Rola węglowodanów we wczesnych reakcjach metabolicznych kiełkujących nasion łubinu porażonych przez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini*

**IWONA MORKUNAS¹, MONIKA KOZŁOWSKA¹, WIKTORIA
RATAJCZAK²**

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

Morkunas I., Kozłowska M., Ratajczak W. (¹Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza im.
A. Cieszkowskiego, ul. Wołyńska 35, 60- 637 Poznań, Poland; ²Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet
im. A. Mickiewicza, al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań, Poland). Role of carbohydrates in early
metabolic reactions of germinating lupin seeds infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini*

(Otrzymano dn. 15 czerwca 2002)

Summary

Soluble carbohydrates, particularly oligosaccharides, can take part in defense responses preventing and restricting fungal pathogen invasion. Morphological changes were observed and β -glucosidase activity was studied in yellow lupin embryo-axes infected and uninfected with *F. oxysporum* and cultured for 24 to 96 hours under conditions of a varying carbohydrate supply. The first disease symptoms - necrotic pathological changes were observed 48 hours after the inoculation. A higher intensity of the disease changes as well as growth restriction were found in 72- and 96-h embryo axes growing under carbohydrate deficiency. The activity of α -glucosidase increased during 24 - 96 hours after inoculation. An especially high increase of the activity was noted in 72- and 96-h embryo axes cultured under carbohydrate deficiency. We suggest that sugars are involved in the mechanisms of yellow lupin embryo axis tissues resistance, since they constitute the source of precursors for the synthesis of antimicrobial factors of plant defense response.

Key words: carbohydrate, infection, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini*, *Lupinus luteus* L., β -glucosidase

WSTĘP

W ostatnich dziesięciu latach opublikowano szereg prac wskazujących, że węglowodany, głównie glukoza i sacharoza, są nie tylko ważnym czynnikiem odżywczym, ale i sygnałem metabolicznym kontrolującym ekspresję wielu genów zarówno procesów katabolicznych jak i anabolicznych (B r o u q u i s s e i in., 1991; C o u e e i in., 1992; K o c h, 1996; Y u, 1999; S m e e k e n s, 2000). Nieliczne jednak są doniesienia dotyczące udziału węglowodanów w reakcjach obronnych zapobiegających lub ograniczających inwazję patogenów. Udział węglowodanów w procesach odporności na grzyby chorobotwórcze jest w dużej mierze złożony i słabo poznany. W indukcji odporności na patogeny szczególne znaczenie przypisuje się oligosacharydom (S h a r o n, 1995). Zarówno bezpośrednie jak i pośrednie dowody wskazują, że wysoki poziom węglowodanów może ograniczać rozwój grzybów chorobotwórczych. Z bezpośrednich dowodów należy wymienić wpływ węglowodanów na potencjał osmotyczny komórek roślinnych (F a r r a r, 1989), a także fakt, że patogeny grzybowe do swego optymalnego rozwoju wymagają określonej wartości potencjału wody, gdzie obniżenie potencjału wody komórek gospodarza może ograniczać rozwój grzyba (C o o k i P o p e n d i c k, 1978). Pośrednie dowody wskazują, że węglowodany mogą oddziaływać na ekspresję genów odporności odpowiedzialnych za syntezę peroksydaz i białek PR (H e r b e r s i in., 1996).

Celem niniejszej pracy było poznanie roli węglowodanów w interakcji patogen-roślina na przykładzie infekcji osi zarodkowych łubinu żółtego przez *F. oxysporum*. Prześledzono zmiany morfologiczne, aktywność β -glikozydazy i objawy chorobowe infekowanych osi zarodkowych łubinu żółtego rosnących w warunkach różnego zaopatrzenia w sacharozę. Infekcje wywołane przez grzyb *F. oxysporum* najczęściej występują w stadium kiełkowania nasion, kiedy poziom węglowodanów ulega znacznym wahaniom, które trwają aż do momentu zanim siewka rozpocznie samodzielną syntezę cukrów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Materiałem wyjściowym do badań były nasiona łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L. Polo) stanowiące super elitę. Doświadczenia przeprowadzono na hodowanych *in vitro* osiach zarodkowych izolowanych z pęczniejących nasion, które po odcięciu liścieni pozbawione swoich rezerw pokarmowych skazane są na źródło węgla dostarczane w pożywce. Następnie tkanki łubinu żółtego inokulowane były przez *F. oxysporum*. Zastosowano cztery warianty hodowli: (1) tkanki nieinokulowane hodowane na pożywce Hellera z $60 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy, (2) tkanki inokulowane hodowane na pożywce Hellera z $60 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy, (3) tkanki nieinokulowane hodowane na pożywce bez cukru, (4) tkanki inokulowane hodowane na pożywce bez cukru. Materiał do analiz pobierano po 24, 48, 72 i 96 godzinach hodowli.

Hodowla *Fusarium oxysporum* i inokulacja

Izolat *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini* (K-1018) otrzymano z Banku Patogenów IOR w Poznaniu. Kultury grzyba hodowano na pożywce PDA (potato dextrose agar, Difco) na świetle w temperaturze 23°C. Z 3 tygodniowej hodowli kultury grzyba przygotowywano zawiesinę zarodników o stężeniu $5 \cdot 10^6$ w 1 ml. Inokulację przeprowadzano poprzez naniesienie 10 μ l inokulatu na wierzchołek wzrostu pędu osi zarodkowej.

Ocena zmian chorobowych i pomiary morfometryczne osi zarodkowych

Od momentu pojawienia się na organach inokulowanych pierwszych nekrotycznych plam chorobowych prowadzono ocenę zasięgu występujących zmian chorobowych. Określenie stopnia podatności (Grzesik i in., 1999) prowadzono wg sześciostopniowej skali Stakmana i Lewisa, według której 0 = brak objawów choroby, 5 = objawy na ponad 50% powierzchni organu. W okresie hodowli wykonano także pomiary długości badanych osi zarodkowych. Do oceny zmian chorobowych jak i pomiarów morfometrycznych brano po 20 osi zarodkowych łubinu. W oparciu o występowanie i powierzchnię nekrotycznych zmian patologicznych wyznaczono stopień podatności.

Ekstrakcja białka enzymatycznego i oznaczanie aktywności β -glikozydazy

Osie zarodkowe łubinu (200 mg) homogenizowano w temp. 4°C z 2 ml 0.1 M buforu fosforanowego pH 7.0 z dodatkiem 0.5% glikolu polietylenowego i 20 mg PVP. Ekstrakt wirowano przy 15 000 x g przez 15 min w temp. 4°C. Aktywność β -D-glikozydazy oznaczano spektrofotometrycznie wg Nicholsa i in. (1980). Mieszaninę zawierającą 0.2 ml ekstraktu i 0.2 ml substratu β -D- glukopyranozydu (2mg / 1ml H₂O) inkubowano w temp. 30°C przez 1 godzinę. Reakcję enzymatyczną przerywano dodając 0.6 ml 2 N Na₂CO₃. Aktywność enzymu wyrażano w μ molach p-nitrofenolu powstałego w ciągu godziny w przeliczeniu na 1 g świeżej masy.

WYNIKI

Po inokulacji osi zarodkowych łubinu żółtego zawiesiną zarodników *F. oxysporum* f.sp. *lupini* pierwsze symptomy infekcji, nekrotyczne zmiany patologiczne zaobserwowano już po 48 godzinach hodowli. Osie zarodkowe rosnące na pożywce z sacharozą dopiero po 72 godzinach od momentu inokulacji wykazywały pojedyncze plamy nekrotyczne, odpowiadające 1 - stopniowi podatności według przyjętej skali (tab. 1). Szczególnie duże nasilenie symptomów chorobowych stwierdzono po 72 i 96 godzinach hodowli na materiale inokulowanym rosnącym w warunkach niedoboru węglowodanów; liczne plamy nekrotyczne zajmowały około 50% powierzchni. Organy były wiotkie i pokryte obfitą masą śluzu. Równolegle do obserwacji etiologicznych wykonano pomiary morfometryczne osi zarodkowych, które wykazały ograniczenie wzrostu wskutek infekcji, dotyczy to zarówno organów rosnących na pożywce z sacharozą jak i bez cukru (ryc.1). Z badań enzymatycznych

Tabela 1

Zmiany chorobowe osi zarodkowych łubinu żółtego inokulowanych przez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini* hodowanych w różnych warunkach troficznych

Table 1

Disease changes of yellow-lupin embryo axes inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini* cultured under different trophic conditions

Czas hodowli [godz] Time of culture [h]	Zmiany nekrotyczne w skali od 0 do 5 Necrotic changes in the scale from 0 to 5			
	+S _n	+S _i	-S _n	-S _i
24	0	0	0	0
48	0	0	0	1
72	0	1	0	4
96	0	2	0	5

+S_n - osie zarodkowe nieinokulowane hodowane na pożywce Hellera z 60 mmol·dm⁻³ sacharozy

+S_i - osie zarodkowe inokulowane hodowane na pożywce Hellera z 60 mmol·dm⁻³ sacharozy

-S_n - osie zarodkowe nieinokulowane hodowane na pożywce bez sacharozy

-S_i - osie zarodkowe inokulowane hodowane na pożywce bez sacharozy

+S_n - uninoculated embryo axes cultured on Heller medium with 60 mmol·dm⁻³ sucrose

+S_i - inoculated embryo axes cultured on Heller medium with 60 mmol·dm⁻³ sucrose

-S_n - uninoculated embryo axes cultured on a medium without sucrose

-S_i - inoculated embryo axes cultured on a medium without sucrose

Ryc.1. Pomiary długości [mm] osi zarodkowych łubinu żółtego nieinokulowanych i inokulowanych przez *Fusarium oxysporum* hodowanych na pożywce z sacharozą (+S) i bez sacharozy (-S). Wyniki są średnią z 10 niezależnych doświadczeń, SD < 6%

Fig. 1. Measurements of the length [mm] of yellow lupin embryo axes uninoculated and inoculated with *Fusarium oxysporum*, cultured on a medium with sucrose (+S) and without sucrose (-S). The results are the mean of 10 independent experiments, SD < 6%

wykonano oznaczenia aktywności β -glikozydazy. W osiach zarodkowych traktowanych zawiesiną zarodników *F. oxysporum* zaobserwowano wzrost aktywności tego enzymu w wyniku infekcji w przedziale od 24 do 96 godzin hodowli (ryc.2). Dwukrotnie wyższą aktywność enzymu w tkankach rosnących na pożywce bez sacharozy stwierdzono już po 48 godzinach od momentu inokulacji w stosunku do tkanek nieinokulowanych. Szczególny wzrost aktywności (7-krotny) obserwowano w 96 godzinnym materiale infekowanym *F. oxysporum* hodowanym w warunkach niedoboru węglowodanów.

Ryc. 2. Zmiany aktywności β -glikozydazy w osiach zarodkowych łubinu żółtego inokulowanych przez *Fusarium oxysporum* hodowanych na pożywce z sacharozą (S) i bez sacharozy (-S). Wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń, SD < 4%

Fig. 2. Changes of β -glucosidase in yellow lupin embryo-axes inoculated with *Fusarium oxysporum*, cultured on a medium with sucrose (S) and without sucrose (-S). The results are the mean of three independent experiments, SD < 4%

DYSKUSJA

Wiele patogenów wymaga do swojego wzrostu obecności węglowodanów rozpuszczalnych. Dostępnym źródłem węgla w komórkach gospodarza jest sacharoza, która uczestnicząc w wielu reakcjach fizjologicznych może odgrywać ważną rolę w procesie infekcji (I s a a c, 1992; H o h l, 1991). Odkrycia ostatnich lat ujawniły rolę poziomu cukru jako wtórnego sygnału uruchamiającego geny w odpowiedzi na pierwotne sygnały środowiska (J a m e s i n., 1993). Niewiele wiadomo na temat wzajemnego oddziaływania dróg transdukcji sygnału cukrowego z drogami innych sygnałów. Najnowsze prace dotyczą oddziaływania sygnału cukrowego z sygnałami świetlnymi lub hormonalnymi (D a v i e s, 1995; T h o m a s i n., 1995; D i j k w e l i n., 1997; P e r a t a i n., 1997), natomiast nieliczne badania wskazują na udział sygnałów cukrowych w modulacji sygnałów wymienianych pomiędzy patogenem i żywicielem. Przeprowadzone przez nas badania biochemiczno-fizjologiczne jak

i obserwacje etiologiczne wskazują na ochronną rolę węglowodanów w procesie infekcji osi zarodkowych *F. oxysporum*. Z naszych badań wynika, że osie zarodkowe łubinu żółtego hodowane w warunkach dobrego zaopatrzenia w węglowodany wykazywały zahamowanie wzrostu jak i pierwsze symptomy choroby - nekrotyczne zmiany patologiczne dopiero po 72 godzinach od momentu inokulacji *F. oxysporum*. Występujące symptomy odpowiadały pierwszemu stopniowi podatności przyjętej przez nas skali (tab. 1). O udziale węglowodanów w reakcjach obronnych uruchamianych w wyniku infekcji wywołanej patogenami grzybowymi mogą świadczyć przedstawione w niniejszej pracy wyniki aktywności β -glikozydazy; enzymu mogącego służyć jako wskaźnik zaawansowania infekcji. W osiach zarodkowych rosnących w warunkach dobrego zaopatrzenia w węglowodany wzrost aktywności enzymu stwierdzono dopiero po 72 godzinach od momentu inokulacji. Szczególnie wysoką aktywność enzymu, bo aż około 8- krotnie wyższą w stosunku do tkanek nieinokulowanych odnotowano w tkankach inokulowanych hodowanych na pożywce bez sacharozy. Poinfekcyjny wzrost aktywności β -D-glikozydazy stwierdzono dla wielu gatunków roślin, ponieważ enzym ten odgrywa istotną rolę w oddziaływaniu rośliny ze środowiskiem uwalniając aktywne biologicznie aglikony z ich glikozydowych połączeń (Nichols i in., 1980; Kozłowska, 1993; Tamasi Fric, 1995; Dreva i in., 2000). Istnieją jednak doniesienia, że w warunkach stresu biotycznego może następować obniżenie aktywności tego enzymu, jeśli czynnikiem infekcyjnym są wirusy lub bakterie (Dreva i in., 2000). Obserwowany przez nas 2 - krotny wzrost β -glikozydazy w materiale 72 godzinnym hodowanym na pożywce z sacharozą może być związany z tworzeniem barier obronnych ograniczających rozprzestrzenianie patogena jak i z gromadzeniem metabolitów antymikrobowych. Zarówno nasze badania jak i nieliczne doniesienia literaturowe wskazywałyby na udział węglowodanów rozpuszczalnych, szczególnie sacharozy, w indukcji mechanizmów obronnych. Badania Engström i Strömberg (1996) wykazały, że po pierwszym dniu od momentu inokulacji liści ziemniaka grzybem *Phytophthora infestans* nastąpił spadek zawartości sacharozy o około 40%, co może wskazywać na udział cukru w reakcjach obronnych ograniczających proces infekcji. Wyniki niniejszej pracy jak i wyniki poziomu wolnych rodników oraz enzymów antyoksydacyjnych (praca w druku), wskazują na istotną rolę sygnałów cukrowych w modulacji oddziaływania patogen-roślina. Cukry jako regulatory aktywności genów mogą odgrywać rolę w mobilizacji aparatu obronnego rośliny, ale nie należy pomijać innej nie koniecznie alternatywnej interpretacji, bowiem węglowodany mogą być substratami do syntezy metabolitów o właściwościach antymikrobowych i barier strukturalnych.

LITERATURA

- Brouquisse R., James F., Raymond P., Pradet A., 1991. Study of glucose starvation in excised maize root tips. *Plant Physiol.* 96: 619-626.
- Cock R.J., Papendick R.I., 1978. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease with special reference to postharvest pathology. *Hortscience* 13: 559-564.
- Couee I., Jan M., Carde J.-P., Brouquisse R., Raymond P., Pradet A., 1992. Effects of glucose starvation on mitochondrial subpopulations in the meristematic and submeristematic regions of maize root. *Plant Physiol.* 100: 1891-1900.
- Davies P.J., 1995. The plant hormone concept: Concentration, sensitivity and transport. In *Plant Hormones*, P.J. Davies, ed (Dordrecht, The Netherlands: Kulwer Academic Publishers), pp. 13-38.
- Dijkwel P.P., Huijser C., Weisbeek P.J., Chua N.-H., Smeekens S.C.M., 1997. Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 583-595.
- Edreva A., Sotirova V., Georgieva I.D., Stoimenova E., Rodeva R., Bogatzevska N., 2000. Differential expression of α -glucosidase in tomato - stress stimuli systems. *Acta Physiol. Plant.* 22 (3): 274-277.
- Engström K., Strömberg A., 1996. Changes in sugar content during induction of systemic acquired resistance to late blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato. *J. Phytopathology* 144: 33-36.
- Farrar J.F., 1989. Fluxes and turnover of sucrose and fructans in healthy and diseased plants. *Journal of Plant Physiol.* 134: 137-140.
- Grzesiuk S., Koczowska I., Górecki R.J., 1999. Fizjologiczne podstawy odporności roślin na choroby. Wyd. ART Olsztyn.
- Herbers K., Meuwley P., Frommer W.B., Metraux J.-P., Sonnewald U., 1996. Systemic acquired resistance mediated by ecotopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8: 793-803.
- Hohl H.R., 1991. Nutrition. In: D.S. Ingram and P.H. Williams (eds), *Advances in Plant Pathology*, pp. 53-84, Academic Press, London.
- Isaac S., 1992. Effects of pathogenic fungal invasion on host plant physiology. In: *Fungal Plant Interaction*. Pp. 208-265, Chapman & Hall, London.
- James F., Brouquisse R., Pradet A., Raymond P., 1993. Changes in proteolytic activities in glucose-starved maize root tips: regulation by sugars. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 845-856.
- Koch K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.
- Kozłowska M., 1993. Activity of β -D-glucosidase and syringaldazine oxidase and susceptibility of red raspberry canes to *Didymella applanata* (Niessl) Sacc.. *Phytopathol. Polonica* 6 (XVIII): 7-12.
- Nichols E.J., Beckman J.M., Hadwiger L.A., 1980. Glycosidic enzyme activity in pea tissue and pea-*Fusarium solani* interaction. *Plant Physiol.* 66: 199-204.
- Perata P., Matsukura Ch., Vernieri P., Yamaguchi J., 1997. Sugar repression of a gibberellin- dependent signaling pathway in barley embryos. *The Plant Cell* 9: 2197-2208.
- Sharon N., 1995. Glycans of glycoconjugates as modulatory and recognition molecules. *Progress in Biotechnology*. Eds. Petersen S.P., Svensson B., Pedersen S. Elsevier Science BV. Amsterdam 10: 1-13.

- Smeekeens S., 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:49-81.
- Tamas L., Fric F., 1995. Activity of hydrolytic enzymes in barley leaves infected with powdery mildew. *Biologia* 50 (1): 85-92.
- Thomas B.R., Terashima M., Katoh S., Stoltz T., Rodriguez R.L., 1995. Metabolic regulation of source-sink relations in cereal seedling. In: *Carbon Partitioning and Source-Sink Interactions in Plants*, M.A. Madore and W. J. Lucas, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists), pp. 78-90.
- Yu S.M., 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol.* 121: 687-693.

Rola węglowodanów we wczesnych reakcjach metabolicznych kiełkujących nasion łubinu porażonych przez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lupini*

Streszczenie

Węglowodany rozpuszczalne, a szczególnie oligosacharydy, mogą brać udział w reakcjach obronnych zapobiegających jak i ograniczających inwazję patogenów grzybowych. Obserwowano zmiany morfologiczne jak i badano aktywność β -glikozydazy w osiach zarodkowych łubinu żółtego inokulowanych i nieinokulowanych przez *F. oxysporum* hodowanych w czasie od 24 do 96 godzin w warunkach różnego zaopatrzenia w sacharozę. Pierwsze symptomy chorobowe - nekrotyczne zmiany patologiczne zaobserwowano po 48 godzinach od momentu inokulacji *F. oxysporum*. Większe nasilenie zmian chorobowych jak i ograniczenie wzrostu stwierdzono w 72 i 96 godzinnych osiach zarodkowych rosnących w warunkach niedoboru węglowodanów. Z oznaczeń aktywności β -glikozydazy wynika, że w wyniku infekcji aktywność tego enzymu wzrastała w czasie 24 do 96 godzin po inokulacji. Szczególnie wysoki wzrost aktywności enzymu odnotowano w 72 i 96 godzinnych osiach zarodkowych hodowanych w warunkach niedoboru węglowodanowego. Przypuszczamy, że cukry zaangażowane są w mechanizmy regulujące odporność osi zarodkowych łubinu żółtego, ponieważ mogą stanowić źródło prekursorów do syntezy czynników antymikrobowych biorących udział w odpowiedzi obronnej rośliny.