
Jana Počuča

Antifungalno dejstvo lisnog ekstrakta i ulja nima (*Azadirachta indica*) na gljivu *Heterobasidion annosum*

Poslednjih decenija primećeno je sušenje četinarskih, pretežno smrčinih šuma na prostoru nacionalnog parka Kopaonik. Ovaj degenerativni proces izazvan je nizom faktora, a jedan od osnovnih uzroka je gljiva *Heterobasidion annosum*. Ova vrsta je parazit četinara koji izaziva truljenje korena domaćina i smatra se ekonomski najznačajnijim šumskim patogenom na severnoj hemisferi. Smatra se da biljka nim (*Azadirachta indica*) ima stimulativno dejstvo na rast drugih biljaka, kao i kontraceptivno i repelentno dejstvo na potkornjake, koji mogu biti uzročnici sušenja šuma. Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje potencijalnog antifungalnog dejstva lisnog ekstrakta i ulja nima na *H. annosum*. Ispitivano je pet koncentracija etanolnog ekstrakta lista (1.4–22.5 mg/mL) i ulja (0.8–7.2%). Inhibicija rasta gljive pod uticajem ekstrakta i ulja praćena je na čvrstoj i u tečnoj podlozi, merenjem površine, odnosno biomase formirane micelije. Dobi-jene vrednosti procenta inhibicije rasta gljive na čvrstoj podlozi iznose do 85% za ekstrakt lista, i 80% za ulje. Razlike u inhibitornom dejstvu između korišćenih koncentracija nisu statistički značajne, što navodi na zaključak da i niže koncentracije mogu biti podjednako efektivne. Potvrđen je i inhibitorni efekat na produkciju biomase gljive. U tretmanu ekstraktom najviše koncentracije, produkcija biomase smanjena je za oko 65%.

Jana Počuča (2001)
Beograd, učenica 3.
razreda Prve
beogradska gimnazija

Uvod

Primeri sušenja šuma, koji su u poslednje vreme zabeleženi na svim kontinentima, omogućavaju početak sagledavanja globalnih obrazaca po kojima klimatske promene utiču na biodiverzitet (Allen 2009). Uticaj klimatskih promena se manifestuje, kako na globalnom nivou, tako i na šume u Srbiji (Stojanović *et al.* 2012). U poslednjih nekoliko decenija, sušenje četinarskih, pretežno smrčevih šuma je primećeno na prostoru Nacionalnog parka Kopaonik (Kesić *et al.* 2016). To je degenerativni proces uzrokovan nizom faktora. Pored suše i promene temperature kao osnovnih, zakišeljavanje tla, kao i zagađenje vazduha i invazija patogena su

MENTORKE:

Nevena Vukojičić,
Biološki fakultet
Univerziteta u
Beogradu

Dunja Pavlović,
student 3. godine
Biološkog Fakulteta
Univerziteta u
Beogradu

faktori koje takođe treba uzeti u obzir u istraživanjima ovog problema (Kesić *et al.* 2016).

Heterobasidion annosum (Fr.) Bref. je gljiva koja uzrokuje velike ekonomske štete u četinarskim šumama širom sveta i jedan je od uzročnika sušenja šuma (Keča 2008). Ovaj predstavnik razdela Basidiomycota smatra se ekonomski najznačajnijim šumskim patogenom na severnoj hemisferi, posebno u Evropi (Adomas *et al.* 2007). Biologija, ekologija i mehanizam širenja infekcije se intenzivno proučavaju kod ove vrste. Parazitira na četinarima, najčešće smrči, i izaziva truljenje korena. Simtomi infekcije su deformacije korena, prekomeran rast četina i pojava žutih pruga na kori drveta. Posebno je problematično to što su simptomi vidljivi tek nakon 1.5-3 godine po pojavi infekcije i često se dešava da biljka uvene pre njihove manifestacije. Ova gljiva inficira nove domačine pomoću bazidiospora, koje se veoma lako prenose vetrom. One prodiru kroz oštećenja i pukotine na stablu. Koristeći transportne sisteme biljke, spore gljive doppevaju do korena gde se formira micelija. Odatle, fragmentacijom micelije, lako može da inficira korenje susednog drveća (Chavez *et al.* 1980). Usled infekcije gljivom *Heterobasidion annosum* oslabljena stabla postaju podložna različitim sekundarnim infekcijama, pa tako i napadima potkornjaka.

Ispitivanja roda *Heterobasidion* u Srbiji započeta su još 1963. godine, kada je primećena infekcija velikog obima gljivom *H. annosum* upravo na Kopaoniku (Keča 2008). Godinama kasnije, 2008. godine, Nenad Keča je sproveo istraživanje u Nacionalnom parku Kopaonik kako bi prikupio detaljne informacije o prisustvu, obimu infekcije i rasprostranjenosti roda *Heterobasidion* u izabranim smrčnim šumama. Međutim, do sada na ovim prostorima nije sprovedena nijedna studija koja se bavi suzbijanjem širenja gljive *Heterobasidion annosum*.

Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) je biljka iz porodice Meliaceae, poreklom sa Indijskog podkontinenta; naseljava tropske i suptropske krajeve (Shrivastava i Swarnkar 2014). Na tom području se ova biljka od davnina koristi u medicinske svrhe. U poslednjih par decenija, napravljen je veliki iskorak u pogledu ispitivanja biološke aktivnosti nima i analize hemijskog sastava njenih komponenti. Poznato je njegovo antimikrobno, antifungalno, antitumorsko i antiinflamatorno dejstvo (Biswas *et al.* 2002). Kvercetin i β -sitosterol su prvi flavonoidi koji su ekstrahovani iz lista nima i za koje je utvrđeno da imaju antimikrobna i antifungalna svojstva (Alzohairy 2016). Ulje ove biljke ulazi u sastav komercijalno dostupnih fungicida. Utvrđeno je da ekstrakti listova i semena biljke *A. indica* inhibiraju rast gljivičnih patogena, među kojima su *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia tiorum*, *Alternaria solani*, kao i nekih pripadnika razdela Basidiomycota (*Rhizonia solani* i *Sclerotium rolfsii*) (Ali *et al.* 2017). Takođe se smatra da nim ima repelentno dejstvo na neke vrste potkornjaka (Lawati *et al.* 2002). Ova biljka bi mogla biti korišćena kao kontrolni agens za ove insekte, koji nanose veliku štetu šumama, a često je njihova pojava povezana sa infekcijom stabla gljivom *Heterobasidion annosum*.

Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi antifungalno dejstvo nimovog ulja i ekstrakta lista na gljivu *Heterobasidion annosum*.

Materijal i metode

Antifungalno dejstvo nimovog ulja kao i etanolnog ekstrakta lista testirano je pomoću dve metode. Gajenjem gljive na čvrstoj hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama nimovog ulja i lisnog ekstrakta ispitan je efekat na inhibiciju rasta, merenjem dijametra kolonije. Testom u tečnoj podlozi kojoj su dodate različite koncentracije istog ekstrakta, ispitan je efekat na produkciju biomase.

Priprema ekstrakta nima. Korišćen je komercijalno dostupan prah nimovog lista proizvođača „Hymalaia”. Ekstrakcija je vršena 96% etanolom u odnosu 2 : 1, 24 h na temperaturi 25°C, nakon čega je ekstrakt centrifugiran 40 minuta na 6000 g. Profiltrirani supernatant je uparen do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Suvi ostatak je rastvoren u 10% dimetil-sulfoksidu (DMSO).

Izolacija i gajenje kultura gljiva. Plodonosna tela gljive *Heterobasidion annosum* uzorkovana su na prostoru Nacionalnog parka Kopaonik tokom juna 2019. godine. Kultura gljive je uspostavljena na hranljivoj podlozi Sabouraud Dextrose Agar (SDA), inkubacijom u trajanju od 10 dana na sobnoj temperaturi.

Priprema suspenzije spora. Suspenzija spora je napravljena tako što je na površinu Petri šolje sa kulturom gljive *H. annosum* dodato 5 mL sterilnog fiziološkog rastvora i 100 µL Tween 20 deterdženta. Spore su odvojene od hifa blagim pokretima sterilnog staklenog štapića. Rastvor spora je profiltriran kroz četiri sloja sterilne gaze, kako bi se odvojili zaostali delovi micelije. Spore su izbrojane pomoću hemocitometra i izračunat je njihov ukupan broj, po formuli:

$$N = n \times 10^4 \times m$$

gde je: N – ukupan broj spora po 1 mL suspenzije, n – izbrojani broj spora, m – faktor razblazenja.

Ispitivanje inhibicije rasta micelije na čvrstoj podlozi sa različitim koncentracijama lisnog ekstrakta i ulja. Ispitivanje antifungalnog dejstva na gljivu *Heterobasidion annosum* vršeno je dodavanjem različitih koncentracija komercijalnog nimovog ulja (Alepharm) i dobijenog lisnog ekstrakta u Potato-dextrose agar (PDA) podlogu. Testirano je pet koncentracija za lisni ekstrakt (22.5 mg/mL, 11.2 mg/mL, 5.6 mg/mL, 2.8 mg/mL, 1.4 mg/mL) i pet koncentracija za nimovo ulje (7.2%, 5.0%, 3.3%, 1.6%, 0.8%). Disk agra prečnika 5 mm sa kulturom gljive *Heterobasidion annosum* je postavljen u centar svake Petri šolje. Na isti način kultura je zasejana i na šolje koje su sadržale 0.7% DMSO, kao kontrolu rastvarača, i na šolje bez dodatog ekstrakta. Ceo eksperiment je postavljen u duplikatu. Nakon 5 dana inkubacije na 25°C, merena je površina kolonija uz pomoć ImageJ programa i računat procenat inhibicije po formuli:

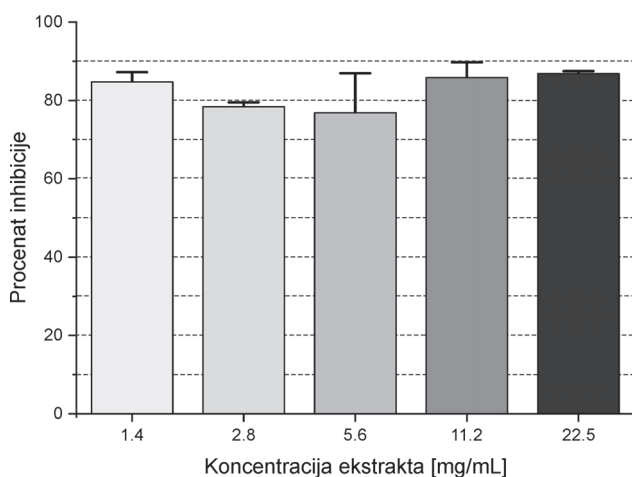
$$FG = \frac{D_C - D_R}{D_C}$$

gde je: FG – inhibicija rasta gljive u procentima, D_C – rast kontrole, D_R – rast na podlogama sa ekstraktom.

Ispitivanje inhibicije rasta micelije u tečnoj podlozi sa različitim koncentracijama lisnog ekstrakta. Efekat nimovog lisnog ekstrakta na produkciju biomase gljive *Heterobasidion annosum* praćen je i u tečnoj podlozi. Eksperiment je postavljen u erlenmajerima koji su sadržali 14 mL SDB (Sabouraud Dextrose Broth) tečnog medijuma. U svaki sud je dodato po 0.5 mL vodene suspenzije spora (5×10^5 spora/mL) gljive *Heterobasidion annosum*. Testirano je pet različitih koncentracija lisnog ekstrakta biljke *A. indica* – 22.5, 11.2, 5.6, 2.8 i 1.4 mg/mL. Postavljene su i dve kontrolne grupe, kontrola rastvarača (10% DMSO) i kontrola rasta, koja nije sadržala lisni ekstrakt. Ceo eksperiment je postavljen u duplikatu. Posle 6 dana inkubacije na 25°C, kulture gljiva su profiltrirane i prikupljena biomasa je osušena na 70°C tokom 24 h, nakon čega je izmerena suva masa.

Rezultati i diskusija

Ispitivanjem inhibicije rasta micelije na čvrstoj podlozi pokazano je da lisni ekstrakt u svim ispitivanim koncentracijama ima inhibitorno dejstvo na gljivu *H. annosum*. Procenat inhibicije varira od 77% do 86%, u zavisnosti od koncentracije test supstance u podlozi (slika 1).

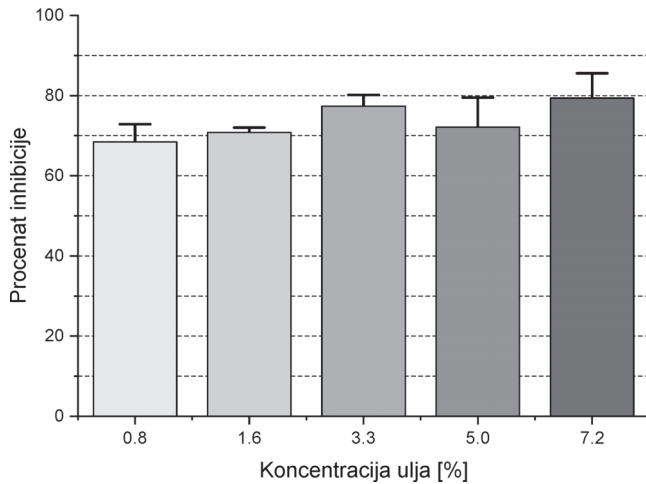


Slika 1. Inhibicija rasta micelije *H. annosum* na čvrstoj podlozi sa različitim koncentracijama lisnog ekstrakta nima. Error-barovima je označena standardna greška srednje vrednosti.

Figure 1. Inhibition of *H. annosum* mycelial growth on solid medium with different concentrations of neem leaf extract. Error bars denote standard errors of means.

Nimovo ulje u testiranim koncentracijama je inhibiralo rast micelije *H. annosum* u nešto manjoj meri nego lisni ekstrakt. Najviša koncentracija ulja (7,2%) je bila najefektivnija i inhibirala je rast micelije za 80%, dok je najniža koncentracija (0,8%) bila najmanje efektivna, inhibirajući rast micelije za 70% (slika 2).

Nepostojanje izraženije razlike u vrednostima inhibicije rasta micelije na pločama sa najvišim i najnižim testiranim koncentracijama kako ulja tako i lisnog ekstrakta, ukazuje na mogućnost da bi i niže koncentracije



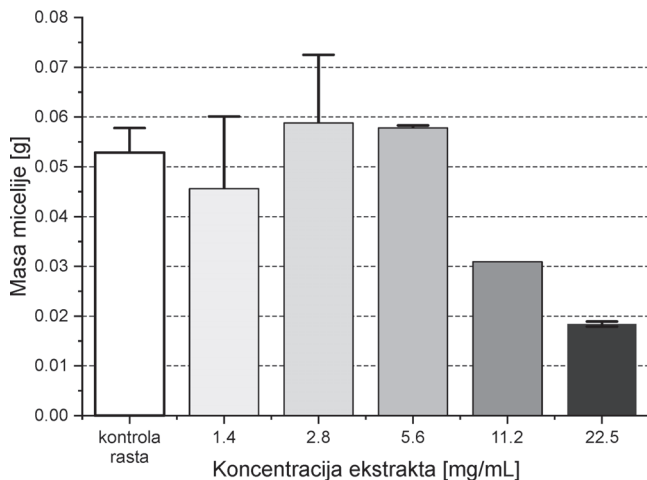
Slika 2. Inhibicija rasta micelije *H. annosum* na čvrstoj podlozi sa različitim koncentracijama nimovog ulja. Error-barovima je označena standardna greška srednje vrednosti.

Figure 2. Inhibition of *H. annosum* mycelial growth on solid medium with different concentrations of neem oil. Error bars denote standard errors of means.

ispitivanih supstanci mogle biti podjednako efektivne. Ali *et al.* (2017) testirali su antifungalno dejstvo nimovog ulja i njegove emulzije sa uljem biljke *Cymbopogon nardus* na gljive *Rhizoctonia solani* i *Sclerotium rolfsii*, koje takođe pripadaju razdelu Basidiomycota. Nimovo ulje je, pri koncentraciji od 0.25 mg/mL, inhibiralo rast *R. solani* za 45%, a *S. rolfsii* za 40%. Emulzija nimovog ulja i ulja biljke *C. nardus* je pokazala značajno jače antifungalno dejstvo pri istim koncentracijama, umanjujući rast obe vrste za od 60% do 75%, u zavisnosti od odnosa ulja i površinski aktivne supstance u emulziji (*ibid.*). Ovo istraživanje govori u prilog tome da bi čak i niže koncentracije lisnog ekstrakta i ulja nima mogle biti efektivne.

Rezultati testa kojim se ispituje inhibicija rasta micelije u tečnoj podlozi sa različitim koncentracijama lisnog ekstrakta prikazani su na slici 3. Izraženo inhibitorno dejstvo je primećeno samo pri tretmanima sa dve najviše koncentracije ekstrakta. Produkcija biomase je smanjena za 40% u sudu u kome je koncentracija ekstrakta bila 11.2 mg/mL. Najviša koncentracija ekstrakta (22.5 mg/mL) je bila najefektivnija, inhibirajući rast gljive za 65%. Neuočavanje jasne zavisnosti između inhibicije produkcije biomase i koncentracije ekstrakta pri tretmanu bi moglo da se objasni nepotpunom rastvorljivošću test supstance i njenim taloženjem na dnu suda. Pri ovom testu nimov ekstrakt je pokazao slabije antifungalno dejstvo nego pri testu na čvrstoj podlozi. Manja efikasnost ekstrakta u tečnom medijumu može, takođe, biti posledica precipitacije test supstance.

Mnogobrojna istraživanja imala su za cilj pronalaženje efikasnog rešenja za borbu protiv gljive *Heterobasidion annosum*. Sprovedeno je više *in vivo* studija u kojima su testirane različite supstance sa ciljem sprečavanja infekcije (fizički pokrивajući ulaznu površinu ili ispoljavajući toksično dejstvo na gljivu) ili favorizovanja rasta konkurentnih brzorastućih nepatogenih vrsta (Brandtberg *et al.* 1996). Greig (1976) je ustanovio da natrijum nitrat u koncentracijama od 10% do 20%, kao i 10% dinatrijum oktaborat, u potpunosti sprečavaju infekciju panjeva bora. Obe ove supstance su ispoljile veoma snažno antifungalno dejstvo, ali su i prilično



Slika 3. Inhibicija rasta micelije *H. annosum* u tečnoj podlozi sa lisnim ekstraktom nima, procenjena na osnovu dva ponavljanja

Figure 3. Inhibition of *H. annosum* mycelial growth in liquid medium with different concentrations of neem leaf extract

štetne za životnu sredinu i organizme u njoj. Brandtberg je sa svojim kolegama 1996. testirao efekat uree na širenje gljive *H. annosum*. Primećeno je smanjenje distribucije ove vrste za 62% pri tretmanu ureom koncentracije 20% i za 85% pri tretmanu sa 30% uree. Ovim istraživanjem utvrđeno je da nim ima sličan inhibitorni efekat na rast gljive *H. annosum* kao i urea. Nasuprot supstancama koje su korišćene u navedenim studijama, nimovo ulje i lisni ekstrakt su prirodne, biljne komponente, za koje se pretpostavlja da imaju manji uticaj na životnu sredinu, te bi njihova potencijalna upotreba kao antifungicida bila bezbednije rešenje. Međutim, ovo su rezultati in vitro studije, pa bi budući in vivo eksperimenti, kao i testiranje uticaja proizvoda nima na životnu sredinu bili neophodni.

Zaključak

Ovim eksperimentom potvrđeno je antifungalno dejstvo biljke *Azadirachta indica* na gljivu *Heterobasidion annosum*. Sve korišćene koncentracije ulja (0.8 - 7.1%) i lisnog ekstrakta (1.4 - 22.3 mg/mL) bile su efektivne. Procenat inhibicije koji je pokazan testom na čvrstoj podlozi je bio viši od onog zabeleženog u tečnoj kulturi. To se može objasniti precipitacijom ekstrakta u tečnom medijumu. U narednim istraživanjima potrebno je testirati antifungalno dejstvo nižih koncentracija ekstrakta i ulja, kao i utvrditi uticaj nima na životnu sredinu, što je preduslov za njegovu potencijalnu komercijalnu upotrebu.

Literatura

- Adomas A., Heller G., Li G., Olson A., Chu T. M. *et al.* 2007. Transcript profiling of a conifer pathosystem: response of *Pinus sylvestris* root tissues to pathogen (*Heterobasidion annosum*) invasion. *Tree Physiology*, 27 (10): 1441.

- Ali E. O. M., Shakil N. A., Rana V. S., Sarkar D. J., Majumder S., Kaushik P. *et al.* 2017. Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Industrial crops and products*, **108**: 379.
- Allen C. D. 2009. Climate-induced forest dieback: an escalating global phenomenon. *Unasylva*, **60** (231-232): 43.
- Alzohairy M. A., 2016. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2016**.
- Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee R. K., Bandyopadhyay U. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*, **82** (11): 1336.
- Brandtberg P. O., Johansson M., & Seeger P. 1996. Effects of season and urea treatment on infection of stumps of *Picea abies* by *Heterobasidion annosum* in stands on former arable land. *Scandinavian journal of forest research*, **11** (1-4), 261.
- Chavez Jr T. D., Edmonds R. L., Driver C. H. 1980. Young-growth western hemlock stand infection by *Heterobasidion annosum* 11 years after precommercial thinning. *Canadian Journal of Forest Research*, **10** (3), 389.
- Greig B. J. W. 1976. Biological control of *Fomes annosus* by *Peniophora gigantea*. *European Journal of Plant Pathology*, **6**: 65.
- Keča N. 2008. Distribution of *Heterobasidion genets* on a Norway spruce site: Case study in National park „Kopaonik“. *Glasnik Šumarskog fakulteta*, **98**: 117.
- Kesić L., Matović B., Stojnić S., Stjepanović S., Stojanović D. 2016. Promena klime kao faktor smanjenja prirasta stabala čiste sastojine smrče (*Picea abies* (L.) H. Karst.) u Nacionalnom parku „Kopaonik“. *Topola*, 197-198: 25.
- Lawati H. A., Azam K. M., Deadman M. L. 2002. Insecticidal and repellent properties of subtropical plant extracts against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Agricultural and Marine Sciences*, **7** (1): 37.
- Shrivastava D. K., Swarnkar K. 2014. Antifungal activity of leaf extract of Neem (*Azadirachta indica* Linn). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3** (5): 305.
- Stojanović D., Matović B., Orlović S., Kržič A., Đurđević V. *et al.* 2012. The use of forest aridity index for the evaluation of climate change impact on beech forests in Serbia. *Topola*, 189-190: 117.

Jana Počuča

Antifungal Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract and Oil Against Wood Decay Fungi *Heterobasidion annosum*

Forest dieback represents a growing global problem, as a consequence of accelerating climate changes. In the last few decades, the drying of coniferous, mostly spruce, forests was noticed in the area of National park Kopaonik. Although this degenerative process is caused by many factors, one of the main causes is the spreading of the fungus *Heterobasidion annosum*. This is a parasitic species that causes rotting of the conifer root. It is considered to be the most economically important pathogen in the Northern hemisphere. Neem (*Azadirachta indica*) is a plant native to the Indian subcontinent, whose oils are compounds of many commercially available antifungicides. It is considered that neem can stimulate the growth of other plants and have a contraceptive and repellent effect on bark beetles, which can also cause serious damage to the forest. The aim of this project was to examine the potential antifungal effect of neem oil and leaf extract on *H. annosum*. Five different concentrations of ethanol leaf extract (1.4–22.5 mg/mL), as well as oil (0.8–7.2%) were used. The inhibition of fungal growth was observed on solid and liquid mediums, by measuring colony surface and mycelium biomass. The percentage of fungal growth inhibition on solid medium was close to 85% for leaf extract and 80% for oil. The variance in inhibitory effect of different used concentrations was not statistically significant, which suggests that lower concentrations can be equally effective. The inhibitory effect on fungal biomass production was also confirmed. Biomass production was reduced by about 65% in the treatment with the highest extract concentration. These results represent a beginning for future studies which could lead to the potential commercial use of neem as a biocontrol agent.

