

Aktywność β -glikozydazy i peroksydazy w siewkach łubinu żółtego infekowanych *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*

MAGDALENA RYBUS-ZAJĄC, IWONA MORKUNAS

Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu,
ul. Wołyńska 35, 60-638 Poznań

Department of Plant Physiology, August Cieszkowski University of Agriculture,
Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland.

β -glycosidase and peroxidase activity in yellow lupin seedling
infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*.

(Otrzymano: 01.04.2005)

S u m m a r y

Lupine diseases caused by pathogenic fungi constitute a serious problem in agriculture. They lead to partial yield loss and deterioration of crop quality through the changes in biochemical composition of seeds or their contamination with mycotoxins. Some of common lupine diseases are fusarioses caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*.

Morphometric and metabolic changes were investigated in yellow lupine seedlings infected with *F. oxysporum* f. sp. *lupini*. It was found that infection caused temporary inhibition of seedling growth, overcome at later development, and activation of β -glycosidase and peroxidases. The changes in enzymes activity indicate the induction of defense mechanism against *F. oxysporum* f. sp. *lupini* and inhibition of pathogen spread.

Key words: *Lupinus luteus*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*, β -glycosidase, peroxidase

WSTĘP

Łubin jest rośliną o dużym znaczeniu w gospodarce człowieka, stąd stanowi obiekt wszechstronnych badań, w tym nad oddziaływaniem patogenicznych mikroorganizmów na wzrost i rozwój tej rośliny. Uprawiane w Polsce gatunki cechują się

zróznicowaną wrażliwością na grzyby z rodzaju *Fusarium*; łubin żółty jest najbardziej podatny, a biały i wąskolistny porażane są w mniejszym stopniu. Występowanie i nasilenie fuzarioz w dużej mierze zależy od odmiany, a także od ras i szczepów patogena występujących w danym ekosystemie, warunków glebowo-klimatycznych, stosowanej agrotechniki oraz regionu uprawy (Jędrzycka i in., 1993; Lewartowska i in., 1994; Sawicka-Sienkiewicz, 1997). Przykładowo w Polsce północno-wschodniej, w wilgotnych latach, fuzarioza bywała przyczyną porażenia także łubinu wąskolistnego (Zakrzewska, 1995).

Celem niniejszej pracy była ocena zmian metabolicznych w siewkach łubinu żółtego porażonych *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*. Patogen ten powodując zgorzel siewek oraz fuzaryjne więdnienie może przenosić się z materiałem siewnym, ale także rozwijać saprofitycznie w glebie lub pasożytować na innych roślinach uprawnych i chwastach. Objawy choroby występują w postaci zgorzeli przedwzrostowej, gnicia korzeni, uwiędów i przedwczesnego zamierania roślin na skutek zakłócenia funkcji fizjologicznych (Sadowski, 1994).

Przeprowadzono ocenę morfometryczną porażonych siewek oraz badano aktywność β -glikozydazy i peroksydaz, sukcesywnie w fazie kiełkowania i wzrostu siewek.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny i inokulacja nasion. Materiałem wyjściowym do badań były siewki wyrosłe z nasion łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) odm. *Polo*. Nasiona poddawano sterylizacji powierzchniowej 96% etanolem (3 min), a następnie 0,01% HgCl₂ (15 min), po czym płukano je kilkakrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Po 48 godzinnym okresie pęcznienia nasiona wysiewano do doniczek ze sterylnym perlitem, jednocześnie przeprowadzając inokulację zawiesiną zarodników *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini* o stężeniu 5×10^6 w ml, poprzez podłanie nasion.

Doświadczenie prowadzono w kamerze hodowlanej w temperaturze 23°C i przy fotoperiodzie 14/10 godzin, stosując oświetlenie lampami fluorescencyjnymi Philips TLD 58W/84 (natężenia światła $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Obserwacje prowadzono przez 4 doby. Po 48, 72 i 96 godzinach od wysiewu i inokulacji nasion pobierano materiał do analiz (korzenie siewek), dla których wykonano pomiary długości i przygotowywano 200 mg naważki do oznaczeń enzymatycznych. Do momentu oznaczeń materiał ten przechowywano w ciekłym azocie.

Izolat *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini* otrzymano z Banku Patogenów IOR w Poznaniu. Hodowlę prowadzono na pożywce ziemniaczanej PDA (Difco).

Ekstrakcja białka enzymatycznego. Zamrożone porcje korzeni rozcierano w 3 ml 0.1 M buforu fosforanowo-sodowego o pH 7.0. Do ekstrakcji dodawano 20 mg

Polyclaru AT, substancji wiążącej związku niskocząsteczkowe. Po odwirowaniu ekstraktu przy 10000 g przez 15 minut w supernatancie oznaczano aktywność enzymów oraz poziom białka.

Aktywność β -glikozydazy oznaczano w oparciu o pracę *Nicholsa i in.*, (1980). Mieszaninę zawierającą 0,3 ml wyciągu i 0,3 ml substratu β -D-glukopyranozydu p-nitrofenolu (2 mg /1 ml H_2O) inkubowano w temperaturze $30^\circ C$ przez godzinę. Reakcję enzymatyczną przerywano dodając 0,9 ml 0,2 N Na_2CO_3 i mierzono gęstość optyczną na spektrofotometrze przy długości fali 400 nm. Aktywność enzymu wyrażano w μ molach p-nitrofenolu powstałego w ciągu godziny w przeliczeniu na 1 mg białka.

Aktywność peroksydazy syringaldazynowej oznaczano w oparciu o pracę *Imberty i in.*, (1985). Do 0,6 ml ekstraktu (o takiej zawartości enzymu, aby wzrost absorbancji w czasie pomiaru mieścił się w granicach 0.200 – 0.500) dodawano 0,6 ml 5 mM H_2O_2 a następnie 60 μ l syringaldazyny (3.1 mg substratu rozpuszczono w 1 ml metanolu a następnie mieszano w/w w stosunku 1:2 z dioksanem). Absorbancję mierzono przy długości fali 530 nm. Aktywność enzymu wyrażano jako przyrost absorbancji w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka ($U \cdot mg^{-1}$ białka).

Aktywność peroksydazy guajakolowej oznaczano w oparciu o pracę *Hammerschmidt i in.*, (1982). Do 0,5 ml ekstraktu dodawano 0,5 ml 3.4 mM guajakolu a następnie 0,5 ml H_2O_2 . Co pół minuty odczytywano na spektrofotometrze absorbancję przy długości fali 480 nm. Aktywność enzymu wyrażano jako przyrost absorbancji w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka ($U \cdot mg^{-1}$ białka).

Aktywność peroksydazy pyrogallolowej była oznaczana według metody *Nakano i Asada*, (1981). Mieszanina reakcyjna zawierała: 50 mM bufor Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7,0, 180 mM pyrogallol, 2 mM H_2O_2 i ekstrakt enzymatyczny. Start reakcji następował przez dodanie H_2O_2 . Analizowano wzrost absorbancji przy długości fali 430 nm przez 2 minuty, co 15 sekund. Aktywność podawano w jednostkach enzymu na mg białka ($U \cdot mg^{-1}$ białka).

Zawartości białka oznaczano metodą *Bradford* (1976).

WYNIKI

Przeprowadzając pomiary morfometryczne stwierdzono, że inokulacja *F. oxysporum* powoduje zahamowanie wzrostu korzeni siewek łubinu w porównaniu do roślin nieinokulowanych. W kolejnych terminach ich długość wynosiła 13,2, 16,3 i 31 mm, co stanowiło 66,4%, 65,4% oraz 68,9% długości korzeni kontrolnych (tab. 1).

Tabela 1
Długość korzeni siewek łubinu żółtego nieinokulowanych i inokulowanych
F. oxysporum f. sp. *lupini*

Table 1
The length of yellow lupin seedling roots inoculated and noninoculated with
Fusarium oxysporum f. sp. *lupini*

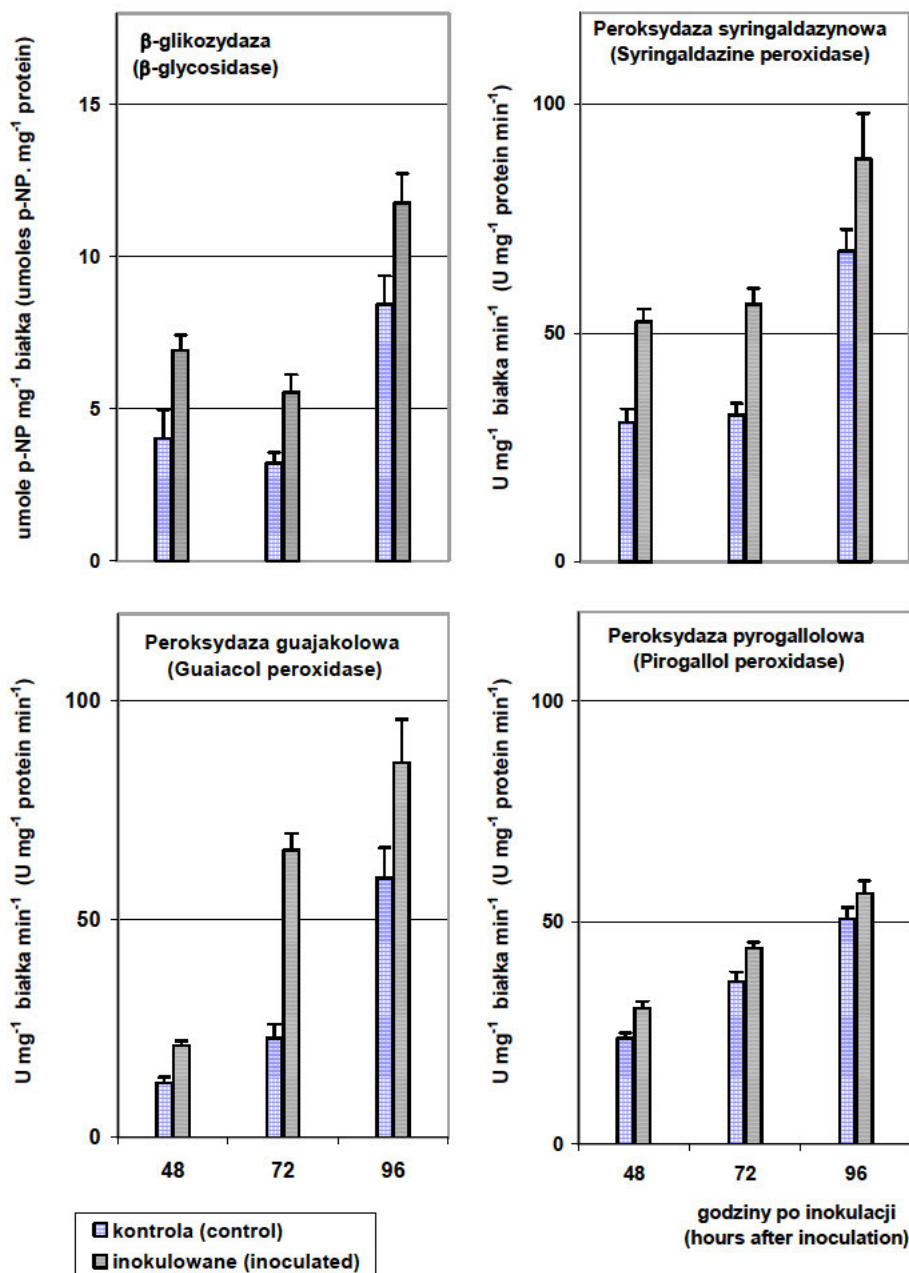
Materiał (Material)	Długość [mm·organ ⁻¹] Length [mm·organs ⁻¹]		
	48 godzin (48 hours)	72 godziny (72 hours)	96 godzin (96 hours)
siewki nieinokulowane (noninoculated seedlings)	19.9 (±2.4)	24.8 (±2.1)	45 (±2.5)
siewki inokulowane (inoculated seedlings)	13.2 (±1.6) 66.4%	16.3 (±1.2) 65.4%	31(± 2.1) 68.9%

W tkankach kontrolnych aktywność β -glikozydazy wynosiła 4.0, 3.3 i 8.4 μ mol p-nitrofenolu, a w tkankach inokulowanych 6.9, 5.6 i 11.8 jednostek odpowiednio po 48, 72 i 96 godzinach wzrostu i porażenia (ryc. 1). W następstwie inokulacji stwierdzono więc wzrost aktywności enzymu, który w kolejnych terminach oznaczeń wynosił: 72%, 67,2% i 39,5%.

Aktywność peroksydazy analizowano wobec syringaldazyny, guajakolu i pyrogallolu jako substratów; wobec syringaldazyny w siewkach kontrolnych wynosiła 30.4, 32.1 i 67.9 $U \cdot mg^{-1}$ białka a w tkankach inokulowanych 52.4, 56.2 i 87.9 jednostek (ryc.1). W następstwie infekcji *F. oxysporum* f. sp. *lupini* stwierdzono wzrost aktywności enzymu odpowiednio o: 72,6%, 75,8 i 29%.

Aktywność peroksydazy mierzona wobec guajakolu była, szczególnie w pierwszym terminie, około 2-krotnie niższa w porównaniu do peroksydazy syringaldazynowej. Odpowiednio w kolejnych terminach oznaczeń wynosiła: 12.5, 22.8 i 59.5 $U \cdot mg^{-1}$ białka w siewkach kontrolnych, a 20.9, 65.8 i 85.9 w inokulowanych. Poinfekcyjny wzrost aktywności enzymu wynosił: 67% i 188% i 44% (ryc. 1). Wzrost aktywności peroksydazy po infekcji wobec guajakolu był wyższy niż wobec syringaldazyny, szczególnie w drugim i trzecim terminie oznaczeń.

W tkankach kontrolnych aktywność peroksydazy pyrogallolowej wynosiła: 23.9, 36.6, 50.8, a w tkankach inokulowanych 30.7, 44.2, 56.5 jednostek odpowiednio w terminach oznaczeń (ryc. 1). W następstwie inokulacji stwierdzono więc wzrost aktywności enzymu w porównaniu z kontrolą największy w pierwszym etapie infekcji.



Ryc. 1 Aktywność β -glikozydazy, peroksydazy syringaldazynowej, guajakolowej i pyrogallolowej w siewkach łubinu żółtego odm. *Polo* infekowanych *Fusarium oxysporum*

Fig 1 β -glycosidase, syringaldazine, guaiacol and pirogallol peroxidase activity of yellow lupin seedlings cv. *Polo* inoculated by *Fusarium oxysporum*

DYSKUSJA

Jednym z podstawowych celów hodowlanych roślin jest pozyskiwanie odmian o jak najwyższej odporności na choroby. W tym procesie znajomość mechanizmów obronnych nabiera coraz istotniejszego znaczenia

Kluczową rolę w mechanizmie odporności przypisuje się metabolitom o właściwościach fungitoksycznych. Metabolity te mogą być syntetyzowane „*de novo*” lub uwalniane z form nieaktywnych, związanych, np. glikozydowo. Właściwościami fungitoksycznymi cechują się m.in. związki o charakterze fenolowym, które z form związanych glikozydowo uwalnia β -glikozydaza (Nicholson i Hammerschmit, 1992). Ich kumulacja hamuje wzrost i rozprzestrzenianie patogena, warunkując odporność rośliny (Harborne, 1980; Lewis i Yamamoto, 1990; Kuć, 1997).

Jednym z badanych wskaźników w ramach niniejszej pracy była właśnie β -glikozydaza, enzym którego aktywacja w następstwie infekcji jest często wykazywana dla układów roślin/patogen (Kozłowska, 1993; Edeva i in., 2000; Morkunas i in., 2002). β -glikozydaza była również analizowana w liściach łubinu infekowanych *Pleiochaeta setosa*, gdzie stwierdzono wzrost aktywności w roślinach porażonych tym patogenem (Rybus-Zajac i Kozłowska, 1996, 2000). Aktywacja β -glikozydazy w patogenezie fuzaryjnego wędnięcia łubinu żółtego w stadium kiełkowania i siewki wskazuje na uruchomienie czynnego mechanizmu obronnego także w tak wczesnej fazie rozwoju rośliny. Pomimo znacznego uzależnienia metabolizmu od materiałów zapasowych, prawdopodobnie wysoka aktywacja oddechu prowadzi także do syntezy i gromadzenia metabolitów wtórnych, wykorzystywanych w odpowiedzi na stresy środowiska. Z drugiej strony aktywacja enzymu może być przejawem zmian chorobowych lub aktywności pasożytniczego grzyba. Uwalniane przez β -glikozydazę metabolity fenolowe mogą uczestniczyć w bezpośrednim ograniczaniu rozprzestrzeniania się patogena lub też biorą udział w tworzeniu barier strukturalnych, co uzasadnia badania aktywności peroksydazy.

Peroksydaza to enzym, który uznany został za marker reakcji roślin na czynniki stresowe ze względu na swoje bardzo powszechne występowanie we wszystkich tkankach roślinnych (Siegel, 1993). W następstwie infekcji roślin patogenicznymi mikroorganizmami następuje wzrost aktywności peroksydazy, często skorelowany z poziomem odporności roślin (He i in., 2001, Kozłowska i in., 2001). Aktywność peroksydazy była też przedmiotem badań nad podatnością odmian łubinu na brunatną plamistość liści, gdzie stwierdzono poinfekcyjny wzrost aktywności enzymu, wyższy u odmiany odpornej (Rybus-Zajac i Kozłowska, 2003).

W siewkach łubinu żółtego, niezależnie od zastosowanego substratu, stwierdzono poinfekcyjny wzrost aktywności enzymu w inokulowanych tkankach. Przebieg tych zmian był skorelowany z aktywacją β -glikozydazy. Sugerować może to, że uwalniane przez hydrolazę metabolity prawdopodobnie mogą nie tylko bezpośrednio ograniczać rozprzestrzenianie patogena, ale mogą podlegać dalszemu utlenianiu do melanin lub przy udziale peroksydaz być włączane w bariery strukturalne.

LITERATURA

- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Edreva A., Sotirova V., Georgieva I.D., Stoimenova E., Rodeva R., Bogatzevska N., 2000. Differential expression of β -glucosidase in tomato – stress stimuli systems. *Acta Physiol. Plant.* 22: 274–277.
- Hammerschmit R., Nucle E.M., Kuć J., 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 73–82.
- Harborne J.B., 1980. Plant phenolics. In: *Secondary Plant Products*, E.A. Bell and B.V. Charlwood eds. Springer-Verlag, Berlin.: 329–395.
- He Ch., Hsiang T., Wolyn D.J., 2001. Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 473–483.
- Imberty A., Goldberg R., Catesson A.M., 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta.* 164: 221–226.
- Jędryczka M., Lewartowska E., Frencel I., 1993. Wpływ środowiska na stopień odporności odmian grochu siewnego i łubinu żółtego na fuzariozę (*Fusarium spp.*). Materiały sympozjum: „Biotyczne środowisko uprawne a zagrożenie chorobowe roślin”. Olsztyn: 213–220.
- Kozłowska M., 1993. Activity of β -D-glucosidase and syringaldazine oxidase and susceptibility of red raspberry canes to *Didymella applanata* (Niessl) Sacc. *Phytopath. Polonica.* 6(XVIII): 7–12.
- Kozłowska M., Fryder K., Wolko B., 2001. Peroxidase involvement in the defense response of red raspberry to *Didymella applanata* (Niessl / Sacc.) *Acta Physiol. Plant.*: 303–310.
- Kuć J., 1997. Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiol. Plant.* 19: 551–559.
- Lewartowska E., Jędryczka M., Frencel I., 1994. Środowisko uprawy a ocena odporności odmian łubinu żółtego na fuzariozę (*Fusarium spp.*). Materiały Konferencji Towarzystwa Łubinowego: „Łubin-Białko-Ekologia”. Poznań: 219–227.
- Lewis N.G., Yamamoto E., 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 455–496.
- Morkunas I., Kozłowska M., Ratajczak W., 2002. Rola węglowodanów we wczesnych reakcjach metabolicznych kiełkujących nasion łubinu porażonych przez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini*. *Acta Agrobot.* 55: 247–254.
- Nakano Y., Asada K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867–880.
- Nichols E.J., Beckman J.M., Hadwiger L.A., 1980. Glycosidic enzyme activity in pea tissues and pea-*Fusarium solani* interaction. *Plant Physiol.* 66: 199–204.
- Nicholson R.L., Hammerschmidt R., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 369–389.

- Rybus-Zajęc M., Kozłowska M., 1996. Activity of β -D-glucosidase of lupin leaves infected with *Pleiochaeta setosa* (Kirchn.) Hughes. *Acta Physiol. Plant.* 18: 211–216.
- Rybus-Zajęc M., Kozłowska M., 2000. Hydrolitic enzymes in the lupin resistance to *Pleiochaeta setosa* (Kirchn.) Hughes. *Phytopathol. Pol.* 19: 19–26.
- Rybus-Zajęc M., Kozłowska M., 2003. Peroxidase involvement in response of lupin to *Pleiochaeta setosa*. *Phytopathol. Pol.* 27: 69–77.
- Sadowski S., 1994. Zdrowotność łubinu i próby zapobiegania zgorzelom korzeni. Materiały Konferencji Towarzystwa Łubinowego: „Łubin-Białko-Ekologia”. Poznań: 65–69.
- Sawicka-Sienkiewicz E.J., 1997. Hodowla łubinów w Polsce i na świecie. Materiały Konferencji Towarzystwa Łubinowego: „Łubin we współczesnym rolnictwie”. Olsztyn: 37–57.
- Siegel B.Z., 1993. Plant peroxidases - an organismic perspective. *Plant Growth Reg.* 12: 303–312.
- Zakrzewska E., 1995. Odporność roślin strączkowych pastewnych na patogeny grzybowe. Materiały sympozjum: „Odporność roślin na choroby, szkodniki i niesprzyjające czynniki środowiska”. Radzików: 233–236.

Streszczenie

Choroby łubinu powodowane przez grzyby chorobotwórcze stanowią poważny problem w rolnictwie. Prowadzą do zniszczenia części plonu oraz pogorszenia jego jakości, poprzez zmiany w składzie biochemicznym nasion lub zakażenie ich mykotoksynami. Do powszechnie występujących chorób łubinu zaliczane są fuzariozy powodowane przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*.

Badano zmiany morfologiczne oraz metaboliczne w siewkach łubinu żółtego infekowanych *F. oxysporum* f. sp. *lupini*. Stwierdzono, że infekcja spowodowała okresowe zahamowanie wzrostu siewek, przełamane w dalszej fazie ich rozwoju oraz aktywację β -glikozydazy oraz peroksydaz. Poinfekcyjne zmiany aktywności enzymów wskazują na uruchamianie mechanizmu obronnego względem *F. oxysporum* f. sp. *lupini* i zahamowanie rozprzestrzeniania się patogena.