

Utjecaj alkoholnog pripravka propolisa na porast fitopatogenih gljiva

Sažetak

Na važnosti propolisa u ekološkoj poljoprivredi zbog njegovog antifungalnog djelovanja ukazuju brojna istraživanja. U provedenom istraživanju utvrđen je utjecaj alkoholnog propolisa na rast 4 fitopatogene gljive: *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Korištene su 3 koncentracije otopine propolisa (0,5 %, 1 % i 2,5 %). Svaka od navedenih koncentracija imala je manji ili veći inhibitorni učinak na porast micelija fitopatogenih gljiva. Potpuno inhibitorno djelovanje na porast *B. cinerea*, *A. brassicae* i *F. oxysporum* imala je koncentracija 2,5 %, dok je porast zabilježen na koncentraciji od 0,5 %. Pri koncentraciji 1% propolisa utvrđene su statistički visoko značajne razlike između porasta micelija kod navedenih gljiva. *S. sclerotiorum* nije se razvila niti na jednoj koncentraciji te je propolis pokazao potpuno inhibitorno djelovanje na porast ove gljive.

Ključne riječi: propolis, fitopatogene gljive, inhibicija, porast micelija

Uvod

Pod ekološkom, organskom ili biološkom poljoprivredom u široj javnosti se uglavnom misli na tzv. proizvodnju „zdrave hrane“, tj. poljoprivrednu proizvodnju bez primjene agrokemikalija. U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji nastoji se maksimalno iskoristiti autonomni potencijal određenog ekosustava, stimulirajući, jačajući i harmonizirajući biološke procese pojedinih njegovih dijelova.

Ekološka poljoprivreda dio je suvremene poljoprivredne proizvodnje, trgovine i agronomske znanosti te se upravo temelji na njezinim najnovijim spoznajama i dostignućima (Znaor, 1996., Žugec i sur. 2004.).

U konvencionalnoj poljoprivredi za zaštitu bilja od uzročnika bolesti uobičajeno se koriste fungicidi.

Zbog njihovog toksičnog djelovanja na uzročnike bolesti neprestano se pokušava pronaći način zaštite bilja koji bi smanjio ili zaustavio uporabu fungicida, a tome pogotovo teži ekološka poljoprivreda. Značajno mjesto u nastojanjima za smanjenom uporabom klasičnih agrokemikalija u zaštiti bilja pripada i korištenju propolisa (Tringale 1989., Guginski-Pival i sur. 2015.).

Propolis je smolasti pčelinji proizvod kojem se još u antičkim vremenima posvećivala posebna pozornost (Kapš, 2013.). Proizvod je mješavine različitih količina voskova i smole koje pčele prikupljaju s pupova lišća ili kore drveća i grmlja. U pčelinjoj zajednici služi kao građevinska dezinfekcijska tvar kojom pčele popunjavaju pukotine, fiksiraju saće, dezinficiraju i poliraju stanice te smanjuju otvor košnice radi zaštite od eventualnih neprijatelja (Mujić i sur., 2014.).

¹ Martina Palameta, Ana Kikić, studentice Diplomskog studija Ekološka poljoprivreda, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, V. Preloga 1, Osijek

² prof.dr.sc. Karolina Vrandečić, prof.dr.sc. Jasenka Čosić, doc.dr.sc. Jelena Ilić Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, V. Preloga 1, Osijek

Istraživanja o mogućnosti uporabe propolisa u području humane medicine (Szliszka i sur., 2009., Sforcin i Bankove, 2011.), veterine (Hegazi i sur., 2002.), prehrambene tehnologije (Mujić i sur., 2014.), ali i zaštite bilja (Ozcan, 1999., Güler i sur., 2005., Curifuta i sur., 2012.) ukazuju da propolis posjeduje antibakterijsko, antigljivično, antioksidativno i insekticidno djelovanje.

Mnogi talijanski i njemački eko voćari i vinogradari u svrhu zaštite bilja koriste propolis, a broj pristaša upotrebe propolisa raste.

Ovo istraživanje imalo je za cilj utvrditi utjecaj različitih koncentracija alkoholne otopine propolisa (0,5 %, 1 % i 2,5%) na porast fitopatogenih gljiva *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc., *Fusarium oxysporum* Schltdl. : Fr., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary i *Botrytis cinerea* Pers. : Fr..

Materijali i metode rada

Pokus je postavljen prema Curifuta i sur. (2012.). U radu je ispitan utjecaj tri otopine alkoholnog propolisa 0,5 %, 1 % i 2,5 % na 4 vrste gljiva: *A. brassicae*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*. Alkoholna otopina propolisa (70%) nabavljena je od proizvođača „Apimel“ d.o.o. te su pripravljene odgovarajuće koncentracije za istraživanje. Sve gljive su iz kolekcije gljiva Katedre za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

Kao podloga za pripremu različitih koncentracija propolisa korišten je krumpir dekstrozni agar (*potato dextrose agar*) (PDA), a pokus je postavljen u četiri ponavljanja.

Različite koncentracije alkoholne otopine propolisa u podlozi dobivene su dodavanjem različitih količina 70% otopine propolisa. Nakon pripreme podloga slijedila je inokulacija izolata u laminariju. Za inokulaciju je korišten sedam dana star micelij gljiva. Diskovi promjera 5 mm uzeti su s ruba kolonije i postavljeni su sterilnim priborom na sredinu Petrijeve zdjelice promjera 9 cm. Micelij gljive okrenut je prema podlozi prilikom nanošenja. Nakon inokulacije Petrijeve zdjelice su inkubirane u termostatu na 22 °C i svjetlosnom režimu 12 sati dan/12 sati noć. U kontrolnoj varijanti gljive su rasle na podlozi bez prisustva alkoholne otopine propolisa. Prvo mjerenje porasta micelija obavljeno je 2 dana od inokulacije. Mjerenje je izvršeno pomoću ravnala, kojim se mjerio promjer micelija preko sredine diska u horizontalnom i vodoravnom smjeru. Mjerenje je vršeno svaki dan u periodu od 32 dana, a u rezultatima rada su prikazani dani s najznačajnijim promjenama. Svi rezultati su statistički obrađeni uz pomoć analize varijance koristeći računalni program VVSTAT (Vukadinović, 1994.)

Rezultati i rasprava

Prvo mjerenje porasta micelija *A. brassicae* (tablica 1.) obavljeno je dva dana nakon inokulacije kad je utvrđen značajan porast micelija u kontroli (1,42 cm). Porast micelija na podlozi s koncentracijom propolisa 0,5 % u prosjeku je bio 0,47 cm. Ostale koncentracije djelovale su inhibitorno, te nije došlo do promjena u porastu gljive. Između kontrole i ostalih tretmana utvrđene su statistički značajne razlike. Sličan trend utvrđen je u drugom i trećem mjerenju s tom razlikom da je zabilježen neznatan porast micelija kod koncentracije 1%. Dvadeseti dan od inokulacije na podlozi s 1% otopinom propolisa utvrđene je promjer micelija od 2 cm, dok na podlozi s 2,5% otopinom propolisa i dalje nije zabilježen rast. Između svih tretmana su utvrđene statistički značajne razlike. Prilikom zadnjeg mjerenja (25 dana od inokulacije) micelij gljive potpuno se razvio na podlozi koncentracije 0,5 %. Na podlozi koncentracije 1 % promjer micelija je bio 2,95 cm, dok je 2,5 %-tna koncentracija

u potpunosti inhibirala rast micelija. U istraživanju koje su proveli Curifuta i sur. (2012.) koji su koristili podloge koncentracije 0,5 %, 1 % i 2,5 % i 5,5 % gljiva *A. alternata* se razvila samo na 0,5% i 1 % koncentracijama. Kod nas je micelij *A. brassicae* na tim koncentracijama došao do ruba Petrijeve zdjelice, ipak treba naglasiti da je riječ o dvije različite *Alternaria* vrste i u istraživanjima Curifuta i sur. (2012.) kulture su rasle na višoj temperaturi (28 ± 2 °C).

Kontrolna skupina *F. oxysporum* svoj potpuni razvoj dosegla je 10. dana mjerenja (tablica 2.). Četrnaest dana nakon inokulacije na podlozi s koncentracijom otopine propolisa od 0,5 % micelij je bio promjera 5,6 cm. Kod 1 % i 2,5 % koncentracije i dalje nema rasta micelija. Koncentracija otopine propolisa 0,5 % je imala najmanji inhibitorski učinak kroz sve dane mjerenja u odnosu na više ispitivane koncentracije. Neznatan porast od 1,15 cm (25 dana od inokulacije) utvrđen je na 1 % koncentraciji. Do razvoja micelija nije došlo na 2,5 % koncentraciji koja je na porast *F. oxysporum* imala potpuni inhibitorski učinak,

Jako antifungalno djelovanje vodene otopine propolisa na *F. oxysporum* pokazalo je i istraživanje Ozcan (1999.). Gljiva se razvila samo do 1 % koncentracije, dok su veće koncentracije (2,5 %- i 5 %) imale jako inhibitorsko djelovanje te nije došlo do porasta gljive. Razlike u inhibitorskom utjecaju vodene i alkoholne otopine propolisa vjerojatno se mogu djelomično pripisati i mogućem inhibitorskom utjecaju etanola.

Tablica 1. Prosječni porast micelija *A. brassicae* (cm) na 0,5%, 1% i 2,5% koncentraciji propolisa

Broj dana od inokulacije/ <i>number of days after inoculation</i>	kontrola <i>control</i>	0,5%	1%	2,5%
2.	1,42	0,47	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,1708	LSD _{0,05} =0,1218
5.	5,30	1,32	0,02	0,00
			LSD _{0,01} =0,6738	LSD _{0,05} =0,4806
10.	9,00	2,75	0,02	0,00
			LSD _{0,01} =0,1395	LSD _{0,05} =0,0995
14.	9,00	4,85	0,29	0,00
			LSD _{0,01} =0,7292	LSD _{0,05} =0,5201
20.	9,00	8,60	2,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,7986	LSD _{0,05} =0,5696
25.	9,00	9,00	2,95	0,00
			LSD _{0,01} =0,3689	LSD _{0,05} =0,2631

Tablica 2. Prosječni porast micelija *F. oxysporum* (cm) na 0,5%, 1% i 2,5% koncentraciji propolisa

Broj dana od inokulacije/number of days after inoculation	kontrola control	0,5%	1%	2,5%
2.	2,28	0,50	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,2227	LSD _{0,05} =0,1588
5.	7,28	1,42	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,9026	LSD _{0,05} =0,6438
10.	9,00	3,03	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,9676	LSD _{0,05} =0,6901
14.	9,00	5,60	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,6831	LSD _{0,05} =0,7932
20.	9,00	6,00	0,50	0,00
			LSD _{0,01} =1,1120	LSD _{0,05} =0,7932
25.	9,00	7,75	1,15	0,00
			LSD _{0,01} =1,6987	LSD _{0,05} =1,2116

Pet dana od inokulacije u kontrolnoj skupini kod *B. cinerea* (tablica 3.) je utvrđeno da je micelij došao do ruba Petrijeve zdjelice promjera 9 cm, dok je na podlozi s 0,5 % otopinom propolisa porast gljive bio 0,55 cm. Na podlozi sa 1% i 2,5 % otopinom nije zabilježen porast. Koncentracija 1 % imala je potpuni inhibitorski učinak na porast gljive do zadnja dva mjerenja (20. i 25. dan) kad se bilježi neznatan porast 0,56 cm, odnosno 2,23 cm. Do razvoja micelija nije došlo na 2,5 %-tnoj koncentraciji koja je na porast *B. cinerea* imala potpuni inhibitorski učinak. Utvrđene su statistički visoko značajne razlike između porasta micelija u kontroli te svih promatranih koncentracija. Budući da u kontrolnoj varijanti nije korišten alkohol (nego samo čista PDA) ne potvrđuje se isključivo djelovanje propolisa kao djelotvorne aktivne tvari koja inhibira rast gljiva.

Djelovanje alkoholne otopine na porast *B. cinereae* potvrđeno je i u istraživanju koje su proveli Curifuta i sur. (2012.) koji su koristili podloge koncentracije 0,5 %, 1 % i 2,5 % i 5,5 %. Najveći porast je bio na koncentraciji 0,5 % gdje je inhibitorski učinak na porast gljive 50 %, na koncentraciji 1 % zabilježeno je 70 % inhibitorski učinak, dok su koncentracije od 2,5 % i 5,5 % imale najveći inhibitorski učinak. Rezultati ovog istraživanja slažu se s dobivenim rezultatima našeg pokusa u kojem je najveći inhibitorski učinak na porast (100 %) zabilježen kod najveće koncentracije od 2,5 %.

Kod *S. sclerotiorum* alkoholna otopina propolisa u sve tri koncentracije 0,5 %, 1 % i 2,5 % potpuno je inhibitorski djelovala na porast micelija tijekom svih mjerenja, dok je kod kontrolne skupine već pri drugom mjerenju zabilježen porast od 9 cm. Analiza varijance u

ovom slučaju nije imala smisla jer u tretmanima s otopinom propolisa u svim ponavljanjima nije bilo porasta.

Visok stupanj učinkovitosti alkoholne otopine propolisa na porast i razvoj gljive *S. sclerotiorum* utvrđen je i u istraživanjima Matny i sur. (2014.). Pronalazak čimbenika koji negativno utječu na produkciju i klijavost sklerocija koje nastaju tijekom životnog ciklusa *S. sclerotiorum* ili ih inhibiraju i tako prekidaju životni ciklus gljive značajni su zbog mogućnosti njene kontrole i suzbijanja (Le Tourneau, 1979.).

Sve podloge s alkoholnom otopinom propolisa, bez obzira na koncentraciju pokazale su inhibitorno djelovanje na porast micelija ispitivanih gljiva što ukazuje na njegovo protugljivično djelovanje.

Razvoj i porast micelija na PDA podlozi bio je značajno viši i brži u odnosu na razvoj i porast micelija na podlogama s alkoholnom otopinom propolisa u sve tri koncentracije. Dobiveni rezultati slažu se s rezultatima drugih autora prema kojima je porast micelija najbrži i najbujniji na PDA podlozi, dok na podlogama s otopinom propolisa rast micelija gljiva smanjen (Ozcan, 1999., Curifuta i sur. 2012).

Tablica 3. Prosječni porast micelija *B. cinerea* (cm) na 0,5%, 1% i 2,5% koncentraciji propolisa

Broj dana od inokulacije/number of days after inoculation	kontrola control	0,5%	1%	2,5%
2.	2,88	0,00	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,1034	LSD _{0,05} =0,738
5.	9,00	0,55	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =0,7083	LSD _{0,05} =0,5052
10.	9,00	1,95	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =2,4717	LSD _{0,05} =1,7629
14.	9,00	4,50	0,00	0,00
			LSD _{0,01} =5,6124	LSD _{0,05} =4,0031
20.	9,00	4,50	0,56	0,00
			LSD _{0,01} =5,7360	LSD _{0,05} =4,0913
25.	9,00	4,50	2,23	0,00
			LSD _{0,01} =6,1518	LSD _{0,05} =4,3878

Razvoj navedenih gljiva korištenih u radu tekao je različitim brzinom. Na takav ishod utjecalo je više parametara. Sve gljive nemaju jednak porast, neke su manje neke više progresivne te je i izbor vrste utjecao na rezultate. Veće koncentracije propolisa očekivano pokazuju bolji antifungalni utjecaj.

U ovim istraživanjima nije eliminiran mogući inhibitorni utjecaj etanola kao otapala za propolis što će biti predmet budućih istraživanja.

Zaključak

Propolis je pčelinji proizvod kojemu se pripisuju brojna pozitivna svojstva, a jedno od njih je i antifungalno djelovanje. Ekološka poljoprivreda koristi alternativne načine u zaštiti bilja, a propolis je jedan od značajnijih proizvoda koji bi mogao biti korišten u zaštiti bilja od gljivičnih uzročnika bolesti. Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija otopina propolisa na četiri fitopatogene gljive *in vitro* pri 22 °C pokazala su značajan antifungalni utjecaj.

Literatura

- Curifuta, M., Vidal, J., Sanchez-Venegas, J., Contreras, A., Salazar, L.A., Alvear, M. (2012.). The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Ciencia e investigación agraria*, 39(2), 347-359.
- Güler, P., Bozcuk, S., Mutlu, F., Sorkun, K. (2005.). Propolis effect on sclerotial formations of *morchella conica* pers. *Pak. J. Bot.*, 37(4), 1015-1022.
- Hegazi, A.G., Faten, K., Abd El-Hady (2002.). Egyptian propolis: 2-Chemical composition, antiviral and antimicrobial activity of East Nile Delta propolis. *Z. Naturforsch.*, 57(3-4), 386-94.
- Kapš, P. (2013.). Liječenje pčelinjim proizvodima, Apiterapija. Naklada Geromar
- Matny, O. N., Abdul-Karim, E. K., Naemah, R. A., Al-Ani, R. A. (2014.). Activity of propolis and *Boswellia* sp resins extract against *Sclerotinia sclerotiorum* causative agent of white rot disease of *Phaseolus vulgaris* and *Daucus carota* under storage conditionis. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2(1), 65-71.
- Mujić, I., Alibabić, V., Travljanin, D. (2014.). Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda. Studiograf, Rijeka.
- Ozcan, M. (1999.). Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites*, 5, 395-398.
- Purdy, L.H., Grogan, R.C. (1954.). Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. *Phytopathology*, 44, 36-38.
- Sforcin, J.M., Bankova, V. (2011.): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253-260.
- Szliszka E., Czuba Z.P., Domino, M., Mazur, B., Zydowicz, G., Krol, W. (2009.). Ethanol extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules*, 14, 738-54.
- Vukadinović, V. (1994.): VVSTAT - računalni program za statističku obradu podataka. Poljoprivredni fakultet u Osijeku
- Znaor, D. (1996). Ekološka poljoprivreda. Nakladni zavod Globus. Zagreb
- Žugec, I., Jug, D., Stipešević, B. (2004). Ekološka poljoprivreda (alternativna poljoprivreda). Autorizirana predavanja. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
- Tringale, M., (1989.). Produzione e uso della propoli in agricoltura, cosmesi e medicina, Giunti Demetra
- Guginski-Piva1, C.A., Santos, I., Wagner, A.J., Winter Heck, D., Faber Flores, M., Pazolini, K. (2015.). Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber. *Idea*, 33, 39-47.
- Ghisalberti, E. L. (1979.). Propolis: A review». *Bee World*, 60, 59-84.

Original scientific study

Influence of alcoholic solution of propolis on growth of phytopathogenic fungi

Abstract

The use of propolis in ecological agriculture based on his antifungal activity. In this research we tested influence of alcoholic propolis on growth of mycelium of *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum*.

We have used 3 concentrations of propolis (0.5 %, 1 % i 2.5 %). Each of the used concentration has had lower or higher inhibitory influence on growth of phytopathogenic fungi. Full inhibitory activity on the growth of mycelium of *B. cinerea*, *A.brassicae* and *F. oxysporum* was recorded with concentration of 2.5 %, while growth was recorded at concentration of 0.5 %. On 1 % concentration there were statistically significant differences in the growth of the mycelium of fungi. All three concentrations had inhibitory effect on the growth of mycelium of *S. sclerotiorum*.

Key words: propolis, phytopathogenic fungi, inhibitory activity, mycelium growth