Powstawanie wolnych rodników w rozwoju szarej pleśni na liściach poinsecji

BEATA KUŁEK¹, JOLANTA FLORYSZAK-WIECZOREK¹,
ZBIGNIEW GÓRSKI²

¹ Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, ul. Wołyńska 35,
60-637 Poznań

² Zakład Radio- i Fotochemii, Politechnika Poznańska, ul. Piotrowo 3, 60-965 Poznań
Kułek B., Floryszak-Wieczorek J., Górski Z. (¹ Department of Plant Physiology Agricultural University
of August Cieszkowski, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland; ² Department of Radio- &
Photochemistry, Poznań University of Technology, Piotrowo 3, 60-965 Poznań, Poland). The
generation of free radicals in the development of grey mould on poinsettia leaves.

(Otrzymano dn. 16 czerwca 2002)

Summary

Participation of superoxide anion and hydroxyl radical as well as lipoxygenase (LOX) activity and chemiluminescence in the development of grey mould on poinsettia leaves of the cvs.: Coco White - moderately resistant and Malibu Red - susceptible to *Botryotinia fuckeliana* (*B. cinerea*) were investigated. In both poinsettia cultivars, the level of superoxide anion radical increased with the disease development. On later dates following inoculation, the content of $O_2^{\bullet-}$ in the diseased leaf areas of the susceptible cultivar was 2 - fold larger than in grey mould symptom areas of the moderately resistant cultivar. The postinfection generation of a strongly reactive hydroxyl radical was found in the cultivar susceptible to the pathogen. The level of $\bullet-OH$ in the last hours after inoculation was 10 fold higher in grey mould spots than in healthy senescing leaves of that cultivar. The activity of LOX exhibited opposite tendencies of changes in the both genotypes examined after the infection. In the first hours after inoculation, the enzyme activity was Low, whereas after 3rd day it significantly increased in diseased leaf areas and in their surroundings. However, in the moderately resistant cultivar the activity of lipoxygenase throughout the first 3 days of the disease activity was relatively high and then decreased. Poinsettia leaves infected with *B. cinerea* emitted chemiluminescence. Kinetics and the intensity of ultraweak

chemiluminescence depended on the cultivars of poinsettia and on the degree of the disease development. The postinfection increase of chemiluminescence was particularly visible in the zone surrounding diseased areas in the susceptible cultivar.

Key words: active oxygen species, ultra weak chemiluminescence, grey mould, imaging, lipoxxygenase, poinsettia

WSTĘP

Przemiany wolnych rodników odgrywają istotną rolę w interakcji patogen - roślina. Na temat ich udziału we wczesnych reakcjach obronnych napisano wiele dobrze udokumentowanych prac przeglądowych, m.in.: Sutherland (1991), Mehdy (1994), Low i Merida (1996), Wojtaszek (1997) oraz Dat i in. (2000).

Generowanie reaktywnych form tlenu może być zarówno elementem strategii ofensywnej patogena, jak i systemu obronnego rośliny. Wolne rodniki uruchamiane przez rośliny zwłaszcza we wczesnych odpowiedziach obronnych mogą toksycznie oddziaływać na mikroorganizm patogeniczny (Elad, 1992; Peng i Kuć, 1992; Małolepsza i Urbane, 2000), utrudniać jego wnikanie do tkanki poprzez inicjowanie uszczelniania (Brisson i in., 1994; Brady i Fry, 1997) lub lignifikację ścian komórkowych (Nicholson, 1992; Boudet, 2000), bądź skutecznie aktywizować dalsze reakcje obronne zaatakowanej rośliny (Apostol i in., 1989; Hammond-Kosach i Jonem, 1996).

Wzmózone wytwarzanie reaktywnych form tlenu w późniejszych etapach rozwoju choroby, nie skoordynowane ze skutecznym systemem ich zmiatania, może pogłębiać zmiany destrukcyjne, co ułatwia rozprzestrzenianie się patogena i tym samym sprzyja rozwojowi choroby (Elad i Evensen, 1995; Tiedemann, 1997).

W prezentowanej pracy zasadniczym przedmiotem zainteresowania było określenie udziału reaktywnych form tlenu, tj.: anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylowego, lipoksygenazy, dostarczającej nadtlenu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w różnych etapach rozwoju szarej pleśni na liściach poinsejji dwóch genotypów różniących się poD a tnością na szarą pleśń powodowaną przez *Botryotinia fuckeliana*, a właściwie jego anamorfę *Botrytis cinerea*. Śledząc poinfekcyjne zmiany, zarówno w miejscach znekrotyzowanych, jak i w okolicach tych miejsc posłużono się bezinwazyjną techniką pomiaru chemiluminescencji, której poziom emisji miał bezpośredni związek z natężeniem przemian wolnorodnikowych w tkance roślinnej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Doświadczenia wykonywano na dwóch odmianach wilczomlecza nadobnego (*Euphorbia pulcherrima* Willd.), zwanego poinsecją: 'Coco White' - średnio odpornej i 'Malibu Red' - podatnej na szarą pleśń. Rośliny rosły w pokoju hodowlanym o stałej temperaturze powietrza $23 \pm 2^\circ\text{C}$ przy intensywności światła $120 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ z 12-godzinnym fotoperiodem. Analizowano rośliny będące w fazie wegetatywnej, a posiadające około 10 liści. Rośliny rosły w doniczkach wypełnionych mieszanką korowo-torflową i podłożem kwiatowo-warzywnym wymieszanych w stosunku objętościowym 3:2, nawożono je raz w tygodniu nawozem wieloskładnikowym Peters Professional (Scotts).

Hodowla grzyba

Izolat *Botrytis cinerea* Pers. (anamorfa grzyba *Botryotinia fuckeliana* [de Bary] Whetzel) uzyskany z pelargonii otrzymano z Banku Patogenów Roślin, Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu. Hodowano go na zestalonej pożywce ziemniaczano-agarowej (PDA) z dodatkiem 2% glukozy, sporządzonej z: 200 g ziemniaków, 20 g glukozy i 20 g agaru na 1 litr wody, o pH 6,3. Co miesiąc grzybnię przeszczepiano na świeżą pożywkę i trzymano w ciemności w temperaturze $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Zawiesinę zarodników sporządzano z trzytygodniowej kultury grzyba w roztworze 0,1 M glukozy i 0,05 M KH_2PO_4 . Uzyskaną zawiesinę zarodników *B. cinerea* filtrowano przez sterylne sito, a stężenie zarodników konidialnych oszacowano stosując komorę Bürkera. Do doświadczeń stosowano stężenie $7,5 \cdot 10^5$ zarodników grzyba na ml 0,1 M glukozy i 0,05 M KH_2PO_4 .

Inokulacja liści

Odcięte z roślin liście obu odmian poinsecji przemywano wodą destylowaną i osuszano. Następnie blaszki liściowe umieszczano w kuwetach na zestalonym agarze (4 g/l) o pH 6,3, z dodatkiem 0,25 g siarczanu streptomycyny. Odcięte liście inokulowano punktowo, nanosząc na spodnią stronę blaszki liściowej po 6 kropli (40 ml) zawiesiny zarodników *B. cinerea* o stężeniu $7,5 \cdot 10^5$ na ml 0,1 M glukozy i 0,05 M KH_2PO_4 . Liście kontrolne traktowano 0,1 M glukozą i 0,05 M KH_2PO_4 . Liście potraktowane zawiesiną zarodników *B. cinerea* umieszczono w kuwetach w fitotronie w temperaturze $20 \pm 2^\circ\text{C}$ przy wilgotności względnej powietrza ok. 95%. Po 24 godzinach miejsca naniesienia kropli na liściach inokulowanych i kontrolnych osuszano bibułą.

Oznaczanie anionorodnika ponadtlenkowego

Zdolność liści poinsecji do wytwarzania rodników ponadtlenkowych badano *in vivo*, posługując się metodą opisaną przez D o k e'a (1983). Detekcja O_2^- polegała na redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT). Z zakażonych liści poinsecji wycinano korkoborem po 5 krążków o średnicy 1 cm ze znekrotyzowanych miejsc liści oraz po 5 krążków z okolic tych plam. Z liści roślin kontrolnych krążki wycinano w miejscach

naniesienia kropli glukozy i z okolic tych miejsc. Następnie krążki te zanurzono w mieszaninie inkubacyjnej, zawierającej 0,05 M bufor fosforanowo-potasowy o pH 7,8; 0,05 % NBT, 0,1 mM EDTA, 10 μ M NADPH oraz 10 mM NaN_3 . Próba odniesienia zawierała samą mieszaninę inkubacyjną bez krążków. Krążki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie z mieszaniny inkubacyjnej pobierano po 2 ml wyciągu i ogrzewano na łaźni wodnej o temperaturze 85 °C przez 15 minut. Po natychmiastowym schłodzeniu mierzono absorbancję roztworów przy długości fali $\lambda = 580$ nm. Poziom anionorodników ponadtlenkowych wyrażono przyrostem absorbancji na 5 krążków na 1 godzinę.

Oznaczanie rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$)

Poziom rodnika hydroksylowego oznaczano według metody opisanej przez T i e d e m a n n a (1997), z pewnymi modyfikacjami. Obecny w próbce $\cdot\text{OH}$ powoduje degradację deoksyrybozy, znajdującej się w mieszaninie inkubacyjnej. Związek powstający w wyniku degradacji deoksyrybozy reaguje z kwasem tiobarbiturowym, dając produkt o różowym zabarwieniu. Metoda ta polega na kolorymetrycznym pomiarze zawartości tego barwnego produktu. Za pomocą korkoboru wycinano z liści poinsekcji po 3 krążki o średnicy 1 cm z plam chorobowych oraz z okolic plam. Krążki zanurzono w 0,75 ml 1mM deoksyrybozy i inkubowano je w ciemności na wytrząsarce w czasie 1 godziny. Kontrolę stanowiła sama mieszanina inkubacyjna bez krążków. Następnie pobrano 0,5 ml mieszaniny inkubacyjnej z każdej kombinacji i dodano do niej 0,5 ml 1 % kwasu tiobarbiturowego w 0,05 M NaOH i 0,5 ml 2,8 % kwasu tróchlorooctowego i natychmiast wstawiano do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut. Potem próbki schładzano w lodzie w czasie 10 minut i mierzono absorbancję przy $\lambda = 540$ nm. Wyniki przedstawiono w jednostkach: $A_{540} \cdot 3 \text{ krążki}^{-1} \cdot \text{godz.}^{-1}$.

Oznaczanie aktywności lipoksygenazy (LOX)

Aktywność LOX oznaczano metodą S u r r e y'a (1964) z pewnymi modyfikacjami. Do oznaczeń pobierano krążki o średnicy 1,5 cm z miejsc objętych objawami choroby i pierścienie o grubości radialnej od 1,5 do 2 cm z okolic tych plam w kolejnych godzinach po inokulacji *B. cinerea* oraz krążki z liści kontrolnych. Enzym ekstrahowano w 2 ml 0,1 M buforu fosforanowo-potasowego o pH 7,8. Do oznaczania LOX pobierano 2,95 ml 0,1 M buforu boranowego o pH 7,6, 25 ml substratu (zawierającego 0,1 M bufor boranowy o pH 10, 100 ml Tween 20 oraz 100 ml kwasu linolenowego) i 25 ml ekstraktu. Reakcję przeprowadzano w temperaturze 25 °C. Próba odniesienia zawierała ekstrakt, do którego zamiast substratu dodano 25 ml buforu fosforanowo-potasowego o pH 7,6. Przyrost absorbancji mierzono przy długości fali 234 nm. Wynik wyrażono w jednostkach aktywności (jednostka = unit). 1 jednostka to przyrost absorbancji o 0,001 na mg świeżej masy na minutę. Każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach.

Detekcja chemiluminescencji

Rejestrowanie fotografii i obrazów chemiluminescencyjnych przeprowadzono za pomocą kamery CCD 'Night Owl' Molecular Light Imager LB 981 firmy EG & G Berthold. Do analizy uzyskanych obrazów służył program WinLight. Kamera 'Night Owl' jest wyposażona w wolno skanującą oświetlaną od tyłu matrycę światłoczułą CCD, czułą na promieniowanie świetlne w zakresie 200-1100 nm, o rozdzielczości 512 x 512 punktów. Uzyskiwany obraz powstaje przez kumulację ładunku powstałego na skutek oddziaływania fotonów z materiałem matrycy. Wykorzystywany tu sposób powstawania obrazu nosi nazwę obrazowania techniką zliczania pojedynczych fotonów i pozwala rejestrować emisję o bardzo małym natężeniu (szczegółowe metodyczne Sławińska i in., 1998).

Badano intensywność emisji ultrasłabego świecenia na odciętych liściach poinsejji, odmiany podatnej - 'Malibu Red' i średnio odpornej - 'Coco White', przez 7 dni rozwoju szarej pleśni. W kolejnych dniach po inokulacji, analizowano po trzy liście, zakażone w sześciu miejscach zawieszoną zarodników *B. cinerea*. Kontrolę stanowiły liście zdrowe, poddane procesowi starzenia, na które naniesiono w analogiczny sposób krople medium bez zawiesiny zarodników.

WYNIKI

Poinfekcyjne zmiany w poziomie anionorodnika ponadtlenkowego w liściach dwóch analizowanych odmian poinsejji przedstawiono na ryc. 1 A i B.

B

Ryc. 1. Wpływ szarej pleśni na poziom anionorodnika ponadtlenkowego w liściach poinseccji odmiany 'Malibu Red' (A) - podatnej i 'Coco White' (B) - średnio odpornej na *Botrytis cinerea* w kolejnych terminach po inokulacji. Każda wartość przedstawia średnią $\pm$ SD z trzech powtórzeń. * Znaczące różnice między liśćmi kontrolnymi, a liśćmi inokulowanymi wg wielokrotnego testu Duncana ($P = 0,05$).

Fig. 1. The effect of grey mold on the level of superoxide anion radical in poinsettia leaves of the cvs. Malibu Red (A) - susceptible and Coco White (B) - moderately resistant to *Botrytis cinerea* on successive dates following inoculation. Each value represents the mean $\pm$ SD of three replicates. * Significant difference between control and inoculated leaves according to Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

Generowanie O_2^- w krążkach z liści pobranych z miejsc objętych objawami choroby systematycznie wzrastało wraz z rozwojem choroby u 'Malibu Red' - podatnej odmiany poinseccji (ryc. 1 A). W ostatnim dniu rozwoju szarej pleśni poziom O_2^- w tych krążkach był ponad 8-krotnie wyższy w porównaniu do poziomu wyjściowego (godzina 0 po inokulacji), a 3-krotnie wyższy w porównaniu do starzejących się liści kontrolnych. W okolicach plam chorobowych zaobserwowano nieznaczny wzrost O_2^- aż do trzeciej doby po inokulacji, następnie zawartość anionorodnika ponadtlenkowego spadała w miarę postępującej choroby i w ostatnim dniu była ok. 4-krotnie niższa niż w plamach chorobowych. Mimo to poziom O_2^- w okolicach plam w ostatnim analizowanym dniu rozwoju szarej pleśni był ok. 2 razy wyższy niż w początkowej godzinie po inokulacji. Istotny wzrost (ponad 3-krotny) zawartości O_2^- nastąpił w miarę starzenia się liści odmiany podatnej.

U średnio odpornej odmiany poinseccji ('Coco White') zaobserwowano w miejscu naniesienia zarodników grzyba na liściach, dwie fazy generowania O_2^- (ryc. 1 B), wczesną (pierwsza doba po inokulacji) o mniejszym natężeniu oraz fazę

późną, wzmożonego generowania $O_2\cdot^-$. Zawartość anionorodnika ponadtlenkowego w ostatnim dniu po inokulacji w porównaniu do początkowego okresu rozwoju choroby, była wyższa w miejscach plam chorobowych ok. 7-krotnie, a w okolicach plam - ponad 3,5-krotnie. Ilość $O_2\cdot^-$ w starzejących się liściach kontrolnych wzrastała w miarę upływu czasu i w ostatnim analizowanym dniu była ok. 4-krotnie wyższa niż w liściach świeżo ściętych.

Wpływ szarej pleśni na poziom rodnika hydroksylowego w liściach obu genotypów poinsekcji w kolejnych godzinach po inokulacji przedstawiono na ryc. 2 A i B. Poziom $\cdot OH$ w podatnej odmianie poinsekcji wyraźnie wzrastał w liściach chorych, w miarę upływu czasu (ryc. 2 A). Maksymalną ilość $\cdot OH$ odnotowano w miejscach objętych plamami chorobowymi w ostatnim dniu rozwoju szarej pleśni, kiedy poziom rodnika hydroksylowego wzrósł 35-krotnie w porównaniu do liści świeżo inokulowanych zarodnikami grzyba, a ponad 10-krotnie w porównaniu do starzejących się liści kontrolnych. W okolicach plam poziom $\cdot OH$ był bardzo niski i podlegał nieznacznym zmianom w czasie, zarówno w liściach kontrolnych, jak i inokulowanych.

Odmiana średnio odporna w kolejnych terminach po inokulacji wykazywała ogólnie niski i względnie stabilny poziom wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego (ryc. 2 B). Jedyne wzrost (3,5-krotny) stwierdzono w 168 godzinie w miejscach plam chorobowych, co mogło być spowodowane sporadycznym rozwojem szarej pleśni u 'Coco White'.

A

Ryc. 2. Wpływ szarej pleśni na poziom rodnika hydroksylowego w liściach poinseccji odmiany 'Malibu Red' (A) - podatnej i 'Coco White' (B) - średnio odpornej na *Botrytis cinerea* w kolejnych terminach po inokulacji. Każda wartość przedstawia średnią $\pm$ SD z trzech powtórzeń. * Znaczące różnice między liśćmi kontrolnymi, a liśćmi inokulowanymi wg wielokrotnego testu Duncana ($P = 0,05$).

Fig. 2. The effect of grey mould on the level of hydroxyl radical in poinsettia leaves of the cvs.: Malibu Red (A) - susceptible and Coco White (B) - moderately resistant *Botrytis cinerea* on successive dates following inoculation. Each value represents the mean $\pm$ SD of three replicates. * Significant difference between control and inoculated leaves according to Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

Patogen stymulował aktywność lipoksygenazy (LOX), chociaż tendencje zmian w aktywności enzymu były odmienne u obu genotypów, w różnych terminach po inokulacji (ryc. 3 A i B).

W liściach podatnej odmiany w początkowych godzinach po inokulacji aktywność lipoksygenazy była relatywnie niska, dopiero po 3. dobie rozwoju choroby nastąpił 2-krotny wzrost aktywności enzymu, zarówno w plamach, jak i w okolicach plam chorobowych. Jednak nasilające się zmiany chorobowe wpłynęły na spadek aktywności LOX w plamach, w ostatnim analizowanym terminie po inokulacji. W tym samym czasie (7. dzień) strefy otaczające plamy szarej pleśni wykazywały maksimum stymulacji enzymu ok. 250 % wzrost w porównaniu do pozostałych kombinacji doświadczalnych. Nie zakażone liście poddane procesowi starzenia wykazywały nieznaczne wahania w aktywności lipoksygenazy.

Ryc. 3. Wpływ szarej pleśni na aktywność lipoksygenazy w liściach poinsecji odmiany 'Malibu Red' (A) - podatnej i 'Coco White' - (B) - średnio odpornej na *Botrytis cinerea* w kolejnych terminach po inokulacji. Każda wartość przedstawia średnią $\pm$ SD z trzech powtórzeń. * Znaczące różnice między liśćmi kontrolnymi, a liśćmi inokulowanym wielokrotnego testu Duncana ($P = 0,05$). Trendy w miejscach plam chorobowych (—) i także w ich okolicach (---).

Fig. 3. The effect of grey mould on lipoxigenase activity in poinsettia leaves of the cvs.: Malibu Red (A) - susceptible and Coco White - (B) - moderately resistant to *Botrytis cinerea* on successive dates following inoculation. Each value represents the mean $\pm$ SD of three replicates. * Significant difference between control and inoculated leaves according to Duncan's multiple range test ($P = 0.05$). Trends in disease spots (—) and also in their surroundings (---).

U średnio odpornej odmiany poinsecji aktywność LOX przez pierwsze 3 dni po inokulacji była istotnie wyższa w porównaniu do odmiany podatnej (ryc. 3 B), zwłaszcza w miejscu naniesienia zarodników *B. cinerea*. W dalszych terminach aktywność enzymu wykazywała jednak wyraźną tendencję spadkową.

Obrazy chemiluminescencji, uzyskane techniką zliczania pojedynczych fotonów zamieszczono na ryc. 4 A i B. Analizując całą bibliotekę obrazów pod względem zmian natężenia świecących plam uzyskano informacje o dynamice zmian metabolizmu w czasie patogenazy w liściach obu genotypów. Emisja ultraślabego świecenia była szczególnie widoczna u odmiany podatnej w kolejnych dniach rozwoju choroby. Na ryc. 4 A zamieszczono obok fotografii obrazy chemiluminescencji obserwowane w dniu inokulacji (czas 0), oraz w 3. i 6. dobie rozwoju szarej pleśni u tej odmiany. Wzrost chemiluminescencji widoczny był w postaci świecącej otoczki, którą obserwowano w tkance okalającej miejsca naniesienia zarodników grzyba.

'Malibu Red'

A

Fotografia

Chemiluminescencja

Dni po inokulacji
Days after inoculation

Ryc. 4. Wpływ szarej pleśni na chemiluminescencję liści poinseccji odmiany podatnej - 'Malibu Red' w 0, 3 i 6 dniu po inokulacji (A); oraz natężenie chemiluminescencji zależne od odmiany poinseccji (B).

Fig. 4. The effect of grey mould on chemiluminescence of poinsettia leaves of the cv. Malibu Red - susceptible, on days 0, 3 and 6 after inoculation (A); and intensity of chemiluminescence depended on the cultivars of poinsettia (B).

Natężenie ultrasłabego świecenia liści, mierzone w impulsach na sekundę (ryc. 4 B) w strefie określanej jako 'plama', wzrastało w kolejnych terminach po inokulacji jedynie w odmianie podatnej. W ciągu 6. dni odnotowano prawie 4-krotny wzrost ultrasłabego świecenia. W odmianie odpornej w miejscu naniesienia grzyba (plama), nie obserwowano istotnych zmian w intensywności chemiluminescencji w czasie. Na uwagę zasługuje stwierdzony u tej odmiany, w pierwszej dobie po inokulacji, nieznaczny wzrost świecenia rejestrowany z całej powierzchni blaszki liściowej (dane nie prezentowane).

DYSKUSJA

Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują na odmienny udział przemian wolnorodnikowych w odpowiedziach metabolicznych dwóch badanych genotypów poinseccji na zakażenie zarodnikami *B. cinerea*. W odmianie podatnej począwszy od 2. doby po inokulacji, w miejscu naniesienia zarodników grzyba stwierdzono znaczną stymulację wytwarzania O_2^- , towarzyszącą rozwojowi choroby. W odmianie odpornej zaobserwowano wczesną fazę nieznacznie podwyższonego poziomu anionorodnika

ponadtlenkowego i ponowny istotny wzrost stężenia $O_2^{\bullet-}$, który nastąpił dopiero po 3 dobie w miejscu naniesienia grzyba. Ogólnie jednak stężenie $O_2^{\bullet-}$ w liściach tej odmiany w czasie patogenezy było 2-krotnie niższe niż w odmianie podatnej.

Wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, zwłaszcza we wczesnej fazie po inokulacji, stwierdzono w odpowiedzi na infekcję różnymi mikroorganizmami patogenicznymi (W o j t a s z e k, 1997). Podczas rozwoju szarej pleśni generowanie wolnych rodników obserwowano na liściach fasoli zakażonej przez *Botrytis cinerea* i *Botrytis fabae* (U r b a n e k i in., 1996) oraz na liściach pomidora o zróżnicowanej podatności na *B. cinerea* (G a j e w s k a i in., 1998).

Zazwyczaj autorzy publikowanych prac odnoszą wzmożone wydzielanie reaktywnych form tlenu do odpowiedzi obronnych tkanki gospodarza podczas, gdy E d l i c h i in. (1989) oraz T i e d e m a n n (1997) akcentują udział wolnych rodników w strategii ofensywnej *B. cinerea* i wiążą ich metabolizm z patogenicznością grzyba.

Rejestrowana przez wielu badaczy nadprodukcja potencjału redukcyjnego, często poparta badaniami cytochemicznymi, lokalizowana jest w strefie bezpośredniego kontaktu patogena z tkanką rośliny gospodarza, czyli w miejscu zakażenia (H ü c k e l h o v e n i K o g e l, 1998).

Stwierdzoną przez nas, u odmiany podatnej, stymulację $O_2^{\bullet-}$, której towarzyszyło bardzo silne wydzielanie rodnika $^{\bullet}OH$, również odnotowano tylko w plamach chorobowych w ostatnich dniach rozwoju szarej pleśni. Drastyczny wzrost silnie reaktywnego rodnika hydroksylowego skorelowany z postępującymi zmianami nekrotycznymi u tego genotypu jest z pewnością odzwierciedleniem zmian degradacyjnych z udziałem tego wysoce reaktywnego rodnika. Jako silny utleniacz aktywuje proces peroksydacji lipidów, co ułatwia lipoksygenazie dalsze utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w kierunku nadtlenkowych pochodnych. Na potwierdzenie, w tym samym okresie po inokulacji u odmiany podatnej, odnotowano silną indukcję aktywności LOX, zarówno w plamach, jak i w tkance otaczającej plamy szarej pleśni.

Wzrost aktywności lipoksygenazy często skorelowany jest z produkcją etylenu w porażonej lub zranionej tkance (I e v i n s h, 1992; K e v a n i in., 1993). *Botrytis cinerea* stymuluje wytwarzanie etylenu w roślinach, a efektywność tego procesu jest ściśle związana ze stopniem rozwoju szarej pleśni i pośrednio odpornością genotypu rośliny na patogen (B a r k a i - G o l a n i in., 1988; E l a d, 1988).

U odmiany średnio odpornej poinsekcji, wzmożone wytwarzanie $O_2^{\bullet-}$ po infekcji nie spowodowało powstania toksycznych rodników hydroksylowych, a początkowy wzrost aktywności lipoksygenazy, nie skoordynowany z rozwojem choroby, wskazywał raczej na stymulację reakcji obronnych, w tym udział antyoksydantów niż zmiany degradacyjne.

E l a d (1992), podkreślając rolę antyoksydantów w ograniczaniu symptomów choroby, postulował wykorzystanie zmiataczy wolnych rodników w kontroli rozwoju szarej pleśni na liściach pomidora, fasoli, pieprzu, oberżyny oraz na płatkach róży.

Pomiary chemiluminescencji u obu odmian potwierdzają powyższe spostrzeżenia. Rozwojowi szarej pleśni na liściach podatnej odmiany poinsekcji towarzyszył systematyczny wzrost ultrasłabego świecenia zogniskowany wokół plam

chorobowych. Emisja nie pochodziła ze strefy komórek nekrotycznych, na co wskazywały wyniki badań cytochemicznych (dane nie publikowane). W odmianie odpornej rejestrowano nieznaczny wzrost ultrasłabego świecenia we wczesnym etapie po inokulacji, a emisja nie pochodziła z miejsc naniesienia grzyba, lecz z całej powierzchni blaszki liściowej.

Wykorzystana przez nas analiza fotometryczna obrazów chemiluminescencyjnych (S ł a w i ń s k a i S ł a w i ń s k i, 1998) w sposób bezinwazyjny pozwala śledzić kinetykę przemian wolnorodnikowych (A b e l e s 1986), towarzyszących odpowiedziom obronnym rośliny oraz rejestrować obszary reorganizacji strukturalnej tkanki. Z podjętych badań wynika, że zarodniki, przetrwalniki oraz strzępki *Botrytis cinerea* nie wykazują emisji ultrasłabego świecenia (dane nie publikowane).

W literaturze jest niewiele doniesień na temat fotografowania obiektów, nie oświetlonych światłem zewnętrznym, po wygaśnięciu fotochemiluminescencji i wykorzystania tych obrazów do śledzenia procesów obronnych w układzie patogen-roślina. Jedynie H i r a m a t s u (1998) rejestrował generowanie ultrasłabego świecenia w bulwach patata infekowanego przez *Fusarium oxysporum* w powiązaniu z obronną akumulacją fitoaleksyn.

W podsumowaniu autorzy akcentują zaangażowanie metabolizmu wolnych rodników w reakcjach obronnych poinsekcji na *B. cinerea*. Uzyskane dane, które wymagają dalszej weryfikacji, pozwalają wstępnie wnioskować o zróżnicowanym charakterze przemian wolnorodnikowych u obu odmian poinsekcji, skorelowanych z poziomem odporności genotypu na patogena.

Badania były częściowo finansowane z tematu IC- 31-543/2002 DS.

LITERATURA

- A b e l e s F.B., 1986. Plant chemiluminescence. Ann. Rev. Plant Physiol., 37: 49-72.
- A p o s t o l i, H e i n s t e i n P.F., L o w P.S., 1988. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Plant Physiol., 90: 109-116.
- B a r k a i - G o l a n R., L a v y - M e i r G., K o p e l i o v i c h E., 1988. Pectolytic and cellulolytic activity of *Botrytis cinerea* Pers. Related to infection of non-ripening tomato mutants. J. Phytopathol., 123: 174-183.
- B o u d e t A.-M., 2000. Lignins and lignification: selected issues. Plant Physiol. Biochem., 38(1/2): 81-96.
- B r a d y J.D., F r y S.C., 1997. Formation of di-isodityrosine and loss of isodityrosine in the cell walls of tomato cell - suspension cultures treated with fungal elicitors or H_2O_2 . Plant Physiol., 115: 87-92.
- B r i s s o n L.F., T e n h a k e n R., L a m b C h., 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell, 6: 1703-1712.
- D a t J., V a n d e n a b e e l e S., V r a n o v á E., V a n M o n t a g u M., I n z é D., V a n B r e u s e g e m F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 57: 779-795.

- D o k e N., 1983. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.*, 23: 359-367.
- E d l i c h A., L o r e n z G., L y r H., N e g a E. & P o m m e r G. H., 1989. New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. *Nether. J. Plant Pathol.*, 95 (Suppl.1): 53-62.
- E l a d Y., V o l p i n H., 1988. The involvement of ethylene and calcium in gray mold of pelargonium, ruscus and rose flowers. *Phytoparasitica*, 16: 119-131.
- E l a d Y., 1992. The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. *Plant Pathol.*, 41: 417-426.
- E l a d Y., E v e n s e n K., 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Amer. Phytopathol. Soc.*, 85(6): 637-643.
- G a j e w s k a E., U r b a n e k H., P a t y k o w s k i J., K u ż n i a k E., 1998. The activities of H_2O_2 - metabolizing enzymes in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Curr. Topics Biophys.*, 22: 58-61.
- H a m m o n d - K o s a c k K.E., J o n e s J.D.G., 1996. Resistance gene - dependent plant defense responses. *Plant Cell.*, 8: 1773-1791.
- H i r a m a t s u M., 1998. Biophotons and defense response in plants. In: Biophotons, J.J. Chang i n. (eds), Kluwer Academic Publishers, 45-55.
- H ü c k e l h o v e n R., K o g e l K.-H., 1998. Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near - isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Mol. Plant - Microbe Interact.*, 11: 292-300.
- I e v i n s h G., 1992. Soluble lipoxygenase activity in rye seedlings as related to endogenous and exogenous ethylene and wounding. *Plant Sci.*, 82: 155-159.
- K e v a n P.C., C r o f t C., J ü t t n e r F., S l u s a r e n k o A.J., 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiol.* 101: 13-24.
- L o w P.S., M e r i d a J.R., 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plant.*, 96: 533-542.
- M a ł o l e p s z a U., U r b a n e k H., 2000. The oxidants and antioxidant enzymes in tomato leaves treated with o-hydroxyethylrutin and infected with *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106: 657-665.
- M e h d y M.C., 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.*, 105: 467-472.
- N i c h o l s o n R.L., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30: 369-389.
- P e n g M., K u ć J., 1992. Peroxidase - generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathol.*, 82: 696-699.
- S ł a w i Ń s k a D., G ó r s k i Z., S ł a w i Ń s k i J., 1998. Chemiluminescence imaging of oxidative changes in plant food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 7/48: 67-72.
- S ł a w i Ń s k a D., S ł a w i Ń s k i J., 1998. Chemiluminescence of cereal products III. Two - dimensional photocount imaging of chemiluminescence. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 13: 21-24.
- S u r r e y K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, 39: 65-70
- S u t h e r l a n d M.W., 1991. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 39: 79-93.

- Tiedemann A.v., 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 50: 151-166.
- Urbanek H., Gajewska E., Karwowska R., Wielanek M., 1996. Generation of superoxide anion and induction of superoxide dismutase and peroxidase in bean leaves infected with pathogenic fungi. *Acta Bioch. Pol.*, 43(4): 679-686.
- Wojtaszek P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, 322: 681-692.

Powstawanie wolnych rodników w rozwoju szarej pleśni na liściach poinseji

Streszczenie

Badano udział wolnych rodników (anionorodnika ponadtlenkowego i hydroksylowego), aktywność lipoksygenazy (LOX) oraz detekcję chemiluminescencji w rozwoju szarej pleśni na liściach poinseji, odmiany 'Coco White' - średnio odpornej i 'Malibu Red' - podatnej na *B. cinerea*.

Poziom anionorodnika ponadtlenkowego wzrastał wraz z rozwojem choroby u obu odmian poinseji. W późniejszych terminach po inokulacji zawartość O_2^- w krążkach z miejsc zasiedlonych przez grzyb u odmiany podatnej była 2 razy większa, niż w analogicznych krążkach u odmiany średnio odpornej.

Poinfekcyjne generowanie silnie reaktywnego rodnika hydroksylowego stwierdzono w odmianie podatnej. Poziom rodnika $\cdot OH$ w ostatnich godzinach po inokulacji był 10 razy wyższy w miejscach plam chorobowych, niż w starzejących się liściach zdrowych tej odmiany.

Aktywność lipoksygenazy (LOX), wykazywała przeciwstawne tendencje zmian w obu analizowanych genotypach po infekcji. U odmiany podatnej w początkowych godzinach po inokulacji aktywność enzymu była niska, natomiast po 3. dobie istotnie wzrastała zarówno w miejscach plam, jak i w okolicach plam. Natomiast u odmiany odpornej przez pierwsze 3 dni rozwoju choroby aktywność lipoksygenazy była relatywnie wysoka, potem malała.

Zakażone przez *B. cinerea* liście poinseji były źródłem ultrasłabej chemiluminescencji. Kinetyka i natężenie ultrasłabego świecenia zależało od odmiany poinseji i stopnia rozwoju choroby. Poinfekcyjny wzrost chemiluminescencji szczególnie był widoczny w strefie otaczającej plamy chorobowe u odmiany podatnej.