

Wykorzystanie niektórych cukrów jako źródeł węgla przez grzyby porażające naparstnicę purpurową i welnistą

II. Phyllosticta digitalis Bell.

The utilization of some carbohydrates as a sources of carbon by fungi infecting of *Digitalis purpurea* L. and *Digitalis lanata* Ehrh.

II. Phyllosticta digitalis Bell.

JÓZEF KOWALSKI

Druga część pracy obejmuje badania dotyczące przyswajalności jednemu różnym źródeł węgla przez *Phyllosticta digitalis*. W tym celu hodowano ten grzyb na płynnych pożywkach mineralnych zawierających następujące cukry: sacharozę, laktozę, melibiozę, maltozę, celobiozę, glukozę, fruktozę i galaktozę. Ponadto zastosowano także trzy mieszaniny cukrów prostych (glukoza + fruktoza, glukoza + galaktoza, glukoza + fruktoza + galaktoza). Metoda badań oraz sposób opracowania wyników podane są w pracy poprzedniej (K o w a l s k i 1970).

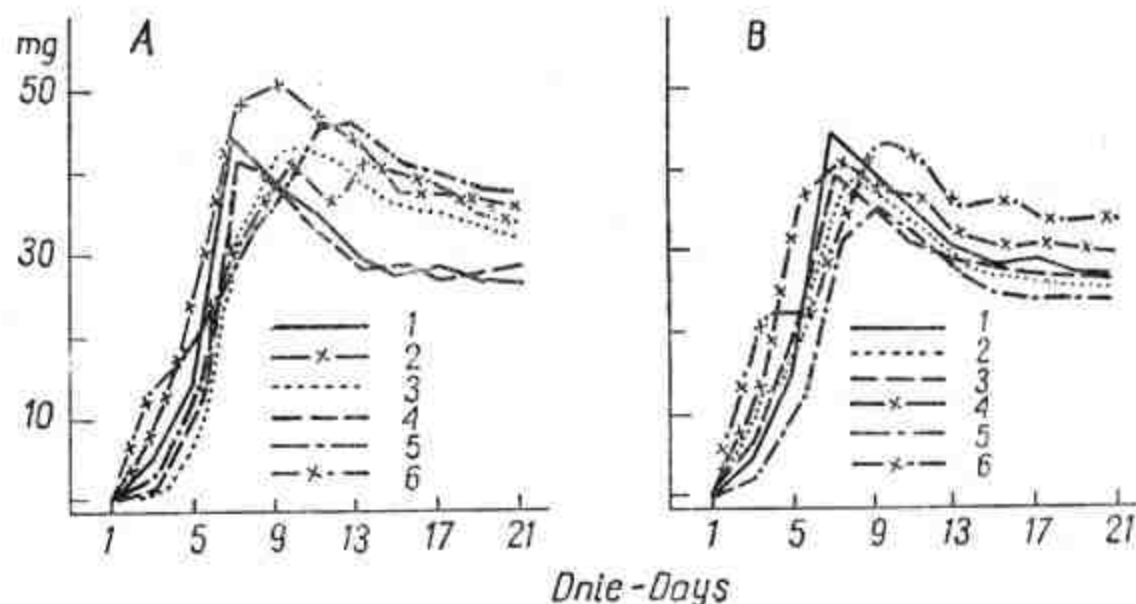
OMÓWIENIE WYNIKÓW

HODOWLA NA POŻYWKACH ZAWIERAJĄCYCH CUKRY PROSTE I ICH MIESZANINY

Wzrost grzybni

Jak wykazują otrzymane wyniki (ryc. 1 A, B) wzrost badanego grzyba na omawianych pożywkach był bardzo intensywny i mniej więcej wyrównany. Grzybnia początkowo biała przybrała w późniejszym okresie zabarwienie brunatne, tworząc na powierzchni pożywek dość grubą warstwę. Liczne pyknydy z zarodnikami pojawiły się, w zależności od pożywki, między 5 a 10 dniem hodowli. Tempo przyrostu grzybni charakteryzują podane niżej współczynniki regresji liniowej (tabela 1).

W porównaniu do *Colletotrichum fuscum* (K o w a l s k i 1970) skład pierwszej grupy pożywek, warunkujących wzrost grzybni zbliżony do wzrostu na glukozie, był nieco odmienny. Znalazły się tu, oprócz pożywek zawierających melibiozę i maltozę, pożywki z laktozą, fruktozą i ga-



Ryc. 1. Wzrost *Phyllosticta digitalis* na pożywkach zawierających różne źródła węgla, wyrażony średnim przyrostem grzybni ($b_{y/g}$ — współczynnik regresji) na danej pożywce (y) na jednostkę przyrostu grzybni na glukozie (g)

The growth of *Phyllosticta digitalis* on the medium containing various sources of carbon, expressed by the average increase of mycelium ($b_{y/g}$ — regression coefficient) on each medium in comparison with the increase unit of mycelium on the glucose medium

A. 1 — D-glukoza (Glucose), $b_{y/g} = 1,00$; 2 — melibioza (Melibiose), $b_{y/g} = 1,10$, $r = 0,90$; 3 — D-galaktoza (Galactose), $b_{y/g} = 1,05$, $r = 0,97$; 4 — D-fruktoza (Fructose), $b_{y/g} = 1,00$, $r = 0,98$; 5 — laktoza (Lactose), $b_{y/g} = 0,95$, $r = 0,79$; 6 — maltoza (Maltose), $b_{y/g} = 0,92$, $r = 0,85$; B. 1 — D-glukoza (Glucose), $b_{y/g} = 1,00$; 2 — D-glukoza + D-fruktoza + D-galaktoza (Glucose + Fructose + Galactose), $b_{y/g} = 0,88$, $r = 0,98$; 3 — sacharoza (Sucrose), $b_{y/g} = 0,75$, $r = 0,99$; 4 — D-glukoza + D-galaktoza (Glucose + Galactose), $b_{y/g} = 0,69$, $r = 0,97$; 5 — D-glukoza + D-fruktoza (Glucose + Fructose), $b_{y/g} = 0,67$, $r = 0,96$; 6 — celobioza (Cellobiose), $b_{y/g} = 0,66$, $r = 0,76$; r — współczynnik korelacji (coefficient of correlation)

laktozą. Z załączonych wykresów (1 A, B) wynika, że pewne różnicowanie tych pożywek wyrażające się przyrostem grzybni nastąpiło już w 3, a głównie w 5 i 7 dniu po zaszczepieniu. Najlepszą okazała się tu pożywka z melibiozą. Zarówno ogólna ilość wytworzonej grzybni, jak i tempo jej dziennych przyrostów były w tym przypadku najwyższe. Na wymienionej pożywce oraz na pożywkach z glukozą i fruktozą maksymalną ilość grzybni otrzymano już w 7 dniu hodowli, podczas gdy na galaktozie, laktozie i maltozie nieco później, bo dopiero między 9 a 13 dniem po zaszczepieniu. W późniejszym okresie zauważono zmniejszenie się ciężaru wytworzonej grzybni, szczególnie na pożywkach z glukozą i fruktozą.

Do drugiej grupy cukrów, na których masa wytworzonej grzybni w porównaniu do glukozy była mniejsza (ryc. 1 B), weszły pożywki zawierające mieszaniny cukrów prostych (podobnie jak u *Colletotrichum fuscum*) oraz sacharozę i celobiozę. Z tej grupy pożywek najsilniejszy

wzrost grzyba, zwłaszcza w pierwszych dniach po zaszczepieniu, wystąpił na mieszaninie glukozy z galaktozą i na sacharozie; najmniejsze przyrosty grzybni otrzymano na mieszaninie glukozy z fruktozą. Okres wzrostu grzybni trwał 9 dni z wyjątkiem kombinacji zawierającej glu-

Tabela 1 — Table 1

Współczynniki regresji (b) charakteryzujące 2-dniowe przyrosty grzybni (i) *Phyllosticta digitalis* na pożywkach z różnymi źródłami węgla
Regression coefficients (b) showing two days increases of mycelium (i) *Phyllosticta digitalis* grown on the media with various carbon sources

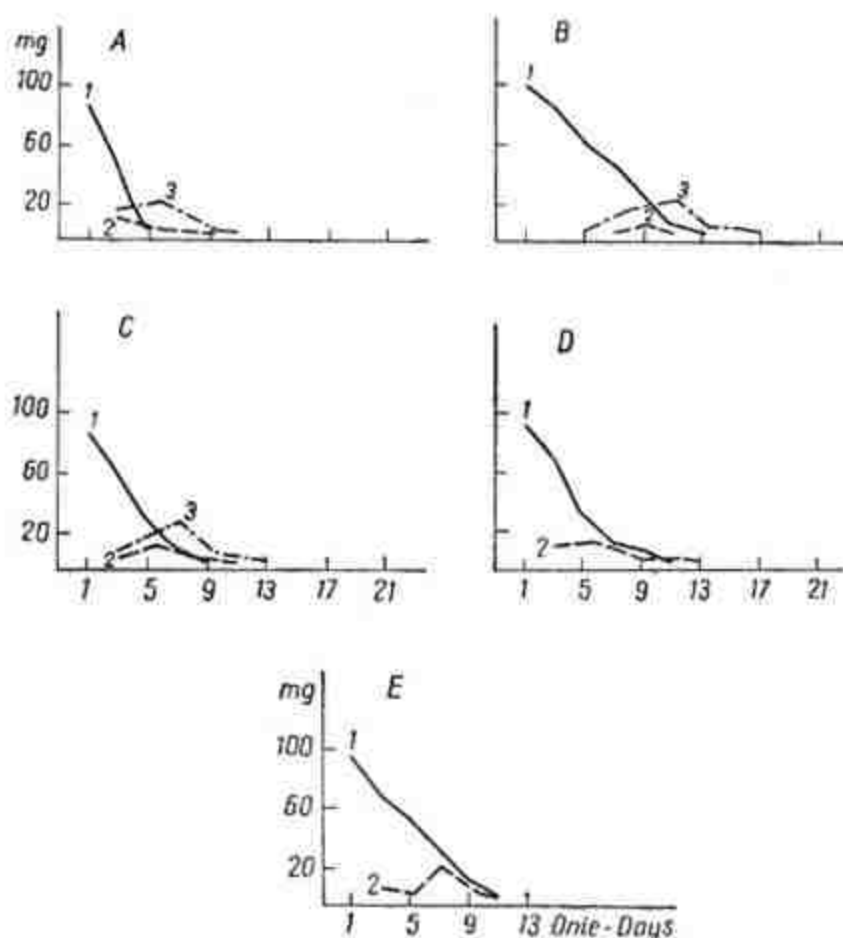
Cukier Sugar	Współczynniki regresji (w mg) Regression coefficients (in mg) b _i /2 dni (days)
D-glukoza	14,38
melibioza	16,13
D-glukoza + D-galaktoza	13,98
D-fruktoza	13,12
sacharozą	10,71
D-galaktozą	10,33
D-glukoza + D-fruktoza + + D-galaktoza	10,08
celobioza	9,80
D-glukoza + D-fruktoza	9,73
laktoza	8,49
maltoza	6,91

kozę z galaktozą na której grzyb osiągnął nieco wcześniej maksimum wzrostu, bo już w 7 dniu hodowli. W następnych dniach na wszystkich pożywkach z tej grupy obserwowano znaczne i dość gwałtowne zmniejszanie się ciężaru wytworzonej grzybni.

Wykorzystanie cukrów

Dwu c u k r y. Jak widać z wyników przedstawionych na wykresach (ryc. 2 A, B, C, D, E) występujące w pożywkach dwucukry były również hydrolizowane przez *Phyllosticta digitalis*. Tempo ich wyczerpywania się z podłoża obrazują zamieszczone współczynniki regresji (tab. 2).

Najszybciej, bo już w 5 dniu wzrostu kultury, została całkowicie rozłożona sacharozą. Hydroliza pozostałych dwucukrów zachodziła wolniej i mniej więcej do 11 dnia hodowli wykrywano w pożywce jednoczesną obecność cukru złożonego oraz produktów jego rozkładu. Z hydrolizatów tych niemal we wszystkich przypadkach znacznie szybciej pobierał grzyb glukozę.



Ryc. 2. Zawartość cukrów w pożywkach podczas wzrostu *Phyllosticta digitalis*.
Sugars content in medium during growth of *Phyllosticta digitalis*

A — pożywka z sacharozą (sucrose medium): 1 — sacharoza (sucrose); 2 — D-giukoza (glucose), 3 — D-fruktoza (fructose); B — pożywka z laktozą (lactose medium): 1 — laktoza (lactose), 2 — D-giukoza (glucose), 3 — D-galaktoza (galactose); C — pożywka z melibiozą (melibiose medium): 1 — melibioza (melibiose), 2 — D-giukoza (glucose), 3 — D-galaktoza (galactose); D — pożywka z maltozą (maltose medium): 1 — maltoza (maltose), 2 — D-giukoza (glucose); E — pożywka z celobiozą (cellobiose medium): 1 — celobioza (cellobiose), 2 — D-giukoza (glucose)

Tabela 2 — Table 2

Współczynniki regresji (b) określające spadek zawartości (w mg) dwucukrów (x) w pożywkach przypadający na 2 dni wzrostu grzybnii (i) *Phyllosticta digitalis*.
Regression coefficients (b) showing the decrease of content (in mg) bisaccharides (x) in the media during two days growth of the mycelium (i) *Phyllosticta digitalis*.

Cukier Sugar	Współczynniki regresji (w mg) Regression coefficients (in mg) $b_{xi}/2$ dni (days)
sacharoza	28,80
melibioza	20,89
celobioza	19,31
laktoza	15,90
maltoza	15,39

Analizując chromatogramy pożywek zawierających sacharozę i maltozę zauważono, że między 3 a 7 dniem wzrostu grzyba występowały na nich, obok plam odpowiednich cukrów, plamy dodatkowe (ryc. 3, I, II). Związek występujący w pożywce z sacharozą oznaczono literą „X”, zaś w pożywce z maltozą literą „Y”. Otrzymane wyniki pozwalały przypuszczać, że były to bardziej złożone związki węglowodanowe, syntetyzowane

Tabela 3 — Table 3

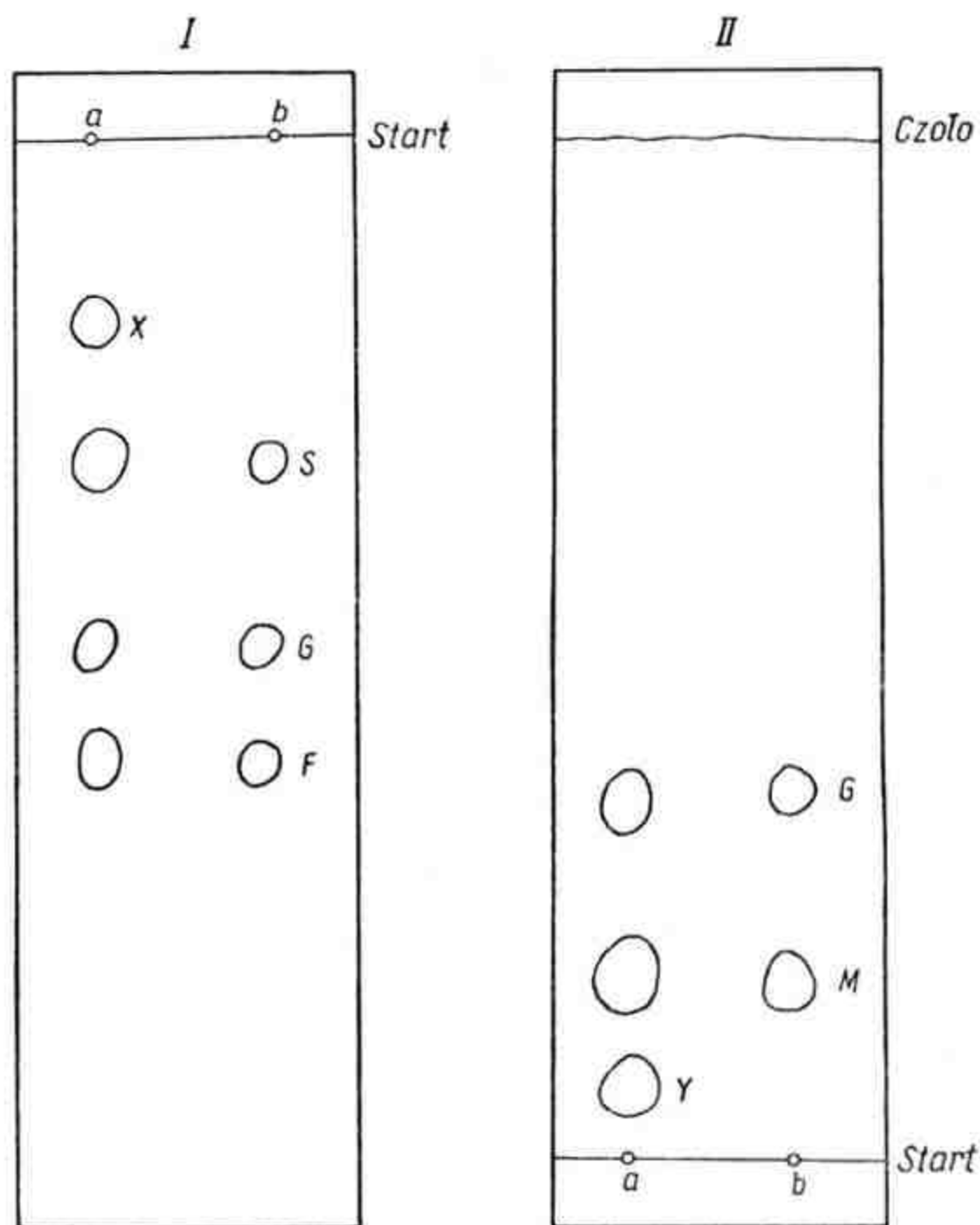
Współczynniki regresji (b) określające spadek zawartości (w mg) w pożywkach poszczególnych cukrów (x) wchodzących w skład mieszanin przypadający na 2 dni wzrostu grzybni (i) *Phyllosticta digitalis*

Regression coefficients (b) showing the decrease of content (in mg) of individual sugars (x) in the media with the mixtures of sugars during two days growth of the mycelium (i) *Phyllosticta digitalis*

Cukier Sugar	Współczynniki regresji (w mg) Regression coefficients (in mg) $b_{xi}/2$ dni (days)
Mieszanina I Mixture I D-glukoza D-fruktoza	9,83 8,30 18,13
Mieszanina II Mixture II D-glukoza D-galaktoza	13,01 8,12 21,13
Mieszanina III Mixture III D-glukoza D-fruktoza D-galaktoza	10,61 5,42 5,99 22,02

przez rosnący organizm bądź to w podłożu, bądź w komórkach grzybni, a następnie wydzielane do pożywki. Substancje te znikaly z pożywki przed wytworzeniem największej suchej masy grzybni. Szczegółowsze badania dotyczące omawianych związków podane są w dalszej części pracy.

Mieszaniny cukrów prostych. Pobieranie przez *Phyllosticta digitalis* cukrów prostych będących składnikami przygotowanych mieszanin zależało w pewnym stopniu od rodzaju tych związków znaj-



Ryc. 3. Chromatogramy bibułowe pożywek zawierających sacharozę i maltozę, wykonane po trzech dniach wzrostu *Phyllosticta digitalis*

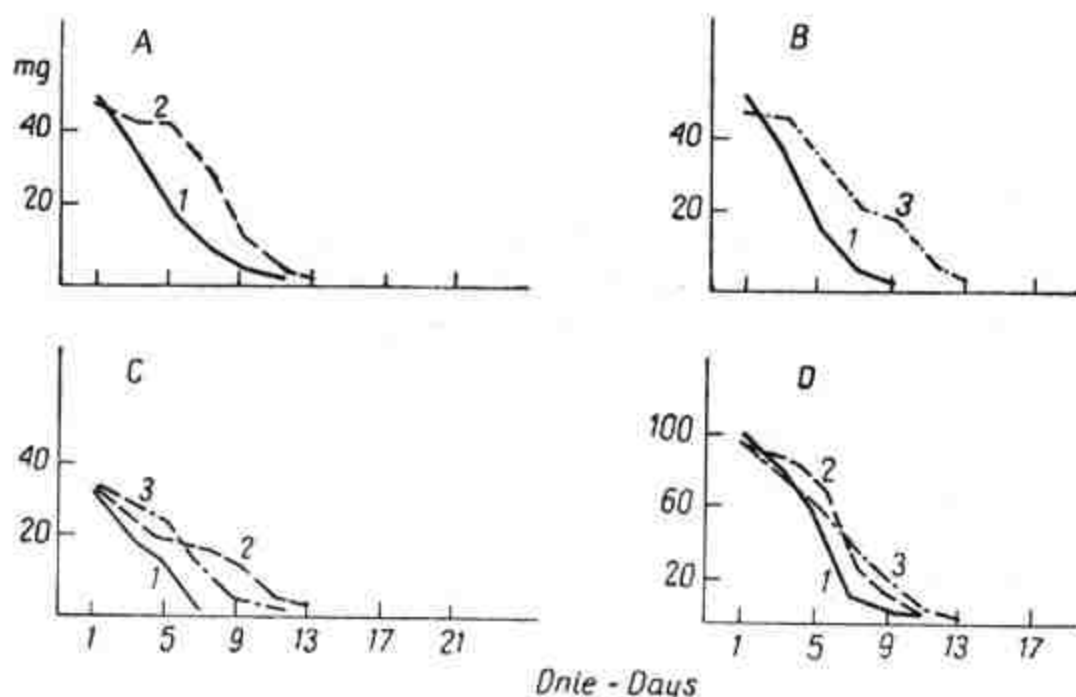
Paper chromatograms of sucrose and maltose medium after 3 days of growth *Phyllosticta digitalis*

I — pożywka z sacharozą (sucrose medium); Technika przepływowa, układ: n-butanol: kw. octowy lodowaty: woda, 4:1:5 (Descending technique, solvent: n-Butanol: acetic acid: water, 4:1:5); II — pożywka z maltozą (maltose medium). Technika wstępująca, układ: izopropanol: woda, 16:4 (Ascending technique, solvent: Iso-Propanol: water, 16:4)

S — sacharoza (sucrose); G — D-glukoza (glucose); F — fruktoza (fructose); M — maltoza (maltose); X, Y — nowe związki (new compounds)

dujących się w danej pożywce. Jak widać z wykresów (ryc. 4 A, B, C) najszybciej została przyswojona glukoza. Jednakże obliczone współczynniki regresji wskazują, że tempo jej pobierania było różne w poszczególnych mieszaninach.

Najwyższy współczynnik otrzymano w przypadku, gdy glukoza występowała w mieszaninie z galaktozą, nieco mniejszy w mieszaninie z fruktozą i galaktozą, a najniższy w obecności fruktozy. Fakt ten prze-



Ryc. 4. Zawartość cukrów w pożywkach podczas wzrostu *Phyllosticta digitalis*
Sugars content in medium during growth of *Phyllosticta digitalis*

A — pożywka z mieszaniną: D-glukoza + D-fruktoza (mixture: glucose + fructose); B — pożywka z mieszaniną: D-glukoza + D-galaktoza (mixture: glucose + galactose); C — pożywka z mieszaniną: D-glukoza + D-fruktoza + D-galaktoza (mixture: glucose + fructose + galactose); D — pożywka z D-glukozą (glucose medium), z D-fruktozą (fructose medium), z D-galaktozą (galactose medium)

1 — D-glukoza (glucose); 2 — D-fruktoza (fructose); 3 — D-galaktoza (galactose)

mawia za tym, że wykorzystanie poszczególnych węglowodanów z mieszanych źródeł węgla jest bardzo swoiste i zależy od wielu różnych czynników.

Cukry proste. Otrzymane wyniki (ryc. 4 D) wskazują, że tempo pobierania przez *Phyllosticta digitalis* trzech cukrów prostych użytych jako oddzielne źródło węgla przebiegało prawie jednakowo. Jedynie w przypadku galaktozy proces ten zachodził nieco wolniej. Wskazują na to również obliczone współczynniki regresji liniowej (tab. 4).

Współczynniki te jednak nie odtwarzają właściwej dynamiki pobierania omawianych cukrów z podłoża. Z ryciny 4 D wynika, że najwięcej

Tabela 4 — Table 4

Współczynniki regresji (b) określające spadek zawartości (w mg) cukrów prostych (x) w pożywkach przypadający na 2 dni wzrostu grzybni (i) *Phyllosticta digitalis*

Regression coefficients (b) showing the decrease of content (in mg) monosaccharides (x) in the media during two days growth of the mycelium (i) *Phyllosticta digitalis*

Cukier Sugar	Współczynniki regresji (w mg) Regression coefficients (in mg) $b_{xi}/2$ dni (days)
D-glukoza	25,08
D-fruktoza	19,88
D-galaktoza	15,46

cukrów grzyb ten pobierał między 5 a 7 dniem wzrostu. W dniach poprzedzających jak i następujących po tym okresie ubytki cukru były stosunkowo nieduże. Dlatego też krzywe obrazujące zawartość cukrów prostych w pożywkach podczas wzrostu *Phyllosticta digitalis* mają tendencję krzywych parabolicznych, co potwierdzają również obliczenia statystyczne.

Sprawdzając metodą regresji liniowej stopień wykorzystania omawianych cukrów w odniesieniu do ciężaru wytworzonej grzybni otrzymano następujące wyniki:

Tabela 5 — Table 5

Stopień wykorzystania cukrów prostych wyrażony ciężarem wytworzonej grzybni

The degree of the utilization of the monosaccharides based upon the weight of mycelium

Współczynniki Coefficients	D-glukoza	D-fruktoza	D-galaktoza
regresji regression b_{yx} w mg	4,76	5,91	4,72
regresji regression b_{xy} w mg	2,01	1,65	2,09
korelacji correlation	0,95	0,90	0,96

b_{yx} — przeciętny przyrost grzybni (w mg) przypadający na 10 mg pobranego cukru.
average increase of the mycelium (in mg) based upon 10 mg of the sugar utilized.

b_{xy} — średnia ilość cukru (w mg) zużyta na wytworzenie 1 mg grzybni.
average amount of sugar (in mg) utilized during the growth of 1 mg of the mycelium.

Z obliczeń tych wynika, że około 47% glukozy i galaktozy zostało zużyte na wytworzenie grzybni i zarodników. W przypadku fruktozy stopień wykorzystania jest jeszcze wyższy i osiąga wartość bliską 60%. Zależność tę potwierdzają również wysokie współczynniki korelacji.

Skład jakościowy cukrów w pożywkach kontrolnych nie zmieniał się w czasie trwania hodowli.

IDENTYFIKACJA CUKRÓW WYSTĘPUJĄCYCH W SUBSTANCJI „X” I „Y”

Wyodrębnianie substancji „X” i „Y”.

Związki „x” i „y” wydzielono z pożywek stosując preparatywną chromatografię bibułą (bibuła Whatman Nr 4). W przypadku pożywki z sacharozą chromatogramy rozwijano techniką przepływową w układzie n-butanol: kwas octowy lodowaty: woda (4:1:5). Przy chromatografowaniu pożywki zawierającej maltozę zastosowano technikę wstępującą, zaś fazą rozwijającą była mieszanina izopropanolu i wody (16:4). Po wysuszeniu wycinano z chromatogramów miejsca z zaadsorbowanymi substancjami i eluowano wodą destylowaną. Otrzymane wyciągi zagęszczono do objętości około 2 ml. Celem identyfikacji cukrów wchodzących w skład omawianych związków przeprowadzono ich hydrolizę oraz badania chromatograficzne.

Hydroliza i oczyszczanie.

Do 1,5 ml zagęszczonych wyciągów dodano 10 ml 2% kwasu siarkowego i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną we wrzącej łaźni wodnej przez 2 godziny. Ostudzone hydrolizaty zneutralizowano węglanem baru. Po oddzieleniu osadu przesącze oczyszczano na wymienniczkach jonowych — Amberlit IR 120 i Amberlit IR 4 B (Cole i Gosvold 1958, Gracza 1965, Pšenak i współpr. 1965).

Badania chromatograficzne

Oczyszczone i zagęszczone do około 1 ml roztwory nanoszono na bibułę Whatman Nr 4 obok wzorcowych roztworów D-glukozy, D-fruktozy, D-galaktozy i rozwijano metodą przepływową w układach:

a — n-butanol: kwas octowy lodowaty: woda (4:1:5),

b — n-butanol: pirydyna: woda (45:25:40),

oraz metodą wstępującą w układzie

c — fenol: woda (1:1).

Wysuszone chromatogramy spryskano odczynnikami Buchan'a i Savage. Po ogrzaniu wystąpiły na chromatogramach brunatne plamy glukozy, galaktozy i fruktozy oraz plamy cukrów znajdujących się w badanych hydrolizatach. Plamy te miały następujące wartości R_f (R_f glukozy przyjęto za 100). (Tab. 6).

Tabela 6 — Table 6

Wartości R_g cukrów otrzymanych po hydrolizie związku „X” i „Y”
 R_g values of the sugars obtained from the isolated compounds “X” and “Y” after
 hydrolysis

Cukier Sugar	Układ — Solvent		
	a	b	c
Substancje wzorcowe Standard substances			
D-galaktoza	85	94	116
D-glukoza	100	100	100
D-fruktoza	120	108	137
Związek „X” Compound „X”			
cukier I — sugar I	99	99,6	100
cukier II — sugar II	121	108	135
Związek „Y” Compound „Y”			
cukier I — sugar I	99,4	100	102

Otrzymane w wyniku hydrolizy substancji „X” i „Y” cukry wykazywały R_g zgodne z glukozą i fruktozą. Stwierdzona zgodność wartości R_g pozwala przypuszczać, że w skład substancji „X” wchodzi D-glukoza i D-fruktoza, natomiast substancja „Y” zbudowana jest, podobnie jak maltoza, z cząsteczek D-glukozy.

HODOWLA NA POŻYWCĘ ZAWIERAJĄCEJ GLIKOZYDY KARDENOLIDOWE

Powszechne, a niekiedy dominujące występowanie *Phyllosticta digitalis* na plantacjach naparstnicy purpurowej i wełnistej skłoniło do przeprowadzenia dodatkowych badań, których celem była próba ustalenia roli glikozydów kardenolidowych jako źródeł węgla dla omawianego pasożyta.

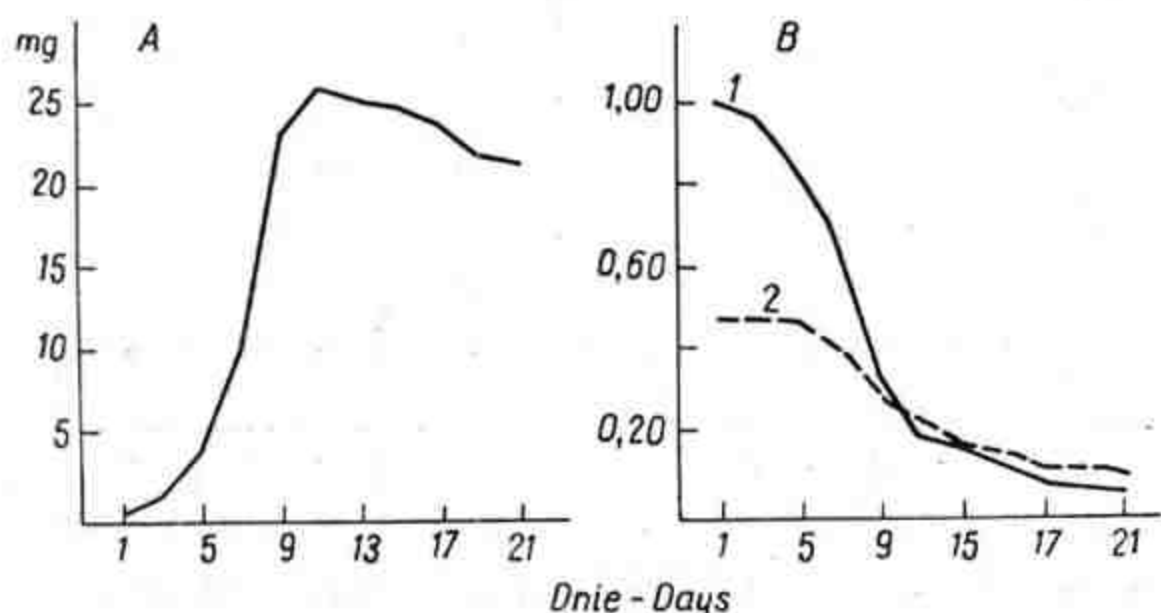
Przygotowanie pożywki

Hodowlę prowadzono na pożywce płynnej zawierającej w 1000 ml wody destylowanej: zespół glikozydów wyekstrahowany z 10 g liści naparstnicy purpurowej, 3,5 g KNO_3 , 1,75 g K_2HPO_4 , 0,75 g $MgSO_4 \times 7H_2O$. Ekstrakcję i oczyszczanie wyciągu glikozydowego wykonano sposobem opisanym w pracach Tattje'go (1957, 1958). Ponieważ w czasie ogrzewania część glikozydów ulega rozkładowi, dlatego oczyszczony wyciąg dodawano do pożywki dopiero po jej wysterylizowaniu. Przygotowaną pożywkę zawierającą jedynie składniki mineralne rozlano

do 100 ml kolbek stożkowych, dając do każdej z nich 20 ml roztworu. Kolbki oraz pozostałą część pożywki sterylizowano w aparacie Kocha. Suchą pozostałość z otrzymanego wyciągu rozpuszczono w pozostałej ilości wysterylizowanej pożywki. Następnie 5 ml tego roztworu dodawano w warunkach sterylnych do poszczególnych kolbek. Ostatecznie w każdej kolbce znajdowało się 25 ml pożywki. W dniu szczepienia zbadano pożywkę chromatograficznie i oznaczono w niej zawartość digitoksyny i gitoksyny. Wartości te przyjęto za początkowe. Zaszczepioną pożywkę oraz kolbki kontrolne ustawiono w pomieszczeniu o temperaturze 25°. Hodowlę prowadzono 19 dni badając chromatograficznie co drugi dzień (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 dzień od zaszczepienia) po 4 kolbki z grzybem oraz 4 kolbki kontrolne — bez grzyba. Zawartość 4 kolbek odpowiadała 1 g surowca użytego do sporządzenia wyciągu.

Analiza chromatograficzna jakościowa i ilościowa glikozydów

Oddzieloną od pożywki grzybnię suszono, a następnie ważono. Pożywkę przenoszono ilościowo do rozdzielacza i ekstrahowano glikozydy chloroformem. Po odparowaniu rozpuszczalnika suchą pozostałość roz-



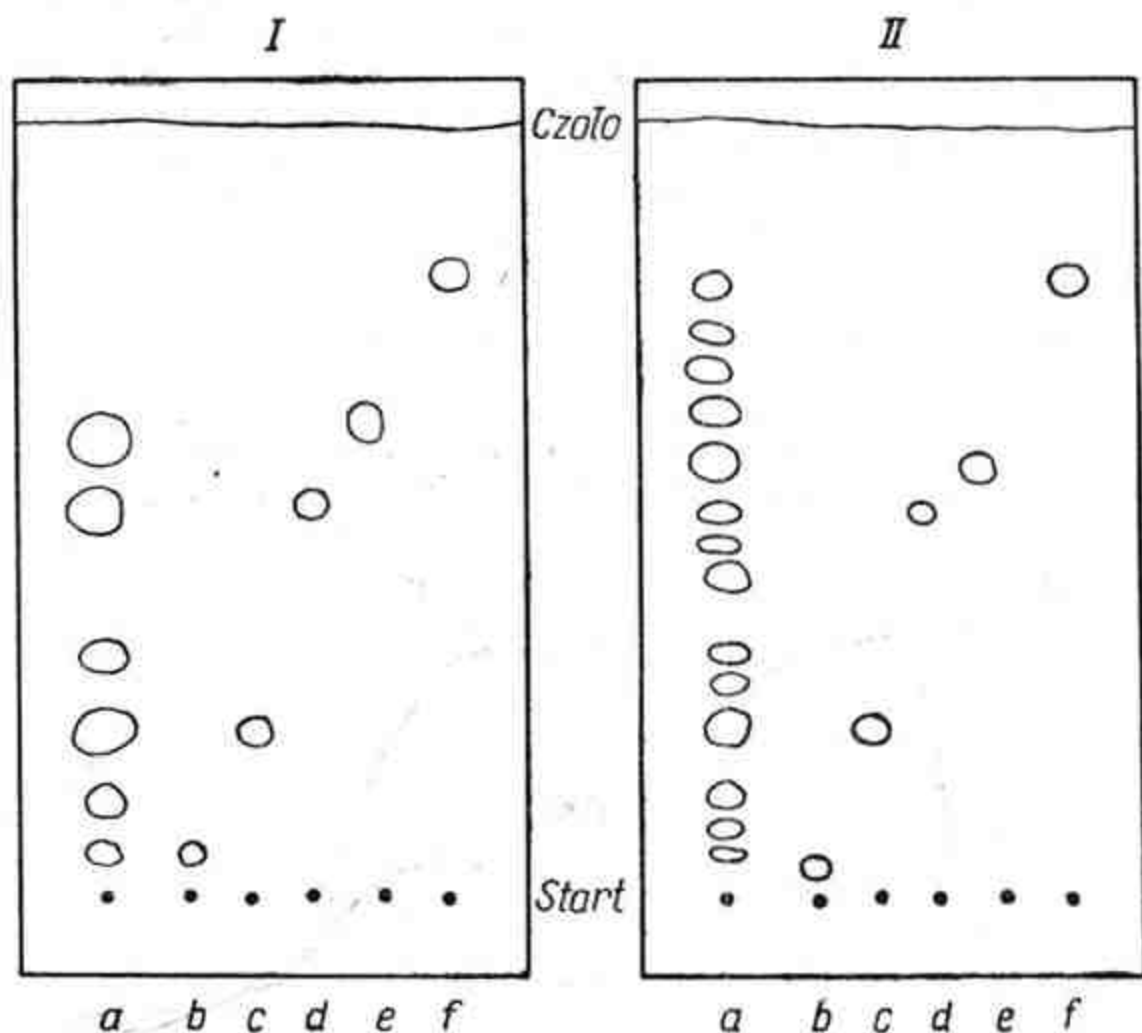
Ryc. 5. Wzrost grzyba *Phyllosticta digitalis* na pożywce zawierającej glikozydy z liści naparstnicy purpurowej (A) oraz zawartość digitoksyny i gitoksyny w pożywce w czasie wzrostu tego grzyba (B)

1 — digitoksyna, 2 — gitoksyna

Growth of *Phyllosticta digitalis* on the medium contents Glycosides from *Digitalis purpurea* leaves (A) and digitoxin and gitoxin content in medium during growth of *Phyllosticta digitalis*

1 — digitoxin, 2 — gitoxin

puszczano w 1 ml mieszaniny chloroform — metanol (1:1), a następnie chromatografowano i oznaczano zawartość digitoksyny i gitoksyny. W badaniach tych stosowano chromatografię cienkowarstwową używając talku jako adsorbenta do powlekania płytek (Żurkowska i współpracownicy 1963, 1964). Ilościowe oznaczanie digitoksyny i gitoksyny wykonano metodą kolorymetryczną z odczynnikiem ksanthydrolowym (Pesez 1952).



Ryc. 6. Chromatogramy cienkowarstwowe pożywki zawierającej glikozydy z liści naparstnicy purpurowej

Thin layer chromatograms of the medium contents glycosides from *Digitalis purpurea* leaves

I — 1 dzień wzrostu (1st day of growth); II — 9 dzień wzrostu (9th day of growth)

a — pożywka (medium), b — strospezyd (strospeptide), c — gitoksyna (gitoxin), d — gitaloksyna (gitaloxin), e — digitoksyna (digitoxin), f — digitoksygenina (digitoxigenin)

Wzrost grzybni

Już w 5 dniu hodowli zaobserwowano na pożywce rozwój białej, delikatnej grzybni, głównie wokół miejsca zaszczepienia. Najsilniejszy

wzrost miał miejsce między 7 a 13 dniem hodowli. Rozwijająca się grzybnia pokryła w tym czasie prawie całą powierzchnię pożywki. Pojawienie się pierwszych zarodników stwierdzono w 15 dniu po zaszczepieniu. Średnie przyrosty suchej masy grzybni przedstawione są na rycinie 5 A.

Badania chromatograficzne

Jak wykazały badania chromatograficzne skład jakościowy zespołu glikozydowego w czasie wzrostu grzyba ulegał pewnym, dość istotnym, zmianom. Najbardziej charakterystyczne zmiany obrazuje zamieszczony rysunek chromatogramu (ryc. 6) wykonanego w 9 dniu hodowli, a więc w okresie największego przyrostu grzybni. Występuje na nim 14 plam związków kardenolidowych, co wskazuje, że oprócz głównych glikozydów znajdują się tu prawdopodobnie produkty ich przemiany i rozkładu. Chromatogramy wykonane w następnych dniach wykazywały stopniowe zmniejszanie się liczby plam, często jednak pojawiały się nowe plamy o innych wartościach R_f , co świadczyłoby o zmianach zachodzących bądź to w aglikonach, bądź też w części cukrowej.

Również z oznaczeń ilościowych digitoksyny i gitoksyny wynikało, że zawartość obydwu glikozydów w pożywce już od chwili zaszczepienia stopniowo malała (ryc. 5 B). Największe ubytki wystąpiły między 5 a 9 dniem wzrostu grzyba. Ponieważ zastosowana metoda ilościowego oznaczania glikozydów kardenolidowych oparta jest na reakcji części cukrowej tych związków z odczynnikiem ksanthydrolowym, otrzymane więc wyniki wskazują na możliwość odszczepiania przez *Phyllosticta digitalis* cząsteczek cukru od aglikonu i wykorzystanie ich jako źródło węgla.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Założeniem podjętej pracy było poznanie dynamiki przyswajania niektórych cukrów przez *Phyllosticta digitalis* oraz zbadanie ich wpływu na wzrost grzybni. Otrzymane wyniki wykazały, że wzrost grzyba na badanych podłożach był bardzo intensywny i mniej więcej wyrównany. Jednakże w oparciu o obliczenia statystyczne wydzielono również dla *Phyllosticta digitalis* dwie grupy pożywek:

1. Do pierwszej grupy, odznaczającej się wzrostem grzybni zbliżonym do wzrostu na glukozie, zaliczono pożywki zawierające melbiozę, maltozę, laktozę, fruktozę i galaktozę.

2. W obrębie drugiej grupy, dającej mniejsze przyrosty grzybni, znalazły się pożywki, w których źródłem węgla były mieszaniny cukrów

prostych (podobnie jak u *Colletotrichum fuscum*), oraz sacharoza i celobioza.

3. Wszystkie badane dwucukry były przed pobraniem hydrolizowane. Z powstających produktów rozkładu najszybciej przyswajał grzyb glukozę. Stopień wykorzystania pobranych cukrów prostych (glukoza, fruktoza, galaktoza) w odniesieniu do masy wytworzonej grzybni osiągał wartość bliską 50%.

4. Z pożywek zawierających sacharozę i maltozę wydzielono dwa nowe związki węglowodanowe, tworzące się prawdopodobnie pod wpływem rosnącego grzyba. Substancje te — nie identyczne z wymienionymi dwucukrami — zbudowane były z cząsteczek D-glukozy i D-fruktozy.

5. *Phyllosticta digitalis* może wykorzystywać jako źródło węgla również glikozydy kardenolidowe. Wskazuje na to fakt dobrego wzrostu grzybni na pożywce zawierającej glikozydy wyizolowane z liści naparstnicy purpurowej oraz zmiany jakościowe i ilościowe, którym ulegają te związki pod wpływem rozwijającego się grzyba.

Katedra Farmakognozji

Akademia Medyczna

Warszawa, Kniewskiego 7

Kierownik: Doc. dr H. Strzelecka

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present work included analyses of the dynamics of assimilation of some sugars by *Phyllosticta digitalis* and studies on their influence on the mycellium's growth. The results obtained indicated that the growth of the fungus on the media studied was very intensive and relatively uniform. Nevertheless, two groups of media were distinguished also for *Phyllosticta digitalis*:

1. Media containing mellibiose, maltose, lactose, fructose and galactose were classified to the first group characterized by a growth of the mycellium similar to that on glucose.

2. Media in which the growth of the mycellium was weaker, consisting of mixtures of simple sugars (similarly as in the case of *Colletotrichum fuscum*) as well as saccharose and cellobiose were the source of carbon.

3. All the disaccharides studied were hydrolyzed before use. Of all the products of decomposition the fungus most rapidly adsorbed glucose. The degree of utilization of the simple sugars (glucose, fructose, galactose) in relation to the mycellial mass produced was about 50 per cent.

4. Two new carbohydrate compounds probably formed under the influence of the growing fungus were isolated from the media containing saccharose and maltose. These substances — differing from these disaccharides — consisted of D-glucose and D-fructose particles.

5. *Phyllosticta digitalis* is also able to utilize cardiac glycosides as carbon source. The satisfactory growth of the mycellium on the medium containing glycosides isolated from leaves of *Digitalis purpurea* as well as qualitative changes which these compounds undergo under the influence of the developing fungus confirm this thesis.

LITERATURA

- Cole J. R., Gisvold I., 1958, A Preliminary Phytochemical Investigation of *Digitalis lutea* First Year Growth, J. Amer. Pharmaceut. Ass. 47: 654.
- Gracza L., 1965, Über die Wirkstoffe von *Asarum europaeum* L., 4 Mitteilung: Kolenhydrate, Pharmazie. 20: 228.
- Kowalski J., 1970, Wykorzystanie niektórych cukrów jako źródeł węgla przez grzyby porażające naparstnicę purpurową i wełnistą. Cz. I *Colletotrichum fuscum* Laub., Acta Mycol. 6: 249—260.
- Pesez M., 1952, Le xanthidrol reactif des desoses, Ann. Pharm. franc. 10: 104.
- Pšenak M., Woitowitz D., Kovacs P., Jindra A., 1965, Cukry v kukliku mestskom (*Geum urbanum*), Českoslov. Farm. 14: 397.
- Tattje D. H. E., 1957, Gehaltsschwankungen der Blätter von *Digitalis purpurea* III. Der Gehaltsverlauf in den Blättern während 24 Stunden, Pharmac. Weekbl. 92: 734.
- Tattje D. H. E., 1958, Influence of Fermentation on the Glycosidal Content of *Digitalis purpurea*, Pharmac. Weekbl. 93: 819.
- Zurkowska J., Łukaszewski M., Ożarowski A., 1963, Glikozydy kardenolidowe III. Jakościowa i ilościowa chromatografia cienkowarstwowa glikozydów naparstnicowych, Acta Pol. Pharm. 20: 115.
- Zurkowska J., Ożarowski A., 1964, Quantitative Dünnschichtchromatographie eines Gemisches der *Lanatoside* A, B, C und D auf Talk, Planta Medica. 12: 222.