

ZENON KRZYWAŃSKI

FITOALEKSYNY

Każda roślina styka się ciągle z zarodnikami znacznej ilości różnych grzybów, także grzybów — pasożytów fakultatywnych, czy też grzybów saprofitycznych, mogących rosnąć na obumarłej tkance tej rośliny, jednakże w większości przypadków nie dochodzi do rozwoju choroby. Rośliny musiały więc wykształcić w swoim rozwoju filogenetycznym jakieś mechanizmy prowadzące do przewyciężenia szkodliwego oddziaływania wspomnianych grzybów.

Jak sądzi Cruickshank (1966), większość roślin jest wrażliwa na infekcje przez większość grzybów, lecz jest równocześnie odporna na większość chorób jakie mogłyby być wywołane przez te grzyby. To znaczy, że zarodniki znacznej liczby gatunków grzybów mogą kiełkować na wielu gatunkach roślin i powierzchniowo penetrować ich komórki epidermalne, lecz nie są one zdolne do wzrostu i rozprzestrzeniania się wewnątrz tkanek tych roślin i do wywołania choroby. Odporność na choroby pochodzenia grzybowego byłaby więc w świecie roślin wyższych zjawiskiem powszechnym, a wrażliwość zjawiskiem względnie rzadkim.

Co należy rozumieć pod określeniem — odporność na choroby — w odniesieniu do roślin? Badania ostatnich kilkunastu lat dostarczyły wystarczającej ilości danych doświadczalnych pozwalających na następującą, ogólną charakterystykę zjawiska odporności. W większości przypadków odporność nie jest zjawiskiem pasywnym, to znaczy, nie jest uwarunkowana istniejącymi w roślinie-gospodarzu przed infekcją barierami mechanicznymi, chemicznymi czy troficznymi, lecz jest zjawiskiem aktywnym. Rozpoczyna się po nastąpieniu fizycznego kontaktu między rośliną-gospodarzem a patogenem i zależy od procesów metabolicznych rośliny-gospodarza. Grzyb indukuje zmiany w metabolizmie rośliny, a niektóre z tych zmian mają charakter obronny. Ta „metaboliczna odpowiedź“ rośliny-gospodarza objawia się reakcjami odpornościowymi skierowanymi przeciwko sprawcy, co prowadzi do zniszczenia lub osłabienia pasożyta, zanim zdoła on wywołać groźną w skutkach chorobę (Allen 1959, Rubin i Arcichowskaja 1968, Tomiyama 1963, Uritani i Akazawa 1959).

Niektóre spośród licznych, patogennie indukowanych zmian metabolicznych rośliny-gospodarza, prowadzą do wytworzenia pewnych związków o charakterze obronnym. W tym artykule pragnę zwrócić uwagę na grupę związków tego typu zwanych fitoaleksynami oraz na niektóre aspekty fizjologiczne zagadnienia.

W początkach obecnego stulecia patologowie roślin, zwracając uwagę na tworzenie się przeciwciał w krwi ludzi i zwierząt w odpowiedzi na infekcję przez mikroorganizmy, a więc na istnienie odporności nabytej, zastanawiali się, czy w organizmach roślinnych może występować funkcjonalnie podobny mechanizm. Doświadczenia Müllera i Börgera (1939, 1940) miały rzucić światło na to zagadnienie. Autorzy ci inokulowali powierzchnię skrawków kłębów kilku odmian ziemniaka zawieszoną sporangiów różnych szczepów grzyba *Phytophthora infestans*. Niektóre spośród użytych odmian były w stosunku do tych szczepów odporne, inne — podatne. Po 24 godzinach dokonywano ponownej inokulacji, tym razem szczepem, w stosunku do którego wszystkie odmiany były podatne. Okazało się, że pierwotna inokulacja szczepem niewirulentnym, to jest szczepem w stosunku do którego dana odmiana była odporna, spowodowała, że inokulacja wtórna, szczepem wirulentnym, nie doprowadziła do powstania objawów chorobowych, które normalnie ten szczep wywoływał. Taki wynik doświadczenia wyraźnie wskazywał na fakt, że po inokulacji szczepem niewirulentnym rozwinął się jakiś mechanizm inhibujący wzrost grzyba w tkance ziemniaka. Wyniki te doprowadziły autorów do szeregu ogólnych wniosków, które stały się podstawą do sformułowania tzw. teorii fitoaleksynowej (Müller i Börger 1940). Najważniejsze punkty tej teorii są następujące:

1. Gdy dojdzie do kontaktu komórek rośliny-gospodarza z pasożytem grzybowym, w komórkach, reagujących nadwrażliwie, tworzy się lub jest aktywowany jakiś składnik (Prinzip), określony mianem — fitoaleksyna *, który inhibuje wzrost grzyba w tych komórkach.

2. Ta reakcja obronna jest właściwa tylko żywym komórkom.

3. Czynniki inhibujący jest substancją chemiczną, którą można uważać za produkt nekrobiozy komórek rośliny-gospodarza.

4. Fitoaleksyna nie jest specyficzna w swej toksyczności w stosunku do grzybów, jednakże poszczególne gatunki grzybów mogą się różnić wrażliwością na tę substancję.

5. Reakcja — odpowiedź rośliny podatnej i odpornej jest podobna; zasadnicza różnica tkwi w szybkości tworzenia fitoaleksyny.

6. Stan odporności nie jest dziedziczny. Stan ten rozwija się gdy grzyb dokonuje infekcji. Czułość komórek rośliny-gospodarza, która określa szybkość ich reakcji, jest specyficzna i zdeterminowana genetycznie.

* Alexein (gr.) — obronić. W terminologii medycznej, aleksyna, inaczej — dopełniacz, to ciało białkowe w surowicy krwi, które umożliwia odpowiednim przeciwciałom rozpuszczenie bakterii i innych obcych komórek w ustroju. Ponieważ fitoaleksyny są zupełnie innej natury chemicznej niż aleksyny, można tu tylko mówić o pewnym podobieństwie funkcjonalnym tych dwóch rodzajów związków.

W roku 1956 Müller scharakteryzował fitoaleksyny jako substancje antybiotyczne wytwarzane w wyniku interakcji między dwoma systemami metabolicznymi, rośliny-gospodarza i pasożyta, i które inhibują wzrost mikroorganizmów patogennych w stosunku do roślin.

Technika badań nad fitoaleksynami

Dla wykazania postinfekcyjnego tworzenia się w roślinach związków typu fitoaleksyn oraz dla stwierdzenia ich właściwości antybiotycznych w stosunku do grzybów, stosuje się różne techniki. Odpowiedni materiał roślinny, na przykład wierzchołki młodych liści pszenicy, listki bobu, hipokotyle soi lub wycinki z organów zapasowych storczyka, batata, ziemniaka czy marchwi, inokuluje się zawiesiną spor odpowiednich grzybów, a następnie wyciągi z zainokulowanych tkanek poddaje odpowiedniej procedurze chemicznej i testuje na ich aktywność biologiczną (Cruickshank 1966). Najprostszą metodą, przy pomocy której można stosunkowo łatwo wykazać tworzenie się fitoaleksyn jest metoda opracowana przez Müllera (1956). Polega ona na umieszczeniu kropeł zawiesiny spor grzyba w zagłębieniach po nasionach w łupinach dojrzewających strąków grochu lub fasoli. Po 24—48 godzinnym przebywaniu tych strąków w odpowiednich warunkach, zbiera się naniesione krople. Są to tak zwane dyfuzaty, zawierające fitoaleksynę, która przedyfundowała z rośliny. Po odwirowaniu dyfuzatów celem usunięcia spor i strzępek, przeprowadza się testy na ich właściwości fungitoksyczne. Dyfuzaty można poddawać także dalszym badaniom z zastosowaniem odpowiednich metod fizycznych i chemicznych dla określenia istoty chemicznej wytworzonej substancji obronnej. Przy zastosowaniu tej metody, izolacja surowej fitoaleksyny jest możliwa bez maceracji tkanki roślinnej i dlatego metoda powyższa ma zdecydowaną przewagę nad innymi.

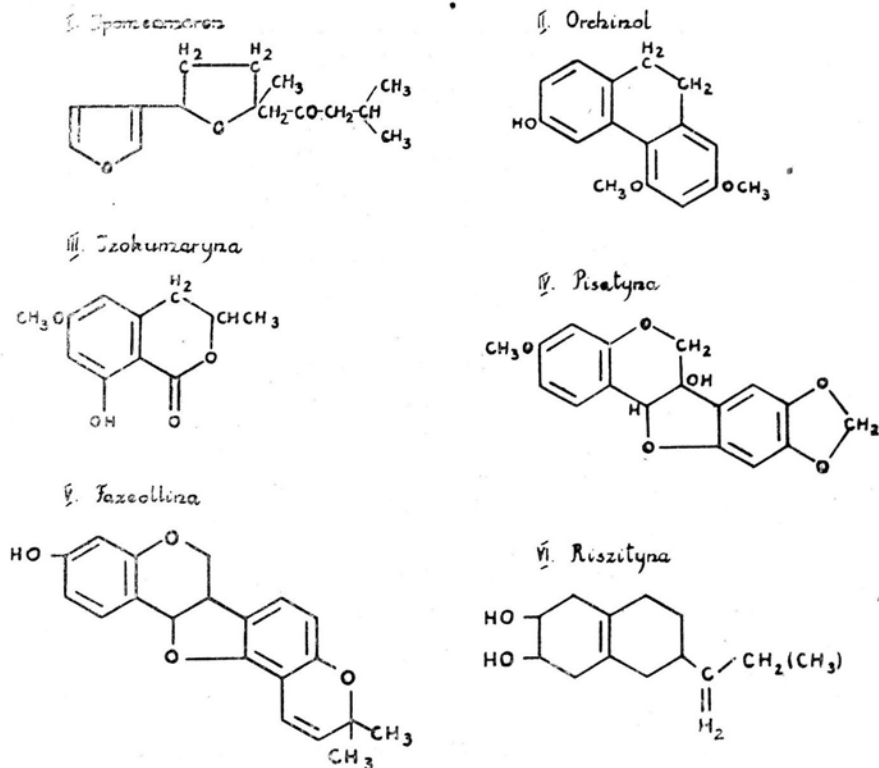
Budowa chemiczna fitoaleksyn

Powstawanie substancji o właściwościach fungitoksycznych w odpowiedzi na infekcję rośliny-gospodarza stwierdzono w wielu przypadkach (Cruickshank 1963, 1966). Można przypuszczać, że w przyrodzie liczba substancji typu fitoaleksyn jest znaczna. Jak dotąd, tylko w niektórych przypadkach wyizolowano i zidentyfikowano związki o wspomnianych właściwościach. Liczba ich jest w tej chwili raczej niewielka. Postępy badań w tej dziedzinie w ostatnich latach pozwalają przypuszczać, że liczba ta w niedalekiej przyszłości znacznie wzrośnie. Te fitoaleksyny, które zostały wyodrębnione i określone pod względem chemicznym, są związkami aromatycznymi, nieskocząsteczkowymi. Są to:

Ipomeamaron (ryc. 1. I.); $C_{15}H_{22}O_3$; c. cząstk. 230. Został wyizolowany z korzeni batata zainfekowanych grzybem *Ceratocystis fimbriata* (Cruickshank 1963). Związek ten jest seskwiterpenem (Akazawa 1960).

Orchinol (ryc. 1. II.); $C_{16}H_{16}O_3$; c. cząst. 256. Wyizolowano ten związek z korzeni storczyka zakażonych przez *Rhizoctonia repens* (Gäumann i in. 1950, Böller i in. 1957). Pod względem chemicznym jest to dwuhydrofenantren (Schellenbaum 1959).

Izokumaryna (ryc. 1. III.); $C_{11}H_{12}O_4$; c. cząst. 208. Tworzy się w korzeniach marchwi zainokulowanych grzybem *C. fimbriata* (Condon i Kuć 1960). Budowę chemiczną wyizolowanego związku określili Sondheimer (1961) oraz Condon i Kuć (1962).



Ryc. 1. I—VI. Wzory strukturalne fitoaleksyn

Pisatyna (ryc. 1. IV.); $C_{17}H_{14}O_6$; c. cząst. 314. Związek ten został wyizolowany ze strąków grochu zainokulowanych grzybem *Monilinia fructicola* (Cruickshank i Perrin 1960, 1961). Pod względem chemicznym jest to chromanokumaran (Perrin i Bottomley 1962).

Fazeollina (ryc. 1. V.); $C_{20}H_{18}O_4$; c. cząst. 332. Związek ten wyizolowano ze strąków fasoli zainokulowanych grzybem *M. fructicola*. Fazeollina, podobnie jak i pisatyna, jest chromanokumaranem (Cruickshank i Perrin 1963b, Perrin 1964).

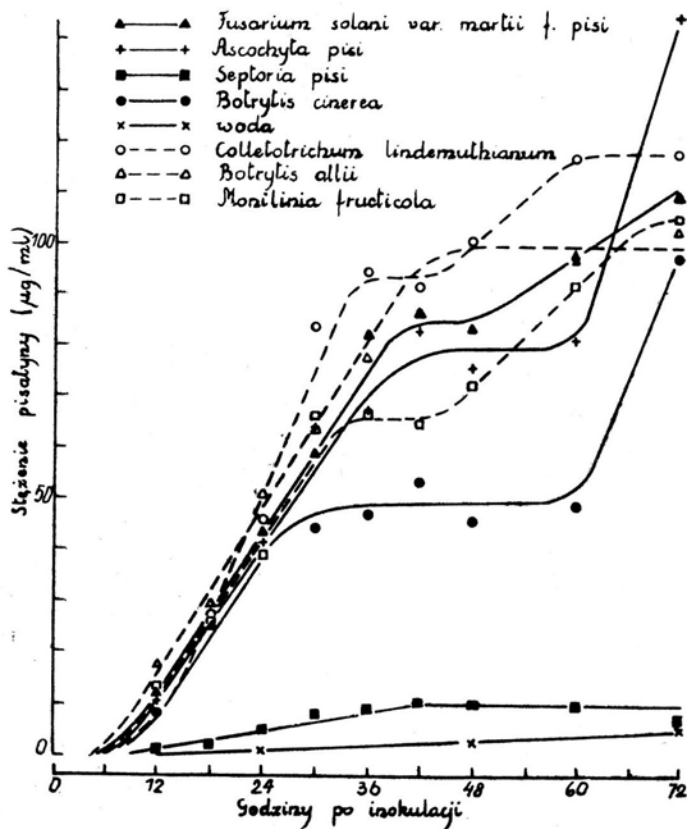
Riszityna (ryc. 1. VI.); $C_{14}H_{22}O_2$; c. cząst. 222. Stwierdzono, że związek ten powstaje w kłębach ziemniaka zainokulowanych niewyspecjalizowaną rasą *P. infestans*. Pod względem chemicznym jest to norseskwiterpen o charakterze alkoholu. (Tomiyaama i in. 1968a, b.) Riszityna, poza właściwościami antybiotycznymi w stosunku do spor *P. infestans* oraz spor innych grzybów, odznacza się także pewnymi właściwościami charakterystycznymi dla inhibitorów wzrostu roślin. W stężeniu $10^{-3}M$ związek ten prawie całkowicie hamował wywołane przez IAA wydłużanie koleoptyle owsa. Inhibicja wywołanego przez IAA wydłużania koleoptyle za pomocą abscysyny II może być cofnięta przez zaaplikowanie wysokiego stężenia GA_3 . W przypadku zastosowania riszityny, hamowanie to nie ulegało cofnięciu pod wpływem GA_3 (Tomiyaama i in. 1968a, b).

Wpływ różnych gatunków grzybów na tworzenie się fitoaleksyn

W zdrowych tkankach roślin, podobnie jak i w tkankach uszkodzonych mechanicznie, nie stwierdzono w wykrywalnych ilościach związków typu fitoaleksyn. Powstawanie fitoaleksyn może być wywołane przez szereg różnych grzybów (Cruickshank 1966). W przypadku powstawania pisatyny w tkankach strąków grochu, aktywne były różne gatunki grzybów fitopatogennych tak patogenów, jak i nie patogenów w stosunku do grochu, a także szereg grzybów saprofitycznych (Cruickshank i Perrin 1963a, 1965a). Ilość wytworzonej pisatyny była w poszczególnych przypadkach różna. Ryc. 2. przedstawia ilości wytworzonej pisatyny pod wpływem różnych gatunków grzybów, w różnym czasie od chwili inokulacji. Na marginesie warto zauważyć, że końcowe stężenie pisatyny po 72 godzinach, poza kontrolą i jednym przypadkiem (*Septoria pisi*), jest raczej wysokie i nie są widoczne różnice między gatunkami patogennymi i niepatogennymi w stosunku do grochu. Jeśli jednak porówna się te ilości z wrażliwością poszczególnych grzybów na stężenie pisatyny stwierdzone *in vitro* (Cruickshank 1962), wówczas okaże się, że grzyby niepatogenne w stosunku do grochu wywołały wytworzenie się pisatyny w stężeniu powyżej efektywnej dawki powodującej hamowanie wzrostu danego grzyba w 50% (ED_{50}). Natomiast w przypadku gatunków patogennych, ilość wytworzonej pisatyny była niższa od wartości ED_{50} dla tych gatunków.

Jak postulowali Müller i Börger (1940), podstawą różnicowania między rośliną podatną a odporną jest szybkość tworzenia fitoaleksyny. Z przytoczonych powyżej danych wynika, że pisatyna wykazuje różnicowaną toksyczność. Stąd szybkość tworzenia fitoaleksyny pod wpływem danego grzyba nie będzie czynnikiem najważniejszym, gdy porówna się grzyby patogene i niepatogene dla danej rośliny. Koncepcja podana przez wspomnianych autorów wydaje się być natomiast bardzo prawdopodobna, gdy w grę wchodzi układy: odmiany rośliny-gospodarza i szczep (rasy) grzyba.

Rozmaitość gatunków grzybów zdolnych do indukowania tworzenia charakterystycznego dla danej rośliny związku obronnego typu fitoaleksyny sugeruje, że grzyb nie odgrywa roli w determinowaniu istoty chemicznej fitoaleksyny. Grzyb jest natomiast czynnikiem indukującym biosyntezę tego związku i kontrolującym szybkość tej biosyntezy.



Ryc. 2. Porównanie szybkości tworzenia się pisatyny w wyniku inokulacji strąków grochu określonymi gatunkami grzybów: *Fusarium*, *Ascochyta*, *Septoria* — patogeny grochu, *Colletotrichum*, *Botrytis allii*, *Monilinia* — nie patogeny grochu, *Botrytis cinerea* — patogen zranieniowy (Wg. Cruickshanka i Perina, 1963a)

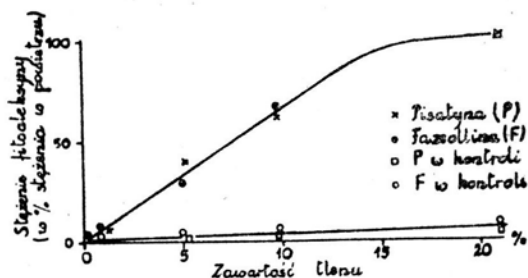
Wpływ niektórych czynników na tworzenie się fitoaleksyn

Ilość wytworzonej fitoaleksyny jest zależna od szeregu czynników takich, jak: stan fizjologiczny rośliny, temperatura w czasie i po inokulacji, warunki tlenowe, stężenie inokulum. Badano także wpływ warunków przechowywania tkanek roślinnych oraz wpływ traktowania ich przed inokulacją podwyższoną lub obniżoną temperaturą względnie narkotykami, na zdolność tworzenia fitoaleksyn. Oto niektóre uzyskane wyniki w streszczeniu.

Wiek rośliny-gospodarza. W badaniach nad powstawaniem pisatyny w strąkach grochu i fazeolliny w strąkach fasoli pod wpływem inokulacji grzybem *M. fructicola* wykazano, że istnieje wyraźna zależność pomiędzy wiekiem tkanek a ich zdolnością tworzenia fitoaleksyny. Im tkanka jest młodsza, tym większa jest jej zdolność tworzenia fitoaleksyny (Cruickshank 1963, Cruickshank i Perrin 1963a).

Warunki zewnętrzne. Cruickshank i Perrin (1963a) wykazali, że strąki grochu, po 6 dniach przechowywania w temperaturze 20°C, utraciły całkowicie zdolność tworzenia pisatyny po inokulacji *M. fructicola*. Natomiast gdy strąki były przechowywane w temperaturze 4°C, utrzymywały tę zdolność przez co najmniej 27 dni.

Jerome i Müller (1958) badali reakcję odpornościową oraz tworzenie się fitoaleksyny (fazeolliny) w strąkach fasoli poddanych działaniu podwyższonej temperatury przed inokulacją grzybem *M. fructicola*. Pod wpływem dwugodzinnego działania temperatury 44°C strąki utraciły swoją odporność, a aktywność antybiotyczna dyfuzatu wynosiła tylko 6—15% w stosunku do kontroli. Ten wpływ podwyższonej temperatury był odwracalny, jeśli strąki przechowywano następnie przez 3 dni w temperaturze 20°C. Cruickshank i Perrin (1965a), badając wpływ traktowania strąków grochu różnymi temperaturami na tworzenie się pisatyny pod wpływem *M. fructicola*, stwierdzili także podobną zależność. Działanie temperatur w granicach 2—40°C przez okres do 3 godzin nie obniżało zdolności tworzenia tego związku. Temperatury skrajne, -20°C oraz 50° i 100°C powodowały całkowitą utratę zdolności syntezy pisatyny.



Ryc. 3. Wpływ warunków tlenowych na zawartość pisatyny i fazeolliny w dyfuzatach (Wg. Cruickshanka i Perrina, 1967)

Innym warunkiem niezbędnym dla tworzenia się fitoaleksyny jest odpowiednia zawartość tlenu. Pisatyna w strąkach grochu i fazeollina w strąkach fasoli nie tworzą się po inokulacji grzybem *M. fructicola* w warunkach beztlenowych (Cruickshank i Perrin 1963a, 1967). Ryc. 3 przedstawia zależność między stężeniem pisatyny i fazeolliny w dyfuzacie a stosowaną ilością tlenu (0,1—21%). Wspomniani autorzy (1967) stwierdzili podobną zależność badając zawartość tych fitoaleksyn w strąkach. Badając równocześnie wpływ zawartości tlenu na reakcję odpornościową

strąków grochu i fasoli na *M. fructicola* autorzy ci stwierdzili wyraźną zależność między ilością wytworzonych fitoaleksyn i reakcją odpornościową a stężeniem tlenu w atmosferze. Przy zawartości tlenu równej 1% obserwowano dobry wzrost grzyba (normalnie niepatogennego dla tych gatunków), a stężenie pisatyny i fazeoliny było znacznie niższe niż wartości dla ED₅₀. Przy zawartości tlenu równym 10 i 21%, wzrost grzyba był całkowicie zahamowany, a zawartość obydwu fitoaleksyn przekraczała wartości dla ED₉₀. Wymienieni autorzy, mając na uwadze tworzenie się fitoaleksyn, zwracają uwagę na fakt, że interakcja między daną kombinacją gospodarz — pasożyt zależy między innymi od warunków tlenowych i podają sugestię, że większa wrażliwość korzeni na zgnilizny powodowane przez odpowiednie grzyby glebowe w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, może być tłumaczona mechanizmem fizjologicznym tego typu.

Stężenie inokulum. Stwierdzono wyraźną, prostą zależność między stężeniem inokulum (*M. fructicola*, *Ascochyta pisi*) a ilością pisatyny w dyfuzatach zebranych z zainokulowanych strąków grochu (Cruickshank i Perrin 1963a). Równocześnie stwierdzono, że zwiększenie stężenia inokulum poza stężenie optymalne, powoduje obniżenie ilości wytworzonej fitoaleksyny.

Indukcja biosyntezy fitoaleksyn przez czynniki niemikrobiologiczne

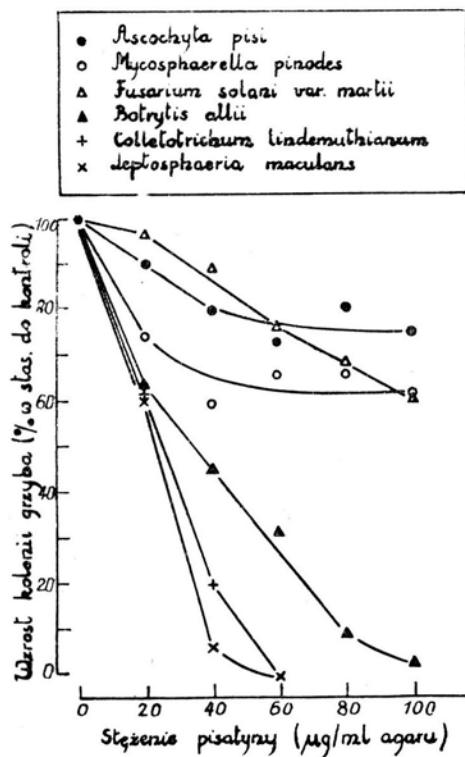
Pewne związki chemiczne mają zdolność indukowania biosyntezy fitoaleksyn. Na przykład potraktowanie korzeni batata takimi związkami, jak: chlorek rtęciowy, kwas jodooctowy, 2,4-dwunitrofenol, powodowało powstawanie ipomeamaronu (Uritani i in. 1960). Podobne wyniki uzyskano dla tworzącej się w strąkach grochu pisatyny. Najbardziej efektywne były tu jony metali ciężkich — Ag, Hg i Cu oraz inhibitory metaboliczne takie, jak jodoocetan sodu, azydek sodu, fluorek sodu i kwas tioglikolowy, a także selenian i selenin sodowy. Niektóre aminokwasy, jak DL-metionina, DL-norwalina, DL-norleucyna i L-walina, także indukowały powstanie tego związku (Cruickshank i Perrin 1963, Perrin i Cruickshank 1965). Tworzenie pisatyny było zależne od stężenia związku — induktora. Należy dodać, że właściwości antybiotyczne wytworzonej tą drogą pisatyny były takie same jak i pisatyny powstałej w odpowiedzi na infekcję grzybową. Wyniki tych doświadczeń wskazują ponadto na fakt, że fitoaleksyny są wytwarzane przez roślinę a nie przez grzyba.

Tutaj pragnę nawiązać do jednego z wniosków z dyskusji zespołu specjalistów na międzynarodowym sympozjum *Fizjologiczne i biochemiczne aspekty interakcji gospodarz — pasożyt*, odbytym w Wageningen (Proc. Intern. Symposium 1968). Wobec tego, że czynnikami indukującymi powstawanie fitoaleksyn są także czynniki abiotyczne, klasyczna definicja Müllera, jako zbyt wąska, byłaby już niewłaściwa i musiałaby być zastąpiona inną, szerszą. Jednakże taka szeroka definicja miałaby tę ujemną stronę, że nie uwzględniałaby znaczenia tworzenia fitoaleksyn jako specjalnego mechanizmu obronnego. Taka definicja musiałaby obejmować

mować każdą substancję utworzoną w roślinie wyższej jako wynik działania czynnika stressowego. Czy wówczas, fitoaleksyny należąc do tej szerokiej grupy substancji wytwarzanych w wyniku uszkodzenia fizycznego czy chemicznego, miałyby się różnić od większości substancji tej klasy jedynie tym, że są fungitoksyczne? Kwestia ta czeka jeszcze na rozwiązanie.

Aktywność biologiczna fitoaleksyn

Zgodnie z definicją Müllera (1956) fitoaleksyny są związkami o właściwościach antybiotycznych i działaniu niespecyficznym w stosunku do grzybów. Jednakże grzyby mogą wykazywać różną wrażliwość na związki tego typu.



Ryc. 4. Porównanie reakcji różnych gatunków grzybów na stężenie pisatyny w pożywce: *Ascochyta*, *Mycosphaerella*, *Fusarium* — patogeny grochu, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Leptosphaeria* — nie patogeny grochu (Wg. Cruickshanka, 1962)

Różną wrażliwość poszczególnych grzybów na dyfuzaty zebrane ze strąków fasoli zainokulowanych grzybami *M. fructicola* i *P. infestans* wykazał po raz pierwszy Müller (1958). Dalszych dowodów dostarczyły badania Gäumann'a i współprac. (1960) nad przeciwgrzybowymi właściwościami orchinolu. Cruick-

shank i Perrin (1960) wykazali różną wrażliwość na pisatynę grzybów: *A. pisi* — patogena grochu i *M. fructicola* — nie patogena grochu. Dalsze badania Cruickshanka (1962) nad wrażliwością kilkudziesięciu gatunków grzybów na pisatynę wykazały, że związek ten odznacza się selektywną toksycznością. Grzyby — patogeny grochu, były mało wrażliwe na pisatynę, natomiast grzyby niepatogenne dla tego gatunku były silnie wrażliwe. Przykładowo obrazuje to ryc. 4.

Selektywna toksyczność pisatyny odnosiła się nie tylko do poszczególnych rodzajów i gatunków, lecz także do odmian czy szczepów tego samego gatunku grzyba. Inna fitoaleksyna, riszityna, nie jest tak wąsko selektywna. Na przykład nie stwierdzono większych różnic w wielkości efektywnej dawki (ED_{50}) dla różnych ras *P. infestans* (Tomiyama i in. 1968b).

Odporność odmianowa

Odporność na daną chorobę jako zjawisko odmianowe jest szczególnie ważna dla rolnictwa. Dana odmiana uprawna może wykazywać wysoką odporność w stosunku do określonej rasy pasożyta oraz silną aktywność na inną rasę tego samego gatunku grzyba. Inna odmiana może cechować się odwrotną reakcją na wspomniane rasy.

Teoria fitoaleksynowa zrodziła się w trakcie badań nad odpornością odmianową i była pomyślana jako podstawa wyjaśnienia głównie odporności odmianowej. Jednakże większość badań nad fitoaleksynami ograniczała się początkowo do układów: roślina-gospodarz pasożyt i roślina-gospodarz + nie pasożyt.

Akazawa i Wada (1961), badając tworzenie się ipomeamaronu w bulwach batata zakażonych przez *C. fimbriata*, stwierdzili pewną zależność między zawartością tego związku a stopniem odporności badanych odmian batata. Odmiany wykazujące wyższy stopień odporności zawierały więcej ipomeamaronu.

Badania Tomiyamy i współprac. (1968a, b) nad zawartością riszityny w kłębach ziemniaka o genotypie odpornościowym R_1 , zakażanych grzybem *P. infestans*, potwierdzają również tego typu zależność. W przypadku inokulacji rasą O, to jest rasą w stosunku do której użyta odmiana była odporna, ilość riszityny wynosiła 120,00 mg na 1 kg świeżej masy kłębów. W przypadku użycia rasy I, rasy, w stosunku do której ta odmiana była podatna, stwierdzono tylko nieznaczne ilości tego związku (0,44 mg).

Klarman (1968) stosując w swych doświadczeniach dwie odmiany soi i trzy gatunki grzyba *Phytophthora* (*P. megasperma* var. *sojae*, *P. megasperma*, *P. cactorum*) stwierdził także różnicę w ilości wytworzonej fitoaleksyny w zależności od stopnia patogenności danego gatunku grzyba. Stwierdził przy tym także różną wrażliwość poszczególnych gatunków na wytworzoną w soi fitoaleksynę. Gatunki niepatogenne wykazywały wyraźnie większą wrażliwość. Została także wykazana doświadczalnie rola fitoaleksyny w odporności soi na wymienione grzyby. Częściowe usunięcie z tkanek hipokotyla soi fitoaleksyny wytworzonej na skutek

inokulacji, wyraźnie zwiększyło podatność odmiany odpornej oraz spowodowało, że gatunki normalnie niepatogenne wywoływały chorobę.

Cruickshank i Perrin (1965b) podjęli badania ilościowe nad zawartością pisatyny w szeregu odmian uprawnych grochu różniących się stopniem podatności na określony szczep *A. pisi*. Badano także zawartość pisatyny w określonej odmianie grochu inokulowanej szczepami *A. pisi* wykazującymi różny stopień patogenności. W doświadczeniach tych stwierdzono, że ilość wytworzonej pisatyny była różna u poszczególnych odmian. Zaznaczyła się wyraźnie dodatnia zależność między stopniem odporności danej odmiany a ilością wytworzonej pisatyny.

Wymienieni autorzy badali także ilość pisatyny w strąkach grochu w różnym czasie od chwili inokulacji dwoma różnymi szczepami *A. pisi* i stwierdzili, że użyta odmiana reagując odpornie, wykazywała wyraźnie więcej pisatyny w tym samym czasie niż w przypadku gdy reagowała podatnie. Tak więc rola pisatyny w odporności na *A. pisi* została powiązana z szybkością tworzenia się tego związku. Tak zresztą postulowała teoria fitoaleksynowa. Mogłaby tu również wchodzić w grę różna wrażliwość poszczególnych szczepów *A. pisi* na pisatynę. Tę ostatnią możliwość trudno jednak stwierdzić doświadczalnie, gdyż stosowanie pisatyny w doświadczeniach *in vitro* w stężeniach równych stężeniom stwierdzonym *in vivo* jest niemożliwe z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność tego związku w wodzie.

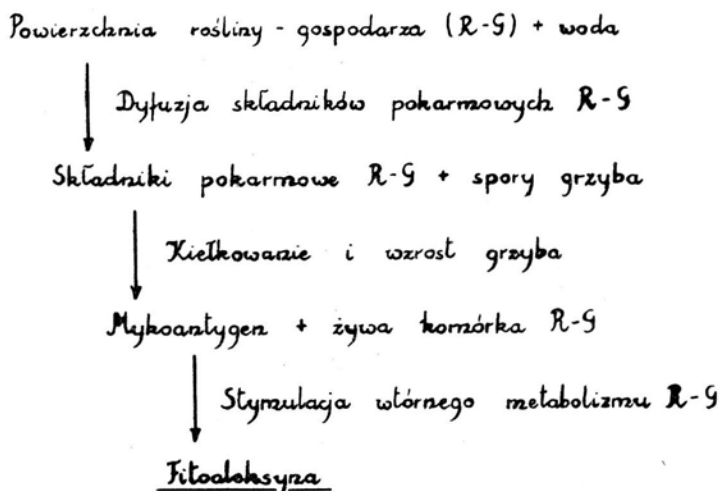
De Wit-Elshove (1968, 1969) wskazuje na inną jeszcze możliwość stwierdzając, że patogenność względnie niepatogenność poszczególnych gatunków grzybów czy też szczepów danego gatunku może także wynikać ze zdolności tych grzybów do rozkładu pisatyny. Autorka, w badaniach *in vitro*, dodawała do kultur różnych grzybów określone ilości pisatyny i oznaczała po tygodniu procent odzyskanej pisatyny. Uzyskane dane wskazują wyraźnie na zdolność całkowitego rozkładu pisatyny przez patogenne w stosunku do grochu formy grzybów. Wyniki te zostały potwierdzone w badaniach z zastosowaniem pisatyny znakowanej ^{14}C (de Wit-Elshove 1969). Oczywiście pozostaje do rozstrzygnięcia, czy procesy tego typu zachodzą również *in vivo*.

Biosynteza fitoaleksyn

Ryc. 5 ilustruje podstawowe etapy biologiczne prowadzące do biosyntezy fitoaleksyn. Schemat ten podkreśla dynamiczny charakter współdziałania na siebie rośliny-gospodarza i pasożyta i sugeruje zjawisko podwójnej indukcji. Składniki odżywcze gospodarza stymulują kiełkowanie spor grzyba, który wytwarza następnie specyficzny metabolit (mykoantygen). Z kolei ten metabolit indukuje w komórkach gospodarza biosyntezę fitoaleksyny. Szczegółowe dane dotyczące tego zagadnienia są na razie skąpe i wstępne.

Mając na uwadze układ biologiczny, w którym powstaje fitoaleksyna, to jest układ — roślina + grzyb, można by zadać dwa pytania, a mianowicie: jaka jest tutaj rola grzyba, oraz jakie enzymy czy substraty rośliny-gospodarza biorą udział w biosyntezie fitoaleksyn.

Pewne światło na rolę grzyba rzucają badania Uehary (cyt. wg. Cruickshanka 1966) oraz Cruickshanka i Perrina (1963), w których wykazano, że bezkomórkowe wyciągi z zarodników *Fusarium* sp. oraz z zarodników *M. fruticola* powodowały biosyntezę odpowiednich fitoaleksyn. Podjęto wobec tego badania mające na celu izolację i bliższą charakterystykę metabolitów grzyba stanowiących przypuszczalny pierwotny czynnik indukujący biosyntezę fitoaleksyny, a wytwarzany w czasie kiełkowania spor i we wczesnym stadium wzrostu grzyba.



Ryc. 5. Główne etapy biologiczne prowadzące do biosyntezy fitoaleksyny (Wg. Cruickshanka, 1966)

Cruickshank i Perrin (1968) donoszą, że udało się im wyizolować i częściowo scharakteryzować tego typu metabolit z grzyba *M. fruticola*. Związek ten, który ma właściwości indukowania biosyntezy fazeolliny w strąkach fasoli został nazwany— monilikolina A. Jest to polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 8 tysięcy, składający się z 65 reszt aminokwasów. Związek ten jest aktywny w bardzo małym stężeniu i nie jest ani fito- ani fungitoksyczny. Dla tego typu związków— metabolitów grzyba, Cruickshank (1966) proponuje tymczasową nazwę— mykoantygeny.

Na uwagę zasługuje fakt, że monilikolina A, w przeciwieństwie do samego grzyba lub surowego, bezkomórkowego wyciągu z grzyba, nie indukowała powstania innych fitoaleksyn, a mianowicie pisatyny w strąkach grochu i wicjatyiny w strąkach bobu. Widocznie za aktywność fitoaleksynotwórczą grzyba *M. fruticola* odpowiedzialny jest więcej niż jeden związek.

Metabolity grzyba, które indukują tworzenie się fitoaleksyn, nie są substratami w biosyntezie fitoaleksyn. Wynika to wyraźnie z badań van den Ende (1965). Autor stosując glukozę z ^{14}C , oznakował spory *S. fruticola* oraz strąki fasoli i stwierdził, że tylko w przypadku gdy tkanka roślinna była oznakowana, wytworzona fitoaleksyna zawierała ^{14}C .

Co do roli enzymów czy metabolitów rośliny-gospodarza, to cytowane wcześniej w tym artykule badania dotyczące warunków tlenowych, czy też działania skrajnych temperatur na biosyntezę fitoaleksyn oraz dane o wpływie narkotyków na tę biosyntezę (Cruickshank 1963) wskazują wyraźnie, chociaż pośrednio, że tworzenie fitoaleksyn jest właściwe tylko żywym układom, i że jest to proces o charakterze enzymatycznym. Być może, że uczestniczą tu enzymy zawierające grupy -SH (Perrin i Cruickshank 1965).

Niestety, brak zupełnie bliższych danych o istocie indukowanej przez grzyba metabolicznej dysfunkcji w tkankach rośliny, prowadzącej do powstania nowych torów metabolicznych lub do aktywowania torów już istniejących i do syntezy normalnie nie występujących, lub występujących w ilościach śladowych związków typu fitoaleksyn.

Obecnie uczeni poddają pewnej rewizji klasyczną definicję Müllera, w myśl której fitoaleksyna jest wytwarzana w wyniku infekcji przez grzyba. Ze wspomnianej definicji wynika, że roślina zdrowa, niezainfekowana, nie syntetyzuje tego typu związku. Według nowszych poglądów, na tworzenie fitoaleksyn należałoby spojrzeć raczej jako na wynik pewnego przesunięcia w już istniejącym mechanizmie biosyntetycznym rośliny, niż na tworzenie czegoś zupełnie nowego. Znaczyłoby to, że dana fitoaleksyna nie jest produktem powstałym *de novo*, lecz że infekcja rośliny-gospodarza indukuje znaczny wzrost szybkości jej tworzenia (Proc. Intern. Symposium 1968, Hadwiger 1968).

Bliższe szczegóły biosyntezy poznanych do tej chwili fitoaleksyn nie są dotąd jasne. Badania izotopowe wskazują na różnorodność biosyntezy związków tego typu (Uritani 1965, Cruickshank 1966).

Wnioski praktyczne wynikające z badań nad fitoaleksynami

Chociaż badania dotyczące problemu fitoaleksyn są badaniami teoretycznymi, poznawczymi, i dotyczą reakcji chorobowej rośliny na pasożyta, mogą one być także interesujące dla ochrony roślin pojętej jak najszerzej. Cruickshank (1966) podaje szereg uwag dotyczących tego zagadnienia.

Obecnie, selekcja na odporność na choroby opiera się na fenotypowej reakcji — odpowiedzi rośliny. Badania nad fitoaleksynami mogą dostarczyć fizjologicznej podstawy dla selekcji w tej hodowli, co, być może, pozwoli na wyselekcjonowanie osobników o wyższym stopniu odporności w obrębie populacji odpornej fenotypowo.

Fitoaleksyny są związkami o właściwościach antybiotycznych w stosunku do grzybów, a także w niektórych przypadkach w stosunku do bakterii. Rolnicze czy farmaceutyczne użytkowanie związków chemicznych pokrewnych fitoaleksynom lub ich analogów jest całkowicie nie zbadane. Ponieważ udało się już dokonać syntezy pisatyny, być może że w przyszłości będzie możliwe wytwarzanie „na miarę“ analogów pisatyny lub innych fitoaleksyn z odpowiednimi podstawnikami, co może

być z punktu widzenia rolniczego i ekonomicznego bardzo atrakcyjne w ochronie roślin.

Następny aspekt jest szczególnie interesujący wobec ogólnego kierunku zmierzającego do ograniczenia w przyszłości stosowania toksycznych środków chemicznych w ochronie roślin. Być może, że zamiast związków chemicznych zapobiegających kiełkowaniu spor na powierzchni rośliny, będzie można stosować nietoksyczne substancje w rodzaju metabolitów grzyba indukujących biosyntezę fitoaleksyn, które dostawszy się do rośliny będą stymulowały *in vivo* biosyntezę związków ochronnych typu fitoaleksyn właściwych danej roślinie.

Katedra Fizjologii Roślin Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

LITERATURA

- Akazawa T., 1960. *Chromatographic isolation of pure ipomeamarone and reinvestigation of its chemical properties*. Arch. Biochem. Biophys., 90, 82—89.
- Akazawa T., Wada K., 1961. *Analytical study of ipomeamarone and chlorogenic acid alterations in sweet potato roots infected by Ceratocystis fimbriata*. Plant Physiol., 36, 139—144.
- Allen P. J., 1959. *Physiology and biochemistry of defense*. Plant Pathology, 1, 435—467, Academic Press, New York.
- Böller A., Corrodi H., Gäumann E., Hardegger E., Kern H., Winterhalter — Wild N., 1957. *Über induzierte Abwehrstoffe bei Orchideen*. Helv. Chim. Acta, 40, 1062—1066.
- Condon P., Kuć J., 1960. *Isolation of a fungitoxic compound from carrot root tissue inoculated with Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology, 50, 267—270.
- Condon P., Kuć J., 1962. *Confirmation of the identity of a fungitoxic compound produced by carrot root tissue*. Phytopathology, 52, 182—183.
- Cruickshank I. A. M., 1962. *Studies on phytoalexins. IV. The antimicrobial spectrum of pisatin*. Aust. J. Biol. Sci., 15, 147—159.
- Cruickshank I. A. M., 1963. *Phytoalexins*. Ann. Rev. Phytopath., 1, 351—374.
- Cruickshank I. A. M., 1965. *Phytoalexins in the Leguminosae with special reference to their selective toxicity*. Biochemische Probleme der kranken Pflanze. Symposium Aschersleben (1964). Tagungsber. DAL zu Berlin 74, 313—332.
- Cruickshank I. A. M., 1966. *Defence mechanism in plants*. World. Rev. Pest Control, 5, 161—175.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1960. *Isolation of phytoalexin from Pisum sativum L.*, Nature 187, 799—800.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1961. *Studies on phytoalexins. III. The isolation, assay and general properties of a phytoalexin from Pisum sativum L.* Aust. J. Biol. Sci., 14, 336—348.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1963a. *Studies on phytoalexins. VI. Pisatin: the effect of some factors on its formation in Pisum sativum L., and the significance of pisatin in disease resistance*. Aust. J. Biol. Sci., 16, 111—128.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1963b. *Phytoalexins of the Leguminosae. Phaseollin from Phaseolus vulgaris L.* Life Sciences, 9, 680—682.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1965a. *Studies on phytoalexins. VIII. The effect of some further factors on the formation, stability and localisation of pisatin in vivo*. Aust. J. Biol. Sci., 18, 817—828.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1965b. *Studies on phytoalexins. IX. Pisatin formation by cultivars of Pisum sativum L. and several other Pisum species*. Aust. J. Biol. Sci., 18, 829—835.

- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1967. *Studies on phytoalexins. X. Effect of oxygen tension on the biosynthesis of pisatin and phaseollin*. Phytopath. Z., 60, 335—342.
- Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., 1968. *The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from Monilinia fructicola*. Life Sciences, 7, II, 449—458.
- Ende G. van den, 1965. *Neue Untersuchungen über die Phytoalexin-Bildung*. Biochemische Probleme der kranken Pflanze. Symposium Aschersleben (1964). Tagungsber. DAL zu Berlin 74. 283—312.
- Gäumann E., Braun R., Bazzigher G., 1950. *Über induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen*. Phytopath. Z., 38, 274—308.
- Gäumann E., Nüesch J., Rimpau R. H., 1960. *Weitere Untersuchungen über die chemischen Abwehrreaktionen der Orchideen*. Phytopath. Z., 38, 274—308.
- Hadwiger L. A., 1968. *Changes in plant metabolism associated with phytoalexin production*. Neth. J. Pl. Path., 74 (1968 Suppl. 1), 163—169.
- Jerome S. M. R., Müller K. O., 1958. *Studies on phytoalexins. II. Influence of temperature on resistance of Phaseolus vulgaris towards Sclerotinia fructicola with reference to phytoalexin output*. Aust. J. Biol. Sci., 11, 301—314.
- Klarman W. L., 1968. *The importance of phytoalexin in determining resistance of soybeans to three isolates of Phytophthora*. Neth. J. Pl. Path., 74 (1968 Suppl. 1), 171—175.
- Klinkowski M., 1966. *Phytoalexine: Begriff und methodische Fragen*. Forschungen und Fortschritte, 40, 321—352.
- Müller K. O., 1956. *Einige einfache Versuche zum Nachweis von Phytoalexinen*. Phytopath. Z., 27, 237—254.
- Müller K. O., 1958. *Studies on phytoalexins. I. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by Phaseolus vulgaris in response to infections with Sclerotinia fructicola and Phytophthora infestans*. Aust. J. Biol. Sci., 11, 275—300.
- Müller K. O., Börger H., 1939. *Studien über den „Mechanismus“ der Phytophthora — Resistenz der Kartoffel*. Landwirtschaftl. Jahrb. Berlin, 87, 609.
- Müller K. O., Börger H., 1940. *Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora — Resistenz der Kartoffel*. Arb. Biolog. Reichsanst. Land- u. Forstwirtschaft Berlin — Dahlem, 23, 189—231.
- Perrin D. R., 1964. *The structure of phaseollin*. Tetrahedron Letters, 1, 29—35.
- Perrin D. R., Bottomley W., 1962. *Studies on phytoalexins. V. The structure of pisatin from Pisum sativum L.* J. Am. Chem. Soc., 84, 1919—1922.
- Perrin D. R., Cruickshank I. A. M., 1965. *Studies on phytoalexins. VII. Chemical stimulation of pisatin formation in Pisum sativum L.* Aust. J. Biol. Sci., 18, 803—816.
- Proceedings Intern. Symposium at Wageningen (1967). *Physiological and biochemical aspects of host — pathogen interactions. General considerations pertaining to the panel discussion*. Neth. J. Pl. Path., 1968, 74, (1968 Suppl. 1), 177—179.
- Rubin B. A., Arcichowskaja E. W., 1968. *Biochimia i fizjologija immuniteta rastenij*. II Izd., Wyszaja Szkoła, Moskwa.
- Schellenbaum M., 1959. *Isolierung und Konstitutionsaufklärung des Orchinols*. Dissertation Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich. Cyt. za — Cruickshank, 1963.
- Sondheimer E., *Possible identity of fungistatic compounds from carrot roots*. Phytopathology, 51, 71.
- Tomiyama K., 1963. *Physiology and biochemistry of disease resistance of plants*. Ann. Rev. Phytopath., 1, 295—324.
- Tomiyama K., Sakuma T., Ishizaka N., Sato N., Katsui N., Tagasugi M., Masamune T., 1968a. *A new antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens*. Phytopathology, 58, 115—116.
- Tomiyama K., Ishizaka N., Sato N., Masamune T., Katsui N., 1968b. *„Rishitin“ a new phytoalexin-like substance. Its role in the defence reaction of potato tubers to infection*. Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury. 287—292. The Phytopath. Soc. Japan, Tokyo.

- Uritani I., 1965. *Molecular pathology in the plant field with special regard to defense action of the host.* Biochemische Probleme der kranken Pflanze. Symposium Aschersleben (1964). Tagungsber. DAL zu Berlin 74, 201—218.
- Uritani I., Akazawa T., 1959. *Alteration of the respiratory pattern in infected plants.* Plant Pathology, I, 349—390, Academic Press.
- Uritani I., Uritani M., Yamada H., 1960. *Similar metabolic alterations induced in sweet potato by poisonous chemicals and by Ceratostomella fimbriata.* Phytopathology, 50, 30—34.
- Wit-Elshove A. de, 1968. *Breakdown of pisatin by some fungi pathogenic to Pisum sativum.* Neth. J. Pl. Path., 74, 44—47.
- Wit-Elshove A. de, 1969. *The role of pisatin in the resistance of pea plants — some further experiments on the breakdown of pisatin.* Neth. J. Pl. Path., 75, 164—168.