

Б. А. РУБИН, Л. А. ВОРОНКОВ, И. В. ЖИВОПИСЦЕВА

**АДЕНИЛОВЫЕ И ПИРИДИНОВЫЕ НУКЛЕОТИДЫ
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ПАТОГЕННОСТИ ФОРМ
VERTICILLIUM DAHLIAE KLEB.**

(Представлено академиком А. С. Спириным 27 VI 1975)

В настоящее время работами многих исследователей установлена положительная корреляция уровня энергетического обмена со степенью патогенности болезнетворных организмов (¹⁻⁴). С этими результатами согласуются полученные нами ранее данные о том, что митохондрии патогенной формы *V. dahliae* обладают большей интенсивностью и энергетической эффективностью окисления различных субстратов (⁵).

Для характеристики энергообмена важно изучение не только механизмов трансформации энергии, но и путей ее передачи акцепторам. Известно, что важнейшими интермедиатами, связывающими системы — генераторы энергии с ее потребителями, являются адениловые нуклеотиды и никотинамидные коферменты. Они одновременно служат регуляторами многих звеньев клеточного обмена. Поэтому их содержание и соотношение в органоидах и целых клетках может отражать направленность метаболических процессов (⁶).

Мы исследовали содержание адениловых нуклеотидов и никотинамидных коферментов в клетках и митохондриях *V. dahliae*.

Выращивание гриба и получение фракций митохондрий проводили, как описано ранее (⁵). Количество никотинамидных коферментов определяли в щелочных и кислотных экстрактах энзиматическим методом (⁷). Анализ содержания адениловых нуклеотидов проводили биолюминесцентным методом с использованием люциферин-люциферазной системы *Luciola mingrelica*, кристаллической креатинфосфаткиназы и аденилаткиназы, выделенной из мышц кролика (⁸).

Как показали результаты наших определений, суммарное содержание адениловых нуклеотидов в мицелии двух форм *V. dahliae* практически одинаково, однако соотношение отдельных компонентов адениловой системы оказалось различным (табл. 1). Так, при равном содержании АТФ в клетках вирулентного гриба обнаружено большее количество АДФ, тогда как у авирулентной формы — АМФ.

Для митохондрий вирулентной формы *V. dahliae* характерно большее суммарное содержание адениловых нуклеотидов по сравнению с авирулентной, в основном за счет АТФ.

На основании данных о содержании нуклеотидов вычислены отношения АТФ/АДФ, АТФ/АМФ, а также энергетический заряд адениловой системы (¹⁰).

Оказалось, что в мицелии вирулентной формы *V. dahliae* величина отношения АТФ/АДФ ниже за счет большого содержания АДФ, а отношение АТФ/АМФ почти в два раза выше, чем у авирулентной.

В митохондриях вирулентной формы отношения АТФ/АДФ и АТФ/АМФ равны 2,0 и 12,2 соответственно, тогда как у авирулентной величина отношения АТФ/АДФ составляет 1,6, а АТФ/АМФ 2,2. Большую величину рассчитанных показателей у вирулентной формы гриба

можно объяснить высокой степенью фосфорилированности всех компонентов адениловой системы в его клетках.

Митохондрии авирулентной формы имеют более низкое по сравнению с вирулентной отношение АТФ/АМФ. Это объясняется тем, что в данном случае в митохондриях, наряду с образованием АТФ, может осуществляться запасание макроэргического фосфата за счет соединений неадениловой природы. Таким соединением служит пирогосфат, факт образования которого в митохондриях и хроматофорах за счет энергии переноса электронов недавно был установлен для широкого круга объектов (¹¹, ¹²).

Таблица 1

Содержание адениловых нуклеотидов в мицелии и митохондриях *V. dahliae* (нмол. на 1 мг белка)

Нуклеотиды	Авирулентная форма		Вирулентная форма	
	мицелий, $M \pm m$	митохондрии, $M \pm m$	мицелий, $M \pm m$	митохондрии, $M \pm m$
АТФ	$0,72 \pm 0,06$	$3,80 \pm 0,29$	$0,79 \pm 0,09$	$7,27 \pm 0,34$
АДФ	$0,51 \pm 0,09$	$2,30 \pm 0,10$	$0,80 \pm 0,08$	$3,53 \pm 0,15$
АМФ	$0,58 \pm 0,12$	$2,60 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,29$
АТФ+АДФ+АМФ	$1,81 \pm 0,09$	$8,10 \pm 0,41$	$1,95 \pm 0,02$	$11,40 \pm 0,23$

Таблица 2

Содержание никотинамидных коферментов в митохондриях и мицелии *V. dahliae* (мкмол. на 1 г сухого веса)

Нуклеотиды	Авирулентная форма		Вирулентная форма	
	мицелий, $M \pm m$	митохондрии, $M \pm m$	мицелий, $M \pm m$	митохондрии, $M \pm m$
НАД	$0,84 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,02$
НАДФ	$0,32 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,13$	$0,37 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,01$
НАД-Н	$0,73 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,01$	$1,10 \pm 0,04$	$2,05 \pm 0,03$
НАДФ-Н	$0,31 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$
Σ	$2,20 \pm 0,04$	$2,92 \pm 0,13$	$3,13 \pm 0,06$	$3,08 \pm 0,04$

Мы рассчитали также величину энергетического заряда для митохондрий и целых клеток, различающихся по патогенности форм *V. dahliae*. Оказалось, что митохондрии вирулентного гриба имеют большее значение энергетического заряда, чем органоиды авирулентного (0,57 и 0,79 соответственно), что свидетельствует о существенных различиях в интенсивности запасаания энергии в митохондриях двух форм *V. dahliae*. Это отражается и на величине энергетического заряда целых клеток, который также выше у вирулентного гриба. Можно в связи с этим предполагать, что в мицелии вирулентной формы обеспечение энергией метаболических процессов происходит более интенсивно.

Согласно современным представлениям, важной функцией митохондрий, помимо образования АТФ, является генерация «восстановительного потенциала», важнейшими переносчиками которого считают никотинамидные коферменты. Эта сторона обмена практически не изучена у возбудителей болезней растений. Никотинамидные коферменты в связи с патогенностью исследовались лишь у возбудителя фузариозного вилта хлопчатника (¹³).

Мы определили содержание НАД, НАД-Н, НАДФ и НАДФ-Н в митохондриях и мицелии *V. dahliae*.

Обнаружено, что в мицелии обеих форм гриба содержание НАД и НАДФ практически одинаково (табл. 2). В то же время количество НАД-Н и НАДФ-Н больше в мицелии вирулентной формы соответственно на 30 и 60 %. Эти данные свидетельствуют о том, что наряду с большим суммар-

ным содержанием никотинамидных коферментов для клеток вирулентного гриба характерно преобладание их восстановленных форм.

Митохондрии двух форм *V. dahliae* имеют одинаковое содержание пиридиннуклеотидов. Однако соотношение их восстановленных и окисленных форм оказалось различным. В митохондриях авирулентного гриба обнаружено большее количество НАД, тогда как в митохондриях вирулентного — НАД-Н.

Расчет относительного содержания восстановленных никотинамидных коферментов в мицелии и митохондриях *V. dahliae* показал, что степень их восстановленности больше как в мицелии, так и в митохондриях вирулентной формы гриба. Особенно ярко это демонстрирует величина отношения $\text{НАД-Н} + \text{НАДФ-Н} / (\text{НАД} + \text{НАДФ})$, которая в митохондриях вирулентной формы составляет 1,5, тогда как у авирулентной 3,5. Это позволяет предполагать, что для митохондрий вирулентного гриба характерна более высокая активность систем генерации «восстановительного потенциала». Такое положение согласуется с высоким значением энергетического заряда, обнаруженным в митохондриях этой формы гриба. Полученные нами результаты еще раз подтверждают положение, что величина энергетического заряда является одним из факторов, контролирующих редокс-состояние никотинамидных коферментов, и что высокое содержание их восстановленных форм возможно лишь при большой величине энергетического заряда адениловой системы (¹⁴).

На основании экспериментального материала, представленного в работе, можно заключить, что существуют глубокие различия в энергетическом обмене отличающихся по патогенности форм *V. dahliae*. Для вирулентной формы характерны более высокая интенсивность и эффективность работы систем запасаения и использования энергии. Очевидно, с этими особенностями метаболизма фитопатогенных организмов связана их способность успешно преодолевать защитные барьеры растения-хозяина.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
26 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. M. Pappenheimer et al., *Biochim. et biophys. acta*, v. 64, 2 (1962). ² Л. Н. Ермолаева, Л. С. Мильман, *Биохимия*, т. 39, в. 2 (1974). ³ Е. Р. Карташова, Е. С. Матеева, *Физиология и биохимия здорового и больного растения*, М., 1970. ⁴ J. Malca et al., *Phytopathology*, v. 58, № 3 (1968). ⁵ Л. А. Воронков, И. В. Живонисцева, *Микология и фитопатология*, т. 7, 6 (1973). ⁶ А. Н. Белозерский, И. С. Кулаев, *Проблемы эволюционной и технической биохимии*, М., 1964. ⁷ S. Brody, *J. Bacteriol.*, v. 101, 3 (1970). ⁸ B. L. Strehler, S. K. Totter, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 40, 28 (1952). ⁹ А. В. Котельникова, Р. А. Звягильская, *Биохимия дрожжевых митохондрий*, М., 1973. ¹⁰ D. E. Atkinson, *Biochemistry*, v. 7, № 11 (1968). ¹¹ D. L. Keister, N. J. Yike, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 42, 932 (1952). ¹² С. Э. Мансурова, Ю. А. Шахов, И. С. Кулаев, *ДАН*, т. 213, № 5 (1973). ¹³ Б. А. Рубин, Е. Р. Карташова, Е. Ю. Золотухина, *ДАН*, т. 218, № 5 (1974). ¹⁴ H. A. Krebs, R. L. Veech, *Adv. in Enzyme Regulat.*, v. 7, 397 (1969).