

ЭВИ ХАБЕРМАН

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ИЗОЭНЗИМНОГО СОСТАВА ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ КАРТОФЕЛЯ В СВЯЗИ С ЗАРАЖЕНИЕМ КАРТОФЕЛЬНОЙ НЕМАТОДОЙ

В настоящее время число исследований, связанных с иммунитетом растений, постоянно увеличивается в связи с большой теоретической и хозяйственной важностью этой проблемы. Сейчас общепринято считать, что решающая роль в защите растений от инфекции принадлежит активному иммунитету, а не тем свойствам, которые выявляются у здоровых растений. Исходя из этого, первостепенное значение приобретает изучение биохимической природы ответной реакции растений на поражение. Внедрение патогенного организма в ткани растения вызывает сложную цепь взаимообусловленных сдвигов в метаболизме растения. Оценить значение этих изменений в создании устойчивости к патогену можно при сравнении особенностей этих биохимических сдвигов, возникающих в резистентных и восприимчивых сортах растений при заражении. Несомненно основная роль среди факторов, которые регулируют изменения в обмене веществ в инфицированных клетках, принадлежит белкам-ферментам. Поэтому особый интерес представляют отклонения, возникающие при заражении в каталитическом аппарате клеток.

В данной работе для сравнительного изучения были выбраны окислительные ферменты восприимчивых и невосприимчивых к картофельной нематоды сортов картофеля, поскольку известно, что в растениях после заражения различными микроорганизмами возникают качественные и количественные изменения оксидаз (Tomiyama, Stahmann, 1964; Rudolph, 1971; Ладыгина и др., 1970). Имеются сообщения о корреляции между активностью пероксидазы и полифенолоксидазы и резистентностью (Rudolph, Stahmann, 1944; Рубин и др., 1964). Многие факты доказывают, что невосприимчивость растений к различным паразитическим организмам имеет больше общих, чем отличительных черт (Flegg, 1964). Поэтому представляет интерес исследование свойств названных окислительных ферментов в течение болезней, вызванных фитопатогенными нематодами, так как биохимические взаимоотношения растений с фитогельминтами изучены гораздо меньше, чем эти отношения в случае вирусных, грибных и бактериальных заболеваний.

Материал и методика

Для работы были использованы два сорта картофеля (*Solanum tuberosum* L.): восприимчивый к картофельной нематоды (*Heterodera rostochiensis* Wollenweber) сорт 'Сулев' и устойчивый к биотипу А сорт 'Спекула' (из ГДР).

Опыты проводились в течение 1971 года. Растения картофеля выращивались в веге-

тационной камере при искусственном освещении (зимой) или в вегетационном домике (летом) в песчаной культуре на питательной среде Роббинса (Хьюитт, 1960). Для заражения использовалась местная популяция картофельной нематоды, которая состоит только из расы А. Инфекционная нагрузка составляла 300 цист нематоды на литр песка. В целях стимуляции выхода личинок цисты обрабатывались в течение трех суток свежеприготовленной 2 мМ пикролоновой кислотой при постоянном продувании воздухом. Цисты с активированными личинками добавляли к увлажненному песку непосредственно перед посадкой глазков картофеля.

Для определения количества проникнувших в корни нематод вся корневая система растений фиксировалась в течение суток в смеси этиловый спирт — ледяная уксусная кислота — формалин — дистиллированная вода 15:1:6:40 (по объему). Фиксированные корни окрашивались при двухминутном кипячении в 0,05%-ном кислом фуксине, приготовленном на растворе лактофенола (100 г фенола, 83 мл молочной кислоты, 160 мл глицерина, 100 мл дистиллированной воды). После охлаждения корни из раствора краски были перенесены для обесцвечивания в раствор чистого лактофенола и содержались таким образом в чашках Петри до анализа. Число личинок в корнях подсчитывалось под бинокляром при 16-кратном увеличении.

Исследовались параллельно листья и корни зараженных картофельной нематодой и незараженных (контрольных) растений обоих сортов в различные сроки после заражения.

Приготовление ферментных экстрактов. 1—2 г промытых дистиллированной водой тканей растирали в 5 мл холодного 0,2М ацетатного буфера (рН 6,6) со стеклянным порошком в охлажденной ступке. Для связывания фенольных соединений, которые могут ингибировать деятельность ферментов, добавляли небольшое количество тонкого порошка активированного угля и давали гомогенату стоять 15 мин на холоду. Затем гомогенат отжимали через планктоновый шелк для освобождения от неразрушенных тканей и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге 15 мин при 18 000 g. К надосадочной жидкости добавляли 100 мг/мл сахарозы и сохраняли ее в замороженном виде при -10°C . Определение активности ферментов проводили, как правило, на третьи сутки после приготовления экстракта. Каждый экстракт использовали для определения только один раз, разбавляя при необходимости 10%-ной сахарозой.

Активность полифенолоксидазы определялась колориметрически по изменению оптической плотности на ФЭК-56 с темно-синим светофильтром № 3 (400 мк) с интервалами в 30 сек в течение трех минут. В качестве субстрата использовался пирокатехин (Ponting, Joslyn, 1948). Инкубационная смесь общим объемом 5 мл состояла из 3,8 мл фосфатного буфера Серенсена (рН 7,6), 0,2 мл экстракта и 1,0 мл свежеприготовленного 0,01М раствора пирокатехина.

Активность пероксидазы определялась также колориметрически на ФЭК-56 с синим светофильтром № 4 (440 мк) с интервалами в 30 сек в течение трех минут. В качестве субстрата использовался гваякол (Ponting, Joslyn, 1948). Инкубационная смесь общим объемом 5 мл состояла из 3,8 мл 0,1М ацетатного буфера (рН 5,6), 0,2 мл экстракта, 0,5 мл 0,01М свежеприготовленного раствора гваякола и 0,5 мл 0,008М H_2O_2 .

Активность ферментов выражалась в изменении оптической плотности на 1 г сырого веса или на 1 мг белка в течение одной минуты. Относительная ошибка определений была меньше 5%.

Экстракцию растворимого белка для электрофореза проводили путем растирания 2 г тканей в 5 мл буфера в охлажденной до -10° ступке со стеклянным порошком, Состав буфера: 50 мМ трис (трисоксиметиламинометан), 40 мМ аскорбиновой кислоты, 1 мМ ЭДТА и 2 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Полученную массу отжимали через тонкий планктоновый шелк и центрифугировали 15 мин в рефрижераторной центрифуге при 18 000 g. Супернатант сохраняли по 2 мл с 200 мг сахарозы и с 80 мг сефадекса G-100 в замороженном виде. Количество белка в супернатанте определялось по Лоури (Lowry и др., 1951) с некоторыми модификациями (Яска, 1968).

Электрофорез белков проводили по методу Дэвиса (Davis, 1964) в несколько измененном виде (Jaaska, Jaaska, 1969). Для опытов использовали только мелкопористый гель, который состоял из 10% акриламида, 0,2% *N,N'*-метиленбисакриламида, 0,25M трис, 0,075M HCl, 0,8% триэтаноламина и 0,05 мг% рибофлавин-5-фосфата. Для приготовления гелей вышеописанную свежеприготовленную смесь отстаивали в стеклянных электрофоретических трубках между двумя люминесцентными лампами на специально подготовленной подставке в течение 25 мин. Катодный буфер для электрофореза состоял из 0,01M трис и 0,08M глицина, а анодный буфер из 0,1 M трис-ацетата с pH 8. Электрофорез в анионной системе проводили в течение 1,5—2 ч. Сила тока на одну трубку была 2мА. Об окончании электрофореза судили по движению зоны индикатора бромфенолового синего. Растительный экстракт, нанесенный на гель, содержал 50—60 мкг белка в случае электрофореза пероксидазы и 100—120 мкг белка при электрофоретическом разделении растворимого белка.

Пероксидазу выявляли на нефиксированных гелях при помощи гистохимической реакции. Состав инкубационной смеси: 9 объемов 0,2M ацетатного буфера (pH 3,6) и 1 объем 0,01M субстрата (*o*-дианизидин), растворенного в 96%-ном этаноле. К 40 мл этой смеси добавляли 0,2 мл 1,5%-ной H₂O₂. Инкубацию проводили в течение 12 мин, затем гели сразу фотографировали в проходящем свете на фотопленку Микрат-200. Интенсивность отдельных зон пероксидазы на фотокопиях измерялась при помощи экстинкционно-регистрирующего прибора ERI 65 (VEB Carl Zeiss, Jena).

Для выявления фракций протеина гели инкубировались 20 мин в растворе 0,2%-ной краски кислотного сине-черного, приготовленного на смеси метанол — уксусная кислота — глицерин — вода (50:10:10:50 по объему). Для освобождения от окрашенного фона гели промывались в смеси 20%-ного этилового спирта и 10%-ной уксусной кислоты (2:1).

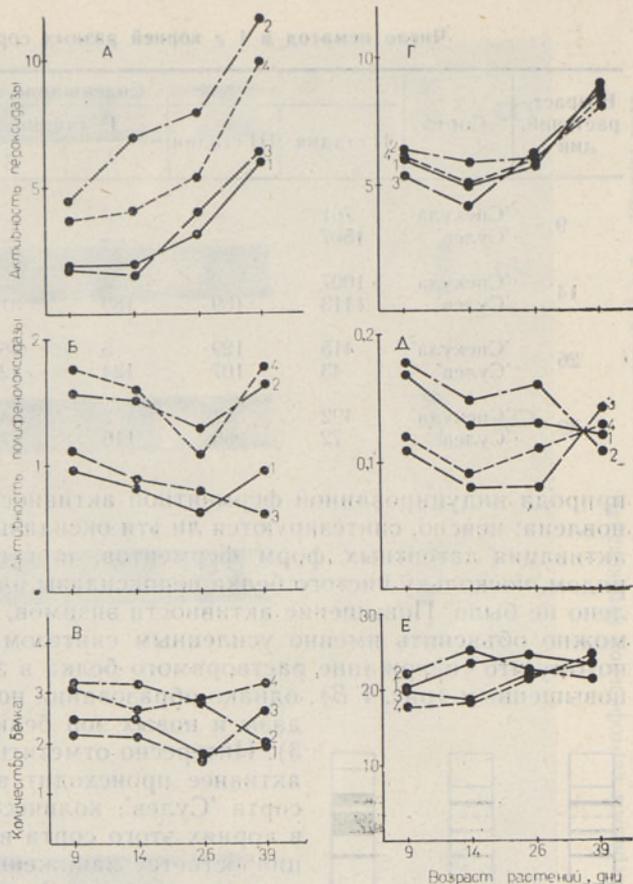
Результаты и обсуждение

При определении активности полифенолоксидазы и пероксидазы в разных сортах картофеля различий между здоровыми растениями устойчивого и восприимчивого сортов обнаружено не было (рис. 1 А, Б, Г). Исключением является только полифенолоксидаза листьев, которая оказалась более активной в резистентном сорте (рис. 1 Д). Под влиянием заражения картофельной нематодой активность обеих оксидаз в местах локализации паразита, т. е. в корнях, повышается. Активность *o*-дифенолоксидазы увеличивается в полтора-два раза. Удельная активность данного фермента в корнях больных растений у обоих сортов картофеля с различной восприимчивостью оказалась практически одинаковой (рис. 1 Б). Повреждение корней нематодами вызывает относительно небольшие изменения активности полифенолоксидазы в листьях. В большинстве случаев активность фермента в листьях пораженных растений увеличивается на 10—40%, причем в одинаковой степени у обоих сортов. Исключение составляют только 39-дневные растения, у которых под влиянием заражения активность полифенолоксидазы даже немного понижается в обоих сортах картофеля, а кроме того, фермент более активен в восприимчивом сорте (рис. 1 Д).

Однако эти результаты еще не дают основания заключить, что полифенолоксидаза не связана с резистентностью картофеля против картофельной нематоды. Сильное увеличение удельной активности фермента в корнях при заражении все же указывает на возможное участие полифенолоксидазы в реакциях иммунитета. Кроме того известно, что полифенолоксидаза связана с метаболизмом фенольных соединений. А фенолам, и особенно окисленным фенольным соединениям, присваивают большое значение в создании невосприимчивости картофеля к различным

Рис. 1. Влияние заражения на активность оксидаз и количество белка в корнях и листьях картофеля.

1 — 'Спекула' незараженный, 2 — 'Спекула' зараженный, 3 — 'Сулев' незараженный, 4 — 'Сулев' зараженный. (По оси ординат: активность оксидаз в единицах изменения оптической плотности на 1 мг белка за 1 мин и количество белка в мг на 1 г сырого веса тканей.) А, Б, В — корни; Г, Д, Е — листья.



патогенам (Johnson, Schaal, 1957; Lee, Tourneau, 1958; Tomiyama и др., 1968). В рамки этой гипотезы входят данные, которые показывают, что в пораженных резистентных сортах картофеля происходит более сильная некротизация тканей под влиянием *Heterodera rostochiensis* по сравнению с восприимчивыми сортами (Kühn, 1958). Различия в свойствах полифенолоксидазы между сортами с разной восприимчивостью могут быть обнаружены при более подробном изучении.

Активность пероксидазы в корнях пораженных растений повышается в 2—4 раза. При этом у устойчивого картофеля фермент активируется в значительно большей степени, чем у восприимчивого сорта и поэтому ее активность в зараженных растениях резистентного сорта была всегда выше на всех изученных этапах развития нематоды (рис. 1 А). Активность фермента в листьях при заболевании практически не подвергается изменению (рис. 1 Г).

Все вышеизложенные закономерности остаются в силе и в том случае, если активность ферментов выразить не на 1 мг белка, а на 1 г сырого веса тканей.

Все вышеизложенные закономерности остаются в силе и в том случае, если активность ферментов выразить не на 1 мг белка, а на 1 г сырого веса тканей.

Важно отметить, что сильное увеличение активности пероксидазы в инфицированных растениях невосприимчивого сорта нельзя объяснить более активным проникновением личинок нематод в корни этого сорта. Как видно из таблицы, в корнях 'Спекулы' на первых этапах развития болезни содержалось меньше нематод, чем в корнях восприимчивого сорта. В более старых растениях количество нематод в обоих сортах было приблизительно равным, что может быть следствием выхода ♂ адультов из корней восприимчивого сорта, где созревание нематод происходит быстрее.

Как видно, развитие инфекционного процесса приводит к значительным сдвигам в активности изученных окислительных ферментов. Однако

Число нематод в 1 г корней разных сортов картофеля

Возраст растений, дни	Сорт	Содержание нематод						Сумма
		II стадия	III стадия	IV стадия		♀	♂	
				♀	♂			
9	'Спекула'	761	—	—	—	—	—	761
	'Сулев'	1507	—	—	—	—	—	1507
14	'Спекула'	1007	2	—	—	—	—	1009
	'Сулев'	1113	189	189	31	—	—	1522
26	'Спекула'	415	129	5	86	—	343	978
	'Сулев'	43	107	124	12	110	409	805
39	'Спекула'	492	17	2	4	—	52	567
	'Сулев'	72	66	116	7	71	249	581

природа индуцированной ферментной активности окончательно не установлена: неясно, синтезируются ли эти оксидазы *de novo*, или происходит активация латентных форм ферментов, или существуют обе реакции рядом, поскольку чистого белка пероксидазы и *o*-дифенолоксидазы выделено не было. Повышение активности энзимов, видимо, в данном случае можно объяснить именно усиленным синтезом ферментативного белка, потому что содержание растворимого белка в зараженных корнях было повышенным (рис. 1 В), однако образования новых изоэнзимов пероксидазы и новых зон белка не отмечалось (рис. 2, 3). Интересно отметить, что хотя синтез белка активнее происходит в корнях восприимчивого сорта 'Сулев', количество растворимого белка в корнях этого сорта в начале развития инфекции остается заниженным по сравнению с резистентным сортом. Сильное падение содержания белка в зараженных корнях 39-дневных растений устойчивого сорта можно объяснить тем, что растения 'Спекулы' на более поздних этапах инфекционного процесса сильнее пострадали от паразитов, чем растения 'Сулева'. Сырой вес корней устойчивого сорта уменьшился на 40, а восприимчивого сорта только на 10%.

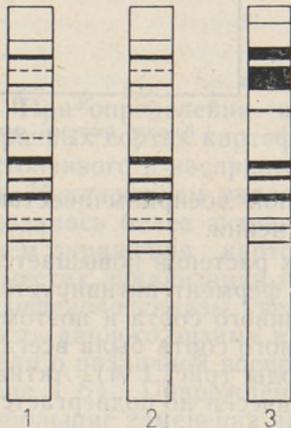


Рис. 2. Диаграммы протениограмм картофеля.

1 — корни 'Спекулы', 2 — корни 'Сулева', 3 — листья.

Количество белка в листьях под влиянием заражения не изменилось (рис. 1 Е). При сравнении электрофореграмм растворимого белка (протениограмм) качественных различий между здоровыми и зараженными растениями как восприимчивого, так и устойчивого сорта обнаружено не было. Однако, как правило, общая окраска зон белков на протениограммах корней зараженных растений была интенсивнее в обоих сортах вследствие общего усиления синтеза белка в больных растениях (рис. 2). Сортные особенности электрофореграмм обнаружены в корнях, а не в листьях. Белковый состав корней и листьев также отличен. Прежде всего бросается в глаза, что в листьях существует одна очень интенсивная медленно движущаяся зона, которая, очевидно, состоит из двух подзон.

При электрофоретическом разделении растительного экстракта выяснилось также, что белок пероксидазы не однороден, а может быть разделен на несколько компонентов. На характер энзимограмм различные

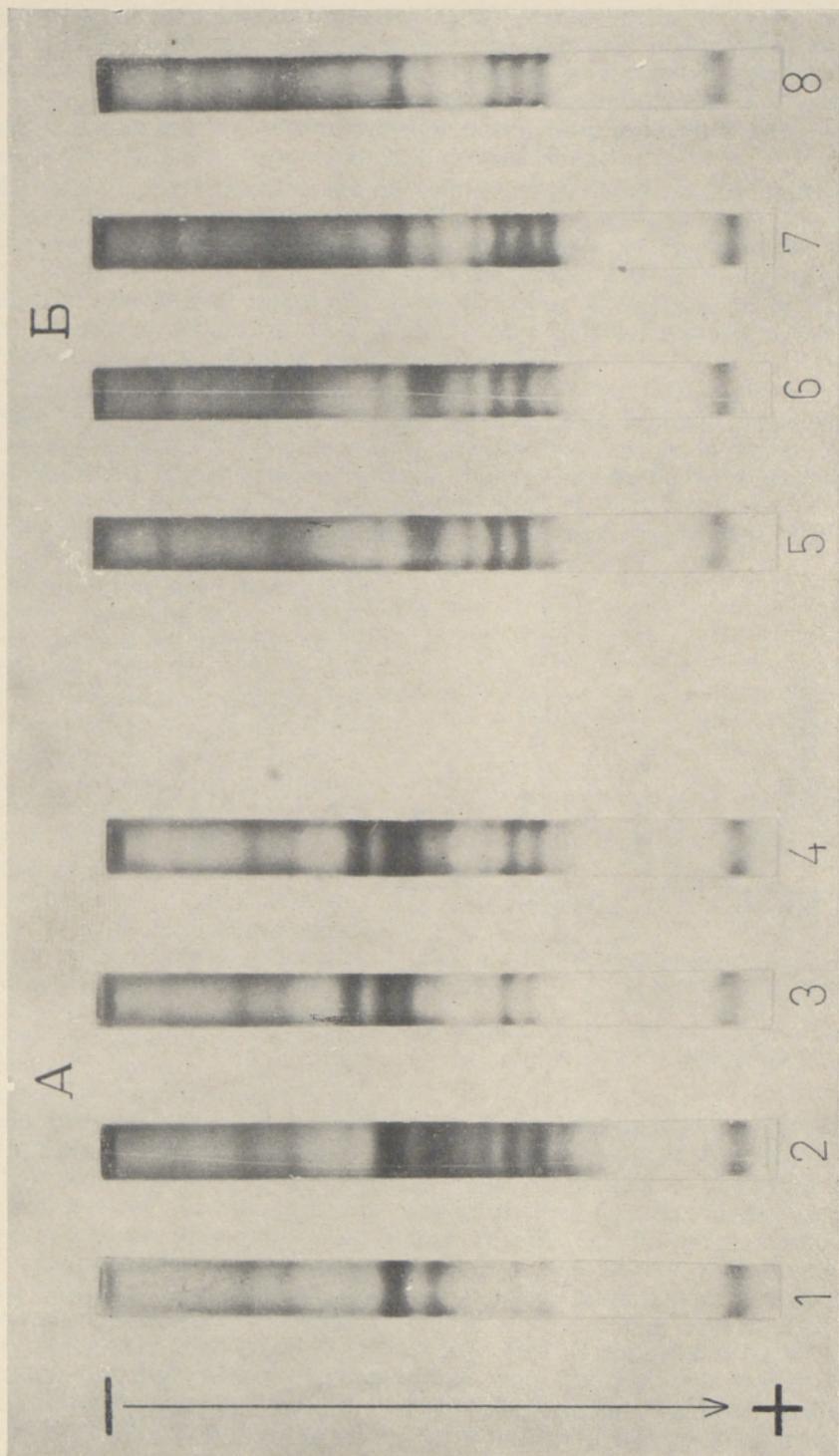


Рис. 3. Энзимогаммы картофельной пероксидазы.
 А — листья. Энзимогаммы: 1 и 5 — 'Спекула' незараженный, 2 и 6 — 'Спекула' зараженный, 3 и 7 — 'Сулев' незараженный, 4 и 8 — 'Сулев' зараженный.

способы приготовления гомогената (0,25 M сахарозы, буфер с защитными добавками) или использование ацетонового препарата влияния не оказали. Добавление при гомогенизации детергентов тритон X-100 (0,1%) и твин 80 (1%) также не повлияло на энзимограммы. Различные условия выращивания (искусственное освещение и дневной свет) на характере растворимой пероксидазы не отразились.

Оказалось, что энзимограммы пероксидазы показывают сортовую и тканевую специфику и состоят из 10—11 зон в корнях и из 12—14 зон в листьях (рис. 3). Зоны корневых энзимограмм можно условно разделить на быстро (1—5), средние (6—9) и медленно (10—11) мигрирующие. Наиболее активными являются средние зоны. Интересно отметить, что различия между энзимограммами различных сортов и тканей также определяются главным образом средними зонами.

Заражение картофеля картофельной нематодой вызывает количественные изменения в энзимограммах пероксидазы, причем характер этих изменений различен у разных по устойчивости сортов. Изменения, происходящие в растениях резистентного сорта, имеют более широкий диапазон — отмечается увеличение активности 3, 4, 5, 6, 7 и 8 зон. С уменьшением подвижности зон повышение активности изоэнзимов при заражении уменьшается (рис. 4 А).

В восприимчивых растениях сильно увеличивается активность третьей и четвертой зоны. Особенно бросается в глаза, что в то время, как средние зоны пероксидазы у резистентного сорта активируются (в среднем на 30—40%), у восприимчивого сорта 'Сулев' они почти не изменяются (рис. 4).

Очевидно, именно за счет изоэнзимов со средней электрофоретической подвижностью от 5 до 8 происходит у невосприимчивого сорта более сильное увеличение активности данного энзима по сравнению с восприимчивым сортом, в то время как на увеличение общей активности пероксидазы в корнях обоих сортов влияют и быстро и средние мигрирующие зоны. Многие исследователи (Staples, Stahmann, 1964; Рубин, Арциховская, 1968) считают, что устойчивость растений может коррелировать с их способностью изменять свой энзиматически активный белковый обмен. На основании наших данных можно предположить, что в активных защитных реакциях картофеля против картофельной нематоды существенную роль играют именно изоэнзимы пероксидазы средней электрофоретической подвижности. Из них особенно отчетливым является изменение изоэнзима 6 ($E_f=0,56$). Его активность в резистентных пораженных растениях увеличивается, при визуальном рассмотрении судя по интенсивности зон на электрофореграммах, сильнее, чем другие зоны. К сожалению, не оказалось возможным провести количественных измерений изменения активности этой зоны, так как у незараженных растений она так слаба, что сливается с зоной 7. В больных растениях восприимчивого сорта активность этой зоны либо не изменяется, либо увеличивается незначительно (рис. 4).

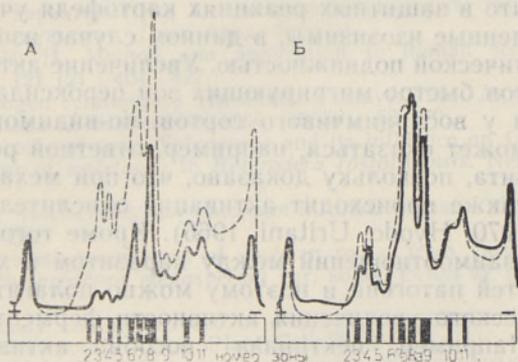


Рис. 4. Денситометрические кривые энзимограмм пероксидазы корней 26-дневных растений картофеля.

А — 'Спекула', Б — 'Сулев'; ——— незараженный, - - - - зараженный.

В листьях пораженных растений интенсивность энзимогрaмм пероксидазы в обоих сортах практически не изменяется (рис. 3).

На энзимогрaммах полифенолоксидазы после заражения не было обнаружено никаких изменений. Окончательных выводов делать пока нельзя, потому что при электрофорезе не происходило хорошего разделения белка этого фермента. В корнях молодых растений обоих сортов не было выявлено ни одной зоны полифенолоксидазы, только начало геля окрашивалось диффузно. В корнях более старых растений появилась одна малоподвижная нечеткая зона. В листьях обоих сортов существовали две зоны полифенолоксидазы. Использование для экстракции фермента боратного буфера (рН 10,0) и добавление к гелю тритон X-100 (0,1%) ничего не изменило.

Суммируя изложенный материал, надо отметить, что об изменениях изоэнзимного спектра пероксидазы под влиянием грибной и вирусной инфекции имеется много сообщений (Аксенова и др., 1971; Nienhaus, Hoogen, 1970) и, следовательно, обнаружение таких изменений в инфицированных картофельной нематодой растениях было вполне закономерным. Факт, что отклонения от нормы у различных сортов являются разнокачественными, свидетельствует о функционально различном действии отдельных изоэнзимов (Уилкинсон, 1968). Поэтому можно предположить, что в защитных реакциях картофеля участвуют не все, а только определенные изоэнзимы, в данном случае изоэнзимы со средней электрофоретической подвижностью. Увеличение активности одинаковых у обоих сортов быстро мигрирующих зон пероксидазы параллельно у резистентного и у восприимчивого сортов, по-видимому, не является специфичным и может оказаться, например, ответной реакцией на проникновение паразита, поскольку доказано, что при механическом повреждении растений также происходит активация окислительных ферментов (Lazar, Farkas, 1970; Hyodo, Uritani, 1966). Кроме того, общеизвестно, что характер взаимоотношений между паразитом и хозяином зависит и от особенностей патогена и поэтому можно полагать, что причиной более специфического увеличения активности фермента могут быть секреты нематод. Например, пектиназа способна активировать полифенолоксидазу и пероксидазу растений (Rudolph, Stahmann, 1964), а по данным Г. Гоффарта и А. Гейлинга (цит. по Sembdner, 1968), личинки из семейства *Heterodera* выделяют пектолитические ферменты.

Пока неясно, какие специфические функции выполняет пероксидаза и ее изоэнзимы в растениях при инвазии нематод, трудно сказать более конкретно и о ее значении в создании иммунитета. Поэтому остаются в силе и такие утверждения, в которых высказывается мысль, что увеличение активности пероксидазы и фенолаз не связано с защитными реакциями, а является следствием нарушения обмена веществ в инфицированных растениях (Grzelinska, 1970; Ho, Weaver, 1971). Однако сторонники теории, постулирующей важное значение оксидаз в иммунитете, могут ссылаться на факт, что пероксидаза может участвовать в гидроксигировании ароматического кольца, что ведет к синтезу фенольных соединений (Kawashima, Uritani, 1963; Рубин, Арциховская, 1968; Метлицкий, Озерецковская, 1968), а роль фенолов в устойчивости растений хорошо известна. В связи с устойчивостью картофеля к картофельной нематоде представляет интерес исследование Дж. Гибеля (Giebel, 1970), который установил, что для хороших растений картофельной нематоды характерно ингибирование разложения ИУК, что не наблюдается в резистентных сортах. Поскольку известно, что под действием пероксидазы ИУК может разложиться (Masł, 1970), то в этом и может заключаться значительное повышение активности пероксидазы у резистентного сорта. Таким

образом, возможно, что активация отдельных изоэнзимов пероксидазы, свойственная только устойчивому сорту, связана с тонкой регуляцией и определенной направленностью обмена веществ (Kawashima, Uritani, 1963). Во всяком случае наличие большого числа изоэнзимов пероксидазы говорит об ее разнообразном влиянии на метаболизм растительных клеток и о больших возможностях растений-хозяев адаптироваться к измененным условиям, возникающим в результате поражения тканей паразитом.

ЛИТЕРАТУРА

- Аксёнова В. А., Кожанова О. Н., Рубин Б. А., 1971. О некоторых свойствах пероксидазы инфицированных тканей растений. Физиол. растений 18 (8): 387—393.
- Ладыгина М. Е., Таймла Э. А., Рубин Б. А., 1970. Особенности изоэнзимного состава пероксидазы и полифенолоксидазы при вирусном патогенезе у табака. Физиол. растений 17 (5) : 928—936.
- Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л., 1968. Фитоиммунитет. М.
- Рубин Б. А., Арциховская Е. В., 1968. Биохимия и физиология иммунитета растений. М.
- Рубин Б. А., Иванова Т. М., Давыдова М. А., 1964. Синтез пероксидазы в зараженных тканях капусты как реакция иммунитета. Докл. АН СССР 158 (6) : 1447—1450.
- Уилкинсон Дж., 1968. Изоферменты. М.
- Хьюитт Э., 1960. Песчаные и водные культуры в изучении питания растений. М.
- Яаска В. Х., 1968. Биохимическая характеристика аденозинтрифосфатазных систем корней проростков пшеницы и кукурузы. Дисс. канд. биол. н.
- Davis B. I., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 (2) : 404—427.
- Flegg I. I. M., 1964. The plant-pathogen relationship (Blackmann-essay), 1964. Annual Report of the East Malling Research Station for 1964 (1965) : 62—70.
- Giebel J., 1970. Phenolic content in roots of some *Solanaceae* and its influence on IAA-oxidase activity as an indicator of resistance to *Heterodera rostochiensis*. Nematologica 16 (1) : 22—32.
- Grzelinska A., 1970. Peroxidase isoenzymes in *Fusarium*-infected tomato plants. Phytopath. Z. 69 (3) : 212—222.
- Ho H. H., Weaver E., 1970. Peroxidase isoenzymes of soybean roots from varieties resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Fyton 27 (2) : 163—167.
- Hyodo H., Uritani I., 1966. A study on the increase in o-diphenol oxidase activity during incubation of sliced sweet potato tissue. Plant Cell Physiol. 7 : 137—144.
- Jaaska Vilve, Jaaska Vello, 1969. Heterogeneity and tissue specificity of some enzymes in kidney bean. Eesti NSV TA Toimet., Biol. 18 (4) : 408—416.
- Johnson G., Schaal I. A., 1957. Accumulation of phenolic substances and ascorbic acid in potato tuber tissue upon injury and their possible role in disease resistance. Amer. Potato J. 34 (7) : 200—209.
- Kawashima N., Uritani J., 1963. Occurrence of peroxidases in sweet potato infected by the black rot fungus. Agric. Biol. Chem. 27 (6) : 409.
- Kühn H., 1958. Über die Abwehrreaktion eines Kartoffelbastards gegen den Kartoffelnematoden (*Heterodera rostochiensis* Wr. in *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (Juz. et Buk.) Hwk. × *Solanum tuberosum* L.). Zeitschrift für Pflanzenkrankh. und Pflanzenschutz 65 : 465—472.
- Lazar G., Farkas G. L., 1970. Patterns of enzyme changes during leaf senescence. Acta biol. Acad. sci. hung. 21 (4) : 389—396.
- Lee Shu-fung, Tournau D., 1958. Chlorogenic acid content and *Verticillium* resistance of potato toes. Phytopathology 48 : 268—274.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1) : 265—275.
- Mast van der, 1971. The influence of membrane-bound peroxidases on the degradation of IAA by the specific JAA degrading protein complexes in homogenates of pea roots. Acta bot. neer. 19 (5) : 727—736.
- Nienhaus F., Hoogen H., 1970. Stoffwechselfysiologische Veränderungen in der Pflanze nach Virusinfektion unter Einfluß von Wundreiz. 2. Enzymaktivitätsbestimmungen nach Acrylamidgelelektrophorese. Phytopathol. Z. 69 (1) : 38—48.
- Ponting J. D., Joslyn M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Arch. Biochem. 19 : 47—64.
- Rudolph K., 1971. Qualitative und quantitative Enzymveränderungen nach Infektion von Bohnenblättern mit *Pseudomonas phaseolicola* and *Uromyces phaseoli*. Angew. Bot. 44 (5—6) : 347—359.

- Rudolph R., Stahmann M. A., 1964. Interaction of peroxidases and catalases between *Phaseolus vulgaris* and *Pseudomonas phaseolicola* (Halo blight of bean). *Nature* 204 : 474.
- Sembdner G., 1968. Biochemische Aspekte der parasitären Wechselbeziehungen zwischen Nematoden (*Heterodera* A. Schmidt, 1871 and *Meloidogyne* Goeldi, 1897) und Pflanzengewebe. *Kulturpflanze* 16 : 173—187.
- Staples R. C., Stahmann M. A., 1964. Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology* 54 : 760.
- Tomiyama K., Stahmann M. A., 1964. Alteration of oxidative enzymes in potato tuber tissue by infection with *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 39 : 483.
- 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. *Phytopathology* 58 (1) : 115.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
21/III 1972

EVI HABERMAN

KARTULI KIDUSSIGA (*HETERODERA ROSTOCHIENSIS* WOLL.) NAKATUNUD KARTULI OKSÜDAASIDE AKTIIVSUS JA ISOENSÜÜMNE KOOSTIS

Resüme

Uuriti *Heterodera rostochiensis* Wollenweber rassi A suhtes resistentse kartulisordi «Spekula» ning sustseptiilse sordi «Sulev» juurte ning lehtede polüfenooloksüdaasi ja peroksüdaasi aktiivsuse muutusi nakatumisel kidussisiga. Mõlema ensüümi aktiivsus infitseeritud taimede juurtes suurenes tugevasti, keskmiselt 2—3-kordselt. Polüfenooloksüdaasi aktiivsus nende sortide nakatatud juurtes ei erinenud. Peroksüdaasi aktiivsus suurenes nakatumisel intensiivsemalt resistentsetes sordis. Oksüdaaside aktiivsuse tõusu põhjuseks on arvatavasti fermentatiivse valgu sünteesi intensiivistumine nakatatud taimedes. Polüakrüülamidgeelelektroforeesil selgus, et kartuli peroksüdaas ilmutab sordi- ja koespetsiifikat, koosneb 10—11 isoensüümi tsoonist juurtes ning 12—14 tsoonist lehtedes. Fermentiivse aktiivsusega aktiveerimisega resistentsete taimede juurtes on seotud keskmised isoensüümid 6, 7 ja 8. Arutatakse peroksüdaasi osa kartuli resistentuses kartuli kidussi suhtes.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saabunud
21. III 1972

EVI HABERMAN

ERFORSCHUNG DER AKTIVITÄT UND DES ISOENZYMISCHEN BESTANDES DER OXYDATIONSENZYME IN DER VOM KARTOFFELNEMATODEN (*HETERODERA ROSTOCHIENSIS* WOLL.) BEFALLENEN KARTOFFEL

Zusammenfassung

Es wurden die Veränderungen der Aktivität der Polyphenoloxydase und Peroxydase in den Wurzeln und Blättern der Kartoffelsorten 'Spekula' und 'Sulev' bei ihrem Befall durch den Kartoffelnematoden untersucht. In Bezug auf *Heterodera rostochiensis* Wollenweber (die Population enthielt nur die Rasse A) ist die Kartoffelsorte 'Spekula' resistent, die Kartoffelsorte 'Sulev' aber anfällig.

Die Aktivität der beiden Enzyme in den befallenen Wurzeln nahm stark zu, im Durchschnitt 2- bis 3mal. Die Aktivität der Polyphenoloxydase sowohl in den gesunden als auch in den befallenen Wurzeln wies keinen Sortenunterschied auf. Die Aktivität der Peroxydase steigerte sich mehr intensiv in der resistenten Sorte. Die Ursache der Aktivitätssteigerung der Oxydase liegt vermutlich in der Intensivierung der Synthese des fermentativen Eiweißes.

Bei der Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese hat sich herausgestellt, daß die Kartoffelperoxydase ein Organ- und Gewebespezifikum hat und aus 10—11 Zonen in den Wurzeln und 12—14 Zonen in den Blättern besteht. Mit der intensiveren Aktivierung dieses Enzyms in den Wurzeln der resistenten Pflanzen sind die mittleren Isoenzyme 6, 7, 8 verbunden. Es wird die Bedeutung der Peroxydase in der Resistenz der Kartoffel gegen den Kartoffelnematoden diskutiert.

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

Eigegangen
am 21. März 1972