

NARAVNE PROTIMIKROBNE SNOVI IN MIKROORGANIZMI KOT SREDSTVA ZA VARSTVO RASTLIN

Jana ERJAVEC¹, Tanja DREO², Jože BRZIN³, Jerica SABOTI⁴, Maja RAVNIKAR⁵

¹Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

²Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana

V naravi najdemo številne vire protimikrobnih snovi, kot so na primer rastline, glive in bakterije, varstvo pa lahko nudijo tudi mikroorganizmi sami ter s svojo zastopanostjo preprečujejo razvoj bolezni in celo vzpodbujajo rast rastlin. Na trgu je registriranih že kar nekaj biotičnih sredstev za varstvo rastlin, ki nadomešajo ali dopolnjujejo konvencionalna sredstva in s tem varujejo rastline na naraven in okolju prijazen način. Razvoj naravnih sredstev za varstvo rastlin je še posebej pomemben v primeru, ko ne poznamo učinkovitega sredstva za zatiranje patogenih mikrobov ali škodljivcev ali pa so ti razvili odpornost na že obstoječe pesticide. V naši raziskavi proučujemo vpliv ekstraktov višjih (bazidiomicetnih) gliv prostotrosov oziroma gob na rastlinske patogene bakterije, med drugim na bakterijo *Ralstonia solanacearum*, ki povzroča rjavo gnilobo krompirja in bolezen na številnih drugih gospodarsko pomembnih rastlinah.

Ključne besede: *Ralstonia solanacearum*, bakterijsko venenje, glive, gobe, protein, inhibicija

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL SUBSTANCES FROM NATURAL SOURCES AND MICROORGANISMS CAN BE USED FOR PLANT PROTECTION AGAINST PATHOGENS

Natural sources of antimicrobial substances, such as plants, fungi and bacteria, can prevent disease development and even promote plant growth. There are several biopesticides already registered on the market and even more are pending. They can replace or complement existing pesticides and protect plants without any major effect on the environment. Development of biopesticides is especially important in cases where there are no pesticides available for the control of the pest or pests developed resistance to the existing control agents. In our research we are testing mushroom extracts against plant pathogenic bacteria, including *Ralstonia solanacearum*, the causative agent of a quarantine brown rot disease of potatoes and other plants, and several other plant pathogenic bacteria.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt, fungi, protein, inhibition

1 UVOD

Rastlinske bolezni so še vedno med najbolj omejujejo imi dejavniki kmetijske pridelave. Poleg uporabe sintetičnih pesticidov se vse več aktivnosti usmerja v iskanje naravnih učinkovincev za

¹ univ. dipl. mikr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana; e-mail: jana.erjavec@nib.si

² dr., prav tam

³ dr., prav tam

⁴ dr., prav tam

⁵ prof. dr., prav tam

varstvo rastlin. Do sedaj so že izolirali številne snovi s protimikrobnim delovanjem iz različnih naravnih virov kot so živali, rastline, bakterije in nižje glive. Prav obstajajo podatki o višjih glivah iz debla Basidiomycota - gobah kot možnem viru novih in uporabnih spojin, je dejanskih raziskav takih spojin izjemno malo. Gobe so kot vir protimikrobnih snovi zanimive tudi z vidika biotehnoške proizvodnje, saj bi take snovi lahko pridobivali iz gojenih gob ali iz micelija gojenega v fermentorju (Erjavec *et al.*, 2012).

Ena najpomembnejših evropskih karantenskih bakterij, ki okužuje krompir in druge kmetijsko pomembne razhudnikovke, je po Gramu negativna bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* Povzroča rjavo gnilobo krompirja in venenje razhudnikovk. Ker odporne sorte proti *R. solanacearum* do sedaj niso znane, lahko bakterija ob neinkovitih konvencionalnih pristopih nadzora bolezni povzroči tudi do 100 % izgubo pridelka. *R. solanacearum* ima zelo širok krog gostiteljev, ki obsega prek 200 vrst rastlin, vključno s pomembnimi poljščinami kot so krompir, banane, tobak, ingver, paradižnik in jajčevci. Dolgo časa lahko preživi v vlažnih tleh ter vodi, zato so namakalne vode pogosto vzrok širjenja okužbe (Janse *et al.*, 2004). Ker ne poznamo uinkovitega protibakterijskega sredstva za zatiranje *R. solanacearum* in številnih drugih škodljivcev, je iskanje novih protimikrobnih snovi iz naravnih virov zelo pomembno.

V prispevku bomo predstavili nekatere naravne in sintetične protimikrobne snovi kot potencialne uinkovine za zatiranje rjave gnilobe krompirja in drugih rastlinskih bolezni, metode iskanja protibakterijskih snovi ter metode identifikacije biotičnih in aktivnih beljakovin. Med njimi bomo poudarili pomen gob iz debla *Basidiomycota*, kot potencialnemu neraziskanemu viru novih protibakterijskih snovi.

133

2 MATERIALI IN METODE

Osnovna metoda za testiranje uinkovitosti protimikrobnih snovi je metoda minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). MIC predstavlja najmanjšo koncentracijo protimikrobne snovi (mg/L), ki v nadzorovanih razmerah in v določenem časovnem intervalu prepreči vidno rast mikroorganizmov (EUCAST - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2003). V mikrotitrsko ploščico tako nanese suspenzijo bakterij katere koncentracijo poznamo ter različne koncentracije ustreznega protimikrobnega sredstva. Druga metoda testiranja protibakterijske aktivnosti na gojiščih je test cone inhibicije, pri katerem na gojišče gostoto nacepimo bakterijsko kulturo in na površino postavimo sterilne diske iz filter papirja. Na diske nato nanese znano koncentracijo inhibitorne substance in po izbranem časovnem intervalu inkubacije izmerimo premer cone inhibicije in meritev primerjamo s standardom (npr. znane koncentracije antibiotika). Podobno kot se medicinske zdravilne uinkovine po potrditvi delovanja *in vitro* v kasnejših fazah testirajo tudi na celih njih kulturah in potem še na ljudeh, je prav tako pomembno, da testiramo protimikrobne snovi proti rastlinskim patogenim bakterijam v rastlinah, na rastlinskih celih njih kulturah in kasneje še na humanih celih njih kulturah, sploh če je substanca zanimiva za transformacijo rastlin. Tudi pri raziskavah na rastlinah so namreč pogosto opazili, da *in vitro* inhibitorna aktivnost ne pomeni, da bo substanca enako uinkovita tudi *in vivo* (Badosa *et al.*, 2007).

Za identifikacijo novih snovi je zelo pomembna metoda masne spektrometrije (MS). Pri tej metodi se meritve izvajajo z ioniziranimi molekulami v plinski fazi. Obstaja več načinov identifikacije beljakovin z MS. Beljakovino nato z orodji bioinformatike identificiramo na podlagi mas peptidov in sicer s pomočjo eksperimentalno pridobljenih podatkovnih baz beljakovin ali pa teoretično iz zaporedja genoma. Poleg MS poteka identifikacija in karakterizacija beljakovin tudi s številnimi elektroforezami in kromatografskimi metodami.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Glede na vse ve je zahteve po razvoju okoljsko trajnostnih sistemov pri nadzoru povzro iteljev rastlinskih boleznih, ki bi bili nadomestili ali dopolnjevali kemi na sredstva za varstvo rastlin, postaja iskanje naravnih u inkovin s protimikrobnim delovanjem vedno bolj aktualno. Vir protimikrobnih snovi so kar mikroorganizmi sami. Presejalne analize mikrobnih izolatov so v zadnjih 50 letih vodile do številnih tržno dosegljivih bioti nih molekul. Poleg tega raziskave v mikrobnih ekologiji kažejo, da je mikrobnost raznolikost v naravi mnogo ve ja od tiste zbrane v laboratorijskih zbirkah sevov mikroorganizmov.

3.1 Rastlinske protimikrobne snovi

Poleg mikroorganizmov so potencialen vir naravnih protimikrobnih snovi tudi rastline. Ve ina je sekundarnih metabolitov, nekateri dajejo rastlinam zna ilen vonj ali okus, hkrati pa služijo tudi kot del obrambnega sistema proti fitopatogenim mikroorganizmom in rastlinskim škodljivcem. Rastlinske protimikrobne snovi lahko razdelimo v nekaj ve jih skupin, in sicer fenolne spojine ter njihove derivate, terpenoide in eteri na olja, alkaloidi, beljakovine in polipeptide, poliacetlene in mešanice, kot so na primer mle ki (Murphy Cowan 1999). Alicin, ki se sintetizira ob poškodbi tkiva esna, je že dalj asa znan po širokem spektru delovanja na razli ne encime rastlinskih povzro iteljev boleznih. Inhibira lahko številne encime, kot so holin esteraza, glioksilaza, alkohol dehidrogenaza in druge (Curtis *et al.*, 2004).

Pradhanang in sodelavci (Pradhanang *et al.*, 2010) so preverjali u inek eteri nih olj na fitopatogeno bakterijo *R. solanacearum*. Za najbolj u inkovitega se je v testu patogenosti izkazal timol iz eteri nega olja timijana, saj po aplikaciji timola v kontaminirana tla iz rastlin paradižnika niso izolirali bakterij *R. solanacearum*, kljub temu, da je bil za etni inokulum bakterij v tleh skoraj 10^9 CFU/mL. Zaradi inhibitorne aktivnosti timola so preverjali tudi njegovo u inkovitost v poljskih poskusih (biofumigacija), v katerih je bil odstotek uvelih rastlin precej nižji v primerjavi s pozitivno kontrolo (Ji *et al.*, 2005). Biofumigacija tal je eden od možnih na inov prepre itev okužbe z *R. solanacearum*, saj bi jo na ta na in uni ili že v tleh, preden bi pridelek posadili.

Pomembne rastlinske inhibitorne substance so tudi lektini, to so beljakovine, ki povratno vežejo specifi en monosaharid oziroma oligosaharid. Ker so slednji navadno zastopani v membranah razli nih mikrobnih celic, se lektini na njih vežejo in povzro ijo aglutinacijo celic. Posebno pri gibljivih bakterijah je aglutinacija pomemben obrambni mehanizem, saj se s tem njihova gibljivost mo no zmanjša, posledici no pa tudi patogenost (Peumans and Van Damme 1995). Poleg lektinov med beljakovinske inhibitorne substance spadajo tudi inhibitorji proteaz. Njihove tar e predstavljajo proteoliti ni virulen ni faktorji rastlinskih patogenih bakterij, gliv, parazitov in virusov, ter tako prepre ijo delovanje mikrobnih proteaz pri pridobivanju hranil in izogibanju rastlinskemu obrambnemu sistemu. Poleg tega rastlinski proteazni inhibitorji delujejo tudi na prebavne encime drugih škodljivcev (npr. žuželk, pršic, polžev) in tako negativno vplivajo na njihovo rast in razvoj (Sabotic and Kos 2012). V številnih raziskavah so uporabili rastlinske gene, ki nosijo zapis za proteazne inhibitorje za transformacijo v nove rastline. Dobili so transgene rastline, ki so izražale proteazni inhibitor z instekticidnim u inkom (Ussuf *et al.*, 2001). Podobno so transgene rastline, ki so izražale razli ne proteazne inhibitorje pokazale negativne u inke na rast pršic, polžev, ogoric, ter fitopatogenih gliv, bakterij in virusov (Sabotic & Kos 2012).

3.2 Sinteti ne protimikrobne snovi

Podobne raziskave, ki so vključevale transformacijo rastlin so potekale tudi na podlagi sinteti nih protimikrobnih molekul in proteinaznih inhibitorjev višjih organizmov. Še posebno zanimiv je cecropin B, pridobljen iz sviloprejk, saj inhibira tako po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije. Njegova protibakterijska aktivnost je bila že znana v *in vitro* testih (Nishikawa and Ogawa, 2004), Oard in Enright (Oard and Enright, 2006) pa sta jo potrdila tudi s transformacijo rastlin *Arabidopsis*. V zadnjih letih je bilo nekaj pozornosti namenjene tudi kratkim peptidom, ki naj bi imeli protibakterijske učinke. Badosa in sod. (2007) so oblikovali knjižnico kratkih peptidov podobnih tistim, ki so kazali *in vitro* inhibitorno aktivnosti proti bakteriji *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, hkrati pa so imeli nizko hemolitično aktivnost. Med raziskavo so ugotovili, da ni vedno korelacije med *in vitro* in *in vivo* inhibitornim učinkom, zato so za testiranje *in vivo* pripravili širši nabor peptidov. Pri nekaterih so opazili zaviranje napredovanja bolezenskih znamenj.

3.3 Protimikrobne snovi iz višjih gliv

V smislu iskanja protimikrobnih učinkovin so še posebej slabo zastopane višje glive iz debla Basidiomycota – gobe. Med predvidenimi 140 000 vrstami gob na Zemlji jih poznamo največ 20 000 (Erjavec *et al.*, 2012). Tudi če bi bil delež uporabnih aktivnih snovi v teh vrstah zelo majhen, še vedno predstavlja velikansko zalogo potencialnih protimikrobnih snovi. Dosedanje raziskave kažejo, da imajo učinkovine iz gob protibakterijske, protivirusne, imunosupresivne, protitumorske, protivnetne in druge lastnosti (Lindequist *et al.*, 2005; Rana *et al.*, 2011). Večina učinkovin iz gob lahko pridobimo iz plodišč (80%) ali pa iz micelija z gojenjem v fermentorjih (20%) (Lindequist *et al.*, 2005). Protimikrobne snovi iz gob običajno razdelimo na manjše sekundarne metabolite in visoko molekularne polisaharide iz glivne celične stene (Zjawiony 2004). Z uporabnega stališča so še posebej zanimive tiste učinkovine, ki hkrati delujejo proti bakterijam odpornim proti več antibiotikom in tiste, ki delujejo proti več vrstam bakterij. Tak primer je goba *Osmoporus odoratus* in goba *Ganoderma* spp., saj vsebujejo ganomicin A in B, ki inhibitorno delujeta proti bakterijam *Staphylococcus aureus*, odpornim proti meticilinu, bakterijam *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* in različnim bakterijam, ki povzročajo kožna obolenja (Albino Smania *et al.*, 2007). Oksalinska kislina, ki jo sintetizira *Lentinula edodes* (šitake) ima protimikroben učinek proti bakterijam *S. aureus* in nekaterim drugim bakterijam (Hiroko Hasegawa *et al.*, 2005), protimikrobni učinek gobe *Podaxis pistillaris* pa se izkorišča ajo v nekaterih deželah proti kožnim izpuščajem in opeklinam (Al-Fatimi *et al.*, 2006). Druge protibakterijske snovi so na primer še merulinski kislini A, B, C iz gobe *Merulius tremellosus* in *Phlebia radiata*, koriolin, desoksihipnofilin, hipnofilin, strobilurini, itn. (Zjawiony, 2004).

Naše preliminarne raziskave nakazujejo, da so snovi iz gob s protibakterijskim delovanjem beljakovine. Primer take protimikrobne snovi je lektin CNL z nematičnim učinkom, ki ga sintetizira gliva *Clitocybe nebularis* (Pohleven *et al.*, 2012). Protimikrobne učinkovine inke lektinov višjih gliv so povzeli (Bleuler-Martinez *et al.*, 2011). Večina teh snovi je testiranih le proti loveškim patogenim bakterijam in glivam, vsekakor pa bili zanimivi rezultati testiranja proti rastlinskim patogenim bakterijam, med drugim tudi bakteriji *R. solanacearum*. V primeru rastlinskih patogenih bakterij bi bile, podobno kot pri ljudeh, še posebej zanimive snovi, ki bi izboljšale

naravne obrambne mehanizme, ki bi direktno vplivale na bakterijske virulene faktorje ali kako drugače prepreči razvoj bolezenskih znamenj in izgubo pridelka.

4 SKLEPI

V smislu iskanja okolju prijaznejših alternativnih načinov upravljanja z rastlinskimi patogenimi bakterijami, so že dobro proučeni razliki med viri protimikrobnih snovi, kot so živali, rastline, bakterije in nižje glive, medtem ko so bile gobe – glive iz debla Basidiomycota le malokrat predmet tovrstnih raziskav. V preglednem članku Erjavec *et al.* (2012), je zbran celovit pregled znanih proteinov iz višjih gliv oziroma gob, saj številni proteini, vključno z lektini, lignoceluliti in encimi, inhibitorji proteaz in hidrofobini, kažejo edinstvene lastnosti. Mnogi na proizvodnja in industrijska uporaba nekaterih glivnih beljakovin kaže na njihovo uporabnost v številnih biotehnoških procesih. V članku so med drugim opisani procesi pridobivanja novih biotično aktivnih beljakovin in pregled trenutne in predvidene uporabe teh proteinov v biotehnologiji, medicini in kmetijstvu. Beljakovine iz gob tako lahko predstavljajo rešitve za nekatere težave, kot so mikrobna odpornost na zdravila, zaščitna poljščina in pred škodljivci in zahteve po obnovljivih virih energije.

5 LITERATURA

- Al-Fatimi, M. A. A., Jürlich, W.-D., Jansen, R., & Lindequist, U. Bioactive components of the traditionally used mushroom *Podaxis pistillaris*. *eCAM* 3[1], 87-92. 2006.
- Albino Smania, E. d. F., Delle Monache, F., Yunes, R. A., Paulert, R., & Smania Junior, A. Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17[1], 14-16. 2007.
- Badosa, E., Ferre, R., Planas, M., Feliu, L., Besalu, E., Cabrefiga, J., Bardaji, E., & Montesinos, E. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* 28, 2276-2285. 2007.
- Bleuler-Martinez, S., Butschi, A., Garbani, M., Walti, M.A., Wohlschlager, T., Potthoff, E., Sabotic, J., Pohleven, J., Luthy, P., Hengartner, M.O., Aebi, M., & Kunzler, M. 2011. A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites., 2011/04/14, (14) 3056-3070
- Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., & Slusarenko, A. J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65, 79-89. 2004.
- Erjavec, J., Kos, J., Ravnihar, M., Dreo, T., & Sabotic, J. Proteins of higher fungi - from forest to application. *Trends in Biotechnology* 30[5], 259-273. 2012.
- EUCAST - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *ESCMID* 9, 1-7. 2003.
- Hiroko Hasegawa, R., Megumi Kasuya, M. C., & Dantas Vanetti, M. C. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology* 8[2], 211-217. 2005. 14-5-2010.
- Janse, J. D., van den Beld, H. E., Elphinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N. N. A., & van Vaerenbergh, J. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology* 86[2], 1147-1155. 2004.
- Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M., & Pradhanang, P. M. Evaluation of Thymol as Biofumigant for Control of Bacterial Wilt of Tomato Under Field Conditions. *Plant Disease* [89], 497-500. 2005.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., & Julich, W.D. 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, (3) 285-299
- Murphy Cowan, M. Plant Products as Antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12[4], 564-582. 1999

- Nishikawa, M. & Ogawa, K. Antimicrobial Activity of a Chelatable Poly(Arginyl-Histidine) Produced by the Ergot Fungus *Verticillium kibiense*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48[1], 229-235. 2004.
- Oard, S.V. & Enright, F.M. 2006. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep*, 25, 561-572
- Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347-352. 1995.
- Pohleven, J., Renko, M., Magister, Š., Smith, D.F., Kuzler, M., Štrukelj, B., Turk, D., Kos, J., & Sabotič, J. 2012. Bivalent Carbohydrate Binding Is Required for Biological Activity of *Clitocybe nebularis* Lectin (CNL), the N,NGÇ-Diacetyllactosediamine (GalNAc+1GÇô4GlcNAc, LacdiNAc)-specific Lectin from Basidiomycete *C. nebularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287, (13) 10602-10612
- Pradhanang, P. M., Momol, M. T., Olson, S. M., & Jones, J. B. Effects of Plant Essential Oils on *Ralstonia solanacearum* Population Density and Bacterial Wilt Incidence in Tomato. *Plant Disease* [87], 423-427. 2010.
- Rana, T., Bera, A.K., Das, S., Bhattacharya, D., Pan, D., Bandyopadhyay, S., De, S., & Das, S.K. 2011. Mushroom lectin protects arsenic induced apoptosis in hepatocytes of rodents., 2010/05/29, (4) 307-317
- Sabotič, J. & Kos, J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors - current and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, (4) 1351-1375
- Ussuf, K. K., Laxmi, N. H., & Mitra, R. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science* 80[7], 847-853. 2001.
- Zjawiony, J. K. Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *J.Nat.Prod.* 67, 300-310. 2004.