

Эви ПАДУ

АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАК-ЛИАЗЫ (КФ 4.3.1.5.) В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ, ЗАРАЖЕННЫХ КАРТОФЕЛЬНОЙ НЕМАТОДОЙ

В зараженных фитопаразитами растениях повреждаются различные цепи основного обмена веществ. Это приводит к накоплению разных продуктов метаболизма в пораженных органах. В корнях растений картофеля, зараженных картофельной нематодой (*Heterodera rostochiensis* Woll.), возрастает общее содержание фенольных соединений (Хаберман, 1973). Считается, что фенольные соединения, образующиеся в ответ на заражение, имеют решающее значение в подавлении развития паразита (Рубин, Арциховская, 1968; Озерецковская и др., 1968; Farkas, Kiraly, 1962; Tomiyama, 1963; Tomiyama и др., 1968), поэтому выяснение механизма, обеспечивающего накопление фенольных соединений, представляет значительный интерес. В настоящее время известны две возможности увеличения концентрации фенольных соединений в инфицированных тканях: активирование общего пути синтеза фенольных соединений и освобождение фенольных соединений из связанного состояния под влиянием ферментов паразита (Farkas, Kiraly, 1962; Mahadevan, 1966). Доказательством увеличения синтетической способности растений считают активирование ферментов, прежде всего дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата, а также фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ), катализирующих разные этапы синтеза фенольных соединений. Под действием ФАЛ происходит превращение *L*-фенилаланина в *транс*-коричную кислоту, а из нее при последующих превращениях образуются различные оксикоричные кислоты, в том числе и хлорогеновая кислота (Zucker, 1965; Patil и др., 1966) — одно из основных фенольных соединений картофеля. Параллелизм между увеличением активности ФАЛ и накоплением фенольных соединений в зараженных различными паразитами растениях установлен некоторыми авторами (Minamikawa, Uritani, 1964; Biehn и др., 1968; Farkas, Szirmai, 1969; Novacky, Acedo, 1970). А выяснению механизма накопления фенольных соединений в зараженных фитонематодами растениях посвящено очень мало работ. Исходя из сказанного, мы изучали взаимоотношения между активностью ФАЛ и накоплением фенольных соединений в растениях картофеля, зараженных картофельной нематодой. Интерес к этой проблеме связан также с тем, что по данным литературы продукты реакции, катализируемой ФАЛ, ингибируют развитие картофельной нематоды (Giebel, 1973).

Материал и методика

В опытах использовались два сорта картофеля (*Solanum tuberosum* L.): восприимчивый к картофельной нематоды (*Heterodera rostochiensis* Woll.) 'Сулёв' и устойчивый к биотипу А нематоды 'Спекула'.

Методика выращивания растений, заражения и определения степени зараженности опубликована ранее (Хаберман, 1972).

Приготовление ферментных экстрактов. 2 г промытых дистиллированной водой корней или 1 г листьев картофеля растирали в 5 мл холодного 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,8) в охлажденных ступках со стеклянным порошком и в присутствии активированного угля. Добавление восстановителей и ингибиторов *o*-дифенолоксидазы (1%-ного поливинилпирролидона, 4 мМ цистеина, 5 мМ β -меркаптоэтанола), а также адсорбентов фенольных соединений (Сефадекса G-25) не увеличивало ферментативной активности. Гомогенат отстаивали в течение 15 мин на холоде и затем центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 15 мин при 18000 об/мин. К надосадочной жидкости добавляли 100 мг/мл сахарозы и хранили ее в замороженном виде. Активность фермента определяли на следующий день после приготовления экстракта.

Активность фенилаланин-аммиак-лиазы определяли по скорости образования *транс*-коричной кислоты (Лаанест, Маргна, 1972), измеряя увеличение поглощения реакционной смеси на СФ-4А при 275 нм (максимум поглощения коричной кислоты в трис-НСl буфере). Реакционная смесь общим объемом 3 мл содержала 0,2 мл 0,05 М *L*-фенилаланина, 0,3 мл экстракта корней или 0,2 мл экстракта листьев в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 8,8). В контрольную смесь вместо фенилаланина добавляли дистиллированную воду. После добавления фенилаланина кюветы с тщательно перемешанным содержимым ставили в термостат (температура 37 °С). Первое измерение проводили через 30 мин и в дальнейшем через каждые 30 мин в течение полутора часов. Активность фермента в течение этого времени изменялась линейно. Активность ФАЛ выражали количеством образовавшейся за полтора часа коричной кислоты (рассчитывали в микрограммах по калибровочному графику) на 1 г сырого веса растений. Экстракты каждого варианта опыта приготавливали в трехкратной повторности. Ошибка определения активности фермента в одном экстракте не превышала 3%.

Нами было проверено, возникает ли вследствие реакции коричная кислота. Для этого реакционную смесь подкисляли 2 н. НСl до рН 4,0 и трижды экстрагировали эфиром в соотношении 1:1. Эфирные экстракты выпаривали досуха при комнатной температуре и осадок растворяли в 60%-ном этаноле. Ультрафиолетовый спектр поглощения и R_f продукта реакции (в 3%-ной уксусной кислоте) совпадали со спектром и R_f коричной кислоты.

В ходе работы мы наблюдали, что активность фермента в отделенных тканях быстро увеличивается, достигая максимума приблизительно через четыре часа после отделения тканей. При этом максимальная активность могла превышать исходную активность фермента более чем в два раза. Такое явление неоднократно отмечалось и другими авторами при работе с различными ферментами. Причиной его считается переход ферментативного белка из связанной в растворимую форму вследствие деградации клеточных структур (Udvardy и др., 1964; Farkas, Lovrekovich, 1965). По названной причине гомогенаты из сравниваемых тканей следует изготавливать в одно и то же время после их отделения от растений. Мы изготавливали гомогенаты сразу после отделения корней и листьев от растений.

Методика определения общего количества фенольных соединений активом Фолина-Дениса описана ранее (Хаберман, 1973).

За биохимическими изменениями, характерными для зараженного картофеля, следили в разные фазы развития инфекции.

Для обработки данных использовался *t*-тест Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, в корнях здоровых растений обоих сортов активность ФАЛ была одинаковой. Заражение вызывало у разных сортов разнонаправленное изменение активности фермента. Активность ФАЛ в корнях устойчивого сорта в большинстве случаев снижалась или не изменялась, как, например, в молодых растениях опыта 2. В корнях восприимчивых растений активность фермента либо увеличивалась, либо не изменялась (исключая 20-дневные растения опыта 2, в которых активность ФАЛ несколько уменьшалась).

Таблица 1

Влияние заражения картофельной нематодой на активность фенилаланин-аммиак-лиазы картофеля (в микрограммах коричной кислоты)

Номер опыта	Возраст растений, дни	Сорт	В корнях			В листьях		
			Контроль	Зараженный	%	Контроль	Зараженный	%
1	10	'Спекула'	17,23±0,07	13,86±0,05	80*	2,95	2,06	70
		'Сулев'	13,22±0,10	12,73±0,78	96	4,43	2,95	67
17	17	'Спекула'	9,11±0,13	4,72±0,48	52*	4,08±0,39	3,83±0,00	94
		'Сулев'	9,85±0,05	12,24±0,00	124*	5,32±0,34	4,91±0,10	92
2	9	'Спекула'	9,52±0,00	9,57±0,12	101	18,28±0,30	5,89±0,00	32*
		'Сулев'	10,18±0,15	15,88±0,17	156*	9,44±0,30	11,19±0,59	119
12	12	'Спекула'	22,40±0,17	21,93±0,17	98	18,51±0,89	11,74±0,00	63
		'Сулев'	23,03±0,37	27,19±0,13	118*	22,28±1,17	15,55±1,06	70
20	20	'Спекула'	20,23±0,15	11,41±0,00	56*	35,13±0,00	20,49±2,93	58
		'Сулев'	20,80±0,12	17,21±0,08	83*	23,42±0,00	29,28±5,86	125

* Различия статистически достоверны на 5%-ном уровне значимости.

В листьях устойчивых растений активность ФАЛ по абсолютным цифрам снижалась, но в большинстве случаев снижение это статистически не подтвердилось из-за большой ошибки определения активности фермента в гомогенате листьев. В листьях восприимчивых растений заражение однонаправленных изменений не вызывало.

Результаты определения содержания фенольных соединений в здоровых и зараженных нематодой растениях картофеля представлены в табл. 2. Опыты показали, что здоровые растения устойчивого и восприимчивого сортов содержат приблизительно одинаковое количество фенольных соединений. Накопление фенольных соединений в ответ на заражение происходило активнее в корнях устойчивого сорта по сравнению с восприимчивым.

Листья картофеля оказались более богатыми фенольными соединениями по сравнению с корнями. Заражение на содержание фенольных соединений в листьях влияния не оказывало, однако, с возрастом растений количество фенольных соединений в листьях сильно повышалось.

Следовательно, наши результаты показывают отсутствие зависимости между активностью ФАЛ и накоплением фенольных соединений в зараженных картофельной нематодой растениях картофеля.

Таблица 2

Влияние заражения картофельной нематодой на содержание фенольных соединений в тканях картофеля, мг/гсырого веса

Номер опыта	Возраст растений, дни	Сорт	Количество этанолрастворимых фенольных соединений					
			В корнях			В листьях		
			Контроль	Зараженный	%	Контроль	Зараженный	%
2	9	'Спекула'	0,14±0,00	0,23±0,01	165*			
		'Сулев'	0,13±0,00	0,18±0,00	136*			
	12	'Спекула'	0,18±0,00	0,36±0,02	202*			
		'Сулев'	0,17±0,00	0,25±0,00	142*			
	20	'Спекула'	0,21±0,00	0,49±0,06	227*			
		'Сулев'	0,21±0,00	0,29±0,01	139*			
3	12	'Спекула'	0,15±0,00	0,29±0,03	207*	1,82±0,04	1,94±0,00	106
		'Сулев'	0,14±0,00	0,20±0,01	136*	1,82±0,02	1,72±0,00	95*
	18	'Спекула'	0,18±0,01	0,41±0,00	223*	3,51±0,01	3,70±0,03	105*
		'Сулев'	0,15±0,01	0,27±0,02	188*	3,64±0,04	3,63±0,13	100
	28	'Спекула'	0,21±0,00	0,31±0,01	148*	5,88±0,13	5,93±0,08	101
		'Сулев'	0,17±0,00	0,26±0,00	150*	5,53±0,12	4,97±0,12	90
	38	'Спекула'	0,31±0,01	0,41±0,01	134*	8,69±0,00	8,63±0,00	99*
		'Сулев'	0,28±0,00	0,40±0,00	145*	8,50±0,00	8,09±0,09	95*

* Различия статистически достоверны на 5%-ном уровне значимости.

В опыте 2 параллельно с определением активности ФАЛ анализировалось содержание фенольных веществ. Активность ФАЛ снижалась или не изменялась с увеличением концентрации фенольных соединений в корнях устойчивых растений. И в восприимчивых растениях накопление фенольных соединений далеко не во всех случаях сопровождалось увеличением активности ФАЛ. Следует отметить, что наши данные не совпадают с результатами польских ученых, работающих с этими же объектами. Они нашли, что большее накопление фенольных соединений в устойчивых растениях базируется на увеличении активности ФАЛ и тирозин-аммиак-лиазы (Giebel, 1973). Причины несоответствия результатов не ясны. Это можно объяснить другим набором сортов, различиями в степени зараженности и в условиях выращивания растений, а также в методике определения активности ферментов.

В то же время известно, что положительная корреляция между активностью ФАЛ и накоплением фенольных соединений не является закономерностью общего характера (Запретов, Шипилова, 1972; Bellini, van Pouse, 1970). Этот факт свидетельствует о том, что активность ФАЛ далеко не всегда является лимитирующим звеном в синтезе фенольных соединений. Л. Лаанест и У. Маргна (1972) на основе своих опытов пришли к выводу, что ведущей причиной возникновения сдвигов в синтезе флавоноидов в растениях являются изменения не на уровне каталитического потенциала, а на уровне субстратной обеспеченности.

Наши данные не опровергают возможности активирования общего пути синтеза фенольных соединений в зараженных картофельной нематодой растениях картофеля. Так, нами установлено активирование

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в зараженном нематодой картофеле. Это считают доказательством увеличенной способности тканей к синтезу фенольных соединений (Запрометов, 1970), так как в пентозомонофосфатном цикле дыхания возникают начальные продукты биосинтеза фенольных соединений. Возрастание концентрации таких фенольных соединений, наличие которых характерно и для здоровых тканей (Хаберман, 1973), заставляет предположить, что в инфицированных нематодой корнях активируется нормальный, свойственный для неповрежденных растений путь синтеза фенольных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

- Запрометов М. Н., 1970. Образование и функции фенольных соединений в высших растениях. Ж. общей биол. 31 (2) : 201—220.
- Запрометов М. Н., Шипилова С. В., 1972. Фенилаланин-аммоний-лиаза и образование фенольных соединений в проростках кукурузы. Физиол. раст. 19 (3) : 498—504.
- Лаанест Л. Э., Маргна У. В., 1972. Роль фенилаланин-аммиак-лиазы (КФ 4.3.1.5.) в накоплении флавоноидов в проростках гречихи. Физиол. раст. 19 (6) : 1157—1164.
- Озерецковская О. Л., Васюкова Н. И., Метлицкий Л. В., 1968. Изучение антибиотических веществ клубня картофеля, возникающих в ходе некротической реакции. Докл. АН СССР 178 (1) : 244—247.
- Рубин Б. А., Арциховская Е. В., 1968. Биохимия и физиология иммунитета растений (2-е изд.). М.
- Хаберман Э., 1972. Изучение активности и изоэнзимного состава окислительных ферментов картофеля в связи с заражением картофельной нематодой. Изв. АН ЭССР. Биол. 21 (4) : 348—356.
- Хаберман Э., 1973. Об изменении фенольного комплекса картофеля при заражении картофельной нематодой. Изв. АН ЭССР. Биол. 22 (3) : 244—254.
- Bellini, E., van Pouce, M., 1970. Distribution of phenylalanine ammonia-lyase in etiolated and far-red irradiated radish seedlings. Planta 93 (1) : 60—70.
- Biehn, W. L., Kuč, J., Williams, E. B., 1968. Accumulation of phenols in resistant plant-fungi interactions. Phytopathology 58 : 1255—1260.
- Farkas, G. L., Kiraly, Z., 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease and disease resistance. Phytopathol. Z. 44 : 105—150.
- Farkas, G. L., Lovrekovich, L., 1965. Enzyme levels in tobacco leaf tissues affected by the wildfire toxin. Phytopathol. 55 : 519—524.
- Farkas, G. L., Szirmai, J., 1969. Increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in bean leaves infected with tobacco necrosis virus. Neth. J. Pl. Path. 75 : 82—85.
- Giebel, J., 1973. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activities in potato roots and their significance in potato resistance to *Heterodera rostochiensis*. Nematologica 19 (1) : 1—6.
- Mahadevan, A., 1966. Biochemistry of infection and resistance. Phytopathol. Z. 57 (1) : 96—99.
- Minamikawa T., Uritani J., 1964. Phenylalanine deaminase and tyrosine deaminase in sliced or black rot-infected sweet potato roots. Arch. Biochem. Biophys. 108 : 573—574.
- Novacky, A., Acedo, G., 1970. Phenylalanine ammonia-lyase activity in tobacco tissue inoculated with *Pseudomonas pisi* and *Pseudomonas tabaci*. Phytopathol. 60 (9) : 13006 (Abstract).
- Patil, S. S., Zucker, M., Dimond, A. F., 1966. Biosynthesis of chlorogenic acid in potato roots resistant and susceptible to *Verticillium albo-atrum*. Phytopathol. 56 (8) : 971—974.
- Tomiyama K., 1963. Physiology and biochemistry of disease resistance in plants. Ann. Rev. Phytopathol. 1 : 295—324.
- Tomiyama, K., Sakama, T., Ishizaka, N., Sato, N., Katsui, N., Takasugi, M., Masamune, T., 1968. A new antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue, infected by pathogenes. Phytopathol. 58 (1) : 115.
- Udvardy, J., Horwath, M., Kisban, K., Dezi, L., Farkas, G. L., 1964. Alteration of enzyme activities in detached leaves and their counteraction by kinetin. Experientia 20 : 214—215.
- Zucker, M., 1965. Induction of phenylalanin deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiol. 40 : 779—784

Evi PADU

FENÜÜLALANIINAMMOONIUMLÜAASI (FK 4.3.1.5.)
AKTIIVSUS KARTULI-KIDUSSIGA NAKATATUD KARTULITAIMEDES

Resümee

Fenüülalaniinammooniumlüaas (FAL) ekstraheeriti külma 0,05 M tris-HCl puhvriga (pH 8,8) aktiveeritud söe manulusel. Puhastamata ensüümi aktiivsuse määraati *trans*-kaneelhape tekkimise kiiruse alusel, kusjuures reaktsioonisegu optilise tiheduse suurenemist mõõdeti lainepikkusel 275 nm. Reaktsioonisegu koosnes 0,2 ml-st 0,05 M L-fenüülalaniinist, 0,3 ml-st juurte ekstraktist (2 g/5 ml) või 0,2 ml-st lehtede ekstraktist (1 g/5 ml) 0,05 M tris-HCl puhvriss (üldruumala 3 ml). Inkubatsiooniaeg oli 1,5 tundi, temperatuur 37°C, mõõtmiste intervall 30 min.

Tulemused näitasid positiivse korrelatsiooni puudumist FAL-i aktiivsuse ja fenoolsete ühendite sisalduse tõusu vahel kartuli-kiduussiga (*Heterodera rostochiensis* Woll.) nakatatud resistentsetes ('Spekula') ja sustseptiilsetes ('Sulev') kartulisordis: FAL-i aktiivsus resistentsetes taimedes vähenes, sustseptiilsetes taimedes aga suurenes või ei muutunud. Samal ajal tõusis fenoolsete ühendite kontsentratsioon mõlema sordi juurtes (märgatavalt suuremal määral resistentsetes taimedes). Fermendi aktiivsus ja fenoolsete ühendite sisaldus mõlema sordi tervete taimede juurtes ja lehtedes osutusid võrdses.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saabunud
1. III 1976

Evi PADU

DIE AKTIVITÄT DER PHENYLALANINAMMONIUMLYASE (EC 4.3.1.5.)
IN DEN VON DER KARTOFFELNEMATODE BEFALLENEN
KARTOFFELPFLANZEN

Zusammenfassung

Phenylalaninammoniumlyase (Pal) wurde mit kalter 0,05 M Tris-HCl Pufferlösung (pH 8,8) unter Hinzufügung aktivierter Kohle extrahiert. Die Aktivität des Enzyms wurde nach der Geschwindigkeit der Entstehung der *trans*-Zimtsäure bestimmt. Die Vergrößerung der optischen Dichte der Reaktionsmischung wurde bei 275 nm gemessen. Die Reaktionsmischung bestand aus 0,2 ml 0,05 M L-Phenylalanin, 0,3 ml Extrakte der Wurzeln (2 g/5 ml) oder 0,2 ml Extrakte der Blätter (1 g/5 ml) in der 0,05 M Tris-HCl Pufferlösung (pH 8,8). Das Gesamtvolumen der Reaktionsmischung 3 ml. Inkubationszeit 1,5 Stunden, Temperatur 37°C, Periode der Messungen 30 Min.

Auf Grund der Ergebnisse trat keine positive Korrelation zwischen der Aktivität der Pal und der Vergrößerung des Gehaltes der phenolischen Verbindungen der befallenen Pflanzen ein, und zwar weder in der resistenten Kartoffelsorte ('Spekula') noch in der anfälligen ('Sulev'). Nach dem Befall nahm die Aktivität der Pal in den resistenten Pflanzen ab in den suszeptiblen aber vergrößerte sie sich oder veränderte sich nicht. Zugleich nahm die Konzentration der phenolischen Verbindungen in beiden Sorten zu, dabei in den resistenten Pflanzen wesentlich schneller. Die Aktivität der Pal in den Blättern und Wurzeln der gesunden Pflanzen war in beiden Sorten gleich.

Institut für Zoologie und Botanik
der Akademie der Wissenschaften der Estnischen SSR

Eingegangen
am 1. März 1976