

Aktywność antygrzybowa (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) różnych glikozydów kwasu medikagenowego

STEFAN MARTYNIUK¹, MARIAN JURZYSTA²

¹Zakład Mikrobiologii Rolniczej, ²Zakład Biochemii, IUNG,
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, sm@iung.pulawy.pl

Department of Agricultural Microbiology, Department of Biochemistry, IUNG,
Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Antifungal (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)
activity of various glycosides of medicagenic acid

(Otrzymano: 04.05.2005)

Summary

Different concentrations of medicagenic acid and five glycosides of this acid isolated from alfalfa (*Medicago sativa*) were added to agar medium (corn meal agar, CMA) inoculated with cultures of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt). After 7 days of incubation at 25°C colony radius was measured and % of inhibition calculated in relation to the control medium (CMA enriched with the solvent of the tested compounds). Within the tested concentrations, only 3-O-β-D -glucopiranoside medicagenate (monoglucoside) significantly reduced the growth of Ggt on CMA medium. This compound at 0.05 mM concentration completely inhibited the development of the fungus and the effect was shown to be fungi-toxic.

Key words: *Gaeumannomyces graminis*, growth, inhibition, glycosides, alfalfa

WSTĘP

Gaeumannomyces graminis (Sacc.) Arx & Olivier varietas *tritici* Walker jest grzybem workowym (*Ascomycotina*) powodującym gnicie (czernienie) korzeni i dolnej części źdźbła zbóż (z wyjątkiem owsa), a jednostka chorobowa wywoływana przez tego grzyba określana jest jako zgorzel podstawy źdźbła zbóż (D r a t ó w n a , 1959; M a r t y n i u k , 1986; K o r b a s , 1998). Omawiany patogen może być przyczyną dużych strat w plonie zbóż uprawianych w uproszczonych zmianowaniach, a zwłaszcza

w monokulturze (M a r t y n i u k , 1986; W e b e r , 2003). Fungicydy stosowane w formie oprysków nie są skuteczne w ochronie zbóż przed *G. graminis* var. *tritici* (Ggt), a jedynie niektóre zaprawy nasienne ograniczają w niewielkim stopniu porażanie roślin zbożowych przez Ggt (W e b e r , 2003). Brak efektywnych metod chemicznej ochrony zbóż przed zgorzelą podstawy źdźbła powoduje, że poszukiwane są inne sposoby ograniczania tej choroby, takie jak wykorzystywanie drobnoustrojów antagonistsycznych (ochrona biologiczna), czy biologicznie czynnych (antygrzybowych) substancji pochodzenia roślinnego (W a l l e r , 1983; M a r t y n i u k i M y ś k ó w , 1984; M r ó z i i n . , 1996; M a r t y n i u k i i n . , 2002). Saponiny są właśnie grupą związków chemicznych (metabolity wtórne) szeroko rozpowszechnionych w świecie roślinnym i znanych nie tylko z ich aktywności antygrzybowej, ale również z właściwości allelopatycznych i antyżywniowych (O l e s z e k , 1990; J u r z y s t a i W a l l e r , 1996; O s b o r n i i n . , 1996, S a n i e w s k a i i n . , 2003). Wyniki naszych wcześniejszych badań wykazały, że zmielone części nadziemne różnych gatunków lucerny oraz mieszaniny saponin wyekstrahowane z tych roślin hamowały wzrost wybranych patogenów grzybowych zbóż na pożywkach agarowych z dodatkiem tych substancji (M a r t y n i u k i i n . , 1999; M a r t y n i u k i i n . , 2002). Pod względem chemicznym saponiny są glikozydami trójterpenów pięciocyklicznych lub steroidów (O l e s z e k , 1990; O s b o r n i i n . , 1996). W tkankach lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) dominują glikozydy kwasu medikagenowego, zróżnicowane zarówno pod względem budowy chemicznej jak i aktywności biologicznej (O l e s z e k , 1990; B i a ł y i i n . , 1999).

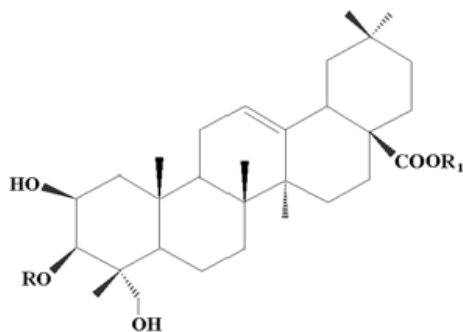
Celem badań opisanych w niniejszej pracy było porównanie zdolności różnych glikozydów kwasu medikagenowego (KM), wyodrębnionych z korzeni lucerny, do hamowania wzrostu *G. graminis* var. *tritici* na pożywce agarowej.

MATERIAŁ I METODY

Związki chemiczne. Badano aktywność antygrzybową następujących związków:

1. Kwas medikagenowy (KM),
2. 3-O-β-D glukopiranozyd KM,
3. 3-O-β-D glukopiranozylo-28-O-β-D glukopiranozyd KM,
4. 3-O-β-D-glukopiranozylo, 28-O-[β-D-ksylopiranozylo(1→4)-α-L-ramnopiranozylo(1→2)-α-L-arabinopiranozyd] KM,
5. 3-O-[β-D-glukopiranozylo(1→2) - β-D-glukopiranozylo], 28-O- [β-D-ksylopiranozylo(1→4)-α-L-ramnopiranozylo(1→2)-α-L-arabinopiranozyd] KM,
6. 3-O-β-D-glukuronopiranozylo, 28-O-[β-D-ksylopiranozylo(1→4) -α-L-ramnopiranozylo(1→2)-α-L-arabinopiranozyd] KM.

Wzór strukturalny kwasu medikagenowego oraz nazwy chemiczne jego glikozydów podano na rycinie 1. Związki te wyodrębniono z korzeni lucerny (*Medicago sativa* L.) i ustalono ich budowę chemiczną zgodnie z metodyką opisaną w pracach: Jurzysta (1982) oraz Biały i in. (1999).



R	R ₁
H	H
Gluk	H
Gluk	Gluk
Gluk	Ksyl(1→4)Ram(1→2)Arab
Gluk(1→2)Gluk	Ksyl(1→4)Ram(1→2)Arab
Glukur	Ksyl(1→4)Ram(1→2)Arab

Ryc. 1. Struktura chemiczna kwasu medikagenowego i jego glikozydów

Fig. 1. Chemical structure of medicagenic acid and its glycosides

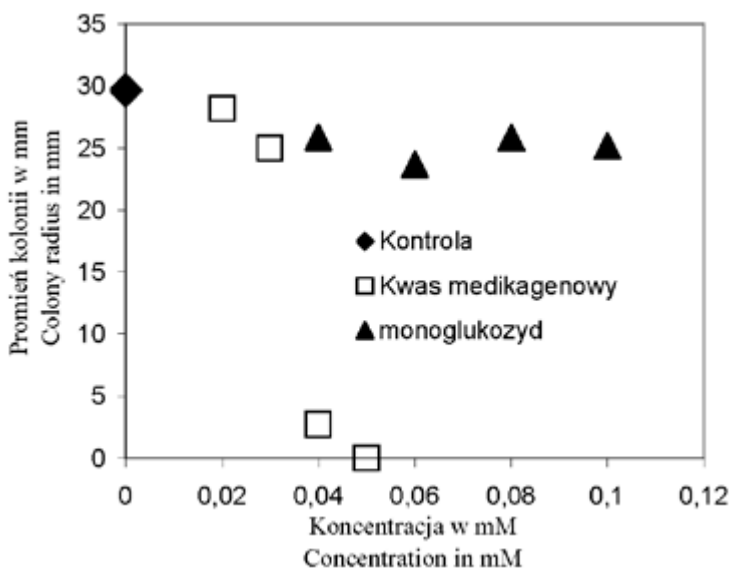
Testowanie właściwości antygrzybowych. Wszystkie testy przeprowadzono z wykorzystaniem agarowej pożywki kukurydzianej (CMA, Oxoid). Do wyjałowionej w autoklawie i ostudzonej do około 45°C pożywki (po 100 ml) w kolbach stożkowych dodawano odpowiednie objętości roztworów wyjściowych (o stężeniu 5 lub 10 mM) badanych związków rozpuszczonych w 75% etanolu, tak aby końcowe stężenie tych związków w pożywce wynosiło od 0,01mM do 0,1mM. Pożywka kontrolna zawierała taką samą objętość 75% etanolu z jaką dodawano badane substancje saponinowe, czyli 1 ml etanolu/100 ml pożywki. Po dokładnym wymieszaniu zawartości kolbek, pożywki rozlewano jałowymi pipetami po 15 ml do szalek Petriego, a po zestaleniu pożywki każdą płytkę zaszczerpiono w środku krążkiem o śred. 5 mm wyciętym z 10-dniowej kultury *G. graminis* var. *tritici* na CMA. Użyty izolant grzyba pochodził z kolekcji drobnoustrojów glebowych Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG, a został on wyodrębniony w 2002 roku z chorych korzeni pszenicy ozimej. Każda koncentracja badanych związków składała się z 6 powtórzeń (szalek). Kultury inkubowano w termostacie

w temp. 25°C i po 7 dniach inkubacji mierzono promień kolonii badanego grzyba. Każdy promień kolonii jest średnią z dwóch przeciwległych pomiarów wykonanych od krawędzi krążka (inokulum) do krawędzi kolonii. Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji (ANOVA), a istotność różnic testowano półprzedziałem Tuckeya.

W przypadku związku o największej aktywności przeciwgrzybowej (3-O-β-D glukopiranozyd KM) wyliczono ED₅₀, czyli stężenie związku, które spowodowało 50% zahamowanie wzrostu badanego grzyba. Ponadto, z pożywki, na której stwierdzono zupełne zahamowanie wzrostu testowanego patogena, zdejmowano krążki inokulum za pomocą jałowej ezy i przekładano je na świeżą pożywkę CMA bez żadnych dodatków. Odrastanie grzyba na tej pożywce świadczyło o efekcie fungistatycznym, natomiast brak wzrostu wskazywał na fungitoksyczne oddziaływanie badanego związku.

WYNIKI I DYSKUSJA

W pierwszym doświadczeniu, którego wyniki przedstawiono w tabeli 1, testowano wszystkie badane związki w koncentracjach 0,01 mM, 0,02mM i 0,03 mM. W tych stężeniach tylko 3-O-β-D glukopiranozyd KM (monoglukozyd KM) istotnie hamował wzrost *G. graminis* var. *tritici* (Ggt), a w stężeniu najwyższym (0,03 mM) hamowanie to było bardzo silne. Kwas medikagenowy (KM) tylko w najwyższej koncentracji (0,03mM) istotnie zmniejszał promień kolonii Ggt, natomiast pozostałe związki nieznacznie hamowały lub stymulowały wzrost badanego patogena grzybowego (związki nr 3, 4, 5 i 6). Doświadczenie drugie miało na celu sprawdzenie powtarzalności wyników uzyskanych w pierwszym doświadczeniu oraz znalezienie koncentracji przy których następowało zupełne zahamowanie wzrost Ggt. W związku z tym użyto w tym doświadczeniu wyższych koncentracji, ale tylko tych związków, które w pierwszym doświadczeniu wykazywały jakikolwiek hamujący wpływ na rozwój testowanego grzyba. Monoglukozyd KM badano w koncentracjach od 0,02mM do 0,05mM, natomiast pozostałe związki w stężeniach od 0,04 mM do 0,1mM (ryc. 2). Spośród substancji testowanych w drugim doświadczeniu tylko kwas medikagenowy oraz monoglukozyd KM istotnie hamowały wzrost kolonii Ggt (ryc. 2). Natomiast pozostałe dwa związki, podobnie jak w pierwszym doświadczeniu, nie powodowały istotnych zmian we wzroście grzyba (danych nie przedstawiono). Oddziaływanie KM i monoglukozydu na rozwój Ggt było jednak zupełnie odmienne. W przypadku KM nawet największe stężenie (0,1mM) w pożywce nie spowodowało silniejszego zmniejszenia wzrostu grzyba niż najmniejsza (0,04 mM) z testowanych koncentracji tego związku (ryc. 2). Brak istotnych różnic w oddziaływaniu różnych stężeń KM na wzrost Ggt wynika prawdopodobnie z bardzo słabej rozpuszczalności tego związku w roztworach wodnych (O l e s z e k, 1990).

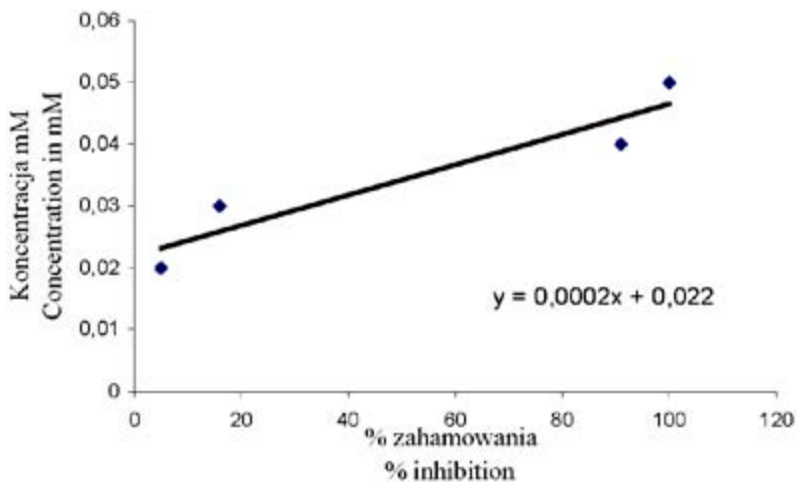


Ryc. 2. Wzrost *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* na pożywce kontrolnej (CMA bez dodatków) oraz na pożywce z dodatkiem różnych koncentracji kwasu medikagenowego (KM) i monoglukozydu KM

Fig. 2. Growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on CMA without amendments and CMA with addition of various concentrations of medicagenic acid (KM) and monoglucoside KM

Wpływ monoglukozydu KM na wzrost Ggt był natomiast wyraźnie uzależniony od jego koncentracji w pożywce (ryc. 3). Związek ten w stężeniu 0,04 mM spowodował ponad 90% redukcję wielkości kolonii a w stężeniu 0,05 mM zupełnie zahamował wzrost testowanego patogena. Na podkreślenie zasługuje ponadto fakt, że po przeniesieniu krążków inokulum Ggt z pożywki zawierającej 0,05 mM monoglukozydu na świeże podłoże grzyb ten nie rósł. Świadczy to, że w wymienionej koncentracji monoglukozyd oddziaływał fungitoksycznie na badanego patogena. W oparciu o dane uzyskane w drugim doświadczeniu wykreślono krzywą zależności pomiędzy dawką monoglukozydu a % zahamowania wzrostu Ggt i na tej podstawie wyliczono ED_{50} , która wyniosła około 32 μM , co odpowiada koncentracji około 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}$. Podobne wyniki uzyskali inni badacze. Na przykład, S a n i e w s k a i i n. (2003) testowali wpływ kilku saponin lucerny na wzrost fitopatogenów grzybowych takich jak *Botrytis tulipae* oraz *Phoma narcissis*. Wykazali oni, że związkiem najaktywniejszym był monoglukozyd KM, przy czym *B. tulipae* okazał się grzybem bardziej wrażliwym na ten glukozyd niż *Ph. narcissis*. W badaniach tych nie wyliczono ED_{50} , ale na podstawie zamieszczonych w publikacji danych można oszacować, że wartość ta wynosiła około 10 μM dla *B. tulipae* i około 40 μM dla *Ph. narcissis*. Na podkreślenie zasługuje także fakt,

że wzrost tych grzybów nie był hamowany w 100%, nawet przez największą koncentrację monoglukozydu ($70 \mu\text{M}$) użytą w tych badaniach (S a n i e w s k a i in., 2003). Wskazywałoby to na fungistatyczne oddziaływanie monoglukozydu KM na wzrost *B. tulipae* i *Ph. narcissis*.



Ryc.3. Hamowanie (w % kontroli) wzrostu *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* na pożywce CMA przez różne koncentracje monoglukozydu KM

Fig. 3. Inhibition (in % of control) of *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* growth on CMA by various concentrations of monoglucoside KM

Znacznie silniejszą aktywność antygrzybową monoglukozydu KM wykazali natomiast L e v y i in. (1989) oraz O l e s z e k (1990). W badaniach O l e s z e k a (1990) wartość ED_{50} dla monoglukozydu KM hamującego wzrost grzyba *Trichoderma viride* wynosiła $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. W badaniach tych grzyb *T. viride* wykorzystano jako organizm testowy, czyli bardzo wrażliwy na analizowane związki.

Aktywność antygrzybowa saponin związana jest z ich zdolnością do tworzenia kompleksów ze sterolami i fosfolipidami w membranie komórkowej grzybów, w wyniku czego dochodzić może do zmian w przepuszczalności membran oraz lizy komórek (G r u i z, 1996). Związkiem najsilniej hamującym wzrost Ggt, a także innych grzybów (O l e s z e k 1990; S a n i e w s k a i in., 2003) był 3-O- β -D glukopiranozyd KM (monoglukozyd), czyli kwas medikagenowy z cząsteczką glukozy przyłączonej w pozycji 3-O (ryc. 1). Pozostałe glikozydy KM analizowane w naszych badaniach posiadały cząsteczki różnych cukrów połączonych z dwoma atomami węgla w pozycjach 3-O- oraz 28-O- (ryc. 1) i związki te w użytych koncentracjach nie wykazywały istotnego wpływu na wzrost Ggt (tab. 1). Nasuwa się więc pytanie z czego wynikają różnice

w aktywności antygrzybowej wymienionych związków? Danych literaturowych na ten temat jest niewiele, ale z badań O l e s z k a (1990) wynika, że aktywność biologiczna saponin lucerny związana jest wyraźnie z ich strukturą chemiczną, a zasadniczą rolę w tym względzie odgrywa wolna, niezestryfikowana grupa karboksylowa przy węglu C-28- (ryc. 1).

Tabela 1

Wzrost *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* na agarowej pożywce kukurydzianej (CMA) z dodatkiem różnych koncentracji kwasu medikagenowego i jego glikozydów.

Table 1

Growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on corn meal agar (CMA) enriched with different concentrations of medicagenic acid and its glycosides.

Związek Compound	Koncentracja Concentration		
	0,01 mM	0,02 mM	0,03 mM
	Promień kolonii grzyba w mm Colony radius in mm		
Kwas medikagenowy (KM) Medicagenic acid (KM)	31,2	29,8	29,2*
3-glu KM	29,3*	24,3*	4,7*
3-glu, 28-glu KM	30,0	30,8	30,2
3-glu, 28-ara-rha-xyl KM	30,8	31,2	30,5
3-glu-glu, 28-ara-rha-xyl KM	31,5	30,7	30,8
3-gluA, 28-ara-rha-xyl KM	31,2	30,7	31,7
Kontrola; Control	30,7	30,7	30,7

*Istotne zahamowanie wzrostu grzyba w stosunku do kontroli ($\alpha = 0.05$)

Significant inhibition of the growth of the fungus in relation to control ($\alpha = 0.05$)

W podsumowaniu przeprowadzonych badań można stwierdzić, że spośród saponin kwasu medikagenowego występujących w korzeniach lucerny jedynie monoglukozyd tego kwasu wykazuje wyraźnie hamujący wpływ na wzrost Ggt na pożywce agarowej. Potrzebne są więc dalsze badania nad możliwością wykorzystania tego związku w praktyce.

LITERATURA

- Biały Z., Jurzysta M., Oleszek W., Piacente S., Pizza C., 1999. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. *J. Agric. Food Chem.*, 47(8): 3185–3192
- Drathówna M., 1959. Występowanie zgorzeli podstawy źdźbła (*Ophiobolus graminis* Sacc. na pszenicy w zależności od przedplonu i gleby. *Biul. Inst. Ochr. Rośl.* 4:125–138.
- Jurzysta M., Waller G.R., 1996. Antifungal and hemolytic activity of aerial parts of alfalfa (*Medicago*) species in relation to saponin composition. In: *Saponin used in traditional and modern medicine*. Eds. G.R Waller.; K. Yamasaki, Pleum Publishing Co., New York, pp. 565–574.
- Jurzysta M., 1982. Sposób wyodrębniania kwasu medikagenowego z surowca roślinnego. Polski Urząd Patentowy, Patent No.114171
- Korbias M., 1998. Choroby i szkodniki zbóż. Wyd. Multum Poznań, ss. 88.
- Levy M., Zehavi U., Naim M., Polacheck I., Evron R., 1989. Structure - biological activity relationships in alfalfa antimicrobial saponins: The relative activity of medicagenic acid and synthetic derivatives thereof against plant pathogenic fungi. *J. Phytopath.* 125: 209–216.
- Martyniuk S., Myśków W., 1984. Control of the take-all fungus by *Phialophora* sp. (lobed hyphopodia) in microplots experiments with wheat. *Zbl. Microbiol.* 139: 575–579.
- Martyniuk S., 1986. Ekologia i właściwości fitopatogena korzeni zbóż *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.)Arx & Olivier i grzybów pokrewnych z rodzaju *Phialophora*. Praca doktorska, Wyd. IUNG, R(208), ss. 85.
- Martyniuk S., Jurzysta M., Wróblewska B., 1999. Influence of powdered aerial parts of various *Medicago* species on the growth of *Gaeumannomyces graminis* and *Cephalosporium gramineum*. *Bull. Pol. Ac. Sci.: Biol.* 47(2-4): 163–165.
- Martyniuk S., Biały Z., Jurzysta M., 2002. Inhibitory effect of *Medicago arabica* and *Medicago murex* constituents on the growth and pathogenicity of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. In: *Modern fungicides and antifungal compounds*, ed.: H-W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell, H. Lyr, AgroConcept GmbH, Bonn, pp. 395–400.
- Mróz A., Martyniuk S., Kuś J., 1994. Response of winter wheat to seed applied microorganisms. *Phytopathol. Pol.* 7:15–20.
- Oleszek W., 1990. Saponiny korzeni lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.). Budowa chemiczna, aktywność biologiczna i oznaczanie. Praca habilitacyjna. Wyd. IUNG, R(203), ss. 74.
- Osbourn A.E., Bowyer P., Daniels M.J., 1996. Saponin detoxification by plant pathogenic fungi. In: *Saponin used in traditional and modern medicine*. Eds. G.R Waller.; K. Yamasaki, Pleum Publishing Co., New York, pp. 547–555.
- Saniewska A., Biały Z., Jurzysta M., 2003. The effect of alfalfa (*Medicago sativa*) saponins on *Botrytis tulipae* and *Phoma narcissi* growth. *Phytopathol. Pol.* 27: 15–27.
- Weber Z., 2003. Wrażliwość *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* na fungicydy. *Prog. Plant Prot./Postępy Ochr. Roślin*, 43(2): 1019–1021.
- Weller D.M., 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73: 463–469.

Streszczenie

Różne koncentracje kwasu medikagenowego (KM) oraz pięciu glikozydów tego kwasu wyodrębnionych z lucerny siewnej (*Medicago sativa*) dodawano do pożywki agarowej (corn meal agar, CMA) zaszczipionej kulturą *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt). Po różnych okresach inkubacji mierzono promień kolonii badanego grzyba i wyliczano % zahamowania jego wzrostu w stosunku do kontroli (CMA z dodatkiem rozpuszczalnika testowanych związków). Spośród analizowanych związków tylko monoglukozyd KM (3-O- β -D -glukopiranozyd KM) istotnie hamował wzrost Ggt w zakresie użytych koncentracji. Związek ten w stężeniu 50 μ M spowodował zupełne zahamowanie rozwoju badanego grzyba, a po przełożeniu inokulum na pożywkę czystą, grzyb ten nie był zdolny do ponownego wzrostu. Wskazuje to, że w powyższej koncentracji monoglukozyd KM wykazuje efekt grzybobójczy w stosunku do Ggt.

VACAT