Analiza pigmentów antrachinonowych *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.

PIOTR KACHLICKI¹, WOJCIECH WAKULIŃSKI²

¹ Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

² Katedra Fitopatologii SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Kachlicki P., Wakuliński W. (¹ Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland; ² Department of Plant Pathology, Warsaw Agricultural University, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Poland). Analysis of anthraquinone pigments of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.

(Otrzymano dn. 5 czerwca 2002)

Summary

Pyrenophora tritici-repentis, anamorph *Drechslera tritici-repentis*, strains used in this study represented three phenotypic classes of this fungus: the wild type, strains unable to produce melanins - mel(-), and intermediate strains. Using an HPLC system with a reversed phase C₁₈ column synthesis of anthraquinone pigments by strains belonging to all three classes could be detected. According to the ¹H NMR spectra analysis the major compounds produced by *P. tritici-repentis* are catenarin, helminthosporin, islandicin, emodin, ω-hydroxy-islandicin, ω-hydroxy-catenarin and ω-hydroxy-helminthosporin. However, amounts of these compounds produced by the wild type were up to 350 times lower than those observed for the mel(-) forms. Some differences in profiles of these compounds produced by different strains were also observed.

Key words: *Pyrenophora tritici-repentis*, anthraquinone pigments

WSTĘP

Pyrenophora tritici-repentis, (stadium konidialne *Drechslera tritici-repentis*) jest gatunkiem powszechnie występującym na całym świecie o szerokim zakresie gospodarzy. Porażeniu ulegają między innymi pszenica, pszenżyto oraz w dużo mniejszym stopniu jęczmień i żyto. Żywicielem są także liczne gatunki traw. (Ellis i Walters, 1976). W uprawie zbóż, patogen jest przyczyną brunatej plamistości liści, choroby o istotnym znaczeniu w kompleksie nekrotycznych plamistości (Wiese, 1977). Grzyb ten, podobnie do innych patogenów z rodzaju *Drechslera*, wytwarza szereg metabolitów wtórnych (Kachlicki, 1995), między innymi pigmenty antrachinonowe, wśród których ilościowo dominuje katenaryna (Engström i in., 1993; Wakuliński i in., 2000). Związek ten wyizolowano po raz pierwszy z kultur *Helminthosporium catenarium* skąd pochodzi jego nazwa (Rastrick i in., 1934). Związek ten w późniejszych latach zidentyfikowano także wśród metabolitów różnych gatunków grzybów z rodzajów *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Drechslera* i *Eurotium* (Turner, 1971; Anke, 1980a, b; Engström, 1993). Wśród szczepów *P. tritici-repentis* znaleziono formy mel(-) nie wytwarzające melanin (Wakuliński i in., 1999), które syntetyzowały znaczne ilości katenaryny i innych pigmentów o podobnej budowie (Wakuliński i in., 2000). Dzięki zastosowaniu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej do analizy związków antrachinonowych wytwarzanych przez te formy grzyba stwierdzono, że kompleks ten składa się z przynajmniej 12 różnych związków i zidentyfikowano struktury pięciu spośród nich (Kachlicki i Wakuliński, 2002)

W niniejszej pracy porównano wyniki analizy chromatograficznej metodą HPLC związków antrachinonowych wytwarzanych przez formy mel(-), formy pośrednie oraz formy typowe *P. tritici-repentis*. Określono też strukturę kolejnego z pigmentów tego kompleksu.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy *Pyrenophora*, podłoża i biosynteza pigmentów

Analizowano wytwarzanie związków antrachinonowych przez 16 jednozarodnikowych izolatów *P. tritici-repentis* pochodzących ze słomy lub liści porażonych roślin pszenicy i pszenżyta zebranych w Polsce oraz Republice Czeskiej, reprezentujących trzy klasy fenotypowe tego patogena: typ dziki, szczepy mel(-) niezdolne do produkcji melanin oraz szczepy pośrednie. Grzyb utrzymywano na pożywce SNA w 4°C.

Biosyntezę pigmentów przeprowadzano na pożywce ryżowej. W tym celu 50 g ryżu umieszczano w kolbie Erlenmayera (500 mL), nawilżano wodą destylowaną (15 mL) i po 24 godz. autoklawowano (121°C, 30 min.). Po ochłodzeniu, podłoże zaszczepiano cylindrycznymi wycinkami agaru przerośniętego grzybnia z 10-dniowych kultur *P. tritici-repentis* na pożywce PDA. Hodowlę prowadzono w temperaturze pokojowej przez 14 dni wstrząsając kultury raz dziennie dla uniknięcia zbrzydlenia. Po powyższym czasie kultury suszono na powietrzu, mielono i poddawano analizie chemicznej.

Ekstrakcja i oczyszczanie pigmentów

Przerośnięte grzybnia podłoże (10 g) ekstrahowano chloroformem (25 mL) i po 24 godz. wstępnie odtłuszczano przez wymrożenie (-20°C). Roztwór metabolitów przesączano, odparowywano na wyparce próżniowej w temp. 35°C i pozostałość rozpuszczano w etanolu. Etanolowy roztwór rozcieńczano 4 częściami wody i nakładano na kolumnienki C_{18} do ekstrakcji w fazie stałej (SPE). Kolumnienki przemycano roztworem acetonitrylu w wodzie (20%) i eluowano 90% acetonitrylem (1 mL). Tak uzyskane próbki pigmentów używano do analizy HPLC.

Analiza HPLC pigmentów antrachinonowych

Analizę prowadzono używając instrument Beckman Gold wyposażony w detektor diodowy i kolumnę Alltima C_{18} (250x4,6 mm, Alltech Associates, UK). Rozdział prowadzono stosując gradient odczynników: (A) woda zawierająca kwas trójfluorooctowy (0,1%) oraz (B) acetonitryl - roztwór A (80:20). Prędkość przepływu eluentów wynosiła 1,2 mL/min. i stosowano następujący program: 60% roztworu B przez 1 min., liniowy gradient do 99% B w 25 min., 99% B przez 6 min., powrót do 60% B w 2 min., równoważenie kolumny (6 min.). Rejestrowano chromatogramy przy długościach fali 230 i 445 nm oraz widma UV/vis poszczególnych związków (w zakresie 210-600 nm).

Analiza struktury pigmentów antrachinonowych

Indywidualne związki otrzymywano w wyniku preparatywnej chromatografii ekstraktu w odwróconej fazie na kolumnie (58x1,5 cm) z wypełnieniem C_{18} (Aldrich, USA) eluowanej roztworami acetonitrylu w wodzie o wzrastających stężeniach. Oczyszczone związki poddawano wysokorozdzielczej spektrometrii NMR (^1H) na instrumencie Varian VXR 300. Rejestrowano widma roztworów w deuterowanym chloroformie (CDCl_3) lub metanolu (CD_3OD) przy 300 MHz stosując tetrametylosilan (TMS) jako standard wewnętrzny

WYNIKI

Stosując metodę HPLC analizy pigmentów antrachinonowych *P. tritici-repentis* stwierdzono występowanie u większości izolatów typu mel(-) 10 różnych związków (Rys. 1.). Na drodze preparatywnego oczyszczania pojedynczych związków i określania ich struktur przy użyciu spektrometrii ^1H NMR ustalono struktury siedmiu z nich przedstawione na rys. 2. (K a c h l i c k i i W a k u l i Ń s k i, 2002). U wszystkich form mel(-) dominującym ilościowo związkiem jest katenaryna, której udział w całkowitej zawartości antrachinonów stanowi około 65%. Kolejnymi związkami występującymi w znacznie mniejszych ilościach są helmintosporyna (ok. 25%), islandycyna (5%) i emodyna (2%). Udział żadnego z pozostałych zidentyfikowanych związków nie przekracza 0,5% całkowitej ilości antrachinonów.

Rysunek 1. Analiza HPLC pigmentów antrachinonowych izolatu 6b *P. tritici-repentis*. Rozdział prowadzono na kolumnie Alltima C₁₈ 250x4.6 mm stosując rozpuszczalniki: (A) woda zawierająca 0.1% kwasu trójfluorooctowego (TFA) i (B) acetonitryl – rozpuszczalnik A (80:20) przy prędkości przepływu 1,2 mL/min z następującym programem: 60% B przez 1 min; liniowy gradient do 99% B w 25 min; 99% B przez 6 min; powrót do 60% B przez 2 min i równoważenie kolumny (6 min). Zarejestrowano chromatogram przy długości fali 445 nm.

Figure 1. HPLC analysis of anthraquinone pigments of *P. tritici-repentis* strain 6b. Separation was performed on Alltima C₁₈ 250x4.6 mm column using the following solvent system; (A) water with 0,1% TFA acid and (B) acetonitrile – solvent A (80:20). The flow rate 1,2 mL/min with gradient elution as follows: 60% of B for 1 min; linear gradient to 99% of B in 25 min; 99% of B for 6 min; return to 60% of B in 2 min and column equilibration (6min.). The chromatogram was recorded at 445 nm.

W wyniku analiz HPLC wykonanych dla izolatów reprezentujących typowe formy *P. tritici-repentis* również stwierdzono wytwarzanie przez nie związków antrachinonowych, lecz w minimalnych ilościach (Rys. 3.). Na podstawie porównania pól powierzchni odpowiednich wierzchołków chromatograficznych można stwierdzić, że ilości te są niekiedy aż 350 razy niższe niż u form mel(-). U form tych pula pigmentów antrachinonowych również zdominowana była przez katenarynę, której udział wynosił ok. 60%, zawartość helmintosporyny była na poziomie 30% sumy a zawartość pozostałych związków była śladowa.

U niektórych analizowanych izolatów (np. izolat 158, Rys. 4.) stwierdzono odmienny skład pigmentów antrachinonowych. U izolatu 158 stwierdzono największą zawartość helmintosporyny (54% sumy związków), zawartości katenaryny i islandycyny wynosiły po ok. 10% natomiast 25% udziału pigmentów przypadało na zawartość niezidentyfikowanego dotychczas związku.

Katenaryna
1,3,5,8-tetrahydrokso-
6-metylo-9,10-antrachinon

Helmintosporyna
1,4,5-trihydrokso-
7-metylo-9,10-antrachinon

Islandycyna
1,4,5-trihydrokso-
3-metylo-9,10-antrachinon

Emodyna
1,3,8-trihydrokso-
6-metylo-9,10-antrachinon

O-hydroksy-helmintosporyna
1,4,5-trihydrokso-
7-hydroksymetylo-9,10-antrachinon

O-hydroksy-katenaryna
1,3,5,8-tetrahydrokso-
6-hydroksymetylo-9,10-antrachinon

O-hydroksy-islandycyna
1,4,5-trihydrokso-
3-hydroksymetylo-9,10-antrachinon

Rysunek 2. Wzory chemiczne zidentyfikowanych pigmentów antrachinonowych
P. tritici-repentis

Figure 2. The chemical structure of anthraquinone pigments detected in cultures
of *P. tritici-repentis*

Rysunek 3. Analiza HPLC pigmentów antrachinonowych izolatu Ptr-200 *P. tritici-repentis*. Chromatogram uzyskano w takich samych warunkach jak podano w opisie rys. 1.

Figure 3. The HPLC analysis of anthraquinone pigments produced by Ptr-200 strain of *P. tritici-repentis*. The analysis condition the same as given in description of Fig. 1.

Rysunek 4. Analiza HPLC pigmentów antrachinonowych izolatu Ptr-158 *P. tritici-repentis*. Chromatogram uzyskano w takich samych warunkach jak podano w opisie rys. 1.

Figure 4. The HPLC analysis of anthraquinone pigments produced by Ptr-158 strain of *P. tritici-repentis*. The analysis condition the same as given in description of Fig. 1.

DYSKUSJA

Antrachinony są metabolitami wtórnymi wytwarzanymi przez różne organizmy, w tym głównie rośliny wyższe, mchy, porosty, algi i grzyby (M u z y c h k i n a, 1998). W sporadycznych przypadkach znajdowano związki antrachinonowe u bakterii i owadów. U większości gatunków występują one w złożonych mieszaninach różnorodnie podstawionych chemicznie związków. E n g s t r ö m i in. (1993) stwierdzili, że głównym pigmentem antrachinonowym wytwarzanym przez *P. tritici-repentis* oraz szereg spokrewnionych gatunków (*P. teres*, *P. graminea*, *P. dictyoides* i *D. phlei*) jest katenaryna. Autorzy ci stwierdzili również, że *D. avenae* i *Bipolaris sorokiniana* wytwarzają helmintosporynę oraz cynodontynę (1,4,5,8-tetrahydrokso-3-metylo-9,10-antrachinon). Antrachinony islandycyna i emodyna zidentyfikowane w badanych izolatach *P. tritici-repentis* są znanymi metabolitami grzybów, lecz do tej pory nie donoszono o występowaniu ich u tego patogena. Na uwagę zasługuje znalezienie u dużej liczby szczepów ω-hydroksylowych pochodnych powyższych pigmentów. Zjawisko takiej hydroksylacji znane jest zarówno u grzybów (G i l l i M o r g a n, 2001), roślin (K u p c h a n i K a r i m, 1976) jak i w trakcie metabolizowania pochodnych antrachinonów w komórkach ssaków przez enzymy związane z cytochromem P450 (M u e l l e r i in., 1998).

Zgodnie z naszymi poprzednimi obserwacjami (W a k u l i Ń s k i i in., 1999, 2000) pigmenty antrachinonowe wytwarzane są głównie przez formy *P. tritici-repentis* nie tworzące melanin. Takie izolaty grzyba wydzielają znaczne ilości katenaryny i innych barwników na zewnątrz grzybni. Podobnego procesu nie obserwowano u izolatów *P. tritici-repentis* typu dzikiego, co prawdopodobnie związane jest ze stosunkowo łatwym włączaniem różnorodnych związków fenolowych w skomplikowane chemicznie polimeryczne struktury melanin. Stosując analizę HPLC wykazano, że także formy grzyba o fenotypie dzikim mogą wydzielać do środowiska pewne, stosunkowo jednak niewielkie, ilości antrachinonów - głównie katenaryny i helmintosporyny, które wykryto w stosowanym podłożu ryżowym na poziomie poniżej 1 ppm.

Zwraca jednocześnie uwagę występowanie izolatów *P. tritici-repentis* o zmienionych stosunkach ilościowych katenaryny i helmintosporyny. Obserwacja ta świadczy o istnieniu przynajmniej kilku genów odpowiedzialnych za wytwarzanie enzymów uczestniczących w biosyntezie i modyfikacjach tych związków lub za regulację tego procesu.

Wytwarzanie złożonych mieszanin związków antrachinonowych przez *P. tritici-repentis* może mieć znaczenie dla tego grzyba w saprofitycznej fazie jego wzrostu gdyż jak stwierdzono powodują one znaczną inhibicję wzrostu różnych gatunków grzybów z rodzajów *Alternaria*, *Fusarium*, *Epicoccum* (W a k u l i Ń s k i i in., 2002).

LITERATURA

- Anke H., Kolthoum I., Zahner H., Laatsch M., 1980a. The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. I. Occurrence, isolation, identification and antimicrobial activity. Arch. Microbiol. 126: 223-230.
- Anke H., Kolthoum I., Laatsch M., 1980b. Metabolic products of microorganisms. 192. The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. II. Biological activity. Arch. Microbiol. 126: 231-236.
- Ellis M.B., Waller J.M., 1976. *Pyrenophora tritici-repentis*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No 494.
- Engström K., Brishammar S., Svensson C., Bengtsson M., Andersson R., 1993. Anthraquinones from some *Drechslera* species and *Bipolaris sorokiniana*. Mycol. Res. 97: 381-384.
- Gill M., Morgan P.M. 2001. New fungal anthraquinones. ARKIVOC 2: 145-156 (<http://www.arkat-usa.org/ark/journal/Volume2/Part3/Cameron/DC-210B/DC-210B.pdf>)
- Kachlicki P., 1995. Metabolites of *Helminthosporia*. W: „*Helminthosporia* - Metabolites, Biology, Plant Diseases”, Institute of Plant Genetics, wyd. J. Chełkowski, 1-26.
- Kachlicki P., Wakuliński W., 2002. Anthraquinone pigments from *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. Złożone do druku.
- Kupchan S.M., Karim A., 1976. Tumor inhibitors. Aloe emodin: antileukemic principle isolated from *Rhamnus frangula* L. Lloydia 39: 223-224.
- Mueller S.O., Stopper H., Dekant W., 1998. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. Drug Metabolism and Disposition 26: 540-546.
- Muzychkina R.A., 1998. Natural anthraquinones. Biological and physicochemical characteristics. Ed. by Tolstikov G. A. Publishing House Phasis, Moskwa. Pp 864.
- Raistrick H., Robinson R., Todd A.R., 1934. On the production of hydroxyanthraquinones by species of *Helminthosporium*. Biochem. J. 28: 559-572.
- Turner W.B., 1971. Fungal metabolites. Academic Press. Pp 446.
- Wakuliński W., Schollenberger M., Zamorski C., Nowicki B., Kachlicki P., 1999. Spontaneous melanin-deficient mutants of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. Phytopathologia Pol. 18: 135-138
- Wakuliński W., Kachlicki P., Zamorski C., Schollenberger M., Lotocka B., Nowicki B., 2000. Characterization of the red pigment in melanin-deficient mutants of *Pyrenophora tritici-repentis*. Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Taormina - Giardini Naxos, Italy, 18-22 September 2000: 148-150.
- Wakuliński W., Kachlicki P., Sobiczewski P., Schollenberger M., Zamorski C., Lotocka B., 2002. Catenarin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler and its significance in saprophytic growth of the fungus. J. Phytopathology, w druku.
- Wiese M.V., Compendium of wheat diseases, Second edition. APS Press, St Paul Minnesota pp 112.

Analiza pigmentów antrachinonowych *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.

Streszczenie

Szczepy *Pyrenophora tritici-repentis*, anamorfa *Drechslera tritici-repentis*, użyte do badań reprezentowały trzy typy fenotypowe tego grzyba: typ dziki, szczepy mel(-) niezdolne do wytwarzania melanin oraz szczepy pośrednie. Dzięki zastosowaniu analizy HPLC na kolumnie z odwróconą fazą C₁₈ można było wykazać zachodzenie biosyntezy pigmentów antrachinonowych przez izolaty należące do wszystkich trzech klas. Na podstawie analizy widm ¹H NMR stwierdzono, że głównymi związkami wytwarzanymi przez *P. tritici-repentis* są katenaryna, helminthosporyna, islandycyna, emodyna, ω-hydroksy-islandycyna, ω-hydroksy-katenaryna i ω-hydroksy-helminthosporyna. Jednakże ilości tych związków wytwarzane przez szczepy dzikie grzyba są do około 350 razy mniejsze od obserwowanych dla szczepów mel(-). Stwierdzono również różnice w profilach związków antrachinonowych wytwarzanych przez poszczególne izolaty.