

# Aktywność enzymów (PAL, TAL) szlaku fenylopropanoidowego w tkankach pszenicy po stymulacji EPS fitopatogenicznego szczepu *Fusarium graminearum* (DEMFg36)

## The activity of the phenylpropanoid pathway enzymes (PAL, TAL) in wheat tissues after stimulation with EPS obtained from the phytopathogenic *Fusarium graminearum* strain (DEMFg36)

Artur Nowak<sup>1</sup>, Renata Tyśkiewicz<sup>2</sup>, Jolanta Jaroszuk-Ściseł<sup>1</sup>

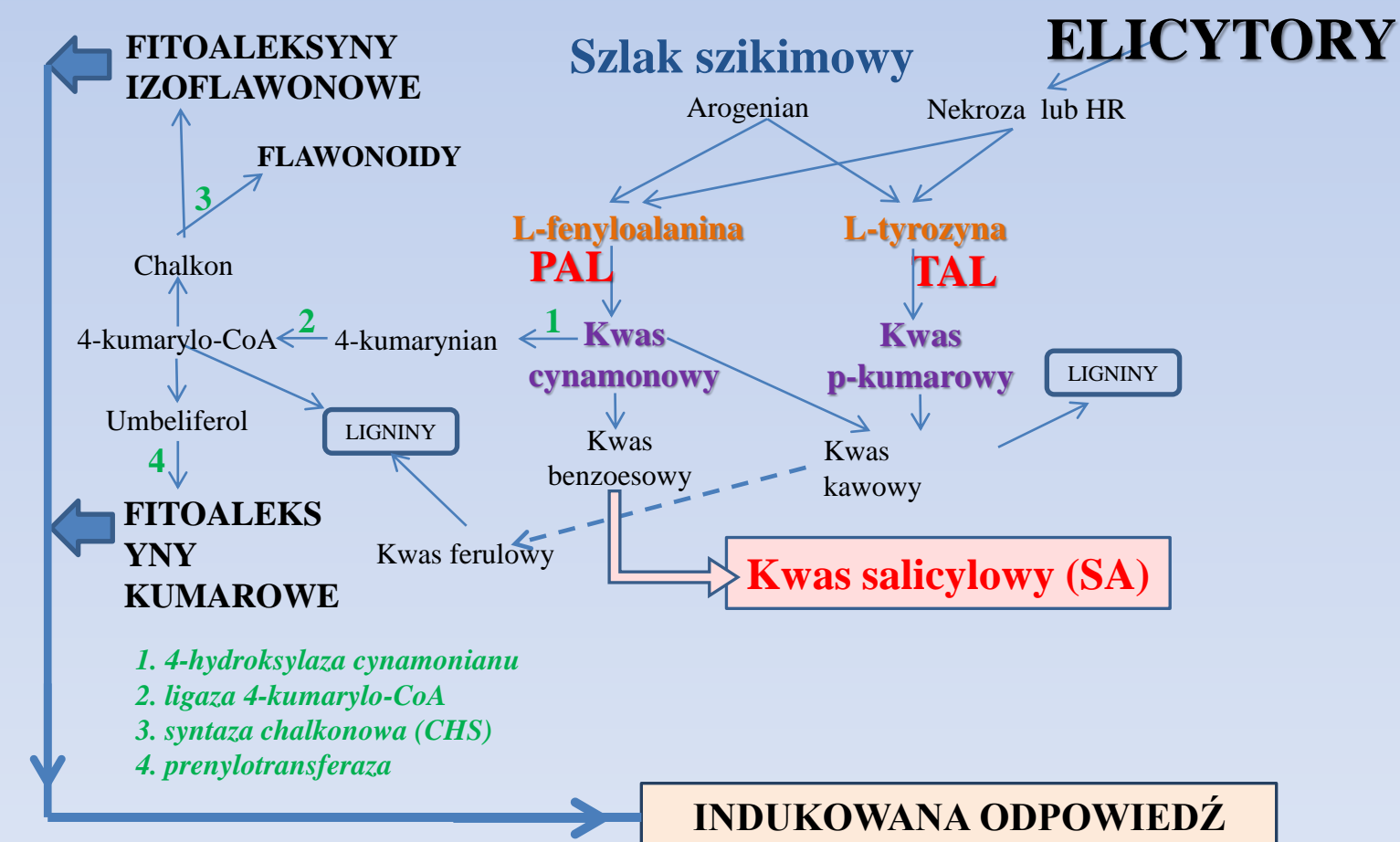
<sup>1</sup> Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

<sup>2</sup> Laboratorium Analityczne, Sieć Badawcza Łukasiewicz–Instytut Nowych Syntezy Chemicznych, Al. Tysiąclecia Państwa Polskiego 13a, 24-110 Puławy

### Wstęp

*Fusarium* to rodzaj grzybów nitkowatych szeroko rozpowszechniony na całym świecie we wszystkich typach gleb. Wiele gatunków tego rodzaju to patogeny powodujące choroby różnych roślin o dużym znaczeniu agronomicznym, ogrodniczym lub leśnym. Jedną z najgroźniejszych chorób wywoływaną przez ten rodzaj jest fuzarioza (FHB – ang. Fusarium Head Blight lub Fusariosis) [1]. Gatunki należące do tego rodzaju są zdolne do syntetyzowania wielu metabolitów wtórnych takich jak: mykotoksyny, fitohormony (IAA i GA) oraz enzymy degradujące ścianę komórkową (CWDE – ang. Cell Wall Degrading Enzymes), oraz polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) [2,3]. EPS mogą być rozpoznawane przez receptory roślinne i oddziaływać m. in. na enzymy szlaku fenylopropanoidowego (PAL – liaza fenyloalaninowa i TAL – liaza tyrozynowa), które biorą udział w syntezie związków fenolowych uczestniczących w lignifikacji ściany komórkowej (Rysunek 1.) [4].

1. Moreno-Amores J, Michel S, Löschenberger F, Buerstmayr H. (2020) Dissecting the contribution of environmental influences, plant phenology, and disease resistance to improving genomic predictions for Fusarium Head Blight resistance in wheat. *Agronomy* 10, 2008
2. Jaroszuk-Ściseł J, Nowak A, Komaniecka I, Choma A, Jarosz-Wilkolazka A, Osińska-Jaroszuk M, Tyśkiewicz R, Wiater A, Rogalski J. (2020) Differences in production, composition, and antioxidant activities of exopolymeric substances (EPS) obtained from cultures of endophytic *Fusarium culmorum* strains with different effects on cereals. *Molecules* 25, 616.
3. Prathyusha A, Mohana SG, Bramhachari PV. (2018) Chemical characterization and antioxidant properties of exopolysaccharides from mangrove filamentous fungi *Fusarium equiseti* ANP2. *Biotechnol. Rep.* 19, 00277.
4. Dong NQ, Lin HX. (2021) Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. *J. Integr. Plant Biol.* 63, 180–209.



Rysunek 1. Schemat przebiegu szlaków indukcji odporności roślin po stymulacji elicytorami zewnątrzkomórkowymi – EPS. Opracowanie własne

# Materiały i Metody

W badaniach wykorzystano szczep *Fusarium graminearum* (DEMFG36) wyizolowany z porażonych kłosów pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) i przyporządkowany do gatunku na podstawie analizy genetycznej i morfologicznej. Szczep został zdeponowany w międzynarodowych bazach pod numerami CBS120102 oraz DQ453701.

Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) uzyskano z 3 dniowej hodowli szczepu na podłożu Czapek-Dox z 3% sacharozą i 0,75% peptonem w 20°C, 120 rpm, poprzez precypitację alkoholową 1:1. Uzyskane EPS następnie liofilizowano i przechowywano do następnych badań.

Aktywność enzymów szlaku fenylopropanoidowego badano w korzeniach i łodygach siewek pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany Arkadia. Nasiona inkubowano w obecności 0,05% zawiesin uzyskanych EPS oraz elicytorów komercyjnych: kwasu salicylowego (SAL), laminaryny (LAM), acibenzolar-S-methylu (BTH), chitozanu (CHI), przez okres 5. i 10. dni w temp. 20°C.

Enzymy ekstrahowano 50 mM buforem fosforanowym o pH 7.5, z dodatkiem 1mM EDTA, 1mM PMSF, 5mM askorbinianu sodu i 1% PVPP.

Aktywność enzymatyczną wyrażano w U (mM/min/mg białka):

A. Liaza fenyloalaninowa - Reakcję przeprowadzono w 100 mM buforze boranowym o pH 8.8. Do 0,1 mL ekstraktu, dodano 0,5 mL L-fenyloalaniny (0,5 mM) i dopełniono wodą do 1 mL. Mieszaninę inkubowano w 37°C przez 1 godzinę, a reakcję zatrzymywano przez dodanie 0,5 mL 5M HCl. Absorbancję mierzono przy długości fali 240 nm. Aktywność określono na podstawie transformacji L-fenyloalaniny w kwas trans-cynamonowy.

B. Liaza tyrozynowa - Reakcję przeprowadzono w 100 mM buforze boranowym o pH 8.8. Do 0,1 mL ekstraktu, dodano 0,5 mL tyrozyny (5,5 μM) i dopełniono wodą do 1 mL. Mieszaninę inkubowano w 37°C przez 1 godzinę, a reakcję zatrzymywano przez dodanie 0,5 mL 5M HCl. Absorbancję mierzono przy długości fali 340 nm. Aktywność określono na podstawie transformacji tyrozyny do kwasu kumarowego.

## ELICYTACJA ZIARNA PSZENICY\* ZA POMOCĄ EPS

### Inkubacja ziarna pszenicy kiełkującego w 0,05% zawiesinie EPS

Dodanie 0,05% zawiesiny badanych EPS do sterylnych nasion pszenicy, po 2 dniach określenie liczby wykiełkowanych ziarniaków

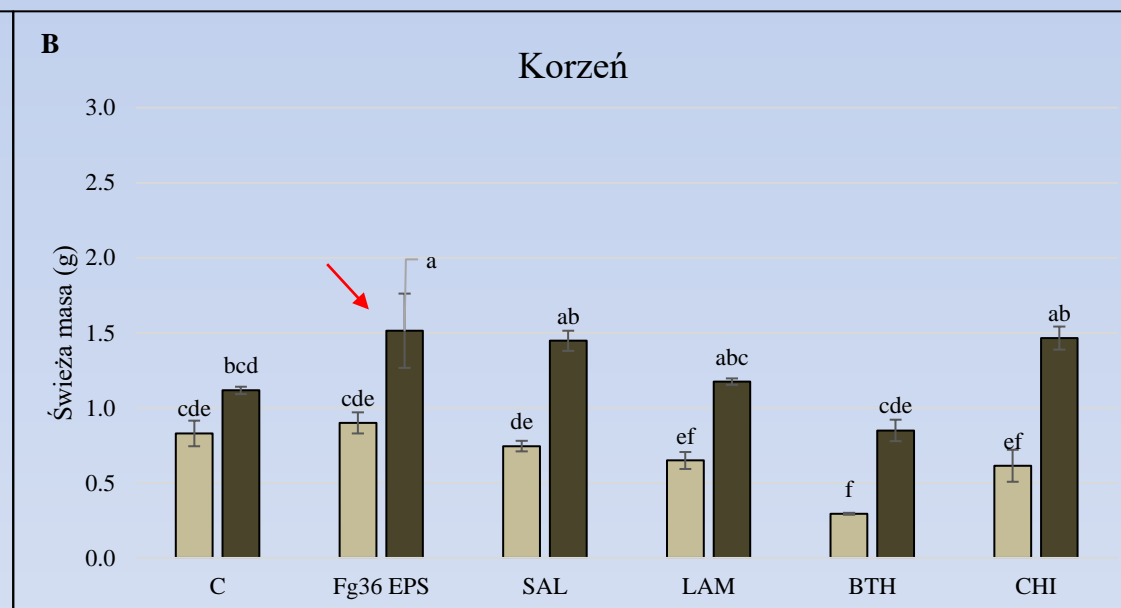
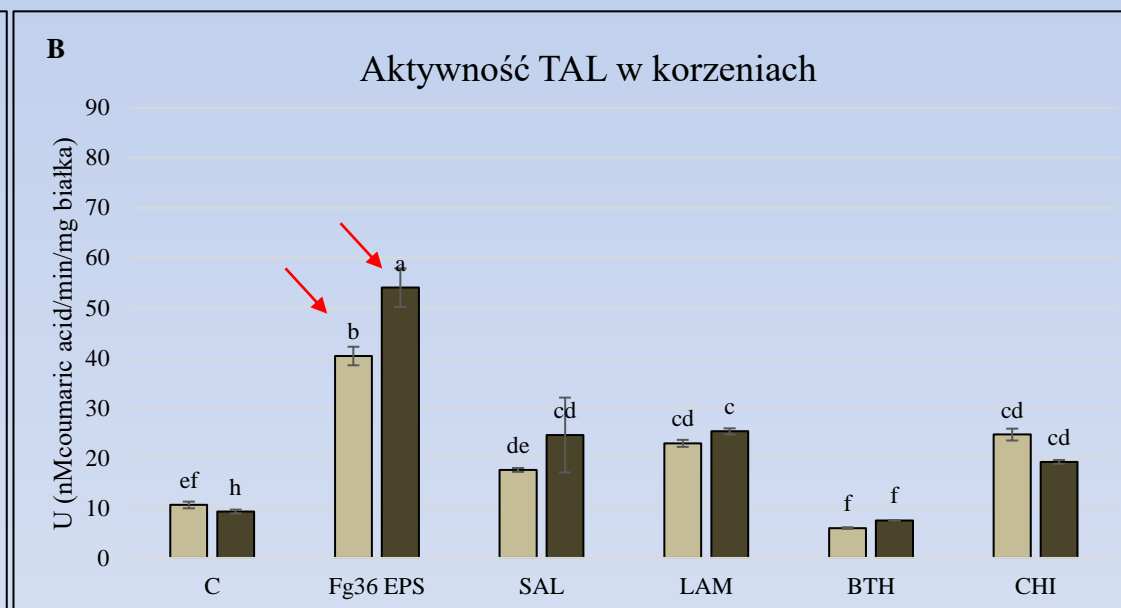
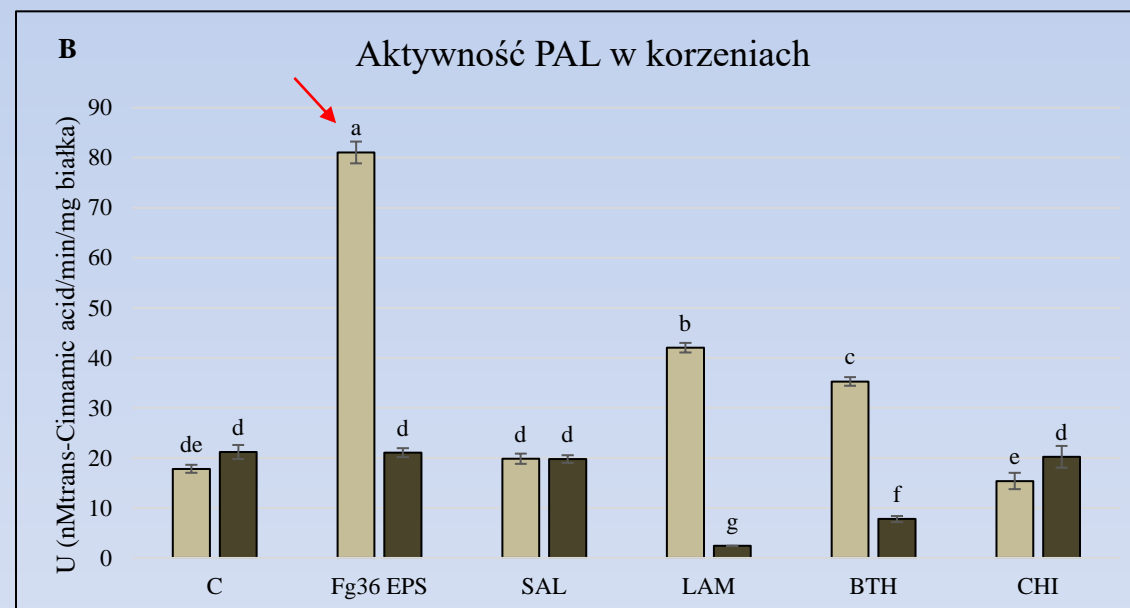
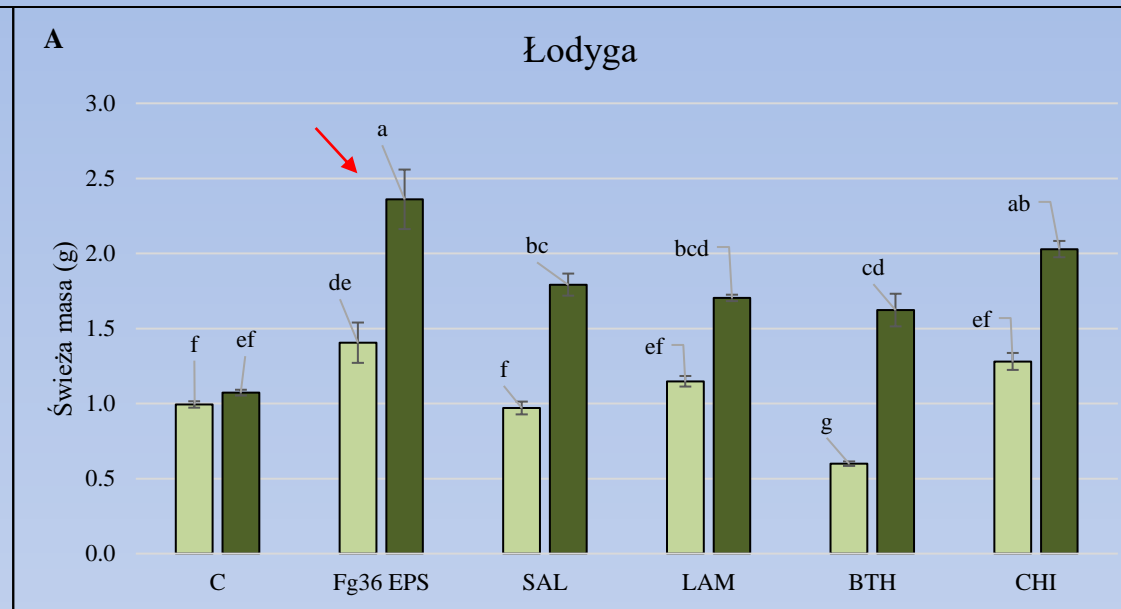
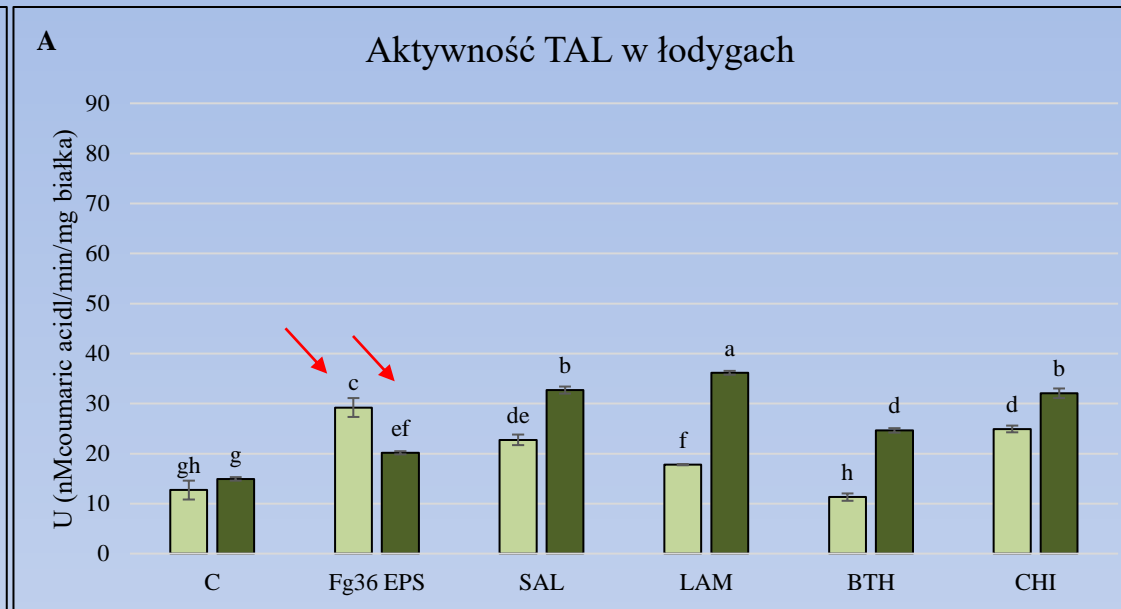
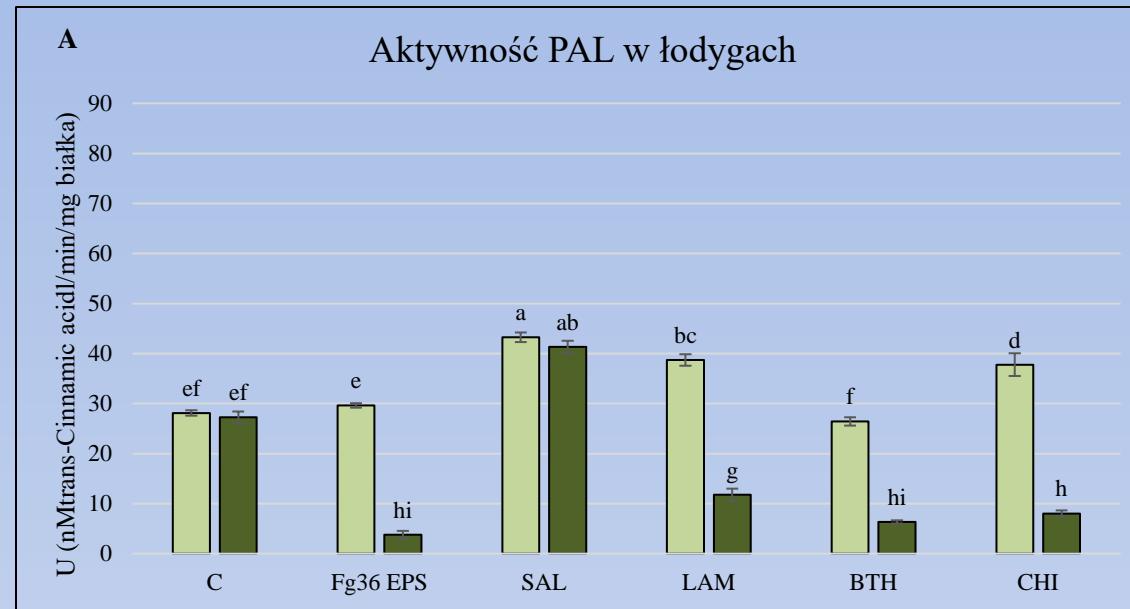
inkubacja siewek w 20°C, po 5 dniach określenie świeżej masy części roślin i przygotowanie tkanek do izolacji enzymów

inkubacja siewek w 20°C, po 10 dniach określenie świeżej masy części roślin i przygotowanie tkanek do izolacji enzymów



Rysunek 2. Przebieg inokulacji i inkubacji nasion pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany Arkadia w obecności EPS uzyskanych z hodowli fitopatologicznego szczepu *Fusarium graminearum* (DEMFG36)

# Opis Wyników



**Rysunek 3.** Aktywność PAL w łodygach (A) i korzeniach (B) pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany Arkadia kielkującej w obecności EPS uzyskanych z hodowli fitopatologicznego szczepu *Fusarium graminearum* (DEMFg36) i elicytorów komercyjnych, zobrazowane w postaci mapy cieplnej. K – kontrola H<sub>2</sub>O; SAL – kwas salicylowy; LAM – laminaryna; BTH – S-metyloester benzo-1,2,3-tiazolowy kwasu tiokarboksylowego; CHIT – chitozan.

**Rysunek 4.** Aktywność TAL w łodygach (A) i korzeniach (B) pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany Arkadia kielkującej w obecności EPS uzyskanych z hodowli fitopatologicznego szczepu *Fusarium graminearum* (DEMFg36) i elicytorów komercyjnych, zobrazowane w postaci mapy cieplnej. K – kontrola H<sub>2</sub>O; SAL – kwas salicylowy; LAM – laminaryna; BTH – S-metyloester benzo-1,2,3-tiazolowy kwasu tiokarboksylowego; CHIT – chitozan.

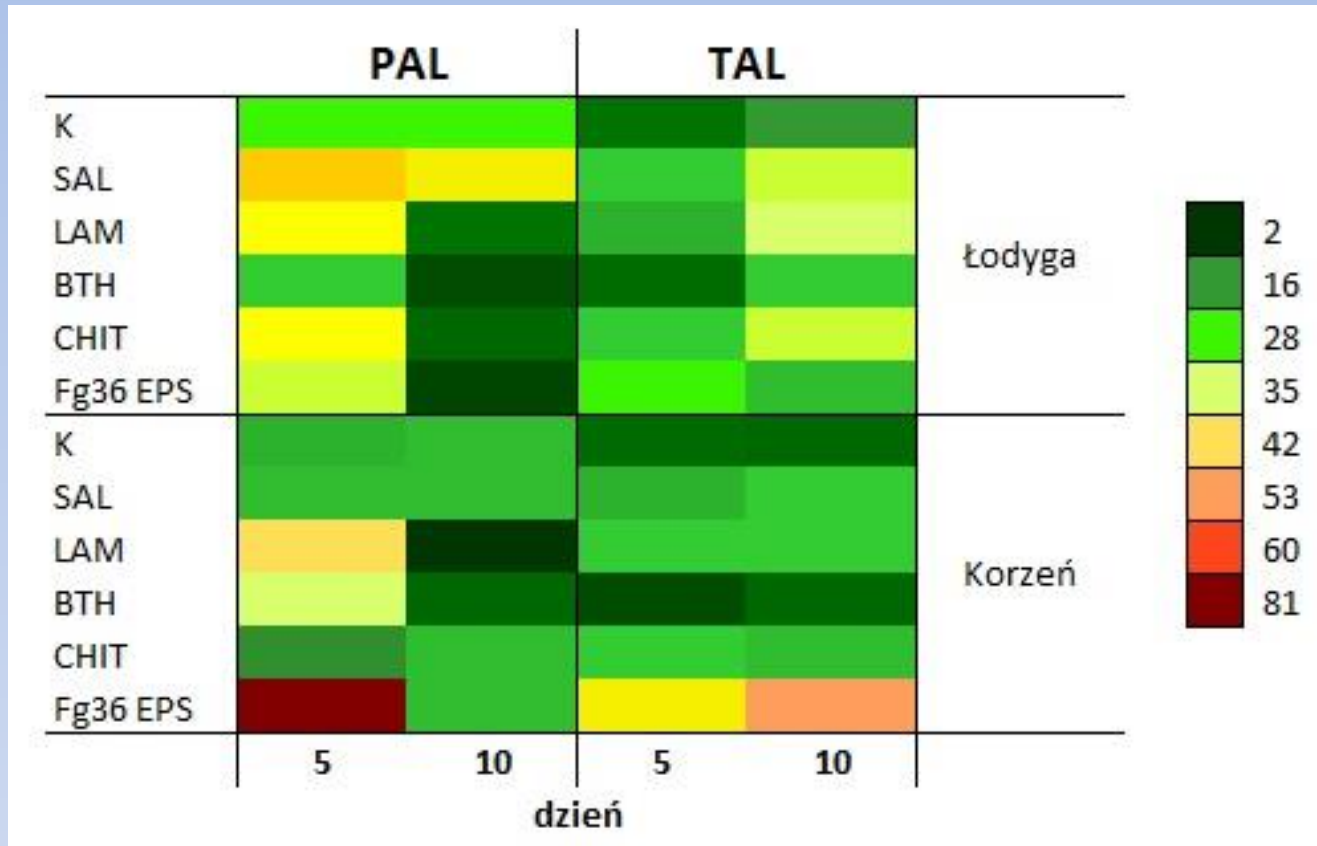
**Rysunek 5.** Świeża masa łodyg (A) i korzeni (B) pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany Arkadia kielkującej w obecności EPS uzyskanych z hodowli fitopatologicznego szczepu *Fusarium graminearum* (DEMFg36) i elicytorów komercyjnych, zobrazowane w postaci mapy cieplnej. K – kontrola H<sub>2</sub>O; SAL – kwas salicylowy; LAM – laminaryna; BTH – S-metyloester benzo-1,2,3-tiazolowy kwasu tiokarboksylowego; CHIT – chitozan.

Aktywność **PAL** (Rysunek 3) w wyniku stymulacji EPS szczepu DEMFg36 wzrastała ponad 4-krotnie w korzeniach (~80U) po 5 dniach inkubacji. Aktywność PAL była również 2-4-krotnie wyższa niż w przypadku działania elicytorów komercyjnych. Z kolei 10-go dnia inkubacji, poziom aktywności PAL w korzeniach był na poziomie kontroli wodnej. W 5 dniu hodowli nie zaobserwowano znaczącego wzrostu poziomu tego enzymu w łodygach pszenicy.

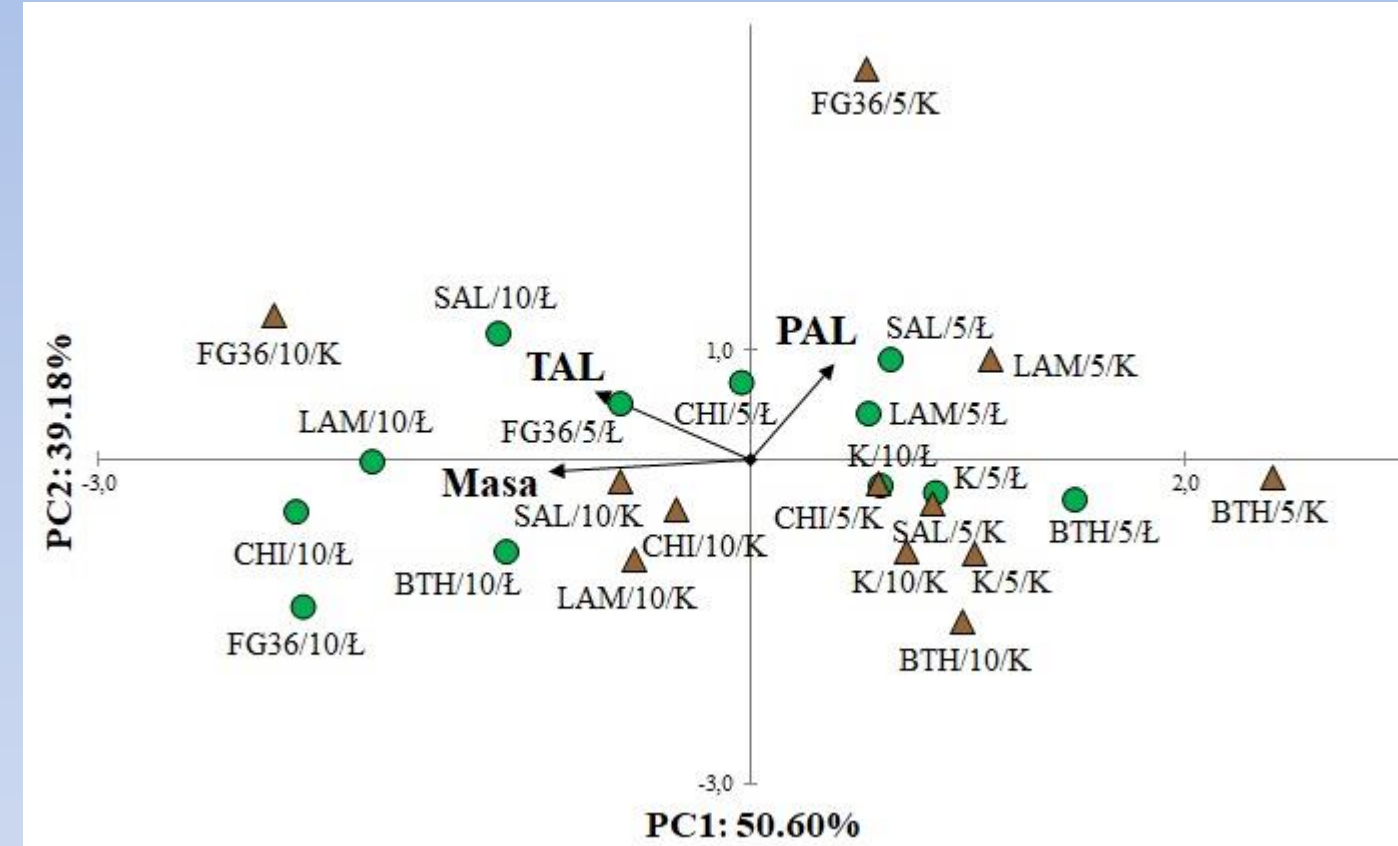
EPS uzyskany z hodowli szczepu DEMFg36 wpływał znacząco na aktywność **TAL** zarówno w łodygach, jak i korzeniach rośliny (Rysunek 4). W 5 dniu inkubacji, aktywność TAL w łodygach pszenicy była na poziomie 30 U, co stanowiło 2-krotnie wyższą aktywność w porównaniu do kontroli wodnej oraz 1,5-krotnie wyższą w porównaniu do elicytorów komercyjnych. Najbardziej znaczący wzrost poziomu tego enzymu zaobserwowano w korzeniach po stymulacji EPS, gdzie 10-go dnia inkubacji aktywność TAL wynosiła ~55U.

Uzyskane EPS nie wpływały negatywnie na kiełkowanie nasion pszenicy oraz świeżą masę łodyg i korzeni (Rysunek 5). Zaobserwowano nawet 1,5-2-krotny przyrost świeżej masy w 10 dniu inkubacji.

# Opis Wyników



**Rysunek 6.** Aktywność enzymów szlaków odporności roślin: liazy fenyloalaninowej (PAL) i liazy tyrozynowej (TAL) w 5- i 10-dniowych łodygach i korzeniach siewek pszenicy po elicytacji nasion EPS szczepu Fg36 i elicytorami komercyjnymi, zobrazowane w postaci mapy cieplnej. K – kontrola H<sub>2</sub>O; SAL – kwas salicylowy; LAM – laminaryna; BTH – S-metyloester benzo-1,2,3-tiazolowy kwasu tiokarboksylogowego; CHIT – chitozan. Najwyższą aktywność enzymatyczną oznaczono kolorem czerwonym, a najniższą kolorem zielonym.



**Rysunek 7.** Analiza głównych składowych (PCA) przedstawiająca aktywność enzymów markerowych szlaków odporności roślin – liazy fenyloalaninowej (PAL) i tyrozynowej (TAL) w 5- i 10-dniowych łodygach (Ł) i korzeniach (K) pszenicy, a także masa łodyg i korzeni rośliny zbożowej (Masa) w wyniku inokulacji nasion EPS szczepu Fg36 oraz elicytorami komercyjnymi. FG36 – EPS szczepu Fg36; K – kontrola H<sub>2</sub>O; SAL – kwas salicylowy; LAM – laminaryna; BTH – S-metyloester benzo-1,2,3-tiazolowy kwasu tiokarboksylogowego; CHI – chitozan.

Aktywność enzymów szlaków odporności roślin zobrazowano w postaci mapy cieplnej (Rysunek 6). Analiza ta wykazała wyraźny wzrost aktywności PAL i TAL w tkankach pszenicy po inokulacji nasion EPS uzyskanym z hodowli szczepu Fg36, w porównaniu do elicytorów komercyjnych i kontroli wodnej.

Wpływ inokulacji nasion pszenicy EPS szczepu Fg36 i elicytorami komercyjnymi na aktywność PAL i TAL oraz masę łodyg i korzeni siewek pszenicy określono za pomocą analizy głównych składowych (PCA). PCA wykazała istotny wzrost aktywności enzymatycznej (TAL w 10., a PAL w 5. dniu inkubacji) w korzeniach siewek pszenicy w wyniku działania EPS szczepu Fg36 w porównaniu do kontroli wodnej oraz elicytorów komercyjnych. Zastosowany EPS korelował również dodatnio z masą łodyg pszenicy w 10 dniu wzrostu siewek (Rysunek 7).

## Wnioski

EPS uzyskane z hodowli szczepu *Fusarium graminearum* (DEMFG36) nie wpływają negatywnie na kiełkowanie nasion i wzrost pszenicy ozimej. Ponadto posiadają potencjał do stymulacji odporności rośliny zbożowej, porównywalny lub wyższy niż elicytorów komercyjnych.

Uzyskane EPS w większym stopniu wpływają na wzrost aktywności PAL i TAL w korzeniach pszenicy.