

**ACȚIUNEA EXTRACTULUI VEGETAL DE *BERBERIS VULGARIS*
ASUPRA GERMINĂRII ȘI CREȘTERII *IN VITRO* A UNOR
CIUPERCI FITOPATOGENE IZOLATE DE PE
*TULIPA GESNERIANA***

**THE ACTION OF *BERBERIS VULGARIS* VEGETAL EXTRACT
UPON *IN VITRO* GERMINATION AND GROWING OF SOME
PHYTOPATOGENOUS IZOLATED FUNGUS FROM
*TULIPA GESNERIANA***

Rozalia Maria Danciu*, Mihai Mititiuc*, Marcel Pârvu,
Laurian Vlase***, Mircea Tămaș*****

* Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Facultatea de Biologie Iași

** UBB, Facultatea de Biologie și Geologie Cluj-Napoca

*** UMF Iuliu Hațieganu, Facultatea de Farmacie Cluj-Napoca

Summary

Berberis vulgaris hydroalcoholic plant extract (1:1) was obtained from stem bark ("*Berberidis cortex*") and it was standardized to 1% alkaloids. The quantity of berberine (0,5668 mg/ml) was determined by a high performance liquid chromatography method coupled with mass spectrometry, compared to Fluka berberine.

The fungal pathogens *Botrytis tulipae* and *Sclerotinia sclerotiorum* were isolated from *Tulipa gesneriana* in "Alexandru Borza" Botanical Garden from Cluj-Napoca and were cultivated on nutritive medium.

In vitro action of *Berberis vulgaris* plant extract was studied on the germination and growth of the phytopathogenic fungi, in order to determine the minimum fungicidal concentration (300-500 µg/ml), compared to Fluka berberine and the control.

Cuvinte cheie: extract vegetal, *Berberis vulgaris*, berberină, concentrație minimă fungicidă (CMF), acțiune antifungică, ciuperci fitopatogene.

Key words: plant extract, *Berberis vulgaris*, berberine, MFC, antifungal action, phytopathogenic fungi.

INTRODUCERE

Date din literatură au menționat acțiunea antimicrobiană a extractelor de *Berberis asiatica* (3), *Berberis aetnensis* (9), *Berberis heterophylla* (6), *Berberis vulgaris* (10, 12, 13) și a unor substanțe active din acestea precum berberina (6) sau derivați ai acesteia (7).

Extractul vegetal de *Berberis vulgaris* are acțiune antifungică față de diferite specii, precum *Botrytis cinerea*, *B. paeoniae* (10, 11), *Coniothyrium concentricum* (12) și *Fusarium oxysporum* (13).

În cercetarea efectuată, s-a analizat acțiunea extractului hidroalcoolic total de *Berberis vulgaris* asupra germinării și creșterii *in vitro* a unor ciuperci fitopatogene (*Botrytis tulipae* de pe flori și *Sclerotinia sclerotiorum* de pe bulbi) izolate de pe plante de *Tulipa gesneriana* (lalea) din Grădina Botanică "Al. Borza" din Cluj-Napoca.

MATERIAL ȘI METODĂ

Extractul fluid (1:1) de *Berberis vulgaris* a fost obținut din scoarță de tulpină, "Berberidis cortex", adusă la gradul de finețe al sitei VI (1), prin tehnica repercolării după Squibb, cu alcool etilic 70% (8) și a fost standardizat la 1% alcaloizi (5, 15).

Dozarea berberinei din extractul vegetal s-a realizat prin metoda cromatografiei de lichide sub presiune cuplată cu spectometrie de masă (LC/MS/MS), comparativ cu berberina (Fluka). Sistemul LC/MS a fost un HPLC de tip Agilent seria 1100.

Pentru izolarea și obținerea coloniilor fungice pure (4) s-au folosit mediul nutritiv Czapek-agar pentru cultivarea ciupercii *Botrytis tulipae* izolată de pe flori de lalea și maț-agar pentru *Sclerotinia sclerotiorum* de pe bulbi. Pregătirea mediilor de cultură s-a realizat conform datelor din literatură (2).

Însămânțarea mediului nutritiv distribuit în vase Petri (diametrul = 70 mm), s-a realizat în punct central, cu inocul fungic (1×10^{-5} /ml), alcătuit din hife și conidii de *B. tulipae*, obținut prin metoda diluțiilor (4). În cazul ciupercii *S. sclerotiorum*, s-a însămânțat în punct central câte un sclerot matur, izolat de pe o colonie de 12 zile. Incubarea s-a făcut la temperatura de 22 °C, timp de 12 zile, iar măsurarea diametrului (în mm) fiecărei colonii s-a realizat succesiv, la intervale egale de timp (3, 6, 9 și 12 zile).

Acțiunea *in vitro* a extractului vegetal de *B. vulgaris* asupra germinării și creșterii ciupercilor a fost apreciată pe baza diametrului fiecărei colonii obținute, pe mediul cu extract vegetal, în diferite concentrații, comparativ cu martorul (colonie pe mediu fără extract vegetal). Pentru fiecare concentrație a extractului vegetal și pentru martor s-au realizat câte șase repetiții.

Prin includere în mediul nutritiv, s-a determinat și acțiunea alcaloidului berberină (Fluka) asupra germinării și creșterii *in vitro* a ciupercii *S. sclerotiorum*.

Analiza statistică a rezultatelor obținute la fiecare repetiție și variantă experimentală (fig. 3, 4 și 5) a fost realizată cu ajutorul Microsoft Excel Software 10.0, prin testul ANOVA și au fost considerate semnificative rezultatele pentru care $p < 0,05$.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Extractul hidroalcoolic total de *B. vulgaris* obținut din scoarță de tulpină are culoare gălbuie. Obținerea extractului și determinarea cantitativă a alcaloizilor s-au realizat la Universitatea de Medicină și Farmacie "Tuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca.

Pentru dozarea berberinei, sursa ESI a spectrometrului de masă a operat în mod pozitiv și a fost setată pentru izolarea și fragmentarea ionului molecular al berberinei cu $m/z = 336$ (fig. 1 a). Cuantificarea berberinei s-a realizat prin însumarea ionilor cu $m/z = 291,9$ și $m/z = 321$, din spectrul MS al ionului părinte (fig. 1 b).

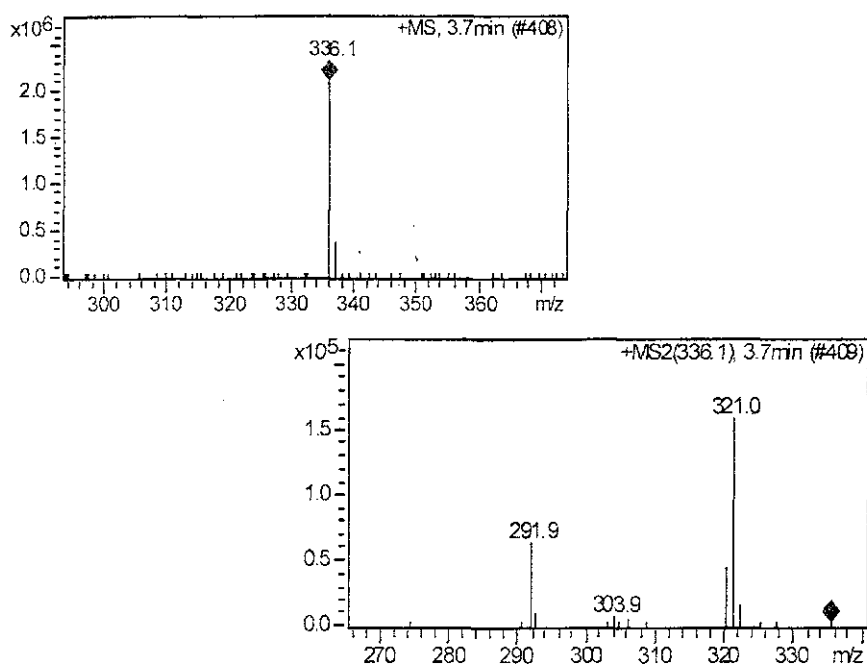


Fig. 1. a. Spectrul întreg MS al berberinei în faza mobilă;
b. Spectrul MS/MS al berberinei în faza mobilă.

Curba de calibrare a fost liniară pe domeniul 43–1931 ng/ml, cu un coeficient de corelație de 0,9998.

Pentru dozarea berberinei din extractul de *B. vulgaris*, s-a folosit metoda detecției MS/MS (fig. 2a), datorită sensibilității și selectivității superioare a acesteia, comparativ cu detecția în UV la 343 nm (fig. 2b). Timpul de retenție pentru berberină a fost de 3,6 minute.

Prin metoda cromatografiei de lichide sub presiune cuplată cu spectrometrie de masă (LC/MS/MS), s-a determinat o cantitate de 0.5668 mg/ml berberină în extractul de *B. vulgaris*.

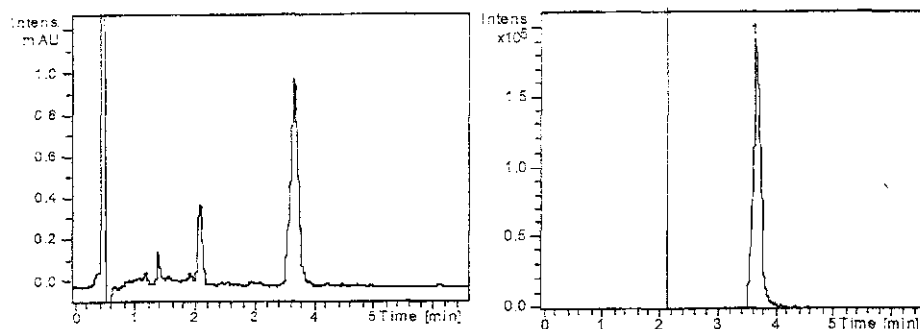


Fig. 2. Cromatogramele pentru berberina din extractul de *Berberis vulgaris*:
a. semnalul MS/MS; b. în UV, la 343 nm.

Extractul vegetal de *B. vulgaris* a fost testat în mai multe concentrații - 0,25% (25 $\mu\text{g/ml}$), 1,0% (100 $\mu\text{g/ml}$), 2,0% (200 $\mu\text{g/ml}$), 2,5% (250 $\mu\text{g/ml}$), 2,75% (275 $\mu\text{g/ml}$) și 3,0% (300 $\mu\text{g/ml}$) - asupra ciupercii patogene *B. tulipae*, comparativ cu martorul (Fig. 3).

Acțiunea inhibitoare a extractului vegetal de *B. vulgaris* asupra creșterii, sporulării și formării scleroților ciupercii *B. tulipae* a crescut proporțional cu concentrația în mediul nutritiv. După 12 zile de incubare, coloniile de *B. tulipae* formate pe mediul nutritiv cu extract de *B. vulgaris*, în concentrație de 100 $\mu\text{g/ml}$, au ajuns la un diametru de 59 mm ($p < 0,001$), iar cele obținute pe mediu cu 275 $\mu\text{g/ml}$ au avut 4,5 mm ($p < 0,001$).

În cazul tuturor repetițiilor, CMF (concentrația minimă fungicidă) a extractului de *B. vulgaris* asupra ciupercii *B. tulipae* s-a înregistrat la valoarea de 300 $\mu\text{g/ml}$, când ciuperca nu a germinat, nici după 12 zile de la inoculare, comparativ cu martorul care avea 70 mm, sporulație și scleroți pe mediul nutritiv (fig. 3).

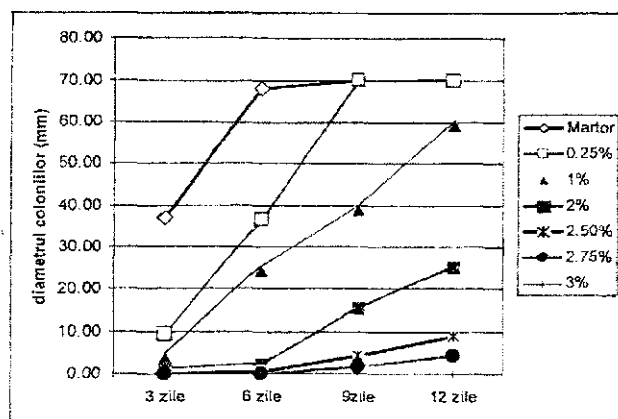


Fig. 3. Acțiunea *in vitro* a extractului de *Berberis vulgaris* asupra germinării și creșterii ciupercii *Botrytis tulipae* izolată de pe flori de la lelea

Extractul vegetal de *B. vulgaris* a fost testat în mai multe concentrații - 1% (100 $\mu\text{l/ml}$), 2% (200 $\mu\text{l/ml}$), 3% (300 $\mu\text{l/ml}$), 4% (400 $\mu\text{l/ml}$), 4,5% (450 $\mu\text{l/ml}$), 4,75% (475 $\mu\text{l/ml}$) și 5% (500 $\mu\text{l/ml}$) - asupra germinării și creșterii ciupercii patogene *S. sclerotiorum*. Efectul inhibitor al extractului vegetal a crescut proporțional cu concentrația extractului în mediul de cultură. La concentrația de 2%, după 12 zile, diametrul coloniei a ajuns la 25-26 mm, miceliul era alb și nu a format scleroți.

După 12 zile, coloniile formate pe mediu cu extract vegetal de *B. vulgaris* în concentrație de 400 $\mu\text{g/ml}$, au avut un diametru de 35 mm ($p < 0,001$), iar la concentrația de 475 $\mu\text{g/ml}$ au avut 6,5 mm ($p < 0,001$).

CMF a extractului vegetal asupra ciupercii *S. sclerotiorum* s-a manifestat la 5% (500 $\mu\text{l/ml}$), când ciuperca nu a germinat nici după 12 zile de la inoculare (fig. 4).

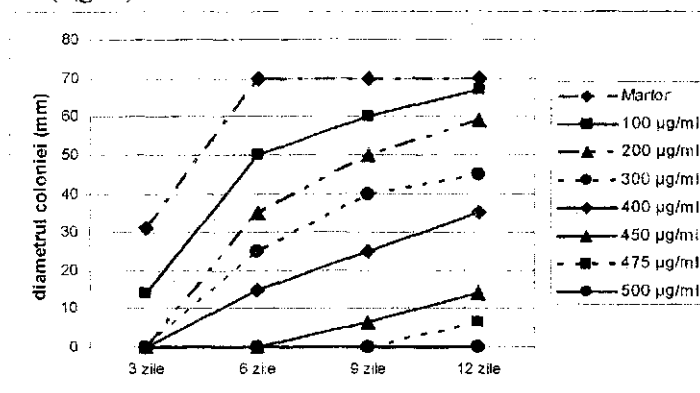


Fig. 4. Acțiunea *in vitro* a extractului de *Berberis vulgaris* asupra germinării și creșterii ciupercii *Sclerotinia sclerotiorum* izolată de pe bulbi de lealea

După 12 zile de incubare, coloniile martor de *S. sclerotiorum* au avut 70 mm, miceliu cenușiu și scleroți de culoare neagră, conform datelor din literatură (14).

Ciuperca *S. sclerotiorum* a fost cultivată și pe mediu nutritiv cu concentrații diferite de berberină, cuprinse între 300 $\mu\text{g/ml}$ și 650 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 5). Pe mediu nutritiv cu berberină în concentrație de 300 $\mu\text{g/ml}$, diametrul coloniilor a fost de 68 mm ($p < 0,05$), după 12 zile de la însămânțare. La concentrația de 600 $\mu\text{g/ml}$, după 12 zile, diametrul coloniilor a fost de 12 mm ($p < 0,001$), iar la 625 $\mu\text{g/ml}$ de 5 mm ($p < 0,001$). CMF a berberinei asupra ciupercii *S. sclerotiorum* a fost la 650 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 5), în timp ce în cazul extractului de *B. vulgaris* aceasta s-a înregistrat la 500 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 4). Acțiunea inhibitoare mai puternică a extractului de *B. vulgaris*, comparativ cu berberina Fluka, poate fi explicată prin compoziția mai complexă a extractului, care conține diferite principii active, precum berberină, berbamină, oxiacantină, magnoflorină, berberubină etc. [15].

Datele obținute confirmă informațiile din literatură, precum că extractele vegetale obținute din plante de *Berberis* au acțiune mai puternică decât berberina. Astfel, extractele metanolice și apoase de *Berberis asiatica* au prezentat activitate antimicrobiană mai crescută față de unele microorganisme, decât berberina, principalul alcaloid (3).

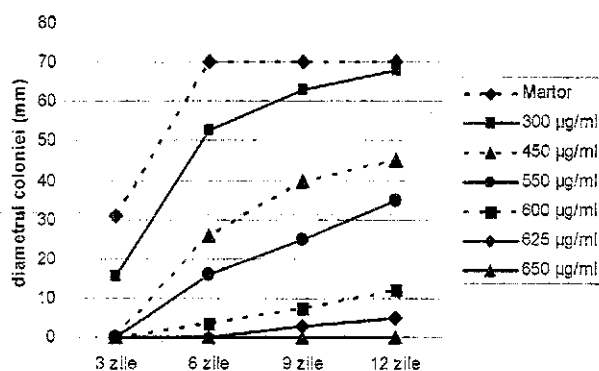


Fig. 5. Acțiunea *in vitro* a berberinei asupra germinării și creșterii ciupercii *Sclerotinia sclerotiorum* izolată de pe lălea

CONCLUZII

Extractul vegetal de *Berberis vulgaris* a manifestat efect inhibitor, asupra germinării și creșterii ciupercilor fitopatogene *Botrytis tulipae* și *Sclerotinia sclerotiorum*, proporțional cu concentrația sa în mediul nutritiv.

CMF a extractului vegetal de *Berberis vulgaris* a fost de 300 µg/ml în cazul speciei *B. tulipae* și de 500 µg/ml în cazul speciei *S. sclerotiorum*.

Extractul de *Berberis vulgaris* a avut acțiune inhibitoare mai crescută față de *S. sclerotiorum*, decât berberina.

BIBLIOGRAFIE

1. Anonymous, 1993, *Farmacopeea Română*, ed. a X-a. Ed. Medicală, București.
2. Atlas R.M., 2004, *Handbook of Microbiological Media*. New York: CRC Press, p. 466.
3. Bhandari, D.K., Nath, G., Ray, A.B., Tewari, P.V., 2000, Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark, *Pharmaceutical Biology*, 38(4): 254-257.
4. Constantinescu, O., 1974, *Metode și tehnici în micologie*, Ed. Ceres, București: 21-107.
5. Deliu, C., Tămaș, M., Ghiran, D., 1994, *Berberis* species: In vitro culture and the production of protoberine and other alkaloids, in: Bajaj YPS (ed.): *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants*, Vol. VII, Springer Verlag Berlin-Heidelberg, p.57.

6. Freile, M.Ł., Giannini, F., Pucci, G., Sturniolo, A., Rodero, L., Pucci, O., Balzarci, V., Enriz, R.D., 2003, Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*, *Fitoterapia*, 74(7-8): 702-705.
7. Kim, S.H., Lee, S.J., Lee, J.H., Sun, W.S., Kim, J.H., 2002, Antimicrobial activity of 9-O-acyl- and 9-O-alkylberberine derivatives, *Planta Medica*, 68(3): 277-281.
8. Ionescu-Stoian P, Savopol E. 1977. *Extracțe farmaceutice vegetale*. București: Ed. Medicală, p. 90.
9. Musumeci, R., Speciale, A., Constanzo, R., Annino, A., Ragusa, S., Rapisarda, A., Pappalardo, M.S., Iauk, L., 2003, *Berberis aetnensis* C. Presl. Extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(1): 48-53.
10. Părvu, M., Tămaș, M., Chindriș, E., Moiceanu, D., 1996, Acțiunea *in vitro* a extractelor totale din *Berberis vulgaris* și *Chelidonium majus* asupra unor ciuperci parazite pe plante ornamentale, *Acta Phytotherapica Romanica*, 3(1-2): 31-36.
11. Părvu, M., 1998, *In vitro* action of plant extracts on *Botrytis* spp., In: Duffy, B., Rosenberger, U., Défago, G. (eds.), 1998, *Molecular approaches in biological control*, *IOBC wprs Bulletin*, 21(9): 307-310.
12. Părvu, M., Roșca-Casian, O., Tămaș, M., 2002, "In vitro" action of some total plant extracts on the germination and growth of *Coniothyrium concentricum* fungus, *Contribuții Botanice*, 37: 197-203.
13. Părvu, M., Roșca-Casian, O., Tămaș, M., 2003, The action of some total plant extracts on the germination and growth of *Fusarium oxysporum* fungus, *Contribuții Botanice*, 38(1): 121-125.
14. Șesan TE, Crișan A. 1998, Putregaiul alb al plantelor de cultură. *Sclerotinia sclerotiorum*. Prevenire și combatere. București: Ed. Ceres, p. 30.
15. Tămaș, M., 1999, *Botanică farmaceutică*, Ed. Medicală Universitară, Cluj-Napoca, III: 44-46.