

Grażyna MAĆIK-NIEWIADOMY, Andrzej NIEWIADOMY

**Właściwości inhibicyjne nowych związków grzybobójczych szeregu $-C(=S)NHNH-$ i O-
podstawionych pochodnych kwasu 2,4,6-trihydroksybenzenokarboditiowego
(TBCA) w zależności od ich struktury**

Inhibitive Properties of New Fungicidal Compounds of the $-C(=S)NHNH-$ Series and O-Substituted Derivatives of 2,4,6-Trihydroxybenzenecarbothioic Acid (TBCA) Depending of Their Structure

Kontynuowano prace badawcze obejmujące syntezę biologicznie czynnych związków grzybobójczych z toksoforowym ugrupowaniem karboditiowym (8).

W celu określenia wpływu indukcyjnych oddziaływań ugrupowań aromatycznych na czynność inhibicyjną zdysaktywowanego rozszczepieniem hydrazynolitycznym toksoforu $-C/S-$ (9) otrzymano N – podstawione fenylo- i (2,4-dinitrofenylo) hydrazy kwasu TBCA.

Pomimo że mechanizm fungitoksycznego działania ugrupowań mono- i dinitroaromatycznych nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony (13), ten rodzaj podstawienia zaproponowano w oparciu o spostrzeżenia (14), które wskazują, że mogą one pełnić funkcje konkurencyjnych inhibitorów inozytu i niektórych substancji wzrostowych. Przy czym pestycydy zawierające grupy nitrowe są skutecznymi środkami hamującymi kiełkowanie zarodników a także rozwój grzybni zwłaszcza grzybów glebowych, takich jak *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Trichoderma* i *Fusarium*.

Dokonano także próby selektywnego alkilowania grup $-OH$ kwasu TBCA w celu ograniczenia komórkowych oddziaływań niespecyficznego metylotransferazy (8) oraz ich acylowania zwiększające, jak stwierdzono (13, 14)), toksyczność większości podstawionych układów fenoli wobec grzybów.

Zakładano, że polarne ugrupowania metoksyłowe acetyłowe powinny ułatwiać właściwą orientację molekuł na granicznej powierzchni fazy tłuszczowej i wodnej, a hydrolityczny rozpad działaniem esteraz zapewniać inaktywacyjny udział grup $-OH$ w stosunku do enzymów amylolitycznych i oksydaz (3, 6, 13).

METODYKA BADAŃ

We wstępnych testach dokonano oceny laboratoryjnej (1, 5), polegającej na ustaleniu hamującego wpływu otrzymanych związków na wzrost grzybni patogenicznych grzybów wskaźnikowych wyszczepianych na sztucznym podłożu.

Roztwory (zawiesiny) poszczególnych związków (stężenia 0,1; 0,25; 0,5; i 0,75 mM) w 5 % acetonie wprowadzano do standardowej pożywki maltozowej (V/V 1:3), w skład której wchodziło 10 g ekstraktu Malto firmy Difco i 20 g agaru w rozcieńczeniu do 1000 cm³ wodą.

W temp. 40°C uzyskane mieszaniny rozlewano do szalek Petriego (n = 5) o średnicy 9 cm, a podłoże po zastygnięciu inokulowano w środku szalki krążkami agaru o średnicy 2 mm przerośniętego grzybnia odpowiedniego grzyba. Inokula pochodziły z dwutygodniowych kultur grzybów, które wyrastały na pożywce maltozowej w temp. 23°C. Obiekt kontrolny stanowiły grzyby wyrastające na szalkach z pożywką bez badanych związków.

Zaszczepione szalki inkubowano w temp. 23°C, po czym po czterech i siedmiu dniach (większość kolonii w kombinacjach kontrolnych osiągała w tym czasie brzeg szalki) dokonywano pomiaru strefy zahamowania rozwoju monokultur (przyrostu liniowego grzybni). Z uzyskanych wyników obliczano procent zahamowania rozwoju kolonii (5).

W celu określenia rodzaju oddziaływań związków w stosunku do poszczególnych gatunków grzybów odszczepiano z każdej kombinacji jednakowej wielkości fragmenty kolonii i przenoszono na zestaloną na szalkach pożywkę maltozową. Szalki przechowywano w temp. 23°C a po sześciu i dziesięciu dniach określano sposób oddziaływania związków (tab. 2).

W badaniach wykorzystano polifagi reprezentujące różne grupy systematyczne pochodzące z różnych środowisk bytowania powszechnie występujące porażające wiele roślin jedno- i dwuliściennych jedno- i wieloletnich. Kulture grzybów pochodziły z kolekcji grzybów Katedry Fitopatologii AR w Lublinie i były wyodrębnione w czasie badań mykologicznych z chorych roślin.

W testach uwzględniono okolicznościowe grzyby pasożytnicze rozwijające się dobrze na sztucznych pożywkach *Fusarium culmorum* W. G. Sm. Sacc., *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *phaseoli* Kand. Snyd., *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. et Magn., *Rhizoctonia solani* Khn i *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary.

Wyniki badań wykorzystano do oceny zależności między budową związków a ich aktywnością biologiczną, mając na uwadze równomolowe udziały odpowiednich ugrupowań tokoferolowych -C/S/S- i -C/S/- w każdej kombinacji testu. W celu porównania aktywności bezwzględnej związków i ustalenia wartości dawek toksycznych ED₅₀ i ED₁₀₀ /dawek mg/dm³ hamujących rozwój grzybni w odpowiednim procencie sporządzono krzywe zależności $P = f(\log c_m)$.

WYNIKI BADAŃ, DYKUSJA

Wyniki uzyskane w testach biologicznych potwierdziły koncepcje syntezy związków. Podstawienie O - alkil (- acyl -) układu sym - trihydroksybenzenu w TBCA wywiera przewidywany wpływ na własności poszczególnych związków oraz ich aktywność biologiczną (tab. 1, 2, 3). W związkach 1, 2 zmianie ulega charakter wewnętrznych oddziaływań wodorowych typu H - O - - HS -, co w znacznym stopniu zwiększa możliwość tworzenia wiązań międzycząsteczkowych z udziałem grup -C/S/SH.

Zwiększona asocjacja i związany z tym zróżnicowany rozkład ładunku prawdopodobnie ułatwia dyfuzyjną migrację badanych związków przez błony lipoproteidowe oraz zmienia ich aktywność związaną z funkcją ugrupowania -C/S/S- jako niespecyficznego inhibitora enzymów przemian energetycznych (2, 10, 12, 13).

Obniżenie aktywności związku 1 (tab. 1, 2) w stosunku do TBCA (8) pozwala wnioskować, że podstawniki metoksyłowe -OCH₃ posiadające wolne pary elektronowe na atomie bezpośrednio związanym z rodnikiem aromatycznym słabiej przyciągają elektrony pierścienia i efekt indukcyjny ograniczany jest efektem sprzężenia, co w pewien sposób dezaktywuje układ tokoferolu -C/S/SH. Z kolei silnie elektronoakceptorowe podstawniki

Tab. 1. Działanie badanych związków na testowane grzyby (n = 5)
Effect of the studied compounds on the tested fungi (n = 5)

Numer związku	Rodzaj związku	Procent zahamowania (P)									
		Po czterech dniach hodowli					Po siedmiu dniach hodowli				
		stężenie 0,25 mM									
1	/CH ₃ O/3C ₆ H ₂ C/S/SH.H ₂ O	68,3	70,2	60,6	64,3	80,7	62,8	76,8	54,9	55,6	72,1
2	/CH ₃ COO/3CH ₂ C/S/SH.H ₂ O	71,2	66,4	78,8	84,3	79,4	76,3	69,2	60,3	62,8	65,7
3	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₅	62,4	46,2	50,2	57,1	40,6	54,1	45,7	57,3	49,7	58,1
4	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₃ /NO ₂ /2	59,3	52,8	58,1	54,4	62,6	53,8	62,8	57,4	48,2	70,5
grzyby		F.c.	F.ox.	R.s.	S.s	C.I.	F.c.	F.ox.	R.s.	S.s	C.I.
		stężenie 0,50 mM									
1	/CH ₃ O/3C ₆ H ₂ C/S/SH.H ₂ O	80,3	94,8	88,4	76,6	100,0	84,6	95,8	89,2	80,7	100,0
2	/CH ₃ COO/3CH ₂ C/S/SH.H ₂ O	88,4	97,5	90,6	98,2	100,0	95,4	100,0	95,7	99,6	100,0
3	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₅	86,4	64,8	80,2	69,4	92,1	84,3	76,2	82,2	94,5	97,0
4	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₃ /NO ₂ /2	78,9	82,3	89,5	91,3	89,6	69,9	88,3	98,4	96,6	100,0
grzyby		F.c.	F.ox.	R.s.	S.s	C.I.	F.c.	F.ox.	R.s.	S.s	C.I.

* Objasnienia: F.c. – *Fusarium culmorum*, F.ox. – *Fusarium oxysporum*, R. s. *Rhizoctonia solani*, S.s. – *Sclerotinia sclerotiorum*, C.l. – *Colletotrichum lindemuthianum*

Tab. 2. Sposób oddziaływania badanych związków w stężeniu 0,5 mM w stosunku do kolonii grzybów wskaźnikowych
Mode of effect of the studied compounds in molar concentration 0.5 mM upon colonies of index fungi

Numer związku	Rodzaj związku	Średnia kolonii po 10 dniach /mm/					Oddziaływanie związku				
1	/CH ₃ O/3C ₆ H ₂ C/S/SH.H ₂ O	25	0	13	17	0	–	+	–	–	+
2	/CH ₃ COO/3CH ₂ C/S/SH.H ₂ O	15	0	0	18	0	–	+	+	–	+
3	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₅	20	35	75	30	8	–	–	–	–	–
4	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₃ /NO ₂ /2	30	15	65	13	0	–	–	–	–	+
grzyby		F.c.	F.ox.	R.s.	S.s.	C.l.	F.c.	F.ox.	S.s.	R.s.	C.l.
kombinacja kontrolna /mm/		90	65	90	90	28					

Objasnienia: + oddziaływanie grzybobójcze, – oddziaływanie grzybstatyczne

Tab. 3. Przybliżone wartości dawek toksycznych ED_x (mg/dm^3) dla testowanych grzybów wyznaczone metodą graficzną z krzywych $P = f(\log C_m)$
 Approximate values of toxic doses ED_x (mg/dm^3) for the tested fungi determined using a graphic curve - based $P = f(\log C_m)$ method

Numer związku	Rodzaj związku	Kolonja grzybów														
		<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Fusarium culmorum</i>			<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>			<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			<i>Rhizoctoria solani</i>		
		ED ₀	ED ₅₀	ED ₁₀₀	ED ₀	ED ₅₀	ED ₁₀₀	ED ₀	ED ₅₀	ED ₁₀₀	ED ₀	ED ₅₀	ED ₁₀₀	ED ₀	ED ₅₀	ED ₁₀₀
1	/CH ₃ O/3C ₆ H ₂ C/S/SH.H ₂ O	15	80	160	20	110	160	15	70	105	15	60	120	20	60	120
2	/CH ₃ COO/3CH ₂ C/S/SH.H ₂ O	10	95	130	10	105	140	20	80	110	20	75	115	15	80	110
3	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₅	35	170	200	25	130	185	25	105	150	30	105	165	30	120	190
4	/HO/3C ₆ H ₂ C/S/NHNHC ₆ H ₃ /NO ₂ /2	40	100	185	30	120	170	20	85	105	20	80	125	35	85	130

Objaśnienia: P – procent zahamowania, C_m – stężenie molowe związku

acetylowe $-O(O)CCH_3$ ograniczające zasadowość czteropodstawionego rodnika $-C_6H_2$ wzmacniają fungi toksyczność związku 2, który w stężeniu 0,5 mM wykazuje oddziaływanie grzybobójcze w stosunku do grzybnia *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *Colletotrichum lindemuthianum* (tab. 2).

Porównanie własności biologicznych związków 1 i 2 oraz TBCA wskazywać może na stosunkowo ograniczone funkcje wolnych grup $-OH$ w mechanizmie oddziaływań fungitoksycznych dla tego szeregu pochodnych.

Specyficzna struktura pochodnych TBCA z układem dwu centrów toksoforowych pozwalała zakładać udział grup $-OH$ w procesach rozpręgnięcia fosforylacji oksydacyjnej oraz inaktywacji procesu przyłączania nieorganicznego fosforanu do ADP (4, 7, 13) względnie ich oddziaływanie z grupami $-SH$ enzymów amylolitycznych i karboksylazy.

Oddziaływanie silnie odciągających elektronów rodników C_6H_5- , $-C_6H_4(NO_2)_2$ meta - na zasadowy układ $-NHNH-$ i pośrednio na zdegradowane do układu $-C/S/-$ ugrupowanie toksoforu zwiększa aktywność biologiczną związków 3 i 4 (tab. 1, 2, 3) w stosunku do niepodstawionego hydrazynu (9).

Grupy $-NO_2$ zmieniają w związku 4 rozkład ładunku w di- podstawionym pierścieniu aromatycznym, a także polarność wiązań w całym łańcuchu sprzężenia. Te efekty wpływają na aktywność inhibicyjną związku, który wykazywał własności grzybobójcze wobec *Colletotrichum lindemuthianum* (tab. 2).

PIŚMIENNICTWO

1. Bakuniak E., Bakuniak J.: Dobór metod biologicznych do badań nowych związków o potencjalnym działaniu pestycydowym. *Pestycydy* 4; 1978.
2. Borecki Z., Czerwińska T., Eckstein Z., Kowalik B.: *Chemiczne środki grzybobójcze*. PWRiL, Warszawa 1965.
3. Borecki Z.: *Fungicydy stosowane w ochronie roślin*. PWN, Warszawa 1984.
4. Cunningham P. C.: Dunne B. *Systematic Fungicides Reduce Disease and Increase in Spring Cereals*. *Form. and Food Res.*, 7 (1); 4-15, 1976.
5. Kowalik B., Krechniak R.: Szczegółowa metodyka biologicznych laboratoryjnych badań środków chemicznych. w: "Mat. do met. biolog. oceny środków ochr. roślin", Inst. Ochr. Rośl., Poznań 1961.
6. Levin I. G.: Use of Chlorophenols as Fungicides in Phenole Sawmills. *Scand. J. Work. Environ Health.*, 2, 1976.
7. McCallan S.: Mechanisms of Toxicity with Special Reference to Fungicides. "Proc. Intern. Conf. Plant Protection" Butterworth's, London, 2, 1967.
8. Niewiadomy A.: Otrzymywanie i badania aktywności fungi- i fitocydalnej nowych biologicznie czynnych związków z grupy karbaminianów i pochodnych kwasu 2,4,6-trihydroksybenzenokarboditiowego (TBCT). *Rozprawa habilitacyjna*. Wyd. AR, Lublin 1989.
9. Niewiadomy A.: Zmiany aktywności inhibicyjnej ugrupowań $-C/S/S-$ i $-C/S/-$ nowych związków grzybobójczych wywołane rozszczepieniem hydrazynolitycznym. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. E*, vol. XLIV, 23, 1989.
10. Owens R. G.: Studies on the Nature of Fungicidal Action. Inhibition of $-Sulfhydryl-$, $-Amino-$, $-Iron-$, and $-Copper$ Dependent Enzymes in Vitro by Fungicides and Related Compounds. *Contrbs. Boyce Thompson. Inst.*, 17, 1963.
11. Rich S.: *Fungicidal Chemistry*. "In Plant Pathology" J. Horsfall, A. Dimond, eds. Academic Press. Nowy Jork 1960.
12. Syrowatka T.: *Badania wpływu fungicydów na komórkowe procesy energetyczne*. *Rozprawa habilitacyjna*, PZH, Warszawa 1970.

13. White - Stenens R.: Pestycydy w środowisku. PWRiL, Warszawa 1977.
14. Woodcock D.: Relation of Chemical Structure to Fungicidal Action. In Plant Pathology. Problems and Progress 1908-1968 C. Holton, G. Fisher, R. Fulton, H. Hart, S. MC. Callan, eds. Univ. Wisconsin Press, Madison 1969.

SUMMARY

The fungicidal activity was examined concerning new biologically active compounds of the series of O- and S-substituted derivatives of 2,4,6-trihydroxybenzencarbodithioic acid (TBCA).

On the basis of the test results using colonies of pathogenic fungi the relationship between the structural composition of compounds and their inhibitive properties was discussed.