, *B. cinerea* pokazala je najveću osjetljivost na djelovanje nikotinamidnih spojeva pri koncentraciji od 100 µg/mL, s inhibicijom u rasponu od 41,0 do 57,1 %. Značajnost njihova istraživanja očituje se u ekološki prihvatljivoj metodi za kvaternizaciju nikotinamida i supstituiranih 2-bromacetofenona korištenjem dubokih eutektičkih otapala (DES). DES predstavljaju okolišno prihvatljiva otapala, usklađena s načelima zelene kemije, te se zbog niske toksičnosti, biorazgradivosti i jednostavne pripreme pokazuju kao potencijalno rješenje za sintezu bioaktivnih spojeva.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je antifungalno djelovanje izonikotinamidnih derivata slično rezultatima nikotinamidnih derivata u pogledu inhibicije porasta micelija *B. cinerea*. Svi spojevi primijenjeni u objema koncentracijama (10 i 100 µg/mL) pokazali su značajno bolje antifungalno djelovanje na porast micelija u odnosu na kontrolu (čisti KDA). S druge strane, u usporedbi s komercijalnim fungicidom, svi spojevi pokazali su znatno slabije antifungalno djelovanje (tablica 19. i 20.). Također je utvrđeno da povećanje koncentracije izonikotinamidnih piridinijevih spojeva pozitivno utječe na njihovo djelovanje protiv *B. cinerea*.

Dudová i sur. (2002.) ispitivali su antifungalna svojstva novih bakrovih(II) kompleksa 2-metiltionikotinata na različitim sojevima filamentoznih gljiva korištenjem makrodilucijske metode. Najosjetljiviji sojevi na bakrove(II) adukte s bioaktivnim ligandima bili su *Rhizopus oryzae* i *Microsporium gypseum* (IC₅₀ 1,5-2,3 mmol/L). Najveću otpornost pokazale su gljive *B. cinerea* i *Fusarium moniliforme* (prosječne IC₅₀ vrijednosti 4,25, odnosno 3,13 mmol/L).

Svi bioaktivni ligandi u bakrovim(II) kompleksima doprinijeli su povećanju inhibicijskog učinka na testirane gljive, osim značajne inhibicije etil-nikotinatom na *R. oryzae*. Njihovi rezultati pokazuju varijabilan učinak tih spojeva na različite patogene. Ti su rezultati u skladu s nalazima ovog istraživanja koji također pokazuju različito antifungalno djelovanje spojeva ovisno o vrsti patogena. Njihovi rezultati također upućuju na pozitivan utjecaj uključivanja nikotinamidnih i izonikotinamidnih kompleksa i njihovo antifungalno djelovanje. Naime, kompleks bakra (II) s 2-metiltionikotinatom inhibirao je sporulaciju *A. alternata* za više od 90 %. Ipak, najslabije antifungalno djelovanje zabilježeno je protiv patogena *B. cinerea* i *F. moniliforme*. Ti su rezultati u skladu s našim nalazima koji također pokazuju da ni jedan ispitivani spoj nije postigao 100 %-tnu inhibiciju porasta micelija *B. cinerea*.

Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja većina nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata pokazala je značajno antifungalno djelovanje na *B. cinerea*, posebice pri višim koncentracijama. Uspoređujući njihovo djelovanje tijekom cijelog vremena inkubacije, primijećeno je da su nikotinamidni spojevi imali nešto bolju učinkovitost na *B. cinerea*, posebice pri višim koncentracijama. Međutim, ni jedan spoj nije u potpunosti suzbio porast micelija patogena *B. cinerea* što upućuje na potrebu za daljnjom optimizacijom formulacija i koncentracija kako bi se poboljšala učinkovitost. Utvrđeno je i da su nikotinamidni spojevi nešto učinkovitiji od izonikotinamidnih što znači da i male strukturne razlike mogu imati važnu ulogu u antifungalnoj aktivnosti.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na ovisnost antifungalnog djelovanja pojedinih nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata o vrsti patogena i primijenjenoj koncentraciji. Dobivene rezultate potvrđuju i istraživanja drugih autora (Dudová i sur., 2002., Wang i sur., 2018., Bušić i sur., 2020., Yan i sur., 2022.).

Tot i sur. (2022.) istraživali su antifungalno djelovanje devet nikotinamid-bromida s različitim dužinama alkilnih bočnih lanaca. Njihovi rezultati pokazuju da lipofilna svojstva utječu na antifungalno djelovanje pri čemu produženje alkilnog lanca poboljšava inhibiciju rasta patogena. Također su utvrdili da su sintetizirani spojevi najslabije djelovali na *F. graminearum*, dok su najjače djelovali na *S. sclerotiorum*. Ta istraživanja naglašavaju ne samo važnost koncentracije već i strukturne varijacije poput dužine bočnih lanaca čime se utječe na antifungalna svojstva protiv različitih vrsta patogena.

Luo i sur. (2018.) također naglašavaju važnost strukturnih prilagodbi u antifungalnom djelovanju, ali s naglaskom na heterociklične derivate poput benzoksazola i benzotiazola.

Prema njihovim rezultatima, derivati benzoksazola često pokazuju bolju antifungalnu aktivnost u usporedbi s derivatima benzotiazola. Tako je spoj 2-(fenoksimetil)benzo[d]oksazol, koji je nesupstituirani derivat benzoksazola, bio tri puta aktivniji u inhibiranju porasta micelija *B. cinerea* od odgovarajućeg spoja 2-(fenoksimetil)benzo[d]tiazol koji je derivat benzotiazola. Njihovo istraživanje ističe da promjene u osnovnoj strukturi molekule, ne samo u bočnim lancima, mogu značajno utjecati na antifungalnu aktivnost.

Izonikotinamidni derivati i njihovi derivati važni su biološki spojevi koji se često proučavaju ne samo zbog njihova antibakterijskog i antifungalnog djelovanja na biljne patogene već i zbog antimikobakterijskih svojstava prema humanim patogenima te se koriste u istraživanjima i razvoju antitumorskih lijekova (de Souza i sur., 2010.).

Patel i sur. (2017.) sintetizirali su šest derivata imidazolidina izonikotinamida i ispitivali njihovu antimikrobnu aktivnost na humane bakterije. Njihovo istraživanje bilo je usmjereno na procjenu djelovanja tih spojeva protiv gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, gram-negativne bakterije *Escherichia coli* i gljivice *Candida albicans*. Rezultati pokazuju da su sintetizirani spojevi pokazali dobro do umjereno antibakterijsko, antifungalno i antituberkulozno djelovanje u usporedbi s pozitivnom kontrolom, odnosno antibakterijskim ofloksacinom, antifungalnim ketoconazolom i antituberkuloznim izoniazidom. Najbolje antibakterijsko, antifungalno i antituberkulotično djelovanje protiv svih testiranih sojeva pokazao je spoj *N*-(2-metil-5-okso-imidazolidin-1-il)izonikotinamid. Također, autori ističu da je prisutnost izonikotinamidne jedinice ključna za pozitivno antimikrobno djelovanje spojeva, a dodatak imidazolidinske jedinice dodatno pojačava taj učinak. Slično tomu, Alghamdi i sur. (2022.) istraživali su antimikobakterijsko djelovanje nekoliko novih derivata tiazolidinona *N*-(5-metil-4-okso-2-ariltiazolidin-3-il)izonikotinamida koji također uključuju izonikotinamidnu jedinicu. Antimikobakterijsko djelovanje ispitano je protiv *Mycobacterium tuberculosis*. Najveću djelotvornost pokazao je spoj *N*-(5-metil-4-okso-2-(4-metoksifenil)tiazolidin-3-il)izonikotinamid, ali svi testirani spojevi pokazali su znatno slabije djelovanje u usporedbi s pozitivnom kontrolom (streptomycinom i izonijazidom).

Antifungalno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida na klijavost konidija i dužinu kličnih cijevi patogene B. cinerea

Prema dobivenim rezultatima o broju iskljajalih konidija te izračunanoj inhibiciji klijavosti konidija, većina nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata ima inhibitorno djelovanje na klijavost konidija patogena *B. cinerea* (tablica 29. i 30.).

Osam spojeva pri koncentraciji 10 µg/mL pokazalo je inhibiciju klijavosti konidija usporedivu s komercijalnim fungicidom (71 %), dok je spoj (8) pokazao i veće inhibitorno djelovanje (74 %). Međutim, povećanje koncentracije tog spoja rezultiralo je smanjenjem inhibitornog djelovanja na 43 %. Rezultat dobiven tim pokusom naglašava da je pri proučavanju djelotvornosti različitih spojeva važno ispitati veći broj koncentracija kako bi se utvrdila optimalna koncentracija za maksimalno djelovanje. Slično djelovanje zabilježeno je i kod drugih spojeva, (3), (4), (5), (6), (8), (9), (10) i (12), gdje je pri većim koncentracijama (100 µg/mL) zabilježena slabija inhibicija klijavosti. Pri koncentraciji od 100 µg/mL, spojevi (11), (7) i (1) pokazali su najveću inhibiciju klijavosti konidija *B. cinerea* (tablica 29.).

Važnost optimizacije koncentracije spojeva potvrđena je i istraživanjem Wang i sur. (2016.) koji su ispitivali različite koncentracije spojeva novih sintetiziranih benzimidazolnih derivata kako bi se procijenilo njihovo inhibicijsko djelovanje na klijanje konidija *M. oryzae*. Spoj (E)-2-((2-(2,4-difluorfenil)hidrazonometil)-1H-benzo[d]imidazol istaknuo se po svojem umjerenom antifungalnom djelovanju protiv *M. oryzae* za koji je EC₅₀ iznosio 1,85 µg/mL te 100 %-tnoj inhibiciji klijanja konidija već pri koncentraciji 10 µg/mL.

Rezultati istraživanja u ovom doktorskom radu također su pokazali da većina nikotinamidnih derivata primijenjenih u koncentraciji 10 µg/mL nema statistički značajne razlike u inhibicijskom djelovanju na dužinu klične cijevi kod *B. cinerea*, u usporedbi s komercijalnim fungicidom. Spoj (12) pri koncentraciji 10 µg/mL pokazao je inhibicijsko djelovanje podjednako onomu postignutom primjenom fungicida, dok je spoj (1) pri 100 µg/mL imao čak i bolje inhibitorno djelovanje od fungicida (tablica 31.). Takvi su rezultati u skladu s istraživanjima Xu i sur. (2023.) koji su ispitivali inhibicijsko djelovanje kinazolin-6-il-karboksilata na klijanje konidija i izduživanje kličnih cijevi kod *B. cinerea* i *Exserohilum rostratum*. Kombinirali su različite supstituirajuće skupine (R) s osnovnom jedinicom N-(3-klor-4-fluorfenil)kinazolin-4-amina kako bi istražili njihovo antifungalno djelovanje. Njihovi spojevi pokazali su značajno inhibicijsko djelovanje na klijanje konidija i dužinu

klične cijevi kod *B. cinerea* pri čemu je spoj 4-((3-klor-4-fluorfenil)amino)-7-metoksikinazolin-6-il-2-(piridin-3-il)acetat pri koncentraciji od 50 µg/mL inhibirao izduživanje kličnih cijevi za 70,5 %.

U ovom istraživanju iznimke su bili spoj (2), primijenjen u objema koncentracijama (10 i 100 µg/mL), i spoj (11) primijenjen u koncentraciji 10 µg/mL, koji su pokazali stimulacijski učinak na dužinu klične cijevi *B. cinerea*. Stimulacijski učinak određenih nikotinamidnih i izonikotinamidnih spojeva potvrđuju rezultati istraživanja Dudová i sur. (2002.) koji su zabilježili da primjena spojeva u koncentraciji od 5 mmol/L kod *B. cinerea* rezultira intenzivnim grananjem hifa. Te sličnosti u rezultatima našeg istraživanja dodatno naglašavaju varijabilnost učinaka različitih spojeva na razvoj patogena.

Spojevi (3), (4), (5) i (6) u koncentraciji 100 µg/mL pokazali su statistički značajno slabiju inhibiciju klične cijevi u usporedbi s kontrolom (destilirana voda). Usporedba različitih koncentracija pokazala je da je spoj (1) bio učinkovitiji pri 100 µg/mL, dok su ostali spojevi postigli bolju učinkovitost pri 10 µg/mL (tablica 31.).

U usporedbi s nikotinamidnim derivatima, izonikotinamidni derivati nisu pokazali značajno različitu inhibiciju od kontrole ili fungicida u koncentracijama od 10 µg/mL i 100 µg/mL. Spojevi (5), (6), (9) i (12) pokazali su različitu inhibiciju ovisno o koncentraciji pri čemu je spoj (12) bio učinkovitiji pri 10 µg/mL, dok su ostali spojevi bili učinkovitiji pri 100 µg/mL (tablica 32.).

Može se zaključiti da nikotinamidni derivati imaju veću varijabilnost u učinkovitosti inhibicije klične cijevi ovisno o koncentraciji, s tim da većina spojeva pri 10 µg/mL djeluje podjednako učinkovito kao fungicid. S druge strane, izonikotinamidni derivati općenito nisu pokazali značajne razlike u usporedbi s kontrolom (destilirana voda) ili fungicidom, osim nekoliko spojeva čija je učinkovitost varirala ovisno o koncentraciji.

In vivo testovi na prirodnim supstratima

Rezultati *in vivo* istraživanja na mrkvi pokazali su da su derivati nikotinamida, primijenjeni u koncentraciji 10 µg/mL, pokazali statistički značajno bolju učinkovitost 144 i 168 sati nakon inokulacije u usporedbi s kontrolom (čisti KDA). Iako većina tih spojeva pokazuje slabije djelovanje u suzbijanju porasta micelija patogena *S. sclerotiorum* u usporedbi s komercijalnim fungicidom, spoj (7) izdvojio se po svojoj učinkovitosti pri čemu se nije statistički značajno razlikovao od komercijalnog fungicida, odnosno imao je jednako antifungalno djelovanje kao i pozitivna kontrola (tablica 33.). Osim što je spoj (7) pokazao potpunu antifungalnu učinkovitost u usporedbi s kontrolom (destilirana voda), drugi nikotinamidni derivati, kao što su (4), (5), (6) i (12), također su pokazali značajnu antifungalnu aktivnost 144 i 168 sati nakon inokulacije. Spojevi (4), (5), (6), (7) i (12) imali su najbolje antifungalno djelovanje nakon 144 i 168 sati od inokulacije. Iako se u *in vitro* uvjetima spoj (7) nije značajno razlikovao od drugih spojeva, u *in vivo* uvjetima pokazao je iznimnu učinkovitost, s potpunim suzbijanjem porasta micelija *S. sclerotiorum*. Ta razlika između *in vitro* i *in vivo* rezultata upućuje na utjecaj okolišnih uvjeta (supstrat) na antifungalna svojstva spojeva te potrebu za istraživanjima u *in vivo* uvjetima kako bi se bolje razumjela učinkovitost u stvarnim uvjetima primjene. Ipak, velik broj istraživanja temelji se na istraživanjima u *in vitro* uvjetima (brzo dobivanje rezultata, kontrolirani uvjeta pokusa i slično) što je ujedno i nedostatak takvih pokusa.

U ovom istraživanju *in vivo* testovima na mrkvi, spojevi (12) i (10) pokazali su značajnu učinkovitost, s djelovanjem koje je jednako komercijalnim fungicidima. Spoj (12) potpuno je suzbio porast micelija (100 %) tijekom cijelog promatranog razdoblja inkubacije (120, 144 i 168 sati). Osim toga, spoj (10) također je postigao snažnu inhibiciju nakon 120 sati inkubacije pri koncentraciji 10 µg/mL. Međutim, važno je napomenuti da se inhibitorno djelovanje spoja (12) smanjilo pri povećanju koncentracije na 100 µg/mL (tablica 34. i 35.). Istraživanje Wang i sur. (2022.) također ističe moguće antifungalno djelovanje nikotinamidnih derivata *in vivo* na listovima uljane repice (*B. napus* L.). Suprotno rezultatima ovog doktorskog rada, autori navode da je sintetizirani spoj spoj 6-klor-*N*-(3-(difluormetil)-1-metil-1*H*-pirazol-5-il)nikotinamid inhibirao porast micelija patogena *S. sclerotiorum* za 73,5 %, ali sa slabijim djelovanjem u usporedbi s komercijalnim fungicidom boskalidom čija je primjena inhibirala porast micelija patogena za 94,1 %.

Nakon *in vivo* pokusa na mrkvi, rezultati testa klijavosti sklerocija pokazali su različite učinke nikotinamidnih piridinijevih spojeva primijenjenih u koncentraciji 10 µg/mL. U kontroli (destilirana voda) je bila najviša klijavost sklerocija od 95,3 %. Spoj (10) pokazao je najbolji inhibicijski učinak, s klijavašću konidija od 12,1 % i inhibicijom od 87,31% (grafikon 1.).

Izonikotinamidni spojevi u koncentracijama 10 µg/mL i 100 µg/mL pokazali su različitu učinkovitost. Spoj (1) u koncentraciji 100 µg/mL najviše je inhibirao klijavost sklerocija (90,66 %), dok su spojevi (5), (8) i (12) u istoj koncentraciji imali najslabije djelovanje (grafikon 2.).

Zaključno, učinkovitost tih spojeva na klijavost sklerocija *S. sclerotiorum* ovisi o njihovoj koncentraciji i spoju.

Rezultati *in vivo* testa na plodovima rajčice pokazali su da derivati nikotinamida nisu potpuno (100 %) inhibirali porast micelija patogena *B. cinerea*. Nakon 96 i 120 sati od inokulacije, većina nikotinamidnih piridinijevih spojevi nije pokazala statistički značajno različito antifungalno djelovanje u usporedbi s kontrolom (destilirana voda). Statistički značajno bolje djelovanje u odnosu na kontrolu (destilirana voda) uočeno je kod spojeva (10) i (12) pri čemu je spoj (12) pokazao značajno bolje antifungalno djelovanje na porast micelija *B. cinerea*, 120 i 144 sata nakon inokulacije (tablica 35.). Inhibitorno djelovanje nikotinamidnih derivata pri koncentraciji od 100 µg/mL slabi s vremenom inkubacije, osim za spoj (12).

Prema istraživanju Yan i sur. (2022.) spoj 6-klor-*N*-(2-(fenilamino)fenil)nikotinamid pokazao je preventivno djelovanje protiv *B. cinerea* na plodovima rajčice pri čemu je njegovo inhibitorno djelovanje bilo najbliže komercijalnom fungicidu pri najvišoj koncentraciji. Učinkovitost navedenog spoja iznosila je 53,9 % pri koncentraciji od 200 mg/L te 49 % i 27,1 % pri koncentracijama od 100 mg/L i 50 mg/L. S druge strane, rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da su svi nikotinamidni derivati, u usporedbi s komercijalnim fungicidom, imali statistički značajno slabiji inhibitorni učinak bez obzira na vrijeme inkubacije (tablica 17.).

Istraživanje utjecaja derivata nikotinamida i izonikotinamida u *in vivo* testu provedeno je na klijanima pšenice zaražene s *F. culmorum*, uz procjenu njihova utjecaja na masu svježeg i suhog korijena i biljke te dužinu biljke i korijena. Rezultati su pokazali varijacije u biološkom odgovoru biljaka ovisno o primijenjenom spoju i koncentraciji.

Indeks bolesti predstavlja važan pokazatelj učinkovitosti ispitivanog sredstava za suzbijanje bolesti jer omogućuje kvantifikaciju intenziteta simptoma bolesti na pojedinačnim biljkama. Goulart (2022.) u svojem istraživanju učinkovitosti različitih fungicida također naglašava značaj indeksa bolesti te u svojim rezultatima navodi visok indeks bolesti koji odražava nisku učinkovitost tretmana. U istraživanju ovog doktorskog rada indeks bolesti također omogućava usporedbu učinkovitosti tretmana fungicidom i različitim spojevima. Dobiveni rezultati prikazuju vrlo nizak indeks bolesti (0,9) za nikotinamidne spojeve (2) i (4) primijenjene u koncentraciji 10 µg/mL (tablica 36.). Taj rezultat sugerira da su navedeni spojevi značajno učinkoviti u smanjenju prisutnosti bolesti u usporedbi s pozitivnom kontrolom.

U istraživanju Mohammed i Imara (2023.) prikazan je utjecaj nikotinske kiseline na rast i otpornost biljke piskavice (*Trigonella foenum-graecum L.*) zaražene patogenom *Sclerotium rolfsii*. Utvrđeno je da primjena nikotinske kiseline u koncentraciji od 10 mM značajno povećava visinu biljke, svježiu i suhu masu biljke te prosječnu težinu mahuna u usporedbi s fungicidnim tretmanom i netretiranim sjemenom. Također su otkrili da tretman nikotinskom kiselinom u koncentracijama od 8 mM i 10 mM inducira otpornost protiv *S. rolfsii*, smanjujući zarazu patogenom i broj mrtvih biljaka.

Rezultati ovog istraživanja također su pokazali da većina ispitanih nikotinamidnih spojeva povećava masu svježeg korijena klijanaca pšenice zaraženih patogenom *F. culmorum* u odnosu na sterilno zrno. Jedino primjenom spoja (1) u koncentraciji 100 µg/mL i spoja (12) u koncentraciji 10 µg/mL nisu utvrđene statistički značajne razlike. Svi spojevi imali su manji utjecaj na masu svježeg korijena u usporedbi s fungicidnim tretmanom (grafikon 3.). Samo je spoj (4) pri koncentraciji 100 µg/mL pokazao statistički značajno veći utjecaj na masu liofiliziranog korijena u odnosu na kontrolu (sterilno zrno), dok ostali spojevi nisu pokazali značajne razlike.

Primjenom testiranih spojeva utvrđena je manja masa liofiliziranog korijena u usporedbi s fungicidnim tretmanom (grafikon 4.). Nakon primjene četiriju nikotinamidnih spojeva utvrđena je veća masa svježe biljke u odnosu na kontrolu, dok su svi spojevi imali manji utjecaj na masu u usporedbi s fungicidnim tretmanom (grafikon 5.).

Kada je riječ o dužini biljke, svi su spojevi pokazali slično djelovanje, osim spoja (4), primijenjenog u koncentraciji 100 µg/mL, za koji je utvrđeno da ima veći utjecaj na dužinu u usporedbi s kontrolom (sterilno zrno). Nije bilo statistički značajnih razlika između

ispitanih spojeva i fungicida (grafikon 7.). Spoj (4) primijenjen u koncentraciji 10 i 100 µg/mL pokazao je veći utjecaj na dužinu korijena u odnosu na kontrolu (sterilno zrno), dok ostali spojevi nisu pokazali značajne razlike (grafikon 8.).

Istraživanje Sidiq i sur. (2021.) pokazalo je da primjena nikotinamid mononukleotida i nikotinamida značajno smanjuje pojavu fuzarijske paleži klasova pšenice (12 % i 8 %) u usporedbi s kontrolnim klasovima (26 %). Navedeni spojevi potiču obrambeni odgovor biljaka već u ranoj fazi infekcije što dovodi do manjeg razvoja bolesti na klasovima pšenice. Istraživanje ovog doktorskog rada na klijancima pšenice imalo je za cilj ispitati utjecaj izonikotinamidnih derivata na parametre rasta biljaka pšenice zaražene s *F. culmorum*. Iako su parametri promatranja različiti, oba istraživanja potvrđuju pozitivan utjecaj nikotinamidnih spojeva na smanjenje zaraze s *Fusarium* vrstama i otpornost biljaka pšenice. Statistički je utvrđeno značajno povećanje mase svježeg korijena pšenice uz primjenu izonikotinamidnih derivata u usporedbi s kontrolom, dok je primjenom odabranih spojeva utvrđena manja masa u odnosu na fungicidni tretman (grafikon 9.).

Rezultati su pokazali da je većina izonikotinamidnih spojeva utjecala na povećanje mase svježih biljke, dok je nakon tretmana spojevima (7) i (9) u koncentraciji od 100 µg/mL izostao taj učinak. Dužina biljke povećana je nakon primjene većine spojeva, osim kod spoja (7) u koncentraciji od 10 µg/mL, dok je dužina korijena bila veća nakon primjene većine spojeva, osim kod spojeva (7) i (9) pri koncentraciji od 100 µg/mL.

Nikotinamidni su se derivati pokazali kao djelotvorni u prevladavanju stresa biljke u uvjetima povećane slanosti tla. Oblaganje sjemena nikotinamidom (2,5 i 5 mg/l) može značajno ublažiti negativne učinke slanosti tla, koja obično utječe na smanjenje dužine biljke, dužine korijena, broj listova, površinu lišća, suhu masu izdanaka i prinos (Sadaka i sur., 2010.). Istraživanja upućuju na potencijal nikotinamidnih derivata u poboljšanju otpornosti biljaka i povećanja prinosa. Ipak, nužna su daljnja istraživanja kako bi se razumjeli specifični učinci i mehanizmi djelovanja tih spojeva.

Ovim istraživanjem utvrdili smo složenost antifungalnog djelovanja kvaternih piridinijevih soli, s varijacijom u učinkovitosti ovisno o strukturi spoja i vrsti patogena. Podjela na izonikotinamidne i nikotinamidne spojeve omogućila je detaljniju analizu njihova utjecaja na porast micelija patogena različitih rodova, *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia*, te na vijabilnost konidija patogena *B. cinerea* i sklerocija patogena *S. sclerotiorum*. Daljnja istraživanja bit će usmjerena na optimizaciju i razumijevanje mehanizama djelovanja tih

spojeva što je važno za razvoj novih ekološki prihvatljivih fungicida. Većina postojećih istraživanja pokazuje značajno antifungalno djelovanje nikotinamida nakon jednog mjerenja porasta micelija. Međutim, s fitopatološkog aspekta jedno mjerenje porasta micelija, posebno kada je riječ o 24 sata ili 48 sati nakon inokulacije, ne daje dovoljno informacija o dugotrajnom antifungalnom djelovanju i stabilnosti primijenjenih spojeva. Zato smo u našim istraživanjima ispitali djelovanje spojeva tijekom šest dana inkubacije što omogućuje bolji uvid u djelovanja kroz dulje razdoblje i pruža osnovu za daljnju optimizaciju spojeva u pogledu dulje djelotvornosti.

5. ZAKLJUČCI

Istraživanje je provedeno na fitopatogenim polifagnim vrstama gljiva rodova *Fusarium* (*F. culmorum* i *F. oxysporum*), *Botryotinia* (*B. cinerea*) i *Sclerotinia* (*S. sclerotiorum*). Cilj istraživanja bio je ispitati antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih soli, derivata vitamina B3, kao novih potencijalnih fungicida. Proučavalo se njihovo djelovanje na porast micelija, sporulaciju, vijabilnost konidija/sklerocija te rast kličnih cijevi. Istraživanja su provedena u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.

Nakon provedenog istraživanja i analize rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Prvi cilj ovog istraživanja bio je utvrditi antifungalno djelovanje serije kvaternih piridinijevih soli na porast micelija fitopatogenih vrsta gljiva rodova *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia*.
 - Postavljena je hipoteza da se kvaterne piridinijeve soli razlikuju u antifungalnom djelovanju na porast micelija fitopatogenih vrsta gljiva rodova *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia*.

Provedenim analizama utvrđeno je da postoje razlike u antifungalnom djelovanju na porast micelija između kvaternih piridinijevih soli. Ovim istraživanjem utvrđeno je da su svi derivati nikotinamida i izonikotinamida imali značajno bolje antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* i *B. cinerea* u odnosu na kontrolu (čisti KDA), bez obzira na vrijeme inkubacije. Općenito, primjena veće koncentracije (100 µg/mL) bila je učinkovitija za nikotinamide, dok za izonikotinamidne spojeve koncentracija nije bila ključan čimbenik učinkovitosti. Nikotinamidni spojevi (10), (8) i (9) te izonikotinamidni spoj (12) pokazali su najbolje antifungalno djelovanje na patogen *S. sclerotiorum*.

Najbolje antifungalno djelovanje na porast micelija *F. oxysporum* utvrđeno je za nikotinamidne derivate (4), (5), (6) i izonikotinamidni derivat (12). Najbolje antifungalno djelovanje na porast micelija patogena *B. cinerea* utvrđeno je kod nikotinamidnih spojeva (4), (8) i (9). Na patogen *F. culmorum* značajno antifungalno djelovanje pokazali su spojevi (7), (8) i (10) samo primjenom koncentracije od 100 µg/mL.

Utvrđeno je i različito antifungalno djelovanje spojeva na različitu vrstu patogena te se **postavljena hipoteza prihvaća.**

2. Drugi cilj bio je utvrditi antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih soli na vijabilnost konidija/sklerocija i rast kličnih cijevi.

- Kvaterne piridinijeve soli razlikuju se u antifungalnom djelovanju na vijabilnost konidija/sklerocija i rast kličnih cijevi.

Analizom varijance ($p \leq 0,05$) potvrđeno je značajno inhibitorno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamnida na klijavost konidija gljive *B. cinerea*. Pri koncentraciji od 10 µg/mL, većina spojeva pokazuje inhibiciju klijavosti konidija u rasponu od 50 % do 66 %, dok je spoj (8) pokazao najbolju inhibiciju od 74 %. Najbolje inhibitorno djelovanje nikotinamidnih derivata pokazali su spojevi (1), (2) i (6) te izonikotinamidni spojevi (10), (12) i (3) s najvećom inhibicijom od 82 %. **Prihvaćena je postavljena hipoteza** jer se spojevi međusobno razlikuju u antifungalnom djelovanju.

Kvaterne piridinijeve soli u koncentraciji od 10 µg/mL pokazuju značajno bolju inhibiciju klijavosti konidija *B. cinerea*, dok se antifungalno djelovanje većine ispitivanih spojeva smanjuje pri koncentraciji 100 µg/mL. Potrebna je daljnja optimizacija koncentracija pojedinih spojeva kako bi se postiglo maksimalno antifungalno djelovanje.

Provedenim analizama utvrđena je značajna razlika u inhibiciji rasta kličnih cijevi konidija *B. cinerea* primjenom različitih koncentracija nikotinamidnih i izonikotinamidnih spojeva. Većina spojeva iz obiju serija pokazala je bolju inhibiciju pri nižoj primijenjenoj koncentraciji (10 µg/mL), dok su se spojevi razlikovali u inhibitornom djelovanju na rast kličnih cijevi. **Postavljena je hipoteza prihvaćena.**

Inhibitorno djelovanje nikotinamidnih i izonikotinamidnih spojeva na klijavost sklerocija patogena *S. sclerotiorum* ovisi o koncentraciji primjene. Veće koncentracije (100 µg/mL) pokazale su bolje inhibitorno djelovanje pri čemu su vrlo učinkoviti bili nikotinamidni derivat (10) i izonikotinamidni derivat (1) s inhibicijom od 87,31 % i 90,66 %. Pozitivna kontrola (fungicid) i nikotinamidni derivat (7) pokazali su potpuno inhibicijsko djelovanje (100 %) na formiranje sklerocija patogena na prirodnom supstratu mrkvi što upućuje na njihov potencijal za primjenu u suzbijanju patogena *S. sclerotiorum*. **Hipoteza se prihvaća** jer je utvrđena značajna razlika inhibitornog djelovanja različitih spojeva.

3. Treći cilj bio je utvrditi antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih soli na porast micelija i sporulaciju u *in vivo* testu.

- Kvaterne se piridinijeve soli razlikuju u antifungalnom djelovanju na porast micelija i sporulaciju u *in vivo* testu.

Rezultati *in vivo* test na plodovima rajčice potvrdili su da ni jedan nikotinamidni derivat primijenjenom koncentracijom od 100 µg/mL nije potpuno inhibirao porast micelija *B. cinerea*. Spoj (12) istaknuo se najboljim antifungalnim djelovanjem od svih primijenjenih spojeva, ali se ni on nije statistički značajno razlikovao od kontrolnih varijanti. **Postavljena se hipoteza prihvata** jer je utvrđena statistički značajna razlika između spojeva nakon 96, 120 i 144 sati inkubacije.

Također, utvrđene su statistički značajne razlike između spojeva (10) i (12) pri čemu je (12) pokazao najjače antifungalno djelovanje među svim ispitanim spojevima. Svi ispitani spojevi imali su značajno slabije antifungalno djelovanje u odnosu na pozitivnu kontrolu (fungicid). Ti rezultati upućuju na potrebu daljnjih istraživanja i optimizacije nikotinamidnih piridinijevih spojeva radi poboljšanja njihove antifungalne učinkovitosti.

Rezultati *in vivo* testa na mrkvi potvrdili su da ni jedan testiran nikotinamidni derivat pri koncentraciji od 10 µg/mL nije potpuno inhibirao rast micelija patogena *S. sclerotiorum*. Većina je spojeva pokazala bolje antifungalno djelovanje u usporedbi s kontrolnom varijantom (destilirana voda). Uspoređeni nikotinamidni derivati pri koncentraciji od 10 µg/mL pokazali su da su spojevi (1), (4), (5), (6) te (12) imali znatno jače antifungalno djelovanje nakon 144 i 168 sati inkubacije ($p < 0,01$) u usporedbi sa spojem (10). Spoj (7) pokazao je statistički najbolje antifungalno djelovanje u usporedbi sa svim drugim ispitanim spojevima pri čemu je njegova učinkovitost tijekom cijelog razdoblja inkubacije (144 i 168 sati nakon inokulacije) bila usporediva s komercijalnim fungicidom.

Antifungalno djelovanje derivata izonikotinamida pri objema koncentracijama potvrdilo je statistički značajne razlike među spojevima tijekom cijelog inkubacijskog razdoblja. Spoj (12) primijenjen u koncentraciji 10 µg/mL potpuno je (100 %) suzbio porast micelija tijekom cijelog inkubacijskog razdoblja, dok je njegova učinkovitost smanjena pri većoj koncentraciji (100 µg/mL). Rezultati *in vivo* testa na zaraženim klijancima pšenice patogenom *F. culmorum* potvrdili su različit utjecaj nikotinamidnih i izonikotinamidnih spojeva na masu i dužinu biljke pšenice.

Većina spojeva iz obiju serija imala je određeno antifungalno djelovanje, ali manju učinkovitost u usporedbi s fungicidnim tretmanom. Posebno su se istaknuli nikotinamidni derivat (4) pri koncentraciji od 100 µg/mL i izonikotinamidni derivat (7) pri koncentraciji

od 10 µg/mL pozitivnim utjecajem na testirane parametre: masu svježeg korijena, dužinu biljke i dužinu korijena pšenice. **Dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu da postoje značajne razlike u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli.**

4. Četvrti cilj bio je utvrditi razlike u antifungalnom djelovanju između kvaternih piridinijevih soli i komercijalnih fungicida na porast micelija.
 - Postoje razlike u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnih fungicida na porast micelija.

Rezultati su potvrdili postavljenu hipotezu da postoje značajne razlike u antifungalnom djelovanju nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata i komercijalnog fungicida. Prema dobivenim je rezultatima hipoteza „Postoje razlike u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnih fungicida na porast micelija“ potvrđena pri čemu je komercijalni fungicid u većini pokusa značajno bolji u inhibiranju porasta micelija patogenih gljiva od nikotinamidnih i izonikotinamidnih piridinijevih spojeva.

Nikotinamidni derivati (8), (9) i (10) te izonikotinamidni derivat (12) pokazali su podjednako djelovanje na porast micelija patogena *S. sclerotiorum* kao i komercijalni fungicid. Ostali primijenjeni spojevi pokazali su statistički značajno manje antifungalno djelovanje u odnosu na komercijalni fungicid.

Statistički značajne razlike u antifungalnom djelovanju kvaternih piridinijevih soli i komercijalnih fungicida utvrđene su i za patogene *F. oxysporum*, *F. culmorum* i *B. cinerea*. Spojevi (8) i (9) pokazali su podjednako djelovanje na porast micelija *B. cinerea* kao i komercijalni fungicid.

Rezultati istraživanja ovog doktorskog rada potvrđuju da kvaterne piridinijeve soli imaju potencijal kao antifungalni agensi s različitim razinama učinkovitosti. Utvrđeno je da njihovo djelovanje ovisi o vrsti patogena i koncentraciji spojeva.

Također, može se zaključiti da nikotinamidni derivati imaju bolje antifungalno djelovanje protiv svih ispitivanih patogena u odnosu na izonikotinamidne spojeve. Bolje antifungalno djelovanje kvaternih piridinijevih soli potvrđeno je za patogene *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*, dok je patogen *F. culmorum* pokazao najmanju osjetljivost na antifungalno djelovanje spojeva u *in vivo* testu. Iako spojevi pokazuju antifungalno djelovanje, potrebna su daljnja istraživanja i optimizacija kako bi se postigla veća učinkovitost u borbi protiv fitopatogenih gljiva.

6. LITERATURA

1. Abaya, A., Serajazari, M., Hsiang, T. (2021. b): Control of *Fusarium* head blight using the endophytic fungus, *Simplicillium lamellicola*, and its effect on the growth of *Triticum aestivum*. *Biological control*, 160, 104684. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104684>
2. Abaya, A., Xue, A., Hsiang, T. (2021. a): Selection and screening of fungal endophytes against wheat pathogens. *Biological Control*, 154, 104511. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104511>
3. Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, L., Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., Schilder, A. (2019.): Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol science and technology*, 29(3), 207-228. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>
4. Abdel-Azeem, A. M., Abdel-Azeem, M. A., Darwish, A. G., Nafady, N. A., Ibrahim, N. A. (2019.): *Fusarium*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives*, 201-261. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_6
5. Adnan, M., Hamada, M. S., Hahn, M., Li, G. Q., Luo, C. X. (2019.): Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* from strawberry to procymidone and zoxamide in Hubei, China. *Phytopathology Research*, 1, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0024-8>
6. Adnan, M., Hamada, M. S., Li, G. Q., Luo, C. X. (2018.): Detection and molecular characterization of resistance to the dicarboximide and benzamide fungicides in *Botrytis cinerea* from tomato in Hubei Province, China. *Plant disease*, 102(7), 1299-1306. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1531-RE>
7. Aissat, K., Nicot, P. C., Guechi, A., Bardin, M., Chibane, M. (2008.): Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy for sustainable development*, 28, 403-409. <https://doi.org/10.1051/agro:2008016>
8. Aktaruzzaman, M., Afroz, T., Kim, B. S., Lee, Y. G. (2017). Occurrence of postharvest gray mold rot of sweet cherry due to *Botrytis cinerea* in Korea. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124, 93-96. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0049-5>

9. Albert, D., Dumonceaux, T., Carisse, O., Beaulieu, C., Filion, M. (2022.): Combining desirable traits for a good biocontrol strategy against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microorganisms*, 10(6), 1189. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061189>
10. Alghamdi, S., Almeahmadi, M. M., Asif, M., Alshehri, M. M., Kamal, M. (2022.): Antimycobacterial Evaluation and Microwave-Assisted Synthesis of N-(5-methyl-4-oxo-2-arylthiazolidin-3-yl) Isonicotinamide Derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 56(2), 215-219. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02623-0>
11. Al-Hatmi, A.M., Meis, J.F., de Hoog, G.S. (2016.): *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS pathogens*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005464>
12. Alkooranee, J. T., Aledan, T. R., Ali, A. K., Lu, G., Zhang, X., Wu, J., Li, M. (2017.): Detecting the hormonal pathways in oilseed rape behind induced systemic resistance by *Trichoderma harzianum* TH12 to *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS One*, 12(1), e0168850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168850>
13. Alonso, D. A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I. M., Ramón, D. J. (2016.): Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016(4), 612-632. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501197>
14. Altaf, A. A., Shahzad, A., Gul, Z., Rasool, N., Badshah, A., Lal, B., Khan, E. (2015.): A review on the medicinal importance of pyridine derivatives. *J. Drug Des. Med. Chem*, 1(1), 1-11. doi: 10.11648/j.jddmc.20150101.11
15. Ammar, Y. A., Mohamed, Y. A., El-Sharief, A. S., El-Gaby, M. S. A., Abbas, S. Y. (2011.): Reactivity of 2, 3-pyridine dicarboxylic anhydride towards some nitrogen nucleophilic reagents: Synthesis and antimicrobial evaluation of some pyridine carboxamide and pyrrolo [3, 4-B] pyridine-5, 7-dione derivatives. *Chemical Sciences Journal*.
16. Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Dickman, M. (2011.): Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS genetics*, 7(8), e1002230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>

17. Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M. (2014.): Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 189-201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
18. Asif, M. (2014.): Antimicrobial potential of nicotinic acid derivatives against various pathogenic microbes. *European Reviews of Chemical Research*, (1), 10-21. doi: 10.13187/ejchr.2014.1.10
19. Azizi, N., Dezfooli, S., Khajeh, M., Hashemi, M. M. (2013.): Efficient deep eutectic solvents catalyzed synthesis of pyran and benzopyran derivatives. *Journal of Molecular Liquids*, 186, 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2013.05.011>
20. Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J., Cigelnik, E., Kroon, L. P., Roebroek, E. J., Waalwijk, C. (2000.): Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90(8), 891-900. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.891>
21. Baffoni, L., Gaggia, F., Dalanaj, N., Prodi, A., Nipoti, P., Pisi, A., Biavati, B., Di Gioia, D. (2015.): Microbial inoculants for the biocontrol of *Fusarium* spp. in durum wheat. *BMC Microbiology*, 15(1), pp. 8–10. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0573-7>.
22. Baptista, F. J., Bailey, B. J., Meneses, J. F. (2012.): Effect of nocturnal ventilation on the occurrence of *Botrytis cinerea* in Mediterranean unheated tomato greenhouses. *Crop Protection*, 32, 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.11.005>
23. Bary, A. (1884.): *Vergleichende morphologie und biologie der pilze, mycetozen und bacterien*. Engelmann.
24. Blake, C., Christensen, M. N., Kovács, Á. T. (2021.): Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(1), 15-25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
25. Bojkov, G. (2022.): Gray Mold (*Botrytis Cinerea*) at Vines. *Scientific Research Publishing, Inc. USA*.
26. Boland, G. J., Hall, R. (1994.): Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 93-108. <https://doi.org/10.1080/07060669409500766>

27. Bolanos-Carriel, C., Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Funnell-Harris, D., Hallen-Adams, H. E., Eskridge, K. M. (2020.): Effects of fungicide chemical class, fungicide application timing, and environment on *Fusarium* head blight in winter wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 158, 667-679. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02109-3>
28. Bolton, M. D., Thomma, B. P., Nelson, B. D. (2006.): *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular plant pathology*, 7(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x>
29. Brown, D. W., Proctor, R. H. (2013.): *Fusarium. Genomics, Molecular and Cellular Biology*, Norfolk, UK. ISBN: 978-1-908230-75-1 (ebook)
30. Bu, S., Munir, S., He, P., Li, Y., Wu, Y., Li, X., He, Y. (2021.): *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 157, 104568. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104568>
31. Bušić, V., Molnar, M., Tomičić, V., Božanović, D., Jerković, I., Gašo-Sokač, D. (2022.a): Choline chloride-based deep eutectic solvents as green effective medium for quaternization reactions. *Molecules*, 27(21), 7429. <https://doi.org/10.3390/molecules27217429>
32. Bušić, V., Pavlović, H., Roca, S., Vikić-Topić, D., Gašo-Sokač, D. (2017.): Microwave-assisted quaternization of various pyridine derivatives and their antibacterial activity. *Croatica Chemica Acta*, 90(3), 425-433. <https://doi.org/10.5562/cca2937>
33. Bušić, V., Roca, S., Vikić-Topić, D., Vrandečić, K., Ćosić, J., Molnar, M., Gašo-Sokač, D. (2020.): Eco-friendly quaternization of nicotinamide and 2-bromoacetophenones in deep eutectic solvents. Antifungal activity of the products. *Environmental Chemistry Letters*, 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00973-3>
34. Bušić, V., Vrandečić, K., Siber, T., Roca, S., Gašo Sokač, D. (2022.b): Novel Synthetic Routes to Quaternary Pyridinium Salts and their Antifungal Activity. *Croatica Chemica Acta*, 95(1), 1-8. <https://doi.org/10.5562/cca3903>
35. Bušić, V., Vrandečić, K., Siber, T., Roca, S., Vikić Topić, D., Gašo Sokač, D. (2019.): A rapid microwave induced synthesis of isonicotinamide derivatives and their antifungal activity. *Croatica chemica acta*, 92(1), 125-135. <https://doi.org/10.5562/cca3527>

36. Cao, L. L., Zhang, Y. Y., Liu, Y. J., Yang, T. T., Zhang, J. L., Zhang, Z. G., Ye, Y. H. (2016.): Anti-phytopathogenic activity of sporothriolide, a metabolite from endophyte *Nodulisporium* sp. A21 in *Ginkgo biloba*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 129, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.10.002>
37. Carisse, O., Van Der Heyden, H. (2015.): Relationship of airborne *Botrytis cinerea* conidium concentration to tomato flower and stem infections: A threshold for de-leafing operations. *Plant Disease*, 99(1), 137-142. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0490-RE>
38. CH, P. (1794.): *Disposita methodical fungorum. Romers Neues Mag Bot*, 1, 81-128. Dostupno na: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=16179&Fields=All>
39. Cheng, X., Wang, W., Wang, Y., Xia, D., Yin, F., Liu, Q., Lv, X. (2021.): Novel pyrazolo [3, 4-d] pyrimidin-4-one derivatives as potential antifungal agents: Design, synthesis, and biological evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(38), 11395-11405. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02454>
40. Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J., Rossi, V. (2015.): Environmental conditions affect *Botrytis cinerea* infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype. *Phytopathology*, 105(8), 1090-1096. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-14-0264-R>
41. Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J., Rossi, V. (2015.): Environmental conditions affect *Botrytis cinerea* infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype. *Phytopathology*, 105(8), 1090-1096. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-14-0264-R>
42. Cobo-Díaz, J. F., Baroncelli, R., Le Floch, G., Picot, A. (2019.): A novel metabarcoding approach to investigate *Fusarium* species composition in soil and plant samples. *FEMS microbiology ecology*, 95(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz084>
43. Cole, L., Dewey, F. M., Hawes, C. R. (1996.): Infection mechanisms of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research*, 100(3), 277-286. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80154-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80154-7)

44. Ćosić, J., Jurković, D. (2001.): *Fusarium* vrste s različitih domaćina i njihova patogenost za klijance pšenice. *Poljoprivreda (Osijek)*, 7(1), 5-9.
45. Dang, T., Nizamov, I. S., Salikhov, R. Z., Sabirzyanova, L. R., Vorobev, V. V., Burganova, T. I., Abdullin, T. I. (2019.): Synthesis and characterization of pyridoxine, nicotine and nicotinamide salts of dithiophosphoric acids as antibacterial agents against resistant wound infection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(1), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.017>
46. D'Angelo, D. L., Bradley, C. A., Ames, K. A., Willyerd, K. T., Madden, L. V., Paul, P. A. (2014.): Efficacy of fungicide applications during and after anthesis against *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in soft red winter wheat. *Plant disease*, 98(10), 1387-1397. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-14-0091-RE>
47. Davari, M., Ezazi, R. (2022.): Mycelial inhibitory effects of antagonistic fungi, plant essential oils and propolis against five phytopathogenic *Fusarium* species. *Archives of Microbiology*, 204(8), 480. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03102-6>
48. de Souza, R. A., Stevanato, A., Treu-Filho, O., Netto, A. V., Mauro, A. E., Castellano, E. E., Leite, C. Q. (2010.): Antimycobacterial and antitumor activities of palladium (II) complexes containing isonicotinamide (isn): X-ray structure of trans-[Pd (N3) 2 (isn) 2]. *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 4863-4868. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.07.057>
49. Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Foster, G. D. (2012.): The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
50. Delić, I. (2020.): Nove strategije u biljnom zdravlju. *Glasilo biljne zaštite*, 20(3), 311-319.
51. Derbyshire, M. C., Denton-Giles, M. (2016.): The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathology*, 65(6), 859-877. <https://doi.org/10.1111/ppa.12517>
52. Desjardins, A. E. (2006.): *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. American Phytopathological Society (APS Press).
53. Díaz Desani, B. M., Oggerin, M., López Lastra, C. C., Rubio, V., Fereres, A. (2009.): Characterization and virulence of *Lecanicillium lecanii* against different aphid species. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-009-9218-9>

54. Dudová, B., Hudecová, D., Pokorný, R., Mičková, M., Palicová, M., Segl'a, P., Melník, M. (2002.): Copper complexes with bioactive ligands: part II—antifungal activity. *Folia microbiologica*, 47, 225-229. <https://doi.org/10.1007/BF02817642>
55. Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., Tsilo, T. J. (2017.): *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop protection*, 91, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>
56. Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A. M., Stewart, A. (2016.): Plant hosts of *Botrytis* spp. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 413-486. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20
57. Elmer, P. A., Michailides, T. J. (2007.): Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In *Botrytis: biology, pathology and control*, 243-272. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>
58. Elsherbiny, E. A., Taher, M. A. (2018.): Silicon induces resistance to postharvest rot of carrot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and the possible of defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.004>
59. Euteneuer, P., Wagentristsl, H., Steinkellner, S., Scheibreithner, C., Zaller, J. G. (2019.): Earthworms affect decomposition of soil-borne plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* in a cover crop field experiment. *Applied soil ecology*, 138, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.020>
60. Fernando, R. (1995.): Pesticide poisoning in the Asia-Pacific region and the role of a regional information network. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 33(6), 677-682. <https://doi.org/10.3109/15563659509010627>
61. Ferrada, E. E., Latorre, B. A., Zoffoli, J. P., Castillo, A. (2016.): Identification and characterization of *Botrytis* blossom blight of Japanese plums caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology*, 106(2), 155-165. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-15-0143-R>
62. Fetting, C. (2020.): The European green deal. *ESDN report*, 53.
63. Fillinger, S., Elad, Y. (Eds.). (2016.): *Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 189-216. Cham, Switzerland: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>

64. Finlayson, J. E., Rimmer, S. R., Pritchard, M. K. (1989.): Infection of carrots by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of plant pathology*, 11(3), 242-246. <https://doi.org/10.1080/07060668909501106>
65. Freije, A. N., Wise, K. A. (2015.): Impact of *Fusarium graminearum* inoculum availability and fungicide application timing on Fusarium head blight in wheat. *Crop Protection*, 77, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.016>
66. Fuckel, L. (1870.): Beiträge zur Kenntniss der rheinischen Pilze. *Jahrbücher Nassauischen Vereins Naturkunde*, 23, 1-459.
67. Garfinkel, A. R. (2021.): The history of *Botrytis* taxonomy, the rise of phylogenetics, and implications for species recognition. *Phytopathology®*, 111(3), 437-454. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0211-IA>
68. Garfinkel, A. R., Lorenzini, M., Zapparoli, G., Chastagner, G. A. (2017.): *Botrytis euroamericana*, a new species from peony and grape in North America and Europe. *Mycologia*, 109(3), 495-507. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1354169>
69. Gašo-Sokač, D., Katalinić, M., Kovarik, Z., Bušić, V., Kovač, S. (2010.): Synthesis and evaluation of novel analogues of vitamin B6 as reactivators of tabun and paraoxon inhibited acetylcholinesterase. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), 234-237. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.004>
70. Gesing, E. R. F., Mueller, K. H., Kysela, E., Drewes, M. W., Dahmen, P., Feucht, D., Pontzen, R. (2001.): Preparation of N-phenylnicotinamides for use as herbicides. *In Chem Abstr*, 134, 266207.
71. Gordon, T. R., Martyn, R. D. (1997.): The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology*, 35(1), 111-128. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.111>
72. Goulart, A. C. P. (2022.): Effectiveness of fungicide seed treatment in the control of soybean seedling dampingoff caused by *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions. *Summa Phytopathologica*, 48, 121-125. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/266033>
73. Grant-Downton, R. (2016.): *Botrytis*-biology, detection and quantification. *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 17-34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_2

74. Gregory, P. H. (1949.): Studies on *Sclerotinia* and *Botrytis*: II. De Bary's description and specimens of *Peziza fuckeliana*. *Transactions of the British Mycological Society*, 32(1), 1-IN3. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(49\)80029-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(49)80029-5)
75. Guan, X., Lin, P., Knoll, E., Chakrabarti, R. (2014.): Mechanism of Inhibition of the Human Sirtuin Enzyme SIRT3 by Nicotinamide: Computational and. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136127>
76. Hajji-Hedfi, L., Rhouma, A., Hajlaoui, H., Hajlaoui, F., Rebouh, N. Y. (2023.): Understanding the influence of applying two culture filtrates to control gray mold disease (*Botrytis cinerea*) in tomato. *Agronomy*, 13(7), 1774. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071774>
77. Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., Xiao, X. (2020.): Biological Control of Tomato Gray Mold Caused by *Botrytis Cinerea* with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae*. *Pathogens*, 9(3), 213. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>
78. Hasmann, M., Schemainda, I. (2003.): FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer research*, 63(21), 7436-7442.
79. Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., Merchán, A. V., Nevado, F. P., Aranda, E., Martín, A. (2021.): Anti-fungal activity of phenolic sweet orange peel extract for controlling fungi responsible for post-harvest fruit decay. *Fungal Biology*, 125(2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.05.005>
80. Higgins, D. S., Hausbeck, M. K. (2023.): Diseases of Carrot. In *Handbook of Vegetable and Herb Diseases*, 1-54. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35512-8_34-1
81. Hogg, A. C., Johnston, R. H., Johnston, J. A., Klouser, L., Kephart, K. D., Dyer, A. T. (2010.): Monitoring *Fusarium* crown rot populations in spring wheat residues using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 100(1), 49-57. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071774>
82. Holz, G., Coertze, S., Williamson, B., Elad, Y., Tudzynski, P., Delen, N. (2007.): Botrytis: biology, pathology and control. by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, Springer, Dordrecht, 9-24. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3>

83. Hossain, M. M., Sultana, F., Li, W., Tran, L. S. P., Mostofa, M. G. (2023.): *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the pathogenomic features of a global pathogen. *Cells*, 12(7), 1063. <https://doi.org/10.3390/cells12071063>
84. Hu, X., Roberts, D. P., Xie, L., Maul, J. E., Yu, C., Li, Y., Liao, X. (2014.): Formulations of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field. *Biological Control*, 70, 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.12.005>
85. Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., Shiping, T. (2018.): Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
86. Huzar-Novakowski, J., Paul, P. A., Dorrance, A. E. (2017.): Host resistance and chemical control for management of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ohio. *Phytopathology*, 107(8), 937-949. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-17-0030-R>
87. Hwang, E. S., & Song, S. B. (2017.): Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(18), 3347-3362. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2527-8>
88. IBM Corporation. IBM SPSS (2020.): Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp.
89. Islam, M. R., Akanda, A. M., Hossain, M. M., Hossain, M. M. (2021.): First characterization of a newly emerging phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* causing white mold in pea. *Journal of Basic Microbiology*, 61(10), 923-939. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100223>
90. Jahan, R., Siddique, S. S., Jannat, R., Hossain, M. M. (2022.): Cosmos white rot: First characterization, physiology, host range, disease resistance, and chemical control. *Journal of Basic Microbiology*, 62(8), 911-929. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200098>
91. Jarvis, W. R. (1977.): *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity-A guide to the literature.
92. Jelenić, J., Ilić, J., Ćosić, J., Vrandečić, K., Velki, M. (2020.): ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA DOMICILNOGA BILJA HRVATSKE NA UZROČNIKA SIVE PLIJESNI (*Botrytis cinerea*) S VINOVE LOZE. *Poljoprivreda*, 26(2), 58-64. <http://doi.org/10.18047/poljo.26.2>

93. Jelenić, J., Ilić, J., Ćosić, J., Vrandečić, K., Velki, M. (2024.): Growing our own poison—a vicious circle of more fungicides and more resistant *Botrytis cinerea* isolates. *Journal of Plant Pathology*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01587-8>
94. Jensen, D. F., Karlsson, M., Sarrocco, S., Vannacci, G. (2016.): Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance. *Plant pathogen resistance biotechnology*, 341-363. <https://doi.org/10.1002/9781118867716.ch18>
95. Jeschke, P., Lindner, W., Bonse, G., Santel, H. J., Luerssen, K., Schmidt, R. R., Hartwig, J. (1993.): Herbicidal and plant-mematocidal compositions based on mercaptonicotinic acid derivatives. *In Chem Abstr*, 119, 160137.
96. Jia, L. Y., Liu, X. S. (2011.): Effect of six fungicides against *Botrytis cinerea* on protected cultivation tomato. In *2011 Second International Conference on Digital Manufacturing & Automation* 489-491. IEEE. <https://doi.org/10.1109/ICDMA.2011.124>
97. Jurković D., Ćosić J., Vrandečić K. (2017.): Pseudofungi and fungi of cereals and arable crops. Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, pp. 288.
98. Kamal, M. M., Lindbeck, K. D., Savocchia, S., Ash, G. J. (2015.): Biological control of sclerotinia stem rot of canola using antagonistic bacteria. *Plant Pathology*, 64(6), 1375-1384. <https://doi.org/10.1111/ppa.12369>
99. Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A. K., Steinberg, C., Friberg, H. (2016). Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 491-501. <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-15>
100. Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., Hornok, L. (2004.): Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4419-4423. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4419-4423.2004>
101. Khandelwal, S., Tailor, Y. K., Kumar, M. (2016.): Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *Journal of Molecular Liquids*, 215, 345-386. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.015>
102. Kieseewalter, H. T., Lozano-Andrade, C. N., Maróti, G., Snyder, D., Cooper, V. S., Jørgensen, T. S., Kovács, Á. T. (2020.): Complete genome sequences of 13 *Bacillus*

- subtilis* soil isolates for studying secondary metabolite diversity. *Microbiology Resource Announcements*, 9(2), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mra.01406-19>
103. Kora, C., McDonald, M. R., Boland, G. J. (2003.): Sclerotinia rot of carrot: an example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 87(5), 456-470.
 104. Kozlevčar, B., Leban, I., Turel, I., Šegedin, P., Petric, M., Pohleven, F., Sieler, J. (1999.): Complexes of copper (II) acetate with nicotinamide: preparation, characterization and fungicidal activity; crystal structures of [Cu₂ (O₂CCH₃)₄ (nia)] and [Cu₂ (O₂CCH₃)₄ (nia)₂]. *Polyhedron*, 18(5), 755-762. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(98\)00350-7](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(98)00350-7)
 105. Labanauskas, L., Udrenaite, E., Gaidelis, P., Brukštus, A. (2004.): Synthesis of 5-(2-, 3-and 4-methoxyphenyl)-4H-1, 2, 4-triazole-3-thiol derivatives exhibiting anti-inflammatory activity. *II Farmaco*, 59(4), 255-259. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2003.11.002>
 106. Le Clerc, V. A. L. É. R. I. E., Briard, M., Crops, R. A. (2020.): Carrot disease management. *Carrots and related Apiaceae crops*, 33, 115-129.
 107. Lee, H. M., Andrys, R., Jonczyk, J., Kim, K., Vishakantegowda, A. G., Malinak, D., Musilek, K. (2021.): Pyridinium-2-carbaldoximes with quinolinium carboxamide moiety are simultaneous reactivators of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by nerve agent surrogates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 437-449. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1869954>
 108. Legrand, F., Picot, A., Cobo-Díaz, J. F., Chen, W., Le Floch, G. (2017.): Challenges facing the biological control strategies for the management of *Fusarium* Head Blight of cereals caused by *F. graminearum*. *Biological control*, 113, 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.06.011>
 109. Lehner, M. S., de Paula Júnior, T. J., Del Ponte, E. M., Mizubuti, E. S., Pethybridge, S. J. (2017.): Independently founded populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from a tropical and a temperate region have similar genetic structure. *PLoS One*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173915>
 110. Lehoczki-Krsjak, S., Varga, M., Mesterházy, Á. (2015.): Distribution of prothioconazole and tebuconazole between wheat ears and flag leaves following

- fungicide spraying with different nozzle types at flowering. *Pest management science*, 71(1), 105-113. <https://doi.org/10.1002/ps.3774>
111. Lević, J. (2008.): Vrste roda *Fusarium*. Cicero. Beograd, Srbija.
 112. Li, H. R., J. G. Xiao, S. Q. Yan. (1993.): Biological control of rice sheath blight by *Bacillus cereus* R2, 101-105.
 113. Liang, Y., Wang, S., Jia, H., Yao, Y., Song, J., Dong, H., Huo, Z. (2022.): Pectin functionalized metal-organic frameworks as dual-stimuli-responsive carriers to improve the pesticide targeting and reduce environmental risks. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 219, 112796. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112796>
 114. Libert, M. A. (1837.): Plante cryptogamicae arduennae (Exsiccati) no. 326. *Published by the author*.
 115. Liu, S., Fu, L., Chen, J., Wang, S., Liu, J., Jiang, J., Chen, G. (2021). Baseline sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to metconazole and the analysis of cross-resistance with carbendazim, dimethachlone, boscalid, fluazinam, and fludioxonil. *Phytoparasitica*, 49, 123-130. <https://doi.org/10.1007/s12600-020-00867-8>
 116. López-Aranda, J. M., Domínguez, P., Miranda, L., de los Santos, B., Talavera, M., Daugovish, O., Medina, J. J. (2016.): Fumigant use for strawberry production in Europe: The current landscape and solutions. *International Journal of Fruit Science*, 16(sup1), 1-15. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1199995>
 117. Lucas, J. A., Hawkins, N. J., Fraaije, B. A. (2015.): The evolution of fungicide resistance. *Advances in applied microbiology*, 90, 29-92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
 118. Luo, B., Li, D., Zhang, A. L., Gao, J. M. (2018.): Synthesis, antifungal activities and molecular docking studies of benzoxazole and benzothiazole derivatives. *Molecules*, 23(10), 2457. <https://doi.org/10.3390/molecules23102457>
 119. M HOSNI, H. A. N. A. A., M ABDULLA, M. O. H. A. M. E. D. (2008.): Anti-inflammatory and analgesic activities of some newly synthesized pyridinedicarbonitrile and benzopyranopyridine derivatives. *Acta Pharmaceutica*, 58(2), 175-186. <https://doi.org/10.2478/v1007-008-0005-4>
 120. Malevu, N., Mbili, N. C., Nyoni, M., Magwaza, L. S. (2022.): Antagonistic microorganisms inhibited *Botrytis cinerea* of tomatoes *in vitro* and *in vivo*. In V

- International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits* 1349, 175-182. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2022.1349.24>
121. Marek, J., Malinak, D., Dolezal, R., Soukup, O., Pasdiorova, M., Dolezal, M., Kuca, K. (2015.): Synthesis and disinfection effect of the pyridine-4-aldoxime based salts. *Molecules*, 20(3), 3681-3696. <https://doi.org/10.3390/molecules20033681>
 122. Mathew, F., Harveson, R., Block, C., Gulya, T., Ryley, M., Thompson, S., Markell, S. (2020.): *Sclerotinia sclerotiorum* diseases of sunflower (white mold). *Plant Health Instructor*.
 123. May-De Mio, L. L., Luo, Y., Michailides, T. J. (2011.): Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. *Plant disease*, 95(7), 821-827. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0511>
 124. Mazumdar, P. (2021). *Sclerotinia* stem rot in tomato: a review on biology, pathogenicity, disease management and future research priorities. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(6), 1403-1431. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00509-z>
 125. Mboussi, S. B., Heu, A., Nsangou, A. N. K., Dooh, J. P. N., Ambang, Z. (2023). *In Vitro* Evaluation of the Antifungal Activity of Essential Oils of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon citratus* on Some Strains of *Sclerotinia sclerotiorum*, Agent Responsible for White Rot of Beans. *Agricultural Sciences*, 14(8), 1068-1086. <https://doi.org/10.4236/as.2023.148071>
 126. McDonald, M. R., Kooi, K. D. V., Westerveld, S. M. (2008.): Effect of foliar trimming and fungicides on apothecial number of *Sclerotinia sclerotiorum*, leaf blight severity, yield, and canopy microclimate in carrot. *Plant Disease*, 92(1), 132-136. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0132>
 127. McKinney, H. H. (1923.): INVESTIGATIONS OF THE ROSETTE DISEASE OF WHEAT AND ITS CONTROL ¹. *Journal of Agricultural Research*, 23(7-12), 771.
 128. Messing, R., & Brodeur, J. (2018.): Current challenges to the implementation of classical biological control. *BioControl*, 63(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9862-4>
 129. Mesterházy, A. (1978.): Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties. *Journal of Phytopathology*, 93(1), 12-25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1978.tb03632.x>

130. Meyer, S. (2022.): *Evaluating the Antagonistic Potential of Bacteria on Sclerotinia Sclerotiorum, Causal Agent of White Mould of Carrots* (Doctoral dissertation, Carleton University).
131. Miedaner, T., Cumagun, C. J. R., Chakraborty, S. (2008.): Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156(3), 129-139. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01394.x>
132. Mishra, R., Kumar, R., Kumar, S., Majeed, J., Rashid, M., Sharma, S. (2010.): Synthesis and in vitro antimicrobial activity of some triazole derivatives. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55(3), 359-362. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072010000300019>
133. Mohammed, H. F., Imara, D. A. (2023.): Evaluation of the Efficacy of Salicylic acid and Nicotinic acid to Control Collar Rot and Root Rot Caused by *Sclerotium rolfsii* and Enhance the Productivity of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) in Egypt. *Egyptian Journal of Botany*, 63(3), 931-950. <https://dx.doi.org/10.21608/ejbo.2023.187832.2231>
134. Muñoz Castellanos, L., Amaya Olivas, N., Ayala-Soto, J., De La O Contreras, C. M., Zermeño Ortega, M., Sandoval Salas, F., Hernández-Ochoa, L. (2020.): *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) and pepper (*Piper nigrum* L.) essential oils and functional extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1702037>
135. Ni, Y., Guo, Y.J., Wang, J., Xia, R.E., Wang, X.Q., Ash, G., Li, J.N. (2014.): Responses of physiological indexes and leaf epicuticular waxes of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Plant Pathology*, 63(1), pp.174-184. <https://doi.org/10.1111/ppa.12060>
136. O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., Geiser, D. M. (2013.): Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
137. Ojaghian, S., Wang, L., Zhang, J. Z., Xie, G. L. (2020). Inhibitory effect of Fungastop and Bion against carrot soft rot caused by *Sclerotinia*

- sclerotiorum*. *Phytoparasitica*, 48, 95-106. <https://doi.org/10.1007/s12600-019-00780-9>
138. Okungbowa, F. I., Shittu, H. O. (2012.): *Fusarium* wilts: An overview. *Environ. Res. J*, 6(2), 83-102.
 139. Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K. (2019.): Antifungal activity of essential oils on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Bortyitis cinerea*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 544-554.
 140. Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., Matic, S. (2021.): A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the mediterranean basin. *Agronomy*, 11(11), 2188. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112188>
 141. Paruch, K., Biernasiuk, A., Khylyuk, D., Paduch, R., Wujec, M., Popiolek, Ł. (2022.): Synthesis, biological activity and molecular docking studies of novel nicotinic acid derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2823. <https://doi.org/10.3390/ijms23052823>
 142. Patel, N. B., Shaikh, F. M. (2010.): New 4-thiazolidinones of nicotinic acid with 2-amino-6-methylbenzothiazole and their biological activity. *Scientia pharmaceutica*, 78(4), 753-766. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1009-15>
 143. Patel, R., Paliwal, P., Bhandari, A. (2017.): SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL SCREENING OF SOME IMIDAZOLIDINE DERIVATIVES OF ISONICOTINAMIDE. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 7(7), 150-153. <https://doi.org/10.22270/jddt.v7i7.1617>
 144. Patkowska, E., Mielniczuk, E., Jamiolowska, A., Skwaryło-Bednarz, B., & Błażewicz-Woźniak, M. (2020.): The Influence of *Trichoderma harzianum* Rifai T-22 and other biostimulants on rhizosphere beneficial microorganisms of carrot. *Agronomy*, 10(11), 1637. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111637>
 145. Paul, P. A., Bradley, C. A., Madden, L. V., Dalla Lana, F., Bergstrom, G. C., Dill-Macky, R., Ruden, K. (2018.): Effects of pre-and postanthesis applications of demethylation inhibitor fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in spring and winter wheat. *Plant disease*, 102(12), 2500-2510. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0466-RE>
 146. Paul, P. A., Lipps, P. E., Hershman, D. E., McMullen, M. P., Draper, M. A., & Madden, L. V. (2008.): Efficacy of triazole-based fungicides for *Fusarium* head

- blight and deoxynivalenol control in wheat: A multivariate meta-analysis. *Phytopathology*, 98(9), 999-1011. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-9-0999>
147. Pavlovskaya, N., Gneusheva, I., Solokhina, I., Ageeva, N. (2020.): The biological activity of subspecies *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*, the causative agent of fusarium wilt cucumber in vitro. In *BIO Web of Conferences*, 21, 00021. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202100021>
 148. Peltier, A. J., Bradley, C. A., Chilvers, M. I., Malvick, D. K., Mueller, D. S., Wise, K. A., Esker, P. D. (2012.): Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. *Journal of Integrated Pest Management*, 3(2), 1-7. <https://doi.org/10.1603/IPM11033>
 149. Peng, Y., Chang, J., Xiao, Z., Huang, J., Xu, T., Chen, S., Luo, H. (2022.): Synthesis and Antifungal Activity of Novel Tetrahydrogeranyl Quaternary Ammonium Salts. *Natural Product Communications*, 17(2). <https://doi.org/10.1177/1934578X221078452>
 150. Percival, D. C., Abbey, J., Lu, H., Harris, L. (2016.): Use of biofungicides to address conventional *Botrytis* blight control challenges in wild blueberry production. In *XI International Vaccinium Symposium 1180*, 241-248. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1180.32>
 151. Perczak, A., Gwiazdowska, D., Marchwińska, K., Juś, K., Gwiazdowski, R., Waśkiewicz, A. (2019.): Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds. *Archives of microbiology*, 201, 1085-1097. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01673-5>
 152. Pernak, J., Rogoza, J. (2000.): Synthesis of 3-substituted pyridinium salts. *Arkivoc*, 6, 889-904. <https://doi.org/10.3998/ARK.5550190.0001.606>
 153. Pidlypnyi, N., Kaul, S., Wolf, S., Drafz, M. H., Schmidt, A. (2014.): Syntheses and characterization of N-(indolyl) pyridinium salts and of their ylides. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 69(5), 605-614. <https://doi.org/10.5560/znb.2014-3324>
 154. Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C., Jenkinson, P. (2002.): Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 469-478. <https://doi.org/10.1023/A:1016010812514>

155. Prova, A., Akanda, A. M., Islam, S., Hossain, M. M. (2018.): Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum*, an emerging fungal pathogen causing blight in hyacinth bean (*Lablab purpureus*). *The plant pathology journal*, 34(5), 367. <https://doi.org/10.5423%2FPPJ.OA.02.2018.0028>
156. Prova, A., Akanda, A. M., Islam, S., Motaher Hossain, M. (2017.): First report of *Sclerotinia sclerotiorum* causing pod rot disease on okra in Bangladesh. *Canadian journal of plant pathology*, 39(1), 72-76. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1278723>
157. Purdy, L. (1979.): *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69(8), 875-880.
158. Qin, G., Zong, Y., Chen, Q., Hua, D., Tian, S. (2010.): Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.018>
159. Quesada-Ocampo L. (2015.): Botrytis gray mold of tomato. Botrytis Gray Mold of Tomato | NC State 629 Extension Publications (ncsu.edu)
160. Rabiey, M., Shaw, M. W. (2016.): Piriformospora indica reduces fusarium head blight disease severity and mycotoxin DON contamination in wheat under UK weather conditions. *Plant Pathology*, 65(6), 940-952. <https://doi.org/10.1111/ppa.12483>
161. Rhouma, A., Hajji-Hedfi, L., Kouadri, M. E., Atallaoui, K., Matrood, A. A., Khriebe, M. I. (2023.): *Botrytis cinerea*: The cause of tomatoes gray mold. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 51(2), 68-75. <https://dx.doi.org/10.21608/ejp.2023.224842.1101>
162. Rojas, E. C., Jørgensen, H. J., Jensen, B., Collinge, D. B. (2018.): *Fusarium* diseases: biology and management perspectives. *Integrated disease management of wheat and barley*. Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge. <https://doi.org/10.19103/AS, 2>.
163. Rollins, J. A., Dickman, M. B. (2001.): pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. *Applied and environmental microbiology*, 67(1), 75-81. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.75-81.2001>
164. Rowe, P. (2015). *Essential statistics for the pharmaceutical sciences*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119109075>

165. Sadak, M. S., Rady, M. M., Badr, N. M., Gaballah, M. S. (2010.): INCREASING SUNFLOWER SALT TOLERANCE USING NICOTINAMIDE AND α -TOCOPHEROL. *International Journal of Academic Research*, 2(4).
166. Saharan, G. S., Mehta, N. (2008.): *Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management*. Springer Science & Business Media.
167. Şahin, İ., Özgeriş, F. B., Köse, M., Bakan, E., Tümer, F. (2021.): Synthesis, characterization, and antioxidant and anticancer activity of 1, 4-disubstituted 1, 2, 3-triazoles. *Journal of Molecular Structure*, 1232, 130042. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130042>
168. Saini, M., Das, R., Mehta, D. K. (2022.): Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Substituted Oxadiazole-Pyridazin-3-One Derivatives as Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Anti-Infective Agents*, 20(4), 36-45. <https://doi.org/10.2174/2211352520666220317142519>
169. Sarven, M. S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., & Xiao, X. (2020.): Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Pathogens*, 9(3), 213. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>
170. SAS Enterprise Guide 7.1 (2014.). Institute, Cary, NC, USA
171. SAS® 9.4 Statistical Software (2017.) SAS Institute, Cary, NC, USA
172. Sattar, S., Martinez, M. T., Ruiz, A. F., Hanna-Rose, W., Thompson, G. A. (2019.): Nicotinamide inhibits aphid fecundity and impacts survival. *Scientific reports*, 9(1), 19709. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55931-z>
173. Sauve, A. A. (2008.): NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 883-893. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.120758>
174. Schumacher, J. (2017.): How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genetics and Biology*, 106, 26-41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.002>
175. Shaabani, A., Hooshmand, S. E. (2016.): Choline chloride/urea as a deep eutectic solvent/organocatalyst promoted three-component synthesis of 3-aminoimidazo-fused heterocycles via Groebke–Blackburn–Bienayme process. *Tetrahedron Letters*, 57(3), 310-313. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.12.014>

176. Sharma, P. C., Jain, S. (2008.): Synthesis and in vitro antibacterial activity of some novel N-nicotinoyl-1-ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-7-piperazin-1-yl-4-oxoquinoline-3-carboxylates. *Acta Pol Pharm*, 65, 551-556.
177. Shaw, M. W., Emmanuel, C. J., Emilda, D., Terhem, R. B., Shafia, A., Tsamaidi, D., Van Kan, J. A. (2016.): Analysis of cryptic, systemic *Botrytis* infections in symptomless hosts. *Frontiers in Plant Science*, 7, 625. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00625>
178. Siber, T., Bušić, V., Zobundžija, D., Roca, S., Vikić-Topić, D., Vrandečić, K., Gašo-Sokač, D., (2019.): An Improved Method for the Quaternization of Nicotinamide and Antifungal Activities of Its Derivatives. *Molecules*, 24(6), 1001. <https://doi.org/10.3390/molecules24061001>
179. Sidiq, Y., Nakano, M., Mori, Y., Yaeno, T., Kimura, M., Nishiuchi, T. (2021.): Nicotinamide effectively suppresses fusarium head blight in wheat plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2968. <https://doi.org/10.3390/ijms22062968>
180. Singh, B. S., Lobo, H. R., Pinjari, D. V., Jarag, K. J., Pandit, A. B., Shankarling, G. S. (2013.): Ultrasound and deep eutectic solvent (DES): A novel blend of techniques for rapid and energy efficient synthesis of oxazoles. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.06.003>
181. Singh, D. (1991.): Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Trichoderma harzianum*. *International Journal of Pest Management*, 37(4), 374-378. <https://doi.org/10.1080/09670879109371617>
182. Singh, K., Kumar, Y., Puri, P., Sharma, C., & Aneja, K. R. (2011). Metal-Based Biologically Active Compounds: Synthesis, Spectral, and Antimicrobial Studies of Cobalt, Nickel, Copper, and Zinc Complexes of Triazole-Derived Schiff Bases. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2011(1), 901716. <https://doi.org/10.1155/2011/901716>
183. Singh, R., Caseys, C., Kliebenstein, D. J. (2024.): Genetic and molecular landscapes of the generalist phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 25(1), 13404. <https://doi.org/10.1111/mpp.13404>
184. Smolińska, U., Kowalska, B. (2018.): Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*—a review. *Journal of Plant Pathology*, 100, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0023-0>

185. Srivastava, S. K., Tripathi, R. P., Ramachandran, R. (2005.): NAD⁺-dependent DNA ligase (Rv3014c) from *Mycobacterium tuberculosis*: crystal structure of the adenylation domain and identification of novel inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30273-30281. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503780200>
186. Stepanić, A., Stanković, S., Lević, J., Ivanović, M., Krnjaja, V. (2011.): Fusariotoxins in wheat grain in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 26(4), 317-323. <http://dx.doi.org/10.2298/PIF1104317S>
187. Stević, M. (2020.): Fungicidi. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 216.
188. Summerell, B. A. (2019.): Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annual review of phytopathology*, 57, 323-339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>
189. Surendra Kumar, R. K., Idhayadhulla, A., Nasser, J. A. (2011.): Synthesis of some new series of Mannich base derivatives and their antimicrobial activity. *Orbital-The Electronic Journal of Chemistry*, 3(1), 32-38.
190. Tcherniuk, S. O., Chesnokova, O., Oleinikov, I. V., Oleinikov, A. V. (2017.): Nicotinamide inhibits the growth of *P. falciparum* and enhances the antimalarial effect of artemisinin, chloroquine and pyrimethamine. *Molecular and biochemical parasitology*, 216, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.06.004>
191. Tekiner, N., Tozlu, E., Kotan, R., Dadaşoğlu, F. (2020.): Biological control of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* with bioagent bacteria and fungi under in vitro conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 29(1), 640-649.
192. Thomas, A. B., Nanda, R. K., Kothapalli, L. P., Deshpande, A. D. (2011.): Synthesis and antimicrobial activity of N-[2-(aryl/substituted aryl)-4-oxo-1, 3-thiazolidin-3-yl] pyridine-4-carboxamide. *Journal of the Korean Chemical Society*, 55(6), 960-968. <https://doi.org/10.5012/jkcs.2011.55.6.960>
193. Timofte, A. A., Florea, A. M., Lipşa, F. D., Ulea, E. (2018.): Essential oils and homemade fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* tomato pathogen.
194. Tot, A., Vrandečić, K., Ćosić, J., Matić, M., Vraneš, M. (2022.): Influence of side-chain length on antifungal efficacy of N-alkyl nicotinamide-based compounds. *Environmental science and pollution research*, 29(47), 71742-71751. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20873-z>

195. Utkhede, R. S., Mathur, S. (2006.): Preventive and curative biological treatments for control of *Botrytis cinerea* stem canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, 51(3), 363-373. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-4239-5>
196. Van Becelaere, G., Miller, J. F. (2004.): Combining ability for resistance to *Sclerotinia* head rot in sunflower. *Crop science*, 44(5), 1542-1545. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1542>
197. Van Kan, J. A., Shaw, M. W., Grant-Downton, R. T. (2014.): *Botrytis* species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue?. *Molecular Plant Pathology*, 15(9), 957-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12148>
198. Veloso, J., van Kan, J. A. (2018.): Many shades of grey in *Botrytis*–host plant interactions. *Trends in plant science*, 23(7), 613-622. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.016>
199. Verdeguer, M., Sánchez-Moreiras, A. M., Araniti, F. (2020.): Phytotoxic effects and mechanism of action of essential oils and terpenoids. *Plants*, 9(11), 1571. <https://doi.org/10.3390/plants9111571>
200. Wagacha, J. M., Muthomi, J. W. (2007.): *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop protection*, 26(7), 877-885. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.003>
201. Wakefield, E. M. (1924.): On the names *Sclerotinia sclerotiorum* (bib.) Massee and *S. libertiana* Puokel. *Phytopathology*, 14(2).
202. Walcourt, A., Loyevsky, M., Lovejoy, D. B., Gordeuk, V. R., Richardson, D. R. (2004.): Novel aroylhydrazones and thiosemicarbazones iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and-sensitive parasites. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(3), 401-407. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00248-6)
203. Wang KaiBo, W. K., Pu Te, P. T., Luo Yan, L. Y., Jiang ShanShan, J. S., Fan LiMing, F. L., Su FaWu, S. F., Ye Min, Y. M. (2018.): The synthesis and antifungal activity of nicotinamide derivatives.
204. Wang, H., Hwang, S. F., Eudes, F., Chang, K. F., Howard, R. J., Turnbull, G. D. (2006.): Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant pathology*, 55(2), 224-230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01339.x>

205. Wang, L. Y., Xie, Y. S., Cui, Y. Y., Xu, J., He, W., Chen, H. G., Guo, J. H., (2015.): Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against *Fusarium* root rot and *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 177, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.005>
206. Wang, L., Li, C., Zhang, Y., Qiao, C., Ye, Y. (2013.): Synthesis and biological evaluation of benzofuroxan derivatives as fungicides against phytopathogenic fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(36), 8632-8640. <https://doi.org/10.1021/jf402388x>
207. Wang, W., Liu, X. J., Lin, G. T., Wu, J. P., Xu, G., Xu, D. (2022.): Novel *N*-(1*H*-Pyrazol-5-yl) nicotinamide Derivatives: Design, Synthesis and Antifungal Activity. *Chemistry & Biodiversity*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202101032>
208. Wang, X., Chen, Y. F., Yan, W., Cao, L. L., Ye, Y. H. (2016.): Synthesis and biological evaluation of benzimidazole phenylhydrazone derivatives as antifungal agents against phytopathogenic fungi. *Molecules*, 21(11), 1574. <https://doi.org/10.3390/molecules21111574>
209. Wang, Y., Lu, N., Wang, K., Li, Y., Zhang, M., Liu, S., Zhou, F. (2023.): Fluxapyroxad resistance mechanisms in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 107(4), 1035-1043. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-22-1615-RE>
210. Wei, Z. C., Wang, Q., Min, L. J., Bajsa-Hirschel, J., Cantrell, C. L., Han, L., Liu, X. H. (2022.): Synthesis and pesticidal activity of new niacinamide derivatives containing a flexible, chiral chain. *Molecules*, 28(1), 47. <https://doi.org/10.3390/molecules28010047>
211. Wen, F., Zhang, H., Yu, Z., Jin, H., Yang, Q., Hou, T. (2010.): Design, synthesis, and antifungal/insecticidal evaluation of novel nicotinamide derivatives. *Pesticide biochemistry and physiology*, 98(2), 248-253. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.06.015>
212. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
213. Williams, J. R., Stelfox, D. (1980.): Influence of farming practices in Alberta on germination and apothecium production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2(3), 169-172. <https://doi.org/10.1080/07060668009501435>

214. Williamson, B., Duncan, G. H., Harrison, J. G., Harding, L. A., Elad, Y., Zimand, G. (1995.): Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 99(11), 1303-1310. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81212-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81212-4)
215. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J. A. (2007.): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
216. Wilson, R. A., Talbot, N. J. (2009.): Fungal physiology—a future perspective. *Microbiology*, 155(12), 3810-3815. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035436-0>
217. Wu, J., Kang, S., Luo, L., Shi, Q., Ma, J., Yin, J., Yang, S. (2013.): Synthesis and antifungal activities of novel nicotinamide derivatives containing 1, 3, 4-oxadiazole. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 64. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-64>
218. Wu, J., Kang, S., Song, B., Hu, D., He, M., Jin, L., Yang, S. (2012. a): Synthesis and antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* for novel hydrazone derivatives containing a pyridine moiety. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-28>
219. Wu, Q., Liu, C., Yang, J., Guan, A., Ma, H. (2017.): Design, synthesis, and herbicidal activity of novel quaternary ammonium salt derivatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.006>
220. Wu, Z., Hu, D., Kuang, J., Cai, H., Wu, S., Xue, W. (2012. b): Synthesis and Antifungal Activity of N-(Substituted pyridinyl)-1-methyl (phenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide Derivatives. *Molecules*, 17(12), 14205-14218. <https://doi.org/10.3390/molecules171214205>
221. Xu, J., Yan, D., Chen, Y., Cai, D., Huang, F., Zhu, L., Huang, Q. (2023.): Fungicidal activity of novel quinazolin-6-ylcarboxylates and mode of action on *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 79(9), 3022-3032. <https://doi.org/10.1002/ps.7477>
222. Xue, A. G., Chen, Y., Voldeng, H. D., Fedak, G., Savard, M. E., Längle, T., Harman, G. E. (2014.): Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Biological control*, 73, 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.010>

223. Yahaya, S. M., Fagwalawa, L. D., Lawan, M. (2015.): Influence of airborne and seed inoculum in the initiation of leaf, stem, and root infection by systemic *Botrytis cinerea* in lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 6(11).
224. Yan, Z., Yang, Z., Qiu, L., Chen, Y., Li, A., Chang, T., Jin, F. (2022.): Discovery of novel pyridine carboxamides with antifungal activity as potential succinate dehydrogenase inhibitors. *Journal of Pesticide Science*, 47(3), 118-124. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D22-017>
225. Yan, Z., Yu, B., Lan, X., Cui, X., Zhao, D., Qiu, L., Li, K. (2024.): Synthesis, bioactivity evaluation and theoretical study of nicotinamide derivatives containing diphenyl ether fragments as potential succinate dehydrogenase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1308, 138331. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138331>
226. Ye, Y. H., Ma, L., Dai, Z. C., Xiao, Y., Zhang, Y. Y., Li, D. D., Zhu, H. L. (2014.): Synthesis and antifungal activity of nicotinamide derivatives as succinate dehydrogenase inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(18), 4063-4071. <https://doi.org/10.1021/jf405437k>
227. Young, C. S., Clarkson, J. P., Smith, J. A., Watling, M., Phelps, K., Whipps, J. M. (2004.): Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathology*, 53(4), 387-397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01018.x>
228. Youssef, K., Roberto, S. R., de Oliveira, A. G. (2019.): Ultra-structural alterations in *Botrytis cinerea*—the causal agent of gray mold—treated with salt solutions. *Biomolecules*, 9(10), 582. <https://doi.org/10.3390/biom9100582>
229. Zemmouri, B., Lammoglia, S. K., Bouras, F. Z., Seghouani, M., Rebouh, N. Y., Latati, M. (2022.): Modelling human health risks from pesticide use in innovative legume-cereal intercropping systems in Mediterranean conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113590. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113590>
230. Zhang, Y. J., Yu, J. J., Zhang, Y. N., Zhang, X., Cheng, C. J., Wang, J. X., Zhou, M. G. (2009.): Effect of carbendazim resistance on trichothecene production and aggressiveness of *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(9), 1143-1150. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1143>

231. Zhang, Y., Zhu, M., Hu, K., Liu, X., Zou, Y., Chen, J. (2024.): Novel amide derivatives containing azetidine moiety as potential SDH inhibitors: Design, synthesis, and evaluation of bioactivity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 28(3), 101853. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2024.101853>
232. Zhang, Z., Zhang, J., Wang, Y., Zheng, X. (2005.): Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.057>
233. Zhao, L. X., Hu, J. J., Wang, Z. X., Yin, M. L., Zou, Y. L., Gao, S., Ye, F. (2020.): Novel phenoxy-(trifluoromethyl) pyridine-2-pyrrolidinone-based inhibitors of protoporphyrinogen oxidase: Design, synthesis, and herbicidal activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104684. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104684>
234. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., Lebeer, S. (2020.): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
235. Zhong, S., Zhang, J., Zhang, G. Z. (2019.): *Botrytis polyphyllae*: A new botrytis species causing gray mold on Paris polyphylla. *Plant disease*, 103(7), 1721-1727. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1284-RE>
236. Zhu, Y. C., Yuan, L. P., Cao, J., Shen, X., Lu, D. H., Ni, C. C., Zhang, Y. B. (2008.): Synthesis and bioactivity of 2-benzylsulfanyl nicotinamide derivatives. *Agrichemicals*, 10, 287-291
237. Zorbaz, T., Braiki, A., Maraković, N., Renou, J., de La Mora, E., Maček Hrvat, N., Renard, P. Y. (2018.): Potent 3-Hydroxy-2-Pyridine Aldoxime Reactivators of Organophosphate-Inhibited Cholinesterases with Predicted Blood–Brain Barrier Penetration. *Chemistry–A European Journal*, 24(38), 9675-9691. <https://doi.org/10.1002/chem.201801394>
238. Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Schäfer, R. B. (2019.): Fungicides: an overlooked pesticide class?. *Environmental science & technology*, 53(7), 3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>

- 239. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>
- 240. <https://www.europarl.europa.eu/news/en/press-room/20200109IPR69902/parliament-supports-european-green-deal-and-pushes-for-even-higher-ambitions>
- 241. <https://www.mycobank.org/>
- 242. <https://fis.mps.hr/fis/>

7. SAŽETAK

Uzročnici biljnih bolesti iz rodova *Fusarium*, *Botryotinia* i *Sclerotinia* imaju značajan utjecaj na poljoprivrednu proizvodnju, uzrokujući smanjenje prinosa i kvalitete usjeva. Njihova otpornost i patogenost čine njihovu kontrolu izazovnom. Razumijevanje biologije i ekologije ovih patogena ključno je za razvoj novih, učinkovitijih mjera zaštite. Kvaterni piridinijevi spojevi poput nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata manje su toksični i manje štetni za okoliš od komercijalnih fungicida.

Cilj istraživanja bio je ispitati antifungalno djelovanje ovih spojeva na *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*. U *in vitro* uvjetima, analizirano je njihovo djelovanje na porast micelija, vijabilnost konidija/sklerocija te rast kličnih cijevi pri koncentracijama od 10 i 100 µg/mL. Istraživanje je također uključilo *in vivo* testove na prirodnim supstratima (mrkva, pšenica, rajčica) za svakog patogena, kako bi se ispitalo antifungalno djelovanje odabranih spojeva.

Rezultati *in vitro* istraživanja su pokazali statistički značajno bolje antifungalno djelovanje na porast micelija *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* i *B. cinerea* u usporedbi s kontrolnim uvjetima (čisti KDA), neovisno o vremenu inkubacije i primijenjenoj koncentraciji. Protiv patogena *F. culmorum*, koncentracija od 100 µg/mL bila je najučinkovitija za nikotinamidne spojeve, dok je antifungalno djelovanje izonikotinamidnih spojeva bilo neovisno o koncentraciji. Analizom varijance ($p \leq 0,05$) potvrđeno je značajno inhibitorno djelovanje nikotinamidnih i izonikotinamidnih derivata na klijavost konidija gljive *B. cinerea*. Utvrđena je statistički značajna razlika u inhibiciji rasta kličnih cijevi konidija *B. cinerea* primjenom različitih koncentracija derivata nikotinamida i izonikotinamida. Većina spojeva pokazuje statistički značajno bolju inhibiciju klijavosti konidija pri nižoj koncentraciji 10 µg/mL. Statistički značajno bolja razlika u inhibiciji rasta kličnih cijevi konidija *B. cinerea* također je potvrđena pri nižoj koncentraciji. Većina spojeva iz obje serije pokazala je bolju inhibiciju pri nižoj primijenjenoj koncentraciji (10 µg/mL). Rezultati ukazuju na potrebu za daljnjom optimizacijom koncentracija pojedinih spojeva kako bi se postiglo maksimalno antifungalno djelovanje.

Inhibitorno djelovanje derivata nikotinamida i izonikotinamida spojeva na klijavost sklerocija patogena *S. sclerotiorum* ovisi o koncentraciji primjene. Veće koncentracije (100 µg/mL) pokazale su bolje inhibitorno djelovanje. Rezultati *in vivo* testova na rajčici nisu pokazali potpunu inhibiciju porasta micelija nikotinamidnih piridinijevih spojeva pri

koncentraciji od 100 µg/mL. Spoj (12) se istaknuo sa najboljim antifungalnim djelovanjem od svih primijenjenih spojeva, ali se niti on nije statistički značajno razlikovao od kontrolnih varijanti. Rezultati *in vivo* testa na mrkvi potvrdili su da niti jedan od testiranih nikotinamidnih piridinijevih spojeva pri koncentraciji od 10 µg/mL nije potpuno inhibirao porast micelija patogena *S. sclerotiorum*. Većina spojeva je pokazala statistički značajno bolje antifungalno djelovanje u usporedbi s kontrolnom varijantom (destilirana voda).

Nikotinamidni derivati (8), (9), i (10) te izonikotinamidni derivat (12) pokazali su podjednako djelovanje na porast micelija patogena *S. sclerotiorum* kao i komercijalni fungicid. Spojevi (8) i (9) pokazali podjedanko djelovanje na porast micelija *B. cinerea* kao i komercijalni fungicid. Najbolje antifungalno djelovanje primijenjenih kvaternih piridinijevih soli na porast micelija potvrđeno je za patogene *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*. Patogen *F. culmorum* pokazao je najmanju osjetljivost na sve primijenjene spojeve. Općenito, rezultati potvrđuju da kvaterne piridinijeve soli imaju potencijal u borbi sa biljnim patogenima, ali s različitim razinama učinkovitosti. Antifungalno djelovanje spojeva koji se statistički nisu značajno razlikovali od komercijalnog fungicida ukazuje na potencijal razvoja novih ekološki prihvatljivijih fungicida, što zahtijeva daljnju optimizaciju radi postizanja sigurne i učinkovite primjene.

8. SUMMARY

The pathogens that cause plant diseases of the genera *Fusarium*, *Botryotinia*, and *Sclerotinia* considerably impact agricultural production and lead to losses in yield and quality. Their resistance and pathogenicity make their control a challenge. Understanding the biology and ecology of these pathogens is crucial for developing new, more effective protective measures. Quaternary pyridinium compounds, such as nicotinamide and isonicotinamide derivatives, are less toxic and less harmful to the environment than commercially available fungicides.

The study aimed to investigate the antifungal activity of these compounds against *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *S. sclerotiorum*, and *B. cinerea*. Under *in vitro* conditions, their effects on mycelial growth, conidial/sclerotial viability, and germ tube growth were analyzed at 10 and 100 µg/ml concentrations. The study also included *in vivo* tests on natural substrates (carrot, wheat, tomato) for each pathogen to evaluate the antifungal activity of the selected compounds.

The results of the *in vitro* study showed a statistically significant improvement in antifungal activity against mycelial growth of *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, and *B. cinerea* compared to the control conditions (pure PDA), regardless of the incubation time and the concentration used. For the pathogen *F. culmorum*, the concentration of 100 µg/mL was most effective for the nicotinamide compounds, while the antifungal activity of the isonicotinamide compounds was independent of the concentration. Analysis of variance ($p \leq 0.05$) confirmed a significant inhibitory effect of nicotinamide and isonicotinamide derivatives on the germination of *B. cinerea* conidia. A statistically significant difference was found in the inhibition of germ tube growth of *B. cinerea* conidia when different concentrations of nicotinamide and isonicotinamide compounds were applied. Most compounds showed statistically significant better inhibition of conidia germination at the lower concentration of 10 µg/mL. A statistically significant improvement in the inhibition of germ tube growth of *B. cinerea* was also confirmed at the lower concentration. Most compounds from both series showed better inhibition at the lower concentration (10 µg/mL). The results indicate that the concentrations of the individual compounds need to be further optimized to achieve maximum antifungal activity.

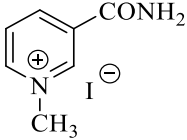
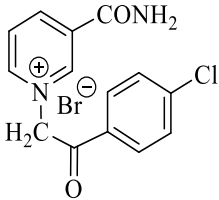
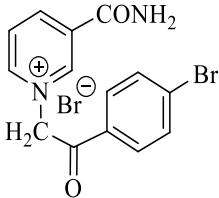
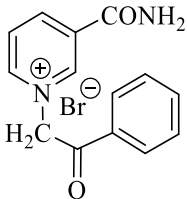
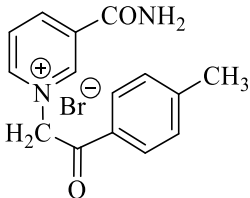
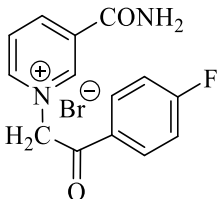
The inhibitory effect of nicotinamide and isonicotinamide compounds on the germination of *S. sclerotiorum* sclerotia depends on the concentration used. Higher concentrations (100

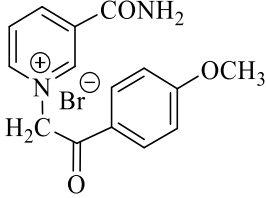
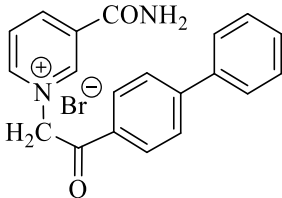
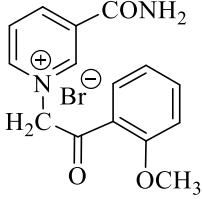
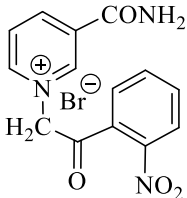
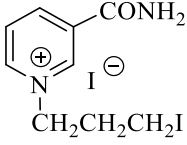
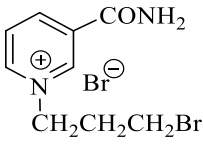
µg/mL) showed a better inhibitory effect. The results of in vivo tests on tomatoes showed no complete inhibition of mycelial growth by nicotinamide derivatives at a 100 µg/mL concentration. The compound (12) was characterized by the best antifungal activity among all compounds used but was not statistically significantly different from the control variants. The in vivo test results on carrots confirmed that none of the nicotinamide pyridinium compounds tested at 10 µg/mL wholly inhibited the mycelial growth of the *S. sclerotiorum* pathogen. Most compounds showed significantly better antifungal activity than the control variant (distilled water).

The nicotinamide compounds (8), (9), and (10), as well as the isonicotinamide compound (12), showed a comparable effect on mycelial growth of the pathogen *S. sclerotiorum* as the commercial fungicide. The compounds (8) and (9) showed a similar effect on the mycelial growth of *B. cinerea* as the commercial fungicide. The best antifungal activity of the quaternary pyridinium salts against mycelial growth was confirmed for *S. sclerotiorum* and *B. cinerea*. The pathogen *F. culmorum* showed the lowest sensitivity to all compounds used. Overall, the results confirm that quaternary pyridinium salts have the potential to control plant pathogens but with varying degrees of efficacy. The antifungal activity of the compounds, which was not statistically significantly different from the commercial fungicide, indicates the potential for developing new, more environmentally friendly fungicides that need to be further optimized for safe and effective use.

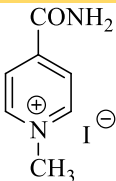
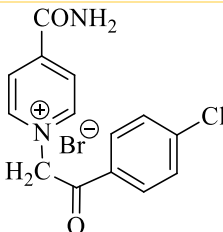
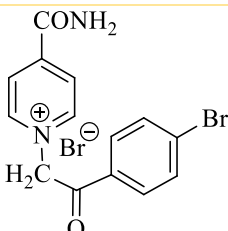
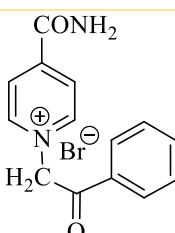
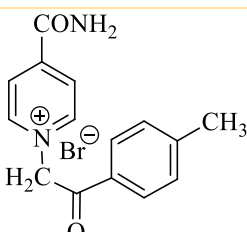
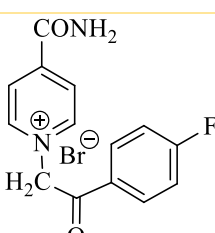
9. PRILOG

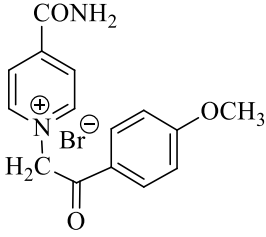
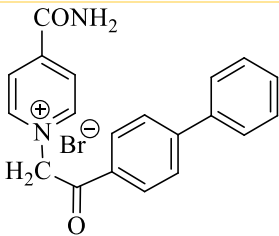
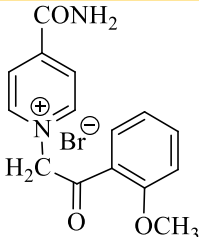
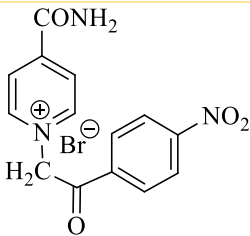
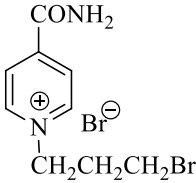
Tablica 3. Struktura ispitanih derivata nikotinamida

Spoj	Struktura
(1) 3-karbamoil-1-metilpiridinijev jodid	 1.
(2) 3-karbamoil-1-(2-(4-klorfenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(3) 1-(2-(4-bromfenil)-2-oksoetil)-3-karbamoilpiridinijev bromid	
(4) 1-(2-fenil-2-oksoetil)-3-karbamoilpiridinijev bromid	
(5) 3-karbamoil-1-(2-(4-metilfenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(6) 1-(2-(4-fluorfenil)-2-oksoetil)-3-karbamoil-piridinijev bromid	

(7) 3-karbamoil-1-(2-(4-metoksifenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(8) 1-(2-([1,1'-Bifenil]-4-il)-2-oksoetil)-3-karbamoilpiridinijev bromid	
(9) 3-karbamoil-1-(2-(2-metoksifenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(10) 3-karbamoil-1-(2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(11) 1-(3-jodpropil)-3-karbamoilpiridinijev jodid	 2.
(12) 1-(3-brompropil)-3-karbamoilpiridinijev bromid	 3.

Tablica 4. Struktura ispitanih izonikotinamidnih derivata

Spoj	Struktura
(1) 4-karbamoil-1-metilpiridinijev jodid	
(2) 4-karbamoil-1-(2-(4-klorfenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(3) 1-(2-(4-bromfenil)-2-oksoetil)-4-karbamoilpiridinijev bromid	
(4) 1-(2-fenil-2-oksoetil)-4-karbamoilpiridinijev bromid	
(5) 4-karbamoil-1-(2-(4-metilfenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(6) 1-(2-(4-fluorfenil)-2-oksoetil)-4-karbamoilpiridinijev bromid	

(7) 4-karbamoil-1-(2-(4-metoksifenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(8) 1-(2-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-oksoetil)-4-karbamoilpiridinijev bromid	
(9) 4-karbamoil-1-(2-(2-metoksifenil)-2-oksoetil)piridinijev bromid	
(10) 4-karbamoil-1-[2-(4-nitrofenil)-2-oksoetil]piridinijev bromid	
(12) 1-(3-brompropil)-4-karbamoilpiridinijev bromid	

ŽIVOTOPIS

Tamara Siber (rođ. Brekalo) rođena je 21. rujna 1989. godine u Osijeku. Osnovnu školu završila je u Čepinu, a II. gimnaziju u Osijeku 2008. godine. Iste godine upisuje sveučilišni preddiplomski studij na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, smjer zootehnika. Godine 2012. upisuje diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, smjer Vinogradarstvo i vinarstvo, koji završava u studenom 2014. godine. Fakultetsko vijeće Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek odobrava joj paralelan upis na drugi diplomski studij, te u listopadu 2014. započinje studij smjera Zaštita bilja, koji završava u rujnu 2017. godine s prosječnom ocjenom 4,93. U veljači 2016. godine završila je program Pedagoško-psihološko-didaktičko-metodičke izobrazbe na Filozofskom fakultetu u Osijeku. Od 19. srpnja 2018. godine zaposlena je kao asistentica na Katedri za fitopatologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. U akademskoj godini 2018./2019. upisuje poslijediplomski doktorski studij Poljoprivrednih znanosti, smjer Zaštita bilja.

Sudjeluje u izvođenju nastave na sljedećim modulima: Fitopatologija I“, „Zaštita bilja u ekološkoj proizvodnji“, „Parazitski uzročnici povrća i cvijeća“, „Bolesti ratarskih kultura“, „Fitopatologija II“, „Zaštita od bolesti i štetnika u vinogradarstvu“, „Zaštita od bolesti i štetnika u voćarstvu“, „Zaštita bilja II – praksa“ i „Osnove bakteriologije i virologije“.

Sudjelovala je kao suradnik na stručnom projektu HarISA (Harmonization and Innovation in PhD Study Programs for Plant Health in Sustainable Agriculture) u sklopu kojega je boravila na stručnom usavršavanju na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Kao student poslijediplomskog dokorskog studija, aktivno je sudjelovala u Erasmus projektu EURO-PLANT-ACT (*Cooperation to Implement Innovative Methods for the Assessment of Medicinal Plants with Central Roles in Pharmaceuticals, Agriculture and Nutrition*). Također, angažirana je u projektu INNO-SAFE-LIFE (*Partnership for innovation on the exchange of best practices and the design of joint collaborative initiatives at European level related to the awareness of the effects of contamination on human health*). Članica je Hrvatskog društva biljne zaštite (HDBZ).

Kao autor ili koautor objavila je sedam (7) znanstvenih radova u kategoriji A1, dva (2) u kategoriji A2, četiri (4) u kategoriji A3 (zbornici radova), dva (2) sažetka u zbornicima skupova te jedan (1) stručni rad.