

AMINOZUREN ALS KOOLSTOFBRON
VOOR *FUSARIUM OXYSPORUM* IN DE HOUTVATEN
VAN LUPINE PLANTEN

*With a summary: Amino acids as a Carbon source for Fusarium oxysporum
in the Vessels of Lupine Plants*

DOOR

IR J. A. D. ZEEVAART

Laboratorium voor Phytopathologie, Landbouwhogeschool, Wageningen

INLEIDING

Uit vroegere onderzoekingen (SCHEFFER, SNIJDER) is gebleken, dat *Fusarium oxysporum* aangetroffen kan worden in de vaten van resistente planten. Uit nog niet gepubliceerd onderzoek van SAALTINK, verricht op het Lab. voor Phytopathologie, blijkt dit ook het geval te zijn met *Fusarium oxysporum lupini* SN. et H. in resistente rassen van *Lupinus luteus* L.. Hierbij werd deze parasiet op vrij grote hoogte in de stengel aangetroffen. De vraag doet zich hierbij voor: Hoe komt de schimmel aan voldoende voedingsstoffen voor zijn groei in de vaten? Anorganische zouten zijn vermoedelijk in voldoende mate aanwezig, maar waaraan ontleent de schimmel de benodigde koolstof?

Voor het onderzoek, dat hiernaar in het voorjaar van 1954 werd ingesteld, was het nodig sap uit de houtvaten van lupineplanten af te zonderen. Bij jonge planten, die bij de proeven werden gebruikt, zijn de houtvaten nauw en betrekkelijk gering in aantal; centrifugeren van stengelstukjes, zoals GOTTLIEB (1943) bij tomaat deed, zou dus een groot aantal stengelstukjes vereisen. Geacht werd daarom van afgesneden planten bloedingsvocht te verzamelen.

MATERIAAL EN METHODEK

De resistente lupineselecties waren afkomstig van het Instituut voor Plantenveredeling; bij de hier beschreven proeven werd selectie no. 199 gebruikt. Als vatbaar ras werd het landras Neven gebruikt.

De zeer pathogene isolatie L 23 van *F. oxysporum lupini* werd gebruikt voor de inoculatie. Schudcultures werden gekweekt in kolven met Dox's voedingsoplossing. De te inoculeren planten werden uit het zand getrokken en met de beschadigde wortels gedurende 10 minuten in een sporensuspensie van een 3-5 dagen oude schudculture geplaatst.

Bloedingsvocht werd als volgt verzameld: Lupineplanten werden onder de cotylen afgesneden, de omtrek onder het snijvlak werd met vaseline ingesmeerd, waarna een passend stukje rubberslang van ± 3 cm lengte over het resterende deel van het hypocotyl werd geschoven, zodat het bloedingsvocht zich daarin kon verzamelen. Een glazen buis werd over het geheel geplaatst om de verdamping te beperken.

Voor micro-reacties op suikers en aminozuren werden reagentia uit de papierchromatografie gebruikt: op suikers werd gereageerd met een oplossing van aniline en phtaalzuur in met water verzadigde n-butanol (PARTRIDGE, 1949).

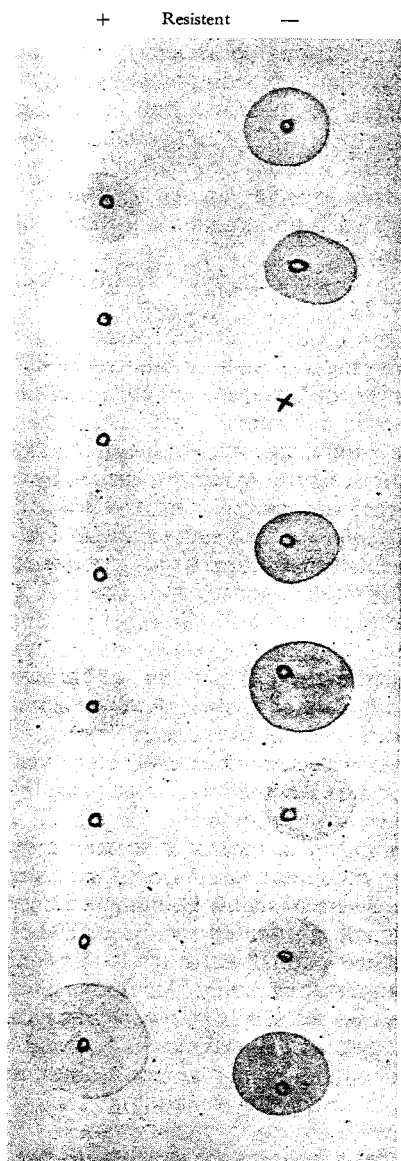


FIG. 1. Reactie op aminozuren in bloedingsvocht van 8 geïnoculeerde resistente lupine planten van selectie no. 199.

Amino acid reaction in exudation sap from 8 inoculated and 8 non-inoculated resistant lupine plants of selection no. 199

- + bloedingsvocht van geïnoculeerde planten
Exudation sap from inoculated plants: no or little amino acids present
- bloedingsvocht van niet-geïnoculeerde planten
Exudation sap from non-inoculated plants; amino acids present
- × geen bloedingsvocht aanwezig
No exudation sap available

Voor het aantonen van aminozuren werd een 0,2 % oplossing van ninhydrine in n-butanol gebruikt.

Door een schoon stuk filtreerpapier even tegen de bolle vloeistofmeniscus te drukken, werd reeds voldoende bloedingsvocht verkregen om één der reacties uit te voeren. In de proeven werden voor iedere plant afzonderlijk beide reacties uitgevoerd.

RESULTATEN

De planten van het ras Neven, die in de hier beschreven proef werden gebruikt, waren 30-4-'54 gezaaid en op 28-5-'54 geïnoculeerd. De planten van selectie no. 199 waren 6-5-'54 gezaaid en 22-5-'54 geïnoculeerd. Op 10-6-'54 werden van het ras Neven 9 geïnoculeerde en 9 controle planten afgesneden, van selectie no. 199 resp. 8 en 8.

De reactie op suikers in het bloedingsvocht was bij alle planten negatief. In het bloedingsvocht van alle niet-geïnoculeerde planten van de resistente selectie no. 199 konden aminozuren worden aangetoond (zie foto 1, rechter strook). In geïnoculeerde planten van selectie no. 199 waren geen of slechts zeer weinig aminozuren aan te tonen (zie foto 1, linker strook). Uit 6 van 8 planten kon *Fusarium* worden geïsoleerd (niet uit plant 5 en 6). Uit niet-geïnoculeerde planten kon de schimmel niet worden geïsoleerd.

Bij planten van het vatbare ras Neven waren de verschillen in aminozuurgehalte in bloedingsvocht van geïnoculeerde en niet-geïnoculeerde planten minder uitgesproken dan bij selectie no. 199.

Met een micropipet werd van iedere groep planten bloedingsvocht verzameld en papierchromatografisch geanalyseerd ¹⁾. In de chromatogrammen bleek maar één aminozuur aanwezig te zijn; duidelijk bleek, dat in bloedingsvocht van niet-geïnoculeerde planten de concentratie aanmerkelijk hoger was dan in dat van geïnoculeerde planten. De hoogste concentratie bedroeg (visueel geschat) ongeveer 10^{-5} g/50 mm³ of wel 0,02 %. Waarschijnlijk was het aangetoonde aminozuur asparaginezuur. Bij een analyse van bloedingsvocht van een nieuwe serie planten (met asparaginezuur als controle) waren 2 aminozuren aanwezig, nl. asparaginezuur en vermoedelijk glutaminezuur.

Voor zover ons bekend, is de aanwezigheid van aminozuren in de houtvaten niet eerder waargenomen; zie o.a. ARISZ (1952).

Dat de aminozuren inderdaad afkomstig zijn uit de houtvaten, werd bij een komkommerplant aangetoond: ook nadat een ring (een paar cm onder het snijvlak met stoom was gedood, kon aminozuur worden aangetoond en wel in dezelfde hoeveelheid als daarvoor.

Verondersteld wordt, dat *Fusarium* in de houtvaten van lupineplanten de daar aanwezige aminozuren gebruikt als koolstofbron voor zijn groei. Deze veronderstelling wordt gesteund door een latere waarneming, waarbij werd aangetoond, dat het mogelijk is *F. oxysporum lupini* in vitro te kweken met anorganische zouten, onder toevoeging van slechts één aminozuur als organische verbinding.

SUMMARY

It has been shown by SAALTINK (unpublished data) that *Fusarium oxysporum lupini* SN. et H. can be isolated both from inoculated plants of the resistant selection no. 199 of *Lupinus luteus* and from the susceptible variety Nevera.

The exudates of plants, the tops of which had been removed, were analysed for sugars and amino acids in order to determine whether the fungus can live on the substances present in the sap of the xylem vessels.

No sugars were found but demonstrated in the sap, but in nearly all cases amino acids were found by using paperchromatographic methods. Aspartic acid was the only amino acid found, except in one case where probably glutamic acid was also present. The concentration of aspartic acid amounted to about 0,02 %. The concentration of amino acids in inoculated plants was much lower than that in non-inoculated plants. Therefore, it is assumed that the fungus lives on amino acids as a carbon source in the xylem vessels of resistant and susceptible plants. This hypothesis is supported by the observation that *F. oxysporum lupini* can be grown in vitro in a solution containing inorganic salts and one amino acid as the only carbon source.

LITERATUUR

- ARISZ, W. H., - 1952. Transport of Organic Compounds. Ann. Rev. Plant Phys. 3: 109-130.
 GOTTLIEB, D., - 1943. The presence of a Toxin in Tomato Wilt. Phytopathology 33: 126-135.
 PARTRIDGE, S. M., - 1949. Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. Nature 164: 443.
 SCHEFFER, R. P., and WALKER, J. C., - 1954. Distribution and Nature of *Fusarium* Resistance in the Tomato Plant. Phytopathology 44: 94-101.
 SNYDER, W. C., BAKER, K. F., and HANSEN, H. N., - 1946. Interpretation of Resistance to *Fusarium* in Tomato. Science 103: 707-708.

¹⁾ Deze analyses werden uitgevoerd door Ir H. W. J. RAGETLI.