

УДК 577.158

БИОХИМИЯ

В. Д. АНИСИМОВ, Т. Б. КАСТАЛЬЕВА, Л. Н. ЛОГИНОВА, А. И. МОЧАЛКИН

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ КАРТОФЕЛЯ И *RHYTOPHTHORA INFESTANS*

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 3 II 1975)

В биохимических исследованиях, посвященных анализу взаимоотношений между растением-хозяином и паразитом, все большее внимание уделяется сравнительному изучению ферментных систем высших растений и микроорганизмов. Предполагается, что от специфичности ферментного состава и свойств каталитически активных белков зависит как устойчивость растений, так и вирулентность паразитов (<sup>1-4</sup>). Интерес к этому вопросу объясняется также тем, что выявление различий в составе и свойствах ферментов растений и патогенов открывает возможности для направленного синтеза химических препаратов, эффективных в борьбе с возбудителями болезней и безвредных для растений и человека.

Целью настоящей работы явилось исследование оксидоредуктаз: *o*-дифеноксидазы (К.Ф.1.10.3.1), пероксидазы (К.Ф.1.11.1.7), каталазы (К.Ф.1.11.1.6) картофеля и возбудителя фитофтороза — *Rhytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Учитывая, что для распространения фитофтороза и заражения им большое значение имеют конидии гриба, ферментный состав которых до сих пор не подвергался изучению, мы использовали в качестве объекта исследования конидии московской популяции *P. infestans*, выращенной на зерне ржи.

Ферменты из клубней картофеля сорта Гатчинский экстрагировали 0,1 *M* фосфатным буфером, pH 5,3, содержащим  $1,5 \cdot 10^{-2}$  мол/л бензойной кислоты и  $10^{-2}$  мол/л аскорбиновой кислоты. Белок осаждали сульфатом аммония (60% насыщения) и перерабатывали диализом. 2 мл диализата помещали на колонку сефадекса G-200 (1,8×50 см), предварительно откалиброванную пятью белками с известным молекулярным весом. Элюцию осуществляли 0,1 *M* фосфатным буфером, pH 7,0.

Конидии *P. infestans* смывали с зерен ржи дистиллированной водой, отфильтровывали через 2 слоя марли и осаждали центрифугированием при 10 000 *g* 15 мин. Осадок промывали охлажденным до  $-40^{\circ}$  ацетоном и высушивали. К 200 мг ацетонового порошка добавляли 30 мл 0,05 *M* трис-HCl-буфера, pH 7,2, содержащего 1 мол/л KCl и 1% тритона X-100. Суспензию гомогенизировали в агатовой шаровой мельнице в течение 1 часа. Осадок отделяли центрифугированием и повторно экстрагировали тем же раствором с добавлением мочевины (4 мол/л). Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования первого и второго экстрактов, объединяли и диализовали против 0,05 *M* трис-HCl-буфера, pH 7,2. Диализат концентрировали с помощью полиэтиленгликоля или сульфатом аммония (90% насыщения) и затем подвергали гель-фильтрации через колонку сефадекса G-200.

На всех промежуточных стадиях приготовления ферментных препаратов, а также во фракциях элюата определяли активность каталазы (<sup>5</sup>), *o*-дифенолоксидазы (<sup>6</sup>, <sup>7</sup>), пероксидазы (<sup>8</sup>, <sup>9</sup>). Выявление этих ферментов после электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле (ПАГ) проводили по методу Сафонова (<sup>10</sup>).

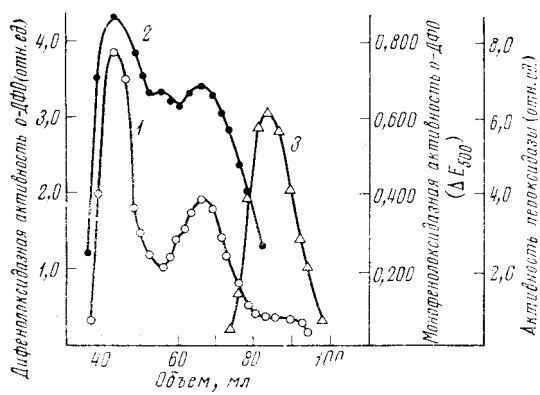


Рис. 1

Рис. 1. Гель-фильтрация ферментного препарата клубней картофеля через сефадекс G-200. 1 — *o*-ДФО (дифенолоксидазная активность), 2 — *o*-ДФО (монофенолоксидазная активность), 3 — пероксидаза

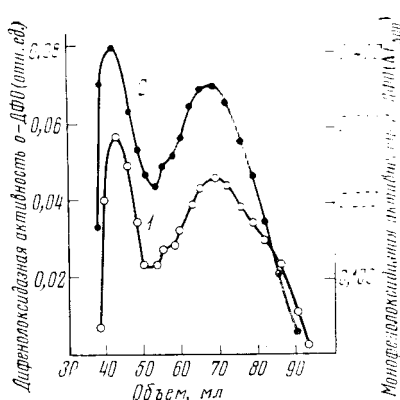


Рис. 2

Рис. 2. Гель-фильтрация ферментного препарата конидий *R. infestans* через сефадекс G-200. 1 — *o*-ДФО (дифенолоксидазная активность), 2 — *o*-ДФО (монофенолоксидазная активность)

*o*-Дифенолоксидаза (*o*-ДФО) катализирует две различные по механизму реакции: окисления *o*-дифенолов в *o*-хиноны (дифенолоксидазная активность) и гидроксилирование монофенолов (монофенолоксидазная активность). Клубни картофеля содержат *o*-ДФО, высокоактивную по отношению к ди- и монофенолам. Конидии *R. infestans* также обладают высокой монофенолоксидазной активностью. Дифенолоксидазная активность конидий в 50–100 раз ниже, чем в картофеле в расчете на 1 г сухого веса. *o*-ДФО картофеля представлена в основном растворимой фракцией (до 80% от общего количества фермента), тогда как *o*-ДФО конидий прочно связана с клеточными стенками. Переход фермента в раствор наблюдался при воздействии детергентов. Введение в экстрагирующую среду наряду с детергентами KCl и мочевины увеличивало выход *o*-ДФО в несколько раз.

При гель-фильтрации через сефадекс G-200 были обнаружены 2 пика активности *o*-ДФО как в случае фермента из клубней картофеля (рис. 1), так и в случае фермента из конидий *R. infestans* (рис. 2). Первый пик элюировался в свободном объеме колонки, объем выхода второго пика соответствовал фракции с молекулярным весом  $132\,000 \pm 6000$  для *o*-ДФО картофеля и  $118\,000 \pm 4500$  для *o*-ДФО *R. infestans*.

После электрофореза в ПАГ препаратов из картофеля обнаружено 10 фракций, активных по отношению к пирокатехину (рис. 3а), а в препаратах из конидий — лишь 4 (рис. 3б).

*o*-ДФО картофеля и конидий имели разные оптимумы pH, когда в качестве субстрата был использован *p*-крезол, *o*-ДФО картофеля проявляла максимальную активность в кислой области (pH 5,8), *o*-ДФО конидий — в щелочной (pH 8,5).

В отличие от клубней картофеля, для которых характерно наличие высокой активности пероксидазы, в конидиях *R. infestans* присутствуют лишь

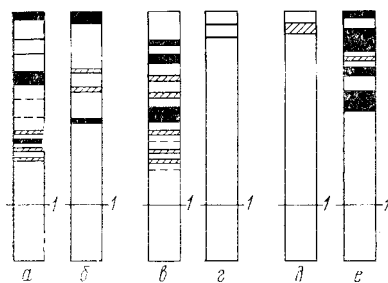


Рис. 3. Схема электрофореграмм ферментов клубней картофеля (а, в, д) и конидий *R. infestans* (б, г, е). а, б — *o*-ДФО; в, г — пероксидаза; д, е — каталаза. 1 — бромфеноловый синий

следовые количества этого фермента. На электрофореграммах пероксидаза конидий проявлялась в виде двух полос с низкой электрофоретической подвижностью (рис. 3e). Пероксидаза клубней картофеля была представлена 10 фракциями (рис. 3e). При гель-фильтрации через сефадекс G-200 она элюировалась одним пиком с объемом выхода, соответствующим белку, молекулярный вес которого равен  $40\,000 \pm 2000$  (рис. 1).

Активность каталазы в конидиях *P. infestans* выше, чем в клубнях картофеля. После электрофореза в ПАГ было выявлено пять фракций, обладавших каталазной активностью (рис. 3e), тогда как в случае картофеля удалось обнаружить одну низкоактивную фракцию (рис. 3d).

Таким образом, картофель и *P. infestans* существенно отличаются по уровню активности *o*-ДФО, пероксидазы и каталазы, а также физико-химическими свойствами этих оксиредуктаз, что свидетельствует о существовании специфических особенностей в метаболизме хозяина и паразита. Заслуживает внимания тот факт, что *P. infestans* содержит активную каталазу, в то время как в клубнях картофеля этот фермент практически отсутствует. Это может играть определенную роль при заражении фитофторозом, поскольку каталаза патогенов обладает способностью подавлять пероксидазу растения-хозяина, ослабляя тем самым его защитные функции (<sup>3</sup>, <sup>4</sup>).

Всесоюзный институт защиты растений  
Всесоюзной Академии сельскохозяйственных наук  
им. В. И. Ленина  
Ленинград

Поступило  
2 XI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Е. Н. Луцинская, В кн.: Физиология и биохимия здорового и больного растения, М., МГУ, 1970, стр. 437. <sup>2</sup> А. П. Николаева, И. М. Богатых и др., В кн.: Иммуни-тет и покой растений, М., «Наука», 1972, стр. 111. <sup>3</sup> K. Rudolf, M. A. Stahmann, Nature, v. 204, № 4957, 474 (1964). <sup>4</sup> M. A. Stahmann, Tagungsberichte, № 74, 9 (1965). <sup>5</sup> H. Lück, In: Methoden der enzymatischen Analyse, 1962, S. 885. <sup>6</sup> А. Н. Бояркин, Тр. Ин-та физиол. раст., т. 8, № 2, 398 (1954). <sup>7</sup> A. Mayer, Enzymologia, v. 16, № 5, 277 (1954). <sup>8</sup> А. Н. Бояркин, Биохимия, т. 16, № 4, 352 (1951). <sup>9</sup> J. Pütter, In: Methoden der enzymatischen Analyse, B. 1, 1970, S. 648. <sup>10</sup> В. И. Сафонова, М. П. Сафонова, В кн.: Биохимические методы в физиологии растений, М., «Наука», 1971, стр. 113.