

Bazı Bitki Ekstraktlarının In Vitro Antifungal Etkileri Üzerine Araştırmalar

Hüseyin TÜRKÜSAY

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir-TÜRKİYE

Ersin ONOĞUR

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 18.03.1996

Özet: Bu çalışmada Ege Bölgesinde doğal flora ait bazı tek ve çok yıllık bitkiler ile kültür bitkilerinin yapraklarından su içinde hazırlanan ekstraktların bitki patojeni *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* ve *Drechslera sorokiniana*'ya karşı in vitro antifungal etkileri araştırıldı.

Ekstraktların antifungal etkilerinin saptanmasında spor çimlenmesi, koloni gelişimi ve sporulasyon yoğunluğu kriter olarak alındı. *Hedera helix* yaprak ekstraktı spor çimlenmesini en yüksek oranda engelledi, bunu *Datura stramonium* izledi. Patojenlerin koloni gelişimi ise yine en yüksek oranda *H. helix* yaprak ekstraktı tarafından olmak üzere *Ficus carica* ve *Avena sativa* ekstraktları tarafından engellendi. *A. sativa*, *Xanthium strumarium*, *F. carica*, *Nicotiana tabacum* ve *D. stramonium* ekstraktları ise etmenlerin sporulasyon yoğunluğunu % 12 ile % 82 arasında değişen oranlarda engellediler.

Studies on Antifungal Effects of Some Plant Extracts In Vitro

Abstract: The antifungal effects of leaf extracts of some cultivated plants and also annual and perennial plants belonging to the natural flora of the Aegean region were tested in vitro against the plant pathogens *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* and *Drechslera sorokiniana*.

The extracts were prepared in water having room temperature; Spore germination, colony growth and sporulation density of the test fungi were measured on PDA added with the extract. Spore germination was inhibited strongly by *Hedera helix* extracts followed by the extract of *Datura stramonium*. *H. helix* extracts also inhibited the colonial growth of the pathogens highly. *Ficus carica* and *Avena sativa* extracts were also found to be effective on colony development on different levels. The sporulation ability of the fungi was effected by a wide range of extracts prepared from the leaves of *A. sativa*, *X. strumarium*, *F. carica*, *Nicotiana tabacum* and *D. stramonium*.

Giriş

Kültür bitkilerinin hastalık ve zararlılardan korunması ve böylece kaliteli ve artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacını karşılayacak düzeyde ürün elde edilmesi amacıyla hastalık etmenleri, zararlılar ve yabancı otlara karşı çeşitli mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Bunların başında kimyasal savaş gelmekte, bunu kültürel ve biyolojik savaş yöntemleri izlemektedir.

Son yıllarda üzerinde çokça durulan konulardan birisi de "Ekolojik Tarım" dır. Bu yolla tarım alanlarında yoğun olarak kullanılan pestisit, gübre ve bitki büyüme düzenleyicilerinin tarımsal ürünler üzerinde bıraktıkları kalıntılardan, toprağa, suya, havaya ve diğer canlılara olumsuz etkilerinden mümkün olduğunca uzak kalmak amaçlanmaktadır. Bunun yanında bitkinin ve toprağın verimliliğini ve direncini artırıcı doğal bitki ekstraktlarından elde edilen maddeleri kullanmak ta ekolojik tarımın amaçları arasındadır (1).

Doğada bazı bitkilerin çeşitli bitkilere olduğu kadar, fungus, bakteri ve omurgalılarına karşı da zararlı yönde etkileri olduğu bilinmektedir. Bu olay ilk kez 1937 yılında "Molish" tarafından allelopati olarak adlandırılmış ve tanımı; Yüksek bir bitkinin, diğer bitkilerin çimlenme, büyüme veya gelişmesi üzerine zararlı etkileri şeklinde yapılmıştır(2). Günümüzde allelopati kavramı daha geniş bir kapsamda ele alınmakta ve bitkinin bitkiyi etkilemesinin yanında, bitkilerin patojenlerin morfogenezisi üzerine etkileri konularını da içerdiği savunulmaktadır (3).

Bitkilerin içerdikleri inhibitör maddelerin saptanması ve bunların yapay yolla sentezlenerek, zararlı organizma ve mikroorganizmalara karşı kullanılması çalışmalarına çok sayıda örnek vermek mümkündür (4,5,6,7,8,9).

Bu çalışmada çeşitli bitkilerden hazırlanan ekstraktların bazı bitki patojeni funguslara karşı in vitro antimikrobiyal etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada patojen olarak; *Drechslera sorokiniana* Subram and Jain., *Botrytis cinerea* Pers., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler ve *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Sor. kullanıldı.

Çalışmada kullanılan yaprak ekstraktları;

- *Avena sativa* L.(Yulaf)
- *Datura stramonium* L.(Şeytan elması)
- *Eucalyptus* sp. L.(Ökalyptus türü)
- *Ficus carica* l.(Incir)
- *Hedera helix* L. (Duvar sarmaşığı)
- *Nicotiana tabacum* L. (Tütün)
- *Xanthium strumarium* L. (Domuz pıtrağı) bitkilerinden elde edildi.

Yöntem

Fungus Kültürü

Bitki Koruma Bölümü kültür stoklarından temin edilen fungal izolatlar PDA besi ortamı üzerinde, karanlıkta 18 °C'de geliştirildi.

Ekstraktı Elde Edilecek Bitki Örneklerinin Alınması

Ekstraktı elde edilecek bitkiler E.Ü.Z.F. 'ne ait bahçe ve tarlalardan toplandı. Alınan yaprak örneklerinin sağlıklı, normal renge sahip olmalarına dikkat edildi. Alınan yapraklar hava sirkülasyonlu kurutma dolaplarında 50 °C'de 40 saat süreyle kurutuldu. Kurutulan yapraklar öğütülerek daha sonra kullanılmak üzere laboratuvar koşullarından cam kavanozlar içinde saklandı.

Yaprak Ekstraktlarının Hazırlanması

Öğütülmüş yaprak örnekleri steril saf su ile 1/15 oranında sulandırılarak çalkalayıcı üzerinde 2 saat süre ile oda sıcaklığında ekstraksiyona bırakıldı. Daha sonra bu materyal 2-4 katlı steril tülbenkten süzülerek önceden 100 °C 'ye kadar ısıtılmış otoklavda 10 dakika süre ile sterilize edildi (10).

Ekstraktların Patojen Sporlarının Çimlenmesine Etkilerinin Saptanması

Çalışmada *A. alternata*, *B. cinerea* ve *D. sorokiniana* fungusları kullanıldı. *A. solani*'nin sporulasyonu sağlanamadığı için bu patojen devre dışı bırakıldı.

Fungus kültürlerinden aşağıdaki oranlarda spor süspansiyonları hazırlandı;

- *Alternaria alternata*: 2.5×10^5 spor/ml
- *Botrytis cinerea*: 2.5×10^5 spor/ml

- *Drechslera sorokiniana*: 2.0×10^5 spor/ml

Su agar dökülen 90 mm çaplı petri kutularına, ortamın donmasından sonra petri kutuları alt yüzeylerinden çizilerek dört eşit kısma ayrıldı. Her kısma hazırlanan yaprak ekstraktlarından mikropipet yardımı ile 0.03 ml konuldu ve hemen ardından 0.01 ml belirtilen yoğunluklardaki spor süspansiyonları verildi. Kontrol olarak petrilere 0.03 ml steril saf su verildi. Deneme üç tekerrürlü olarak kuruldu. Spor süspansiyonu verildikten 6 saat sonra, çimlenmeyi durdurmak üzere her petriye % 0.1 'lik merthiolat çözeltisinden eşit oranda verildi. Belirgin olarak uzunluklarının 1/2'si kadar çim borusu oluşturmuş sporlar çimlenmiş olarak kabul edildi. Deneme koşullarında söz konusu fungusların sporları 6 saat içinde çimlenmektedirler. Değerlendirmeler mikroskop altında, numaratorlerle sayılan 100 spordan çimlenen ve çimlenmeyen sporların belirlenmesi şeklinde yapıldı.

Ekstraktların Patojenlerin Koloni Gelişimine Etkilerinin Saptanması

Hazırlama yöntemi yukarıda da açıklanan yaprak ekstraktlarının 135 ml'si 400 ml PDA ortamına eklendi ve oluşan karışım 90 mm çaplı petri kaplarına 15'er ml olmak üzere döküldü. 24 saat sonra her petrinin ortasına bir adet olmak üzere 8 günlük patojen kültürlerinden 7 mm'lik mantar delici ile alınan diskler kondu. Kontrol olarak steril saf su kullanıldı. Değerlendirmelere 24 saat sonra başlandı ve 8 gün boyunca her gün koloni çapları ölçülerek ortamlardaki fungal gelişme izlendi.

Ekstraktların Patojenlerin Sporulasyon Yoğunluğuna Etkilerinin Saptanması

Bu denemede bir önceki bölümde hazırlanışı açıklanan ortamlarda gelişen test funguslarının sporulasyonu belirlendi.

Sporulasyon yoğunluğunun saptanması için kültürlerden 7 mm'lik mantar delici ile dört disk alındı ve bunlar 10 'ar ml steril saf su içeren tüplere konarak tüp çalkalayıcıda birer dakika çalkalandılar. Değerlendirmeler bir Hemacytometre yardımıyla ml'de spor yoğunluğuna göre yapıldı.

Ekstraktların patojenlerin spor çimlenmesi, koloni gelişimi ve sporulasyon yoğunluğuna karşı gösterdikleri % engelleme etkileri; kontrol petrilindeki gelişme 100 kabul edildiğinde, ekstrakt içeren petrilere gelişmenin buna göre ne kadar olduğunun oranlanmasıyla elde edilmiştir. Örnek: *Alternaria alternata*'ya *Avena sativa* ekstraktının % engelleme etkisi incelenirken, kontrolde % çimlenme 87=100 kabul edilirse, *A. sativa* ekstraktındaki % çimlenme % 70 ise engelleme etkisi % 20 olarak hesaplanmıştır.

Bitki Ekstraktı	A.alternata %Çimlenme			B.cinerea %Çimlenme			D.sorokiniana %Çimlenme		
	*K	Eks.	Eng.	K	Eks.	Eng.	K	Eks.	Eng.
<i>A.sativa</i>	87	70	20	91	74	19	82	67	18
<i>D.stramonium</i>	78	47	40	69	67	3.0	68	70	+3.0
<i>Eucalyptus sp.</i>	89	78	12	81	80	1.0	82	80	2.0
<i>F.carica</i>	88	78	11	79	68	14	85	75	12
<i>H.helix</i>	84	33	61	77	57	26	83	27	68
<i>N.tabacum</i>	88	78	11	80	77	4.0	79	74	6.0
<i>X.strumarium</i>	89	77	14	82	59	28	76	76	0.0

*K: Kontrol, Eks.: Ekstraktta % çimlenme, Eng.: % Engelleme etkisi

Tablo 1. Yaprak ekstraktı verilmiş su agar ortamında inokulasyondan 6 saat sonra *A. alternata*, *B. cinerea* ve *D. sorokiniana* sporlarının çimlenme yüzdeleri

Ekstrakt Adı	Patojen Adı			
	A. alternata (Kontrol:55.3)	A.solani (Kontrol: 55.5)	B.cinerea (Kontrol: 58.9)	D. sorokiniana (Kontrol: 58.3)
Kontrol	55.3	55.5	58.9	58.3
<i>A. sativa</i>	Ekstrakt	48.6	54.1	41.5
	%Engelleme	12.0	19.0	30.0
<i>D. stramonium</i>	Ekstrakt	46.9	43.0	47.3
	%Engelleme	15.0	23.0	20.0
<i>Eucalyptus sp.</i>	Ekstrakt	45.0	31.3	52.4
	%Engelleme	19.0	44.0	11.0
<i>F. carica</i>	Ekstrakt	44.5	50.2	37.7
	%Engelleme	9.00	20.0	36.0
<i>H. helix</i>	Ekstrakt	32.3	29.5	44.0
	%Engelleme	41.0	47.0	25.0
<i>N. tabacum</i>	Ekstrakt	42.4	48.2	49.8
	%Engelleme	23.0	13.0	15.0
<i>X. strumarium</i>	Ekstrakt	51.9	49.3	46.5
	%Engelleme	8.00	11.0	21.0

Tablo 2. Ekstraktların PDA ortamında ekimden 8 gün sonra patojenlerin koloni gelişimlerine etkileri (Kontrol=100)

Bulgular

Ekstraktların Patojen Sporlarının Çimlenmesine Olan Etkileri

Su agar ortamına mikropipetle verilen yaprak ekstraktlarının, *A. alternata*, *B. cinerea* ve *D. sorokiniana* sporlarının çimlenme yüzdesine etkilerinin testlendiği bu denemede elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verildi.

Tablodan da görüldüğü gibi, ekstraktı elde edilen bitkiler içinde spor çimlenmesini en yüksek oranda engelleyen bitki *H. helix* olmuştur. Bu ekstrakt *A. alternata*'nın spor çimlenmesini %61, *B. cinerea*'nin spor çimlenmesini % 26, *D. sorokiniana*'nın spor çimlenmesini ise % 68 oranında engellemektedir. Bundan başka *D. stramonium*'da *A. alternata*'yı % 40 oranında engellemektedir. Ayrıca *A. sativa* yaprak ekstraktının da her üç patojene ortalama % 19 oranında bir engelleme etkisi yaptığı dikkati çekmektedir.

Ekstraktların Patojenlerin Koloni Gelişimine Etkileri

Yaprak ekstraktlarının *A. solani* dahil test funguslarının PDA besi ortamındaki koloni gelişimine olan etkileri üzerindeki bulgular Tablo 2'de verildi.

Tablodan, *A. alternata* ve *A. solani*'nin koloni gelişimine en etkili ekstraktın *H. helix*'e ait olduğu, *B. cinerea* ve *D. sorokiniana*'nın ise en çok *F. carica* yaprak ekstraktından etkilendiği görülmektedir.

Ekstraktların Patojenlerin Sporulasyon Yoğunluğuna Etkileri

Bu denemede ekimden 8 gün sonra farklı ekstrakt içeren ortamlarda koloni gelişimleri belirlenmiş fungus kültürleri kullanıldı. Yaprak ekstraktlarının *A. solani* hariç diğer test funguslarının spor yoğunluğuna olan etkileri Tablo 3'te verildi.

Tablodan *A. sativa*, *X. strumarium*, *F. carica*, *N. tabacum* ve *D. stramonium* ekstraktlarının fungal sporulasyon üzerinde çeşitli oranlarda etkili oldukları görülmektedir. Bu etki *A. sativa* - *B. cinerea* kompozisyonunda % 82'ye kadar çıkmakta, *N. tabacum*-*A. alternata*'da ise % 36 seviyesinde olmaktadır.

Tartışma

Elde edilen sonuçlardan yaprak ekstraktlarının, denemeye alınan patojenlerin in vitro spor çimlenmelerini,

Bitki Ekstraktı	<i>A. alternata</i>				<i>B.cinerea</i>				<i>D. sorokiniana</i>			
	1.T.	2.T.	Ort.	Eng.*	1.T	2.T	Ort	Eng	1.T	2.T	Ort	Eng
<i>Kontrol</i>	37	33	35		31	35	33		73	70	71.5	
<i>A. sativa</i>	21	20	20.5	41	6	6	5	82	32	28	30	58
<i>D. stramonium</i>	23	21	22	37	12	21	16.5	50	54	72	63	12
<i>Eucalyptus sp.</i>	24	28	26	26	22	27	25	26	52	56	54	24
<i>F. carica</i>	19	15	17	51	39	26	32.5	2	67	60	63.5	11
<i>H.helix</i>	26	30	28	20	31	27	29	12	50	45	48	34
<i>N.tabacum</i>	21	24	22.5	36	27	24	25.5	23	41	44	42.5	41
<i>X.strumarium</i>	11	10	10.5	70	18	21	10.5	41	44	72	58	19

*1.T.:1. Tekerrür, 2.T.: 2. Tekerrür, Ort.: Ortalama, Eng.: % Engelleme etkisi

koloni gelişimlerini ve sporulasyon yeteneklerini düşük veya yüksek bir oranda engelleyebildikleri görülmektedir.

Yaprak ekstraktları arasında patojenlerin spor çimlenmesine en yüksek engelleme etkisini *H. helix* ekstraktı göstermiştir. Patojenlere karşı % 68'e varan orandaki bu etki dikkati çekmektedir. Bu etkinin yaprakların parçalanması ile açığa çıkan bidesmozidik hederasaponinlerden kaynaklanması mümkündür. *H. helix* yaprakları yaralandığında, 5-10 dakika içinde bu bileşikler, enzimatik yolla yüksek aktiviteli monodesmozidik türevler olan alfa ve beta hederin'e dönüşmektedirler. Bu saponinler 50-250 µg/ml yoğunlukta fungusların çoğu için kuvvetli, gelişmeyi tamamen durdurucu antibiyotik özelliklere sahiptir (8).

Tüm patojenlerin PDA ortamındaki koloni gelişimlerine en büyük engellemeyi yine *H. helix* ekstraktı yaklaşık % 30-50 oranında değişen bir etkiyle gösterdi. Buradan spor çimlenmesine olan etkinin koloni gelişimine de yansıdığı anlaşılmaktadır. Çalışmada *Eucalyptus sp.*, *F. carica*, *A. sativa* yaprak ekstraktlarının da patojenlerin koloni gelişimini % 20-45 arasında değişen oranlarda engelledikleri saptandı. *Eucalyptus citriadora* ile yapılan diğer bir çalışmada, bu bitkinin yapraklarından elde edilen ekstraktın *Aspergillus flavus*'un miseliyal gelişmesini önemli oranda engellediği ve bu etkinin bitkinin yapraklarında yüksek oranda bulunan tanen içeriğinden kaynaklandığı bildirilmektedir (11). E.Ü.Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde yapılan bir çalışmada in vitro koşullarda *F. carica* ekstraktının *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Phytophthora capsici*, *Verticillium dahliae* ve

Tablo 3.

Ekstraktların PDA ortamında ekimden 8 gün sonra *A. alternata*, *B. cinerea* ve *D. sorokiniana*'nın sporulasyon yoğunluğuna etkileri (x 10 spor/ml)

Thielaviopsis basicola 'nın miseliyal gelişmesine büyük oranda engelleme etkisi gösterdiği ve bu bitkinin yaprak öz suyunda bulunan "ficin" adı verilen proteolitik bir enzimden kaynaklandığı bildirilmektedir (10). Literatürde ayrıca *F. carica* yapraklarının psoralen, bergapten, umbelliferone, 4',5'-dihydropsoralen ve marmesin adı verilen kumarinlerin bulunduğu kayıtlıdır (12). Yaprak ekstraktlarının fungal gelişmeye etkisi kapsamında üçüncü bir kriter olarak ele alınan sporulasyon yoğunluğunun en çok *A. sativa* ekstraktı tarafından, tüm patojenlere karşı % 40-80 arasında değişen oranlarda olmak üzere engellendiği ortaya konmuştur. Bunu % 20-70 arasında değişen oranlarda engelleme etkisi ile *X. strumarium* ekstraktı izlemektedir. Buradan koloni gelişimi ile sporulasyon yoğunluğu arasında doğrudan bir ilişki olmadığı, diğer bir ifade ile koloni gelişimini yüksek oranda engelleyen yaprak ekstraktlarının test funguslarının sporulasyon yeteneklerine aynı oranda etkili olmadıkları görülmektedir. Nitekim *H. helix* örneğin *A. alternata*'nın koloni gelişimini % 41 oranında engellerken, sporulasyon yoğunluğunu % 20 oranında engellemekte, buna karşı *A. sativa* için bu değerler sırasıyla % 12 ve % 41 olmaktadır.

Bu araştırmanın sonucunda elde edilen yüksek engelleme etkilerine dayanılarak yaprak ekstraktlarının in vivo koşullarda *Alternaria solani*-domates, *Botrytis cinerea*-Fasulye, *Drechslera sorokiniana*-Arpa patojen-konukçu sistemlerinde denenmesinin yararlı sonuçlar verebileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Ertem, A. 1993. Ekolojik Tarım Ve Rapunzel. İzmir, 36 s.
2. Molish, H., 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Fischer: Jena.
3. Bell, A.A., 1977. Plant pathology as influenced by allelopathy. In Report of the Research Planning Conference on the Role of Secondary Compounds in Plant Interactions (Allelopathy). pp 64-99.

4. Alice, D. and A.V. Rao, 1987. Antifungal effects of plant extracts on *Drechslera oryzae* in rice. International Rice Research Newsletter 12(2):28. RPP: 67(2):758.
5. Bhowmick, B.N. and B.K. Chaudhary, 1982. Antifungal activity of leaf extracts of medicinal plants on *Alternaria alternata*. Indian Botanical Reporter 1(2):164-165. RPP:62(4):1361.

6. Egger, B.D., 1987. Fungizide wirkung verschiedener Pflanzenextrakte Ergebnisse aus Laborscreening, Klimakammer und Freiland-Versuchen. Med. Fac. Land bouws. Rijksuniv. Gent, 52(3a):971-980.
7. Malik, M.S., N.K. Sanfwan, K.S. Dhindsa and D.S. Bhatti, 1988. Nematicidal activity of extracts of *Xanthium strumarium*. Weed Abstr. 37(5):1673.
8. Schlösser, E., 1974. Role of saponins in antifungal resistance. II. The *Hedera* saponins in leaves of English ivy (*Hedera helix* L.) Z. Pfl.Kr. und Pfl. Schutz, 80, 704-710.
9. Weltzien, H.C. and N. Ketterer, 1986. Control of *Phytophthora infestans* on tomato leaves and potato tubers through water extracts of composed organic wastes. *Phytopathology* 76, 1104.
10. Tat, C., 1978. Bazı bitkilerin yaprak ekstraktlarının fungitoksik etkilerinin saptanması üzerinde araştırmalar. Mezuniyet tezi, E.Ü.Ziraat Fak. Bit. Kor. Böl., 34 s.
11. Loksha, S., V. Kumar, and H.S. Shetty, 1986. Effect on plant extracts on growth and sporulation of *Aspergillus flavus*. *Plant Disease Research* 1(1-2):79-81. RPP. 67(10):4864.
12. Innocenti, G.,A. Bettero and G. Caporale, 1982. The HPLC determination of coumarinic constituents of fig leaves (*Ficus carica*). *Farmaco, Edizione Scientifica* 37(7):475-485. *Analytical Abstracts* 44, 2E 40.