

Andrzej NIEWIADOMY

**Zmiany aktywności inhibicyjnej ugrupowań -C/S/S- i -C/S/-
nowych związków grzybobójczych wywołane rozszczepieniem hydrazynolitycznym**

Changes in the Inhibitory Activity of -C/S/S- and -C/S/- Groups of New Fungicidal Compounds
Produced by Hydrazinolytic Splitting

Rozważając funkcje grupy tiolowej -SH toksoforu -C/S/SH/R/ w mechanizmie oddziaływań inhibicyjnych nowych biologicznie czynnych związków pochodnych kwasu 2,4,6-trihydroksybenzenokarboditiowego TBKD dokonano hydrazynolizy ugrupowania -C/S/S- w celu jego desulfurylacji.

Dotychczas stwierdzono bowiem, że pestycydy zawierające rodnikowo związane protonoakceptorowe ugrupowania -C/S/S- lub -C/S/- wykazują wielokierunkowe działanie, jednakże powszechnie podzielony jest pogląd, że należą one do grupy niespecyficznych inhibitorów enzymów czynnych w przemianach energetycznych (1, 3, 12, 13). Związki te blokują przede wszystkim przemiany, w których podstawową rolę odgrywa uwalnianie a zarazem gromadzenie energii przez wytworzenie ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej zależnej od łańcucha oddechowego (2, 7, 11). Zakłócenie procesów cyklu energetycznego w komórkach grzybów poprzez oddziaływanie grup -C/S/S- lub -C/S/- uwalnianych działaniem esterazy tiolowej prowadzi do zahamowania zarówno oddychania, jak i gromadzenia energii (4, 6, 9, 10).

W porównawczych badaniach funkcji toksoforu -C/S/S- i zdegradowanego rozszczepieniem ugrupowania -C/S/- wykorzystano kolonie grzybów wskaźnikowych.

Przeprowadzono również badania spektroskopowe w zakresie UV-ViS wskazujące na zmiany gęstości elektronowej w czynnych biologicznie ugrupowaniach -C/S/- porównywalnych związków.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Widma elektronowe związków zarejestrowano na spekordzie vV-ViS i VSU-2G roztwory w metanolu i etanolu. Materiał badań stanowiły związki reprezentujące poszczególne szeregi homologiczne (tab. 1) oraz hydrazyd TBKD, który otrzymywano z S-podstawionych alkilo estrów kwasu.

Tab. 1. Zmiany protonoakceptorowych własności grupy $-C/S-$ wynikające ze zmian energii przejść elektronowych w chromoforze karboditiowym związków
(w nawiasach podano molowe współczynniki [cm^{-2} , mol^{-1}])

Changes in the proton-acceptory properties of the $-C/S-$ group arising from the energy of electron transitions in the carbodithion chromophore of the compounds

Numer	Związek	Rodzaj przejścia elektronowego, położenie λ max (nm)	
		spinowo-wzbronione w chromoforze $-C/S-$	spinowo-dozwolone w układzie sprzężonego chromoforu $-C/S/S-$
I	$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3 \text{C}(\text{S})\text{SH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	315 (13400)	360 (16800)
II	$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3 \text{C}(\text{S})\text{SC}_2\text{H}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	340 (31200)	375 zinterferowane
III	$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3 \text{C}(\text{S})\text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$	315 (8500)	350 (10500)
IV	$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3 \text{C}(\text{S})\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	325 (11300)	375 (19400)
V	$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3 \text{C}(\text{S})\text{NHNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	315 (6200)	360 i 380 zinterferowane

Proces odszczepienia ugrupowania tioalkilowego $-SR$ ze związków przeprowadzono w absolutnym etanolu ogrzewając przez 2 h mieszaninę estru z 85% roztworem hydrazyny (M/M 1:1,5) na wrzącej łaźni wodnej. Po ochłodzeniu hydrazyd kwasu TBKD wyodrębniono z mieszaniny przez ekstrakcję eterem etylowym. Budowę związku potwierdzono po analizie widm oscylacyjnych IR (pastylka z KBr).

W doświadczeniach, których celem było ustalenie działania izomolowych stężeń związków w stosunku do grzybów testowych zastosowano metodę szalkową (13).

Roztwory podstawowe (0,25 i 0,5 mM) poszczególnych związków w 5% acetonie wprowadzano w stosunku 1:3 do pożywki maltozowej (10 g estratu Malto + 20 g agaru w rozcieńczeniu wodą do 1000 cm^3). W temp. 40°C uzyskane mieszaniny rozlewano do szalek Petriego (średnica 9 cm), a po zastygnięciu podłoża szczepiono krążkami agaru o średnicy 0,2 cm przerośniętego grzybnia. Inokula pochodziły z dwutygodniowych kultur badanych grzybów, które wyrastały na pożywce maltozowej w temp. 23°C . Dla każdego związku traktowanego jako obiekt i jednego rodzaju grzyba uwzględniano pięć powtórzeń uznając szalkę za powtórzenie. Zaszczepione szalki przechowywano przez siedem dni w temp. 23°C , przy czym po czterech-siedmiu dniach określano przyrost liniowy i z uzyskanych wyników obliczono % zahamowania (P) (8, 13). W celu określenia rodzaju oddziaływań fungicydalnych i fungistatycznych związków w stosunku do grzybów odszczepiano z każdej kombinacji, jednakowej wielkości fragmenty kolonii i przenoszono na zestaloną na szalkach pożywkę maltozową.

Po sześciu dniach utrzymywania szalek w temp. 23°C określano sposób oddziaływania, na podstawie badania wzrostu lub zaniku wyszczepianej grzybni (13).

Kultury grzybów patogenicznych pochodziły z kolekcji grzybów Katedry Fitopatologii AR w Lublinie.

Tab. 2. Działanie badanych związków na testowane grzyby
Action of the studied compounds on the tested fungi

Numer	Rodzaj związku	Stężenie (mM)	Procent zahamowania (P)									
			po czterech dniach hodowli					po siedmiu dniach hodowli				
I	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2H \cdot 2H_2O$	0,25/0,5	72,1 83,2	60,0 100	62,7 91,9	69,8 72,2	84,2 100	70,2 89,8	711,6 93,7	32,4 93,4	62,3 84,6	77,4 100
II	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2C_3H_{11} \cdot 2H_2O$	0,25/0,5	81,2 100	85,7 100	68,3 100	66,8 100	70,2 100	66,7 78,4	81,5 86,7	69,7 100	67,2 93,7	73,3 100
III	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2CH_2C_6H_4NO_2$	0,25/0,5	87,3 100	100 100	81,2 100	93,0 100	100 100	88,1 100	100 100	76,1 100	92,8 100	100 100
IV	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2CH_2CO_2C_2H_5 \cdot H_2O$	0,25/0,5	61,9 100	69,7 100	55,7 92,8	70,9 100	71,2 100	56,6 100	61,2 91,9	48,3 93,7	60,3 100	77,6 100
V	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2NHNH_2 \cdot H_2O$	0,25/0,5	50,0 76,6	23,2 68,3	41,5 79,7	58,6 92,2	39,8 84,3	50,0 76,5	29,8 70,9	30,2 70,0	42,6 93,3	62,3 83,6
	Rodzaj grzybów		F.c.	F.ox.	R.s.	S.s.	C.l.	F.c.	F.ox.	R.s.	S.s.	C.l.

F.c. — *Fusarium culmorum*

F.ox. — *Fusarium oxysporum*

R.s. — *Rhizoctonia solani*

S.s. — *Sclerotinia sclerotiorum*

C.l. — *Colletotrichum lindemuthianum*

Tab. 3. Sposób oddziaływania badanych związków w stosunku do kolonii grzybów testowych
 Mode of action of the studied compounds towards colonies of test fungi

Numer związku	Rodzaj związku	Grzyb testowy — dawki związków (mM), rodzaj oddziaływania									
		Fusarium culmorum		Fusarium oxysporum		Sclerotinia sclerotiorum		Colletotrichum lindemuthianum		Rhizoctonia solani	
		0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5
I	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2H \cdot 2H_2O$	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—
II	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2C_5H_{11} \cdot 2H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+
III	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2CH_2C_6H_4NO_2$	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+
IV	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CS_2CH_2CO_2C_2H_5 \cdot H_2O$	—	+	—	—	—	+	—	+	—	+
V	$C_6H_2(OH)_3 \cdot CSNHNH_2 \cdot H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ oddziaływanie fungicydalne

— oddziaływanie fungistatyczne

WYNIKI BADAŃ

Porównanie uzyskanych wyników pozwala przyjąć, że odszczepienie atomu siarki od toksoforu -C/S/S- obniża aktywność inhibicyjną ugrupowania -C/S- niezależnie od układu odniesienia (tab. 2 i 3).

Odnosi się to praktycznie do wszystkich kolonii w zakresie stężeń związków 0,25-0,50 mM, w tym również do stosunkowo łatwo zwalczanych przez związki I-IV *Colletotrichum lindemuthianum*. Dla tych kolonii przy udziale związku V w stężeniu 0,5 mM procent zahamowania wzrostu po czterech i siedmiu dniach wynosił odpowiednio 83,6 i 84,3 gdy w pozostałych przypadkach uzyskiwano całkowite zahamowanie rozwoju (tab. 2).

Na podstawie przyjętego dla związków typu RC/S/S- mechanizmu oddziaływań fungicydalnych należy uznać, że reakcja eliminacji atomu siarki ze związku prowadząca do form RC/S/- może ograniczać charakter konkurencyjnych oddziaływań związku V względem enzymów komórkowych. Wiąże się to ze zmniejszoną zdolnością związku V (tab. 1 i 2) do tworzenia mostków wiązań wodorowych i złożonego układu wielosiarczków z prostetycznymi grupami —SH enzymów oraz ograniczeniem własności chelatowych karbotionu (5, 13, 14).

WNIOSEK

Wywołane desulfurylacją ugrupowania -C/S/S- kwasu TBKD obniżenie aktywności fungistatycznej rodnika m -(HO)₃C₆H₂C(S)- wskazuje na istotne w tym przypadku funkcje (odtworzanymi działaniem esterazy tiolowej) grup -SH w mechanizmie oddziaływań inhibicyjnych traktowane dyskusyjnie dla układu toksoforowego R/R₁/N/H/CS₂- fungicydów ditiokarbaminianowych.

Praca wpłynęła 8 III 1989

PIŚMIENNICTWO

1. Borecki Z., Czerwińska T., Eckstein Z., Kowalik B.: Chemiczne środki grzybobójcze. PWRiL, Warszawa 1965.
2. Cunningham P. C., Dunne B.: Systemic fungicides reduce discase and increase yield in spring cereals. *Farm. and Food Res.*, 7, 1, 4, 1976.
3. Davies N. H., Sexton W. A.: Chemical constitution and fungistatic action of organic sulfur compounds. *Biochem. J.*, 40, 331, 1956.
4. Goksyr J.: The mechanism of action of dithiocarbamyl compounds on the acetate pathway in yeast. *Universitet Bergen Arbok, Naturtens Kapelig rekke* 3, 1968.
5. Van Der Kerk G. J. M., Klöpping H. L.: Investigations on organic fungicides. Further considerations regarding the relations between chemical structure and antifungal action of dithiocarbamate and bis — dithiocarbamate derivatives. *Rec. trav. chim.*, 71, 1179, 1962.

6. Van Der Kerk G. J. M.: The present state of fungicide research Mededel Landbouwhoges-
schell en Opozoekingestation. Staat Gent 21, 305, 1966.
7. Klöpping H. L.: Chemical constitution and antifungal action of sulfur compounds. Thesis
Utrecht, 1961.
8. Lukens R. J.: Chemistry of fungicidal action. Springer Berlin-Heidelberg 1968.
9. Mc Callan S. E. A., Miller L. P.: Comparative effect of fungicides on oxygen uptake and
germination of spores. Contribs. Boyce Thompson Inst., 18, 39, 1954.
10. Mc Callan S. E. A.: Mechanisms of toxicity with special reference to fungicides. Proc. Intern.
Conf. Plant Protection 2-nd Butterworth's London 1967.
11. 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. Contribs.
Boyce Thompson Inst., 17, 221, 1953.
12. Syrowátka T.: Badania wpływu fungicydów na komórkowe procesy energetyczne. Rozprawa
habilitacyjna. PZH, Warszawa 1970.
13. Thanassouloupoulos C. C., Giannopolitis C. N., Vitosos T. G.: Evaluation of
sensitiveness and development of resistance of *Fusarium oxysperum* f.sp. *Lycopersici* to
Benomyl phytopathol. Zeitsch., 70, 114, 1971.
14. Thorn G. P., Ludwig P. A.: The dithiocarbamate and related compounds. Elsevier
Publishing Company. Amsterdam 1962.

SUMMARY

It was demonstrated, following the results of spectroscopic studies and biological tests with the colonies of test fungi, that elimination of the sulphur atom from the toxophoric — C/S/S- grouping of biologically active derivatives of the 2,4,6-TBKD acid does not favour the fungicidal activity of the carbothion system arising from hydrazinolysis.

The obtained results were connected with the mechanism of inhibitory action of this group of compounds.