

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 632.938 : 632.4

© А. К. Никонова, Ц. А. Егоров, Т. Г. Галкина,
Е. В. Гришин, А. В. Бабаков

**АНТИГРИБНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕНОЛЬНОГО ГЛИКОЗИДА
ВЕРБАСКОЗИДА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СЕМЯН ПОДРОЖНИКА**

NIKONOROVA A. K., EGOROV S. A., GALKINA T. G., GRISHIN E. V., BABAKOV A. V.
ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PHENOLIC GLICOZIDE VERBASCOSIDE
FROM PLANTAGO MAJOR SEEDS

Для своей защиты растения продуцируют множество различных веществ, среди которых имеются как высокомолекулярные соединения (белки, пептиды) (Tossi, Sandri, 2002), так и низкомолекулярные (фитоантисипины и фитоалексины) (Morrissey, Osbourn, 1999; Дьяков и др., 2001). Они присутствуют в здоровых растениях конститутивно или синтезируются в ответ на атаку фитопатогенных микроорганизмов, стресс или воздействие некоторыми природными, а также синтетическими соединениями (Hutcheson, 1998; Тарчевский и др., 2002).

Цель настоящей работы состояла в выделении из семян подорожника (*Plantago major* L.) соединений, обладающих антигрибной активностью, и в изучении их свойств по отношению к разным видам фитопатогенных грибов.

Материал и методы

Семена подорожника собирали в 2002 г. в Московской обл. В экспериментах использовали фитопатогенные грибы: *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*.

Семена подорожника (1 г) измельчали в ступке и экстрагировали 1 мл 10%-й уксусной кислоты при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре. Осадок удаляли центрифугированием, супернатант лиофилизировали. Остаток растворяли в 0.5 мл растворителя (10%-й водный раствор ацетонитрила в 0.1%-й трифторуксусной кислоте), центрифугировали. Супернатант наносили на колонку Sephacryl S-100 (1.6 × 80 см) и элюировали этим же растворителем со скоростью 16 мл/ч, собирая фракции объемом 4 мл. Полученные фракции упаривали на вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant, США) и тестировали на антифунгальную активность по отношению к грибу *Bipolaris sorokiniana*. Далее активную фракцию разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil-100 (4.6 × 250 мм) градиентом ацетонитрила от 10 до 40 % в течение 60 мин при скорости потока 1 мл/мин и температуре 40 °С; растворитель А — 0.1%-я трифторуксусная кислота, растворитель В — 80%-й ацетонитрил в воде. На данной колонке активное соединение элюируется на 37 мин. Структура выделенного соединения была установлена методом ЯМР спектроскопии.

Антигрибную активность изучали модифицированным методом лунок. Грибы выращивали 2 суток на смеси Nestle — 5 злаков, (20 г/л) при 26 °С, затем тестируемые

образцы (50 мкл) помещали в лунки, вырезанные в агаре на расстоянии 3 см от центра чашки Петри. Через 2 суток оценивали ингибирующую активность образцов и влияние их на морфологические изменения в развитии гриба.

Для оценки способности изучаемого соединения защищать проростки ячменя от поражения обыкновенной корневой гнилью использовали семена ячменя сорта Пирка, чувствительного к данному заболеванию. Стерильные наклонившиеся семена помещали в чашки Петри с 2%-м водным агаром рядом с мембранным фильтром, смоченным суспензией конидий гриба *B. sorokiniana* (10^6 спор/мл) и 25 мкл раствора изучаемого соединения. Чашки Петри выдерживали в термостате в горизонтальном положении 24 ч, столько же в вертикальном положении и затем 3 суток на свету при комнатной температуре в вертикальном положении. Измеряли длину корней, высоту и массу проростков, оценивали поражаемость корней грибом *B. sorokiniana* по степени некротизации ткани.

Интенсивность спороношения гриба на корнях определяли флотационным методом (Duczek, 1990). Отрезки корней растирали в ступке с 40 мл 5%-го раствора NaCl. Смесь фильтровали через два слоя стеклоткани в пробирку и в фильтрат добавляли 5 мл минерального масла. Пробирки встряхивали горизонтально в течение 10 мин. После 5 мин отстаивания слой масла (0.1 мл) переносили на предметное стекло и подсчитывали количество конидий гриба. Данные выражали как количество конидий на растении. Повторность 5-кратная.

Результаты и обсуждение

С помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса ранее нами была установлена структура соединения, выделенного из семян *Plantago major* (Егоров и др., 2004). Этим соединением оказался фенольный гликозид (2-(3,4-дигидроксифенил)этил-β-D-3-O-β-D-рамнопиранозил)-4-O-(3,4-дигидроксициннамоил)-β-D-глюкопиранозид с молекулярной формулой $C_{29}H_{36}O_{15}$ и с молекулярной массой 624.60, известный под названием вербаскозид.

Биологические испытания показали, что вербаскозид в опытах *in vitro* в разной степени ингибирует рост почвообитающих фитопатогенных грибов: *Fusarium culmorum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea* (табл. 1). Отметим, что степень ингибирования вербаскозидом разных видов грибов варьировала. Так, *Bipolaris sorokiniana* оказался наименее устойчивым, а *Fusarium culmorum* — наиболее устойчивым к вер-

Таблица 1

Антигрибная активность вербаскозида

Концентрация, мкг/мл	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Alternaria solani</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
1000.00	–	++++	++	–	++
330.00	–	++++	+	–	+
110.00	–	+++	–	–	–
37.00	–	++	–	–	–
12.30	–	++	–	–	–
4.10	–	+	–	–	–
1.37	–	+	–	–	–
0.45	–	+	–	–	–
0.15	–	–	–	–	–

Примечание. «–» — отсутствие, «+» — наличие антигрибной активности.

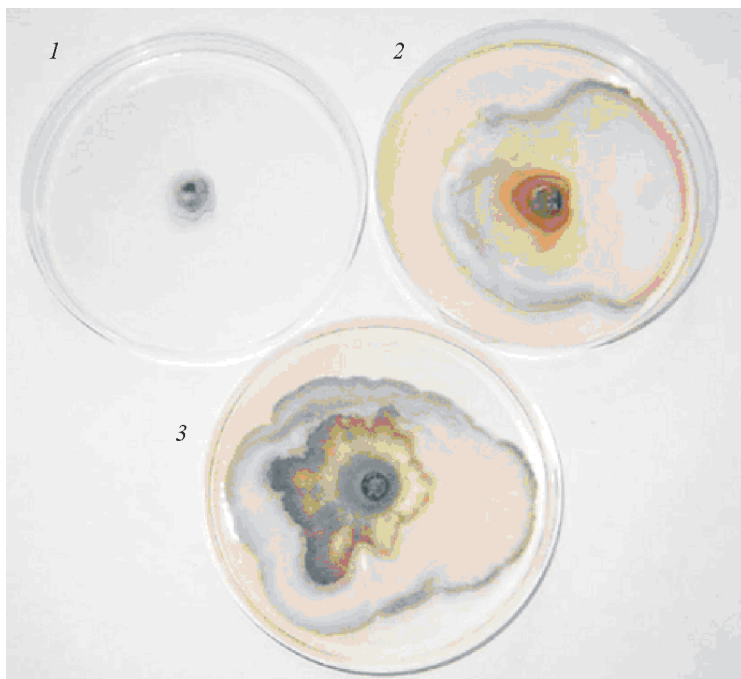


Рис. 1. Морфологические изменения *Bipolaris sorokiniana* при росте на среде с вербаскозидом. Концентрация в агаровой среде: 1 — 33,0, 2 — 1,2, 3 — 0,4 мкг/мл.

баскозиду. На *Rhizoctonia solani* и *Alternaria solani* вербаскозид не оказывал фунгистатического действия. Интересной особенностью вербаскозида оказалось его влияние в малых концентрациях на морфологию гриба: вторичный рост, интенсивное образование покоящихся структур — конидий и микросклероциев, нарушение меланиногенеза и т. д. Наиболее чувствительным к вербаскозиду оказался гриб *A. solani*.

Эта особенность вербаскозида была проверена нами в экспериментах по его действию на линейную скорость роста *Bipolaris sorokiniana*. В концентрации 33 мкг/мл вербаскозид полностью подавлял рост гриба на твердой среде на протяжении 11 суток. В контрольном варианте гриб вырос равномерно по всему диаметру чашки Петри на 5-е сутки культивирования. При меньших концентрациях вербаскозида (1,2—0,4 мкг/мл) наблюдается нарушение радиального роста гриба, особенностей субстратного и воздушного мицелия: край колонии образует валик воздушного, войлочного мицелия. Изменение морфологии развития и ингибирования роста фитопатогена *B. sorokiniana* при внесении в среду разных концентраций вербаскозида показано на рис. 1. Морфологические изменения в развитии гриба сохранялись и после двукратного посева культуры.

В опытах *in vitro* вербаскозид защищал проростки ячменя от поражения *B. sorokiniana*, значительно снижая интенсивность спорообразования гриба в тканях корня и заболеваемость проростков корневой гнилью (рис. 2; табл. 2).

Таким образом, в ходе поиска соединений антигрибной природы мы использовали семена сорного растения подорожника, повсеместно распространенного в России. Изолированный из семян подорожника фенольный гликозид соответствует по своей структуре известному соединению, называемому вербаскозидом, которое впервые было выделено из корней *Leucoseptrum japonicum* (Miyase et al., 1982) и листьев тайландского дерева *Barnetti a cerri* (Kanchanaroom et al., 2002). Вербаскозид является природным антиоксидантом, обладающим положительным кардиоактивным (Pennaschio et al., 1999) и антиметастазным действием (Ohno et al., 2002). Отмечена также его

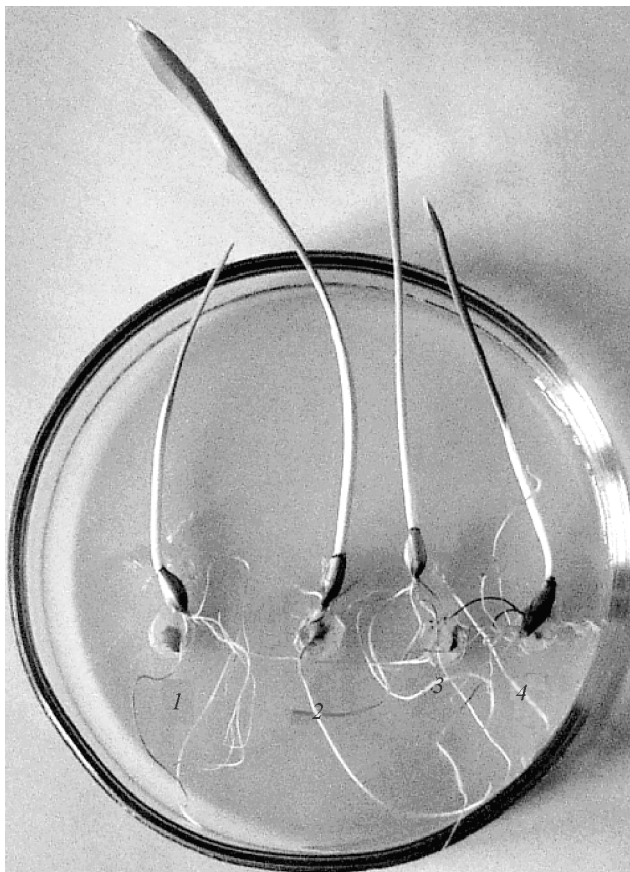


Рис. 2. Влияние вербаскозида на поражение проростков ячменя *Bipolaris sorokiniana*.
 1 — *B. sorokiniana* (10^6 конидий/мл) + 25 мкл H_2O ; 2, 3, 4 — *B. sorokiniana* + 25 мкл раствора вербаскозида в концентрации 37,0, 4,1 и 0,2 мкг/мл соответственно.

Таблица 2

Влияние вербаскозида на развитие проростков ячменя и поражение корней *Bipolaris sorokiniana* (средние данные 7-кратной повторности)

Концентрация, мкг/мл	Длина корня		Высота проростков		Масса проростков		Поражение корня, %	Количество конидий в тканях корня, штук/г
	мм	% по отношению к контролю	мм	% по отношению к контролю	мг	% по отношению к контролю		
Контроль	85	—	102	—	189	—	81	400
37.0	92	8	145	42	210	11	22	120
4.1	97	14	123	20	201	7	25	120
0.2	85	0	109	7	190	1	60	288
P < 0.05 (НСР)	4	—	6	—	5	—	—	13

антибактериальная активность против грамположительных *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Proteus mirabilis* бактерий (Didry et al., 1999), однако его антигрибная активность не установлена.

Наши исследования биологической активности показали, что вербаскозид обладает фунгистатическим действием по отношению к фитопатогенам *Fusarium culmorum*, *Bipolaris sorokiniana* и *Botrytis cinerea*. При этом низкие концентрации соединения вызывают морфологические изменения у грибов *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria solani* и *Rhizoctonia solani*. Ингибирование роста *R. solani* и *Alternaria solani* на твердых средах не отмечено.

Помимо непосредственного влияния вербаскозида на развитие грибов на твердых средах нами была обнаружена его способность защищать проростки ячменя от грибной инфекции. Она проявлялась в снижении поражаемости корней грибом *Bipolaris sorokiniana*, а также в уменьшении интенсивности споруляции фитопатогена в тканях корня.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-48578) и Министерства промышленности, науки и технологий (грант 43.050.11.2561).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дьяков Ю. Т., Озерецковская О. Л., Джавахия В. Г., Багирова С. Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общ-во фитопатологов, 2001. 302 с.

Егоров Ц. А., Галкина Т. Г., Балашова Т. А., Арсеньев А. С., Никонорова А. К., Бабаков А. В., Гришин Е. В. Фенольный гликозид, выделенный из семян подорожника (*Plantago major* L.) // Докл. РАН. 2004. Т. 396, № 1. С. 1—4.

Тарчевский Н. И., Зиновьева С. В., Ильинская Л. И. и др. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.

Didry N., Seidel V., Dubreul L., Tilleguin T., Bailleul F. Isolation and antibacterial activity phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra* // J. Ethnopharmacol. 1999. Vol. 67(2). P. 197—202.

Duczek L. J. Sporulation of *Cochliobolus sativus* on crown and underground parts of spring cereals in relation to weather and host species, cultivar, and phenology // Can. J. Plant Pathol. 1990. Vol. 12. P. 273—278.

Hutcheson S. W. Current concepts of active defense in plants // Annu. Rev. Phytopathol. 1998. Vol. 36. P. 59—90.

Kanchanaroom T., Kasai R., Yamasaki K. Phenolic glycosides from *Barnettia kerri* // Phytochemistry. 2002. Vol. 59. P. 565—570.

Miyase T., Koizumi A., Ueno A. et al. Studies on the acyl glycosides from *Leucoseptum japonicum* (Miq.) Kitamura et Murata // Chem. Pharm. Bull. 1982. Vol. 30(8). P. 2732—2737.

Morrissey J. P., Osbourn A. E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. Vol. 63(3). P. 708—724.

Ohno T., Inoue M., Ogihara Y., Saracoglu I. Antimetastatic activity of acteoside, phenylethanoid glycoside // Biol. Pharm. Bull. 2002. Vol. 25(5). P. 666—668.

Pennacchio M., Syah Y. M., Alexander E., Ghisalberti E. L. Mechanism of action of verbascoside on the isolated rat heart increases in level of prostacyclin // Phytother. Res. 1999. Vol. 13(3). P. 254—255.

Tossi A., Sandri L. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides // Curr. Pharm. Des. 2002 Vol. 8(9). P. 743—761.

ГНУ Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина

и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

anikon@iab.ac.ru

Поступила 15 IV 2008

Р Е З Ю М Е

Фенольный гликозид вербаскозид с молекулярной массой 624.6 Да был изолирован из семян *Plantago major*. Оценивали биологическую активность вербаскозида по отношению к различным видам почвенных фитопатогенных грибов. Вербаскозид ингибировал *in vitro* рост таких видов, как *Fusarium culmorum*, *Bipolaris sorokiniana* и *Botrytis cinerea*, но не влиял на рост *Rhizoctonia solani* и *Alternaria solani*. В низких концентрациях вербаскозид влияет на морфологическое развитие патогенных грибов. Было показано, что вербаскозид защищает проростки ячменя от поражения обыкновенной корневой гнилью и снижает интенсивность споруляции грибов в ткани корня.

Ключевые слова: антигрибная активность, вербаскозид, *Plantago major*.

S U M M A R Y

Phenylpropanoid glycoside verbascoside with molecular mass 624.6 Da was isolated from the seeds of *Plantago major*. We assessed the biological activity of verbascoside with different soil-borne pathogenic fungi. Verbascoside inhibited *in vitro* the growth of *Fusarium culmorum*, *Bipolaris sorokiniana* and *Botrytis cinerea* but not *Rhizoctonia solani* and *Alternaria solani*. At low concentrations the verbascoside influences the morphological development of pathogenic fungi. It was shown that verbascoside protects barley seedlings against common root rot disease and it decreases the intensity of fungus sporulation in root tissue.

Key words: antifungal activity, verbascoside, *Plantago major*.