

TAPHRINA DEFORMANS-SZAL FERTŐZÖTT ŐSZIBARACK LEVELEK HORMONÁLIS VÁLTOZÁSAI

SAWSAN EL WAZIRI — BALÁZS ERVIN — KIRÁLY ZOLTÁN — SZIRÁKI ISTVÁN

Számos gombafertőzés esetén kimutatták, hogy a gazdanövényen látható szimptómák hormonális zavarokra vezethetők vissza. Többek között bab és *Uromyces phaseoli*, káposzta és *Plasmidiophora brassicae*, valamint gyapot és *Verticillium albo-atrum* gazda—parazita kapcsolatokban mutattak ki hormonális változásokat (KIBÁLY—POZSÁR—EL HAMMADY 1966, DEKHUIJZEN—STAPLES 1968, REDDY—WILLIAMS 1970, WIESE—DE VAY 1970). Nemcsak a fertőzött növény, hanem a kórokozó gombák in vitro hormonszintézisét is tanulmányozták (SOMMER 1961, KOVOOR—KLAMBT 1969). E két utóbbi szerző a *Taphrina* fajok (*deformans* és *betulina*) in vitro tenyésztésének hormonszintézisével foglalkozik. SOMMER a *Taphrina deformans* tenyésztetből izolált sejtmegnyúlást és sejtosztódást serkentő anyagot. Feltételezéseink szerint ezek az anyagok indukálják a jellegzetes hipertrófiát és hiperpláziát, amelyet a *Taphrina deformans*szal fertőzött őszibarack leveleken és hajtásokon tapasztaltunk. Jelen dolgozatunkban a fertőzött levelek citokinin- és auxintartalmának vizsgálatával foglalkozunk.

Anyag és módszer

Növényi anyag: *Taphrina deformans* (BERK.) TUL. fajjal természetes körülmények között fertőződött őszibarack (*Persica vulgaris* MILL. cv. *Élberta*) leveleket gyűjtöttünk be a betegség kialakulásának harmadik hetében (VARGA 1965).

Indol vegyületek meghatározása: 35 g friss-súlyú egészséges és fertőzött növényi levelet 350—350 ml 60%-os etilalkohollal homogenizáltunk 10 percig Waring Blendorban maximális fordulatszám (15000) mellett, majd az anyagot 6000 ford./perc mellett 10 percen át centrifugáltunk 0 °C-on.

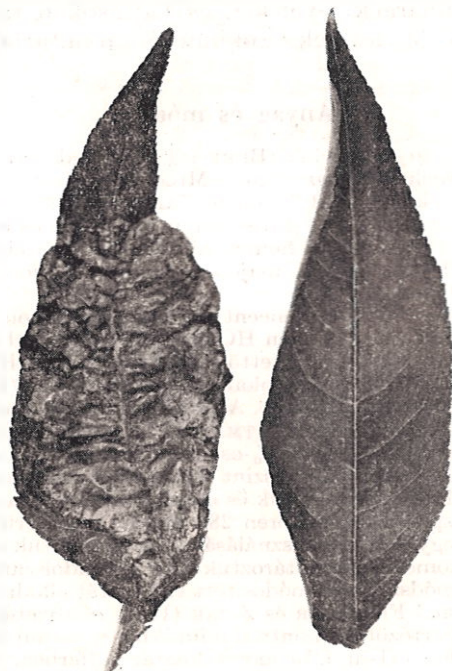
A felüliszókat ezután kb. 100 ml-re koncentráltuk be vákuumon (40 °C). A bekonzentrált anyagot ezután megsavanyítottuk 1 n HCl-dal pH 2-re, majd 3 × 50 ml dietiléterrel kiráztuk. A dietiléteres fázisokat egyesítettük és 3 × 50 ml NaHCO₃ (5 w/v) oldatba átráztuk. Az egyesített karbonátos fázisokat savanyítás után (1 n HCl-dal pH-2-re) ismételten (3 × 50 ml) dietiléterbe ráztuk át. Az éteres fázisokat ezután szárazra pároltuk be, majd etilalkoholba vettük fel és WHATMAN N° 1 papíron kloroform—etilacetát—hangyasav (5 : 4 : 1) és izopropanol — 7 %-os ammónia—víz (8 : 1 : 1) futtató keverékekkel kromatografáltuk. A papírokat részint SALKOWSKI reagenssel előhívtuk, részint az R_f értékeknek megfelelően feldaraboltuk és etilalkoholba visszaoldva spektrofotometrián UNICAM SP 800 spektrofotométeren 280 nm-nél megmértük az oldatok extinkcióját. Autentikus indol-vegyületek felhasználásával azonosítottuk a vegyületeket, illetve mennyiségüket spektrofotometrián határoztuk meg. Az indolszármazékok kinyerésénél WIESE és DE VAY (1970) módszerének módosított változatát alkalmaztuk, míg a spektrofotometriás meghatározásnál FLECHTER és ZALIK (1963) módszerét követtük.

Citokininek kivonása. Fertőzött és kontroll mintákból egyaránt 35 g friss-súlyú levelet homogenizáltunk 70 ml 6,5 pH-jú 1/15 mólos foszfát-pufferben, majd 250 ml 96%-os alkohollal extraháltuk 12 órán keresztül 4 °C-on. Az anyagot szűrtük, majd centrifugáltuk 15 percig 6000 ford./perc mellett 4 °C-on. Centrifugálás (JANETZKI K 23) után vákuum alatt kb. 70 ml-re bepároltuk. Újabb centrifugálás után az oldat pH-ját 9,0-ra állítottuk

be, és háromszor ráztuk azonos térfogatú petroléterrel (forráspont: 60–80 °C). A pH érték 2,5-re való beállítása után az anyagot azonos térfogatú etilacetáttal választottuk el háromszor ismételve. A vizes fázis térfogatát újabb vákuum alatt történő bepárlással 30 ml-re állítottuk be. Ezután az oldatot Dowex 50 W–X8 H⁺ (100–200 mesh) ioncserező oszlopra vittük fel. Az oszlopot 100 ml desztillált vízzel mostuk, majd 75 ml 4 n NH₄OH-dal eluáltuk. Az oldatból vákuum alatt elpárologtattuk az ammóniát, majd a pH értéket 7,8-ra állítottuk be. Ezután az oldatot háromszor extraháltuk azonos térfogatú vízzel telített butanollal. A butanolos fázist bepároltuk, majd azt követően öt alkalommal 15–15 ml desztillált víz hozzáadása után újra bepároltuk. A bepárolt anyagot 90%-os etanolba vettük fel, és WHATMAN N° 1-es kromatográfiás papírra cseppentettük fel. A futtatás tercier butanol–ammónia–víz 3 : 1 : 1 arányú keverékében történt. Szárítás után párhuzamos csíkokra (10 db) vágtuk fel a papírt. Előkísérleteinkben, annak eldöntésére, hogy ez a kombinált kivonási módszer megfelelő-e, a citokinin aktivitás meghatározására a gyors retek–cotyledon tesztet alkalmaztuk. A csíkokból 3 × 5 ml etilalkohollal (90%) kioldottuk a futtatás során szétváló anyagokat, és beszárítás után pufferben (3 ml 2 mM/ foszfát puffer pH 5,9; amely 10 mM KCl-ot tartalmazott) felvettünk, majd ezt szűrőpapírt tartalmazó PETRI-csészékbe tettük. PETRI-csészénként 10–10 db retek-cotyledont helyeztünk. Az eredményeket 5 nap után értékeltük (LETHAM 1968). Ezen előkísérletek alapján a csíkok citokinin-aktivitását szójakallusz bioteszttel határoztuk meg. A 20 ml alaptáptalajt és a megfelelő Rf értékű kivonatkomponenst tartalmazó 50 ml-es ERLÉN-MAYER-lombikokba 3–3 inokulumot helyeztünk el. A kultúrákat 27 °C-on, sötét termosztátban tartottuk, majd 28 nap elteltével a szövetek súlyát lemértük. A kivonást és a tisztítást KIRÁLY et al. (1966), MILLER (1967) és VAN STADEN et al. (1972) módszerei alapján, a szójakallusz biotesztet MILLER (1965) szerint végeztük.

Eredmények és megvitatás

A *Taphrina deformans*szal fertőzött őszibarackleveleket a betegség kialakulásának harmadik hetében gyűjtöttük, amikor a betegségre jellemző tünetek már kialakultak, de még csak a leveleken láthatóak a jellegzetes torzulások (1. ábra). Ekkor a beteg levelek



1. ábra. Fertőzött és egészséges levél

Fig. 1. Infected and healthy leaf

víz-tartalma már többszöröse az egészségesekének (VARGA 1965). Ezt az eredmények interpretálásánál figyelembe kellett vennünk, s ezért a szárazanyag tartalmát is mindig meghatároztuk; eredményeinket azokra vonatkoztattuk. Méréseink szerint a kontroll levelek szárazanyag-tartalma 32,22%, a fertőzött leveleké pedig 17,83% volt. Az általunk felhasznált kinyerési és meghatározási eljárások mellett a betegségnek ebben a szakaszában a következő eredményeket kaptuk. Az indol-vegyületek identifikálásánál a rendelkezésünkre álló standardokat felhasználva (indol-3-ecetsav, indol-acetonitril, 3-indol-acetamid, 5-hidroxi-indol-3-yl-ecetsav, indol-propionsav, triptofán) csak a triptofánt és az indol-3-ecetsavat tudtuk kimutatni.

Ezenkívül két általunk nem identifikált foltot kaptunk a kromatogrammon. Mind az indolecetsavban, mind pedig annak egyik fő prekursorában, a triptofánban a kontrollhoz képest emelkedést kaptunk (1. táblázat). Előzetesen végzett vizsgálatainkban a betegség

1. táblázat

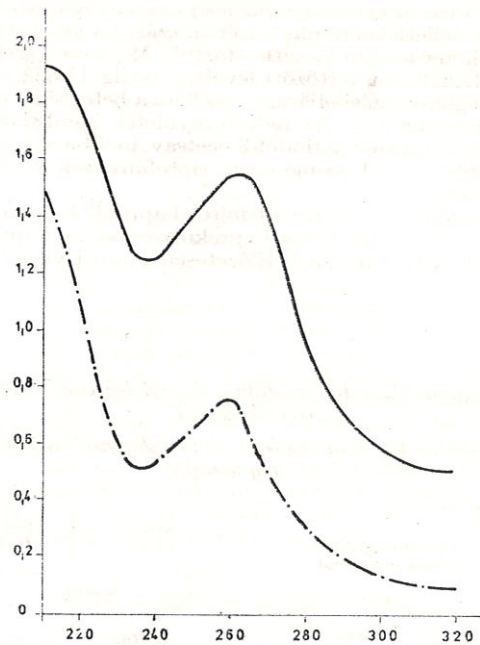
Table 1

Egészséges és fertőzött őszibaracklevelek triptofán- és indolecetsav-tartalma szárazanyagsúlyra vonatkoztatva

The tryptophan and indol-acetic acid content of healthy and infected peach leaves related to dry weight

Indol-vegyület Indole compound	Kontroll Control	Fertőzött Infected
	µg/g	
Indolecetsav Indol-acetic acid	0,106	0,191
Triptofán Tryptophan	0,022	0,034

későbbi stádiumából származó, mintegy 6 hetes fertőződöttségű mintában indol-acetonitrilt mutattunk ki, amelynek mennyisége igen jelentős volt. Ezek az eredmények összeegyeztethetők KIERMEYER (1958) és FEHRMANN (1965) más gazda-parazita kapcsolatokban kapott hasonló eredményeivel. A fertőzött és egészséges levelek citokinin extraktumának butanololdékony fázisának spektrumát is felvettük 210 és 320 nm között (2. ábra). A spektrumból látható, hogy maximumaik egybeesnek a purinszármazékok abszorpciós maximumával (REDDY-WILLIAMS, 1970; KRASNUK-WITHAM-TEGLEY 1971). A spektrumból látható az is, hogy a fertőzött növényből készült, még kromatografálás előtti kivonatok purinszármazékainak optikai denzitása (OD) mintegy kétszeres értékű az egészséges növényekből készült kivonatok spektrumának OD értékeihez képest. A kivonatot további papírkromatográfiai tisztítása után az egyes Rf értékeknek megfelelő citokinin-aktivitást a szója-kallusz biotessztel határoztuk meg. Minthogy az előkísérletekben alkalmazott cotyledon-teszt eredményei azt mutatták, hogy a cotyledonok súlya a citokinin-kivonatok koncentrációjának függvényében optimumgörbe szerint alakult, ez szükségessé tette, hogy meghatározzunk egy olyan kivonat koncentrációt, amely a szója-kallusz tesztben megfelelően alkalmazható. 3 különböző koncentrációt (0,89 g szárazsúly/liter, 1,78 g szárazsúly/liter) hasonlítottunk össze, és azt találtuk, hogy 8,9 g szárazsúly/liter koncentráció alkalmazása mellett a szövetek növekedése már kielégítő, de még nem jelentkezik a túl magas koncentráció következtében fellépő gátló hatás. Az 1 hónapos inkubációs idő után mért szövetsúlyokat a 2. táblázatban tüntettük fel. A 2. táblázatból és a 3. ábráról látható, hogy mind a kontroll, mind a fertőzött minták esetén a 0,8 Rf értéknél található a legmagasabb citokinin-aktivitás. Mint a 3. ábráról látható, nemcsak a 0,8 Rf értéknél kaptunk fokozott citokinin-aktivitást, hanem 0,0; 0,4 és 0,7 frakciókban is. A kontroll és a fertőzött minták citokinin-aktivitása között a 0,4 Rf értéknél tapasztaltuk a legnagyobb különbséget a fertőzött javára, de ezt a különbséget valamennyi citokinin-aktivitást mutató Rf értéknél megtalálhatjuk. Ezek az adatok, valamint az idézett irodalmi adatok is alátámasztják azt a véleményünket, hogy a növényi kivonatok citokinin-aktivitása több vegyületnek tulajdonítható.



2. ábra. Az egészséges és fertőzött levelek aktív anyagának ultravioleta spektruma semleges körülmények között
(függőleges tengely: optikai denzitás, vízszintes tengely: hullámhossz (nm), — fertőzött, - - - - egészséges)

Fig. 2. Ultraviolet spectra of the active material from healthy and infected leaves under neutral conditions
Ordinate: optical density, abscissa: wave-length (nm), solid line: infected, broken line: healthy)

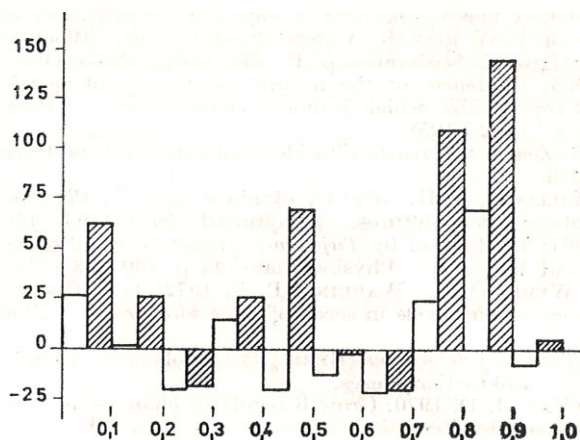
2. táblázat

Table 2

Szójakallusz-növekedés egészséges és fertőzött növényekből készített kivonat hatására
Growth of soy-bean callus on media containing extracts from healthy and infected leaves

Rf érték Rf value	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Egészséges friss-súly/mg/lombik Healthy callus yield/mg/flask	280	233	176	251	175	192	172	276	377	202
Fertőzött friss-súly/mg/lombik Infected callus yield/mg/flask	358	283	179	282	372	200	180	460	543	234

Víz kontroll 220
Water control



3. ábra. Az egészséges és fertőzött levelek citokinin-aktivitású anyagainak papírkromatográfiás elválasztása. A kromatogramm futtatása tercier butanol—ammónia—víz (3 : 1 : 1) keverékében történt. A táptalaj 1000 ml-e 8,9 g szárazsúlyú levélből származó citokinin kivonatot tartalmaz (függőleges tengely: víz kontrollhoz viszonyított %-os változás, vízszintes tengely: Rf érték, üres hasáb: egészséges, vonalazott hasáb: fertőzött)

Fig. 3. The paper-chromatographic separation of cytokinin activity in extracts of healthy and infected leaves. The chromatograms were developed with a solvent of t-butanol—ammonia—water (3 : 1 : 1, v/v). The extracts are obtained from 8,9 g dry weight of leaves/1000 ml medium (ordinate: percentual change related to water control, abscissa: Rf value, open bar: healthy, solid bar: infected)

Az auxin és citokinin felhalmozódásból arra következtetünk, hogy a betegségre jellemző morfológiai elváltozások a hormonális egyensúly felbomlására vezethetők vissza. A fokozott auxin-szintézissel magyarázható az abnormális sejtnövekedés és vízfelvétel, míg a fokozott citokinin-szintézissel a megnövekedett sejtosztódás.

A technikai segítségért KISS NOÉMIKÉK és a kísérleti anyag egy részének a rendelkezésükre bocsátásáért VARGA ISTVÁNNAK mondunk köszönetet.

IRODALOMJEGYZÉK — LITERATURE

- DEKHUIJZEN, H. M. — STAPLES, R. C. 1968: Mobilization factors in uredospores and bean leaves infected with bean rust fungus. — *Contrib. Boyce Thomson Inst.* **24** p. 39—52.
- FEHRMANN, H. 1965: Zum Auxinstoffwechsel phytophthora-kranker Kartoffelknollen. — *Naturwiss.* **52** p. 481.
- FLECHTER, R. A. — ZALIK, S. 1963: Quantitative spectrophotometric determination of indolyl-3-acetic acid. — *Nature* **199** p. 903.
- KIERMEYER, O. 1958: Papierchromatographische Untersuchungen über den Wachstoffsgehalt von *Capsella bursa-pastoris* nach Infektion mit *Albugo candida* und *Pero-nospora parasitica*. — *Osterr. Bot. Z.* **105** p. 518—528.
- KIRÁLY, Z. — POZSÁR, B. I. — EL HAMMADY, M. 1966: Cytokinin activity in rust-infected plants: Juvenility and senescence in diseased leaf tissues. — *Acta Phytopath. Hung.* **1** p. 29—37.
- KOVOOR, R. — KLÄMBT, D. 1969: Cytokinins in transfer-RNA of *Taphrina betulina*. — in: F. WIGHTMAN — G. SETTERFIELD [edit.]: *Biochemistry and physiology of plant growth substances* p. 57—60. Runge Press, Ottawa.
- KRASNUK, M. — WITHAM, F. H. — TEGLEY, J. R. 1971: Cytokinins extracted from Pinto bean fruit. — *Plant Physiol.* **48** p. 320—324.

- LETHAM, D. S. 1969: A new cytokinin bioassay and the naturally occurring cytokinin complex. — in: F. WIGHTMAN—G. SETTERFIELD [edit.]: *Biochemistry and physiology of plant growth substances*. p. 19—31. Runge Press, Ottawa
- MILLER, C. D. 1965: Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: Compounds from maize which promote cell division. — *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **54** p. 1052—1058.
- MILLER, C. D. 1967: Zeatin and zeatin riboside from a mycorrhizal fungus. — *Science* **157** p. 1055—1056.
- REDDY, M. N.—WILLIAMS, P. H. 1970: Cytokinin activity in *Plasmodiophora brassicae*-infected cabbage tissue cultures. — *Phytopath.* **60** p. 1463—1465.
- SOMMER, N. F. 1961: Production by *Taphrina deformans* of substance stimulating cell elongation and division. — *Physiol. Plant.* **14** p. 460—469.
- VAN STADEN, J.—WEBB, D. P.—WAREING, P. F. 1972: The effect of stratification on endogenous cytokinin levels in seeds of *Acer saccharum*. — *Planta (Berl.)* **104** p. 110—114.
- VARGA I. 1965: *A Taphrina deformans* (BERK.) TUL. biológiája és a nagyüzemi védekezés lehetőségei. — Doktori értekezés.
- WIESE, M. V.—DEVAY, J. D. 1970: Growth regulator changes in cotton associated with defoliation caused by *Verticillium albo-atrum* — *Plant Physiol.* **45** p. 304—309.

HORMONAL CHANGES OF PEACH LEAVES INFECTED WITH TAPHRINA DEFORMANS

Sawsan El Waziri — E. Balázs — Z. Király — I. Sziráki

It is well-known, that peach leaves infected with *Taphrina deformans* show hypertrophic and hyperplastic changes. This abnormality suggests an unbalanced hormone metabolism. In our experiments we investigated the changes in hormone metabolism. The tryptophan and indolacetic acid content of peach leaves infected with *Taphrina deformans* was twice as high as that of the healthy plant. This was determined by paper chromatography and spectrophotometry. The cytokinin content was measured with the soy-bean callus bioassay. The cytokinin content of infected peach leaves was higher than that of the control plants. The cytokinin content of infected leaves was 138% at 0,8 Rf and that of the healthy 100%.

The high water-content of infected leaves can be explained by the increased auxin content, thus by the results related to dry weight. In our experiments we demonstrated that the symptoms of infected peach leaves were caused by the pathogen which induced a disturbance in the auxin-cytokinin balance.

(Address: Research Institute for Plant Protection, H—1525 Budapest, P. O. Box 102)