



## Volatile metabolites of endophytic fungi isolated from Brazilian Barbatimão tree

Gökalp İŞCAN \*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Farmakognozi Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, 26470, Eskişehir, Türkiye

### Abstract

Endophytic fungi live in a symbiotic association with higher plants and may improve the host resistance to biotic and/or abiotic stresses. Endophytes have a very rich biodiversity and they can synthesize so many bioactive metabolites. These simple natural molecules are challenging potential resources for the pharmaceutical, food and fragrance industries.

In the present study five endophytic fungi were isolated from barks and leaves of Brazilian native tree *Stryphodendron adstringens* and identified by molecular methods. The fungi were cultured in liquid media and the volatile compounds profile were determined by using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) techniques. Hydrocarbones and the terpenic compounds mono- and sesquiterpenes were detected as the main volatiles of the isolated fungus.

**Key words:** endophytes, headspace-solid phase micro-extraction, GC/MS, volatile organic compounds

----- \* -----

## Brezilya Barbatimão ağacından izole edilen endofitik fungusların uçucu metabolitleri

### Özet

Endofitik funguslar bitkilerle ortaklaşa bir yaşam sürdürmekle birlikte, onların biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı dirençlerini arttırmaktadırlar. Endofitik fungusların biyoçeşitliliği çok fazladır ve birçok biyoaktif bileşik sentezleyebilirler. Bu basit yapıya sahip doğal moleküller ilaç, gıda ve parfümeri endüstrisinin büyük ilgisini çekmektedir. Çalışmamızda Brezilya'nın yerel bir bitkisi olan *Stryphodendron adstringens*'in yaprak ve gövde kabuklarından 5 farklı endofitik fungus izole edilerek moleküler metodlar ile tanımlanmışlardır. Funguslar uygun sıvı besi ortamı içerisinde kültüre alınarak, ürettikleri uçucu madde profili tepe boşluğu-katı faz mikro-ekstraksiyon ve gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GK/KS) kullanılarak, ortaya konmuştur. İzole edilen fungusların terpen yapısında mono- ve sesquiterpenler ile hidrokarbon yapısında organik uçucu bileşikler ürettikleri saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** endofitler, tepe boşluğu-katı faz mikro-ekstraksiyonu, GK/KS, uçucu organik bileşikler

### 1. Giriş

Yeryüzünde mevcut fungus sayısının 1.5 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. İzole edilerek tanımlanan tür sayısı ise 100 bin civarındadır (Strobel 2003). Fungusların en yoğun buldukları bölgeler yağmur ormanları olup, çürükçül ve parazitik olanlar dışında, yüksek bitkilerin çeşitli organ ve dokularında büyük çeşitlilik ve sayıda fungus mevcuttur. Bitki bilimcilerin son 20 yıldır önemini fark ettikleri bu canlılar endofitlerdir (Sieber, 2007).

Endofitik funguslar simbiyotik özellikte canlılardır ve birlikte yaşadıkları bitkilerin doku ve hücreler arası boşluklarında bitkiye herhangi bir zarar vermeden kolonize olmuşlardır (Tan ve Zou, 2001). Genellikle Ascomycota, Basidiomycota ve Zygomycota taksonlarına ait üyelerden oluşmaktadırlar (Carvalho vd., 2012).

Özellikle tıbbi önemi olan bitkilerde kolonize olmuş endofitik funguslar, çok değerli antikanser bir bileşik olan paklitakselin *Taxus brevifolia* (Porsuk ağacı) gövde kabuğundan izole edilen endofitler tarafından üretildiğinin ortaya konmasından sonra büyük önem kazanmıştır (Stierle vd. 1995). Yapılan çok sayıda çalışma ile endofitik

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902223350580/3709; Fax.: +902223350580; E-mail: giscan@anadolu.edu.tr

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

mikroorganizma metabolitlerinin ilaç, gıda, tarım, veterinerlik, kozmetik, tat ve koku sanayiinde kullanılabilir olacak alkaloid, flavonoid, steroid (Kumar ve Kaushik, 2012), kinon, kumarin, ksanton, fenol ve terpen yapısında büyük çeşitlilik arz eden kıymetli moleküller oldukları belirlenmiştir (Strobel ve Daisy, 2003).

Yüksek çeşitlilik oranında sahip endofitlerin ürettikleri metabolitlerin profili de yaşadığı ortamın eşsiz kimyasal karakterine bağlıdır (Kompe ve Mutlu, 2017). Endofitik funguslar yaşadıkları bitkide doğal olarak bulunan metabolitleri ürettiklerideki gibi, benzer yapıda türevlerini de sentezleyebilirler. Yapılan çalışmalarda konakçı bitki ve fungus tarafından üretilen ortak fitokimyasalların sentezinden sorumlu bazı genlerin, endofit fungusların genomunda da bulunduğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2006).

Endofitik sekonder metabolitler genellikle, bitkinin gelişimi ve çoğalması için anahtar rol oynarken, hastalıklara, zararlı organizmalara ve ortamın olumsuz koşullarına karşı bitkinin direncini arttıran belirli bir aktiviteye sahip maddelerdir (Duan vd., 2013). Özellikle patojenik mikroorganizmalara ve böceklerle olan dirençten sorumlu biyoaktif her bir bileşik potansiyel ilaç adayı moleküllerdir (Schulz ve Boyle, 2005). Tanımlanmış fungusların dışında yüzbinlerce endofit türü ve onlara ait biyoaktif metabolit keşfedilmeyi beklemektedir (Suryanarayanan vd., 2009). Yapılan çalışmalarda endofitik fungus metabolitlerinin kuvvetli biyolojik etkiler yanında, tat ve koku endüstrilerinin de ilgisini çekebilecek uçucu yapıda ve farklı koku özelliklerine sahip kıymetli moleküller ürettikleri bildirilmektedir. Bu metabolitler genellikle bitki uçucu yağlarının bileşimlerinde bulunan monoterpen ve seskiterpenlerin de yer aldığı hidrokarbon yapısında “uçucu organik bileşikler” olarak bilinmektedir (Rundel vd., 2015; Ting vd., 2010).

Brezilya’da oldukça yaygın olarak yetişen ve “barbatimão” yerel ismi ile anılan *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) tanenlerin dolayı kullanımı olan tıbbi bir bitkidir. Yaprak ve gövdenin sulu ekstratları yerel halk tarafından ağrı kesici, kabız, ödem giderici ve antiseptik olarak kullanılmaktadır (Melo vd., 2007). Cilt hastalıkları ve parazit enfeksiyonlarında da kullanımı bildirilen ağacın kabukları ve yapraklarının yapılan çalışmalarda endofitik funguslar bakımından yüksek bir biyoçeşitliliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Carvalho vd., 2012).

Çalışmamızda, Brezilya, Belo Horizonte kenti civarında Brezilya Savanı olarak isimlendirilen alanlarda yetişmekte olan, tıbbi özelliklere sahip *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, ağacının yaprak ve gövde kabuklarından örnekler alınmış, uygun koşullarda endofitik fungusları izole edilmiştir. İzole edilen fungusların rDNA (ITS) bölgeleri, ITS 1 ve ITS 4 geri primerleri kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yardımıyla çoğaltılmış, ilgili bölgenin dizi analizi ile incelenmesi ile taksonomik olarak en az cins düzeyinde tanımlanmışlardır. Hızlı gelişen ılımlı funguslar seçilerek sıvı besi ortamında 7 gün boyunca kültüre alınmış, tamamen geliştikleri günlerde tepe boşluğu-katı faz mikro-ekstraksiyon şırıngası ile örnekleme yapılmıştır. Alınan örnekler gaz kromatografisi/kütle spektrometresinde analiz edilerek endofitik fungus kültürünün tepe boşluğunda bulunan uçucu bileşiklerinin profili çıkarılmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Bitkisel materyal ve endofit izolasyonu

Ocak 2013 tarihinde Brezilya’nın Belo Horizonte kenti civarında Brezilya savanı olarak bilinen bölgelerde doğal olarak yetişen *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) türüne ait 5 farklı ağaca ait yaprak ve gövde kabuğu örnekleri alınmıştır. Örnekler laboratuvara getirilene kadar kilitli poşetlerde 10°C’de 24 saat muhafaza edilmiştir. Örnekler, steril kabin içerisinde steril bistiiri ile 5-10 mm uzunluğunda parçalara ayrılmıştır. Dış kabukların 0.5-1 cm derinlikte olan fellemleri kullanılmıştır. Tüm parçalar steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyonuna tabii tutulmuştur. Bunun için ilk önce steril falkon tüplerinde hazırlanmış olan %70’lik Etanol’de 1 dakika, ardından Sodyum hipoklorit (%2) çözeltisi içerisinde 3 dk, son olarak tekrar %70 EtOH’de 1 dk. tutulmuştur. Örnekler steril pens yardımı ile tutularak en son steril distile su içerisinde yıkanmıştır. Yıkanan örnekler Patates Dekstroz Agar (PDA) plaklarına, petri başına en fazla 5 örnek olacak biçimde aktarılmıştır. Yıkama suları sterilizasyon kontrolü olarak yine PDA plaklarına aktarılmıştır. Plaklar iki tekrarlı olacak şekilde hazırlanarak, 25°C’de 20-25 gün inkübasyona bırakılmıştır. 1-2 gün içerisinde hızlı gelişme gözlenen plaklar, muhtemel epifit veya çürükçül fungus olması gerekçesiyle atılmıştır. Ortalama olarak 5-10 gün içerisinde doku içinden besi ortamına doğru uzanan miseller şeklinde gelişme gösteren örnekler için plaklar endofit olarak belirlenmiştir (Carvalho vd. 2012). Tüm kültürler, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozik Kültür Koleksiyonu ile Brezilya, Federal de Minas Gerais Üniversitesi, Mikroorganizma ve Hücre Koleksiyonlarında saklanmaktadır.

### 2.2. Endofit kültürü ve örnekleme

25 günlük inkübasyon süresi sonunda morfolojik olarak aynı olan küfler tek örneğe indirilerek tüm izolatlar saf kültür eldesi için pasajlanmış ve ayrı ayrı kodlanarak stoğa çekilmiştir. PDA petrilerinde steril delici ile kesilen küf ve besi ortamı diskleri aseptik şartlarda içerisinde distile su bulunan steril cam flakonlara çekilerek, alüminyum kapaklar ile zımbalanmış oda sıcaklığında karanlık ortamda “Castellani” yöntemine göre stoklanmıştır (de Capriles vd., 1989). Uzun süreli saklama için, fungus sporlu miselleri içinde %30 steril gliserol bulunan mikro reaksiyon tüplerine aktararak, -85°C’de muhafaza edilmiştir.

Stoklardan alınan örnekler, içinde 200 mL Sabouraud Glikoz Broth (SGB) içeren erlenlere aşılanarak, 25°C’de çalkalamalı etüvde (150 rpm) 10 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. Kültürlerin tam olarak geliştikleri eksponansiyal dönemlerinde örnekleme yapılarak tepe boşluğu katı faz mikro ekstraksiyon şırıngası ile örnekleme yapılmıştır. Diğer izolatlara göre hızlı ve verimli gelişim gösteren ve zengin uçucu bileşenlere sahip *Guignardia mangiferae* türü tekrar kültüre alınarak, 3, 5, 7, 9 ve 11. günlerde örnekleme yapılmış, uçucu bileşiklerinin zaman içerisinde değişimi izlenmiştir. Sıvı besiyortamı buharlaşmanın kolaylaşması için ekstraksiyon süresince için 40 °C’de tutulmuş, balonun ağzı parafilm ile kapatılmıştır. Şırınga ucu parafilm delinerek içeri sokulmuş, silika fiber adsorban uç açılarak 15 dk. ekstraksiyon için beklenmiştir.

### 2.3. Uçucu organik bileşiklerin tayini

Ekstraksiyon işlemi sonrasında, mavi uç mikro-ekstraksiyon şırıngası (CAR/PDMS, SUPELCO) gaz kromatografisi/kütle spektrometresi enjeksiyon portuna yerleştirilerek, aşağıda verilen şartlarda analiz edilmiştir. Uçucu bileşiklerin tayini, Agilent 5975 GC-MSD sistemi ile HP-Innowax kolon (60 m x 0,25 mm Ø, 0,25 µm film kalınlığı) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Otomatik enjektör aparatı çıkarılarak, katı faz mikro ekstraksiyon şırıngası manuel olarak enjeksiyon portuna yerleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır (0,8 mL/dak). Gaz kromatografisi firmı sıcaklığı ilk önce 60°C de 10 dk. tutulmuş ve dakikada 4 °C artışla önce 220 °C’ye artırılmış, ardından bu sıcaklıkta 10 dk. beklendikten sonra dakikada 1 °C artışla 240 °C’ye çıkması sağlanmıştır. Split oranı 40:1, enjeksiyon sıcaklığı 250 °C’ye ayarlanmıştır. Kütle tarama aralığı (70 eV) 35-450 *m/z* olarak ayarlanmıştır. Saptanan bileşiklerin tanımlanmasında Wiley, Adams, MassFinder 3 ticari kütüphaneleri (McLafferty vd., 1989; Joulain ve König, 1998) ile 3300 civarında standart maddenin yer aldığı “Başer Uçucu Bileşenler Kütüphanesi” kullanılmıştır.

### 2.4. Endofit fungusların moleküler yöntemler ile tanımlanması

Saflaştırılmış fungal kültürlerin DNA izolasyonları ve dizilenmesi işlemi Rosa vd., (2009) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. ITS1 ve ITS 4 primerleri SSU ve LSU arasındaki ITS bölgelerinin (ITS1-5.8SITS2) çoğaltılması için kullanılmıştır. İleri primer olarak kullanılan ITS-1’e ait dizi 5’-TTC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’ iken geri primer olarak kullanılan ITS-4’e ait dizi 5’- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3’ şeklindedir (White et al. 1990). Polimeraz Zincir Reaksiyonları hazırlanırken 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksiniükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 1 unite Taq DNA polimeraz enzimi ve 3-5 µl template DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. Reaksiyonlar 35 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve 95 °C de 2 dakika ön denatürasyon sonrasında her döngü için uygulanan şartlar da şu şekilde ayarlanmıştır; 95 °C de 60 saniye denatürasyon, 55 °C de 45 saniye primerlerin bağlanması ve 72 °C de 1.5 dakika dizilerin uzaması. 35 döngü sonrasında son uzama için 72 °C de 5 dakika uygulanmıştır.

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jellerde yürütülmüşlerdir. Tüm jellerde DNA’nın gözlenebilmesi amacıyla jeller, 0.5 µg/µl konsantrasyonlu etidyum bromid solusyonları içinde 15 dakika bekletildikten sonra 10 dakika kadar da distile su içerisinde tutulmuş ve UV transilluminatör ile gözlenip fotoğraflanmışlardır. Dizileme işlemi sonrası konsensüs dizilerin eldesi için Bioedit v.7.0.5.3 yazılımı kullanılmıştır. Tür tayini için rRNA dizilerinden faydalanılmış, Fasta 2.0 programı yardımıyla “BLASTn Search” taraması yapılmış ve olası türler belirlenmiştir. % 98 ve üstü benzerlikler tür tanımında alt sınır olarak belirlenmiştir.

## 3. Bulgular

Saflaştırılmış fungal kültürlerden en hızlı ve kolay üreyen morfolojik olarak da birbirinden farklı beş izolat seçilmiş, DNA izolasyonları ve dizilenmesi işlemi yapılmıştır. Yapılan taramalar sonucunda izolatlar *Neofusicoccum* sp., *Diaphora* sp., *Valsaceae* sp., *Phomopsis* sp. ve *Guignardia mangifera* olarak tanımlanmıştır. Stoktan çıkarılan, her bir izolat Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besi ortamında canlandırılarak, morfolojik kontrolleri yapılmış ve çift kopya olacak şekilde Sabouraud Glukoz Broth (SGB) besi ortamına inoküle edilmiştir. Tür düzeyinde tayini yapılan *Guignardia mangifera* 11 gün olmak üzere tüm izolatlar inkübasyona bırakılmış, gelişmelerinin en iyi olduğu yedinci günlerinde tepe boşluğu- katı faz mikro ekstraksiyon /gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi yöntemi kullanılarak uçucu bileşikleri belirlenmiştir (Çizelge 1). Tür düzeyinde tanımlanan, erken gelişme gösteren ve uçucu bileşikleri bakımında zengin olduğu belirlenen *Guignardia mangifera* tekrar 11 gün inkübe edilmiş, belirli günlerde (3, 5, 7, 9 ve 11) örnekleme ve analiz yapılmıştır.

GK/KS sonuçlarına göre, izoamil alkol’ün *Valsaceae* sp. izolatu hariç, diğer 4 fungusun ana bileşeni (%65-86) olduğu saptanmıştır. Fenil etil alkol (%5-10.2), 2-propanol (%15.7), 2-metil-propan-1-ol (%5.2) ve dodekanol diğer ortak majör bileşikler olarak belirlenmiştir. *Valsaceae* sp., diğer tüm izolatlardan farklı olarak seskiterpenlerden oluşan bir profil ortaya koymuştur. Ana bileşenler olarak β-himakalen (% 41.0), kuparen (%9.8) ve α-paçulen % 6.7 saptanmıştır.

Çizelge 1. İzole edilen Endofitlerin Tepe Boşluğu Katı Faz Mikroekstraksiyon-Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi yöntemi ile belirlenen uçucu bileşikleri

<i>Neofusicoccum</i> sp.	<i>Diaphorte</i> sp.	<i>Valsaceae</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Guignardia mangifera</i>
İzoamil alkol %74	İzoamil alkol %65,2	β-Himakalen % 41,0	İzoamil alkol %86,0	İzoamil alkol %86,0
2-Propanol %15,7	Fenil etil alkol %22,1	β-Kamigren %17,0	Fenil etil alkol %10,2	2-Propanol %15,7
2-Metil-propan-1-ol %5,6	α-Muurolen % 7,9	Kuparene %9,8	2-Undekanon %2,7	2-Metil-propan-1-ol, %5,6
Fenil etil alkol %5	γ-Kadinen 0,8	α-Paçulen % 6,7	1-Dodekanol 0,42%	Fenil etil alkol %4,9
	Linalool %0,43	α-Barbaten %3,0	Tridekan %0,38	Sedril metil eter %0,2
	γ-Muurolene 0,4	β-Akoradien %2,2	Dodekanal %0,24	Dodekanol %0,1
	Dodekanol %0,47	β-Kuprenen % 1,7		
		β-Barbaten %1,1		
		α-Akoradien %1,0		
		β-Bisabolen % 0,7		
		Selina-4,11-dien %0,3		
		M1 %8,8		
		M2 %5,5		

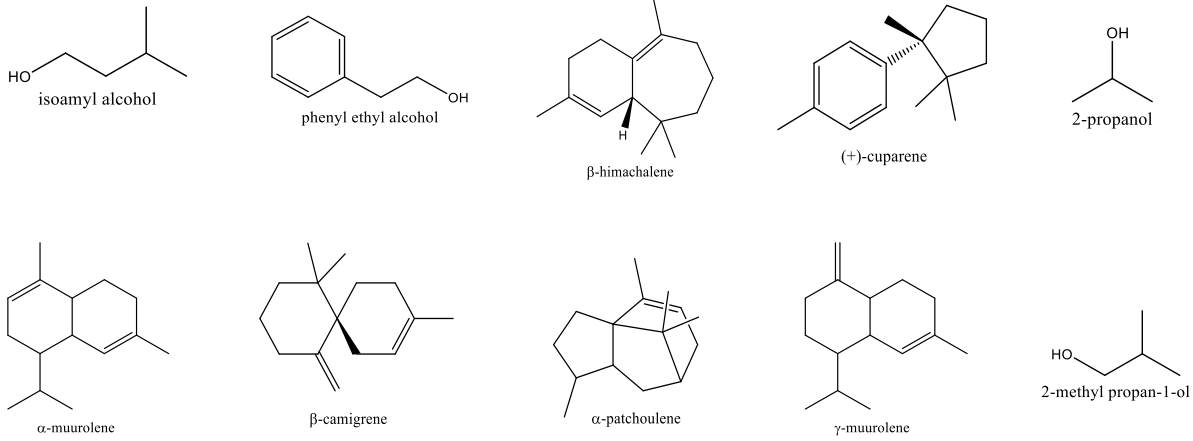
M1: Tanımlanamayan bileşik-1 (Temel pik: 105; MA<sup>+</sup>: 204), M2: Tanımlanamayan bileşik-2 (Temel pik: 96; MA<sup>+</sup>: 204)

11 gün boyunca inkübasyona devam edilerek, uçucu madde profilinin zaman içinde değişiminin incelendiği *Guignardia mangifera*'nın SGB içerisinde 9. Güne kadar diğer izolatlara benzer profile sahip olduğu, 11. Günden itibaren izoamil alkol'un miktarının büyük oranda azalarak farklı bileşiklere dönüştüğü görülmüştür. Ortam şartlarının olumsuzlaşmaya başladığı, 11. günden itibaren ilginç olarak *p*-simen saptanmıştır (Çizelge 2). Yine benzer şekilde 9. ve 11. günlerde yapılan analizlerde linalil asetat ve linalol saptanmıştır. Ayrıca 5. günden itibaren, sedrol türevi bir bileşik olan sedril metil eter oluştuğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. *Guignardia mangifera*'nın belirlenen majör uçucu bileşikleri ve relatif yüzdeleri

Bileşikler	%				
	3.gün	5. gün	7.gün	9.gün	11. gün
izoamil alkol	72.0	72.1	76.0	77.0	50.3
2-propanol	9.9	17.5	15.8	12.8	12.9
2-metil-propan-1-ol	2.2	2.4	2.6	2.9	16.6
<i>p</i> -simen	-	-	-	-	11.8
2-heptanon	1.9	<i>tr</i>	-	-	-
1-hekzanol	0.7	0.3	-	-	-
linalol	-	-	-	0.6	0.52
linalil asetat	-	-	-	0.3	0.27
2-nonanon	7.9	0.25	-	-	-
5-nonen-2-on	2.1	0.2	-	-	-
α-terpinil asetat	-	-	-	-	0.16
sedril metil eter	-	0.3	0.4	0.4	0.9
2-nonanol	0.6	-	-	-	-
fenil etil alkol	0.9	2.3	4.9	4.3	6.0
1-dodekanol	-	1.36	0.1	0.1	-
izopropil miristat	-	0.47	-	-	-
1-tetradekanol	-	0.1	-	-	-
<b>% Toplam</b>	<b>98.2</b>	<b>97.38</b>	<b>99.6</b>	<b>98.4</b>	<b>99.45</b>

*tr*: Eser miktarda <%0.1, - : tespit edilmedi



Şekil 1. İzole edilen endofit kültürlerinde saptanan uçucu ana bileşikler

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Zengin tanen içeriğine sahip, yetiştiği bölgede halk ilacı olarak kullanılan *Stryphnodendron adstringens*'in gövde kabuklarından izole edilen 5 endofitik fungus sıvı besi ortamında geliştirilmiş, yapılan kromato-spektroskopik analizler sonucu çok farklı yapı ve miktarda uçucu organik bileşikler ürettikleri belirlenmiştir. Bu maddelerin genellikle hidrokarbon yapıları basit bileşikler ile bitkisel uçucu yağlarda çok yaygın olarak bulunan bazı mono- ve seskiterpenler oldukları görülmüştür. *Guignardia mangifera*'nın izoamil alkol yanında, lavanta uçucu yağının ana bileşenleri olan ve lavantanın kendine has kokusundan sorumlu, parfümeri ve kozmetik sanayiinde geniş kullanımı olan linalol ve linalil asetat'ı ürettiği görülmüştür. Yine aynı fungusun, kekik, çörek otu, kimyon gibi aromatik bitkilerin uçucu yağlarında ana bileşikler olarak bulunan *p*-simen isimli monoterpeni de ürettiği saptanmıştır. İnkübasyonun üçüncü gününde oluştuğu belirlenen sedril metil eter ise sedir ağaçları uçucu yağında bulunan sedrol'ün yarı sentetik bir türevidir. Düşük miktarda da olsa (% 0,9) sedril metil eterin doğal olarak bir fungus tarafından üretildiği ilk kez bu çalışma ile gösterilmektedir.

Seskiterpenler doğada yaygın olarak bulunan çeşitli biyolojik etkilere ve koku özelliklerine sahip, ilaç, gıda ve parfümeri sanayilerinde yaygın kullanımı olan 15 karbonlu terpenik bileşiklerdir. İzolatlarımızdan *Valsaceae* sp. kültürünün diğer izolatlardan farkı olarak uçucu organik bileşik profilinde yoğun olarak seskiterpenler tespit edilmiştir ( $\beta$ -himachalene % 41, kuparene % 9,8 ve  $\alpha$ -paçulen % 6,7). Ana bileşen olan  $\beta$ -himachalene *Cedrus* türlerinde ana bileşen olarak bulunan seskiterpenlerdendir (Chaudhary vd., 2009). Bir diğer ana bileşen olarak tespit edilen  $\alpha$ -paçulen ise parfümeri endüstrisinde kullanılan ve oldukça kıymetli olan doğal paçuli yağının bileşenlerindedir (Swamy ve Sinniah, 2015).

*Valsaceae* sp. dışında izole edilen diğer tüm fungusların ana bileşenleri olarak izoamil alkol ve fenil etil alkol saptanmıştır. İzoamil alkol önceleri likör sanayiinde amil asetat (muz esansı) üretiminde kullanılan yüksek kaynama noktasına sahip bir alkoldür. Günümüzde parfümeri ve kozmetik sanayiinde geniş kullanımı olan bu bileşik ve esteri amil asetat, ayrıca gıda sanayiinde özellikle alkollü içkilerde sentetik aroma maddelerinin hazırlanmasında kullanılan kıymetli aroma molekülleridir (Torres vd., 2010). Yapılan benzer bir çalışmada tropikal çevrelerden izole edilen mayaların uçucu organik bileşikleri ortaya konmuş, elde edilen 40 ayrı izolatta ana bileşenler olarak izoamil alkol ve amil alkol tespit edilmiştir (Buzzini vd., 2003).

Çalışmamızda saptanan bir diğer ana bileşen, fenil etil alkol doğada yaygın olarak bulunan çiçek kokusuna sahip, özellikle de ticari gül yağı eldesinde kullanılan gül türlerinde mevcut, ticari öneme sahip kıymetli aromatik bir maddedir. Fenil etil alkol su distilasyonu ile elde edilen gül uçucu yağında %1'in altında oranlarda bulunurken, tepe boşluğu ekstraksiyonu ile analiz edilen gül petalleri örneklerinde ve gül suyunda ana bileşen olarak saptanmaktadır (Baydar ve Erbaş, 2016). Çalışmamızda izole edilen funguslar tarafından kültür ortamında %5 ile %21 arasında değişen oranlarda fenil alkol üretildiği belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan tepe boşluğu katı faz mikroekstraksiyon yöntemi ile izole edilen uçucu organik bileşiklerin belirlendiği benzer çalışmalarda endofit funguslardan 3-oktanon, 3-oktanol ve 7-okten-4-ol gibi hidrokarbonlar (Banerjee vd., 2010), kuvvetli antimikrobiyal etkilere sahip naftalen türevleri (Ezra vd., 2004), sikloheksan, propanol, bütanol, etanol ve bunların etil esterleri (Roze vd., 2012; Prenafeta-Boldú vd., 2001), benzen türevleri, organik asitler, oksijenli ve oksijensiz çok sayıda monoterpen (Morath, vd., 2012) ve seskiterpenlerin (Oliviera vd., 2015) endofitik funguslar tarafından üretildiği rapor edilmektedir.

Günümüzde, üzerinde yoğun araştırmaların yapıldığı antibiyotikler ve kanser ilaçlarına alternatif olabilecek doğadan yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi büyük önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra yapılan birçok doğal madde kimyası araştırmalarında yeni tat ve koku bileşiklerinin de doğal yollarla elde edilebileceği ortaya konmuştur. Doğada varlığı bilinen ancak çok nadir olarak bulunan, elde edildiği canlı türünün devamlılığını tehdit eden veya doğadan sağlanmasının ekonomik olmayan maddelerin genellikle sentetik analogları veya yarı sentetik türevleri tercih

edilmektedir (Vasundhara, vd., 2016). Ancak son 20 yılda doğal olanın daha sağlıklı olduğu inancıyla birlikte, doğal ilaç, koku ve tat hammaddelerine yönelim de büyük oranda artmıştır (Tejesvi, vd., 2007). Sentetik olarak üretilen veya doğadan verimsiz şekilde elde edilen bir molekülün laboratuvar ortamında bir mikroorganizma veya bitki kültürü tarafından kolayca ve bol miktarda üretiminin sağlanması ilaç, gıda ve kozmetik sanayii için büyük önem arz etmekte ve bu şekilde üretilen maddeler doğal kabul edilmektedir (Stobel vd., 2004).

Ülkemizin coğrafik ve iklimsel koşulları ile sahip olduğumuz bitki çeşitliliği düşünüldüğünde, bu bitkilerden izole edilebilecek binlerce endofitik fungus ve muhtemel biyoaktif metabolitleri araştırılmayı bekleyen zenginliklerimizdir. Bu alanda yapılacak fungal taksonomi, doğal madde kimyası ve biyoaktivite çalışmaları, ülkemizdeki endofitik fungus çeşitliliğini ortaya koyacak ve bu canlıların ürettikleri sekonder metabolitler aydınlatılarak ilaç, gıda ve kozmetik sanayiine yeni aday moleküller sunulabilecektir.

### Teşekkür

Endofit fungus metabolitleri ile çalışma fikrini bana veren kıymetli hocam Prof. Dr. Neşe Kırimer'e, laboratuvarında bana çalışma imkânı tanıyan Brezilya, Belo Horizonte kenti, Federal Minas Gerais Üniversitesi, Mikrobiyoloji Bölümü araştırmacılarından Prof. Dr. Luis H. ROSA ve Dr. Vivian Gonçalves'e, ve çalışmaya verdiği kıymetli katkıları için Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye, teşekkürlerimi sunarım.

### Kaynaklar

- Banerjee, D., Strobel, G. A., Booth, B., Sears, J., Spakowicz, D., Busse, S. (2010). An endophytic *Myrothecium inundatum* producing volatile organic compounds. *Mycosphere*, 1(3), 241-247.
- Baydar, H., Erbaş, S. (2016). Yağ Gülü (*Rosa damascena* Mill.)'nde Tepe Boşluğu Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (HS-SPME) ve Konvansiyonel Su Distilasyonu Yöntemleri ile Elde Edilen Uçucu Bileşenlerin Karşılaştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1), 27-36.
- Buzzini, P., Martini, A., Cappelli, F., Pagnoni, U.M., Davoli, P. (2003). A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(4), 301-311.
- Carvalho, C. R., Gonçalves, V. N., Pereira, C. B., Johann, S., Galliza, I. V., Alves, T. M., Rabello, A., Sobral, Zani, C.L., M.E.G., Rosa, C. A., Rosa, L. H. (2012). The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, 57(2), 95-107.
- Chaudhary, A., Kaur, P., Singh, B., Pathania, V. (2009). Chemical composition of hydrodistilled and solvent volatiles extracted from woodchips of Himalayan *Cedrus: Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. *Natural Product Communications*, 4(9), 1257-1260.
- de Capriles, C. H., Mata, S., Middelveen, M. (1989). Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 106(2), 73-79.
- Duan, J. L., Li, X. J., Gao, J. M., Wang, D. S., Yan, Y., Xue, Q. H. (2013). Isolation and identification of endophytic bacteria from root tissues of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and determination of their bioactivities. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1501-1512.
- Ezra, D., Hess, W. M., Strobel, G. A. (2004). New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 150(12), 4023-4031.
- Joulain, D., König, W. A. (1998). The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. Hamburg, EB-Verlag.
- Kompe Özden, Y., Akın Mutlu, V. (2017). Mycorrhizal diversity in some species of *Dactylorhiza* genus (Orchidaceae). *Biological Diversity and Conservation*, 10(1), 55-64.
- Kumar, S., Kaushik, N. (2012). Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochemistry Reviews*, 11(4), 507-522.
- McLafferty, F. W., Stauffer, D. B., Stenhagen, E., Abrahamsson, S., Heller, S. R., Milne, G. W. (1989). The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data: Vol. 1., New York, John Wiley & Sons.
- Melo J. O., Endo T. H., Bersani-Amado L. E., Svidzinski A. E., Baroni S., Palazzo de Mello J. C., Bersani-Amado C. A. (2007). Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(3), 465-469.
- Morath, S. U., Hung, R., Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2), 73-83.
- Prenafeta-Boldú, F. X., Andrea, K. U. H. N., Luykx, D. M., Heidrun, A. N. K. E., van Groenestijn, J. W. (2001). Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycological Research*, 105(04), 477-484.
- Rosa, L. H., Vaz, A. B., Caligiorno, R.B., Campolina, S., Rosa, C.A. (2009). Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biology*, 32(2), 161-167.

- Roze, L. V., Beaudry, R. M., Linz, J. E. (2012). Analysis of volatile compounds emitted by filamentous fungi using solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols*, 133-142.
- Schulz, B., Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(06), 661-686.
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21(2), 75-89.
- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P., Bignami, G. (1995). The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal Natural Products*, 58, 1315–1324
- Strobel A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products, *Microbes and Infection*, 5, 535–544.
- Strobel, G. A. Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67, 491–502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms I. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257-268.
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R., Murali, T.S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23, 9-19
- Swamy, M. K., Sinniah, U. R. (2015). A Comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. *Molecules*, 20, 8521-8547.
- Tan, R. X., Zou, W. X. (2001), Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4), 448-459.
- Ting, A. S. Y., Mah, S. W., Tee, C.S. (2010). Identification of volatile metabolites from fungal endophytes with biocontrol potential towards *Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense* race 4. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(2), 177-182.
- Torres, V.D., Pandey, A., Castro, G.R. (2011). Banana flavor: insights into isoamyl acetate production; In book: *Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues* (Cohen, A.E.). Hauppauge, N.Y. Nova Publishers.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5), 753-771.

(Received for publication 12 December 2016; The date of publication 15 August 2017)