

AKTIVNOST ENCIMOV FENILPROPANOIDNE POTI, KOT ODZIV TKIVA NA OKUŽBO Z JABLANOVIM ŠKRLUPOM (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.)

Ana LIKOZAR¹, Franci ŠTAMPAR², Maja MIKULIČ-PETKOVŠEK³, Robert VEBERIČ⁴

^{1,2,3,4} Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo, Ljubljana

IZVLEČEK

V poskusu smo želeli ugotoviti kako okužba z jablanovim škrlupom vpliva na delovanje encimov in vsebnost posameznih fenolov v kožici jabolka. Znano je, da okužba z glivo *Venturia inaequalis* spremeni metabolizem fenolov. Največ fenolov je vsebovalo okuženo tkivo (pega) in robno tkivo (okolica pege), najmanj pa zdrava kožica. Največjo encimsko aktivnost za PAL, CHS/CHI, DFR, FLS smo analizirali v pegi. Pega je imela 3,4 krat več hidroksicimetnih kislin, 1,1 krat več dihidrohalkonov in 1,4 krat več flavan-3-olov, v primerjavi z zdravo kožico.

Ključne besede: encimi, fenilpropanoidna pot, fenoli, flavanoidi, jablanov škrlup

ABSTRACT

ENZYME ACTIVITY OF PHENYLPROPANOID PATHWAY AS A TISSUE RESPONSE TO INFECTION WITH APPLE SCAB (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.)

The aim of the study was to evaluate how the infection with apple scab influences the enzyme activity and the content of different phenolic compounds in apple peel. Infection with the *Venturia inaequalis* fungus enhanced the metabolism of phenolics. The highest content of phenolic compounds had infected tissue (spot) and tissue around the spot, the lowest content had healthy apple peel. The highest enzyme activity for PAL, CHS/CHI, DFR, FLS were determined in scab spot. Scab spot showed in comparison to the healthy peel up to 3.4 times more hydroxycinnamic acids, up to 1.1 times more dihydrochalcones and up to 1.4 times more flavan-3-ols.

Keywords: apple scab, enzyme, flavanoids, phenolic, phenylpropanoid pathway

1 UVOD

V rastlini so fenoli pomembna skupina sekundarnih metabolitov, za katere je znano, da so vključeni pri naravni obrambi jablane proti različnim boleznim (npr. proti jablanovemu škrlupu). Vsebnost fenolnih snovi v tkivu lahko določa občutljivost/odpornost na glivične infekcije (Usenik *et al.*, 2004). Mnogi fenoli, zlasti fenolne kisline, so direktno vključeni v odziv rastline na različne oblike stresa. Fenolne kisline, so vključene pri lignifikaciji poškodovanih delov. Fenolne snovi imajo antimikrobno delovanje, saj njihova vsebnost

¹ mlada raziskovalka, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

² prof. dr., prav tam

³ dr., prav tam

⁴ doc. dr., prav tam

naraste po infekciji (Bostock *et al.*, 1999). Prav tako je znano, da sta v obrambo proti jablanovemu škrlupu vključeni dve skupini flavonolov in dihidrohalkonov (Punyasiri *et al.*, 2005).

Okužba s patogeni izzove sintezo snovi, ki so vključene v obrambo pred patogenom (Treutter, 2001). Fenilalanin amonijak-liaza (PAL) je ključni encim med primarnim in sekundarnim metabolizmom. Katalizira spremembo aminokislina fenilalanin v cimeto kislino, ki je eden od ključnih intermediatov v nadaljnji poti (Halbwirth, 2002). Okužba z glivo poveča transkripcijo obveščevalne RNA, ki kodira PAL, le ta pa povzroči povečanje PAL-a v rastlini, ki kasneje stimulira sintezo fenolnih snovi. Halkon sintaza (CHS) in halkon izomeraza (CHI) sta naslednja encima v fenilpropanoidni poti, ki vodita v nastanek naringenina. Naringenin pa se kasneje s pomočjo flavanon-3-hidroksilaze (FHT) in dihidroflavonol-4-reduktaze (DFR) pretvori v prekurzorje za nastanek antocianov in flavan-3-olov. Flavonol sintaza (FLS) katalizira tvorbo flavonolov. Flavonoid-7-glukoziltransferaza (GTP) pa sodeluje pri nastanku floridzina (Treutter, 2001), ki ima obrambno funkcijo proti jablanovemu škrlupu.

V raziskavi smo spremljali odziv kože jabolk na okužbo z jablanovim škrlupom. Zanimalo nas je, ali obstaja razlika v vsebnosti posameznih fenolov in encimske aktivnosti med pego škrlupa, robnim tkivom med pego in zdravim delom kože ter zdravo kožico. Raziskava je bila opravljena na vsebnosti posameznih fenolov v povezavi z delovanjem encimov v fenilpropanoidni poti. Cilj raziskave je bil ugotoviti v katerih delih fenilpropanoidne poti je delovanje encimov povečano in kakšna je povezava z vsebnostjo fenolov, ki so vključeni v obrambo proti jablanovemu škrlupu.

2 MATERIAL IN METODE

Poskus smo izvedli na plodovih sorte 'Zlati delišes', ki so bili pridelani v poskusnem sadovnjaku Biotehniške fakultete v Ljubljani. Plodove smo obrali v tehnološki zrelosti 15. septembra 2008. Kožici plodov smo priredili tri obravnavanja; pego, okolico pege (1-2 mm) in zdravo tkivo. Vzorci smo zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili pri -80°C do priprave vzorcev.

a. Priprava in določitev posameznih fenolov

Priprava vzorcev (različni deli kože) je bila opravljena po metodi Escarpa in Gonzalez (2000) z nekaterimi spremembami. 0,5 g vzorca smo prelili s 3 ml metanola z dodatkom 1% 2,6-di-tetra-butyl-4-metilfenola (BHT) in vzorce homogenizirali z ultrazvokom T-25 (Ika-Labotechnik). BHT smo vzorcem dodali, da smo preprečili oksidacijo v procesu ekstrakcije. Vzorce smo pustili 1 uro v ultrazvočni kopeli in nato centrifugirali na 10.000 obr./min 7 minut pri 10°C . Supernatant smo filtrirali skozi poliamidne filtre Chromafil A0-45/25 proizvajalca Macherey-Nagel (Düren, Nemčija). Analiza je bila opravljena z HPLC sistemom.

b. Določanje encimske aktivnosti

Encimska aktivnost je bila določena po metodi Halbwirth *et al.* (2002). Encimska aktivnost je bila podana na količino proteina, ki smo jih določili po modificirani metodi Sandermann in Strominger (1972).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Skupina hidroksicimetnih kislin je prva skupina fenolnih snovi, ki nastanejo v fenilpropanoidni poti. Različne rane na plodovih in listih preko aktivacije encima PAL vodijo v akumulacijo klorogenske kisline in flavonolov (Mayer *et al.*, 1999). V naši raziskavi smo ugotovili višjo vsebnost ferulne kisline in klorogenske kisline v pegi, v primerjavi z okolico pege in zdravim tkivom (preglednica 1).

Hradzinia *et al.* (1997) poroča, da je prisotnost floridzina v jabolku povezana z odpornostjo na jablanov škrlup. Ta trditev pa temelji na dejstvu, da je gliva sposobna pretvoriti floridzin v

aglikon floretin, ki je toksičen za glivo. V našem poskusu smo določili nižjo vsebnost floridzina v zdravem tkivu, kot v pegi in okolici pege (preglednica 1).

Hamazu *et al.* (2005) kot tudi Treuter in Freucht (1990) poročata, da tkivo okuženo z glivo *Venturia inaequalis* povzroči akumulacijo flavan-3-olov (epikatehin, katehin, procianidin B2, B5 in E-B5). V naši raziskavi smo prav tako določili večjo vsebnost katehina, epikatehina in procianidina B2 v pegi, kot v okolici pege in zdravem tkivu (preglednica 1).

Feucht *et al.* (1998) poročajo, da se kot odgovor na okužbo v njeni okolici nalagajo flavonoli, ki preprečujejo njeno nadaljnje širjenje. Feucht *et al.* (1998) poročajo, da je kemična analiza tkiva jablane pokazala akumulacijo flavonolov v območju 1-2 mm v okolici okužbe. Skupna koncentracija flavonolov v našem poskusu kaže, da je njihova vsebnost večja v okolici pege kot v zdravem tkivu in sami pegi (preglednica 2).

Preglednica 1: Vsebnost posameznih fenolov (mg/100g sveže mase) v različnih delih kože jabolka pri sorti 'Zlati delišes'. Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med različnimi deli kože (Duncanov test, $p < 0,05$).

Table 1. The content of single phenolic compounds (mg/100g FW peel) in apple peel at 'Golden Delicious' cultivar. Different letters denoted statistically significant differences between different parts of peel (Duncan test, $p < 0.05$).

	p-kumarna kislina	klorogenska kislina	kavina kislina	ferulna kislina	epikatehin	katehin	procianidin B2	floridzin
okolica pege	1,66 ± 0,51	2,14 ± 0,24b	1,48 ± 0,18	0,04 ± 0,01a	27,09 ± 3,93a	2,42 ± 0,50a	36,97 ± 1,71	181,40 ± 57,25
pega	3,23 ± 1,50	10,13 ± 0,42c	1,54 ± 0,20	0,24 ± 0,05b	35,00 ± 0,27b	7,95 ± 1,07b	46,43 ± 3,81	192,54 ± 20,06
zdravo	2,24 ± 0,31	0,87 ± 0,11a	1,35 ± 0,11	0,05 ± 0,01a	23,06 ± 1,47a	2,73 ± 0,70a	39,53 ± 3,09	174,75 ± 31,14

Preglednica 2: Vsebnost posameznih fenolov (mg/100g sveže mase) v različnih delih kože jabolka pri sorti 'Zlati delišes'. Različne črke pomenijo statistično značilno razliko med različnimi deli kože (Duncanov test, $p < 0,05$).

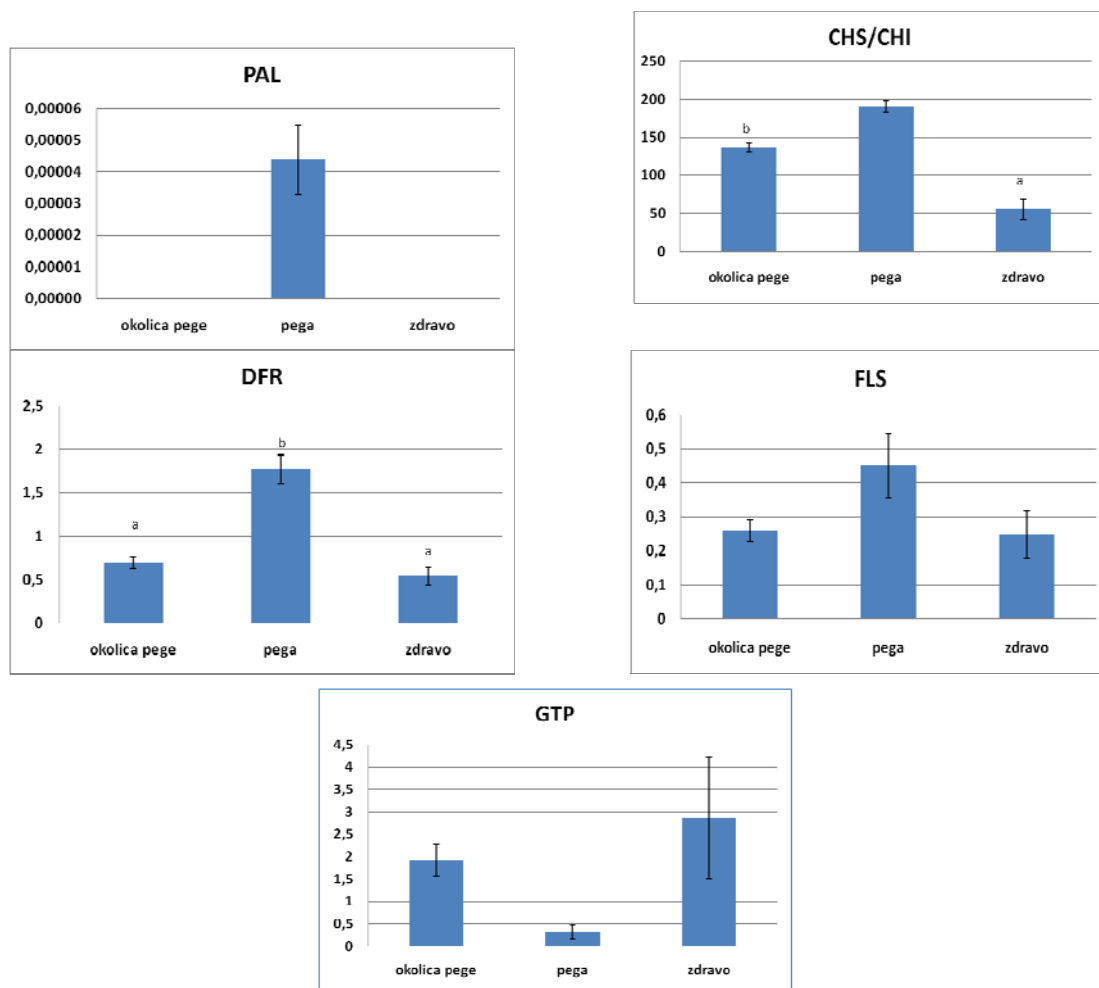
Table 2: The content of single phenolic compounds (mg/100g FW peel) in apple peel at 'Golden Delicious' cultivar. Different letters denoted statistically significant differences between different parts of peel (Duncan test, $p < 0.05$).

	rutin	Q-3-glukozid	Q-3-galaktozid	Q-3-ramnozid	skupni kvercetini
okolica pege	0,37 ± 0,17	24,68 ± 3,99	42,55 ± 4,36	170,72 ± 29,53	238,32 ± 38,04
pega	0,29 ± 0,14	17,61 ± 2,06	28,22 ± 2,54	101,77 ± 17,88	147,89 ± 7,03
zdravo	1,00 ± 0,40	23,58 ± 6,04	36,87 ± 7,82	149,10 ± 28,67	210,55 ± 24,61

PAL je ključni encim med primarnim in sekundarnim metabolizmom in je ključen za regulacijo nastanka različnih fenolnih snovi. V naši raziskavi smo ugotovili nizko aktivnost tega encima le v pegi, medtem ko nismo zaznali njegove aktivnosti v okolici pege in zdravem tkivu (slika 1). Naslednji pomemben encim v fenilpropanoidni poti je CHS/CHI, s pomočjo katerega nastane naringenin. Pri aktivnosti CHS/CHI smo zaznali 100 krat višjo aktivnost v vseh analiziranih delih kože, glede na aktivnost ostalih encimov. Višjo encimsko aktivnost CHS/CHI smo določili v pegi, ki ji sledi aktivnost v okolici pege in zdravem tkivu (slika 1). Visoko aktivnost CHS/CHI razlagamo z dejstvom, da je njegov produkt pomemben pri tvorbi nadaljnjih fenolnih snovi, katerih sinteza se ob okužbi poveča.

Aktivnost encima DFR je bila nižja v zdravem tkivu, višja pa v pegi. Encim FLS je pomemben pri nastanku flavonolov, med katere uvrščamo tudi kvercetine. Visoko aktivnost FLS smo zaznali v pegi, kar pa nasprotuje ugotovitvam, da se kvercetini kopičijo v okolici okužbe, kjer služijo kot pregrada za preprečitev nadaljnje širitve okužbe (slika 1).

GTP sodeluje pri nastanku floridzina. Pri tem encimu je bila v nasprotju z ostalimi encimi nižja aktivnost v pegi, višja pa v zdravem tkivu (slika 1). Vzrok za nižjo aktivnost GTP je morda v tem, da je vsebnost produkta (floridzina) tega encima visoka v pegi, glede na ostale analizirane dele.



Slika 1: Encimska aktivnost izražena v $\text{nmol/s} \cdot \text{g}_{(\text{protein})}$. Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med različnimi deli kože (Duncanov test, $p < 0,05$).

Figure 1: Enzyme activity in $\text{nmol/s} \cdot \text{g}_{(\text{protein})}$. Different letters denote statistically significant differences between different parts of peel (Duncan test, $p < 0.05$).

4 SKLEPI

Iz rezultatov sklepamo, da fenoli sodelujejo v obrambnem mehanizmu jablan proti jablanovemu škrlupu. Vsebnost fenolov je višja v pegi, nižja pa v okolici pege. Skupna vsebnost kvercetinov kaže akumulacijo teh v okolici pege, kar kaže da se v okolici tvori varovalna bariera. Encimska aktivnost fenilpropanoidne poti je v okuženem tkivu bistveno višja kot v zdravem tkivu.

5 LITERATURA

Bostock R.M., Wilcox S.M., Wang G., Adaskaveg J.E. 1999. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acid. *Physiological and molecular plant pathology*. 54: 37-50

- Escarpa, A., Gonzalez, M.C., 2000. Optimatization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatogr. A* 897, 161-170
- Feucht W., Treutter, D., Schwalb, P., 1998. Principles of barrier formation of scab infected apple fruits. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 105, 4: 394-403
- Hrazdina, G., Borejsza-Wysocki, W., Lester, C., 1997. Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*. 87, 3; 868-876
- Hamazu Y., Yasui H., Inno, T., Kume, C., Omanyuda M., 2005. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of chinense quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 928-934
- Mayr U., Batzdorfer R., Treutter D., Feucht W., 1994. Surfactant-induced changes in phenol content of apple leaves and fruit skins. *Acta Horticulturae*. 381: 479-487
- Punyasiri, P.A.N., Abeyasinghe, I.S.B., Kumar, V., 2005. Preformed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infection. *Journal of Chemical Ecology*. 31, 6: 1315-1324
- Sandermann, H., Strominger, L., 1972. Purification and properties of C55 – isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *Journal Biol. Chem.* 247: 5123-5131
- Treutter, D., 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*. 34: 71-89
- Treutter D., Feucht W., 1990. Accumulation of flavan-3-ols in fungus-infected leaves of Rosaceae. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 97: 634-641
- Usenik, V., Mikulic-Petkovsek, M., Solar, A., Stampar, F., 2004. Flavonols of leaves in relation to apple scab resistance. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 111, 137-144