

MARTA ALEKSANDROWICZ-TRZCIŃSKA, EWELINA HALLMANN

Cebula (*Allium cepa* L.) jako biologiczny środek ochrony roślin w szkółkach leśnych

Onion (*Allium cepa* L.) as a biological agent of plant protection in forest nurseries

ABSTRACT

Aleksandrowicz-Trzcńska M., Hallmann E. 2013. Cebula (*Allium cepa* L.) jako biologiczny środek ochrony roślin w szkółkach leśnych. Sylwan 157 (7): 495-505.

The paper discusses the biologically active compounds contained in onion (*Allium cepa* L.) such as thiosulfinates and other organosulfur compounds, saponins and flavonoids as well as evaluates their biological role. Method for biofungicides preparation, whose essential element is an aqueous extract of onion, and the possibility of its application in forest nurseries are presented. Content of polyphenols (quercetin and its derivatives) in a biopreparation responsible for its biological activity is determined as well.

KEY WORDS

Allium cepa, biofungicide, thiosulphinates, saponins, flavonoids, quercetin

ADDRESSES

Marta Aleksandrowicz-Trzcńska ⁽¹⁾ – e-mail: marta_aleksandrowicz_trzcinska@sggw.pl
Ewelina Hallmann ⁽²⁾ – e-mail: ewelina_hallmann@sggw.pl

⁽¹⁾ Katedra Ochrony Lasu i Ekologii; SGGW w Warszawie; ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa

⁽²⁾ Katedra Żywności Funkcjonalnej i Towaroznawstwa; SGGW w Warszawie; ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa

Wstęp

Ogólnoświatowe tendencje w kierowaniu się we wszelkiej działalności człowieka ochroną środowiska oraz zdrowia ludzi i zwierząt wyrażają się, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych, nie tylko zmianami w prawodawstwie, ale również w proekologicznej mentalności społeczeństwa. Zgodnie z tymi kierunkami oraz z uregulowaniami prawnymi obowiązującymi w Unii Europejskiej, w ochronie roślin zaleca się ograniczanie chemicznych metod na rzecz metod niechemicznych (profilaktycznych, hodowlanych) oraz biologicznych.

Biologiczne metody ochrony roślin polegają na zastosowaniu organizmów niepatogenicznych w ograniczaniu lub zwalczaniu organizmów szkodliwych w produkcji roślinnej [Okorski 2007]. Wiele biologicznych środków ochrony roślin nie tylko skutecznie chroni je przed chorobami, lecz również działa jako stymulatory wzrostu i rozwoju [Horoszkiewicz-Janka, Jajor 2006; Placek i in. 2009]. Dużą grupę środków biologicznych stanowią wyciągi roślinne. Obecnie stosowanych jest w Europie kilka preparatów wykorzystujących naturalne substancje roślinne. Biosept 33 SL i Grevit 200 SL zawierają ekstrakt z nasion i miąższu z grejpfruta [Ostrowska, Robak 2008; Oszaiko i in 2009], Kelpak i Bio-algeen S 90 Plus 2 – wyciąg z brunatnicy *Ecklonia maxima* [Matysiak, Adamczewski 2006], Timorex i BM 608 – olej melaleuca (olej z drzewa herbacianego *Melaleuca alternifolia*), Prev-AM 060 SL – olej z pomarańczy [Ostrowska, Robak 2008], a Sincocin Al – wyciąg z roślin pustynnych (*Quercus falcata*, *Opuntia lindheimeri*, *Rhus aromatica*,

Rhizophoria mangle) [Duda i in. 2000]. Jednocześnie prowadzone są badania nad możliwością wykorzystania ekstraktów konopi siewnych (*Cannabis sativa*) [Dorna i in. 2010], roślin z rodziny baldaszkowatych (kopru ogrodowego, pietruszki, pasternaku, barszczu Sosnowskiego i zwyczajnego) [Piotrowski i in. 1995; Sas-Piotrowska, Piotrowski 1996; Moliszewska, Burgiel 1998], a także ekstraktów z aronii czarnej, bielunia dziędzierzawy, dziurawca zwyczajnego, jeżyny krzewiastej, konwalii majowej, lawendy lekarskiej czy maliny właściwej [Masny i in. 2006]. Duże zainteresowanie badaczy w aspekcie wykorzystania jako biologiczne środki ochrony roślin budzą przedstawiciele z rodzaju *Allium*, szczególnie czosnek (*Allium sativa*) i cebula (*Allium cepa*). Obie rośliny od ponad 6000 lat są wykorzystywane przez człowieka nie tylko jako składnik żywnościowy szeroko stosowany w dietetyce, ale również w medycynie [Dorsch 1996/97]. Obecnie czosnek jest stosowany w Polsce w ochronie roślin w postaci biopreparatów Bioczos BR i Biochron AL [Burgiel 2005]. Możliwości zastosowania cebuli w ochronie roślin są obecnie dużo mniejsze.

Celem pracy jest przedstawienie związków chemicznych zawartych w cebuli i ich biologicznych właściwości oraz możliwości aplikacji wyciągu wodnego jako środka ochrony roślin.

Związki chemiczne biologicznie czynne występujące w cebuli

TIOSULFINATY I INNE ORGANICZNE ZWIĄZKI SIARKI. Tiosulfinaty są dobrze poznanymi związkami występującymi w roślinach z rodzaju *Allium*. Powstają w wyniku uszkodzenia tkanek roślin i decydują o charakterystycznym smaku i zapachu, a w przypadku cebuli dodatkowo są czynnikiem powodującym łzawienie oczu [Selby i in. 1979; Block i in. 1993; Jones i in. 2004]. Związki te powstają w wyniku reakcji enzymu alliinazy obecnego w wakuolach i zlokalizowanych w cytoplazmie prekursorów tych związków. Tiosulfinaty powstające w roślinach poszczególnych gatunków różnią się z powodu odmienności w strukturze i ilości związków będących ich prekursorami. W czosnku, w wyniku reakcji alliiny (prekursora tiosulfinatów obecnego w cytoplazmie) i enzymu alliinazy powstaje allicyna, która jest związkiem lotnym i niestabilnym, ulegającym przemianie między innymi do ajoenu, dwusiarczku dwuallylu i trójsiarczku dwuallylu [Jones i in. 2004; Lanzotti 2006]. Zawartości allicyny i ajoenu czosnek zawdzięcza szerokie zastosowanie w medycynie i ochronie roślin [Yoshida i in. 1987; Ankri, Mirelman 1999; Slusarenko i in. 2008]. Natomiast w cebuli, po uszkodzeniu tkanek, obecna w cytoplazmie isoalliina w reakcji z alliinazą powoduje powstanie tiosulfinatów, będących analogami allicyny oraz m.in. zwiebelanów i cepenin [Benkeblia, Lanzotti 2007; Corzo-Martínez i in. 2007].

Zawartość tiosulfinatów i innych związków siarkoorganicznych zależy od odmiany cebuli. Najwięcej znajduje się w cebuli żółtej, mniej w czerwonej, a najmniej w białej. Innymi czynnikami kształtującymi zawartość tych związków są warunki wzrostu, termin zbioru czy długość przechowywania. W cieplejszym klimacie i przy wyższych dawkach nawozów zawierających siarkę zawartość tiosulfinatów jest wyższa [Breu 1996; Benkeblia, Lanzotti 2007].

Tiosulfinaty i inne związki siarkoorganiczne są związkami lotnymi. Najwyższe ich stężenie w ekstrakcie występuje, w zależności od rodzaju związku, od 2 minut do 4 godzin po uszkodzeniu tkanek. Zamrożenie ekstraktu w temperaturze -20°C lub niższej nie powoduje rozkładu zawartych w nim związków przez co najmniej 27 tygodni [Breu 1996].

Aktywne biologicznie związki tworzące się w wyniku skaryfikacji cebuli posiadają m.in. właściwości przeciwzapalne oraz leczące choroby układu oddechowego, co pozwala na ich szerokie zastosowanie w medycynie [Dorsch 1996/97]. Natomiast możliwości wykorzystania tych związków w ochronie roślin są dużo mniejsze. Decyduje o tym kilka czynników. Tiosulfinaty i związki siarkoorganiczne cebuli charakteryzują się znacznie mniejszymi właściwościami anty-

bakteryjnymi, antygrzybowymi i antywirusowymi w porównaniu z analogicznymi związkami obecnymi w czosnku. Ponadto zawartość tiosulfinatów i innych organicznych związków siarki jest czterokrotnie mniejsza w cebuli niż w czosnku [Benkeblia, Lanzotti 2007]. Ponieważ jednak ekstrakt z cebuli charakteryzuje się silnymi właściwościami antybakteryjnymi, antygrzybowymi i antywirusowymi, można przypuszczać, że są one wynikiem synergistycznego działania tiosulfinatów, związków siarkoorganicznych oraz innych związków występujących w wyciągu z tej rośliny.

SAPONINY. Saponiny są związkami pochodzenia roślinnego należącymi do glikozydów. W ich skład wchodzi dwie części aglikon – sapogenina (sapogenol) i glikon – sacharyd (cukier). W roślinach z rodzaju *Allium* występują saponiny sterydowe (sterydowy charakter aglikonu). Są one pochodnymi spirostanu lub furostanu [Sparg i in. 2004]. Lanzotti [2006] podaje nazwy i wzory kilkunastu saponin wyizolowanych z różnych odmian cebuli. Badania wskazują na antybakteryjne, antygrzybowe, antywirusowe i owadobójcze właściwości saponin [Francis i in. 2002; Sparg i in. 2004]. Ich mechanizm działania na mikroorganizmy polega na tworzeniu kompleksów ze sterolami i fosfolipidami zawartymi w membranach komórkowych, co powoduje wzrost ich przepuszczalności oraz lizy komórek [Francis i in. 2002; Lanzotti i in. 2012]. Fungitoksyczność saponin jest zróżnicowana i zależy zarówno od rodzaju saponiny, jej stężenia, jak i testowanego gatunku grzyba [Sparg i in. 2004]. Lanzotti i in. [2012] zbadali wpływ trzech saponin cebuli, pochodnych furostanu (A, B i C) na 10 gatunków grzybów. Najsilniejszą aktywnością antygrzybową charakteryzowała się saponina B, a najsłabszą saponina C. *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotium cepivorum*, będące patogenami cebuli, okazały się gatunkami niewrażliwymi na badane saponiny. Dwa ostatnie gatunki grzybów posiadały zdolność rozkładu saponin do nietoksycznych związków. Badane saponiny wykazywały synergizm w działaniu antygrzybowym. Ich mieszanina charakteryzowała się silniejszą fungitoksycznością w porównaniu z działaniem każdej z nich oddzielnie.

Saponiny są metabolitami wtórnymi występującymi u bardzo wielu roślin. Dzięki właściwości pienienia się w wodzie były przez długi czas stosowane do prania. Cebula zawiera znacznie mniej saponin w porównaniu z innymi roślinami. W surowcach zielarskich, z których pozyskuje się saponiny (np. korzeń mydlicy, liść bluszczu czy owoc kasztanowca) ich zawartość wynosi 8-12%. Natomiast z 10 kg świeżych roślin z rodzaju *Allium* można uzyskać 5-10 mg czystych saponin [Lanzotti 2005]. Zawartość saponin zależy od fizjologicznego wieku rośliny. W roślinach niedojrzałych znajduje się więcej saponin niż w dojrzałych [Francis i in. 2002]. U roślin z rodzaju *Allium* najwięcej saponin występuje w kwiatach, znacznie mniej w innych częściach, np. w liściach [Lanzotti 2005]. Ilościowa i jakościowa zawartość saponin u niektórych roślin z rodzaju *Allium* zależy od pory roku, w której wykonuje się analizy i ma związek z przechowywaniem. U pora (*Allium porrum*) najwyższa zawartość saponin występuje w lecie. Zimą saponin jest najmniej i nie występują saponiny pochodne spirostanu [Lanzotti 2005]. W literaturze brak jest dokładnych danych dotyczących zawartości saponin w cebuli. Można jednak przypuszczać, że podlegają one tym samym zależnościom, co u innych roślin z rodzaju *Allium*.

FLAWONOIDY. Flawonoidy są polifenolami występującymi w roślinach. Struktura flawonoidów oparta jest na układzie flawanu, składającego się z trzech pierścieni: A, B i C. Modyfikacje w obrębie pierścienia C prowadzą do powstania różnych związków flawonoidowych. W cebuli występują związki z grupy flawonoli i antocjanidyn. Flawonole występują w cebuli białej, żółtej i czerwonej, natomiast antocyanidyny tylko w czerwonej [Slimestad i in. 2007]. Do tej pory w cebuli zidentyfikowano 25 flawonoli i 25 antocjanidyn. Zawartość flawonoli jest najwyższa

w cebuli czerwonej i wynosi 415-1917 mg/kg św. m. [Slimestad i in. 2007]. Cebula biała zawiera minimalne ilości flawonoli (1,2-2,7 mg/kg św. m.) [Marotti, Piccaglia 2002]. Głównym flawonolem w cebuli, niezależnie od jej rodzaju, jest kwercetyna. Jej udział wynosi około 90% wszystkich flawonoli występujących w cebuli [Lombard i in. 2002]. Flawonoidy występują w postaci połączeń glikozydowych i wolnych aglikonów.

W porównaniu z innymi roślinami zawartość flawonoidów w cebuli jest bardzo wysoka [Lanzotti 2006]. Zależy ona zarówno od czynników genetycznych (odmiany cebuli), jak i środowiskowych. Ta sama odmiana cebuli rosnąca w różnych miejscach może różnić się zawartością kwercetyny [Patil i in. 1995; Marotti, Piccaglia 2002; Rodriguez Galdón i in. 2008]. Najwięcej flawonoli znajduje się w skórce (suche łuski). Ich zawartość w tkankach cebul zmniejsza się od zewnętrznych liści do wewnętrznych [Bilyk i in. 1984]. Poziom nawożenia według jednych badań nie ma wpływu na zawartość flawonoli [Morgen i in. 2006]. Natomiast inne wskazują, że niska zawartość azotu w glebie w drugiej części sezonu wegetacyjnego może powodować wzrost zawartości flawonoli [Patil i in. 1995]. Ich akumulacja w cebulach rozpoczyna się w sierpniu w momencie zasychania liści i wzrasta aż do zbioru, a także może być kontynuowana w pierwszych tygodniach przechowywania, jeżeli temperatura nie będzie wyższa niż 1°C [Horbowicz 1999]. Również pozostawienie cebuli po zbiorze na polu przez 3-4 dni powoduje akumulację flawonoli [Patil i in. 1995]. Stąd też termin zbioru i sposób przechowywania mają decydujący wpływ na zawartość tych związków w cebulach. Stres środowiskowy oraz niedobór wody, porażenie przez grzyby lub owady powoduje wzrost zawartości flawonoli [Patil i in. 1995].

Kwercetyna, główny flawonol występujący w cebuli, znajduje szerokie zastosowanie w medycynie: obniża stężenie cholesterolu i lipidów we krwi, ma działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i przeciwzakrzepowe, zmniejsza skutki napromieniowania, ochrania miąższ wątroby, obniża poziom glukozy we krwi, zapobiega miażdżycy [Lanzotti 2006].

Wiele metabolitów wtórnych roślin wykazuje aktywność biologiczną w stosunku żywych organizmów. Flawonoidy odgrywają w tym zakresie szczególnie ważną rolę, kontrolując interakcje między roślinami, grzybami, organizmami grzybobodobnymi i bakteriami [Lagrange i in. 2001]. Odgrywają one rolę cząsteczek sygnałnych biorących udział w rozpoznaniu partnerów i decydują o ekspresji genów odpowiedzialnych za nawiązanie symbiozy (tworzenie brodawek) roślin motylkowatych i bakterii z rodzaju *Rhizobium* [Kikuchi i in. 2007]. Podobny udział flawonoidów ma miejsce w nawiązywaniu pasożytniczych relacji między roślinami i bakterią *Agrobacterium tumefaciens*, grzybobodobnymi *Oomycetes* oraz grzybami z rodzaju *Fusarium* powodujących pasożytniczą zgorzel siewek. Flawonoidy mają również wpływ na kiełkowanie zarodników i form przetrwalnikowych grzybów pasożytniczych [Lagrange i in. 2001; Kikuchi i in. 2007].

Flawonoidy, w zależności od ich stężenia i budowy, mogą wpływać zarówno stymulująco, jak i inhibująco na kiełkowanie zarodników grzybów ekto- i endomikoryzowych oraz wzrost i rozgałęzianie się ich strzępek, przez co regulują tworzenie symbiozy mikoryzowej [Chabot i in. 1992; Fries i in. 1997; Kikuchi i in. 2007]. Kwercetyna w stężeniu 10 µM stymulowała wzrost strzępek endomikoryzowego grzyba *Gigaspora margarita* i pozostawała bez wpływu na wzrost *Gigaspora gigantea* [Douds i in. 1996]. Badania Friesa i in. [1997] wykazały, że dogłębowa aplikacja kwercetyny w niskich stężeniach (0,25 mM) stymulowała wzrost roślin i kolonizację endomikoryzową. Natomiast wyższe stężenia (1,0 mM) i wielokrotna aplikacja hamowały zarówno wzrost, jak i kolonizację mikoryzową. Autorzy ci uważają, że tylko w wąskim przedziale niskiego stężenia kwercetyna stymuluje kiełkowanie zarodników i wzrost strzępek grzybów endomikoryzowych z rodzaju *Glomus* i *Gigaspora*. Kikuchi i in. [2007] testowali wpływ 11 flawonoidów aplikowanych w stężeniu 2 mM na kiełkowanie zarodników ektomikoryzowego grzyba *Suillus*

bovinus. Siedem z badanych flawonoidów stymulowało kiełkowanie, a cztery, w tym kwercetyna, pozostawało bez wpływu na ten proces.

Flawonoidy, w tym kwercetyna, charakteryzują się właściwościami antygrzbowymi [Curir i in. 2006; Silva i in. 1998]. Niektóre gatunki mikroorganizmów glebowych oraz grzybów, np. z rodzaju *Armillaria*, również wrażliwych na flawonoidy, mogą je metabolizować do związków nietoksycznych i wykorzystywać jako źródło węgla [Fries i in. 1997; Curir i in. 2006].

Flawonoidy mogą wpływać także na wzrost roślin. Agati i Tattini [2010] uważają, że flawonoidy o właściwościach antyoksydacyjnych, w tym kwercetyna, są skutecznymi inhibitorami dopodstawowego (bazypetalnego) transportu auksyny w łodydze. Z kolei Lagrange i in. [2001] podają, że flawonoidy mogą w roślinach wykazywać działanie podobne do cytokinin (aktywne stężenie około 100 μM).

Biologiczna rola związków występujących w cebuli

Przedstawione powyżej grupy związków pełnią ważną rolę w reakcjach obronnych rośliny [Jones i in. 2004]. Tiosulfiny i związki siarkoorganiczne powstają w tkankach w miejscu infekcji lub mechanicznego uszkodzenia ze związków będących ich prekursorami, fizycznie oddzielonymi od siebie w nieuszkodzonej komórce. Związki te toksyczne dla atakujących mikroorganizmów mogą również uszkodzić tkanki roślin, dlatego działają tylko lokalnie i w krótkim czasie, minimalizując taką możliwość. Tiosulfiny i związki siarkoorganiczne należy zaliczyć do fitoantycypin, czyli toksycznych dla mikroorganizmów substancji produkowanych w roślinie w wyniku infekcji lub mechanicznego uszkodzenia tkanek wyłącznie ze związków obecnych w komórce. Fitoantycypiny różnią się od fitoaleksyn, które syntetyzowane są *de novo* w komórce w wyniku różnego rodzaju stresów, również infekcji [VanEtten i in. 1994]. Saponiny cebuli są typowymi fitoncydami, czyli substancjami wydzielanymi przez rośliny naczyniowe (niezależnie od infekcji) i oddziałujące na mikroorganizmy. Flawonoidy cebuli pełnią najbardziej zróżnicowaną rolę. Jako substancje toksyczne dla grzybów zaliczane są do fitoncydów, jednak ich działanie allelopatyczne jest znacznie szersze. Mają one wpływ na kiełkowanie zarodników i interakcje między roślinami a organizmami symbiotycznymi i pasożytniczymi [Gniazdowska i in. 2004].

Najczęściej fitoncydy, fitoantycypiny czy fitoaleksyny danej rośliny działają na mikroorganizmy, które jej nie porażają [Lanzotti i in. 2012]. Jest rzeczą zupełnie zrozumiałą, że skutecznie infekować rośliny mogą jedynie te mikroorganizmy, które w swoim rozwoju ewolucyjnym potrafiły wykształcić mechanizmy unieszkodliwiającej substancje toksyczne występujące w porażanej roślinie lub zdobyły odporność na ich działanie [Jankiewicz, Sobiczewski 1997]. Wiedza w tym zakresie daje jednak szeroką możliwość wykorzystania omawianych substancji w ochronie innych gatunków roślin.

Doświadczenia z praktycznym zastosowaniem cebuli w szkółkach leśnych

Metodę zastosowania wodnego wyciągu z cebuli w ochronie siewek przed pasożytniczą zgorzelą w szkółkach leśnych zaproponowała dr Barbara Duda z Instytutu Badawczego Leśnictwa. Biofungicyd ten, przygotowany przez szkółkarza samodzielnie, można stosować do zaprawiania nasion oraz opryskiwania wschodów [Duda 1998]. Preparat cebulowy stosowano w wielu szkółkach, m.in. w Nadleśnictwie Szubin i Dobrzejewice (RDLP Toruń) oraz w szkółce Kampińskiego Parku Narodowego. Zabiegi zwiększyły przeżywalność siewek, ograniczyły występowanie patogenów w glebie i spowodowały zmiany morfologiczne grzybni *Rhizoctonia solani* [Stocka 2008]. W wyniku aplikacji preparatu cebulowego nastąpiło zwiększenie liczby gatunków grzybów

saprotroficznych w glebie do 20, przy czterech gatunkach po stosowaniu fungicydów zawierających tiuram [Sierota 1997]. Niekorzystnym efektem aplikacji wyciągu z cebuli w ochronie sosny przed pasożytniczą zgorzelą może być zahamowanie wzrostu ochraniających roślin. Wskazują na to wyniki uzyskane przez Dudę [1998] i Hamerę [2009]. Obie autorki wykazały ograniczenie długości części nadziemnej siewek sosny, co może być efektem ograniczenia bazyfetalnego transportu auksyny przez flawonoidy zawarte w wyciągu z cebuli. Niezależnie od stosowania cebuli w ograniczaniu pasożytniczej zgorzeli siewek, podejmowane są badania nad wykorzystaniem pozostałości poźniwnych roślin z rodzaju *Allium*: czosnku i cebuli do biofumigacji gleby w szkółce w ochronie przed chwastami [Mallek i in. 2007].

Opracowany przez Dudę [1998] przepis na przygotowanie biofungicudu jest następujący: zmielone cebule zalewa się wodą i pozostawia w ciemnym, chłodnym i przewiewnym miejscu na tydzień. Podstawowy skład mieszaniny stanowi 1 kg cebuli i 3 litry wody. Po przefiltrowaniu mieszaniny otrzymany wodny wyciąg stosuje się do oprysków jako 7% wodny roztwór (przepis ilościowy). Zmodyfikowany przepis podaje Stocka [2008]. Zmielone cebule zalewa się wodą w proporcji: 1 część pulpy cebulowej i 1,5 części wody. Mieszaninę przetrzymuje się w chłodnym miejscu przez 7-10 dni, a następnie odcedza. Otrzymany wodny wyciąg można przechowywać w chłodni przez 3 miesiące. Do oprysków stosuje się wyciąg w proporcji: 1 część wyciągu i 7 części wody (przepis objętościowy).

W biofungicydzie przygotowanym według powyższych przepisów największą aktywność biologiczną wykazują flawonoidy (kwercetyna i jej pochodne). Decyduje o tym zarówno wysoka zawartość tych związków [Slimestad i in. 2007], jak również fakt, że są one skuteczne w roztworach mili-, mikro-, a nawet nanomolarnych [Kikuchi i in. 2007]. Tiosulfiny i związki siarkoorganiczne jako substancje lotne i nietrwałe wykazują wysoką aktywność antygrzybową tylko w okresie kilku-kilkunastu godzin po zmieleniu cebuli [Breu 1996]. Z kolei zawartość saponin w kilogramie cebuli wynosi jedynie 0,005-0,01% (50-100 ppm). Po zalaniu pulpy cebulowej wodą oraz rozcieńczeniu odcedzonego wyciągu przed opryskiem zawartość saponin jest zbyt niska, aby mogła być skuteczna. Lanzotti [2006] podaje, że 100% inhibicji wzrostu grzybni uzyskano przy stężeniu saponin 200 ppm, natomiast przy stężeniu 50 ppm inhibicja wynosiła 65-90% w zależności od testowanego gatunku grzyba. Należy jednak oczekiwać, że zarówno tiosulfiny i związki siarkoorganiczne, jak i saponiny, mimo niskiej zawartości, będą wykazywały działanie synergistyczne z flawonoidami.

Oznaczenie zawartości polifenoli w wodnym wyciągu z cebuli

Mając na uwadze wiosenny termin przygotowywania przez szkółkarza preparatu cebulowego (zaprawianie nasion – druga połowa kwietnia, opryski – maj) oraz znaczną zmienność zawartości związków biologicznie czynnych w zależności od odmiany cebuli, warunków wzrostu i przechowywania, oznaczono zawartość polifenoli w wodnym wyciągu (odcieku z maceratu) z cebuli. W końcu kwietnia zakupiono od producentów cebulę żółtą dwóch odmian (Wiktorja Skierniewicka i Supra). Wyciąg przygotowano według przepisów podanych powyżej. Do oznaczeń przygotowano próbki z cebuli obranej ze skórki (pozbawione suchej łuski) i nieobranej, ponieważ żaden z przepisów nie precyzuje z jakiej cebuli sporządza się biopreparat, a jednocześnie wiadomo, że w skórce znajduje się najwięcej polifenoli [Bilyk i in. 1984]. Doświadczenie składało się z 8 wariantów: 2 odmiany, 2 przepisy, cebula obrana i niedobrana. Oznaczenia wykonano w trzech terminach (5, 9 i 13 dni po sporządzeniu maceratu). Z każdego wariantu w każdym terminie pobrano po trzy próby. Łącznie oznaczenia wykonano w 72 próbkach.

Suchą masę odcieku maceratu oznaczono z zastosowaniem metody wagowej. Badany macerat odsączono na lejku Schotta pod ciśnieniem (-0,1 mBa). 1 g odcieku suszono przez 24 godziny w 105°C przy stałym ciśnieniu. Po upływie doby próbki ochłodzono w ekzykatorze i ważono, notując ubytek masy. Czynność tę powtórzono 3 razy do osiągnięcia stanu stałej masy [Polska... 1988]. Flawonoidy oznaczono metodą opisaną przez Hallmann [2012]. Naważkę odcieku odważono do plastikowej próbówki, dodano metanol oraz 1% kwas askorbinowy, wymieszano dokładnie na wortexie i inkubowano w łaźni ultradźwiękowej (15 min., 30°C). Próbki zwirowano przy prędkości 4000 rpm. Z próbówki pobrano 1 ml ekstraktu i ponownie zwirowano przy prędkości 10 000 rpm. 900 µl ekstraktu pobrano do wialki HPLC i poddano analizie. Do analizy związków flawonoidowych wykorzystano kolumnę Synergi Fusion-RP 80i (250×4,60 mm).

Tabela

Zawartość suchej masy [g/100 g] oraz kwercetyny i jej pochodnych [mg/100g] w odcieku maceratu z cebuli
Content of dry-mass [g/100g] as well as quercetin and its derivatives [mg/100g] in the effluent from the onion macerate

| Wariant | Sucha masa | Rutynozyd-3-O-kwercetyny | Glukozyd-3-O-kwercetyny | Kwercetyna |
|---------------------------|------------|--------------------------|-------------------------|------------|
| Piąty dzień maceracji | | | | |
| Wiktoria Skierniewicka | 3,02 b | 0,50 b | 0,23 b | 0,93 b |
| Supra | 2,40 a | 0,24 a | 0,17 a | 0,88 a |
| Przepis ilościowy | 2,37 a | 0,38 b | 0,16 a | 0,93 b |
| Przepis objętościowy | 3,05 b | 0,36 a | 0,23 b | 0,88 a |
| Cebula bez skórki | 2,66 a | 0,29 a | 0,25 b | 0,96 b |
| Cebula ze skórką | 2,77 a | 0,44 b | 0,15 a | 0,85 a |
| Średnio | 2,24 x | 0,37 x | 0,20 x | 0,91 x |
| Dziewiąty dzień maceracji | | | | |
| Wiktoria Skierniewicka | 3,05 b | 0,57 b | 0,20 b | 0,98 b |
| Supra | 2,56 a | 0,32 a | 0,16 a | 0,92 a |
| Przepis ilościowy | 2,51 a | 0,45 a | 0,14 a | 0,99 b |
| Przepis objętościowy | 3,10 b | 0,45 a | 0,21 b | 0,91 a |
| Cebula bez skórki | 2,85 a | 0,35 a | 0,23 a | 1,00 b |
| Cebula ze skórką | 2,76 a | 0,54 b | 0,12 a | 0,90 a |
| Średnio | 2,80 xy | 0,45 xy | 0,18 x | 0,95 x |
| Trzynasty dzień maceracji | | | | |
| Wiktoria Skierniewicka | 3,30 b | 0,70 b | 0,17 a | 4,60 b |
| Supra | 2,87 a | 0,42 a | 0,19 b | 3,47 a |
| Przepis ilościowy | 2,82 a | 0,60 b | 0,175 a | 4,04 b |
| Przepis objętościowy | 3,35 b | 0,52 a | 0,182 b | 4,03 a |
| Cebula bez skórki | 3,12 a | 0,42 a | 0,195 b | 4,86 b |
| Cebula ze skórką | 3,05 a | 0,70 b | 0,163 a | 3,21 a |
| Średnio | 3,09 y | 0,56 y | 0,18 x | 4,04 y |
| Prawdopodobieństwo | | | | |
| Odmiana cebuli | <0,0001 | <0,0001 | 0,0220 | <0,0001 |
| Przepis | <0,0001 | 0,0014 | <0,0001 | 0,0036 |
| Postać cebuli | n.s. | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 |
| Czas maceracji | <0,0001 | <0,0001 | n.s. | <0,0001 |

Ta sama litera oznacza brak istotnych statystycznie różnic ($p \leq 0.05$) między średnimi dla dwóch porównywanych wariantów (a, b) lub terminów oznaczeń (x, y)

The same letter indicates lack of statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the means for the two comparable variants (a, b) or for individual identifications (x, y)

Zastosowano przepływ gradientowy i dwie fazy mobilne acetonitryl/woda dejonizowana (55% oraz 10%, pH=3). Czas wykonania analizy: 36 min, przepływ: 1 ml/min, długość fali: 250-370 nm. Związki zidentyfikowano na podstawie zewnętrznych standardów Fluka i Sigma Aldrich o czystości 99,5%. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, stosując czteroczynnikową analizę wariancji (odmiana cebuli, przepis, postać cebuli, czas maceracji).

Wyniki przedstawione w tabeli pokazują istotnie większą zawartość kwercetyny i jej pochodnych, jak również większą suchą masę odcieku w odmianie cebuli Wiktorja Skierniewicka w porównaniu z Suprą, we wszystkich terminach (wyjątek stanowi zawartość glukozydu-3-O-kwercetyny w 13 dniu maceracji). Macerat sporządzony według przepisu ilościowego [Duda 1998] zawierał mniej pulpy cebulowej w większej ilości wody w porównaniu z przepisem objętościowym [Stocką 2008]. Stąd też sucha masa odcieku z maceratu w przepisie ilościowym była istotnie mniejsza we wszystkich terminach wykonania oznaczeń. Z kolei zawartość kwercetyny była istotnie większa w odcieku sporządzonym według przepisu ilościowego. Można zatem stwierdzić, że przygotowując biopreparat według tego przepisu, uzyskamy więcej cieczy użytkowej zawierającej większą ilość kwercetyny. Większa ilość wody ułatwia bowiem ekstrakowanie substancji z materiału roślinnego.

W porównaniu z preparatem przygotowanym z cebuli bez skórki, biopreparat sporządzony z cebuli ze skórką nie różnił się wielkością suchej masy odcieku, lecz charakteryzował się istotnie wyższą zawartością rutynozydu-3-O-kwercetyny i niższą glukozydu-3-O-kwercetyny i kwercetyny. Niższa zawartość kwercetyny w preparacie sporządzonym z cebuli ze skórką, mimo że suche łuski zawierają więcej tego związku, jest spowodowana słabszym przechodzeniem do roztworu wodnego substancji występujących w suchych łuskach w porównaniu z tymi występującymi w łuskach mięsistych.

Czas maceracji wpływa zarówno na wielkość suchej masy odcieku, jak i zawartość kwercetyny i rutynozydu-3-O-kwercetyny, natomiast nie ma wpływu na zawartość glukozydu-3-O-kwercetyny. Ponieważ w naszych oznaczeniach zawartość kwercetyny wzrosła między 9. a 13. dniem maceracji czterokrotnie, należałoby przeprowadzić dodatkowe badania w warunkach różnych szkółek leśnych, aby ustalić optymalny czas maceracji. Być może w pewnych warunkach siedmiodniowy czas maceracji nie pozwala na wykorzystanie w pełni potencjału biopreparatu z cebuli.

Wnioski

- ✦ W sytuacji drastycznego ograniczenia liczby fungicydów zarejestrowanych dla leśnictwa dobrą alternatywą wydaje się możliwość stosowania w szkółkach leśnych środków ochrony biologicznej wykonanych sposobem gospodarczym. Biofungicyd oparty na wodnym wyciągu z cebuli może być z dobrym skutkiem stosowany w ochronie siewek drzew leśnych przed zgorzelą pasożytniczą [Duda 1998].
- ✦ Sporządzenie biopreparatu z cebul nieobranych z suchych łusek będzie mniej pracochłonne, ale tak przygotowany środek może zawierać mniej kwercetyny. Biofungicyd przygotowany według przepisu ilościowego Dudy [1998] będzie zawierał więcej kwercetyny niż sporządzony według przepisu objętościowego Stockiej [2008].
- ✦ Ujemnym skutkiem stosowania biofungicydu niestandardyzowanego (wykonanego samodzielnie) może być bardzo zróżnicowany efekt ochronny. Będzie on zależny od zawartości substancji biologicznie aktywnych w wyciągu, na co ma wpływ zarówno odmiana użytej cebuli, jak również warunki jej wzrostu i przechowywania.

Literatura

- Agati G., Tattini M. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.* 186: 786-793.
- Ankir S., Mirelman D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 2: 125-129.
- Benkeblia N., Lanzotti V. 2007. Allium thiosulfates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food* 1 (2): 193-201.
- Bilyk A., Cooper P. L., Sapers G. M. 1984. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue. *J. Agric. Food Chem.* 32: 274-276.
- Block E., Naganathan S., Putman D., Zhao S.-H. 1993. Organosulfur chemistry of garlic and onion. Recent results. *Pure Appl. Chem.* 65 (4): 625-632
- Breu W. 1996. *Allium cepa* L. (Onion) Part 1: Chemistry and analysis. *Phytomedicine* 3 (3): 293-306.
- Burgiel Z. J. 2005. Czy preparaty roślinne zastąpią syntetyczne pestycydy?. W: *Ochrona środowiska naturalnego w XXI wieku – nowe wyzwania i zagrożenia*. Fund. na Rzecz Wspierania Badań Naukowych. Wydział Ogrodniczy AR w Krakowie. 116-125.
- Chabot S., Bel-Rhliid R., Chênevert R., Piché Y. 1992. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytol.* 122: 461-467.
- Corzo-Martínez M., Corzo N., Villamiel M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology* 18: 609-625.
- Curir P., Dolci M., Corea G., Galeotti F., Lanzotti V. 2006. The plant antifungal isoflavone genistein is metabolized by *Armillaria mellea* Vahl to give non-fungitoxic products. *Plant Biosyst.* 140 (2): 156-162.
- Dorna H., Kaniewski R., Jarosz M., Banach J., Szocińska D. 2010. Zdrowotność i kiełkowanie nasion marchwi traktowanych wyciągiem wodnym z konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.). *Streszczenia 50. Sesji Naukowej Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego Poznań*.
- Dorsch W. 1996/97. *Allium cepa* L. (Onion): Part 2 Chemistry, analysis and pharmacology. *Phytomedicine* 3 (4): 391-397.
- Douds D. D., Nagahashi G., Abney G. D. 1996. The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls, and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. *New Phytol.* 133: 289-294.
- Duda B. 1998. Biologiczna ochrona sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) przed pasożytniczą zgorzelą siewek w szkółkach leśnych. *Rozprawa doktorska, IBL*.
- Duda B., Piwnicki J., Skrzeczek I. 2000. Zastosowanie preparatów Sincocin AL i Nufilm 96 EC w leśnictwie. W: *Chemiczna metoda ochrony roślin drzewiastych przed chorobami – pozytywne aspekty i zagrożenia*. Materiały z IV konferencji Sekcji Chorób Roślin Drzewiastych PTF, Rogów-Skierniewice 5-7 lipca 2000. 81-87.
- Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* 88: 587-605.
- Fries L. L. M., Pacovsky R. S., Safir G. R., Siqueira J. O. 1997. Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *J. Chem. Ecol.* 23 (7): 1755-1767.
- Gniazdowska A., Oracz K., Bogatek R. 2004. Allelopatia – nowe interpretacje oddziaływań pomiędzy roślinami. *Kosmos* 2 (264): 207-217.
- Hallmann E. 2012. The influence of organic and conventional cultivation systems on the nutritional value and content of bioactive compounds in selected tomato types. *J. Sci. Food Agric.* 92 (14): 2840-2848. doi 10.1002/jsfa.5617.
- Hamera A. 2009. Wpływ preparatów biologicznych stosowanych w ochronie siewek przed pasożytniczą zgorzelą na wzrost i kolonizację mikoryzową sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). *Praca doktorska, Wydział Leśny SGGW*.
- Horbowicz M. 1999. Changes of the flavonols content in onion during the vegetation period and storage. *VCRB* 50.
- Horszkiwicz-Janka J., Jajor E. 2006. The effect of seed dressing on healthiness of barley, wheat and rape in early development stages. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 51 (2): 47-53.
- Jankiewicz L. S., Sobiczewski P. 1997. Fitoaleksyny i inne substancje związane z odpornością roślin przeciwko patogenom. W: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*. PWN, Warszawa. 251-273.
- Jones M. G., Hughes J., Tregova A., Milne J., Tomsett A. B., Collin H. A. 2004. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany* 55 (404): 1903-1918.
- Kikuchi K., Matsushita N., Suzuki K., Hogetsu T. 2007. Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza* 17: 563-570.
- Lagrange H., Jay-Allmand C., Lapeyrie F. 2001. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytol.* 149: 349-355.
- Lanzotti V. 2005. Bioactive saponins from *Allium* and *Aster* plants. *Phytochemistry Reviews* 4: 95-110.
- Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A* 1112: 3-22.
- Lanzotti V., Romano A., Lanzuise S., Bonanomi G., Scala F. 2012. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry* 74: 133-139.
- Lombard K. A., Geoffriau E., Peffley E. 2002. Flavonoid quantification in onion by spectrophotometric and high performance liquid chromatography analysis. *HortScience* 37 (4): 682-685.

- Mallek S. B., Prather T. S., Stapleton J. J. 2007. Interaction effects of *Allium* spp. residues, concentrations and soil temperature on seed germination of four weedy plant species. *Applied Soil Ecology* 37: 233-239.
- Marotti M., Piccaglia R. 2002. Characterization of flavonoids in different cultivars of onion (*Allium cepa* L.). *J. Food Sci.* 67 (3): 1229-1232.
- Masny S., Mikiściński A., Berczyński S. 2006. Efektywność ekstraktów roślinnych w ograniczaniu kiełkowania zarodników konidialnych grzyba *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint. *Postępy w Ochronie Roślin* 46 (2): 645-649.
- Matysiak K., Adamczewski K. 2006. Wpływ bioregulatora Kelpak na plonowanie roślin uprawnych. *Postępy w Ochronie Roślin* 46 (2): 102-108.
- Moliszewska E. B., Burgiel Z. J. 1998. Wpływ wyciągów roślinnych na rozwój grzybów patogennych. *Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 5 (7): 603-612.
- Morgen L. M., Olsson M. E., Gertsson U. E. 2006. Quercetin content in field-cured onions (*Allium cepa* L.): effects of cultivar, lifting time, and nitrogen fertilizer level. *J. Agric. Food Chem.* 54 (17): 6185-6191.
- Okorski A. 2007. Biologiczna ochrona roślin przed chorobami – mechanizmy i perspektywy rozwoju. *Postępy Nauk Rolniczych* 5: 21-36.
- Ostrowska A., Robak J. 2009. Wpływ nowych środków ochrony roślin stosowanych przedzbiorko w ochronie selera na zdrowotność korzeni w okresie długotrwałego przechowywania. *Postępy w Ochronie Roślin* 49 (1): 252-255.
- Oszako T., Orlikowski L. B., Skrzypczak C. 2009. Możliwości chemicznej i biologicznej ochrony szkółek leśnych przed *Phytophthora citricola*. *Sylwan* 153 (3): 164-170.
- Patil B. S., Pike L. M., Hamilton B. K. 1995. Changes in quercetin concentrations in onion (*Allium cepa* L.) owing to location, growth stage and soil type. *New Phytol.* 130: 349-355.
- Piotrowski W., Sas-Piotrowska B., Wyrostkiewicz K., Czajkowski P. 1995. Wpływ wyciągów roślinnych na kiełkowanie zarodników niektórych grzybów patogennych dla roślin. *Zesz. Nauk. ART. w Bydgoszczy* 190, *Rolnictwo* 36: 139-145.
- Placek M., Dobrowolska A., Wraga K., Zawadzińska A., Żurawik P. 2009. Wykorzystanie chitozanu w uprawie, przechowalnictwie i ochronie roślin ogrodnich. *Postępy Nauk Rolniczych* 3-4: 101-109.
- Polska Norma PN-R-04013. 1988. Analiza chemiczno-rolnicza – Oznaczenie powietrznie suchej i suchej masy.
- Rodríguez Galdón B., Rodríguez Rodríguez E. M., Díaz Romeo C. 2008. Flavonoids in onion cultivars (*Allium cepa* L.). *J. Food Sci.* 73 (8): 599-605.
- Sas-Piotrowska B., Piotrowski W. 1996. Możliwości wykorzystania w ochronie roślin grochu (*Pisum sativum* L.) aktywności biologicznej preparatów naturalnie i sztucznie syntetyzowanych. *Postępy w Ochronie Roślin* 36: 236-243.
- Selby C., Galpin I. J., Collin H. A. 1979. Comparison of the onion plant (*Allium cepa*) and onion tissue culture. I. Allinase activity and flavour precursor compounds. *New Phytol.* 83: 351-359.
- Sierota Z. 1997. Ochrona szkółek przed grzybami pasożytniczymi. *Sylwan* 141 (5): 5-13.
- Silva A. M. S., Weidenbörner M., Cavaleiro J. A. S. 1998. Growth control of different *Fusarium* species by selected flavones and flavonoid mixtures. *Mycol. Res.* 102 (5): 638-640.
- Slimestad R., Fossen T., Vågen I. M. 2007. Onions: a source of unique dietary flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 55 (25): 10067-10080.
- Slusarenko A. J., Patel A., Portz D. 2008. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 313-322. doi: 10.1007/s10658-007-9232-7.
- Sparg S. G., Light M. E., van Staden J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 219-243.
- Stocka T. 2008. Biologiczne metody ochrony przed chorobami grzybowymi w szkółkach leśnych. *Postępy Techniki w Leśnictwie* 104: 28-38.
- VanEtten H. D., Mansfield J. W., Bailey J. A., Farmer E. E. 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus „phytoanticipins”. *Plant Cell* 6: 1191-1192.
- Yoshida S., Kasuga S., Hayashi N., Ushiroguchi T., Matsuura H., Nakagawa S. 1987. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (3): 615-617.

SUMMARY

Onion (*Allium cepa* L.) as a biological agent of plant protection in forest nurseries

The onion (*Allium cepa* L.) contains three groups of biologically active compounds playing an important role in plant defense responses and allowing to use onion extract as a bio-fungicide in plant protection. Thiosulfinates and organosulfur compounds are volatile and unstable compounds. They are formed in the tissues in the site of infection or mechanical damage from the compounds

which are their precursors, physically separated from one another in the intact cell. Flavonoids and saponins are secondary metabolites of onions. Thiosulfates, organosulfur compounds and saponins are known for their antibacterial, antimycotic and antiviral activity. Flavonoids, however, affect plant growth and germination of fungal spores and control the interactions between plants and fungi, fungi-like organisms, bacteria, both symbiotic and parasitic.

The paper describes the method of preparing biofungicides based on an aqueous extract of onion, and the possibility of its application in forest nurseries for the protection against the damping off. The study demonstrates a different content of flavonoids (quercetin and its derivatives) in the aqueous extract of onion depending on its variety, the method of preparing biofungicides and the time of identification (5, 9, and 13 days).