

STANISŁAWA PUKACKA

Fizjologiczne i biochemiczne podstawy odporności mieszańców topoli na grzyb *Dothichiza populea* Sacc. et Br.*

| | |
|---|-----|
| Wstęp | 227 |
| I. Założenia i cel pracy | 228 |
| II. Udział związków fenolowych w odporności przedinfekcyjnej topoli na grzyb <i>Dothichiza populea</i> Sacc. et Br. | 229 |
| 1. Naturalne substancje fenolowe w korze topoli | 229 |
| 2. Rola związków fenolowych w odporności roślin | 230 |
| 3. Materiały i metody | 232 |
| 4. Wyniki | 235 |
| III. Poinfekcyjne zmiany w organizmie żywiciela i ich znaczenie w zwalczaniu choroby | 241 |
| 1. Przegląd literatury | 241 |
| 2. Materiały i metody | 242 |
| 3. Wyniki | 246 |
| IV. Degradacja wysokocząsteczkowych składników ścian komórkowych | 257 |
| 1. Przegląd literatury | 257 |
| 2. Materiały i metody | 258 |
| 3. Wyniki | 260 |
| V. Dyskusja | 262 |
| VI. Wnioski końcowe i podsumowanie wyników | 269 |

WSTĘP

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie topolą jako drzewem mogącym zaspokoić niektóre braki surowcowe w przemyśle drzewnym. Zalicza się ona do drzew szybko rosnących. Wykazuje wysoką zdolność asymilacyjną, która skorelowana jest z dużymi rocznymi przyrostami masy. Żelański (1973) podaje, że intensywność fotosyntezy u niektórych odmian topoli osiąga wartość 40 mg CO₂/g suchej masy/godz. Jest to wielkość porównywalna z wysokoproduktywnymi roślinami uprawnymi. Dla sosny na przykład wynosi ona 3-6 mg CO₂/g suchej masy/godz. (Żelański 1967).

Uprawa topoli na szeroką skalę mogłaby w stosunkowo krótkim czasie

* Praca doktorska wykonana pod kierunkiem prof. dra Mirosława Tomaszewskiego w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku. Praca była częściowo finansowana przez Ministerstwo Rolnictwa USA (FG-PO-266).

dostarczyć dużych ilości drewna. Pierwsze plantacje topoli pojawiły się w krajach Europy zachodniej, gdzie zasoby drzewne poważnie zubożały na skutek szybkiego rozwoju przemysłu. W Polsce uprawa tego gatunku ma na celu dostarczenie surowca niektórym gałęziom przemysłu drzewnego dla zaoszczędzenia naszych lasów. Hodowla szybko rosnących topoli była zainicjowana przez zespół naukowców Instytutu Dendrologii w Kórniku (Białobok, 1956; Bugała i Stecki, 1961; Pohl, 1962 i 1964; Stecki, 1967).

Obecnie pozyskujemy około 60 000 m³ drewna topolowego rocznie (Surmieński, 1973). Służy ono przede wszystkim jako surowiec dla przemysłu celulozowo-papierniczego, zapalczanego oraz do wyrobu wysokiej jakości płyt pilśniowych i wiórowych. Z drewna topoli ponadto wyrabia się różnego rodzaju opakowania, jak skrzynki, beczki, łubianki itp.

Oprócz tego topole coraz częściej wprowadza się do zadrzewienia nowych osiedli w miastach. Znoszą dobrze różnego rodzaju zanieczyszczenia powietrza i mogą być sadzone w ośrodkach przemysłowych. Podnoszą również piękno krajobrazu wiejskiego.

Uprawa topoli na szerszą skalę w plantacjach wymaga dobrej pielęgnacji gleby oraz doboru odpowiednich odmian, ponieważ w uprawie zwartej rozprzestrzeniają się różnego rodzaju choroby. Jednym z groźnych patogenów topoli jest grzyb *Dothichiza populea* Sacc. et Br. Wywołuje on chorobę zwaną u nas pomorem topoli (Orłowski, 1959). Najsilniej atakowane są zręzy topolowe oraz dwuletnie pędy.

Szczegółowe badania nad czynnikami sprzyjającymi rozwojowi tej choroby w warunkach klimatu polskiego i sposobami jej zwalczania prowadziła Kozłowska (1971). Siwecki (1969) natomiast opracował metodę szybkiego określania odporności topoli na *D. populea* przy pomocy sztucznego zakażania i wypróbował ją na mieszańcach o różnej odporności.

I. ZAŁOŻENIA i CEL PRACY

Zasadniczym celem niniejszej pracy było wykazanie, jakie mechanizmy odpornościowe występują w korze topoli przed i po infekcji *D. populea*. Chodziło również o to aby zbadać jakimi charakterystycznymi substancjami odznaczają się topole odporne na ten patogen i czy istnieje przyczynowa zależność między nimi a odpornością.

Praca miała także stanowić teoretyczne podstawy do opracowania testów dla typowania osobników odpornych na *D. populea*, przeznaczonych do uprawy i hodowli.

Ponieważ wiadomo, że rośliny należące do rodziny *Salicaceae*, w tym również topole, charakteryzują się obfitością występowania związków fenolowych w korze i liściach, a z kolei o substancjach tych wiadomo, że

mogą odgrywać poważną rolę w odporności roślin na infekcję mikroorganizmów, te właśnie związki oraz ich metabolizm starano się badać w niniejszej pracy.

II. UDZIAŁ ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W ODPORNOŚCI PRZEDINFEKCYJNEJ TOPOLI NA GRZYB *DOETHICHA POPULEA* SACC. et BR.

1. NATURALNE SUBSTANCJE FENOLOWE W KORZE TOPOLI

Kora topoli zawiera różnorodne związki fenolowe. Występują one w stanie wolnym oraz w postaci połączeń z cukrami, kwasami itp. Szczegółowe badania nad tymi związkami w korze niektórych odmian topoli prowadzili głównie Pearl i inni (1962, 1964, 1966a i b, 1967a i b, 1968a i b) oraz Thieme i Benecke (1970 i 1971).

Pearl i inni (1960) poddali alkalicznej hydrolizie zmieloną, suchą korę następujących gatunków topoli: *P. tremuloides*, *P. grandidentata*, *P. tacamahaca*, *P. deltoides*, *P. trichocarpa*, *P. heterophylla*. Następnie przy pomocy chromatografii bibułowej wykazali, że we wszystkich badanych gatunkach występują takie związki jak: wanilina, aldehyd syryngowy, aldehyd p-OH benzoesowy oraz kwasy: waniliowy, syryngowy, ferulowy, p-OH benzoesowy, p-OH cynamonowy. Stwierdzili oni duże różnice w ilości poszczególnych związków, jakkolwiek suma ich była podobna we wszystkich topolach.

Tabela 1

Występowanie glukozydów fenoli w korze niektórych gatunków topoli według Pearl i innych (1962, 1964, 1966a, i b, 1967a i b, 1968a i b)

The occurrence of phenolic glucosides in the bark of some species of poplars according to Pearl et al. (1962, 1964, 1966a i b, 1967a i b, 1968a i b)

| Glukozyd Glucoside | <i>P. balsamifera</i> | <i>P. trichocarpa</i> | <i>P. grandidentata</i> | <i>P. tremuloides</i> |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Salicyna (saligenina-glukoza) | + | + | + | + |
| Salirepozyd (alkohol gentyzynowy-kwas benzoesowy-glukoza) | + | + | + | + |
| Trichokarpina (kwas gentyzynowy-fenyletanol-glukoza) | + | + | - | - |
| Trichozyd (kwas metoksygentyzynowy-fenyletanol-glukoza) | + | + | - | - |
| Trichokarpigenina (kwas gentyzynowy-kwas benzoesowy-fenyletanol-glukoza) | + | - | - | - |
| Trichokarpozyd (kwas p-kumarowy-saligenina-glukoza) | + | + | - | - |
| Tremulozydina (kwas benzoesowy-saligenina-glukoza) | - | - | + | + |
| Populina (saligenina-kwas benzoesowy-glukoza) | - | - | + | - |
| Grandidentatyna (kwas p-kumarowy-1,2 cykloheksanodiol-glukoza) | - | - | + | - |

W dalszych pracach autorzy ci badali wyciągi wodne z kory niektórych gatunków topoli i stwierdzili występowanie skomplikowanych połączeń fenoli z cukrami. Jedne z nich występowały u kilku gatunków ale były też charakterystyczne połączenia tylko dla jednego gatunku topoli.

Podobne badania ale obejmujące nieco inne gatunki prowadzili Thieme i Benecke (1970) i wykryli jeszcze inne połączenia oraz niektóre takie same jak poprzedni autorzy.

Oto przykłady glukozydów, jakie zostały zidentyfikowane w korze topoli przez wymienionych badaczy:

Tabela 2

Występowanie glukozydów fenoli w korze niektórych gatunków topoli według Thieme i Benecke (1970)

The occurrence of phenolic glucosides in the bark of some poplar species according to Thieme and Benecke (1970)

| Glukozyd Glucoside | <i>P. tremula</i> | <i>P. tremuloides</i> | <i>P. nigra</i> | <i>P. alba</i> | <i>P. trichocarpa</i> | <i>P. canadensis</i> |
|---|-------------------|-----------------------|-----------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| Salicyna | + | + | + | + | + | + |
| Salikortyna (kwas salicylowy-saligenina-glukoza) | + | + | + | + | + | + |
| Tremulacyna (kwas benzoesowy-kwas salicylowy-saligenina-glukoza) | + | + | - | + | + | - |
| Salirepozyd | + | + | - | + | + | + |
| Nigracyna (kwas benzoesowy-alkohol gentyzynowy-glukoza) | - | - | + | - | - | - |
| Trichokarpina | - | - | - | - | + | + |
| Grandidentatyna | + | + | - | + | - | - |
| 1-p-kumarylo D-glukoza | + | + | - | - | + | + |

Jak widać z zamieszczonych przykładów możliwości połączeń związków fenolowych z glukozą są różnorodne. Ten sam fenol może występować w kilku glukozydach, na przykład saligenina wchodzi w skład salicyny, salikortyny i tremulacyny. Thieme i Benecke (1971) wykazali, że zawartość poszczególnych glukozydów w korze topoli zmienia się sezonowo. Tworzenie się tych połączeń jest jedną z form gromadzenia przez roślinę zapasów, które w odpowiednim momencie są uruchamiane.

2. ROLA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W ODPORNOŚCI ROŚLIN

Związkami fenolowymi jako czynnikami grzybobójczymi interesowano się już w pierwszych dziesiątkach naszego stulecia (Newton i Anderson 1929, Walker 1923). Na substancje te zwrócono uwagę przy badaniach mechanizmów obronnych w roślinach w walce z pasożytami, ponieważ charakteryzują się dużą toksycznością dla mikroorganizmów w stosunkowo niskich stężeniach. Badania nad wyjaśnieniem znaczenia fenoli w walce rośliny z pasożytem prowadzono w trzech aspektach.

W pierwszym z nich zmierzano do znalezienia zależności między sumą związków fenolowych w komórkach żywiciela a jego odpornością, lub do wykrycia specyficznej substancji, której obecność w roślinie nie pozwala na rozwój patogenu. Byłoby to równoznaczne z udziałem substancji fenolowych w tzw. odporności przedinfekcyjnej. W niektórych przypadkach udało się takie zależności wykazać. Na przykład Newton i Anderson (1929) stwierdzili, że u odmian pszenicy odpornych na *Puccinia graminis* zawartość związków fenolowych jest wyższa niż u odmian wrażliwych. Podobnie Johnson i Shall (1957) wykazali, że ilość kwasu chlorogenowego w bulwach ziemniaka odpornego na *Streptomyces scabies* jest wyższa niż u odmiany wrażliwej. Walker (1923) zaobserwował zależność między odpornością cebuli na *Colletotrichum circinans* a obecnością w komórkach katecholu i kwasu protokatechusowego. Ponadto wykazał hamujący wpływ tych związków na rozwój patogenu. Hubbes (1969) natomiast uważa, że kwas benzoesowy i salicylowy są odpowiedzialne za zahamowanie rozwoju *Hypoxylon pruinaum* w korze niektórych odmian topoli. Butin (1964) oraz Loeschcke (1964) twierdzą, że występujący w korze topoli balsamicznych glukozyd zwany trichokarpiną, jest toksyczny dla niektórych pasożytów, między innymi dla *D. populea*.

Drugi aspekt badań dotyczy zmian stężenia związków fenolowych w komórkach żywiciela po infekcji oraz ich wpływu na odporność. Poinfekcyjne zmiany w zawartości substancji fenolowych stwierdzono u wielu roślin. I tak Lee i LeTourneau (1958) wykazali wzrost zawartości kwasu chlorogenowego w ziemniaku zakażonym *Verticillium albo-atrum*. Haniecka (1970) stwierdziła, że w porażonych przez *Phytophthora infestans* bulwach ziemniaków odpornych wzrasta zawartość kwasu chlorogenowego i wolnych fenoli, natomiast w bulwach wrażliwych następował spadek ilości tych substancji. Brown i Swinburne (1971) wykazali, że w owocach jabłoni odpornych na *Nectria galligena* wzrasta zawartość kwasu benzoesowego w przypadku porażenia tym patogenem.

Z przytoczonych danych wynika, że poziom związków fenolowych i ich budowa mogą mieć wpływ na różnego rodzaju pasożyty roślinne. Równocześnie jednak niektóre badania wykazały brak korelacji między ilością fenoli a odpornością. Na przykład Fehrman i Dimond (1967) stwierdzili brak zależności między zawartością kwasu chlorogenowego w niektórych organach ziemniaka a ich odpornością na infekcję *Phytophthora infestans*. Wykazali oni również niewielki wpływ tego związku na rozwój patogenu.

Inny wreszcie aspekt badań zapoczątkował Müller zwracając uwagę na substancje, które pojawiają się w komórkach żywiciela po infekcji i wywierają hamujący wpływ na rozwój patogenu. Zostały one nazwane fitoaleksynami. Dotychczas poznano strukturę niektórych fitoaleksyn i okazało się, że większość z nich ma również charakter fenoli, na przykład pizatyna, fazeolina, orchinol.

Związki fenolowe są bardzo rozpowszechnione w świecie roślinnym. Są one rozpuszczalne w wodzie i w różnych stężeniach znajdują się w wakuolach. Po naruszeniu kompartmentacji komórki przez patogen fenole zostają wprowadzone do cytoplazmy i wtedy mają z nim bezpośredni kontakt. Pod wpływem enzymów i samorzutnie mogą być utleniane poprzez chemiczne reaktywne rodniki do chinonów. Produkty utlenienia fenoli są bardziej toksyczne dla mikroorganizmów niż formy wyjściowe (Farkas i Kiraly 1962). Dalsze utlenienie i polimeryzacja substancji fenolowych prowadzi do utworzenia melanin, które wywołują brunatnienie tkanek i stanowią barierę w rozprzestrzenianiu dalszej infekcji.

3. MATERIAŁY I METODY

A. Patogen i gospodarz

W badaniach używano grzybni czystej kultury *Dothichiza populea* Sacc. et Br. wyizolowanej przez C. Kozłowską. Przez cały okres prowadzenia badań grzybnię przeszczepiano co trzy miesiące na skosy z brzezkowym podłożem odżywczym i przechowywano w chłodzie. Do wszystkich inokulacji używano krążków (ϕ 5 mm) wycinanych z dziesięciodniowych hodowli grzybni na podłożu odżywczym.

Badania prowadzono na następujących gatunkach i mieszańcach topoli, które Siwecki (1969) scharakteryzował pod względem odporności na *D. populea*.

Tabela 3

Gatunki i mieszańce topoli, na których prowadzono doświadczenia
Species and hybrids of poplars used in the experiments

| Gatunek, mieszaniec Species, hybrid | Sekcja Section | Charakterystyka odporności Characteristic of resistance |
|--|---|--|
| <i>maximowiczii</i> | <i>Tacamahaca</i> | odporna (resistant) |
| <i>nigra</i> 'Italica' | <i>Aigeiros</i> | wrażliwa (susceptible) |
| <i>laurifolia</i> | <i>Tacamahaca</i> | odporna (resistant) |
| PK-136 (3) (<i>nigra</i> 'It.' \times <i>laurifolia</i>) | <i>Aigeiros</i> \times <i>Tacamahaca</i> | średnio odporna (medium resistant) |
| PK-137 (9) (<i>nigra</i> 'It.' \times <i>nigra</i>) | <i>Aigeiros</i> | wrażliwa (susceptible) |
| PK-124 (24) (<i>maximowiczii</i> \times <i>nigra</i>) | <i>Aigeiros</i> \times <i>Tacamahaca</i> | średnio odporna (medium resistant) |
| PK-127 (15) (<i>maximowiczii</i> \times <i>laurifolia</i>) | <i>Tacamahaca</i> | odporna (resistant) |

B. Podłoża

a) Brzezkowe

brzezcza — 250 ml,

H₂O — 750 ml,

agar — 15 g.

Sterylizowano w 0,75 atm. przez 20 minut.

b) Syntetyczne stałe lub płynne

| | | | | | |
|-----------------------------------|---|----------|-------------------|---|------------|
| glukoza | — | 10 g, | CaCl ₂ | — | 5,0 mg, |
| maltoza | — | 20 g, | MnSO ₄ | — | 5,0 mg, |
| KH ₂ PO ₄ | — | 0,5 g, | tiamina | — | 100,0 ng, |
| MgSO ₄ | — | 0,5 g, | biotyna | — | 5,0 ng, |
| L-asparagina | — | 0,5 g, | agar | — | 15,0 g, |
| myo-inozytol | — | 0,04 g, | H ₂ O | — | 1000,0 ml. |
| ZnSO ₄ | — | 0,25 mg, | pH = 5,6 | | |
| Fe(NO ₃) ₃ | — | 10,0 mg, | | | |

Sterylizowano w 0,75 atm. przez 20 minut.

W niektórych doświadczeniach stosowano podłoże uboższe, wtedy zmniejszono dziesięciokrotnie ilość cukrów lub podłoże wyłącznie mineralne i wtedy cukry w ogóle odrzucono a zamiast L-asparaginy wprowadzono 0,5 g NH₄NO₃.

C. Przygotowanie wyciągu alkoholowego z kory topoli

Na wiosnę z jednorocznych pędów pobrano pewną ilość kory, pocięto na drobne odcinki i odważono odpowiednie próbki. Zalano 80% etanolem i podgrzewano na łaźni wodnej do wrzenia. Do etanolu przechodzą wtedy wszystkie niskocząsteczkowe związki fenolowe. Dla lepszego wyluowania ich, korę rozdrobniono w homogenizatorze UNIPAN typ 302. Po trzykrotnej ekstrakcji etanolem substancje fenolowe były praktycznie usunięte z kory. Etanol odparowano w wyparce próżniowej, pozostałość podejmowano znaną objętością wody i próbki tego roztworu pobierano do doświadczeń. Ten roztwór również zakwaszano do pH = 3 i ekstrahowano trzykrotnie eterem przez wytrząsanie. Po odparowaniu eteru pozostałość rozpuszczono w znanej objętości wody. W ten sposób otrzymano frakcję eterową wyciągu alkoholowego z kory topoli, którą użyto do doświadczeń.

D. Wzrost *Dothichiza populea* w obecności wyciągów z kory topoli

Odpowiednią ilość wyciągów przeliczoną na świeżą masę kory podawano do 100 ml podłoża stałego brzezkowego lub mineralnego, na przykład 1% podłoże oznacza, że w 100 ml pożywki znajduje się wyciąg z 1 g świeżej kory. Po sterylizacji pożywkę rozlano na szalki Petriego. Na środku płytki umieszczono krążek grzybni (ϕ 5 mm) *Dothichiza populea*. Kontrolę stanowiło podłoże bez wyciągów z kory. Po dwóch dobach inkubacji w temperaturze 25°C mierzono przyrost średnicy grzybni. Pomiarów dokonywano codziennie o jednakowej porze. Ze średniej wartości średnicy grzybni obliczono powierzchnię jaką ona zajmuje.

E. Wzrost grzybni *Dothichiza populea* w obecności czystych związków fenolowych

Do doświadczeń użyto czystych preparatów handlowych niektórych związków fenolowych. Substancje te podawano do podłoża stałego brzezkowego w takich ilościach, że ich końcowe stężenie wynosiło: 10⁻⁴M,

10^{-3}M , 10^{-2}M . Następnie wyszczepiono krążek grzybni *Dothichiza* i inkubowano w temp. 25°C . Po 48 godz. dokonano pierwszych pomiarów średnicy grzybni. Kontrolę stanowił wzrost grzybni na czystym podłożu brzezkowym.

F. Wpływ katecholu oraz pochodnych kwasu benzoowego na wzrost *Dothichiza populea*

Do butli Roux rozlano po 10 ml płynnego podłoża uboższego w cukry i wysterylizowano. Następnie sterylnie wprowadzono związki fenolowe w stężeniu końcowym 10^{-4}M , $3,5 \times 10^{-4}\text{M}$, i 10^{-3}M . Do każdej butli wprowadzono jednakowe inokulum grzybni *Dothichiza populea*. Inkubowano w 25°C przez dwa tygodnie. Po tym czasie grzybnię oddzielono od podłoża i dokonano pomiaru suchej masy. W filtracie badano produkty metabolizmu fenoli, zakwaszając go do pH-2 i ekstrahując eterem. Po odparowaniu eteru pozostałość rozpuszczono w niewielkiej ilości etanolu i analizowano za pomocą chromatografii bibułowej dwukierunkowej i cienkowarstwowej na żelu GF-254.

Używano następujących solwentów:

butanol : kwas octowy : woda (4 : 1 : 2) (bibułowa),

kwas octowy 3% (bibułowa),

benzen : kwas octowy : woda (1 : 1 : 1) (bibułowa i cienkowarstwowa),

chloroform : kwas octowy (95 : 5) (cienkowarstwowa).

W celu identyfikacji chromatogramy oglądano w świetle UV 254 i 356 nm bezpośrednio po rozwinięciu i następnie po spryskaniu 3% Na z CO_3 i 1N NaOH. Dodatkowo spryskiwano je odczynnikami sulfanilowym i 2,4-dwunitrofenylhydrazyną.

G. Wpływ pH na toksyczność kwasu salicylowego

Do płynnego podłoża uboższego w cukry dodano kwasu salicylowego w końcowym stężeniu 10^{-3}M i $3,5 \times 10^{-4}\text{M}$ i rozlano do 11 butli Roux. W każdym powtórzeniu ustalono różne pH w zakresie 3 - 5,2. Podobne pH ustalono w pożywce bez fenolu. Po sterylizacji wyszczepiono jednakowe inokulum grzyba. Inkubowano dwa tygodnie w 25°C . Po tym czasie grzybnię oddzielono od filtratu, wysuszono w 90°C i oznaczono suchą masę.

Dla uzupełnienia wykonano dodatkowy eksperyment. Grzybnię *Dothichiza populea* wyhodowaną na podłożu syntetycznym, oddzielono od filtratu i następnie zważono kilka jednogramowych próbek. Próbi te umieszczono w roztworze 10^{-3}M kwasu salicylowego o pH 3 i 5 i inkubowano

5 i 20 godzin. Po tym czasie grzybnię odsączono. Następnie za pomocą spektrofotometru wykreślono widmo adsorpcyjne kwasu salicylowego w przesączu i w roztworze wyjściowym.

H. Oznaczenie zawartości fenoli w korze

Związki fenolowe oznaczono w wyciągach etanolowych z kory topoli po odparowaniu etanolu, według metody podanej przez Swaina, Hillisa (1959). W metodzie tej stosowano odczynnik Folin-Ciocalteu (BDH). Pomiarów ekstynkcji dokonano na spektrokolorymetrze „Specol” przy długości fali $\lambda = 725$ nm. Sumę fenoli oznaczono po hydrolizie wyciągów z kory w 1N HCl w temperaturze 90°C przez 20 minut. Zawartość fenoli związanych obliczono z różnicy sumy fenoli i fenoli wolnych.

4. WYNIKI

Wpływ wyciągów alkoholowych z kory topoli na wzrost grzybni *Dothichiza populea* przedstawiono w tabeli 4.

Dodanie wyciągów z kory topoli do podłoża stałego brzezkowego wpływa hamująco na wzrost grzybni. Najbardziej fungistatyczny jest skład wyciągu z mieszańca PK-127 a najmniej z PK-137.

Tabela 4

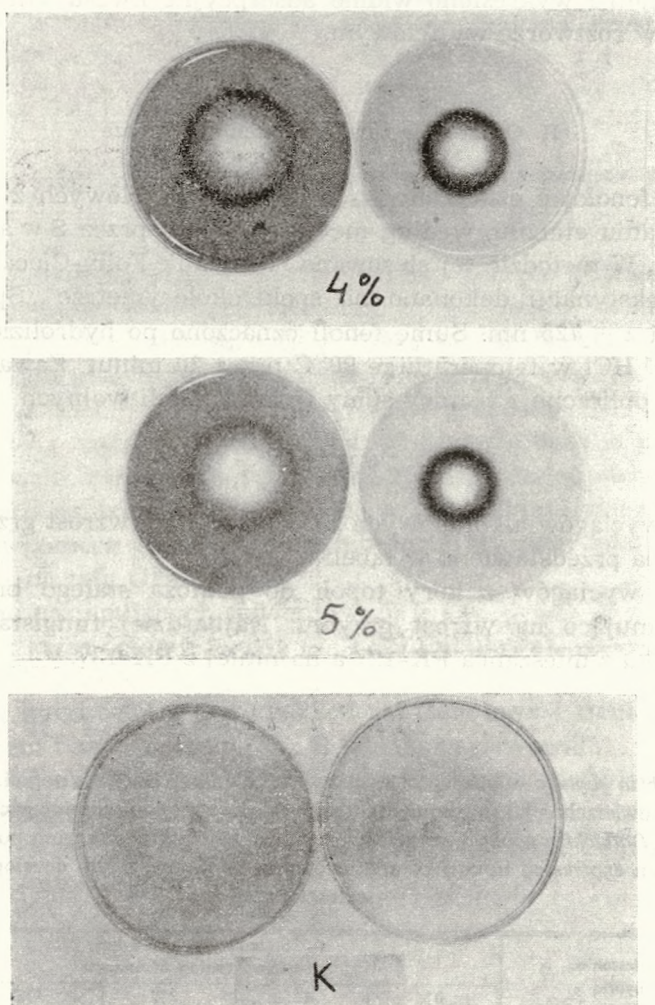
Wzrost *Dothichiza populea* w obecności wyciągów alkoholowych z kory topoli. (Wzrost wyrażono w cm² powierzchni jaką zajmuje grzybnia na poszczególnych wyciągach)
The growth of *Dothichiza populea* in the presence of alcoholic extracts from poplar bark. (The growth has been expressed in cm² of area occupied by the mycelium developing on various extracts)

| Gatunek, mieszańiec Species, hybrid | Stężenie wyciągu z kory Concentration of extracts | | | | |
|---|--|-----|-----|-----|-----|
| | 0% | 1% | 2% | 3% | 4% |
| <i>maximowiczii</i> | | 3,4 | 1,7 | 1,5 | 1,1 |
| <i>nigra</i> 'Italica' | | 5,3 | 2,5 | 1,2 | 1,1 |
| <i>laurifolia</i> | | 4,8 | 2,0 | 1,7 | 1,3 |
| PK-136 | | | | | |
| <i>nigra</i> 'It.' × <i>laurifolia</i> | | 4,5 | 2,8 | 1,7 | 1,4 |
| PK-137 | | | | | |
| <i>nigra</i> 'It.' × <i>nigra</i> | | 4,6 | 3,1 | 2,1 | 1,0 |
| PK-124 | | | | | |
| <i>maximowiczii</i> × <i>nigra</i> | | 4,1 | 3,1 | 2,1 | 2,1 |
| PK-127 | | | | | |
| <i>maximowiczii</i> × <i>laurifolia</i> | | 2,8 | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| Kontrola bez wyciągu Control without extract | 18,0 | | | | |

Również frakcja eterowa wyciągu z PK-127 bardziej hamuje wzrost patogenu niż podobna frakcja z kory PK-137 (ryc. 1 - 3).

Podłoże brzezkowe jest optymalne dla wzrostu *Dothichiza populea*

PK-137 PK-127
P. nigra 'Italica' × *P. nigra* *P. maximowiczii* × *P. lauri*-



Ryc. 1 - 3. Wzrost *Dothichiza populea* na podłożu odżywczym w obecności wyciągów eterowych z kory topoli

Pierścienie wokół grzybni wskazują na utlenienie polifenoli do ciemno zabarwionych produktów, które wyraźnie hamują wzrost grzybni. W kontroli biała grzybnia nie kontrastuje z tłem i zarasta całą płytkę

Fig. 1 - 3. The growth of *Dothichiza populea* on nutrient medium in the presence of ether extracts from the bark of poplars

The rings around the mycelium are caused by the oxidation of polyphenols into dark staining products, which distinctly inhibit the growth of the mycelium. In the control the white mycelium does not contrast with the background and overgrows the whole Petri dish

Tabela 5

Wzrost *Dothichiza populea* na pożywce mineralnej w obecności wyciągów etanolowych z kory topoli. (Wzrost wyrażono w cm² powierzchni grzybni)

The growth of *Dothichiza populea* on a mineral medium in the presence ethanolic extracts from poplar bark. (Growth expressed in cm² of the area occupied by the mycelium)

| Mieszaniec Hybrid | Stężenie wyciągów z kory Concentration of extracts | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|
| | 0% | 1% | 2% | 3% | 4% |
| PK-137 | | 5,1 | 4,4 | 3,3 | 4,3 |
| PK-127 | | 2,7 | 1,0 | 0,0 | 0,0 |
| Kontrola bez wyciągu Control without extract | 3,2 | | | | |

i może ono nieco zmieniać oraz łagodzić fungistatyczne działanie wyciągów. Dlatego w następnym doświadczeniu użyto podłoża mineralnego oraz wyciągi alkoholowe z kory najbardziej różniących się mieszańców PK-127 i PK-137. Wyniki przedstawia tabela 5.

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że na podłożu mineralnym zaznacza się wyraźniej hamujący wpływ wyciągów z kory mieszańca PK-127 na wzrost patogenu oraz, że składniki ekstraktu z kory PK-137 poprawiają wzrost grzybni.

Ogólnie rzecz biorąc można stwierdzić, że w korze mieszańca PK-127 znajduje się związek lub grupa związków, które mogą hamować rozwój *Dothichiza populea*.

Wpływ czystych związków fenolowych na wzrost *Dothichiza populea* przedstawiono w tabeli 6. Zaskakujące jest to, że kwas chlorogenowy, tak często badany jako czynnik spełniający pewną rolę w odporności roślin na infekcje grzybowe Lee i Le Tourneau (1958), Johnson i Shaal (1957), w tym przypadku nie jest toksyczny dla patogenu. Nie są też toksyczne glukozydy jak salicyna i rutyna oraz takie fenole jak D-katechina i kwercetyna. Niektóre substancje natomiast w najniższym stężeniu stymulują wzrost grzybni a w najwyższym hamują go całkowicie. Tak zachowuje się kwas cynamonowy i jego pochodne. Katechol, kwas benzoesowy oraz ich pochodne wydają się być toksyczne dla patogenu i dlatego w następnym eksperymencie badano ich wpływ na wzrost *D. populea* w podłożu płynnym. Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

Spśród przetestowanych fenoli kwas salicylowy, salicylan metylu i kwas gentyzynowy hamują wzrost grzybni w stężeniu 10⁻³M. W najniższym stężeniu natomiast wszystkie fenole wpływają dodatnio na wzrost.

W tabeli 7 widoczna jest również zmiana pH środowiska w czasie rozwoju grzybni. Nie we wszystkich przypadkach jest ona związana z toksycznością związku. Zbadano jednak, czy są różnice w toksyczności kwasu salicylowego w zależności od pH środowiska. Wyniki przedstawiono na rycinie 4. Jak wynika z wykresu takie różnice wyraźnie wystąpiły.

Wzrost *Dothichiza populea* na podłożu brzeczkowym w obecności związków fenolowych, wyrażony w procentach średnicy grzybni w stosunku do kontroli

The growth of *Dothichiza populea* on a brewer's worth medium in the presence of phenolic compounds, expressed as the percentage of the mycelium relative to the control.

| Fenole Phenols | Stężenie w podłożu Molar concentration | | | Barwa podłoża Appearance of the medium |
|--|---|--------------------|--------------------|---|
| | 10 ⁻⁴ M | 10 ⁻³ M | 10 ⁻² M | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid | 89 | 88 | 50 | lekko brązowa f. brown |
| Rutyna Rutin | 128 | 132 | 94 | lekko brązowa f. brown |
| Kwercetyna Quercetin | 116 | 114 | 98 | brązowa brown |
| D-katechina D-Catechin | 94 | 90 | 76 | pomarańczowo-brązowa orange-brown |
| Salicyna Salicin | 113 | 115 | 104 | bez zmian white |
| Saligenina Saligenin | 89 | 89 | 32 | brązowa brown |
| Salicylan metylu Methyl salicylate | 90 | 84 | 0 | bez zmian white |
| Kwas salicylowy Salicylic acid | 120 | 104 | 0 | bez zmian white |
| Katechol Catechol | 93 | 74 | 0 | ciemno-brązowa dk. brown |
| Kwas benzoesowy Benzoic acid | 95 | 74 | 0 | bez zmian white |
| Kwas 4-OH benzoesowy 4-Hydroxybenzoic acid | 104 | 108 | 0 | lekko żółta f. yellow |
| Kwas protokatechusowy Protocatechnic acid | 102 | 105 | 79 | ciemno-brązowa dk. brown |
| Kwas genetyzynowy Gentisic acid | 103 | 89 | 0 | brązowa brown |
| Kwas waniliowy Vanillic acid | 109 | 104 | 0 | lekko brązowa f. brown |
| Kwas syringowy Syringic acid | 120 | 85 | 35 | lekko brązowa f. brown |
| Kwas cynamonowy Cinnamic acid | 95 | 63 | 0 | bez zmian white |
| Kwas 4-OH cynamonowy 4-Hydroxycinnamic acid | 120 | 81 | 0 | bez zmian white |
| Kwas kawowy Caffeic acid | 91 | 63 | 0 | lekko brązowa f. brown |
| Kwas ferulowy Ferulic acid | 120 | 71 | 0 | lekko brązowa f. brown |
| Kwas synapinowy Sinapic acid | 92 | 85 | 0 | brązowa brown |
| Kontrola bez fenolu Control without phenol | | 100 | | bez zmian white |

W zakresie pH 3 - 4 kwas salicylowy całkowicie hamuje rozwój grzybni. W wyższych pH toksyczność jego zmniejsza się i zależy od stężenia.

Z dodatkowego eksperymentu wynika, że w niskich pH, gdy stopień dysocjacji kwasu salicylowego jest wyższy, więcej tego związku absorbuje się na grzybni, przez co jego kontakt z patogenem jest silniejszy (ryc. 5).

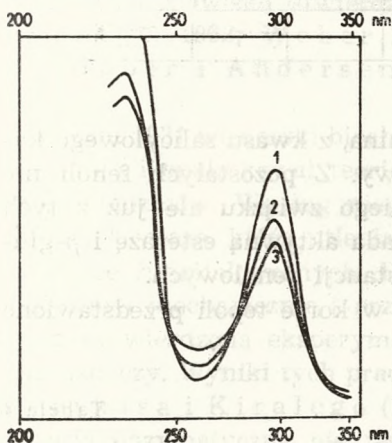
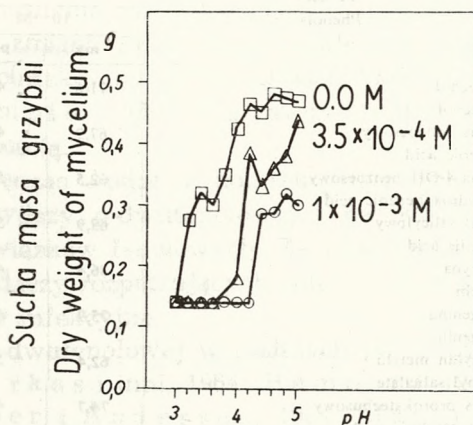
Badając filtrat z hodowli *D. populea* w obecności związków fenolowych

za pomocą analizy widmowej, stwierdzono szybki ubytek tych związków w podłożu. Widna adsorpcyjne dla poszczególnych fenoli wyglądały tak jak na następującym przykładzie (ryc. 6).

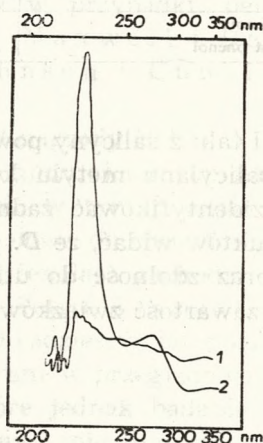
Za pomocą chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej udało się zidentyfikować niektóre produkty rozpadu poszczególnych związków fe-

Ryc. 4. Wpływ pH podłoża na przyrost suchej masy grzybni *Dothichiza populea* w obecności kwasu salicylowego w stężeniach $3,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ i 10^{-3} M

Fig. 4. The effect of pH of the medium on the dry weight increment of the *Dothichiza populea* mycelium in the presence of salicylic acid at concentrations of $3.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ and 10^{-3} M



Ryc. 5. Zawartość kwasu salicylowego w filtracie po 5-godzinnej inkubacji z 1 g grzybni *Dothichiza populea* przy pH=3 (krzywa 3) i pH=5 (krzywa 2) oraz w kontroli bez grzybni (krzywa 1)
Fig. 5. The content of salicylic acid in the filtrate after 5 hours of incubation with 1 g of *Dothichiza populea* mycelium at pH 3 (curve 3) and pH 5 (curve 2), and the control without the mycelium (curve 1)



Ryc. 6. Zmiana absorpcji kwasu benzoowego (10^{-3} M) w podłożu uboższym w cukry w obecności grzybni *Dothichiza populea* po dwóch tygodniach inkubacji (krzywa 1). Wyjściowa zawartość fenoli bez grzybni — krzywa 2

Fig. 6. Changes in the absorption of benzoic acid (10^{-3} M) on a medium deficient in sugars in the presence of *Dothichiza populea* mycelium, after two weeks of incubation (curve 1). The initial phenolic content without the mycelium — curve 2

Tabela 7

Wzrost grzybni *Dothichiza populea* (mg suchej masy) w obecności związków fenolowych na podłożu uboższym w cukry

The growth of *Dothichiza populea* mycelium (mg. of dry weight) in the presence of phenolic compounds on a medium deficient in sugars

| Fenole Phenols | Stężenie w podłożu Molar concentration | | | | | |
|---|---|-----|--------------------------|-----|--------------------|-----|
| | 10 ⁻⁴ M | | 3,5 × 10 ⁻⁴ M | | 10 ⁻³ M | |
| | mg | pH | mg | pH | mg | pH |
| Katechol Catechol | 71,6 | 4,6 | 78,4 | 4,1 | 66,2 | 4,4 |
| Kwas benzoesowy Benzoic acid | 67,9 | 4,5 | 63,4 | 5,7 | 74,6 | 5,3 |
| Kwas 4-OH benzoesowy 4-Hydroxybenzoic acid | 62,5 | 5,6 | 70,2 | 5,1 | 67,6 | 5,0 |
| Kwas salicylowy Salicylic acid | 68,9 | 5,5 | 67,8 | 5,0 | 44,0 | 3,9 |
| Salicyna Salicin | 86,4 | 4,1 | 80,6 | 4,1 | 90,2 | 3,5 |
| Saligenina Saligenin | 75,9 | 4,7 | 67,4 | 5,5 | 81,3 | 4,9 |
| Salicylan metylu Methyl salicilate | 62,4 | 5,6 | 58,5 | 5,5 | 51,6 | 5,8 |
| Kwas protokatechusowy Protocatechuic acid | 74,7 | 4,1 | 65,7 | 5,0 | 68,8 | 4,1 |
| Kwas genetyzynowy Genticic acid | 63,5 | 4,9 | 74,6 | 4,7 | 55,2 | 4,6 |
| Kontrola bez fenolu Control without phenol | 67,1 | 5,0 | | | | |

nolowych. I tak: z salicyny powstaje saligenina, z kwasu salicylowego katechol, z salicylanu metylu kwas salicylowy. Z pozostałych fenoli nie udało się zidentyfikować żadnego pośredniego związku ale już z tych kilku produktów widać, że *D. populea* posiada aktywną esterazę i β -glukozydazę oraz zdolność do utleniania substancji fenolowych.

Ogólną zawartość związków fenolowych w korze topoli przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8

Zawartość związków fenolowych (mg/g świeżej masy) w korze topoli w przeliczeniu na katechole
The content of phenolic compounds (mg/g of fresh weight) in the bark of poplars expressed as catechol equivalents

| Gatunek topoli Species | Suma fenoli mg/g świeżej masy Total phenols | Fenole wolne Free phenols | Fenole związane Bound phenols |
|---------------------------|---|------------------------------|----------------------------------|
| <i>maximowiczii</i> | 41,6 | 22,4 | 19,2 |
| <i>nigra</i> 'Italica' | 37,6 | 23,2 | 14,4 |
| <i>laurifolia</i> | 36,0 | 17,6 | 18,4 |
| PK - 136 | 42,6 | 23,2 | 18,4 |
| PK - 137 | 42,4 | 23,2 | 19,2 |
| PK - 124 | 39,2 | 18,8 | 20,4 |
| PK - 127 | 32,8 | 16,8 | 16,0 |

III. POINFEKCYJNE ZMIANY W ORGANIZMIE ŻYWCIELA I ICH ZNACZENIE W ZWALCZANIU CHOROBY

1. PRZEGLĄD LITERATURY

Kontakt pasożyta z organizmem żywiciela wywołuje reakcję manifestującą się w zmianie kierunku i nasilenia różnych procesów metabolicznych, uwarunkowaną najczęściej zmianą aktywności niektórych enzymów. Stwierdzono na przykład poinfekcyjny wzrost intensywności procesów fotosyntezy i glikozy (Sempio, 1950). Nie zawsze jednak zjawiska takie mają związek z odpornością.

Dużo natomiast uwagi poświęcono badaniu poinfekcyjnych zmian aktywności dwóch enzymów: oksydazy o-dwufenolowej i peroksydazy, które biorą udział w utlenianiu związków fenolowych. Ze względu na te właściwości zainteresowały one badaczy rozpatrujących rolę fenoli w zjawisku odporności roślin na choroby infekcyjne.

Wzrost aktywności oksydazy o-dwufenolowej w roślinach porażonych zaobserwowało wielu autorów (Farkas i inni, 1964; Hampton, 1963; Matta i Diamond, 1963; Huber i Andersen, 1964; Maraite, 1973).

To samo zjawisko stwierdzono również w przypadku peroksydazy (Hampton, 1963; Weber i inni, 1967; Maxwell i Bateman, 1967; Huber i Andersen, 1964; Johnson i Cunningham, 1972).

W roku 1931 węgierski biochemik, laureat nagrody Nobla, A. Szent-Györgyi opublikował teorię dotyczącą odporności roślin na infekcję mikroorganizmów. Według niego istotną rolę w tym procesie odgrywa polifenoloksydaza, która utlenia związki fenolowe do chinonów, substancji wysoce fungitoksycznych. Reakcja fenol-fenolaza zachodzi w tkance uszkodzonej mechanicznie i przez patogeny. Teoria Szent-Györgyi została potwierdzona eksperymentalnie w dwadzieścia lat później przez wielu badaczy. Wyniki tych prac zostały zebrane w przeglądowej publikacji Farkasa i Kiralego (1962). Niektóre jednak badania dowodzą, że teoria enzymatyczna nie jest uniwersalna i nie dotyczy wszystkich przypadków infekcji. Nie zawsze bowiem wzrostowi aktywności oksydaz fenolowych towarzyszył wzrost odporności rośliny (Stavelly i Hanson, 1967; Patil i inni, 1964).

Atak pasożyta na komórki żywiciela wywołuje nie tylko zmiany w całkowitej aktywności oksydaz, ale również ilościowe i jakościowe zmiany w proporcjach ich form molekularnych — izozymach. Ilościowe, w sensie zwiększenia aktywności poszczególnych izozymów i jakościowe dotyczące syntezy nowych form (Grzelińska, 1970; Staples i Stahmann, 1964; Yu i Hampton, 1964; Reddy i Stahmann, 1972). Seever i inni (1971) stwierdzili nawet, że u odpornej odmiany pszenicy po-

jawia się po infekcji rdzą izoenzym peroksydazy, który nie występuje u odmian wrażliwych. Autorzy nazywają go izozymem odporności.

Niezależnie od roli oksydaz fenolowych w poinfekcyjnym metabolizmie fenoli, badano ich udział w regulacji poziomu auksyn w komórkach żywiciela. Starano się dowieść czy IAA zawarty w tkankach roślinnych ma znaczenie dla rozwoju patogenu, jak zmienia się jego zawartość podczas infekcji i jaki to ma związek z odpornością. Śledzono degradację i syntezę auksyny w roślinach zdrowych i porażonych.

Shaw i Hawkins (1958) badając rozkład IAA-1-¹⁴C w liściach pszenicy porażonych *Puccinia graminis* i zdrowych stwierdzili, że w przypadku liści chorych ilość wyzwolonego ¹⁴CO₂ jest mniejsza niż dla zdrowych. Postulowali oni, że szybkość rozkładu IAA jest skorelowana z odpornością. Wyniki te nie zostały potwierdzone przez innych autorów (Daly i Deverall, 1963; Antonelli i Daly 1966; Seevers i Daly, 1970).

Rozkład IAA jest katalizowany przez enzym zwany IAA-oksydazą, który nie jest niczym innym jak peroksydazą (Ray, 1958). Aktywność tego enzymu określa się często ilością ¹⁴CO₂ uwolnionego ze znakowanego w grupie karboksylowej IAA, podanego do tkanki roślinnej. Sequera (1973) twierdzi jednak, że utożsamianie stopnia dekarboksylacji IAA z aktywnością IAA-oksydazy w roślinie jest rzeczą ryzykowną, ponieważ w procesie tym mogą brać udział również inne enzymy.

Seevers i Daly (1970) stwierdzili brak zależności między aktywnością peroksydazy w liściach pszenicy a odpornością na rdzę. Wobec tego są zdania, że aktywność IAA-oksydazy, która jest peroksydazą, również nie może być uważana za wskaźnik odporności.

Wetmore i Morel (1949) stwierdzili, że oksydaza o-dwufenolowa może także utleniać auksynę. Briggs i Ray (1956) zaobserwowali inaktywację IAA przez oksydazę o-dwufenolową w obecności katecholu, a Tomaszewski (1959) stwierdził podobny efekt dla kwasu chlorogenowego.

Stwierdzono, że w pewnych przypadkach, na przykład przy zranieniach mechanicznych lub na skutek uszkodzenia tkanki przez patogena, IAA-oksydaza jest blokowana przez polifenole (Sequera, 1964). Wtedy IAA może być rozkładany przez oksydazę o-dwufenolową.

2. MATERIAŁ I METODY

A. Przygotowanie materiału roślinnego

Zmiany w aktywności enzymów w tkance kory topoli podczas infekcji *D. populea* badano na roślinach rosnących w szklarni. W marcu, do doniczek z częściowo wysterylizowaną ziemią ogrodniczą, wysadzono zrzesy z jednorocznych pędów badanych topoli. W maju były one już ukorzenio-

ne i wtedy przystąpiono do inokulacji. Z każdej odmiany topoli zakażono tyle zrzesów, aby do analiz brać po pięć osobników porażonych i pięć zdrowych oraz aby doświadczenia móc wykonać w czterech terminach po inokulacji.

B. Zakażenie zrzesów topolowych

Grzybnię *Dothichiza populea* wyszczepiono na podłoże brzezczkowe płynne. Po dziesięciu dniach hodowli oddzielono ją od filtratu i rozdrobniono przy pomocy homogenizatora UNIPAN typ 302, przy niewielkich obrotach, przez dwie minuty. Homogenat wirowano i przemywano kilkakrotnie sterylnym roztworem płynu fizjologicznego. W końcu otrzymano czystą pastę grzybową, którą przechowywano w lodówce w sterylnej szalce Petriego.

Do zakażenia materiału roślinnego używano pasty oraz dodatkowo grzybni wyhodowanej na podłożu brzezczkowym na płytkach Petriego.

Każdy zrzes zakażano w trzech miejscach. Zdejmowano zewnętrzną warstwę kory i na to miejsce kładziono pewną ilość pasty grzybowej i kostkę agaru z grzybnią. Całość owinięto poloplastem. Na zrzesach kontrolnych robiono same nacięcia i owijano poloplastem.

Materiał do doświadczeń pobierano w momencie inokulacji oraz w pierwszym, drugim, trzecim i czwartym tygodniu po tym zabiegu.

C. Sporządzanie preparatów acetonowych z kory

Zrzesy zakażone i kontrolne umyto. Z odcinka gdzie znajdowały się miejsca inokulacji zdjęto korę i pobrano próbki do analizy. Rozdrobnioną korę przeniesiono do schłodzonego acetonu. Homogenizowano przez kilka minut w temperaturze topniejącego lodu. Następnie homogenat przeniesiono na sączek szklany G₄ lub G₃ i przemywano pod pompą próżniową oziębionym 70% acetonem. Ostatni raz przemywano 100% acetonem. Ostatecznie preparat wysuszono na sączku i po wysuszeniu przesiano przez gęste sitko. Otrzymany proszek acetonowy przechowywano w chłodzie w temperaturze -10°C w szczelnie zamkniętym naczyniu.

D. Oczyszczanie preparatu acetonowego oraz pomiar aktywności oksydazy o-dwufenolowej i peroksydazy

Pewną ilość proszku acetonowego przeniesiono do woreczka dializacyjnego z dodatkiem kilku mililitrów buforu fosforanowego 0,1 M o pH=6 zawierającego 0,5% kwasu askorbinowego. Dializowano w dziesięciokrotnej objętości wody w temperaturze 1°C przez 24 godziny. Po dializie mieszaninę odwirowano. Supernatant uzupełniono buforem do znanej objętości. W ten sposób otrzymano roztwór białka częściowo oczyszczony. Przed wykonaniem analiz roztwory enzymatyczne sprawdzono za pomocą 0,001 M 2,6-dwuchlorofenolindofenolu na obecność kwasu askorbinowego. Jeśli próby były negatywne sporządzano dalsze analizy.

Do pomiaru aktywności oksydazy o-dwufenolowej przygotowano mie-

szaninę reagującą z katecholem według Mosbacha (1963). Pomiarów ekstynkcji w czasie dokonano na spektrokolorymetrze „Specol” przy długości fali $\lambda=415$ nm.

Do pomiaru aktywności peroksydazy przygotowano mieszaninę reagującą z benzydynam według Safonowa (1969). Pomiar ekstynkcji w czasie wykonano na tym samym przyrządzie przy $\lambda=400$ nm.

E. Rozdział izozymów peroksydazy metodą elektroforezy dyskowej

Do analiz użyto roztworu enzymatycznego sporządzonego według metody opisanej w rozdziale D.

Elektroforezę dyskową wykonano na żelu poliakrylamidowym według Ornstein (1964) i Davisa (1964). Zymogramy peroksydazy wybarwiano benzydynam i H_2O_2 według Safonowa (1969). Na kolumnę z żelem nanoszono roztwór białka odpowiadający jednakowym ilościom tkanki.

F. Oznaczanie zawartości kwasu chlorogenowego i składu jakościowego związków fenolowych w korze

Aceton, który służył do oczyszczania preparatów białkowych z kory (podrozdz. C), odparowano do sucha. Suchą pozostałość przeznaczono do analizy ilościowej kwasu chlorogenowego (Zucker i Ahrens 1958) i do analizy jakościowej fenoli przy pomocy chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej. Jako wzorców do identyfikacji używano czystych związków fenolowych. Chromatografię bibułową wykonano na bibule Schleicher i Shül 2041.

Stosowano technikę wstępującą dwukierunkową. Używano następujących solwentów:

- butanol : kwas octowy : woda (4 : 1 : 2),
- benzen : kwas octowy : woda (1 : 1 : 1),
- forestal I (kwas octowy : HCl : H_2O ; 30 : 3 : 10),
- forestal II (kwas octowy : HCl : H_2O ; 3 : 1 : 8),
- izopropanol : amoniak : woda (10 : 1 : 1).

W tych solwentach rozwijano chromatogramy w jednym kierunku. W drugim natomiast rozwijano w 3% kwasie octowym.

Do chromatografii cienkowarstwowej użyto żelu GF-254. Chromatogramy rozwijano jednokierunkowo w następujących solwentach:

- benzen : kwas octowy : woda (1 : 1 : 1),
- chloroform : kwas octowy (95 : 5),
- chloroform : octan etylu : kwas mrówkowy (50 : 40 : 10).

Za pomocą obu technik chromatograficznych analizowano wyciągi z kory topoli przed i po hydrolizie kwaśnej (3% HCl, 100°C, 30 min.) i zasadowej (1N NaOH, 20°C, 12h, N_2).

G. Pomiar stopnia degradacji IAA-1-¹⁴C w korze topoli zdrowych i zakażonych *D. populea*

Zrzezy topoli PK-137 i PK-127 wysterylizowano częściowo za pomocą 0,5% sublimatu w roztworze detergentu. Następnie część z nich zakażono *D. populea* w dwóch miejscach, przez przyłożenie do zranienia w korze, kostki agaru pokrytego grzybnią. Zrzezy zakażone i kontrolne umieszczono w sterylnych probówkach z wodą destylowaną i zatkało korkiem. W takich semisterylnych warunkach inkubowano próbki kilka tygodni w komorze hodowlanej w temperaturze 25°C.

W określonym terminie po inokulacji grzybnią zrzezy pobierano do badań. Każdy zrzec podzielono na odcinki. W każdym segmencie robiono małe nacięcie na korze, wypłukano je dokładnie wodą i następnie wprowadzono tam 10 ml IAA-1-¹⁴C o stężeniu 2×10^{-4} M. Odcinki te zawieszono w szczelnie zamkniętych naczynkach, z bibułą nasyconą Ba(OH)₂ na dnie. Co pewien czas odcinki pędów przenoszono do nowych naczynek z wodorotlenkiem baru na bibule. Całość doświadczenia trwała 9 godzin, po czym segmenty topoli usunięto, a krążki bibuły wysuszono w temperaturze pokojowej. Następnie umieszczono je w płynie scyntylacyjnym POP POPOP. Przy pomocy spektrometru scyntylacyjnego PACKARD liczono impulsy pochodzące od ¹⁴CO₂ związanego przez Ba(OH)₂.

Stopień degradacji IAA określono sumując ilość impulsów pochodzących od ¹⁴CO₂ w trakcie całego doświadczenia.

H. Wpływ polifenoli na dekarboksylację IAA¹⁴C

Do badań użyto proszku acetonowego z rozwijających się pąków topoli jako dostarczyciela enzymów do degradacji IAA. Do naczynek Warburga wsypano 10 mg tego proszku, dodano 1 ml buforu fosforanowego 0,1 M o pH=6,0 oraz radioaktywny IAA w stężeniu końcowym 10⁻⁶M. Reakcję rozpoczęto wlewając z ramienia bocznego 1 ml roztworu kwasu chlorogenowego lub katecholu w stężeniu 5×10^{-3} M. W studzienkach naczynek umieszczono małe krążki bibuły nasyconej Ba(OH)₂, którą zmieniano co 1 godzinę. Krążki z zaabsorbowanym ¹⁴CO₂ wysuszono i mierzono ich radioaktywność przy pomocy antykoicydencyjnego licznika Geigera-Müllera. Reakcję wydzielania ¹⁴CO₂ kontrolowano w ciągu 4 godzin od chwili aplikacji IAA-1-¹⁴C.

I. Zdolność *Dothichiza populea* do syntezy IAA z tryptofanu

Na podłoże syntetyczne uboższe w cukry zawierające 150 mg/l L-tryptofanu wszczepiono grzybnię *Dothichiza populea*. Do niektórych wariantów dodano 0,5% wyciągu z kory topoli. Po tygodniu hodowli w temperaturze 25°C grzybnię oddzielono od filtratu i ekstrahowano przez kilka dni eterem. Filtrat zakwaszono pH=3 i również ekstrahowano eterem.

Wyciągi eterowe analizowano za pomocą testu skrzywieniowego *Avena* (Larsen, 1955) oraz chromatografii cienkowarstwowej na żelu GF-254. Do rozwijania chromatogramów używano solwentu: benzen : kwas octowy

(99 : 1). Chromatogramy spryskiwano odczynnikami Prochazki (Kaldewaya, 1969) i oglądano fluorescencję pochodnych indolowych w UV 254 i 356 nm.

J. Degradacja IAA przez *Dothichiza populea*

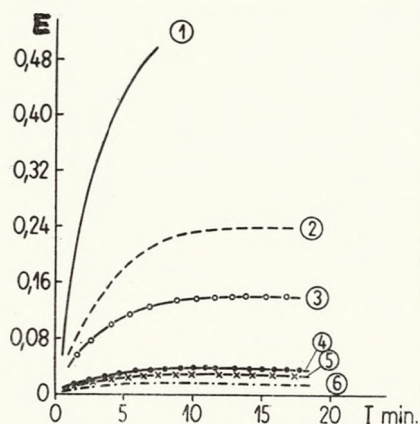
Do dziesięciodniowej kultury patogenu na podłożu syntetycznym z dodatkiem 0,5% wyciągu z kory topoli i bez, wprowadzono sterylnie 20 mg/l IAA. Po trzech dniach i po tygodniu materiał pobierano do analizy.

Z grzybni i filtratu sporządzono wyciągi eterowe, które analizowano za pomocą testu skrzywienia *Avena* oraz chromatografii cienkowarstwowej, analogicznie jak w doświadczeniu z tryptofanem (podrozdz. I).

3. WYNIKI

Aktywność oksydazy o-dwufenolowej w korze topoli przed infekcją grzybem *Dothichiza populea* przedstawiono na rycinie 7.

Badane topole są bardzo zróżnicowane między sobą pod względem aktywności oksydazy o-dwufenolowej. Gatunki, które Siwec ki (1969) na podstawie testów ze sztucznym zakażaniem uznał za odporne, charakte-



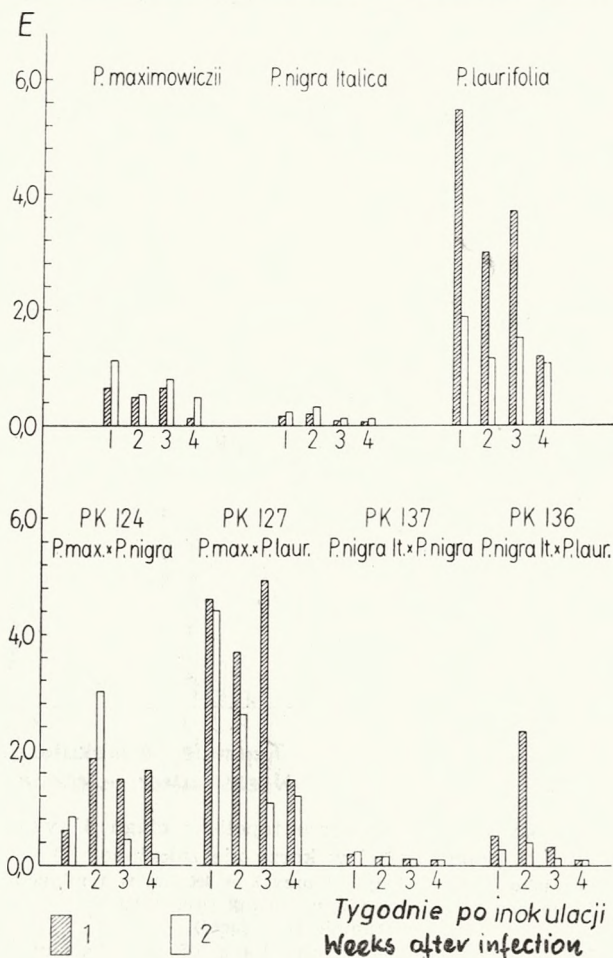
Ryc. 7. Aktywność oksydazy o-dwufenolowej w korze topoli przed infekcją
1 — PK-127, 2 — *P. laurifolia*, 3 — *P. maximowiczii*,
4 — PK-136, 5 — PK-137, 6 — *P. nigra 'Italica'*.
(Aktywność wyrażono jako wzrost ekstynkcji po dodaniu 0,05 M katecholu do 10 mg/ml preparatu z kory)
Fig. 7. Activity of o-diphenol oxidase in the bark of poplars before infection
1 — PK-127, 2 — *P. laurifolia*, 3 — *P. maximowiczii*,
4 — PK-136, 5 — PK-137, 6 — *P. nigra 'Italica'*. (The activity was expressed as an increase in O.D. at 415 nm after supplying 0.05 M catechol to 10 mg/ml of bark extract)

ryzują się kilkakrotnie wyższą aktywnością tego enzymu (PK-127 — 1, *P. laurifolia* — 2, *P. maximowiczii* — 3) niż gatunki scharakteryzowane jako wrażliwe (PK-137 — 5, *P. nigra 'Italica'* — 6). Istnieje zatem prosta zależność między aktywnością oksydazy o-dwufenolowej a odpornością na *D. populea* badanych topoli.

W czasie rozwoju choroby zachowana jest w dalszym ciągu ta zależność, przy czym daje się zauważyć dalszy wzrost aktywności tego enzymu w korze topoli odpornych (ryc. 8).

Analogiczne zmiany w aktywności peroksydazy w korze topoli pod-

czas infekcji obrazuje rycina 9. Zróznicowanie badanych topoli pod względem aktywności peroksydazy jest znacznie mniejsze niż w przypadku oksydazy o-dwufenolowej. Przed infekcją aktywność peroksydazy u wszy-



Ryc. 8. Aktywność oksydazy o-dwufenolowej w korze topoli w ciągu 4 tygodni po inokulacji *D. populea* (1) i w korze nie zakażonej (2)

Aktywność wyrażono jako wartość ekstynkcji przy $\lambda = 415 \text{ nm}$ w 5 min. reakcji z 0,05 M katecholem. (Ekstynkcję podano w przeliczeniu na 10 mg preparatu acetonowego z kory w mieszaninie reagującej)

Fig. 8. The activity of o-diphenol oxidase in the bark of poplars during 4 weeks after inoculation with *D. populea* (1) and non-infected bark (2)

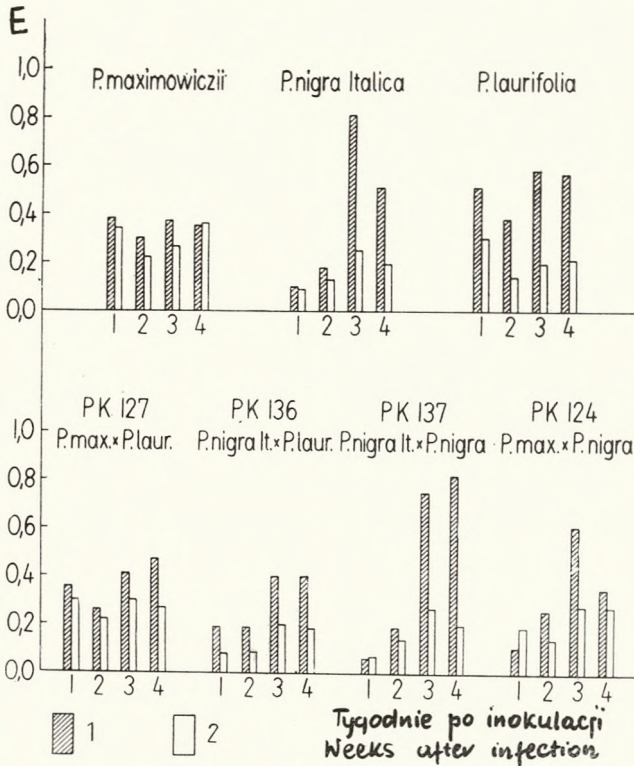
The activity was expressed as O.D. at 415 nm after 5 min. of reacting with 0.05 M catechol. (O.D. was given converted to 10 mg of acetone powder from the bark)

stkich topoli jest prawie wyrównana ale w czasie rozwoju choroby zaznacza się wyraźny wzrost aktywności, przy czym jest on wyższy dla odmian wrażliwych jak: *P. nigra* 'Italica', PK-137.

Wzrost aktywności peroksydazy w zakażonych pędach można również zaobserwować na zymogramach z elektroforetycznego rozdzielania preparatu

enzymatycznego (ryc. 10 - 16). We wszystkich przypadkach rozdzielano roztwór białka odpowiadający jednakowym ilościom tkanki i dlatego wszystkie zymogramy są pomiędzy sobą porównywalne.

Peroksydaza rozdziela się elektroforetycznie na trzy podstawowe grupy



Ryc. 9. Aktywność peroksydazy w korze topoli w ciągu 4 tygodni po inokulacji *D. populea* (1) i w korze nie zakażonej (2)

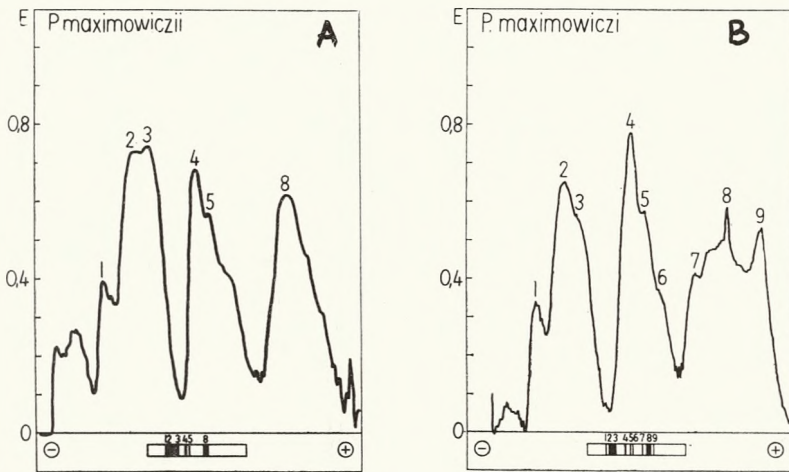
Aktywność wyrażono jako wartość ekstynkcji przy $\lambda = 400 \text{ nm}$ w 1 minucie reakcji benzidyny i H_2O_2 . (Ekstynkcję podano w przeliczeniu na 10 mg preparatu acetonowego z kory w mieszaninie reagującej)

Fig. 9. The activity of peroxidase in the bark of poplars during 4 weeks after inoculation with *D. populea* (1) and non-infected bark (2)

The activity was expressed as the value of the O.D. at 400 nm after 1 min. of reaction with benzidine and H_2O_2 . (O.D. was given converted to 10 mg acetone powder from the bark)

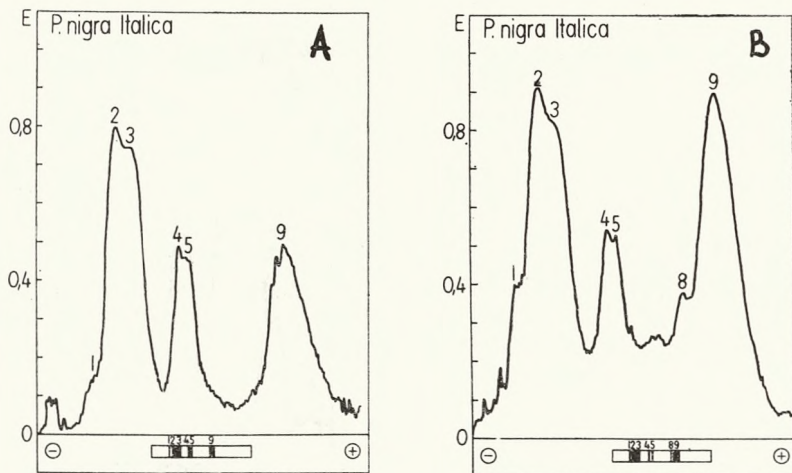
izoenzymów pod względem szybkości migracji w polu elektrycznym. Pierwszą grupę stanowią pasma 1, 2, 3, przy czym pasma 2 i 3 były tak aktywne, że można je było odróżnić tylko przy pomocy densytometru. W skład drugiej grupy wchodzi pasma 4, 5, 6, których aktywność jest na ogół mniejsza od następnej grupy izoenzymów obejmujących pasma 7, 8, 9.

Pomiaru aktywności oksydazy o-dwufenolowej i peroksydazy dokonano również w korze dwuletnich pędów topoli rosnących na plantacji. Wyniki przedstawiono na rycinie 17 oraz w tabeli 9.



Ryc. 10. Izozymy peroksydazy w korze badanych topoli: A — zdrowych, B — porażonych *D. populea*

Fig. 10. Isozymes of peroxidase in the bark of the studied poplars: A — healthy, B — infected by *D. populea*

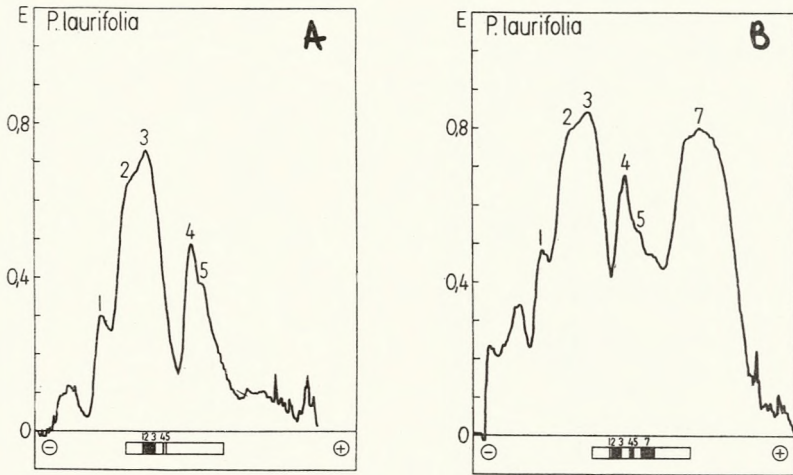


Ryc. 11. Izozymy peroksydazy w korze badanych topoli: A — zdrowych, B — porażonych *D. populea*

Fig. 11. Isozymes of peroxidase in the bark of the studied poplars; A — healthy, B — infected by *D. populea*

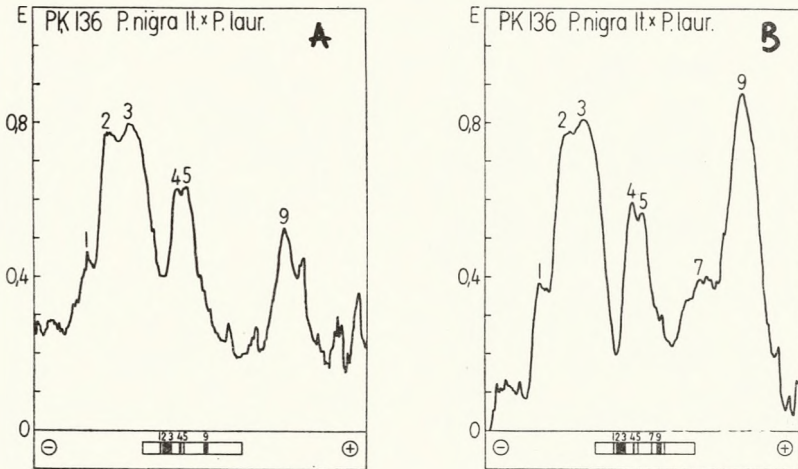
Wybrane topole różnią się między sobą aktywnością oksydazy o-dwufenolowej, przy czym wyraźnie oddzielają się od siebie sekcje *Tacamahaca* i *Aigeiros*.

Na ogół otrzymane wyniki pokrywają się z wiadomościami hodowców o odporności badanych topoli na *D. populea* osiągniętymi w drodze długoletnich obserwacji. Topole o wyższej aktywności oksydazy o-dwufenolowej są odporniejsze na grzyb *Diothichiza populea*.



Ryc. 12. Izozymy peroksydazy w korze badanych topoli: A — zdrowych, B — porażonych *D. populea*

Fig. 12. Isozymes of peroxidase in the bark of the studied poplars: A — healthy, B — infected by *D. populea*



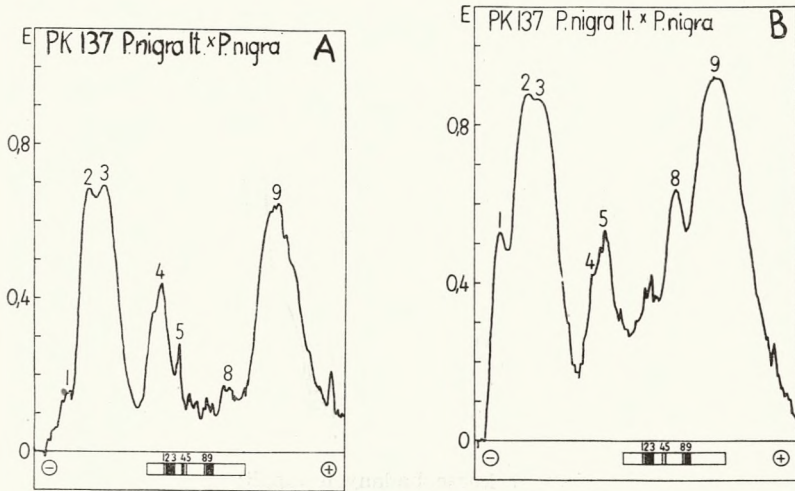
Ryc. 13. Izozymy peroksydazy w korze badanych topoli: A — zdrowych, B — porażonych *D. populea*

Fig. 13. Isozymes of peroxidase in the bark of the studied poplars: A — healthy, B — infected by *D. populea*

Podobnie jak w poprzednich eksperymentach aktywność peroksydazy nie jest skorelowana z odpornością topoli.

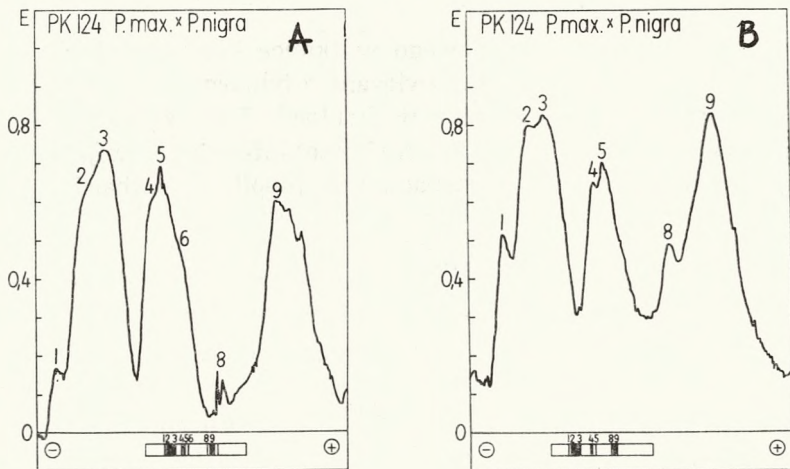
Aktywność wyrażona jest jako ekstynkcja w 2 min. reakcji określonej ilości preparatu enzymatycznego z kory z benzydynam i H_2O_2 , mierzona przy $\lambda=400$ nm.

Badając skład jakościowy związków fenolowych w korze topoli za po-



Ryc. 14. Izozymy peroksydazy w korze badanych topoli: A — zdrowych, B. — porażonych *D. populea*

Fig. 14. Isozymes of peroxidase in the bark of the studied poplars: A — healthy, B — infected by *D. populea*



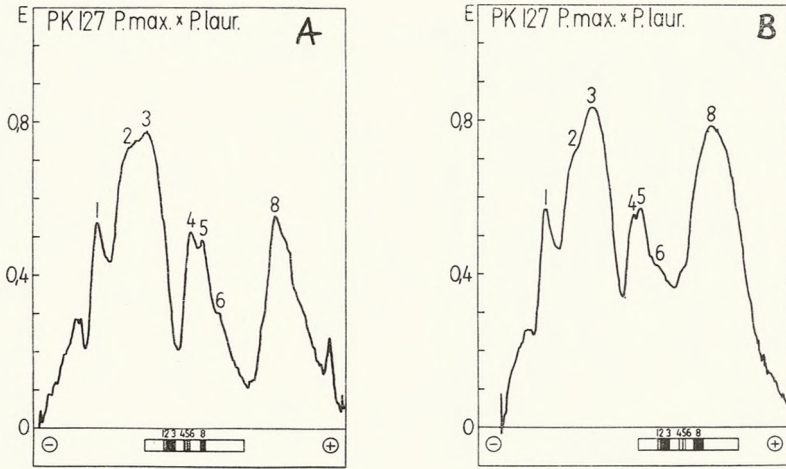
Ryc. 15. Izozymy peroksydazy w korze badanych topoli: A — zdrowych, B — porażonych *D. populea*

Fig. 15. Isozymes of peroxidase in the bark of the studied poplars: A — healthy, B — infected by *D. populea*

moją chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej stwierdzono występowanie następujących związków (tab. 10).

Jak widać większość tych substancji przetestowano pod względem toksyczności dla *D. populea* (tab. 3).

Nie stwierdzono różnic w składzie jakościowym fenoli w zakażonych pędach.

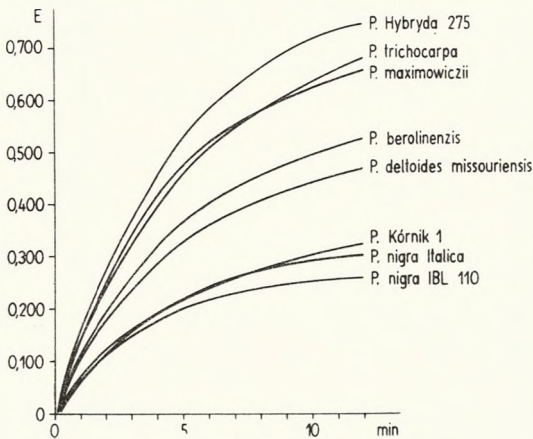


Ryc. 16. Izozymy peroksydazy w korze badanych topoli: A — zdrowych, B — porażonych *D. populea*

Fig. 16. Isozymes of peroxidase in the bark of the studied poplars: A — healthy, B — infected by *D. populea*

Zachodzą natomiast zmiany w zawartości kwasu chlorogenowego w korze topoli zakażonych (tab. 11).

Zawartość kwasu chlorogenowego w tkance kory topoli nie podlega regularnym zmianom ani nie jest związana z odpornością. Jest ona raczej związana z przenikaniem patogenu w tkankach. Dotyczy to przede wszystkim mieszańca PK-137, w którego korze infekcja rozwijała się najszybciej spośród wszystkich przebadanych topoli. U najbardziej odpor-



Ryc. 17. Aktywność oksydazy o-dwufenolowej w korze dwuletnich pędów topoli

Fig. 17. O-diphenol oxidase in the bark of two year old shoots of poplars

nego mieszańca PK-127 obserwowano pewien wzrost zawartości kwasu chlorogenowego tylko w pierwszym tygodniu po infekcji, po czym nastąpił spadek zawartości w porównaniu z kontrolą.

Tabela 9

Aktywność peroksydazy w korze dwuletnich pędów topoli
 Peroxidase activity in the bark of two-year-old poplar shoots

| Gatunek, odmiana, mieszaniec Species, variety, hybrid | Ekstynkcja $\lambda = 400$ nm Optical density at 400 nm |
|--|--|
| hybrida 275 (<i>maximowiczii</i> \times <i>trichocarpa</i>) | 0,125 |
| <i>trichocarpa</i> | 0,235 |
| <i>maximowiczii</i> | 0,195 |
| <i>berolinensis</i> | |
| (<i>laurifolia</i> \times <i>nigra</i> 'It.') | 0,145 |
| <i>deltooides missouriensis</i> | 0,185 |
| Kórnik 1 | |
| (<i>maximowiczii</i> \times <i>nigra</i> 'It.') | 0,150 |
| <i>nigra</i> 'Italica' | 0,200 |
| <i>nigra</i> IBL 110 | 0,235 |
| <i>angulata</i> | 0,490 |
| Kórnik 23 | |
| (<i>angulata</i> \times <i>berolinensis</i>) | 0,370 |
| hybrida 277 | |
| (<i>maximowiczii</i> \times <i>berolinensis</i>) | 0,120 |

Po podaniu do tkanki kory radioaktywnego IAA stwierdzono, że najwyższa dekarboksylacja zachodzi w miejscach zakażenia, chociaż w przypadku mechanicznego zranienia może także wystąpić pewien wzrost degradacji auksyny.

Wyniki doświadczenia nie dają jednoznacznej odpowiedzi czy rozkład IAA spowodował tylko system enzymatyczny rośliny, pobudzony przez infekcję patogenu, czy też następował on z udziałem enzymów pasożyta.

W związku z tym dokonano pomiaru degradacji auksyny w preparacie enzymatycznym z gospodarza i w czystych kulturach grzybowych. Możliwość rozkładu IAA przez enzymy gospodarza w obecności polifenoli: kwasu chlorogenowego i katecholu obrazuje tabela 12.

W obecności katecholu stwierdzono intensywną dekarboksylację przy czym roztwór bardzo szybko zabarwia się na brązowo wskutek utlenienia substratu. Utlenienie kwasu chlorogenowego zachodzi dużo wolniej (roztwór zabarwia się na kolor żółto-brązowy dopiero po kilku godzinach) i proces rozkładu auksyny jest mniej intensywny.

W tabeli 13 przedstawiono zdolność *D. populea* do rozkładu IAA.

Z tabeli 13 wynika, że degradacja IAA postępowała szybciej w obecności ekstraktu z kory topoli. Nasuwa się przypuszczenie, że enzymem degradującym auksynę jest lakkaza, a nie proksydaza, ponieważ ta ostatnia byłaby hamowana przez polifenole podane w ekstrakcie z kory.

W celu zbadania czy IAA podany do kultury grzybni nie adsorbuje się na niej mechanicznie ekstrahowano eterem odfiltrowaną grzybnię. Otrzymane aktywności auksyny nie przekraczały jednak 1% zawartości IAA w filtracie.

Tabela 10

Substancje fenolowe występujące w korze badanych gatunków topoli
Phenolic substances occurring in the bark of the studied poplar species

| Fenole Phenols | <i>P. maxi- mowiczii</i> | <i>P. lauri- folia</i> | PK - 127 | <i>P. nigra</i> 'It'. | PK - 137 | PK - 136 | PK - 124 |
|--|------------------------------|----------------------------|----------|--------------------------|----------|----------|----------|
| Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| D-katechina D-catechin | - | - | - | + | + | ± | ± |
| Salicyna Salicin | + | + | + | + | + | + | + |
| Saligenina Saligenin | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas salicylowy Salicylic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Katechol Catechol | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas p-OH benzoesowy 4-hydroxybenzoic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas gentyzynowy Gentisic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas waniliowy Vanillic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas syringowy Syringic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas cynamonowy Cinnamic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas 4-OH cynamonowy 4-Hydroxycinnamic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas kawowy Caffeic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwas ferulowy Ferulic acid | + | + | + | + | + | + | + |
| Kwercetyna Quercetin | - | - | - | + | + | + | + |
| Kempferol Kaemferol | - | - | - | + | + | + | + |
| Kwercetyna-glukoza Quercetin-glucose | - | - | - | + | + | + | + |
| Kempferol-glukoza Kaemferol-glucose | - | - | - | + | + | + | + |

Tabela 11

Zawartość kwasu chlorogenowego (% świeżej masy) w korze topoli podczas infekcji *D. populea*
Content of chlorogenic acid (% of fresh weight) in the bark of poplars during infection by
D. populea

| Gatunek topoli Species | Tygodnie po infekcji Weeks after infection | | | | | | | |
|---------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|
| | I | | II | | III | | IV | |
| | K | Z | K | Z | K | Z | K | Z |
| <i>maximowiczii</i> | 1,89 | 2,19 | 1,25 | 1,84 | 1,79 | 1,74 | 2,40 | 2,00 |
| <i>nigra</i> 'Italica' | 1,82 | 2,42 | 2,03 | 2,37 | 1,93 | 1,84 | 1,65 | 3,00 |
| <i>laurifolia</i> | 2,49 | 2,21 | 1,62 | - | 1,69 | 1,33 | 1,94 | 2,40 |
| PK - 136 | 1,95 | 2,19 | 1,47 | 1,58 | 1,93 | 1,51 | 1,62 | 2,77 |
| PK - 137 | 2,73 | 2,79 | 2,00 | 5,09 | 2,54 | 4,65 | 2,83 | 4,30 |
| PK - 124 | 1,84 | 2,40 | 1,67 | 1,71 | 1,57 | 2,77 | 1,91 | 1,00 |
| PK - 127 | 2,09 | 2,51 | 2,32 | 1,92 | 2,83 | 1,86 | 3,00 | 1,00 |

Tabela 12

Dekarboksylacja IAA-1-¹⁴C w obecności preparatu enzymatycznego z rozwijających się pąków liściowych topoli porażonych *D. populea* (Z) i zdrowych (K) oraz w obecności polifenoli w stężeniu 5×10^{-3} M, po 4 godzinach inkubacji

Decarboxylation of IAA-1-¹⁴C in the presence of an enzyme preparation obtained from developing leaf buds of poplars infected by *Dothichiza populea* (Z) and healthy (K), in the presence of polyphenols at 10^{-3} M concentrations, after 4 hours of incubation

| Polifenol Polyphenol | Stoień dekarboksylacji IAA (¹⁴ CO ₂ imp/min.) Rate of decarboxylation of IAA | | | |
|---|--|-----|----------|-----|
| | PK - 137 | | PK - 127 | |
| | Z | K | Z | K |
| Kwas chlorogenowy Chlorogenic acid | 132 | 153 | 164 | 130 |
| Katechol Catechol | 246 | 321 | 284 | 299 |
| Kontrola bez fenolu Control without phenol | 135 | 206 | 172 | 144 |

Tabela 13

Rozkład IAA przez grzybnię *Dothichiza populea* w podłożu płynnym
Decomposition of IAA by the mycelium of *Dothichiza populea* in a fluid medium

| Mieszanina reagująca w kulturze Reaction mixture | Okres inkubacji z <i>D. populea</i> Time of incubation with <i>D. populea</i> | |
|---|--|-----------------|
| | 3 dni 3 days | 7 dni 7 days |
| Kora 0,5%+IAA Bark extract 0.5%+IAA | 208,0 | 25,6 |
| IAA | 288,0 | 105,0 |
| Kora 0,5% Bark extract 0.5% | 0,1 | 0,0 |
| Kultura bez dodatków Basal medium | 0,25 | 0,05 |

(W tabeli podano IAA w ng pozostały w filtracie po inkubacji z grzybnią. Zawartość wyjściowa auxyny wynosiła 10 000 ng).

(In the table IAA is given in ng remaining in the filtrate after incubation with the mycelium. The initial quantity of auxin amounted to 10 000 ng).

Tabela 14

Produkty rozkładu IAA przez grzybnię *Dothichiza populea* w wyciągu eterowym z filtratu
The products of IAA degradation by the mycelium of *Dothichiza populea* in an ether extract from the filtrate

| Solvent Solvent | Rf plamy Rf spot | Odczynnik Prochazki Prochazka reagent | | Rf wzorca Rf of standard | Nazwa związku Compound |
|------------------------------|---------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------------|--|
| | | Światło widz. Visible light | UV | | |
| Benzen : dioxan (66 + 35) | 0,30 | fioletowy violet | czarny black | 0,30 | kwas indolo-3-karboksylowy (ICA) indole-3-carboxylic acid |
| Benzen : dioxan (66 ÷ 35) | 0,55 | szary gray | szaro-brązowy gray-brown | 0,55 | aldehyd indolowy indole-aldehyd |
| Benzen : dioxan (66 ÷ 35) | 0,70 | pomarańczowo-żółty orange-yellow | pomarańczowy orange | 0,70 | indolo-3-etanol (tryptofol) indole-3-ethanol |

Dla zbadania jakie pochodne indolowe powstały w wyniku inkubacji IAA z grzybnią wyciąg eterowy z filtratu badano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej. Wyniki analizy podano w tabeli 14.

Dothichiza populea powoduje przekształcenie auksyny do produktów nieaktywnych biologicznie jak: kwas indolokarboksylowy i aldehyd indolowy. Drugą drogą reakcji jest redukcja IAA do tryptofolu.

Hodując grzybnię *Dothichiza* na podłożu zawierającym 150 mg/l L-tryptofanu stwierdzono, że grzybnia może przekształcać ten aminokwas do auksyny.

Tabela 15

Aktywność auksyny w filtracie z kultury grzybowej hodowanej w obecności L-tryptofanu (150 mg/l)
The activity of auxin in the filtrate from a fungal culture in the presence of L-tryptophan (150 mg/l)

| Mieszanina reagująca w kulturze Reaction mixture | Okres inkubacji z <i>D. populea</i> Time of incubation with <i>D. populea</i> | |
|---|--|-------------------|
| | 10 dni 10 days | 20 dni 20 days |
| Kora 0,5% + L-tryptofan Bark extract 0.5% + L-tryptophan | 324,0 | 376,0 |
| L-tryptofan L-tryptophan | 78,0 | 232,0 |
| Kora 0,5 % Bark extract 0.5 % | 0,0 | 17,2 |
| Kultura bez dodatków Basal medium | 0,0 | 23,6 |

(W tabeli podano aktywność auksyny przeliczoną na zawartość IAA w ng).

Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej udało się zidentyfikować w ekstrakcie eterowym z filtratu następujące produkty indolowe:

Tabela 16

Produkty metabolizmu L-tryptofanu w kulturze *Dothichiza populea*
The products of the metabolism of L-tryptophan in a culture of *Dothichiza populea*

| Solvent Solvent | Rf plamy Rf spot | Odczynnik Prochazki Prochazka reagent | | Rf wzorca Rf of standard | Nazwa związku Compound |
|----------------------------------|---------------------------|--|------------------------|-----------------------------------|---|
| | | Światło widz. Visible light | UV | | |
| Benzen : kwas octowy (99 : 1) | 0,05 | szaro-żółty gray-yellow | pomarańczowy orange | 0,05 | acetylotryptofan N-acetyl-tryptophan |
| Benzen : kwas octowy (99 : 1) | 0,42 | pomarańczowo-żółty orange-yellow | pomarańczowy orange | 0,42 | tryptofol indole-3-ethanol |
| Benzen : kwas octowy (99 : 1) | 0,45 | brązowo-żółty brown-yellow | żółty yellow | 0,45 | IAA IAA |

IV. DEGRADACJA WYSOKOCZAŚTECZKOWYCH SKŁADNIKÓW
ŚCIAN KOMÓRKOWYCH

1. PRZEGLĄD LITERATURY

Podstawowymi składnikami ścian komórkowych roślin są: celuloza, hemiceluloza i lignina. Są to związki wysokomolekularne o mniej lub bardziej skomplikowanej budowie.

Mikroorganizmy patogenne, przenikające tkanki roślinne, muszą odznaczać się zdolnością do destrukcji komponentów ścian komórkowych. Uważa się, że istnieje prosta zależność między zdolnością rozkładu polisacharydów, a wirulencją mikroorganizmów (Albersheim 1969). Najczęściej patogeny wyposażone są w system enzymatyczny rozkładający składniki wielocukrowe ścian komórkowych (celulazy i pektynazy), które są związkami o stosunkowo prostej budowie chemicznej. Niektóre jednak posiadają także zdolność do rozkładu ligniny, polimeru złożonego ze związków aromatycznych, powiązanych ze sobą różnymi typami wiązań chemicznych, bardziej odpornych na działanie enzymów.

Celulazy i pektynazy są enzymami zewnątrzkomórkowymi, produkowanymi przez mikroorganizmy po zetknięciu się z substratem. Aktywność tych hydrolaz może być zahamowana w obecności cukrów prostych, w szczególności produktów rozpadu ścian komórkowych gospodarza. Na przykład Horton i Keen (1966) zaobserwowali, że *Pyrenochaeta terrestris* syntetyzuje celulazę w obecności celulozy, ale gdy w podłożu koncentracja glukozy wyniesie 0.005 M następuje represja syntezy tego enzymu. Podobnie Biehn i Diamond (1971a) zaobserwowali znaczne zmniejszenie produkcji poligalakturonazy przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* gdy w podłożu znalazła się galaktoza. Taki sam efekt powodował kwas galakturonowy i glukoza (Biehn i Diamond, 1971b). Równocześnie niektóre składniki roślinne mogą powodować zwiększenie syntezy hydrolaz. Biehn i Diamond (1971b) stwierdzili, że działanie takie wykazuje nierozpuszczalna w etanolu frakcja kory wiązu, w obecności, której produkcja poligalakturonazy przez *Ceratocystis ulmi* wzrasta prawie 50 krotnie.

Reakcja obronna rośliny przeciw patogenom powodującym degradację celulozy i pektyny, polegałaby na hamowaniu syntezy enzymów hydrolizujących ściany komórkowe lub ich inaktywacji. Pierwszą możliwość gospodarz może osiągać poprzez odpowiednią koncentrację węglowodanów w miejscu wtargnięcia patogenu.

Patil i Diamond (1968) stwierdzili, że podanie glukozy na łodygi pomidora zakażone *Fusarium oxysporum*, zmniejsza efekt infekcji.

Niektóre substancje znajdujące się w komórkach lub w ścianach komórkowych mogą mieć wpływ na zmniejszanie aktywności enzymów hydrolitycznych patogenu. Takimi substancjami są fenole. Wykazano, że same związki fenolowe a zwłaszcza produkty ich utleniania powodują

zmniejszanie aktywności celulazy i poligalakturonazy (Lyr, 1965; Okasha i inni, 1968; Bhatia i inni, 1972; Patil i Diamond, 1967 i 1968) prawdopodobnie na skutek utleniania grup —SH tych enzymów. Albersheim (1971) wykazał ostatnio, że niektóre składniki ścian komórkowych natury białkowej, także hamują aktywność poligalakturonazy mikroorganizmów pasożytniczych.

Niektóre drobnoustroje mają zdolność do destrukcji ligniny. Najlepiej poznane z nich to grzyby białej i brunatnej zgnilizny. Degradacja ligniny zachodzi pod wpływem enzymów typu peroksydazy, lakkazy i tyrozynazy. W przypadku białej zgnilizny następuje całkowity rozkład ligniny, natomiast grzyby brunatnej zgnilizny rozkładają celulozę i częściowo ligninę.

Trojanowski i Leonowicz (1970) są zdania, że pierwszym etapem rozkładu ligniny jest demetylacja. Oderwanie grup metylowych od cząsteczki ligniny powoduje peroksydaza. Na skutek tego procesu powstają ugrupowania o-dwufenolowe, które pod wpływem lakkazy utleniane są dalej do chinonów. Jak wiadomo chinony stanowią silny układ elektrofilny, co może doprowadzić w końcu do rozerwania wiązań eterowych w ligninie. Uwalniają się wtedy pochodne fenylpropanu, które mogą ulegać dalszym przemianom do kwasu protokatechusowego. Końcowym etapem degradacji ligniny jest rozerwanie pierścienia aromatycznego, czego dokonuje enzym oksygenaza kwasu protokatechusowego. Ten schemat degradacji ligniny potwierdza szereg autorów, śledząc etapy rozkładu podawanych do kultury grzybów związków o charakterystycznych dla ligniny wiązaniach i ugrupowaniach (Fuzukumi i inni, 1964, 1965; Ishikawa i inni, 1963, 1964, 1966).

2. MATERIAŁY I METODY

A. Substraty i podłoże do syntezy enzymów celulolitycznych i pektolitycznych przez *D. populea*

Jako substratów w badaniach nad enzymami hydrolitycznymi produkowanymi przez *D. populea* używano pektynę cytrusową (Pectin NF, Sunkist) i karboksymetylcelulozę — CMC (Koch-Light).

Podłoże do syntezy enzymów:

| | | | | | |
|-----------------------------------|---|----------|-------------------|---|------------|
| MgSO ₄ | — | 0,5 g, | MnSO ₄ | — | 5,0 mg, |
| KH ₂ PO ₄ | — | 0,5 g, | tiamina | — | 100,0 ng, |
| NH ₄ NO ₃ | — | 0,5 g, | biotyna | — | 5,0 ng, |
| Fe(NO ₃) ₃ | — | 10 mg, | H ₂ O | — | 1000,0 ml, |
| ZnSO ₄ | — | 0,25 mg, | pH = 5,6, | — | 10,0 g |
| CaCl ₂ | — | 5,0 mg, | pektyna cytrusowa | — | 10 g. |
| | | | lub CMC | | |

B. Wpływ substancji fenolowych na syntezę enzymów pektolitycznych i celulolitycznych przez *Dothichiza populea*

Pożywkę rozlano do probówek o średnicy 2,5 cm po 15 ml i sterylizowano w 0,75 atm. przez 1/2 godz. Następnie sterylnie wprowadzono substancje fenolowe w takiej ilości, że ich końcowe stężenie wynosiło 10^{-8} M. Do każdej probówki wszczepiono jednakowe inokulum grzybni *Dothichiza populea*. Inkubowano na wytrząsarce w temperaturze 25°C. W odpowiednich terminach pobierano materiał do analiz.

Ubytek substratu mierzono oznaczając za pomocą wiskozymetru Ostwalda lepkość podłoża w trzech probówkach z tym samym fenolem. Obliczono średnią pomiarów i wyznaczono jaki stanowi procent w stosunku do stanu wyjściowego. Grzybnię natychmiast oddzielono od podłoża i wyznaczono jej suchą masę. Kontrolę stanowiło podłoże bez związków fenolowych.

C. Wpływ wyciągów z kory topoli na syntezę enzymów pektolitycznych i celulolitycznych

Z kory mieszańców PK-127 i PK-137 sporządzono wyciągi alkoholowe. Po odparowaniu etanolu pozostałość podjęto określoną ilością wody.

Do probówek z podłożem zawierającym pektynę cytrusową lub CMC podano takie ilości wyciągów aby ich stężenie wynosiło 1 i 2% w przeliczeniu na świeżą masę kory.

Po sterylizacji wyszczepiono jednakowe inokulum grzybni *Dothichiza populea*. Dalej postępowano analogicznie jak w poprzednim doświadczeniu.

D. Wpływ fenoli i ich produktów utleniania na aktywność enzymów celulolitycznych i pektolitycznych wydzielanych przez *D. populea*

Podłoże do syntezy enzymów zawierało 0,5% pektyny cytrusowej lub CMC. Po tygodniu inkubacji z grzybnią *Dothichiza populea* filtrat służył jako źródło enzymów peкто- lub celulolitycznych (E).

Roztwór pektyny cytrusowej i CMC służący jako substrat w reakcji enzymatycznej sporządzono według metody podanej przez Lundberga (1970).

Z kory mieszańca PK-127 przygotowano roztwór enzymatyczny (F) według metody opisanej w cz. III. Zawierał on aktywną oksydazę o-dwufenolową.

Sporządzono następujące mieszaniny reagujące:

1 ml (E) ÷ 0,5 ml katecholu ÷ 0,5 ml (F) ÷ 3 ml buforu fosforanowego 0,1 M (pH = 6),

1 ml (E) ÷ 0,5 ml kwasu chlorogenowego ÷ 0,5 ml (F) ÷ 3 ml buforu fosforanowego 0,1 M,

1 ml (E) ÷ 0,5 ml katecholu ÷ 3,5 ml buforu,

1 ml (E) ÷ 0,5 ml kwasu chlorogenowego ÷ 3,5 ml buforu,

1 ml (E) ÷ 0,5 ml (F) ÷ 3,5 ml buforu.

Mieszaniny inkubowano w temperaturze 25°C przez 1 i 6 godzin. Po tym czasie mierzono aktywność hydrolityczną enzymów, przez dodanie substratu i dokonanie pomiaru lepkości roztworu natychmiast, i po półgodzinnej inkubacji w temperaturze 30°C (dla pektynaz) lub 25°C (dla celulazy). Końcowe stężenie fenoli wynosiło 10^{-8} M.

E. Wpływ produktów utleniania wyciągów z kory topoli na aktywność celulazy i pektynaz *Dothichiza populea*

Sporządzono analogiczne mieszaniny jak w poprzednich doświadczeniach z tym, że zamiast fenoli podano wyciągi z kory topoli PK-127 i PK-137 w takich ilościach, że ich końcowe stężenie w środowisku wynosiło 2 i 3% w przeliczeniu na świeżą masę kory.

Czas inkubacji wynosił 6 godzin, po czym mierzono aktywność celulolityczną i pektolityczną jak w poprzednim eksperymencie.

F. Zdolność *Dothichiza populea* do degradacji ligniny

Możliwości destrukcji ligniny przez *D. populea* badano drogą pośrednią, przez hodowlę patogenu na podłożu zawierającym związki ligninopochodne i przez analizowanie produktów rozpadu tych związków. Jako substancji ligninopochodnych użyto α -konidendrynę (Crown Zellerbach) i indulinę (ATR Westvacco) oraz śledzono metabolizm kwasu weratrowego.

a) Degradacja α -konidendryny i induliny. Związki te wprowadzono do podłoża mineralnego w ilości 30 mg/l. Wyszczepiono jednakowe inokulum grzybni *Dothichiza populea*. Inkubowano w temp. 25°C przez 40 dni. Co 10 dni pobierano materiał do analiz. Podłoże przesączano przez sączek szklany G₃. Filtrat zakwaszono do pH = 3 i ekstrahowano trzykrotnie eterem. Frakcję eterową analizowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na żelu GF-254. Pozostałość na sączku suszono i ważono. Następnie α -konidendrynę i indulinę wymywano z sączka za pomocą dioksanu. Na sączku pozostała tylko grzybnia, którą wysuszono i zważono. Zmierzono absorpcję filtratu w UV.

b) Degradacja kwasu weratrowego. Grzybnię *Dothichiza populea* hodowano na podłożu mineralnym zawierającym 10⁻³M kwasu weratrowego. Co 10 dni próbki filtratu analizowano na absorpcję w UV. W ekstrakcie eterowym zaś badano produkty rozpadu kwasu weratrowego.

3. WYNIKI

Zdolność *Dothichiza populea* do rozkładu celulozy i pektyny zbadano wcześniej (P u k a c k a, 1972). Stwierdzono również, że grzyb ten syntetyzuje esterazę pektynianową i poligalakturonazę.

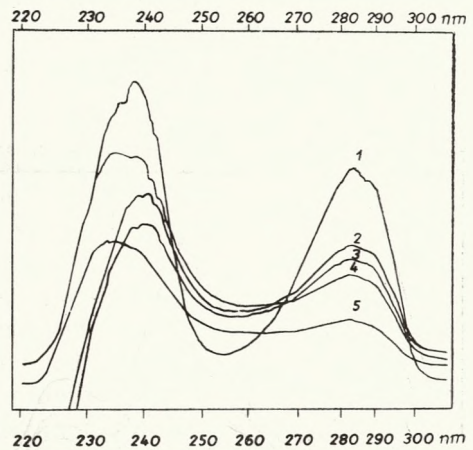
Produkcja enzymów celulolitycznych w podłożu zawierającym kwas salicylowy i chlorogenowy jest opóźniona w stosunku do kontroli pozbawionej związków fenolowych. Równocześnie jednak w tych samych przypadkach daje się zaobserwować słabszy rozwój grzybni. Można więc przypuszczać, że te fenole wpływają na syntezę enzymów poprzez hamowanie wzrostu patogenu.

Analogiczne doświadczenie dla enzymów pektolitycznych nie wykazało różnic we wzroście grzybni na podłożu z fenolami ani w tempie rozkładu pektyny cytrusowej.

Wyciągi z kory mieszańców PK-127 i PK-137 zdrowych i zakażonych *D. populea* zmniejszają produkcję enzymów celulolitycznych patogenu. Nie stwierdzono w tym przypadku ograniczenia wzrostu grzybni. Intere-

sujący jest również fakt, że wyciągi z kory mieszańca odpornego (PK-127) bardziej hamują syntezę enzymów niż wyciągi z kory mieszańca wrażliwego.

Nie stwierdzono żadnego wpływu wymienionych wyciągów na syntezę enzymów pektolitycznych.



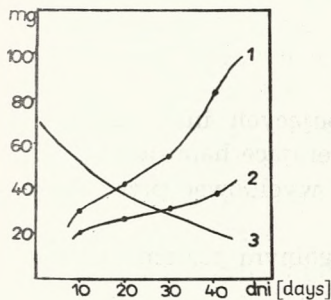
Ryc. 18. Rozkład α -konidendryny w podłożu z *D. populea*

Fig. 18. The decomposition of α -conidendrin in a medium with *D. populea*

Utleniony katechol po 6 godzinnej inkubacji z enzymami hydrolitycznymi *D. populea* wpływał hamująco na aktywność pektynaz. Aktywność celulazy pozostawała nie zmieniona. Produkty utleniania kwasu chlorogenowego w minimalnym stopniu zmniejszały aktywność pektynaz.

Wolne fenole nie odgrywały żadnej roli w aktywności enzymów hydrolitycznych *D. populea*. Podobnie zachowywały się wyciągi z kory topoli oraz produkty ich utleniania.

Rozkład α -konidendryny w podłożu z *D. populea* widoczny jest na ry-



Ryc. 19. Wzrost *Dothichiza populea* na podłożu z α -konidendryną

1 — sucha masa grzybni na podłożu z α -konidendryną, 2 — sucha masa grzybni na podłożu mineralnym, 3 — ubytek substratu w podłożu

Fig. 19. The growth of *Dothichiza populea* on a medium with α -conidendrin

1 — dry weight of mycelium on a medium with α -conidendrin, 2 — dry weight of mycelium on a mineral medium, 3 — loss of substrate from the medium

cinie 18 przedstawiającej widmo absorpcyjne substratu w kolejnych fazach rozwoju patogenu.

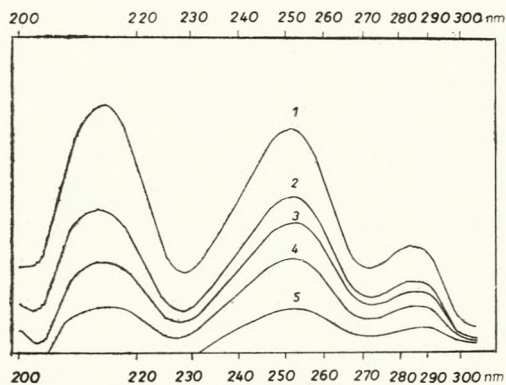
Zauważono również wyraźną zmianę barwy badanego związku. Z białego proszku powstał jasnobezowy. Rozpuszczony w dioksanie dawał wyraźne żółtobrazowe zabarwienie.

Grzybnia rozwijała się wolno, ale w stosunku do kontroli (na podłożu mineralnym) następował przyrost masy.

W filtracie z podłoża stwierdzono występowanie waniliny obok innych nie zidentyfikowanych produktów rozkładu α -konidendryny.

Indulina jest mniej przyswajalnym substratem dla *D. populea*. Stwierdzono bardzo słaby wzrost grzybni na podłożu z tym związkim i nie zauważono jego degradacji.

Dothichiza populea powoduje stosunkowo szybką degradację kwasu



Ryc. 20. Rozkład kwasu weratrowego w podłożu z *D. populea* w ciągu 5 tygodni hodowli
Fig. 20. The decomposition of veratric acid in a medium with *D. populea* during 5 weeks of culture

weratrowego. Już po kilku dniach hodowli zmienia się barwa podłoża z jasnożółtej na brązową.

Rycina 20 przedstawia widmo absorpcyjne kwasu weratrowego w podłożu w kolejnych stadiach rozwoju kultury patogenu.

Analizując produkty rozkładu kwasu weratrowego stwierdzono obecność aldehydu weratrowego, waniliny i kwasu waniliowego.

V. DYSKUSJA

Przeprowadzone badania dostarczyły następujących informacji:

1) w korze topoli występują substancje wywierające hamujący wpływ na rozwój grzybni *Dothichiza populea* (można je wyeluować przez gorącą ekstrakcję etanolem),

2) topole odporne i wrażliwe nie różnią się ogólnym poziomem związków fenolowych, ale ich składem jakościowym,

3) toksyczność fenoli dla patogenu jest różna i uzależniona od pH podłoża,

4) topole odporne charakteryzują się znacznie wyższą aktywnością oksydazy o-dwufenolowej w korze w stosunku do wrażliwych,

5) aktywność peroksydazy nie jest skorelowana z odpornością,

6) w zakażonej tkance zachodzi proces destrukcji auksyny,

7) *Dothichiza populea* charakteryzuje się zdolnością do syntezy i degradacji IAA,

8) *Dothichiza populea* posiada zdolność destrukcji wysokomolekularnych składników drewna.

Początkowym etapem prowadzonych badań było zbadanie czy topole odporne, przed infekcją, dysponują substancjami fungistatycznymi lub nawet toksycznymi dla *D. populea* oraz czy istnieje zróżnicowanie występowania tych substancji u odmian o różnej odporności. Pierwszych dowodów na istnienie takich związków dostarczyły testy, w których badano wpływ wyciągów alkoholowych z kory na wzrost grzybni *Dothichiza populea*. Z uzyskanych wyników wyraźnie widać, że zawartość ekstraktów z kory odmian odpornych bardziej hamuje wzrost grzybni niż z wrażliwych (tab. 4 i 5 oraz ryc. 1-3). W wyciągach etanolowych znajduje się przeważająca ilość niskocząsteczkowych związków fenolowych kory. Szczegółowa analiza ilościowa ekstraktów nie wykazała istotnych różnic w ogólnej zawartości substancji fenolowych pomiędzy badanymi topolami (tab. 9). Różnice takie ujawniono jednakże w toku analizy jakościowej (tab. 10). Okazało się bowiem, że kora *P. nigra* 'Italica' i PK-137 zawiera w znacznych ilościach D-katechinę, kwercetynę, kempferol oraz ich glukozydy. Związków tych nie zauważono w ogóle w wyciągach z kory *P. laurifolia*, *P. maximowiczii* i PK-127. Wymienione substancje flawonoidowe nie należą do najbardziej fungistatycznych dla *D. populea* ale można przypuszczać, że ich przeważający udział we frakcji fenolowej ogranicza możliwości występowania innych związków, które mogłyby wykazywać znaczenie obronne. Testy na toksyczność poszczególnych substancji fenolowych dla rozwoju grzybni *Dothichiza* wykazały, że większość z nich hamuje wzrost patogenu gdy stężenie w pożywce wynosiło 10^{-2} M (tab. 6). Stężenie tego rzędu mogą osiągać niektóre fenole w soku komórkowym roślin. W przypadku badanych topoli taką zawartość może mieć kwas chlorogenowy (tab. 11). Mimo, że związek ten w omawianym teście w stężeniu 10^{-2} M nie zahamował całkowicie wzrostu grzybni, to w warunkach naturalnych w połączeniu z innymi fenolami oraz z enzymami utleniającymi, może mieć pewne znaczenie obronne. Wielu badaczy stwierdziło pozytywną korelację między zawartością kwasu chlorogenowego a odpornością roślin na różnego rodzaju pasożyty (Lee i Le Tourneau, 1958; Johnson i Shaal, 1957; Haniecka, 1970). Natomiast Fehrman i Diamond (1967) wykazali brak zależności odporności na grzyb *Phytophthora* niektórych organów ziemniaka od ilości w nich kwasu chlorogenowego.

Określone związki fenolowe nie zawsze mają podobne działanie w stosunku do wszystkich grzybów i nie zawsze wyniki *in vitro* pokrywają się *in vivo*. W komórkach roślinnych mogą zachodzić podczas infekcji zmiany, które modyfikują toksyczność substancji fenolowych. Na przykład w niniejszej pracy wykazano, że kwas salicylowy hamuje rozwój

Dothichiza populea w stosunkowo niskim stężeniu 10^{-3} M (tab. 7). Równocześnie jednak wykazano, że toksyczność^s jego w dużej mierze zależy od pH środowiska (ryc. 4). W komórkach kory pH soku komórkowego utrzymuje się w zakresie 5-6. Jednak, jak wykazali Bortitz i Breuel (1967), podczas infekcji *D. populea* zmienia się pH w miejscu wtargnięcia patogenu, do alkalicznego. Z tego wynikałoby, że w samym miejscu infekcji kwas salicylowy, jak również inne fenole mogą utracić swoje właściwości fungistatyczne. Dopóki rozmiary infekcji są niewielkie związki fenolowe mogą działać jako czynniki obronne. Kiedy zaś dojdzie do silniejszego rozwoju patogenu, nie są one w stanie ograniczyć infekcji. I tak na przykład w niniejszej pracy stwierdzono kilkakrotnie zwiększenie zawartości kwasu chlorogenowego w komórkach kory topoli wrażliwej PK-137, zakażonej *D. populea* (tab. 11). Mimo to, proces chorobowy rozwijał się tam najbardziej ze wszystkich badanych odmian. Wzrost stężenia kwasu chlorogenowego był prawdopodobnie wynikiem reakcji obronnej rośliny wrażliwej, której komórki były bez przerwy drażnione wydzielinami patogenu. W komórkach roślin odpornych, gdzie infekcja na samym początku została opanowana, tego zjawiska nie zaobserwowano.

Odporność topoli może wynikać nie tylko ze składu chemicznego kory, ale także może być spowodowana przemianami metabolicznymi różnych związków, głównie fenoli, i zależy od aktywności enzymów uczestniczących w tych przemianach jeszcze przed infekcją patogenu.

W niniejszej pracy wykazano, że aktywność oksydazy o-dwufenolowej w korze topoli odpornych jest wielokrotnie wyższa niż u wrażliwych (ryc. 7). Z tego wynika, że te topole jeszcze przed infekcją są bardziej predysponowane do obrony przed *D. populea*. Można sobie bowiem wyobrazić, że gdy na skutek inwazji patogenu związki fenolowe, które są zlokalizowane w wakuoli, znajdują się w kontakcie z enzymami cytoplazmy to nastąpi szybkie ich utlenienie. Pierwszymi produktami utlenienia fenoli przez oksydazy fenolowe są rodniki o charakterze semichinonów, które są szczególnie reaktywne i działając na niektóre wrażliwe fragmenty białek mogą zmniejszać ich aktywność enzymatyczną i powodować denaturalizację. Dalszymi produktami utlenienia fenoli są chinony, a te z kolei polimeryzują do ciemnozabarwionych melanin. Utlenione fenole, melaniny oraz wygarbowane białko tworzą naturalne bariery zapobiegające rozprzestrzenianiu się infekcji (Farkas i Kiraly, 1962).

Badając aktywność oksydazy o-dwufenolowej w korze topoli zakażonej grzybnią *Dothichiza populea* zaobserwowano dalszy jej wzrost u osobników odpornych (ryc. 8). Tak duże różnice w aktywności tej oksydazy między odmianami odpornymi i wrażliwymi są rzadko spotykane. Enzymowi temu wielu badaczy przyznaje niewątpliwą rolę w odporności. Stwierdzono także poinfekcyjny wzrost aktywności oksydazy o-dwufenolowej skorelowany z odpornością (Farkas i inni, 1964; Matta i Di-

mond, 1963; Maxwell i Bateman, 1967; Huber i Andersen, 1964; Weber i inni, 1967).

W niniejszej pracy stwierdzono również różnice w aktywności oksydazy o-dwufenolowej w korze dwuletnich pędów topoli rosnących w terenie, należących do sekcji *Aigeiros* i *Tacamahaca* oraz mieszańców międzysekcyjnych. W przypadku topoli z sekcji *Tacamahaca* aktywność tej oksydazy jest wyraźnie wyższa niż u topoli z sekcji *Aigeiros* (ryc. 17).

Aktywność peroksydazy nie jest skorelowana z odpornością topoli (ryc. 9 i tab. 9). Po infekcji obserwowany był wzrost aktywności peroksydazy wyraźniej zaznaczony u roślin wrażliwych.

Zjawisko wzrostu aktywności peroksydazy po infekcji zaobserwowano u wielu roślin (Johnson i Cunningham, 1971; Weber i inni, 1967; Hampton, 1963; Maxwell i Bateman, 1967; Huber i Andersen, 1964). Nie zawsze jednak wzrost aktywności skorelowany był z odpornością. W niektórych przypadkach rośliny odporne nie wykazywały poinfekcyjnych zmian aktywności peroksydazy (Grzelińska, 1969; Stavely i Hanson, 1967; Patil i inni, 1964).

Przeprowadzony w dalszym etapie badań elektroforetyczny rozdział peroksydazy i materiału zdrowego i zakażonego ukazuje poinfekcyjny wzrost aktywności niektórych izozymów, zarówno u roślin wrażliwych jak i odpornych. Stwierdzono ponadto w niektórych przypadkach ujawnienie się nowych pasm peroksydazy po infekcji (ryc. 10 - 16). Uzyskane wyniki nie pozwalają jednak na powiązanie tego zjawiska z odpornością, ale fakt istnienia tego typu różnic świadczy o interwencji patogenu w system regulacji biosyntezy białek żywiciela. Podobnego zdania są inni badacze, którzy stwierdzili poinfekcyjną biosyntezę nowych izozymów peroksydazy nie wiążąc tego jednak ze zjawiskiem odporności (Staples i Stahmann, 1964; Stavely i Hanson, 1967; Grzelińska, 1969; Maraite, 1973; Reddy i Stahmann, 1972; Farkas i Stahmann, 1966).

Podsumowując wyniki badań nad rolą enzymów utleniających fenole w odporności topoli na infekcję *Dothichiza populea* można stwierdzić, że większe znaczenie w tym względzie posiada oksydaza o-dwufenolowa, peroksydaza natomiast może pogłębiać lub uzupełniać jej działanie.

Rozwój posożyta w tkankach żywiciela wywołuje zmiany w gospodarce hormonalnej (Andel i Fuchs, 1972). Patogen może produkować różnego rodzaju hormony powodujące anormalny wzrost określonych tkanek gospodarza, może on również powodować rozkład istniejących w organizmie roślinnym regulatorów wzrostu (Fahraeus, 1961; Krupasagar i Sequeira, 1969). Z drugiej strony roślina, dzięki swojemu systemowi enzymatycznemu, reguluje poziom auksyn. Degradacja substancji wzrostowych w porażonych tkankach roślinnych może mieć pewne znaczenie w odporności. Patogen penetruje tkanki gospodarza pozbawione auksyny, co wpływa hamująco na jego rozwój, ponieważ wiadomo, że

auksyna steruje mobilizacją substancji pokarmowych. Ponadto stwierdzono, że produkty rozkładu IAA są toksyczne dla niektórych mikroorganizmów (Tuli i Moyed, 1966). Rozkład IAA w roślinie jest katalizowany przez IAA-oksydazę, która jest peroksydazą (Ray, 1958), oraz polifenoloksydazę (Brigs i Ray, 1956; Tomaszewski, 1959). Aktywność IAA-oksydazy może być zahamowana przez polifenole takie jak: skopoletyna, kwas kawowy (Sequeira, 1964). Spadek aktywności IAA-oksydazy i wzrost zawartości auksyny w tkankach porażonych zaobserwowali Shaw i Hawkins (1958) oraz Daly i Deverall (1963). Nie udało się jednak tego zjawiska bezpośrednio połączyć z odpornością (SeEVERS i Daly, 1970). W niektórych przypadkach zachodzi zjawisko odwrotne. Sequeira (1973) twierdzi, że zmniejszenie zawartości IAA w tkankach porażonych może być spowodowane:

- a) przeszkodą w syntezie i transporcie auksyny,
- b) indukcją aktywności IAA-oksydazy przez patogena,
- c) wydzielanie przez pasożyta do środowiska enzymów degradujących auksynę.

Na podstawie podanych faktów z literatury, w niniejszej pracy starano się prześledzić losy IAA znakowanego w grupie karboksylowej, podanego do tkanki kory topoli zdrowych i zakażonych *D. populea*, odpornych i wrażliwych. Zbadano również czy patogen może syntetyzować lub też powodować rozpad auksyny. Wyniki otrzymane z tych eksperymentów starano się połączyć w logiczną całość i porównać z danymi z literatury.

Na podstawie ilości uwolnionego $^{14}\text{CO}_2$ stwierdzono, że szybkość rozkładu IAA w tkankach porażonych jest wyższa w stosunku do zdrowych miejsc kory. Ponadto na uwagę zasługuje duży stopień dekarboksylacji auksyny w tkance odpornego mieszańca PK-127 w drugim tygodniu po inokulacji. Jednakże trudno jest podać jednoznaczną odpowiedź jaki system enzymatyczny powoduje tę degradację. W przypadku mieszańca PK-127 (odpornego) należy się spodziewać, że interwencja patogenu jest niewielka, ponieważ choroba praktycznie się nie rozwijała. Powstała tylko ciemna plama w miejscu inokulacji. Mamy zatem do czynienia z reakcją rośliny i degradacją IAA przez gospodarza. Aktywność IAA-oksydazy może być w miejscu infekcji znacznie obniżona, ponieważ kora topoli zawiera liczne związki polifenolowe. Z poprzednich eksperymentów jednak wiemy, że topole te posiadają bardzo aktywną polifenoloksydazę, która również może powodować dekarboksylację IAA. Przekonano się o tym w następnym doświadczeniu, gdzie badano degradację IAA w obecności preparatu enzymatycznego z pąków topoli oraz katecholu i kwasu chlorogenowego (tab. 12). Obydwa te fenole są inhibitorami IAA-oksydazy, ale katechol jest szybko utleniany przez polifenoloksydazę co stymuluje dekarboksylację IAA. Taka reakcja może zachodzić w badanych topolach, z tym że w przypadku mieszańca wrażliwego (PK-137) część uwolnione-

go $^{14}\text{CO}_2$ może pochodzić od patogenu penetrującego tkankę gospodarza oraz od towarzyszących mu mikroorganizmów epifitycznych.

W kolejnym eksperymencie stwierdzono, że *Dothichiza populea* powoduje szybki rozkład auksyny, przy czym zidentyfikowano kwas indolo-3-karboksylowy (ICA), aldehyd indolowy oraz tryptofol obok innych produktów rozpadu (tab. 13 i 14). Dwa pierwsze związki są już nieaktywne biologicznie i prowadzą do całkowitej destrukcji IAA. Tryptofol natomiast może z powrotem być utleniony do IAA.

Dothichiza populea jest zdolna także do syntezy auksyny z tryptofanu. Jako produkty pośrednie udało się zidentyfikować oprócz IAA jeszcze acetylotryptofan i tryptofol (tab. 15 i 16).

Podsumowując otrzymane wyniki można stwierdzić, że w porażonej korze topoli następuje spadek zawartości IAA dzięki systemowi enzymatycznemu rośliny oraz patogenu. Rola auksyny w odporności nie jest jednak ostatecznie wyjaśniona, ponieważ *Dothichiza* sama może syntetyzować IAA zwłaszcza gdy korzysta z puli aminokwasowej gospodarza.

Grzyb *Dothichiza populea* zdolny jest do produkcji enzymów celulolitycznych i pektolitycznych na podłożu zawierającym odpowiednie substraty (P u k a c k a, 1972). Ten fakt niewątpliwie umożliwia rozprzestrzenianie się patogenu w tkankach gospodarza.

W niniejszej pracy badano wpływ fenoli oraz wyciągów z kory topoli na produkcję i aktywność enzymów celulolitycznych i pektolitycznych *Dothichiza populea*. Odnosnie do pierwszego problemu stwierdzono, że możliwe jest zmniejszenie produkcji enzymów celulolitycznych przez substancje fenolowe oraz wyciągi z kory topoli przy równoczesnym ograniczeniu wzrostu grzybni. W przypadku pektynaz takich wyników nie udało się otrzymać, ponieważ pektyna pobudzała raczej wzrost patogenu.

Wyniki te są analogiczne z rezultatami jakie otrzymali Patil i Dimond (1968). Stwierdzili oni, że niektóre fenole mogą ograniczyć produkcję poligalakturonazy u *Verticillium albo-atrum* z równoczesnym ograniczeniem wzrostu grzyba.

Inaczej ma się sprawa z aktywnością enzymów hydrolitycznych. Wykazano, że same fenole nie mają na nią żadnego wpływu.

Patil i Dimond (1967) stwierdzili to samo u *Verticillium albo-atrum*, natomiast Bhatia i Bajaj (1972) wykazali hamujący wpływ niektórych substancji fenolowych na aktywność poligalakturonazy u *Aspergillus niger*.

W dalszych eksperymentach wykazano, że na aktywność pektynazy *Dothichiza populea* mogą mieć wpływ produkty utleniania fenoli. Po 6 godzinnej inkubacji enzymów pektolitycznych z produktami utleniania katecholu aktywność ich zmniejszyła się o 25%.

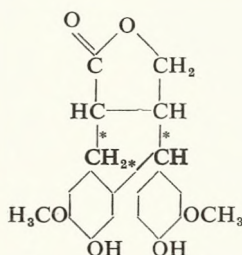
Wyższy stopień zahamowania aktywności enzymów analogicznych przez produkty utleniania polifenoli otrzymali Patil i Dimond

(1967) oraz L y r (1965), ale wyników tych eksperymentów nie można ze sobą porównywać. Zależą one bowiem od zawartości białek w mieszaninie: enzym hydrolityczny — fenol — oksydaza o-dwufenolowa. Produkty utlenienia fenoli — chinony, nie działają na wybrane enzymy ale w ogóle na białka. Powodują one utlenienie grup —SH. Mimo, że grupy te nie są miejscami aktywnymi dla poligalakturonazy (Patil i Diamond 1967) to jednak utlenienie ich inaktywuje częściowo enzym. Patil i Diamond (1967) wykazali, że toksyczne działanie produktów utlenienia fenoli można zmniejszyć przez dodanie do mieszaniny inkubującej niektórych aminokwasów.

Dothichiza populea jest grzybem atakującym korę dwuletnich pędów topoli, powodując ich obumieranie. Z obserwacji drzew porażonych tym patogenem wynika, że atakowane jest również drewno. Dotychczas nie zbadano jakie są możliwości rozkładu składników drewna, a w szczególności ligniny przez *D. populea*. Grzyb ten produkuje enzymy, które biorą udział w rozkładzie ligniny w przypadku innych grzybów, a mianowicie lakkazę i peroksydazę. Zniszczenie drewna przez *D. populea* objawia się w postaci brązowej plamy. Podobne ciemnienie występuje w procesie rozkładu ligniny przez grzyby brunatnej zgnilizny.

Analizując produkty rozkładu kwasu weratrowego przez patogen stwierdzono demetylację tego związku.

Trojanowski i Leonowicz (1970) są zdania, że demetylacja ugrupowań metoksyłowych jest pierwszym etapem w rozkładzie ligniny. Bardzo często proces degradacji tego skomplikowanego związku przez mikroorganizmy śledzi się na substancjach ligninopodobnych, to jest takich, które mają charakterystyczne dla niego grupy i wiązania (Fuz-



α -konidendryna (gwiazdkami oznaczono miejsca gdzie może następować rozerwanie wiązań)

α -conidendrin (with asterisks places where bond can be broken are indicated)

k u m i i inni, 1964 i 1965; I s h i k a w a i inni, 1963, 1964, 1966). Jedną z takich substancji jest α -konidendryna. S u n d m a n (1965) badała degradację α -konidendryny przez bakterie glebowe z rodzaju *Agrobacterium* i jako produkty tego procesu zidentyfikowała kwas waniliowy i metoksy-p-chinon.

W przypadku grzyba *Dothichiza populea* podczas jego wzrostu na

α -konidendrynie rozwój grzybni jest lepszy niż na podłożu mineralnym (ryc. 19). Stwierdzono również zmianę barwy substratu z białej na jasnobrązową.

Sundman (1966) obserwowała podobne zjawisko i tłumaczyła je powstawaniem związków chinonowych.

Pomiar absorpcji w uV rozpuszczonego w dioksanie proszku pozostałego w podłożu potwierdza ubytek substratu w stosunku do ilości początkowej, spowodowany rozkładem przez patogena (ryc. 18). W przesączu z podłoża zaś zidentyfikowano wanilinę obok innych produktów rozpadu α -konidendryny.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz obserwacji zniszczeń wywołanych przez *D. populea* w drewnie, można sądzić, że grzyb ten ma pewne predyspozycje do rozkładu ligniny. Nie są one jednak duże i najprawdopodobniej patogen powoduje tylko częściową degradację tego trwałego związku. Reszty mogą dokonywać mikroorganizmy towarzyszące.

VI. WNIOSKI KOŃCOWE I PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Grzyb *Dothichiza populea* Sacc. et Br. wywołuje chorobę pędów topoli nazwaną u nas przez Orłosia (1959) pomorem topoli. Szczególnie zagrożony okazał się materiał topolowy przeznaczony do wysadzenia w gruncie tzw. zrzesy topolowe. Choroba rozwija się na nich dopiero po wysadzeniu. Porażone zrzesy nie ukorzeniają się i giną natychmiast albo mogą wyrastać rośliny słabe, które także po pewnym czasie zamierają. Choroba może się również szerzyć w plantacjach topolowych. Grzyb atakuje wtedy młode pędy i powoduje ich obumieranie. Jeżeli są to pędy górne w koronie to może dojść do uschnięcia całego drzewa.

Dokładne badania nad pomorem topoli prowadziła Kozłowska (1971) i Hubbes (1959). Dotyczyły one głównie biologii grzyba oraz warunków w jakich choroba rozwija się najlepiej.

Nie było do tej pory prowadzonych badań nad mechanizmami dzięki którym topola broni się przed pasożytem. Są bowiem gatunki topoli szczególnie odporne na *D. populea* i bardzo wrażliwe. Z takiego materiału miano możliwość korzystać w niniejszej pracy. Zbadano niektóre wskaźniki fizjologiczne mogące mieć znaczenie w odporności topoli. Stwierdzono, że jedno z nich odgrywa rolę wiodącą, inne natomiast nie mają większego znaczenia dla odporności.

W podsumowaniu wyników stwierdzono, że

1) Substancje fenolowe zawarte w korze topoli mogą mieć znaczenie w odporności przedinfekcyjnej. Ich działanie nie zależy od ilości, ale od składu jakościowego.

2) Spośród enzymów utleniających fenole duże znaczenie dla odporności ma oksydaza o-dwufenolowa, której aktywność jest kilkakrotnie wyższa u osobników odpornych na *D. populea*.

- 3) Aktywność peroksydazy nie jest skorelowana z odpornością.
- 4) Na skutek interwencji patogenu następuje zakłócenie w syntezie białek w organizmie gospodarza, mogą pojawiać się nowe białka.
- 5) Degradacja auksyny w tkance porażonej jest wyższa niż w zdrowej. Proces ten nie jest jednak związany z odpornością.
- 6) Substancje fenolowe mogą mieć wpływ na produkcję i aktywność enzymów celulolitycznych i pektolitycznych *Dothichiza populea*, ale dla odporności prawdopodobnie nie ma to decydującego znaczenia.
- 7) *Dothichiza populea* posiada pewne predyspozycje do rozkładu ligniny.

Prof. drowi Mirosławowi Tomaszewskiemu za stałą opiekę w czasie wykonywania pracy oraz za cenne wskazówki, składam tą drogą serdeczne podziękowanie.

Instytut Dendrologii
Kórnik k. Poznania

LITERATURA

1. Albersheim P., Jones T. M., English P. D. — 1969. Biochemistry of cell walls in the disease processes. *Ann. Rev. Phytopath.* 7: 171.
2. Albersheim P., Anderson A. J. — 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 1815 - 19.
3. Andel O. M., Fuchs A. — 1972. Interference with plant growth regulation by microbial metabolites. *Phytotoxins in plant diseases.* Acad. Press.
4. Antonelli E., Daly J. M. — 1966. Decarboxylation of indoleacetic acid by near-isogenic lines of wheat resistant or susceptible to *Puccinia graminis f.sp. tritici*. *Phytopath.* 56: 610 - 18.
5. Białobok S. — 1956. Wstępne wyniki hodowli topoli w Zakładzie Dendrologii i Pomologii w Kórniku. *Arboretum Kórnik.* 2: 175 - 193.
6. Biehn W. L., Dimond A. E. — 1971 a. Effect of galactose on polygalacturonase production and pathogenesis by *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. *Phytopath.* 61: 242 - 43.
7. Biehn W. L., Dimond A. E. — 1971 b. Effect of pectin source and sugars on polygalacturonase production by *Ceratocystis ulmi*. *Phytopath.* 61: 745 - 46.
8. Bhatia I. S., Sharma H. K., Bajaj K. L. — 1972. Study of the inhibitory effects of polyphenols on endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Zentralblatt f. Bakt., Parasit. Infektionskrank. u. Hygiene* 127: 437 - 42.
9. Bortitz S., Breuel K. — 1967. Beiträge zur Atiologie der Braunfleckenkrankes, einer Rindennekrose der Gattung *Populus*. *Phytopath. Z.* 58: 281 - 90.
10. Briggs W., Ray P. M. — 1956. An auxin inactivation system involving tyrosinase. *Plant Physiol.* 31: 165 - 67.
11. Brown A. E., Swinburne T. R. — 1971. Benzoic acid: an antifungal compound formed in Brambley's Seedling apple fruits following infection by *Nectria galligena* Bres. *Physiol. Plant Pathol.* 1: 469 - 75.
12. Bugała W., Stecki Z. — 1961. Mieszance *Populus Maximowiczii* Henry i dotychczasowe wyniki uprawy w Kórniku. *Arboretum Kórnik.* (6: 93 - 116).

13. Butin H. — 1964. Zur Frage der Resistenz der Pappel gegenüber *Dothichiza populea* Sacc. et Br. Der Forst und Holzwirt 19 : 266 - 68.
14. Daly J. M., Deverall B. J. — 1963. Metabolism of indoleacetic acid in rust diseases. I. Factors influencing rates of decarboxylation. Plant Physiol. 38 : 741 - 50.
15. Davis B. J. — 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci. 121 : 404 - 27.
16. Fahraeus G. — 1961. Oxidation of indole-3-acetic acid by fungal laccase. Physiol. Plant. 14 : 171 - 76.
17. Faraks G. L., Dezsi L., Horvath M., Kisban K., Udvardy J. — 1964. Common pattern of enzymic changes in detached leaves and tissues attacked by parasites. Phytopath. Z. 49 : 343 - 54.
18. Farkas G. L., Kiraly Z. — 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. Phytopathol. Z. 44 : 105 - 59.
19. Farkas G. L., Stahmann M. A. — 1966. On the nature of changes in peroxidase isozymes in bean leaves infected by Southern Bean Mosaic Virus. Phytopath. 56 : 669 - 77.
20. Fehrman H., Dimond A. E. — 1967. Peroxidase activity and *Phytophthora* resistance in different organs of the potato plant. Phytopathol. 57 : 69 - 72.
21. Fuzukumi T., Hiyama T., Minami K. — 1965. Metabolic products from aromatic compounds by the wood-rooting fungus *Polysticus sanguineus* (*Trametes sanguinea*). III. Reductive transformation of veratric acid to veratraldehyde. J. Jap. Wood Res. Soc. 11 : 4.
22. Fuzukumi T., Uranshihara S., Ohaski T., Shibamoto T. — 1964. Enzymatic degradation of lignin. III. Oxidation accompanying carbon dioxide liberation of vanilic acid vanilloylformic acid and guaiacylpyruvic acid by enzyme of *Polysticus sanguineus* and *Poria subacida*. J. Jap. Wood Res. Soc. 10 : 6.
23. Grzelińska A. — 1969. Changes in protein level and activities of several enzymes in susceptible and resistant tomato plants after infection by the *Fusarium oxysporum f. lycopersici*. Phytopath. Z. 66 : 374 - 80.
24. Grzelińska A. — 1970. Peroxidase isoenzymes in *Fusarium* — infected tomato plants. Phytopath. Z. 69 : 212 - 22.
25. Haniecka T. — 1970. Udział związków fenolowych w odporności liści dwóch odmian ziemniaka na *Phytophthora infestans* de by. Praca doktorska WSR Poznań.
26. Hampton R. E. — 1963. Activity of some soluble oxidases in carrot slices infected with *Thielaviopsis basicola*. Phytopath. 53 : 497.
27. Horton J. C., Keen N. T. — 1966. Regulation of induced cellulase synthesis in *Pyrenochaeta terrestris* Gorenz et al. by utilizable carbon compounds. Canad. J. Microb. 12 : 208 - 20.
28. Hubbes M. — 1959. Untersuchungen über *Dothichiza populea* Sacc. et Briard den Erreger des Rindenbrandes der Pappel. Phytopath. Z. 35 : 58 - 96.
29. Hubbes M. — 1969. Benzoic and salicylic acids isolated from a glycoside of aspen bark and their effect on *Hypoxyylon pruinaum*. Canad. J. Bot. 47 : 1295.
30. Huber D. M., Andersen A. L. — 1964. Characteristics of resistance to *Fusarium* root of bean. Phytopath. 54 : 896.
31. Ishikawa H., Oki T. — 1964. The oxidative decomposition of lignin. I. The enzymic of softwood lignin related aromatic compounds by peroxidase. J. Jap. Wood Soc. 10 : 5.
32. Ishikawa H., Oki T. — 1966. The enzymic hydrolysis of ether linkages in lignin. J. Jap. Wood Res. Soc. 12.
33. Ishikawa H., Shubert W. J., Nord E. F. — 1963. Investigations on

- lignins and lignification. XXX. Enzymic degradation of guaiacylglycerol and related compounds by white-rot fungi. *Bioch. Z.* 338 : 153 - 63.
34. Johnson L. B., Cunningham B. A. — 1972. Peroxidase activity in healthy and leaf-rust-infected wheat leaves. *Phytochem.* 11 : 547 - 51.
 35. Johnson G., Shaal L. A. — 1957. Chlorogenic acid and other orthodihydrophenols in scab-resistant Russet Burbank and scab-susceptible Triumph potato tubers of different maturities. *Phytopath.* 47 : 253.
 36. Kaldeway H. — 1969. *Thin-Layer Chromatography*. Ed. E. Stahl Springer, Berlin.
 37. Kozłowska C. — 1971. Badania nad biologią grzyba *Chondroplea populea* (Sacc.) Kleb. (*Dothichiza populea* Sacc. et Briard) oraz próby jego zwalczania. *Prace Inst. Bad. Leśnictwa* 396.
 38. Krupasagar V., Sequeira L. — 1969. Auxin destruction by *Marasmius perniciosus*. *Amer. J. Bot.* 56 : 390 - 97.
 39. Larsen P. — 1955. Growth substances in higher plants. *Modern methods of plant analysis* 3 : 565 - 625.
 40. Loeschcke V., Francksen H. — 1964. Trichocarpin ein neues als Resistenzfaktor bedeutsames Phenylglykosid aus Pappelrinde. *Naturwissenschaften* 51 : 140.
 41. Lundberg G. — 1970. Utilisation of various nitrogen sources in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. *Stud. Fores. Suesica* 79.
 42. Lyr H. — 1965. On the toxicity of oxidized polyphenols. *Phytopath. Z.* 52 : 229 - 40.
 43. Lee S. F., Le Tourneau D. — 1958. Chlorogenic acid content and *Verticillium* wilt resistance of potatoes. *Phytopath.* 48 : 268 - 7.
 44. Maraite H. — 1973. Changes in polyphenoloxidases and peroxidases in muskmelon (*Cucumis melo* L.) infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phys. Plant Pathol.* 3 : 29 - 49.
 45. Matta A., Dimond A. E. — 1963. Symptoms of *Fusarium* wilt in relation to quality of fungus and enzyme activity in tomato stems. *Phytopath.* 53 : 574 - 78.
 46. Maxwell D. P., Bateman D. F. — 1967. Changes in the activities of some oxidases in extracts of *Rhizocotonia* — infected bean hypocotyls in relation to lesion naturation. *Phytopath.* 57 : 482 - 85.
 47. Mosbach R. — 1963. Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. *Bioch. Biophys. Acta* 73 : 204 - 12.
 48. Newton R., Anderson J. A. — 1929. Studies on the nature of rust resistance in wheat. IV. Phenolic compounds on the wheat plant. *Cand. J. Res.* 1 : 89 - 99.
 49. Okasha K. A., Ryungo K., Wilhelm S., Bringham R. S. — 1968. Inhibition of growth of *Verticillium albo-atrum* sporelings by tanins and polyphenols from infected crowns of *Verticillium* — resistant and susceptible strawberry cultivars. *Phytopath.* 58 : 1114 - 17.
 50. Orłóś H. — 1959. *Cryptodiaporthe populea* (Sacc.) But. — pomór topolowy. *IBL. Ulotka Zakładu Fit. Leśnej* nr 27.
 51. Ornstein L. — 1964. Disc elektroforesis I. Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.* 121 : 404 - 27.
 52. Patil S. S., Dimond A. E. — 1967. Inhibition of *Verticillium* polygalacturonase by oxidation products of polyphenols. *Phytopathol.* 57 : 492 - 96.
 53. Patil S. S., Dimond A. E. — 1968. Effect of phenols and cytokinins on polygalacturonase production by *Verticillium albo-atrum* in culture. *Phytopathol.* 58 : 868 - 69.
 54. Patil S. S., Dimond A. E. — 1968. Represion of polygalacturonase synthesis

- in *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici* by sugars and its effect on symptom reduction in infected tomato plants. *Phytopathol.* 58: 676 - 82.
55. Patil S. S., Powelson R. L., Young R. A. — 1964. Relation of chlorogenic acid and free phenols in potato roots to infection by *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathol.* 54: 531 - 35.
 56. Pearl I. A., Beyer D. L., Laskowski D., Whitney D. — 1960. Studies on the barks of the family *Salicaceae* III. The alkaline hydrolysis of barks of several species of the genus *Populus*. *Tappi*, 43: 756 - 8.
 57. Pearl I. A., Darling S. F. 1962. Studies on the barks of the family *Salicaceae* V. Grandidentatin, a new glucoside from the bark of *Populus grandidentata*. *J. Org. Chem.* 27: 1806 - 9.
 58. Pearl I. A., Darling S. F. — 1964. Further studies on the isolation of glucosides from the barks and leaves of *Populus tremuloides* and *Populus grandidentata*. *Tappi*, 47: 377 - 79.
 59. Pearl I. A., Darling S. F., Heller S. F. — 1966 a. Glucosides from the barks and leaves of triploid varieties of *Populus* species. *Tappi*. 49 : 278 - - 89.
 60. Pearl I. A., Darling S. F. — 1968 a. Studies on the family *Salicaceae*. XIV. Further studies on the bark of triploid *Populus tremuloides*. *Tappi*, 50 : 324 - - 27.
 61. Pearl I. A., Darling S. F. — 1968 a. Studies on the barks of the family *Salicaceae*. XIX. Continued studies on the hot water extractives of *Populus balsamifera* bark. *Phytochem.* 7: 1851 - 53.
 62. Pearl I. A., Darling S. F. 1968 b. Studies on the barks of the family *Salicaceae*. XX. Variations in the hot water extractives of *Populus balsamifera* bark. *Phytochem.* 7: 1855 - 58.
 63. Pearl I. A., Estes T. K. — 1967 b. Studies on the barks of the family *Salicaceae*. XIII. Hot water extractives of the green bark of *Populus trichocarpa*. *Tappi*, 50: 318 - 20.
 64. Pearl I. A., Pottenger Ch. R. — 1966 b. Studies on the water extractives of the green bark of *Populus balsamifera*. *Tappi*, 49: 152 - 54.
 65. Pohl Z. — 1962. Studia nad wzrostem i morfologią kórnickich mieszańców *Populus Maximowiczii* Henry. *Arboretum Kórn.* 7: 115 - 187.
 66. Pohl Z. — 1964. Dziedziczenie piramidального pokroju korony u mieszańców *Populus pyramidalis* Roz. *Arboretum Kórn.* 9: 199 - 222.
 67. Pukacka S. — 1972. Degradation of poplar wood by *Dothichiza populea*. E-21-FS-57 First Tech. Rep. 12 - 15.
 68. Ray P. M. — 1958. Destruction of auxin. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 9: 81 - 118.
 69. Reddy M. N., Stahmann M. A. — 1972. Multiple molecular forms of enzymes in peas infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* Race 1. *Phytopathol. Z.* 74: 55 - 68.
 70. Safonov W. I., Safonova M. P., Narbut N. A. — 1969. Studies on the Soybean seed proteins by means of disc electrophoresis. *Biol. Plant. (Praha)* 11: 183 - 89.
 71. Seevers P., Daly J. M. — 1970. Studies on wheat stem rust resistance controlled at the Sr 6 locus. II. Peroxidase activities. *Phytopathol.* 60: 1642 - 47.
 72. Seevers P. M., Daly J. M., Cathedral F. F. — 1971. The role of peroxidase izozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiol.* 48: 353 - 56.
 73. Sempio C. — 1950. Metabolic resistance to plant disease. *Phytopathol.* 40 : 799 - 819.
 74. Sequeira L. — 1964. Inhibition of idoleacetic acid oxidase in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 54: 1078 - 1083.

75. Sequeira L. — 1973. Hormonal metabolism in diseased plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 353 - 380.
76. Shaw M., Hawkins A. R. — 1958. The physiology of host-parasite relations. V.A. preliminary examination of the level of free endogenous idoleacetic acid in rusted and mildewed cereal leaves and their ability to decarboxylate exogenously supplied radioactive indoleacetic acid. *Can. J. Bot.* 36: 1 - 16.
77. Siwecki R. — 1969. Badania dziedziczenia odporności kórniczych mieszańców topoli na porażenie grzybem *Chondroplea (Dothichiza) populea* (Sacc.) Kleg. *Arboretum Kórn.* 14: 219 - 274.
78. Staples R. C., Stahmann M. A. — 1964. Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathol.* 54: 760 - 765.
79. Stavely J. R., Hanson E. W. V 1967. Electrophoretic comparisons of resistant and susceptible *Trifolium pratense* noninoculated and inoculated with *Erysiphe polygoni*. *Phytopathol.* 57: 482 - 485.
80. Stecki Z. — 1967. Studia nad zmiennością i dynamiką wzrostu siewek i wegetatywnie mnożonych mieszańców topoli. *Arboretum Kórn.* 12: 283 - 328.
81. Sundman V. — 1965. A study of lignanolytic soil bacteria with special reference to α -condendrin decomposition. *Acta Polytech. Scand.* 40.
82. Sundman V., Haro K. — 1966. On the mechanism by which cyclolignanolitic agrobacteria might cause humification. *Finska Kemist. Medd.* 75. 4.
83. Surmiński J. — 1973. Właściwości techniczne drewna topoli i możliwości jego użytkowania. *Topole PWN* 471 - 500.
84. Swain T., Hillis W. E. — 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10: 63 - 68.
85. Thieme H., Benecke R. — 1970. Die Phenolglycoside der Salicaceen. *Die Pharmazie* 12: 780 - 783.
86. Thieme H., Benecke R. — 1971. Die Phenolglycoside der Salicaceen. *Die Pharmazie* 4: 227 - 231.
87. Tomaszewski M. — 1959. Kwas chlorogenowy-fenolaza jako system inaktywujący auksynę wyodrębnioną z liści niektórych gatunków z rodzaju *Prunus* L. *Zeszyty Naukowe UMK w Toruniu* 6. *Biologia* IV.
88. Trojanowski J., Leonowicz A. — 1970. Biochemiczny mechanizm rozkładu ligniny przez grzyby. *Zeszyty Naukowe SGGW-Lesnictwo* z. 14.
89. Tuli V., Moyed H. S. — 1966. Desensitization of regulatory enzymes by a metabolite of plant auxin. *J. Biol. Chem.* 241: 4564 - 4566.
90. Walker J. C. — 1923. Disease resistance to onion smudge. *J. Agric. Res.* 24: 1019 - 1039.
91. Weber D. J., Clare B., Stahmann M. A. — 1967. Enzymic changes associated with induced and natural resistance of sweet potato to *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathol.* 57: 421 - 424.
92. Wetmore R. H., Morel G. — 1949. Polyphenoloxidase as a problem in organ cultures and auxin diffusion studies of horsetails and ferns. *Amer. J. Bot.* 36: 380.
93. Zucker M., Ahrens J. F. — 1958. Quantitative assay of chlorogenic acid and its pattern of distribution within tobacco leaves. *Plant Physiol.* 33: 246.
94. Żelawski W. — 1967. Wymiana gazowa i bilans wodny igliwia. *Zarys fizjologii sosny zwyczajnej*. PWN, Poznań 33 - 93.
95. Żelawski W. — 1973. Wymiana gazowa i gospodarka wodna. *Topole*. PWN, Poznań 184 - 205.
96. Yu L. M., Hampton R. F. — 1964. Biochemical changes in tobacco infected with *Colletotrichum destructivum*. II. Peroxidases. *Phytopathol.* 54: 499 - 501.

STANISŁAWA PUKACKA

*Physiological and biochemical basis for the resistance of poplar hybrids to the fungus Dothichiza populea Sacc. et Br.**

S u m m a r y

The fungus *Dothichiza populea* Sacc. et Br. is a parasite of poplar bark. Particularly sensitive are young shoots on plantations, and the material prepared for outplanting in the ground, the so called poplar cuttings. Generally the species and cultivars of balsam poplars are more resistant to the infection by *Dothichiza* than the black poplars. As a result of this comparative biochemical studies were undertaken on the representatives of resistant poplars *P. maximowiczii* and *P. laurifolia* (balsam poplars), and the sensitive black poplars *P. nigra 'Italica'* as well as the hybrids originating from crosses between these poplars.

Special note was taken of the phenolic compounds and of the enzymes capable of oxidising them. With the help of paper and thin layer chromatography the qualitative composition of the phenolics in the bark of the poplars was investigated before and after inoculation with *Dothichiza*. In the bark of *P. nigra 'Italica'* and its hybrids it was found that free guercetin and kaemferol exist as well as their glucosides and (+) catechin. These substances were not found in the bark of *P. maximowiczii* and *P. laurifolia* nor in their hybrids. It was found that several phenolic derivatives of benzene, benzoic acid and cinnamic acid occur both in the bark of balsam and black poplars.

With the help of biotests it was shown that the content of ethanolic extracts from the bark of poplars resistant to *Dothichiza* inhibit more the growth of the mycelium of the pathogen than analogous extracts from the bark of susceptible poplars. Pure phenolic substances at a concentration of $10^{-2}M$ usually inhibit totally the growth of the *Dothichiza* mycellium. At lower concentrations their influence is different and depends on the structure of the compound and on the pH of the substratum. The most fungistatic phenolic components of the bark were salicylic acid, gentisic acid and catechol. Chlorogenic acid and quercetin, which constitute the main phenolic component of bark proved to have less fungistatic properties. The fungistatic activity was dependent on the pH of the substratum, at higher acidity the fungistatic effectiveness being greater.

A separate part of the study has been devoted to the enzymes oxidising phenolic compounds, that is o-diphenol oxidases and peroxidases in the poplar bark before and after inoculation with *Dothichiza*. It was found that the pre-infection activity of o-diphenol oxidase in the bark of the resistant balsam poplars is decidedly higher than in the bark of the more sensitive black poplars. During infection an increase of the activity of the o-diphenol oxidase in the bark of the resistant poplars was observed. Also a post-infection increase in the peroxidase activity was observed in the poplar shoots, but this response did not differentiate the resistant and susceptible individuals. With the help of disc electrophoresis, peroxidase from the bark of poplars inoculated with *Dothichiza* and from healthy ones, was separated out into individual isozymes and quantitative as well as qualitative differences in their composition were observed, caused by the infection.

Studying the degradation of IAA-1- ^{14}C in the bark from infected and healthy tissues a higher rate of decarboxylation was found in the infected places. This phenomenon probably is not of any greater significance for the resistance because

* This work was supported in part by Grant FG-Po-266 from U.S. Department of Agriculture.

the fungus *Dothichiza populea* is capable of independent synthesis of IAA, particularly if it can utilize the amino acid pool of the host.

Dothichiza populea produces cellulase and pectinase which cause the disintegration of the polymeric substances that comprise the basic components of the cell walls. It was shown that the production and activity of these enzymes can be inhibited by the phenolic substances of the bark and by the products of their oxidation by the phenol oxidase. It was established that *Dothichiza* has also some capacity to decompose lignin. Model substances such as α -conidendrine, a lignan and veratric acid a methoxylated phenol, have been metabolized by the cultures of *Dothichiza populea*.

On the basis of the presented results it is assumed that the basic role in the resistance of poplars to *Dothichiza populea* is played by the high activity of the o-diphenol oxidase in the resistant varieties, which following inoculation quickly creates infection barriers.

СТАНИСЛАВА ПУКАЦКА

Физиологические и биохимические основы устойчивости гибридов тополей к грибу *Dothichiza populea* Sacc. et Br.

Резюме

Гриб *Dothichiza populea* Secc. et Br. паразитирует на коре тополей. В особенности он угрожает молодым побегам на плантациях и материалу, подготовленному для высадки, т.е. черенкам тополей. В целом виды и разновидности (культivarы) бальзамических тополей более устойчивы к заражению, чем тополи черные. В связи с этим предпринято сравнительно-биохимическое исследование тополей, устойчивых к заболеванию, а именно *Populus maximowiczii* и *P. laurifolia* (бальзамические тополи), и подверженного заболеванию черного тополя *P. nigra 'Italica'*, а также гибридов, полученных в результате скрещивания указанных видов.

Особенное внимание было обращено на роль, которую играют в иммунитете фенольные соединения и ферменты, вызывающие их окисление. С помощью бумажной и тонкослойной хроматографии был определен качественный состав фенолов в коре тополей до и после заражения *Dothichiza*. В коре *P. nigra 'Italica'*, и у его гибридов установлено наличие свободного кверцетина и кемферола, их гликозидов и (+) катехина. Эти вещества не были обнаружены в коре *P. maximowiczii*, *P. laurifolia* и их гибридов. Выяснено, что ряд фенольных производных бензола, бензойной и коричной кислот представлен в коре как бальзамических, так и черных тополей.

С помощью биологических тестов показано, что этаноловые вытяжки из коры тополей, иммунных к *Dothichiza*, в большей степени тормозят рост мицелия патогенного гриба, чем аналогичные вытяжки из тополей, восприимчивых к заболеванию. Чистые фенольные соединения в концентрации 10^{-2} м по большей части полностью затормаживают рост мицелия. В меньших концентрациях их влияние различно, оно зависит от структуры соединения и от pH субстрата. Наиболее фунгистатическими фенольными соединениями в коре оказалась салициловая и гентизиновая кислоты и катехол. Хлорогеновая кислота и кверцетин, являющиеся основными фенольными компонентами коры, оказались более слабыми фунгистатическими факторами. Фунгистатическое действие зависело от pH субстрата и чем больше была кислотность, тем выше фунгистатический эффект.

Специальная часть работы посвящена исследованию ферментов, окисляющих фенолы

(т.е. О-двуфенольной оксидазе и пероксидазе), в коре тополей до и после заражения *Dothichiza*. Установлено, что до заражения грибом активность О-двуфенольной оксидазы в коре иммунных бальзамических тополей значительно выше, чем в коре черных тополей, неустойчивых к этому грибу. Во время заражения наблюдалось дальнейшее повышение активности О-двуфенольной оксидазы в коре устойчивых тополей. Наблюдалось также послеинфекционное возрастание активности пероксидазы в побегах тополя, однако оно не коррелировалось с их устойчивостью к грибу. С помощью электрофореза в полиакриламидной колонке пероксидазу из коры тополей, зараженных *Dothichiza* и здоровых, разделено на отдельные изозимы и выявлены количественные и качественные различия в их составе, вызванные инфекцией.

Исследуя деградацию ИУК-1-¹⁴C в тканях здоровой коры и коры пораженной *Dothichiza* установлена более высокая декарбоксиляция в зараженных местах. Это явление, вероятно, не имеет существенного значения для устойчивости растений, так как гриб *Dothichiza*, способен к самостоятельному синтезу ИУК, особенно когда он использует аминокислотный пул растения-хозяина.

Dothichiza populea продуцирует целлюлазу и пектиназу, вызывающие распад высокомолекулярных соединений, являющихся основными компонентами клеточных оболочек в коре растений. Доказано, что на образование и активность этих энзимов могут иметь тормозящее действие фенольные вещества коры и продукты их окисления с участием фенольной оксидазы. Установлено, что *Dothichiza* обладает также определенной способностью к разложению лигнина: такие модельные вещества как лигнина L-кондендрин и метоксилованный фенол — вератровая кислота — являются продуктами метаболизма культуры *Dothichiza populea*.

На основе проведенных исследований можно сказать что существенную роль в устойчивости тополей к *Dothichiza populea* играет высокая активность О-двуфенольной оксидазы у устойчивых форм, что создает условия для быстрого формирования инфекционных барьеров в случае заражения.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.