

MIKOPOPULACIJA LJEKOVITOGA BILJA U HRVATSKOJ

Karolina Vrandečić, Jasenka Čosić, Draženka Jurković, Jelena Poštić

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

Sustavnog istraživanja mikoflore ljekovitoga bilja u našoj zemlji do sada nije bilo. U ovome radu iznosimo rezultate preliminarnih istraživanja mikopopulacije 14 vrsta ljekovitih biljaka. Ukupno je pregledano 393 biljna dijela, s kojih je izolirano 10 rodova gljiva: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sordaria*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Stemphillium*, *Fusarium*, *Phomopsis* i jedan nedeterminirani rod. S najvećeg broja uzoraka izoliran je *Penicillium* sp. (s 11 od 14 biljnih vrsta). Na biljkama s kojih su izolirane gljive nisu utvrđeni makroskopski vidljivi simptomi zaraze, osim biljnih dijelova *Lavandula x intermedia*, s koje su izolirani *Phomopsis* sp. i *Fusarium* sp. i *Foeniculum vulgare*, s kojega je izoliran *Phomopsis* sp.

Ključne riječi: ljekovito bilje, mikopopulacija

UVOD

Uporaba ljekovitoga bilja u medicinske svrhe stara je koliko i čovjek. Ljekovite biljke potrebne za fitopripravke članovi su spontane flore i skupljaju se iz okoline ili se plantažno uzgajaju. Plantažni uzgoj ljekovitoga bilja fizički je relativno zahtjevan, zbog većega broja agrotehničkih radnji. Osim toga, u toj proizvodnji nije dopuštena primjena bilo kakvih kemijskih pripravaka. Unatoč tome, uzgoj ljekovitoga bilja ekonomski je isplativ, financijska je dobit veća nego kod uzgoja drugih poljoprivrednih kultura (prije svega, ratarske kulture) i ta je proizvodnja moguća i na manjim površinama, što može biti dobar izvor prihoda za obiteljska gospodarstva. Plantažni uzgoj ljekovitoga bilja 2007. godine u našoj zemlji obuhvaćao je 214,14 ha i od tada je u blagome porastu te je u 2010. godini proširen na 388 ha (www.mps.hr). Povećanjem površina na kojima se uzgajaju ljekovite biljke može se očekivati i veća pojava bolesti. Do sada se relativno mali broj znanstvenika bavio istraživanjem mikopopulacije ljekovitoga bilja. Huang i sur. (2008.) proučavali su endofitne gljive na 29 kineskih ljekovitih biljaka, s kantaronom je izoliran *Colletotrichum gleosporioides* (Debrunner i sur., 2000.), a detaljnim istraživanjem mikopopulacije 5 vrsta ljekovitoga bilja u Srbiji determinirana je 31 gljivična vrsta (Pavlović, 2008.).

Prema nama dostupnim podacima, sustavnog istraživanja mikoflore ljekovitoga bilja u našoj zemlji nema. Vrandečić i sur. (2010.) su sa stolisnika (*Achillea millefolium*) izolirali *Phomopsis* sp. Čičak veliki (*Arctium lappa*) je domaćin nekim važnim gljivičnim uzročnici-

ma bolesti kultiviranoga bilja: *Fusarium graminearum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, *Diaporthe helianthi* i *Diaporthe* sp. (Čosić i sur., 2010.). U ovome radu iznosimo rezultate preliminarnih istraživanja mikopopulacije nekih ljekovitih vrsta u Hrvatskoj.

MATERIJAL I METODE

Za proučavanje mikopopulacije prikupljeni su uzorci sljedećih biljnih vrsta: *Mentha piperita* L. (menta), *Crataegus* sp. (glog), *Matricaria recutita* L. (kamilica), *Achillea millefolium* L. (stolisnik), *Betula pendula* Roth. (obična breza), *Sambucus nigra* L. (bazga), *Hypericum perforatum* L. (kantaron), *Rosa canina* L. (šipak), *Urtica dioica* L. (kopriva), *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel (lavandin), *Hedera helix* L. (bršljan), *Frangula alnus* Mill. (krušina), *Foeniculum vulgare* Mill. (komorač) i *Agrimonia eupatoria* L. (petrovac). Uzorci su prikupljeni tijekom 2010. i 2011. godine na lokacijama Koprivnica, Niza, Lozan, Grdanjci, Sudovec, Belišće i Ston.

Biljni su dijelovi pažljivo isprani pod tekućom vodom. Nakon ispiranja, dijelovi su lista i cvijeta izrezani na komadiće promjera 3-5 mm, a dijelovi peteljke, stabljike, kore i korijena na dužinu 0,5-1 cm. Tako pripremljeni uzorci dezinficirani su 96% etanolom 10 sekundi,

Doc.dr.sc. Karolina Vrandečić (karolina.vrandecic@pfos.hr), prof.dr.sc. Jasenka Čosić, prof.dr.sc. Draženka Jurković, Jelena Poštić, dipl. inž. - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, 31000 Osijek

1% natrij-hipokloritom (NaOCl) 1 min i isprani tri puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Potom su posušeni na sterilnome filter papiru i stavljani na krumpir dekstrozni agar (KDA) sa streptomycinom. U svaku Petrijevu zdjelicu stavljena su do 4 biljna dijela te su držani u termostatu na 22°C i svjetlosnom režimu 12 sati dan/12 sati noć. Pregled se obavljao svaka 3 dana, a na većini uzoraka micelij se razvio do 12. dana. Razvijeni micelij precijepljen je na novu KDA podlogu te je, nakon početnoga porasta, vršni dio micelija ponovno prenesen na KDA. Mikroskopski pregled obavljen je pomoću Olympus BX-41 i Olympus SZX9 mikroskopa. Morfološka identifikacija gljiva do roda obavljena je pomoću standardnih ključeva. Izračunata je učestalost izolacije u % prema formuli:

$$\text{Učestalost izolacije} = \frac{\text{broj koloniziranih dijelova s gljivama}}{\text{ukupan broj analiziranih biljnih dijelova}} \times 100$$

REZULTATI I RASPRAVA

U našim istraživanjima mikopopulacije ljekovitoga bilja ukupno je pregledano 393 biljna dijela s 14 biljnih vrsta. Ni na jednoj biljci s koje su izolirane gljive nisu utvrđeni makroskopski vidljivi simptomi zaraze, osim biljnih dijelova *Lavandula x intermedia*, s koje su izolirani *Phomopsis* sp. i *Fusarium* sp. i *Foeniculum vulgare*, s kojega je izoliran *Phomopsis* sp.

Tijekom lipnja 2011. godine na dvogodišnjim biljkama *Lavandula x intermedia* uočeni su simptomi venuća i potpunoga propadanja biljaka. Iz provodnoga staničja korijena izoliran je *Fusarium* sp.

Na nekim biljkama lavandina utvrđena je i promjena boje stabljika i bočnih grana. Na izbjeljenim dijelovima uočena su crna plodišta – piknidi, za koja smo utvrdili da pripadaju rodu *Phomopsis*.

Slične simptome uočili smo na stabljikama i granama komorača, s kojih je, također, izoliran *Phomopsis* sp.

Osim dva prethodno navedena roda, sa sakupljenih uzoraka ljekovitoga bilja izolirani su pripadnici još osam rodova. S najvećega broja uzoraka izolirani su *Penicillium* sp. (s 11 od 14 biljnih vrsta), *Alternaria* sp. (sa 7 vrsta) i *Aspergillus* sp. (s 5 biljnih vrsta). Učestalost izolacije i rodovi gljiva s pojedinih domaćina te biljni dio s kojeg su gljive izolirane dani su u Tablici 1.

Rodovi *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Xylariales* i jedna neidentificirana vrsta bili su dominantni na 29 tradicionalnih ljekovitih biljaka u Kini (Huang i sur., 2008.). Pavlović (2008.) je u Srbiji sakupila *Altheae officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Hypericum perforatum* i *Salvia officinalis* sa simptomima bolesti te je s njih u najvećem postotku izolirala *Fusarium* sp. i *Sclerotinia sclerotiorum*. *Alternaria alternata* bila je dominantna endofitna vrsta na ljekovitoj biljci *Withania somnifera* (Khan i sur., 2010.). Osim *Fusarium* sp. (lavandin) i *Phomopsis* sp. (lavandin i komorač) koji pripadaju u parazite, ostale izolirane gljive pripadaju ili u grupu saprofita ili u endofite. Iako neki od rodova, kao što su *Penicillium* sp. i *Aspergillus* sp. u fitopatološkome smislu nisu značajni, važno je voditi računa o njihovoj zastupljenosti, jer se neke ljekovite vrste konzumiraju bez dodatne tehnološke obrade, a gljive iz navedenih rodova potencijalno su mikotoksikogene (Parange i sur. 2005., Hashem i Alamri, 2010.). U uzorcima 14 ljekovitih i začinskih biljaka Aziz i sur. (1998.) istraživali su kontaminaciju plijesnima i prisustvo mikotoksina. Determinirano je 10 različitih gljivičnih rodova, a *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, i *Penicillium viridicatum* bili su najčešće izolirani. Također je utvrđena prisutnost aflatoksina B1 u 17 uzoraka (u količini 10 do 160 µgkg⁻¹) i ohratoksina A u 3 uzorka (20 do 80 µgkg⁻¹).

Tablica 1. Učestalost izolacije gljiva na ljekovitome bilju

Table 1. Frequency of fungal isolation on medicinal plants

Biljna vrsta (biljni dio) Plant species (plant part)	Broj uzoraka Number of samples	Gljivična vrsta Fungi species	Učestalost izolacije (%) Isolation frequency
<i>Mentha piperita</i> (list / leaf)	20	<i>Penicillium</i> sp.	35,0
		<i>Aspergillus niger</i>	5,0
<i>Crataegus</i> sp. (list i cvijet / leaf and flower)	40	<i>Penicillium</i> sp.	30,0
		<i>Aspergillus niger</i>	7,5
		<i>Phoma</i> sp.	2,5
		<i>Sordaria fimicola</i>	2,5
<i>Matricaria recutita</i> (cvijet / flower)	40	<i>Penicillium</i> sp.	47,5
		<i>Aspergillus</i> sp.	2,5
		<i>Fusarium</i> sp.	2,5
		<i>Sordaria fimicola</i>	5,0
		<i>Phoma</i> sp.	2,5
		neidentificirano/unidentified	2,5
<i>Achillea millefolium</i> (cvat / inflorescence)	40	<i>Penicillium</i> sp.	25,0
		<i>Cladosporium</i> sp.	2,5
		<i>Sordaria fimicola</i>	10,0

nastavak tablice

<i>Sambucus nigra</i> (cvijet / flower)	40	<i>Penicillium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.	30,0 20,0 2,5 2,5
<i>Betula pendula</i> (list / leaf)	20	<i>Penicillium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	35,0 10,0 10,0
<i>Hypericum perforatum</i> (cvijet / flower)	40	<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Sordaria fimicola</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Stemphillium</i> sp. Neidentificirano	10,0 2,5 15,0 2,5 20,0 2,5 5,0
<i>Rosa canina</i> (plod / fruit)	40	<i>Penicillium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Sordaria fimicola</i>	40,0 5,0 2,5
<i>Urtica dioica</i> (list / leaf)	20	<i>Penicillium</i> sp. <i>Sordaria fimicola</i>	30,0 10,0
<i>Lavandula x intermedia</i> (korijen i stabljika / root and stem)	17	<i>Fusarium</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp.	41,10 29,41
<i>Hedera helix</i> (list / leaf)	20	<i>Penicillium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Sordaria fimicola</i>	10,0 15,0 15,0 10,0
<i>Frangula alnus</i> (kora / bark)	20	<i>Alternaria</i> sp. <i>Sordaria fimicola</i>	15,0 5,0
<i>Foeniculum vulgare</i> (stabiljka / stem)	16	<i>Phomopsis</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	75,0 12,5
<i>Agrimonia eupatoria</i> (list i cvijet / leaf and flower)	20	<i>Penicillium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Aspergillus niger</i>	35,0 5,0 15,0

Kontrolu zdravstvenoga stanja ljekovitoga bilja treba sustavno provoditi, budući da je za očekivati da će povećanjem površina na kojima se te vrste uzgajaju problem prisutnosti gljivičnih vrsta u polju i tijekom skladištenja postati veći.

ZAKLJUČAK

U istraživanjima mikopopulacije 14 vrsta ljekovitih biljaka ukupno je pregledano 393 biljnih dijelova, s kojih je izolirano 10 rodova gljiva: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Sordaria*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Stemphillium*, *Fusarium*, *Phomopsis* i jedan nedeterminirani rod.

ZAHVALA

Zahvaljujemo tvrtki SUBAN d.o.o., Veri Trampus i Branki Šmehil Grabar na dostavljenim uzorcima ljekovitoga bilja. Istraživanja su financirana iz projekta "Systems to reduce mycotoxins contamination of cereals and medicinal plants in order to preservation native species and traditional products in Romania-Serbia-Croatia area" (SEE-ERA.NET PLUS 139/01).

LITERATURA

1. Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly, M.Z., Moussa, L.A. (1998): Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39:279-285.
2. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D., Poštić, J. (2010.): Značajne patogene gljive izolirane s velikog čička (*Arctium lappa* L.) i krpaste češljugovine (*Dipsacus laciniatus* L.). *Glasilo biljne zaštite*, 5: 334-340.
3. Debrunner, N., Rauber, A. L., Schwarz, A., Michel, V.V. (2000): First Report of St. John's-Wort Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Switzerland. *Plant Disease*. 84: 203.
4. Hashem, M., Alamri, S. (2010): Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 17: 167-175.
5. Huang, W.Y., Cai, Y. Z., Hyde, K. D., Corke, H., Sun, M. (2008): Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*. 33: 61-75.
6. Khan, R., Shahzad, S., Choudhary, M.I., Khan, S.A., Ahmad, A. (2010): Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pak. J. Bot.*, 42(2): 1281-1287.

7. Pavlović, S. (2008.): Mikoze značajnijih ljekovitih biljaka u Srbiji. Doktorska disertacija, Novi Sad. Fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (17): 6930–6938.
8. Prange, A., Modrow, H., Hormes, J., Krämer, J., Köhler, P. (2005): Influence of Mycotoxin Producing Fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) on Gluten Proteins during Suboptimal Storage of Wheat after Harvest and Competitive Interactions between Field and Storage
9. Vrandečić, K., Jurković, D., Riccioni, L., Ćosić, J., Poštić, J. (2010): Occurrence of *Phomopsis* sp. on *Achillea millefolium*. Agriculture 16(1): 3-7.
10. www.mps.hr

MYCOPOPULATION OF MEDICINAL PLANTS IN CROATIA

SUMMARY

There has not been a systematic research of medicinal plants mycoflora in Croatia. This paper aims to present the results of preliminary research of mycopopulation of 14 species of medicinal plants. Total of 393 plant parts has been examined and 10 genera of fungi were isolated: Penicillium, Aspergillus, Sordaria, Phoma, Cladosporium, Rhizopus, Stemphylium, Fusarium, Phomopsis and one unidentified genus. Penicillium sp. (from 11 of 14 plant species) was isolated from the majority of samples. The plants fungi were isolated from did not show any macroscopically visible symptoms of infection, except plant parts of Lavandula x intermedia and Foeniculum vulgare, from which Phomopsis sp. and Fusarium sp. were isolated.

Key-words: medicinal plants, mycopopulation

(Primljeno 18. travnja 2011.; prihvaćeno 15. studenoga 2011. - Received on 18 April 2011; accepted on 15 November 2011)