

WPLYW LUCERNY NA WZROST *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*
W MIKROHODOWLI

RADOSŁAW ŚPIEWAK¹, WIESŁAWA SZOSTAK¹, MARIAN JURZYSTA², ZBIGNIEW
BIAŁY², ROMUALD MALESZKA³, BOŻENA RZEPECKA³, MARIA MAZUREK³

¹ Instytut Medycyny Wsi, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin

² Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

³ Oddział Dermatologiczny Szpitala MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.

THE EFFECT OF *MEDICAGO SPP.* ON GROWTH OF *TRICHOPHYTON*
MENTAGROPHYTES IN MICROCULTURE

A b s t r a c t. The study aimed at assessing effect of dried root and aerial parts of *Medicago* spp. on growth of *Trichophyton mentagrophytes*. Fungus strains were inoculated onto microcultures with Sabouraud agar supplemented each with 1 g of dried and pulverised roots or aerial parts of 3 species: *Medicago arabica*, *M. sativa*, and *M. murex*. The strongest inhibitory effect on *T. mentagrophytes* growth was that of aerial parts of *M. arabica* (median diameter 6 mm compared to 13 mm of control), followed by root of *M. arabica* (10 mm) and root of *M. murex* (10.5 mm) – in all cases $p < 0.001$. Slight inhibitory effect was also found in the case of aerial parts of *M. murex* (median diameter 12 mm, $p = 0.03$). In contrast, *M. sativa* has shown stimulating effect on growth of *T. mentagrophytes* (15 mm for root and 16.5 mm for aerial part, $p < 0.001$).

WSTĘP

Saponiny są substancjami mającymi chronić roślinę przed infekcją grzybiczą a aktywność niektórych z nich wobec patogenów roślinnych została dobrze udokumentowana (LEVY i wsp. 1989). Fungitoksyczne działanie saponin lucerny wynika z ich interakcji ze związkami sterolowymi komórki grzybiczej (GESTETNER i wsp. 1972). Związki te budzą zainteresowanie jako potencjalne leki przeciw zakażeniom grzybiczym u ludzi.. Do tej pory wykazano *in vitro* działanie saponin lucerny na patogenne dla człowieka grzyby drożdżopodobne (POLACHEK i wsp. 1986a, b). Udokumentowano również *in vitro* hamujące działanie jednej z saponin lucerny – oczyszczonego glukozydu kwasu medikagenowego na wzrost ludzkiego dermatofita *Trichophyton mentagrophytes* (ŚPIEWAK i wsp. 1999) oraz patogennego grzyba pleśniowego *Scopulariopsis brevicaulis* (ŚPIEWAK i wsp. 2000). Nie

ma jednak pewności czy ten właśnie glikozyd jest jedyną saponiną lucerny o działaniu przeciwgrzybiczym. Ponadto, nawet w przypadku potwierdzenia tego efektu *in vivo*, wdrożenie glukozydu kwasu medikagenowego do leczenia napotkałoby na trudności wynikające z wysokich kosztów uzyskania tej substancji w postaci oczyszczonej. Celem niniejszych badań była ocena wpływu na wzrost grzyba surowca znacznie tańszego i zawierającego również inne saponiny o potencjalnym działaniu przeciwgrzybiczym – sproszkowanych korzeni oraz części nadziemnych wybranych gatunków lucerny.

MATERIAŁ I METODY

Nasiona lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) cv. *Radius* (odmiana polska), *M. murex* Willd. cv. *Zodiak* (odmiana australijska) i *M. arabica* SA 7746 (Australian Medicago Genetic Resource, Centre, Adelaide) wysiano 17.05.1999 r. na polu doświadczalnym Kępa w Puławach. Rośliny zebrano w początkowym stadium kwitnienia, wysuszono w 60°C i zmielono.

Badanie efektu biologicznego uzyskanego materiału przeprowadzono na szczepach dermatofita *Trichophyton mentagrophytes* wyizolowanych od ludzi chorych na grzybicę. Szczepy posiewano w mikrohodowli za pomocą sztancy o średnicy 3 mm. Ogółem wykonano 44 posiewy, każdy na 7 podłożach: na czystym agarze Sabourauda (kontrola) oraz podłożach z dodatkiem po 1 g sproszkowanych suchych korzeni i części nadziemnych *Medicago arabica*, *M. sativa* oraz *M. murex* w 100 ml agaru Sabourauda. Inokulowane hodowle inkubowano w temperaturze 27°C. Czas inkubacji zależał od tempa wzrostu danego szczepu – hodowle mierzono gdy brzeg najszybciej rosnącej kolonii zbliżał się do krawędzi bloczka agarowego, zazwyczaj po 6 – 7 dniach. Analizie statystycznej poddano średnice kolonii.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki badania przedstawia szczegółowo tabela 1. Najsilniejsze zahamowanie wzrostu *T. mentagrophytes* spowodowała sproszkowana część nadziemna gatunku *M. arabica* (mediana 6 mm w porównaniu do 13 mm kontroli), następnie korzeń *M. arabica* (10 mm) oraz korzeń *M. murex* (10,5 mm) – stwierdzone różnice w stosunku do kontroli były istotne statystycznie przy $p < 0,001$. Niewielkie działanie hamujące wywierała również część nadziemna *M. murex* (mediana 12 mm, $p = 0,03$). Natomiast dodatek do podłoża sproszkowanego suszu lucerny siewnej (*M. sativa*) spowodował przyspieszenie wzrostu *T. mentagrophytes* – mediana dla średnic kolonii hodowanych z dodatkiem korzenia tej rośliny wyniosła 15 mm a z dodatkiem części nadziemnej – 16,5 mm (w obu przypadkach $p < 0,001$).

Rozważenia wymaga pytanie, jakie związki zawarte w badanym materiale roślinnym odpowiadają za stwierdzony efekt hamujący lub stymulujący wzrost dermatofita *T. mentagrophytes*. Interesujących informacji dostarczyć może tutaj zestawienie danych własnych z wynikami badań JURZYSTY i WALLERA (1996) nad efektami biologicznymi oraz charakterystyką chemiczną saponin w nadziemnych częściach poszczególnych gatunków lucerny (Tabela 2). Otóż obydwie gatunki, które w niniejszej pracy wykazały działanie przeciwgrzybicze, cechują się wysokim indeksem hemolitycznym (*M. murex*: 1778, *M. arabica*: 1464) oraz silnym działaniem hamującym wzrost grzyba *Trichoderma viride* (zahamowanie wzrostu przy stężeniu 0,1 g roztworu wodnego/100 ml podłoża wyniosło dla *M. murex* oraz *M. arabica* po 69%). Tymczasem gatunek *M. sativa*, którego dodatek do podłoża wykazał działanie stymulujące wzrost *T. mentagrophytes*, cechuje się niskim indeksem hemolitycznym (150) oraz brakiem działania hamującego na wzrost *T. viride*. Jeszcze ciekawszych danych dostarcza zestawienie działania porównywanych 3 gatunków na *T. mentagrophytes* z podanymi w tej samej pracy JURZYSTY i WALLERA (1996) stężeniami saponin: *M. murex* i *M. arabica* zawierają bardzo wysokie stężenia glikozydów hederageniny a nie zawierają wykrywalnych ilości glikozydów kwasu medikagenowego i sojasapogenolu A. Natomiast część nadziemna *M. sativa*, której dodatek stymulował wzrost *T. mentagrophytes*, nie zawierała wykrywalnych ilości glikozydów hederageniny, za to zawierała średnie ilości glikozydów sojasapogenolu A oraz kwasu medikagenowego. Obecność glikozydów kwasu medikagenowego w gatunku sprzyjającym wzrostowi *T. mentagrophytes* jest zaskakująca w świetle wcześniejszych badań własnych wykazujących wyraźny wpływ hamujący tej saponiny w postaci czystej na wzrost *T. mentagrophytes* (ŚPIEWAK i wsp. 1999). Być może *M. sativa* zawiera inne związki na tyle silnie stymulujące wzrost dermatofita, że znoszą one działanie kwasu medikagenowego. Ponadto, pozostałe gatunki mogą zawierać inne substancje o jeszcze silniejszym działaniu przeciwgrzybiczym. W świetle uzyskanych danych substancją taką mogłaby być hederagenina.

Podsumowując, poszczególne gatunki lucerny różnią się wpływem na wzrost grzyba *Trichophyton mentagrophytes* – najsilniejsze działanie hamujące wykazuje *Medicago arabica*, nieco słabsze – *M. murex*, natomiast dodatek *M. sativa* wykazuje działanie przyspieszające wzrost dermatofita.

TABELA 1

Wpływ dodania 1g sproszkowanej części lucerny do 100 ml podłoża Sabourauda na wzrost dermatofity *Trichophyton mentagrophytes*. Wartości liczbowe odpowiadają średnicy kolonii grzybów w chwili zakończenia badania

TABLE 1

Effect of addition of 1 g of pulverised *Medicago* per 100 ml of Sabouraud medium on growth of dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. Numerical values represent diameter of colonies at the end of observation

	Kontrola Control	<i>Medicago arabica</i>		<i>Medicago sativa</i>		<i>Medicago murex</i>	
		korzeń	nadz.	korzeń	nadz.	korzeń	nadz.
		root	aerial	root	aerial	root	aerial
n	44	44	44	44	44	44	44
max	20,0	12,0	10,0	21,0	23,0	14,0	16,0
Q3	15,0	11,0	7,0	16,0	18,0	12,0	13,0
M	13,0	10,0	6,0	15,0	16,5	10,5	12,0
Q1	12,0	8,0	6,0	13,0	14,5	9,0	11,0
min	6,0	7,0	5,0	11,0	12,0	7,0	8,0
p	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	= 0,03

n – liczba wykonanych posiewów, min – najmniejsza odnotowana wartość, Q1 – 25. percentyl, M – mediana, Q3 – 75. percentyl, max – największa odnotowana wartość, nadz. – część nadziemna rośliny. Poziom istotności p dla różnic między średnicami kolonii hodowanych na podłożu Sabourauda z dodatkiem badanych surowców a średnicami kolonii kontrolnych został obliczony testem kolejności par Wilcoxon.

n – number of cultures, min – the minimal value observed, Q1 – the 25th percentile, M – median, Q3 – the 75th percentile, max – the maximal value observed. The significance level p for differences between diameters of colonies grown on Sabouraud agar supplemented with the plant material tested and diameters of control colonies was calculated using Wilcoxon rank test for pairs.

TABELA 2

Zestawienie wyników własnych w odniesieniu do części nadziemnych poszczególnych gatunków lucerny (pierwszy szereg) z danymi z pracy JURZYSTY i WALLERA (1996) na temat wpływu na wzrost *Trichoderma viride*, zawartości wybranych saponin, oraz aktywności hemolitycznej

TABLE 2

Compilation of own results for aerial parts of the 3 *Medicago* species (first row) with data on inhibition of *Trichoderma viride*, saponin content, and hemolytic activity available from the work by JURZYSTA and WALLER (1996)

	<i>M. arabica</i>	<i>M. murex</i>	<i>M. sativa</i>
działanie na / effect on <i>T. mentagrophytes</i>	silne hamowanie strong inhibition	hamowanie inhibition	stymulacja stimulation
działanie na / effect on <i>Trichoderma viride</i>	silne hamowanie strong inhibition	silne hamowanie strong inhibition	brak wpływu no influence
kwasy medikagenowy medicagenic acid	-	-	++
hederagenina hederagenin	++++	++++	-
indeks hemolityczny hemolytic index	1464	1778	150

Ocena półilościowa: niewykrywalne (-), stężenie niskie (+), średnie (++), wysokie (+++), bardzo wysokie (++++)

Semiquantitative scale: not detectable (-), low (+), medium (++), high (+++), and very high (++++) concentration

LITERATURA

- GESTETNER B, ASSA Y, HENIS Y, TENCER Y, ROTMAN M, BIRK Y, BONDI A. 1972. Interaction of lucerne saponins with sterols. *Biochem. Biophys. Acta* 270: 181-187.
- JURZYSTA M, WALLER GR. 1996. Antifungal and hemolytic activity of aerial parts of alfalfa (*Medicago*) species in relation to saponin composition. W: Waller GR, Yamasaki H (Red). *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine*. New York: Plenum Press: 565-274.
- LEVY M, ZEHAU U, NAIM M, POLACHEK I, EVRON R. 1989. Structure-biological activity relationships in alfalfa antimycotic saponins: the relative activity in medicagenic acid and synthetic derivatives thereof against plant pathogenic fungi. *J. Phytopatol.* 125: 209-216.
- POLACHEK I, ZEHAU U, NAIM M, LEVY M, EVRON R. 1986 a. Activity of compound G2 isolated from alfalfa roots against medically important yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.*

30: 290-294.

POLACHEK I, ZEHAVI U, NAIM M, LEVY M, EVRON R. 1986 b. The susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to an antimycotic agents (G2) from alfalfa. *Zbl. Bakt. Hyg.* 261: 481-486.

ŚPIEWAK R, SZOSTAK W, JURZYSTA M, BIAŁY Z. 1999. The effect of medicagenic acid 3-O-β glucopyranoside on different strains of pathogenic fungus *Trichophyton mentagrophytes* obtained from skin lesions in humans – preliminary results. W: *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants. Book of Abstracts*. Puławy: Institute of Soil Science and Plant Cultivation: 106.

ŚPIEWAK R, SZOSTAK W, JURZYSTA M, BIAŁY Z. 2000. Hamujące działanie 3-glukozydu kwasu medikagonowego na wzrost *Scopulariopsis brevicaulis in vitro*. *Mikol. Lek.* 7, Supl. 1:112-113.