

Wpływ egzopolimerów (EPS) uzyskanych z hodowli *Penicillium paneum* Pp7 na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (CAT, APX, GPX) w tkankach pszenicy

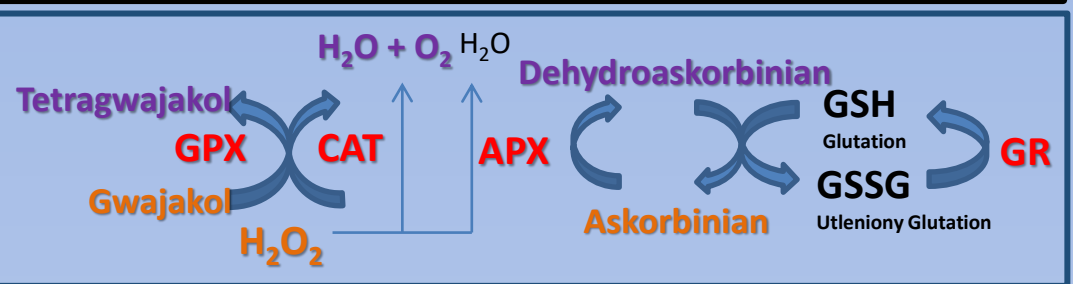
Artur Nowak¹, Renata Tyśkiewicz², Ewa Ozimek¹, Jolanta Jaroszuk-Ścisiel¹

¹Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, UMCS, Lublin

²Laboratorium Analityczne, Sieć Badawcza Łukasiewicz–Instytut Nowych Syntezy Chemicznych, Puławy

Wstęp

Reaktywne formy tlenu (ROS) są substancjami toksycznymi, wywołującymi uszkodzenia oksydacyjne komórek roślinnych w różnych warunkach stresu środowiskowego, takich jak zasolenie, susza, zimno, metale ciężkie, promieniowanie UV, jak i mikrobiologicznego wywołanego przez mikroorganizmy fitopatogeniczne. Do związków tych zalicza się $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 i 1O_2 [1]. Jednakże ROS odgrywają również ważną rolę sygnalizacyjną w roślinach, kontrolując takie procesy, jak wzrost, rozwój, a zwłaszcza reakcje na bodźce biologiczne i środowiskowe [2]. Aby zapewnić przetrwanie, rośliny musiały rozwinąć wydajną maszynę antyoksydacyjną, która składa się z dwóch elementów: (1) składników enzymatycznych, takich jak dysmutaza nadadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza askorbinowa (APX), peroksydaza gwajakolowa (GPX), reduktaza glutationowa (GR), monodehydroascorbatereduktaza (MDHAR) i reduktaza dehydroascorbatereduktaza (DHAR) [Rys. 1.]; (2) antyoksydanty nieenzymatyczne, takie jak kwas askorbinowy (AA), zredukowany glutation (GSH), α -tokoferol, karotenoidy, flawonoidy i kosmoazotoprolina [3]. W stymulowaniu odporności roślin na stres oksydacyjny interesujące wydaje się wykorzystanie polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS), wytwarzanych przez grzyby. EPS w swojej budowie zawierają rdzeń cukrowy, który zostaje rozpoznan przez receptory roślin, wpływając na wiele szlaków metabolicznych, w tym na poziom takich enzymów jak: katalaza, peroksydaza askorbinowa i peroksydaza gwajakolowa [4,5].

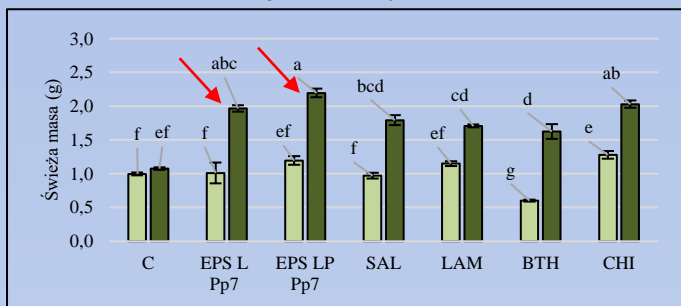


Rysunek 1. Skrócony model usuwania ROS w komórkach roślinnych z wyszczególnieniem katalazy (CAT), peroksydazy askorbinowej (APX), peroksydazy gwajakolowej (GPX) i reduktazy glutationowej (GR).

Wyniki

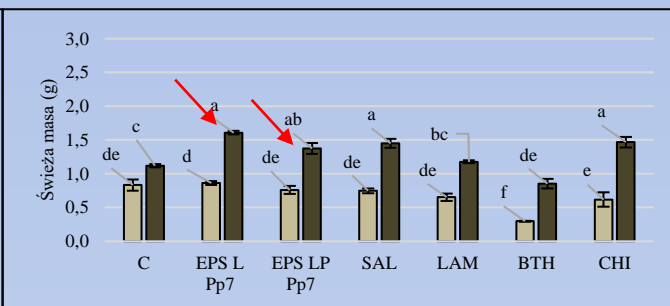
Łodyga

□ 5 dzień ■ 10 dzień



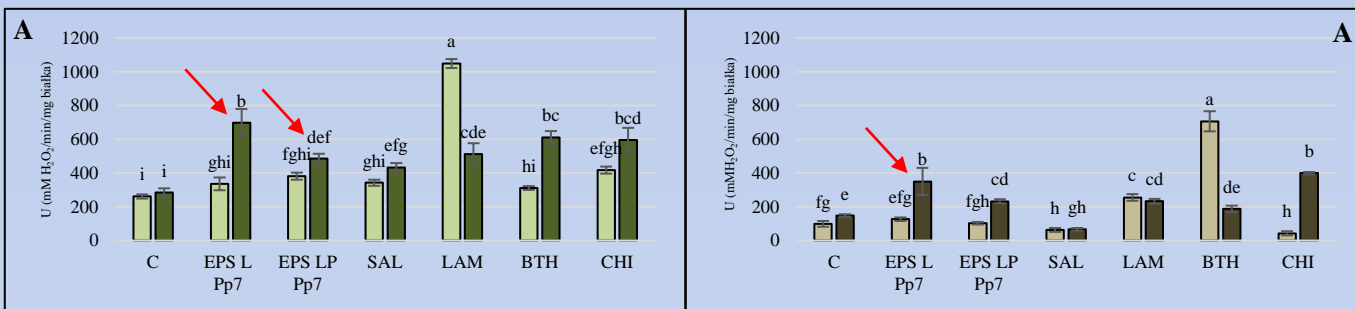
Korzeń

□ 5 dzień ■ 10 dzień

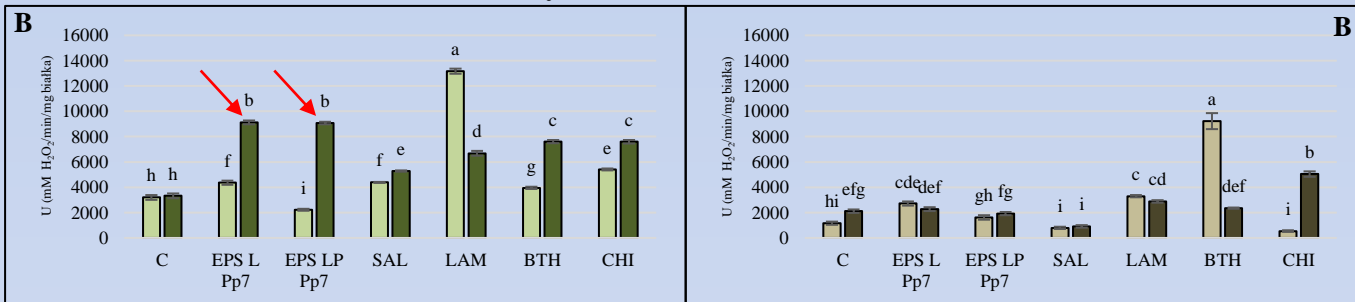


Rysunek 2. Świeża masa łodyg i korzeni po stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI).

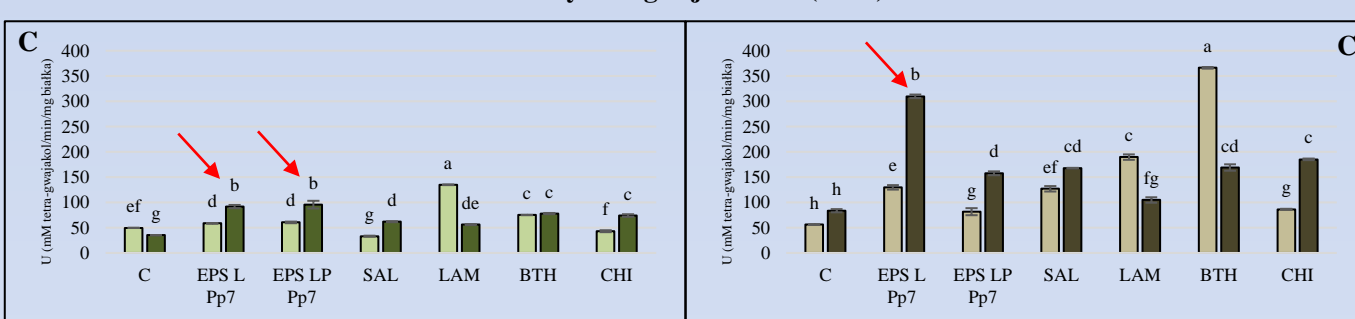
Katalaza (CAT)



Peroksydaza askorbinianowa (APX)



Peroksydaza gwajakolowa (GPX)



Rysunek 4. Aktywność katalazy (A), peroksydazy askorbinianowej (B) i peroksydazy gwajakolowej (C) po stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI), w łodygach i korzeniach pszenicy.

Materiały i Metody

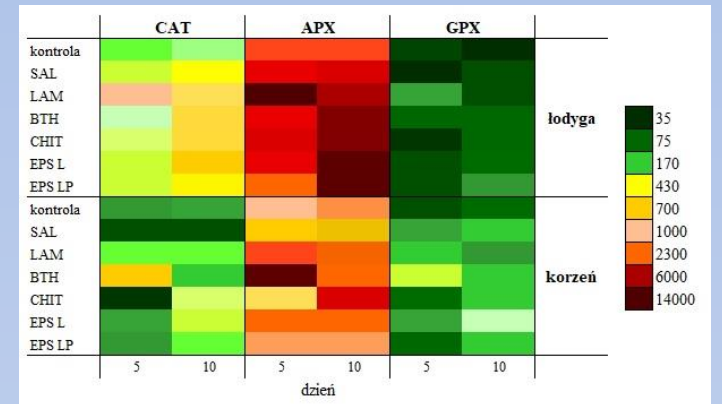
W badaniach wykorzystano szczep *Penicillium paneum* Pp7 wyizolowany z gleby Spitsbergenu i przyporządkowany do gatunku na podstawie analizy sekwencji ITS1 i ITS4, porównując wyniki z bazą danych UNITE przy pomocy programu BLAST. Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) uzyskano z 6 dniowej hodowli na podłożu Czapek-Dox z 3% sacharozą i 0,75% peptonem w 20°C, 120 rpm, poprzez precypitację alkoholową 1:1. Połowę uzyskanych EPS poddano procesowi oczyszczania poprzez odbiałczanie (proteinaza K) i dializę. Uzyskane EPS liofilizowano uzyskując 2 frakcje: EPS L – polimery „surowe” i EPS LP – polimery „odbiałczane”. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych badano w korzeniach i łodygach siewek pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany Arkadia. Siewki 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 H₂O₂/tetra-gwajakolu/min/mg białka):

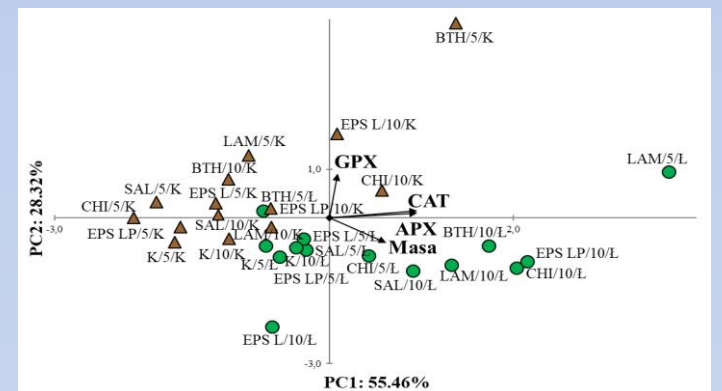
- katalaza (CAT) - H₂O₂ rozłożonego przez okres 3 minut w buforze fosforanowym o pH 7,0;
- peroksydaza askorbinianowa (APX) - H₂O₂ rozłożonego w obecności kwasu askorbinowego przez okres 3 minut w buforze fosforanowym o pH 7,0;
- peroksydazę gwajakolową (GPX) - tetragwajakolu powstałego w wyniku transformacji gwajakolu przez okres 1 minuty w buforze fosforanowym pH 6,5.

Literatura

- Ceveran A, Casassoli A, Brammer S.P. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress, Chapter 20 in Abiotic and Biotic Stress in Plants: Recent Advances and Future Perspectives, Intech, 2016, 463-480
- Din K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front. Environ. Sci., 2014, 2(5)
- Malska A, Tomaszewska B. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obrony. Postępy Biologii Komórki, 2005, 32(2), 311-325
- Li P, Haiy L, Jia M, Weiho S, Xiaohu W, Shiqiang L, Youlang P, Ligang Z. Effects of oligosaccharides from endophytic *Fusarium oxysporum* D217 on activities of defense-related enzymes in *Dioscorea zingiberensis* suspension cell and seedling cultures. Electron J Biotechnol, 2012, 17(4), 136-142
- Chandrasekar B, Wankar A, Wankar S, Sankar P, Mahil L, Chandra R, Neelam M, Mallic M, Thiele M, Dama M, et al. Fungi hijack a ubiquitous plant apoplastic endoglucanase to release a rice scavenging β-glucan decaccharotide to subvert immune responses. Plant Cell, 2022, 00, 1-20



Rysunek 3. Mapa cieplna obrazująca efekt stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI), w łodygach i korzeniach pszenicy.



Rysunek 5. Analiza PCA obrazująca efekt stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI), w łodygach i korzeniach pszenicy.

Nie zaobserwowano istotnego wpływu badanych elicytorów na kiełkowanie nasion pszenicy. Po stymulacji EPS L i EPS LP, świeża masa łodyg wzrastała 2-krotnie, a korzenie 1,5-krotnie w 10 dniu wzrostu siewek, w porównaniu do kontroli wodnej (C) [Rys. 2].

Za pomocą mapy cieplnej zobrazowano zależność między poziomem enzymów antyoksydacyjnych po stymulacji badanymi elicytorami, a kontrolą wodną. Wpływ EPS L i LP na aktywność enzymatyczną był często podobny do elicytorów komercyjnych lub wyższy, jak w przypadku APX w łodygach lub GPX w korzeniach pszenicy [Rys. 3].

Najwyższy wzrost aktywności CAT obserwowano w łodygach pszenicy po 10. dniach inkubacji w wyniku inokulacji nasion EPS L (700 U) i LP (500 U). Co ważne aktywność ta była porównywalna do elicytorów komercyjnych. Z kolei aktywność CAT w korzeniach wzrastała do poziomu 300 U w obecności EPS L i 200 U w obecności EPS LP [Rys 4A].

Uzyskane EPS L i LP powodowały 3-krotny wzrost aktywności APX (~9000U) w łodygach po 10. dniach inkubacji. Była to wartość wyższa niż w przypadku stymulacji BTH, SAL i CHI. Nie obserwowano natomiast istotnego wpływu na poziom APX w korzeniach pszenicy [Rys. 4B].

Aktywność GPX po stymulacji badanymi elicytorami była 2-4-krotnie wyższa w korzeniach pszenicy niż w łodygach. Najistotniej na poziom GPX oddziaływał EPS L (300U) po 10. dniach inkubacji [Rys. 4C].

Analiza Głównych Składowych (PCA) [Rys. 5] wykazała, że zastosowane EPS wpływały na wzrost aktywności enzymów markerowych szlaków odporności roślin podobnie jak elicytory komercyjne oraz silniej niż kontrola wodna. Co więcej, EPS LP zwiększał istotnie świeżą masę łodyg pszenicy, podobnie jak elicytory CHI, SAL i BTH.

Wniosek

Uzyskane polimery EPS L i LP z hodowli szczepu *P. paneum* wpływały na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach pszenicy. Efektywność stymulacji odporności badanymi polimerami była na poziomie elicytorów komercyjnych. Proces odbiałczania EPS nie wpływał w istotny sposób na efektywność indukcji odporności.