

## Influence of gums formed in stone-fruit trees on *in vitro* growth and sporulation of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*

### Wpływ gum wytwarzanych w owocowych drzewach pestkowych na wzrost i zarodnikowanie w warunkach *in vitro* *Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae*

Anna Jarecka Boncela, Elżbieta Węgrzynowicz-Lesiak, Justyna Góraj, Marian Saniewski

#### Summary

The effect of gums formed in stone-fruit trees on the *in vitro* growth and development of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* cultured on Czapek Dox Agar (CzDA), Malt Extract Agar (MEA) and Potato Dextrose Agar (PDA) was investigated. Addition of gums at concentration 5 mg/cm<sup>3</sup> to all used media greatly stimulated mycelium growth of *V. albo-atrum* and *V. dahliae* and sporulation of the pathogen. Surface of colony of the pathogens after 8 days of culturing on CzDA, MEA and PDA supplemented with gums increased twice on the first two media and three fold on PDA as compare to the control.

**Key words:** *Verticillium albo-atrum*; *V. dahliae*; gums formed in stone-fruit trees; growth; sporulation; *in vitro*

#### Streszczenie

Prezentowano wyniki badań nad wpływem gum z owocowych drzew pestkowych na wzrost i rozwój *Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae* w warunkach *in vitro* na pożywce mineralnej Czapka zestawionej agar (CzDA – Czapka Dox Agar), agarowo-maltozowej (MEA – Malt Extract Agar) i agarowo-ziemniaczano-glukozowej (PDA – Potato Dextrose Agar). Dodatek gum w ilości 5 mg/cm<sup>3</sup> do wszystkich wymienionych pożywek wpłynął silnie stymulująco na wzrost i zarodnikowanie kultur *V. albo-atrum* i *V. dahliae* w porównaniu do kultur kontrolnych patogena rosnących na podłożach bez dodatku gum. Powierzchnia kultur patogenów po 8 dniach inkubacji na badanych pożywkach z dodatkiem gum wzrosła: 2-krotnie na CzDA, 2-krotnie na MEA i 3-krotnie na PDA w porównaniu do kultur kontrolnych kultywowanych na wymienionych pożywkach bez dodatku gum.

**Słowa kluczowe:** *Verticillium albo-atrum*; *V. dahliae*; gumi z owocowych drzew pestkowych; wzrost; zarodnikowanie; *in vitro*

Institut Ogrodnictwa  
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
[Anna.Jarecka@inhort.pl](mailto:Anna.Jarecka@inhort.pl)

## Wstęp / Introduction

W wyniku infekcji przez patogeny czy żerowania szkodników, gumy wytwarzane są w wielu gatunkach roślin, między innymi z rodziny Rosaceae, np. w śliwach, wiśni, moreli, brzoskwini, migdałach i innych (Boothby 1983). Gummy wyizolowane z drzew wiśni, brzoskwini i śliwy zawierają w swoim składzie polisacharydy złożone głównie z galaktozy, arabinozy, ksylazy, ramnozy i mannozy o różnym składzie procentowym oraz kwasu glukuronowego (Bonaduce i wsp. 2007). Interesujące jest, że nie tylko stres indukuje tworzenie się gum w różnych roślinach, ale również etylen i jasmonian metylu powoduje powstawanie gum. Zostało wykazane, że jasmonian metylu indukuje tworzenie się gum w pędach wiśni, moreli, brzoskwini, śliwy (Saniewski i wsp. 2006). Cebule tulipanów wytwarzające gumy pod wpływem infekcji przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* mają zdolność ich tworzenia pod wpływem samego etylenu lub związków wytwarzających etylen po zetknięciu się z tkanką rośliny, np. etefonu, który stanowi źródło etylenu (Kamerbeek i De Munk 1976; De Munk i Saniewski 1989). Przypuszcza się, że gumy w różnych gatunkach roślin tworzą się pod wpływem synergistycznego współdziałania etylenu z jasmonianami (Skrzypek i wsp. 2005).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu gum z owocowych drzew pestkowych na wzrost i zarodnikowanie *Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae*.

## Materiały i metody / Materials and methods

Gumy pozyskane z brzoskwiń, czereśni, moreli, śliwy i wiśni w ilości 5 mg/cm<sup>3</sup> pożywki, po rozpuszczeniu w 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej dodano przed sterylizacją do 45 cm<sup>3</sup> pożywki mineralnej Czapka zestalanej agarem (Czapka Dox Agar, CzDA – Difco), agarowo-maltozowej (Malt Extract Agar, MEA – Difco) i agarowo-ziemniaczano-glukozowej (Potato Dextrose Agar, PDA – Merck). Po wysterylizowaniu, pożywki rozlewano do płytek Petriego o średnicy 90 mm. Na zestalone pożywki nanoszono 5 mm krążki pożywki agarowo-ziemniaczano-glukozowej z 7-dniowej kultury *V. albo-atrum* i *V. dahliae*. Kontrolę stanowiły kolonie grzybów rosnące na pożywkach bez dodatku gum. Płytki z kulturami grzybów inkubowano w termostacie o temperaturze 25°C przez 15 dni. Pomiary średnicy kultur w dwóch prostopadłych kierunkach dokonano po 2, 4, 6 i 8 dniach inkubacji. Wszystkie badane pożywki testowano na 5 płytkach Petriego w trzech seriach w odstępach tygodniowych. Po 6 i 13 dniach inkubacji oceniano mikroskopowo wpływ gum na zarodnikowanie badanych patogenów. Z każdej płytki pobierano 4 fragmenty pożywki z kulturami grzybów o powierzchni 4 cm<sup>2</sup>, które przenoszono do oddzielnych płytek Petriego (średnicy 50 mm) zawierających po 5 cm<sup>3</sup> sterylizowanej wody. Zanurzone w wodzie fragmenty pożywki z grzybną powietrzną pocierano lekko, szklaną bagietką po powierzchni grzybni i przesączono 2-krotnie przez filtr z bibuły filtracyjnej w celu

oddzielenia zarodników od fragmentów strzępek grzybni. Liczbę zarodników określano mikroskopowo przy użyciu komory Bürkera. Kontrolę stanowiła zawiesina zarodników pozyskana z kultur grzybni rosnących na pożywkach bez dodatku gum.

Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji dokonując syntezy z serii. Do ocen różnic między wartościami średnimi dokonano porównania testem Duncana przy poziomie istotności  $p = 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

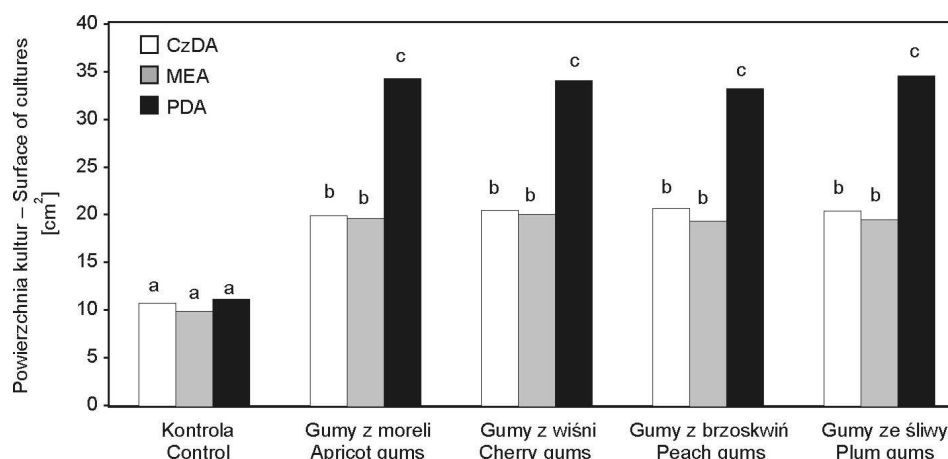
Dodatek gum z brzoskwini, czereśni, moreli, wiśni i śliwy do pożywek CzDA, MEA i PDA wpłynął silnie stymulująco na wzrost i zarodnikowanie kultur *V. albo-atrum* i *V. dahliae*. Powierzchnia grzybni po 8 dniach inkubacji *V. albo-atrum* i *V. dahliae* na pożywkach z badanymi gumami wzrosła: 3-krotnie na PDA, 2-krotnie na CzDA i 2-krotnie na MEA w porównaniu do kultur kontrolnych wzrastających na wymienionych pożywkach bez dodatku gum (rys. 1, 2). Należy podkreślić, że badane patogeny wzrastające na podłożach z dodatkiem wszystkich wymienionych gum wyróżniały się bardzo obfitą w strzępki, watowatą grzybną powietrzną w porównaniu do kultur kontrolnych.

Wcześniej stwierdzono, że dodatek gum powstających w cebulach tulipana do pożywek CzDA, MEA i PDA silnie stymulował wzrost i zarodnikowanie *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* (Saniewska 2002a). Gumy tulipana dodane do pożywki CzDA nie stymulowały wzrostu grzybni *Fusarium oxysporum* f. sp. *callistephi* i *F. oxysporum* f. sp. *narcissi*, ale badane kultury rosnące na podłożu z dodatkiem gum wyróżniały się bardziej obfitą w strzępki, watowatą grzybną (Saniewska 2002b). Kultury *V. albo-atrum* i *V. dahliae* rosnące na pożywkach CzDA, MEA i PDA z dodatkiem badanych gum zarodnikowały obficie w porównaniu do kultur kontrolnych. Po 6 dniach inkubacji grzybni badanych patogenów na pożywkach CzDA, MEA i PDA uzupełnionych gumami z owocowych drzew pestkowych, liczba zarodników *V. albo-atrum* i *V. dahliae* pozyskiwana z 4 cm<sup>2</sup> fragmentów grzybni była ponad 2-krotnie większa, a po 13 dniach inkubacji kultur ponad 5-krotnie większa w porównaniu do kultur grzybni wzrastających tylko na samych pożywkach (rys. 3, 4). Najprawdopodobniej zwiększona liczba zarodników badanych patogenów w kulturach rosnących na pożywkach z dodatkiem gum z owocowych drzew pestkowych może być wynikiem zwiększonej produktywności komórek konidiotwórczych w obfitej grzybni powietrznej, w porównaniu do kultur kontrolnych.

W literaturze wysuwana jest hipoteza, że tworzenie się gum w roślinach w wyniku infekcji przez patogena może stanowić reakcję obronną (Boothby 1983). Można przypuszczać, że powstające gumy, które są polisacharydami (o różnym składzie cukrowców w zależności od gatunku rośliny), szybko zestalają się na powierzchni danego organu rośliny i mogą w ten sposób zapobiegać dalszemu rozprzestrzenianiu się patogena bądź też odpo-

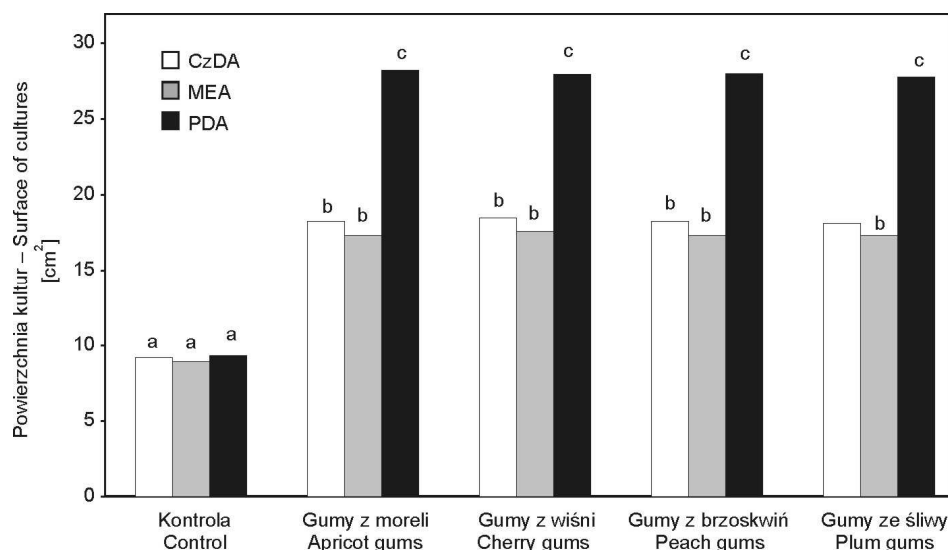
wiednie fragmenty polisacharydów gum mogą indukować reakcje obronne u roślin na drodze metabolicznej, a więc działać jako elicytory. W zainfekowanych tkankach, zależnie od gatunku rośliny, uwalniane są oligocukry ze ścian komórkowych (oligoglukuronidy, oligogalakturnidy, oligoksyloglukany i inne), które mogą elicytować różne reakcje obronne (Cutillas-Iturralde i wsp. 1998).

Różne oligo- i polisacharydy mogą pełnić w roślinach rolę molekularnych sygnałów zwanych elicytorami, które regulują wzrost i rozwój poprzez oddziaływanie na wiele procesów fizjologicznych i biochemicznych (Aldington i wsp. 1991; Farmer i wsp. 1991; Darvill i wsp. 1992; Creelman i Mullet 1997; Ebel i Mithöfer 1998).



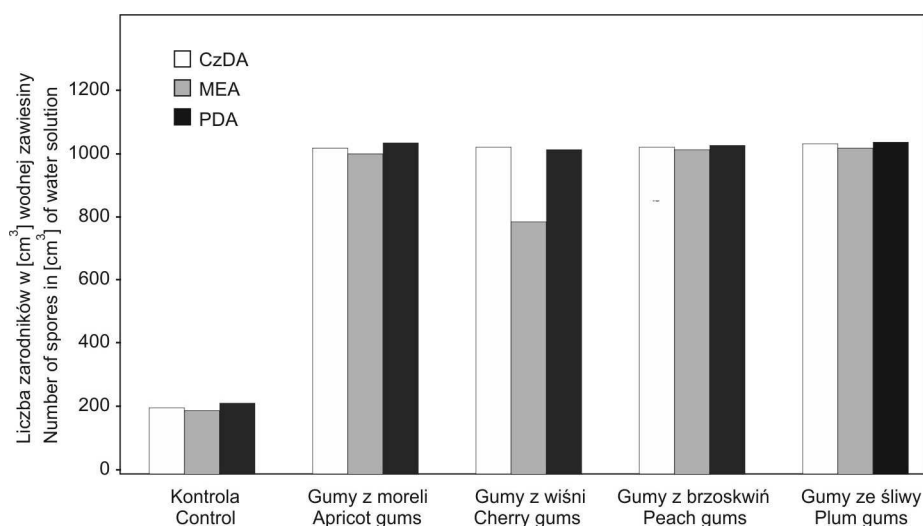
Rys. 1. Wpływ gum z owocowych drzew pestkowych na wzrost kultur *V. dahliae* na różnych pożywkach: mineralnej Czapka zestalanej agarem (CzDA), agarowo-maltozowej (MEA) i agarowo-ziemniaczano-glukozowej (PDA), obserwacja po 8 dniach inkubacji. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy  $p = 0,05$ ; wielokrotny test Duncana

Fig. 1. Influence of gums formed in stone-fruit trees on the cultures growth of *V. dahliae* on different media: Czapek-Dox-Agar (CzDA), Malt-Extract-Agar (MEA) and Potato-Dextrose-Agar (PDA), observation after 8 days of incubation. Means followed by the same letter do not differ  $p = 0.05$  level of significance; Duncan's multiple range test



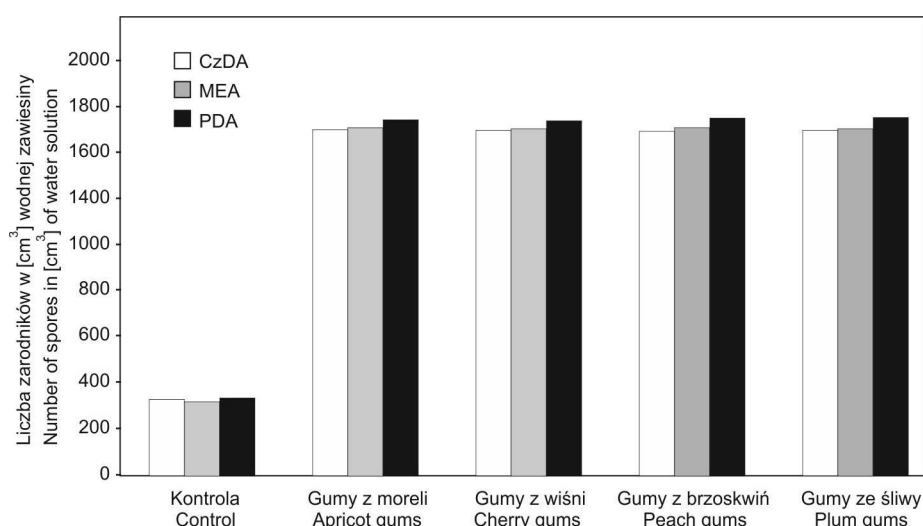
Rys. 2. Wpływ gum z owocowych drzew pestkowych na wzrost kultur *V. albo-atrum* na różnych pożywkach: mineralnej Czapka zestalanej agarem (CzDA), agarowo-maltozowej (MEA) i agarowo-ziemniaczano-glukozowej (PDA), obserwacja po 8 dniach inkubacji. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy  $p = 0,05$ ; wielokrotny test Duncana

Fig. 2. Influence of gums formed in stone-fruit trees on the cultures growth of *V. albo-atrum* on different media: Czapek-Dox-Agar (CzDA), Malt-Extract-Agar (MEA) and Potato-Dextrose-Agar (PDA), observation after 8 days of incubation. Means followed by the same letter do not differ  $p = 0.05$  level of significance; Duncan's multiple range test



Rys. 3. Wpływ gum z owocowych drzew pestkowych na zarodnikowanie *V. albo-atrum* na różnych pożywkach: mineralnej Czapka zestawionej agar (CzDA), agarowo-maltozowej (MEA) i agarowo-ziemniaczano-glukozowej (PDA), obserwacja po 13 dniach inkubacji

Fig. 3. The effect of gums formed in stone-fruit trees on sporulation of *V. albo-atrum* on different media: Czapek-Dox-Agar (CzDA), Malt-Extract-Agar (MEA) and Potato-Dextrose-Agar (PDA), observation after 13 days of incubation



Rys. 4. Wpływ gum z owocowych drzew pestkowych na zarodnikowanie *V. dahliae* na pożywkach: mineralnej Czapka zestawionej agar (CzDA), agarowo-maltozowej (MEA) i agarowo-ziemniaczano-glukozowej (PDA), obserwacja po 13 dniach inkubacji

Fig. 4. The effect of gums formed in stone-fruit trees on sporulation on different media: Czapek-Dox-Agar (CzDA), Malt-Extract-Agar (MEA) and Potato-Dextrose-Agar (PDA) of *V. dahliae*, observation after 13 days of incubation

## Wniosek / Conclusion

Otrzymane wyniki pozwalają twierdzić, że gumy z owocowych drzew pestkowych w warunkach *in vitro* nie są czynnikiem ograniczającym, wręcz przeciwnie bardzo silnie stymulującym wzrost i zarodnikowanie *V. albo-atrum* i *V. dahliae*, u których nie znane jest zjawisko indukcji gum w tkankach swoich żywicieli.

Praca finansowana przez Grant Narodowe Centrum Nauki Nr NN 310078239.

## Literatura / References

- Aldington S., Mc Dougall G.J., Fry S.C. 1991. Structure-activity relationships of biologically active oligosaccharides. *Plant Cell Environ.* 14: 625–636.
- Bonaduce I., Brecolaki H., Colombini M.P., Lluveras A., Restiv V., Ribechini E. 2007. Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of plant gums in samples from painted works of art. *J. Chromatogr. A* 1175: 275–282.
- Boothby D. 1983. Gummosis of stone fruit trees and their fruits. *J. Sci. Food Agric.* 34, p. 17.
- Cutillas-Iturralde A., Fulton D.C., Fry S.C., Lorences E.P. 1998. Xyloglucan-derived oligosaccharides induce ethylene synthesis in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 49: 701–706.
- Darvill A., Augur C., Bergman C., Carlson R.W., Cheong J.J., Eberhard S., Hahn M.G., Lo V.M., Marfe V., Mayer B., Mohnen D., O'Neil M.A., Spiro M.D., Van Halbeek H., York W.S., Albersheim P. 1992. Regulate, development and defence responses in plants. *Glycobiology* 2: 181–198.
- De Munk W.J., Saniewski M. 1989. Gummosis in tulips under the influence of ethephon. *Sci. Hort.* 40: 153–162.
- Ebel J., Mithöfer A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 206: 335–348.
- Farmer E.E., Moloshok T.D., Saxton M.J., Ryan C.A. 1991. Oligosaccharides signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266: 3140–3145.
- Kamerbeek G.A., De Munk W.J. 1976. A review of ethylene effects in bulbous plants. *Sci. Hort.* 4: 101–115.
- Saniewska A. 2002a. The effect of gums induced by *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *tulipae* Apt. in tulip bulbs on the mycelium growth and development of the pathogen *in vitro*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 481: 577–583.
- Saniewska A. 2002b. Wpływ gum indukowanych w cebulach tulipana przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* na wzrost i rozwój *in vitro* form specjalnych *Fusarium oxysporum* niepatogenicznych dla tulipana. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 488: 773–778.
- Saniewski M., Ueda J., Miyamoto K., Horbowicz M., Puchalski J. 2006. Hormonal control of gummosis in *Rosaceae*. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 14 (Suppl. 1): 137–144.
- Skrzypek E., Miyamoto K., Saniewski M., Ueda J. 2005. Jasmonates are essential factors inducing gummosis in tulips: mode of action of jasmonates focusing on sugar metabolism. *J. Plant Physiol.* 162: 495–505.