Reakcja metaboliczna *Taxus baccata* L. na porażenie grzybem *Pestalotiopsis funerea* Desm. w zależności od warunków siedliskowych

**MONIKA KOZŁOWSKA, MAGDALENA RYBUS-ZAJĄC,
HALINA GNIAZDOWSKA-SKOCZEK**

Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu,
ul. Wołyńska 35, 60-638 Poznań

Kozłowska M., Rybus-Zajac M., Gniazdowska-Skoczek H. (Department of Plant Physiology,
August Cieszkowski University of Agriculture, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland).

Metabolic response of *Taxus baccata* L. to *Pestalotiopsis funerea* Desm. in dependence
of environmental conditions.

(Otrzymano dn. 8 czerwca 2002)

Summary

One of the reasons of yew shoot blight observed in the garden and park plantations was the infection with *Pestalotiopsis funerea* fungus. Leaves with extensive disease symptoms have been found to have metabolic disturbances induced by this pathogen. Activation of oxidative stress enzymes, i.e. catalase and peroxidase, points to the possibility of inducing defense responses. Among factors modifying the degree of plant affection under natural conditions, the level of nitric nutrition as well as light conditions may play an important role.

Key words: *Taxus baccata*, *Pestalotiopsis funerea*, disease originator, metabolism, peroxidase, catalase, β -glucosidase, nitrates.

WSTĘP

Drzewa i krzewy iglaste zajmują największą powierzchnię spośród formacji roślinnych rozprzestrzenionych na półkuli północnej. Należą do roślin o wysokiej odporności i tolerancji na niesprzyjające warunki środowiska i o dużych zdolnościach

przystosowawczych do zmieniających się warunków ekologicznych. Poza obszarami leśnymi, znaczenie tych roślin związane jest z ich wykorzystaniem w nasadzeniach ogrodowych i parkowych. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowalności, zwłaszcza modrzewia, żywotnika, jałowca cyprysika i cisa, na choroby pochodzenia biotycznego (Ł a b a n o w s k i i O r l i k o w s k i, 1997).

Taxus baccata L. cechuje się bardzo dużą tolerancją względem wymagań świetlnych, klimatycznych i glebowych (V r e ś t i a k i O s w a l d, 1994). Do patogenów najczęściej atakujących ten gatunek należą: *Diplodia taxa*, *Sphaerulina taxi* oraz *Pestalotiopsis funerea*. Na wieloletnich okazach cisów, rosnących na terenie Ogrodu Dendrologicznego Akademii Rolniczej w Poznaniu, obserwowano rozległe zmiany chorobowe liści, wskazujące na porażenie patogenicznym mikroorganizmem. Celem pracy było określenie czynnika sprawczego obserwowanych zmian chorobowych oraz przeprowadzenie wstępnych badań wskaźnikowych związanych z reakcją metaboliczną chorej rośliny, obejmujących aktywność peroksydazy, katalazy i β -glikozydazy oraz stan odżywienia azotowego, tj. poziom $N-NO_3$.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na roślinach cisa pospolitego *Taxus baccata*, rosnących w środowisku naturalnym - Ogród Dendrologiczny AR im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu. Wieloletnie okazy wysokości 5 - 6 m, z objawami w formie chlorotycznych przebarwień liści, rosły na stanowisku półcienistym (1) i na stanowisku nasłonecznionym (2). Z roślin tych, w okresie zimowym pobrano próby do identyfikacji czynnika chorobotwórczego, którą przeprowadzono w oparciu o izolację stadium doskonałego patogena grzybowego. W okresie wczesno-letnim pobrano próby do analiz biochemicznych, przygotowując naważki liści z pędów jednorocznych i dwuletnich bez objawów chorobowych oraz z pędów dwuletnich z objawami chorobowymi. Do momentu oznaczeń próby przechowywano w temperaturze $-20^{\circ}C$.

Ekstrakcja białka enzymatycznego. 200 mg naważki rozcierano w 0.1 M buforze fosforanowym o pH 7.0 zawierającym 0.5% glikol polietylenowy. Do ekstrakcji dodawano 40 mg Polyclaru AT, substancji wiążącej związki niskocząsteczkowe. Po odwirowaniu przy 10000g przez 15 minut otrzymywano supernatant, który służył do dalszych oznaczeń.

Aktywności peroksydazy oznaczano wobec syringaldazyny w oparciu o pracę I m b e r t y i in., (1985). Do 2 ml 0.1 M buforu fosforanowego o pH 6.0 dodawano 0.5 ml ekstraktu o takiej zawartości enzymu, aby wzrost absorbancji w czasie pomiaru mieścił się w granicach 0.2 - 0.5, 0.5 ml 5 mM H_2O_2 , a następnie 50 ml syringaldazyny (3.1 mg substratu rozpuszczono w 1 ml metanolu i łączono z dioksanem w stosunku 1 : 2). Aktywność enzymu wyrażano jako przyrost absorbancji, przy długości fali 530 nm, w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg tkanki.

Aktywność β -glikozydazy oznaczano w oparciu o pracę N i c h o l s a i in., (1980), poprzez pomiar barwnego p-nitrofenolu uwolnionego z 4-nitrofenylu- β -D-glukopyranozydu. Ekstrakt enzymatyczny mieszało z równą objętością roztworu

substratu (2mg /ml) i inkubowano w temperaturze 30°C. Po godzinie reakcję zatrzymywano, dodając 1.5 ml Na_2CO_3 na 1 ml mieszaniny. Powstały produkt oznaczano przy 400 nm. Aktywność enzymu wyrażano w μmol ach powstałego p-nitrofenolu (p-NP) w przeliczeniu na gram tkanki.

Aktywność katalazy oznaczano mierząc szybkość konwersji H_2O_2 do O_2 w temperaturze pokojowej za pomocą elektrody tlenowej (Oxytec RE K1-1), według procedury D e l R i o i in., (1977). Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto wytworzenie 1 μmol O_2 x min^{-1} x 10^{-2} .

Zawartości azotanów. 500 mg naważki cięto na drobne kawałki i umieszczano w 5 ml wody destylowanej. Materiał roślinny gotowano w łaźni wodnej przez 15 minut, a po schłodzeniu wirowano przy 18000g przez 30 minut. Otrzymany supernatant uzupełniano wodą do 5 ml. Zawartość azotanów oznaczano metodą C a t a l d o i in., (1975). Do 0.1 ml ekstraktu dodawano 0.4 ml 5% kwasu salicylowego w stężonym H_2SO_4 i pozostawiano na 20 minut. Z otrzymanej mieszaniny pobierano 50 μl i dodawano 0.95 ml 2 N NaOH. Próby chłodzono do temperatury pokojowej i mierzono absorbancję przy 410 nm. Wyniki wyrażano w mg NO_3^- x g tkanki.

WYNIKI

Na rycinie 1 przedstawiono fragment pędu cisa z objawami chorobowymi w formie chlorotycznych przebarwień na liściach (igłach). Takie objawy obserwowano na liściach dwuletnich i starszych. W oparciu o izolację stadium doskonałego zidentyfikowano czynnik sprawczy - patogenicznego grzyba *Pestalotiopsis funerea*.

Ryc.1. Fragment pędu *Taxus baccata*; 1- liście kontrolne jednoroczne, 2- liście kontrolne dwuletnie, 3- liście dwuletnie z objawami chorobowymi

Fig.1. The branch of *Taxus baccata*; 1- one-year-old control leaves, 2- two-year-old control leaves, 3- two-year-old leaves with disease symptoms

W liściach porażonych patogenem stwierdzono wyższą aktywność badanych enzymów w porównaniu z aktywnością w liściach pędów bez objawów chorobowych (ryc. 2).

Ryc.2. Aktywność peroksydazy, katalazy i β-glikozydazy oraz zawartość azotanów w liściach *Taxus baccata* porażonych *Pestalotiopsis funerea*; stanowisko 1- półcień; stanowisko 2 - nasłonecznione

Fig.2. Peroxidase, catalase and β-glicosidase activities and the nitrates level in *Taxus baccata* leaves attacked with *Pestalotiopsis funerea*; position 1- half-light; position 2 - full-light

Aktywność peroksydazy była wyższa 3.5-krotnie w roślinach rosnących na stanowisku półcienistym a 2.5-krotnie na nasłonecznionym. Aktywność katalazy badano tylko dla roślin na stanowisku zacienionym; poziom w liściach bez objawów chorobowych był na granicy mierzalności a wysoki w liściach porażonych. Aktywność glikozydazy była nieznacznie wyższa w liściach chorych. Jednak młode, jednoroczne igły, zwłaszcza na stanowisku półcienistym, cechowały się wyższą aktywnością tego enzymu niż liście dwuletnie.

Zawartość azotanów w igłach cisa rosnących na stanowisku półcienistym była wyższa niż roślin na stanowisku nasłonecznionym oraz wyższa w igłach dwuletnich niż jednorocznych. W liściach porażonych nieco wyższy poziom azotanów mieścił się w zakresie odchył standardowych.

DYSKUSJA

Zamieranie pędów a w następstwie wieloletnich okazów roślin iglastych jest zjawiskiem złożonym. Powodem mogą być czynniki biotyczne, zanieczyszczenia powietrza, stres radiacyjny, wodny lub termiczny. Czynnikiem sprawczym chlorotycznych plam chorobowych na liściach cisa oraz opadania liści i zamierania pędów okazał się patogeniczny grzyb *Pestalotiopsis funerea*. Patogen ten łatwo atakuje zwłaszcza rośliny uszkodzone lub rosnące w niekorzystnych warunkach siedliskowych. Roślinami żywicielskimi jest nie tylko cis ale także cyprysik, jałowiec, świerk, sosna, żywotnik i inne (Ł a b a n o w s k i i O r l i k o w s k i, 1997). Objawy chorobowe obserwowano zarówno na okazach rosnących na stanowisku nasłonecznionym jak i półcienistym. Pomimo tego, takie warunki modyfikując niektóre procesy metaboliczne mogą oddziaływać na odporność roślin jak i inwazję grzybów patogenicznych.

Niniejsza praca obejmuje wstępne badania aktywności metabolicznej porażonych roślin. Peroksydaza i katalaza są enzymami stresu oksydacyjnego, które przyczyniają się do usuwania H_2O_2 . Ponadto, peroksydaza, jako enzym kompleksowy, utlenia polifenole i inne metabolity uczestniczące w tworzeniu barier antymikrobowych (G a s p a r, 1982, K o z ł o w s k a i in., 2001). W liściach cisa z objawami chorobowymi stwierdzono wyższą aktywność enzymów, zwłaszcza katalazy, która w liściach kontrolnych była na granicy mierzalności. Uzyskane wyniki wskazywałyby na indukcję stresu oksydacyjnego, prowadzącą do generowania nadtlenu wodoru (G ö n n e r i in., 1993; B a k e r i O r l a n d i, 1995; L a m b i D i x o n, 1997). Aktywność peroksydazy była też wyższa w liściach dwuletnich, na których obserwowano chlorotyczne plamy niż na jednorocznych oraz w roślinach rosnących na stanowisku nasłonecznionym względem zacienionego. Te fakty potwierdzają wielofunkcyjność peroksydazy, zwłaszcza w odniesieniu do metabolizmu wtórnego, zależnego od fazy rozwojowej rośliny i światła (S e g e l, 1993).

Patogeny grzybowe jak i elicytory mechanizmów obronnych prowadzą do aktywacji β -D-glikozydazy. Uwolnione aglikony mogą być włączone w tworzenie barier chemicznych i strukturalnych (L i i in., 1989; D h a r m a w a r d h a n a i in.,

1995). Poinfekcyjny, choć niewielki wzrost aktywności enzymu w liściach cisa potwierdzałyby możliwość udziału glikozydazy w aktywnych reakcjach obronnych. Jednak wyższą aktywnością cechowały się liście młode, na których nie obserwowano zmian chorobowych.

W warunkach naturalnych dostępność światła jest czynnikiem modyfikującym gromadzenie azotanów, a poprzez stan odżywienia azotowego podatność roślin na czynniki stresowe. W badanych igłach cisa, podobnie jak w siewkach sosny, światło ograniczało gromadzenie azotanów (G e b a u e r i in., 1988; M a r g o l i s i in., 1988).

Podsumowując badania wstępne nad wyjaśnieniem obniżonej zdrowotności cisów w nasadzeniach ogrodowych i parkowych, stwierdzono że jednym z czynników sprawczych tego zjawiska jest patogen *Pestalotiopsis funerea*, powodujący zakłócenia w chorej roślinie. Ze względu na ważność problemu badania będą kontynuowane.

LITERATURA

- B a k e r C.J., O r l a n d i E.W., 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 299-321.
- C a t a l d o D.A., H a r o o n M., S c h r a d e r L.E., Y o u n g s V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Plant Anal. 6: 71-80.
- D e l R i o L.A., G ó m e z O r t e g a M., L e a l L ó p e z A., L ó p e z G e o g é J., 1977. A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. Analytical Biochem. 80: 409-415.
- D h a r m a w a r d h a n a D.P., E l l i s B.E., C a r l s o n J.E., 1995. A beta-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. Plant Physiol. 107: 331-339.
- G a s p a r T., P e n e l C., T h o r p e T., G r e p p i n H., 1982. Peroxidases 1970-1980. A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. Univ. Geneva, Switzerland.
- G e b a u e r G., R e h d e r H., W o l l e n w e b e r B., 1988. Nitrate, nitrate reduction and organic nitrogen in plants from different ecological and taxonomic group of Central Europe. Oecologia (Berlin) 75: 371-385.
- G ö n n e r M.v., S c h l ö s s e r E., N e u b a c h e r H., 1993. Evidence from electron-spin resonance for the formation of free radicals during infection of *Avena sativa* by *Drechslera* spp. Physiol. Mol. Plant Path. 42: 405-412.
- I m b e r t y A., G o l d b e r g R., C a t e s s o n A.M., 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. Planta, 164: 221-226.
- K o z ł o w s k a M., F r y d e r K., W o l k o B., 2001. Peroxidase involvement in the defense response of red raspberry to *Didymella applanata* (Niessl / Sacc.). Acta Physiol. Plant. 23: 303-310.
- L a m b C., D i x o n R.A., 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 251-275.
- L i Z.C., M c C l u r e J.W., H a g e r m a n A.E., 1989. Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase, b-D-glucosidase, malate dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) primary leaves. Plant Physiol. 90: 185-190.

- Łobanowski G., Orlikowski L., 1997. Ochrona roślin iglastych i wrzosowatych. Wyd. Plantpress, Kraków.
- Margolis H.A., Vézina L.P., Ouimet R., 1988. Relation of light and nitrogen source to growth, nitrate reductase and glutamine synthetase activity of jack pine seedlings. *Physiol. Plant.* 72: 790-795.
- Nichols E.J., Beckman J.M., Hadwiger L.A., 1980. Glycosidic enzyme activity in pea tissues and pea-*Fusarium solani* interaction. *Plant Physiol.* 66: 199-204.
- Siegel B.Z., 1993. Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regulation.* 12: 303-312.
- Vreštiak P., Oswald Z., 1994. Leksykon iglaków. Wyd. Multico, Warszawa.

Reakcja metaboliczna *Taxus baccata* L. na porażenie grzybem *Pestalotiopsis funerea* Desm. w zależności od warunków siedliskowych

Streszczenie

Jedną z przyczyn zamierania pędów cisa, obserwowanego w nasadzeniach ogrodowych i parkowych jest porażenie grzybem *Pestalotiopsis funerea*. W liściach o rozległych zmianach chorobowych stwierdzono zakłócenia metaboliczne wywołane tym patogenem. Aktywacja enzymów stresu oksydacyjnego, tj. katalazy i peroksydazy wskazuje na możliwość indukowania reakcji obronnych. Spośród czynników modyfikujących stopień porażenia roślin w warunkach naturalnych ważną rolę mogą ogrywać warunki świetlne i stopień odżywienia azotowego.