
Dragan Jevtić

Ispitivanje antifungalne aktivnosti petroletarskih i metanolnih ekstrakata mahovina *Hypnum cupressiforme* Hedw. i *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort.

*Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi prisustvo biološki aktivnih materija mahovina *Hypnum cupressiforme* Hedw. i *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort i njihov uticaj na rast fitopatogenih gljiva *Alternaria cheiranthi* Lib, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Aspergillus fumigatus* Fres i *Fusarium latericium* Nees. Biljni materijal (usitnjene i osušene mahovine) je ekstrahovan petroletrom i metanolom. Svi petroletarski ekstrakt je za dalje analize rastvaran u petroletru, a metanolni u sterilnoj vodovodnoj vodi. Efekat ekstrakata na rast gljiva ispitivan je diskdifuznom metodom. Ekstrakti mahovine *Hypnum cupressiforme* nisu imali efekta ni na jednu ispitivanu vrstu gljiva. Petroletarski ekstrakti mahovine *Pellia endiviifolia* pokazali su inhibitoran efekat na gljive *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus* i *Fusarium latericium*, dok su metanolni ekstrakti iste uticali na smanjen rast gljiva *Rhizoctonia solani* i *Aspergillus fumigatus*.*

Uvod

Mahovine su po redu druga najveća grupa biljaka, odmah posle cvetnica. Broje oko 28000 vrsta i dele se u tri klase: Anthocerotopsida, Marchantiopsida (jetrenjače) i Bryopsida (prave mahovine). Fitohemija mahovina je dugo bila nepoznata, uglavnom zato što ih je teško determinisati i sakupiti dovoljnu količinu materijala za biohemijska ispitivanja (Asakawa 2001). Smatra se da ljudima nisu od koristi i pored primera njihove upotrebe u narodnoj medicini (Kumar *et al.* 2000). Poznato je da su veoma bogate terpenoidima, fenolima, glikozidima i masnim kiselinama, ali i nekim retkim aromatičnim jedinjenjima (Sabovljević, Bjelović, Grubišić 2001).

Biološka aktivnost mahovina može se posmatrati kao antibakterijska, antifungalna, citotoksična, antitumorska, vazopresin-antagonistička, kardiotonična, insekticidna, moluscidna, piscidna. Ona se može ogledati u regulaciji rasta biljaka, izazivanju alergija, kao i u inhibiciji aktivnosti slobodnog radikala superoksidnog anjona (Asakawa 1999).

*Dragan Jevtić (1984),
Novi Sad, Bul.
Jovana Dučića 13,
učenik 3. razreda
Gimnazije "Jovan
Jovanović Zmaj" u
Novom Sadu*

Hypnum cupressiforme Hedw. je jedna od najčešćih pravih mahovina. Sreće se u šumama različitih tipova, parkovima, baštama. Raste na kamenu, zemlji i trulom drvetu. Podataka o njenom hemijskom sastavu uglavnom nema, verovatno zato što se smatra da ne poseduje veliki broj bioaktivnih materija.

Pellia endiviifolia (Dicks.) Dumort. pripada klasi jetrenjača. Kao i sve ostale jetrenjače, poseduje masna tela izgrađena iz lipofilnih terpenoida i aromatičnih jedinjenja. Postoje jedinjenja izolovana iz ove mahovine koja pokazuju citotoksičnu aktivnost. Za sada je utvrđeno da ova mahovina pokazuje i antibakterijsku i piscidalnu aktivnost (Asakawa 1999).

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi prisustvo biološki aktivnih materija mahovina *Hypnum cupressiforme* i *Pellia endiviifolia*, pre svega antifungalnih, i njihov uticaj na rast fitopatogenih gljiva *Alternaria cheiranthi* Lib, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Aspergillus fumigatus* Fres i *Fusarium latericium* Nees.

Materijal i metode

Biljni materijal

Biljni materijal (mahovine *Hypnum cupressiforme* i *Pellia endiviifolia*) sakupljan je u okolini Istraživačke stanice Petnica 6. jula 2002. godine. Ubrani biljni materijal osušen je na sobnoj temperaturi od 30-35°C (letnji period), na tamnom i promajnom mestu. Materijal je usitnjavao neposredno pred analizu.

Ekstrakcija biljnog materijala

Biljni materijal je ekstrahovan petroletrom (odnos droge i rastvarača 1:20) u erlenmajerima. Ekstrakcija je vršena u toku 48 h, na sobnoj temperaturi, uz često mućkanje (postupak maceracije). Petroletarski ekstrakt je zatim profiltriran i uparen na rotacionom evaporatoru pod sniženim pritiskom. Droga je nakon ekstrakcije petroletrom prelivena 70% metanolom (odnos 1 : 20) i ekstrahovana 48 h na sobnoj temperaturi, uz često mućkanje. Metanolni ekstrakt je zatim profiltriran i uparen na rotacionom evaporatoru pod sniženim pritiskom.

Tabela 1. Koncentracije osnovnih rastvora ekstrakata

Mahovine	Ekstrakt	
	petroletarski ekstrakt	metanolni ekstrakt
<i>Hypnum</i>	0.0226 g/mL	0.0173 g/mL
<i>Pellia</i>	0.0276 g/mL	0.032 g/mL

Suvi petroletarski ekstrakt je rastvoren u petroletru, a metanolni u sterilnoj vodovodnoj vodi. Tako su pripremljeni osnovni rastvori od kojih su dalje pripremana odgovarajuća razblaženja (2×, 3×). Koncentracije osnovnih rastvora date su u tabeli 1.

Korišćene kulture gljiva

U ovom radu korišćene su fitopatogene gljive *Alternaria cheiranthi*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus* i *Fusarium latericium*. *Alternaria cheiranthi* je gljiva koja parazitira na kukuruzu. Preko mladog korena ulazi u biljku i izaziva truljenje. *Aspergillus fumigatus* je gljiva koja parazitira na kukuruzu. *Rhizoctonia solani* je parazit krompira. Parazitira na krtoli. Njen micelijum obrazuje crnkaste pege na površini krtole. Značajno umanjuje prinos krompira, i do 10%. *Fusarium latericium* je fakultativni parazit kukuruza. Gljive iz roda *Fusarium* najčešće su prouzrokovali truleži klipa kukuruza.

Kulture ovih plesni su dobijene iz kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Gljive su presejavane iz kultura na kosi potatodekstroza agar i inkubirane 4 dana na temperaturi od 25°C, u cilju dobijanja mladih kultura.

Ispitivanje dejstva ekstrakata

Efekat ekstrakata mahovina na rast gljiva testiran je u petri posudama na potatodekstroza agar hranljivoj podlozi. Najpre su na hranljivoj podlozi zasejane gljive, a zatim postavljani diskovi od filter hartije prečnika 10 milimetara. Na diskove je naneto po 10 mL odgovarajućeg razblaženja. Nakon perioda inkubacije od 36 časova očitavaju se rezultati, odnosno mere zone inhibicije oko diskova.

Rezultati i diskusija

Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 2.

Ekstrakti mahovine *Hypnum cupressiforme* nisu imali efekta ni na jednu ispitivanu vrstu gljiva.

Inhibitorni efekat zabeležen je kod petroletarskog ekstrakta *Pellia-e* na tri ispitivane vrste gljiva (*Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus* i *Fusarium latericium*). Zona smanjenog rasta, ali ne i potpune inhibicije zabeležena je kod vodenog rastvora metanolnog ekstrakta na dve ispitivane vrste gljiva (*Rhizoctonia solani* i *Aspergillus fumigatus*).

Nijedan od ispitivanih ekstrakata nije imao efekat na gljivu *Alternaria cheiranthi*.

U literaturi ne postoji mnogo podataka o pojedinačnim hemijskim jedinjenjima izolovanim iz *Pellia-e*. Ispitivani su diterpenoidi i utvrđena je njihova citotoksična, piscicidna i antibakterijska aktivnost (Asakawa 2001).

Neki diterpenoidi izolovani iz gljiva (Anke et al. 2002) i morskih suštera (White, Wood 2001) imaju antifungalno dejstvo. Ne možemo tvrditi da u ovom slučaju to dejstvo pokazuju upravo diterpenoidi, a ne neka druga do sada neispitivana jedinjenja.

Tabela 2. Zabeležene zone inhibicije rasta u milimetrima

Ekstrakt	Mahovina	Konc. [g/mL]	Ispitivane gljive			
			<i>A. cheir.</i>	<i>R. sol.</i>	<i>A. fum.</i>	<i>F. later.</i>
Petroletarski ekstrakt	<i>Hypnum</i>	0.0226	0	0	0	0
		0.0113	0	0	0	0
		0.0075	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	<i>Pellia</i>	0.0276	0	12	13	16
		0.0138	0	0	12	0
		0.0092	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Metanolni ekstrakt	<i>Hypnum</i>	0.0173	0	0	0	0
		0.0086	0	0	0	0
		0.0058	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
	<i>Pellia</i>	0.032	0	15*	14*	0
		0.016	0	11*	0	0
		0.011	0	14*	0	0
		0	0	0	0	0

* – podatak se odnosi na zonu smanjenog rasta; potpuna inhibicija nije zabeležena

Ranije je utvrđeno da su gljive *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus*, kao i *Alternaria kikuchiana* osetljive na biološke aktivne materije bisbibenzilnog tipa izolovane iz jetrenjače roda *Marchantia* (Asakawa 2001). Ukoliko u *Pellia*-i postoje jedinjenja ovog tipa, ona mogu biti uzrok antifungalnoj aktivnosti.

Zaključak

Ekstrakti mahovine *Hypnum cupressiforme* nisu imali efekta ni na jednu ispitivanu vrstu gljiva. Petroletarski ekstrakti mahovine *Pellia endiviifolia* pokazali su inhibitoran efekat na gljive *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus* i *Fusarium latericium*, dok su metanolni ekstrakti iste uticali na smanjen rast gljiva *Rhizoctonia solani* i *Aspergillus fumigatus*.

Dalja istraživanja treba usmeriti u pravcu izolacije pojedinačnih hemijskih jedinjenja i ispitivanja antifungalnog dejstva svakog od njih zasebno. Tek tada će se sa sigurnošću moći utvrditi koja jedinjenja deluju antifungalno i iz kojih razloga.

Literatura

- Asakawa Y. 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes – acetogenins, terpenoids and bis (bibenzyl)s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinian and European liverworts. *Phytochemistry*, **56**: 297
- Kumar K., Singh K. K., Asthana A.K., Nath V. 2000. Ethnotherapeutics of Bryophyte *Plagiochasma appendiculatum* among the Gaddi Tribes of Kangra Valley, Himachal Pradesh, India. *Pharmaceutical Biology*, **38**: 353
- Sabovljević M., Bijelović A., Grubišić D. 2001. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Lek. Sirov.*, XXI (21): 17
- Asakawa Y. 1999. Biologically active terpenoids and aromatic compounds from liverworts. In *Phytochemicals in Human Health Protection*. New York: Kluwer Academic, pp. 319-342
- Anke T., Rabe U., Schu P., Eizenhöfer T., Schrage M., Steglich W. 2001. Studies on the Biosynthesis of Striatal-Type Diterpenoids and the Biological Activity of Herical. *Z. Naturforsch.*, **57c**: 263
- White R.D., Wood J.L. 2001. Progress toward the Total Synthesis of Kahlhinane Diterpenoids. *Organic letters*, **3** (12): 1825-1827

Dragan Jevtić

Testing Antifungal Activity of Petrolether and Methanol Extracts of *Hypnum cupressiforme* Hedw. and *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort.

The aim of this project was to detect the presence of biologically active substances of Bryophytes *Hypnum cupressiforme* Hedw. and *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort. considering their influence on the growth of fungi *Alternaria cheiranthi* Lib, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Aspergillus fumigatus* Fres. and *Fusarium latericium* Nees. Plant material was extracted with petrolether (ratio of drug and solvent 1:20). Extraction was conducted through a 48 h period, on room temperature, with frequent mixing (maceration treatment). Petrolether extract was then filtrated and vaped at low pressure. After the extraction the drug was poured over with 70% methanol (ratio 1:20) and extracted on room temperature through a 48 h period, with frequent mixing. Methanol extract was then filtrated and vaped at

low pressure. Elementary solutions prepared in that way were later used to make appropriate solutions. Concentrations of elementary solutions are given in table 1. Antibioqram method was used to test the effect of these extracts on fungal growth. Extracts of the moss *Hypnum cupressiforme* showed no effect on any tested fungus. Petrolether extract of the liverwort *Pellia* showed the inhibition effect on the three tested species of fungus (*Rhizoctonia solani*, *Aspergillus fumigatus* i *Fusarium latericium*). Zone of decreased growth, but not total inhibition, was registered in a water solution of methanol extract on the two tested species of fungi (*Rhizoctonia solani* i *Aspergillus fumigatus*). Fungus *Alternaria cheiranthi* was not effected by any tested extract. Further research should be directed to isolation of chemical compounds of these Bryophytes and detecting the antifungal effect for each one. Then we could be sure which substances show antifungal effect and why.

