

УДК 581.2

ФИТОПАТОЛОГИЯ

Б. А. РУБИН, В. А. АКСЕНОВА, О. Н. КОЖАНОВА

НОВООБРАЗОВАНИЕ БЕЛКА ПЕРОКСИДАЗЫ В ТКАНЯХ КАПУСТЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЗАРАЖЕНИЯ *BOTRYTIS CINEREA*

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 10 XI 1972)

Одной из характерных реакций растения на внедрение паразита является увеличение активности некоторых энзимов, в частности пероксидазы (¹). Возрастание ферментативной активности в инфицированных тканях растения может являться результатом протеолиза клеточных структур и высвобождения фермента из неактивной формы (²). С другой стороны, в настоящее время все большее признание получает точка зрения, согласно которой увеличение активности энзима в зараженных тканях растения является результатом синтеза ферментного белка. Иммунохимические исследования, опыты с включением C^{14} -аминокислот, а также с использованием ингибиторов белкового синтеза подтверждают эту точку зрения (³⁻⁷).

Ранее в работах нашей лаборатории было показано, что растворимые белки тканей капусты при фракционировании на колонке сефадекса Г-75 делятся на два пика, обладающие пероксидазной активностью. При заражении капусты грибом *Botrytis cinerea* активность фермента в этих пиках возрастает одновременно с увеличением содержания в них белка (⁸).

В нашей работе мы продолжили эти исследования и изучили влияние *Botrytis cinerea* на процесс синтеза белка пероксидазы в тканях капусты, используя для этого C^{14} -лейцин.

Работа проводилась с устойчивым к *Botrytis cinerea* сортом капусты Амагер и восприимчивым сортом Номер Первый. Заражение и взятие проб для анализа проводили по принятой в нашей лаборатории методике (⁹). Капусту анализировали на третьи сутки после заражения.

Ткани здоровой и зараженной *Botrytis cinerea* капусты инфильтрировали раствором циклогексимида 0,5 мг/л и C^{14} -лейцина 1 мкС/мл (удельная активность 83 мкС/ммоль) и инкубировали 5 час., а затем из этих тканей выделяли белок пероксидазы по методике, описанной ранее (¹⁰). В выделенном препарате пероксидазы определяли активность по методу Бояркина (¹¹) и белок по методу Лоури (¹²). Электрофоретическое изучение белка пероксидазы проводили по методу Девиса (¹³). Сила тока на одну трубку 4 ма, напряжение 200—300 в, время разгонки 1,5 часа. Для проявления изоэнзимов пероксидазы на электрофореграммах гели помещали в раствор бензидина, приготовленного по Луцинской и Ермакову (¹⁴), а затем в 0,03 М H_2O_2 . Радиоактивность препарата белка пероксидазы, а также отдельных изоэнзимов, обнаруженных в полиакриламидном геле, просчитывали в сцинтилляционном счетчике марки Mark II. Для этого гели непосредственно после проявления изоэнзимов пероксидазы замораживали в смеси, состоящей из сухого льда и спирта, разрезали на сегменты, содержащие изоэнзимы пероксидазы, помещали их в стаканчики для счета и экстрагировали из них белок 0,5 мл 3% додецилсульфата Na при 37° в течение 16 час. Затем добавляли сюда 10 мл сцинтилляционной жидкости, содержащей 800 мл диоксана, 200 мл метанола, 4 г PPO, 0,2 г PORP и 60 г нафталина и просчитывали радиоактивность в импульсах на 1 мг белка пероксидазы.

Определение пероксидазной активности в гомогенате тканей капусты подтвердило полученные нами ранее данные (¹⁰) и показало, что внедрение *Botrytis cinerea* вызывает активирование энзима в тканях обо-

Таблица 1

Активность пероксидазы в здоровых и зараженных *B. cinerea* тканях капусты

Сорт	Ткань	Отн. ед. на 1 г сыр. веса	%
Амагер	Здоровая	2623 ± 74	100
	Зараженная	4861 ± 54	185
Номер Первый	Здоровая	1209 ± 17	100
	Зараженная	1674 ± 22	138

их изучавшихся сортов капусты, при этом величина этого активирования была выше у устойчивого сорта капусты по сравнению с поражаемым (табл. 1).

Для выяснения возможных причин возрастания активности пероксидазы в зараженных тканях капусты мы изучали скорость синтеза белка фермента в этих тканях. Для этого диски капусты

инфильтрировали раствором C^{14} -лейцина и инкубировали их во влажной камере в течение 5 час. Затем диски делили на 2 партии и в одной из них определяли активность пероксидазы, а из другой выделяли препарат фермента и просчитывали его радиоактивность. Как видно из табл. 2, за

Таблица 2

Активность пероксидазы, включение C^{14} -лейцина в белок фермента здоровых и зараженных *B. cinerea* тканей капусты после 5 час. инкубации и влияние циклогексимида на эти процессы

	Амагер		Номер Первый	
	здоровая ткань	зараженная ткань	здоровая ткань	зараженная ткань
Активность пероксидазы				
Исходная (контроль), отн. ед. на 1 г сыр. веса	2623 ± 74	4861 ± 54	1209 ± 17	1674 ± 22
Через 5 час. инкубации, отн. ед. на 1 г сыр. веса	3155 ± 84	7352 ± 32	1435 ± 19	1223 ± 24
% к контролю	123	151	119	73
Через 5 час. инкубации + циклогексамид, отн. ед. на 1 г сыр. веса	2518 ± 54	4778 ± 60	1022 ± 22	1016 ± 19
% к контролю	96	98	85	61

Включение C^{14} -лейцина

За 5 час. инкубации (контроль), имп/мин на 1 мг белка	12 310 ± 530	18 360 ± 450	8790 ± 150	7360 ± 210
За 5 час. инкубации с циклогексимидом, имп/мин. на 1 мг белка	4280 ± 160	4650 ± 130	3218 ± 150	2752 ± 110
% к контролю	34	25	37	37

5 час. инкубации активность пероксидазы увеличивалась в здоровых тканях устойчивого и поражаемого сортов капусты примерно на одинаковую величину. Иная картина наблюдалась в зараженных тканях. Если у устойчивого сорта Амагер инфекция вызывала дополнительное повышение активности фермента (на 28%), то в тканях неустойчивого сорта Номер Первый в этих условиях наблюдалось подавление активности пероксидазы. Как мы показали ранее (¹⁶), внедрение в ткани неустойчивого сорта капусты *Botrytis cinerea* вызывает значительные нарушения в структуре протопласта этой формы растения (увеличение проницаемости мембран клетки, сдвиг pH клеточного сока, нарушение свойств коллоидов и т. д.). Процесс инфильтрации, очевидно, усиливает это поврежде-

ние протопласта, что и может являться причиной подавления активности пероксидазы в зараженных тканях неустойчивого сорта.

При определении интенсивности включения C^{14} -лейцина в белок пероксидазы были получены аналогичные закономерности: в тканях устойчивого сорта включение меченой аминокислоты в белок фермента при заражении увеличивалось, а в тканях поражаемого — подавлялось (табл. 2). Следовательно, можно считать, что наблюдающееся при заражении тканей капусты грибом *Botrytis cinerea* активирование пероксидазы связано с синтезом фермента *de novo*. Подтверждением этому служат также результаты наших опытов с циклогексимином — ингибитором синтеза белка, подавляющим процесс транслкации в рибосоме (¹⁵). Циклогексимид, инфильтрированный в ткани капусты, вместе с меченой аминокислотой препятствовал активированию в них пероксидазы и одновременно подавлял включение C^{14} -лейцина в белок пероксидазы (табл. 2). Таким образом, опыты с использованием меченой аминокислоты и ингибитора белкового синтеза подтверждают вывод о том, что в зараженных тканях устойчивого сорта капусты происходит процесс новообразования белка пероксидазы.

Таблица 3

Включение C^{14} -лейцина в изоэнзимы пероксидазы (ими. на 1 мг белка за 4 мин.)

№ изоэнзима	Амагер		Р	Номер Первый		Р
	здоровая ткань	зараженная ткань		здоровая ткань	зараженная ткань	
1	166 ± 6	200 ± 11	< 0,05	—	—	
2	132 ± 2,5	144 ± 9	> 0,05	160 ± 12	136 ± 24	> 0,05
3	129 ± 5,8	160 ± 6,3	< 0,01	121 ± 11	134 ± 10	> 0,05
4	143 ± 5,7	168 ± 15	> 0,05			
5	305 ± 18	402 ± 20	< 0,02			
6	154 ± 6	201 ± 20	> 0,05			
7	210 ± 20	203 ± 14	> 0,05			
8		234 ± 12				

В дальнейших опытах пероксидазный белок, меченный C^{14} -лейцином, был исследован методом электрофореза в полиакриламидном геле. Ранее нами было показано, что пероксидаза устойчивого сорта капусты Амагер делится в полиакриламидном геле на 7 компонентов, а неустойчивого сорта Номер Первый — на 3 компонента (¹⁰). При заражении активность изоэнзимов пероксидазы увеличивается у обоих изучавшихся сортов, а у устойчивого сорта Амагер, кроме того, обнаруживается новый быстроподвижный изоэнзим (№ 8), у поражаемого сорта капусты количество изоэнзимов при заражении не изменяется.

Исследование распределения метки между изоэнзимами пероксидазы здоровых и зараженных тканей изучавшихся сортов капусты показало, что в здоровых тканях устойчивого сорта капусты Амагер наблюдалось включение C^{14} -лейцина во все 7 изоэнзимов пероксидазы, при этом с наибольшей скоростью синтезировались 5 и 7-й изоэнзимы (табл. 3). После заражения интенсивность включения C^{14} -лейцина возрастала на статистически достоверную величину в 1, 3 и 5-м изоэнзимах, которые на электрофореграмме показывают самую высокую активность (¹⁰). Кроме того, обнаружено включение метки в 8-й изоэнзим пероксидазы, дополнительно синтезирующийся в зараженных тканях капусты. Следовательно, синтез различных изоэнзимов пероксидазы в зараженных тканях происходит с разной скоростью. Что касается поражаемого сорта капусты Номер Первый, то в данном случае включение C^{14} -лейцина обнаружено во 2 и 3-й изоэнзимы пероксидазы здоровых и зараженных тканей. По интенсивности включения метки эти два типа ткани практически не различались.

В 1-й малоподвижный изоэнзим, отличающийся и самой низкой активностью, включения C^{14} -лейцина наблюдать не удалось. Очевидно, этот изоэнзим содержится в белке пероксидазы в небольших количествах, почему и не удается зарегистрировать его синтез нашими методами.

Таким образом, данные, полученные в работе с использованием меченой аминокислоты и ингибитора белкового синтеза, отчетливо свидетельствуют о том, что в тканях устойчивого сорта капусты под влиянием заражения *Botrytis cinerea* происходит синтез белка пероксидазы, что и является одним из источников увеличения активности фермента.

У поражаемого сорта капусты этот процесс практически отсутствует или протекает с гораздо меньшей интенсивностью. Не исключено также, что в последнем случае вследствие высокой лабильности протопласта клеток и легкой его повреждаемости под влиянием продуктов жизнедеятельности патогена имеет место протеолиз клеточных структур и высвобождение фермента из неактивной формы. А это также может являться одним из путей повышения активности пероксидазы в зараженных тканях. Исследование этого вопроса нами продолжается.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
11 X 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. А. Рубин, Е. В. Арциховская, Биохимия и физиология иммунитета растений, М., 1968. ² G. Farkas, L. Dezsi et al., *Phytopathology*, **49**, 4 (1964). ³ J. Uritani, M. Stahmann, *Plant Physiol.*, **36**, 770 (1961). ⁴ G. Farkas, M. Stahmann, *Phytopathology*, **56**, 699 (1966). ⁵ L. Shannon, J. Uritani, H. Imaseki, *Plant Physiol.*, **47**, 493 (1971). ⁶ P. Jennings, B. Brannaman, F. Zscheile, jr., *Phytopathology*, **59**, 7 (1967). ⁷ J. Kanazawa, N. Shichi, J. Uritani, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 840 (1965). ⁸ Б. А. Рубин, Т. М. Иванова, М. А. Давыдова, *Прикладная биохимия и микробиология*, **1**, 1 (1965). ⁹ В. А. Аксенова, Р. В. Савченко, Докл. ВАСХНИЛ, **4**, 21 (1965). ¹⁰ В. А. Аксенова, О. Н. Кожанова, Б. А. Рубин, *Физиол. раст.*, **18**, в. 2 (1971). ¹¹ А. Н. Бояркин, *Биохимия*, **16**, 352 (1951). ¹² O. Lowry, N. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, № 1 (1951). ¹³ B. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964). ¹⁴ Е. Н. Луцинская, И. П. Ермаков, Научн. докл. высш. школы, Биол. науки, № 3, 142 (1968). ¹⁵ V. I. Agol, G. V. Lipskaya et al., *Virology*, **41**, 533 (1970). ¹⁶ В. А. Аксенова, Р. В. Савченко, С.-х. биол., **1**, № 6 (1966). ¹⁷ А. С. Спирин, А. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1971.