

## SKŁAD IZOENZYMOWY PEROKSYDAZY I KWAŚNEJ FOSFATAZY W PĘDACH MALINY ZDROWYCH I PORAŻONYCH PRZEZ *DIDYMELLA APPLANATA* (NIESSL.) SACC.

Zenon Krzywański, Andrzej Stroiński, Monika Czech

Akademia Rolnicza w Poznaniu

Choroba zwana zamieraniem pędów malin, której głównym sprawcą jest grzyb *Didymella applanata*, powoduje coraz większe straty na plantacjach tej rośliny. Poszczególne odmiany uprawne maliny różnią się podatnością na wspomnianego grzyba [3, 7, 8], jednakże przyczyny tych różnic nie są znane. Badania zmierzające do znalezienia zależności między cechami budowy morfologicznej pędów a ich odpornością nie dały jednoznacznych wyników [4]. Wydaje się, że problem jest bardziej złożony i wymaga zwrócenia uwagi na zmiany w metabolizmie rośliny-gospodarza zaindukowane przez patogena oraz na ewentualny związek między tymi zmianami a reakcjami obronnymi gospodarza. W odniesieniu do kompleksu malina — *D. applanata* brak całkowicie literatury na ten temat. Stąd, w Zespole Naukowo-Dydaktycznym Fizjologii Roślin AR w Poznaniu podjęto badania zmierzające do poznania fizjologicznych przyczyn owych różnic w stopniu podatności na wspomnianego patogena.

Referowane wyniki dotyczą fragmentu badań enzymatycznych, głównie peroksydazy, oraz wstępnie kwaśnej fosfatazy, w zdrowych i porażonych pędach dwóch odmian uprawnych różniących się w warunkach polowych stopniem podatności na wspomnianego patogena (odmiana Malling Promise — podatna, odmiana Latham — względnie odporna).

### MATERIAŁ I METODYKA

Analizowano pędy zdrowe oraz pędy z objawami chorobowymi, a w przypadku peroksydazy także fragmenty pędów graniczące z plamami wywołanymi przez patogena, ale bez widocznych objawów. Materiał roślinny pochodził z założonego w Gospodarstwie Doświadczalnym Przybroda doświadczenia polowego — nawozowego, Instytutu Produkcji Ogrodni-

czej AR w Poznaniu. Badano materiał roślinny pochodzący z dwóch kombinacji nawozowych różniących się stopniem porażenia przez *D. appplanata*. Były to kombinacje: A — bez nawożenia mineralnego, B — nawożenie NPK w ilości: N — 100, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> — 75, K<sub>2</sub>O — 125 kg/ha (N w dwóch dawkach, wiosną i po kwitnieniu). Rośliny z kombinacji, w której stosowano nawożenie mineralne, charakteryzowało większe porażenie, co było szczególnie widoczne u odmiany Latham [9].

Z pędów pozbawionych liści zdejmowano warstwę zewnętrzną, aż do miazgi, materiał ten zamrażano w suchym lodzie i rozdrobniono, a następnie przemywano trzykrotnie zimnym acetonem (3 × po 50 ml na 5 g tkanki). W ten sposób otrzymywano z materiału roślinnego proszki acetonowe, z których sporządzano ekstrakty do oznaczeń enzymatycznych. Tak samo postępowano w celu uzyskania proszku acetonowego z grzybni *D. appplanata* wyrosłej na płynnej pożywce ziemniaczano-glukozowej.

**Sumaryczna aktywność peroksydazy.** 10 mg proszku zalewano 8 ml 0,01 M buforu fosforanowego o pH 6,3. Po godzinie wyciąg sączono i oznaczano w nim aktywność metodą Bojarkina [1].

**Skład izoenzymowy peroksydazy.** 100 mg proszku zalewano 5 ml 0,01 M buforu fosforanowego o pH 6,3, zawierającego 20% sacharozy 0,1% kwasu askorbinowego i 0,1% cysteiny. Całość rozcierano cztery razy po 3 minuty w odstępach 15 minutowych, w szklanym homogenizatorze, a następnie wirowano przy 30 000 × g przez 30 minut. Supernatant używano do dalszych badań. Skład izoenzymowy wyciągu badano techniką elektroforezy dyskowej w żelu poliakrylamidowym, według Davisa [2] w buforze Tris-glicynowym o pH 9,0. Stosowano 20 μg białka na żel. Enzymatycznie aktywne prążki identyfikowano przez zanurzenie żelów na 30 minut w nasyconym roztworze benzydyny i następnie na 1,5 minuty w 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Intensywność barwy prążków oznaczano na densytometrze, przy 576 nm.

**Skład izoenzymowy kwaśnej fosfatazy** oznaczano w wyciągu uzyskanym przez ekstrakcję 30 mg proszku za pomocą 1 ml 0,1 M buforu Tris-HCl o pH 8,0, zawierającego wymienione dodatki, w sposób podany wyżej. Po godzinie całość wirowano przy 14 000 × g przez 10 minut. Rozdziału dokonywano techniką elektroforezy dyskowej w żelu poliakrylamidowym. Stosowano 200 μg białka na żel. Aktywne enzymatycznie prążki identyfikowano przez umieszczenie przemytego uprzednio przez 30 minut 1 M buforem octanowym o pH 5,0 żelu na 1 godzinę w 0,2 M buforze octanowym o pH 5,0, zawierającym alfa naftylofosforan sodowy (1 mg/ml) oraz błękit trwały B (1 mg/ml). Inkubację przeprowadzono w temperaturze 35-37°C w ciemności.

**Zawartość białka** w wyciągach oznaczano metodą Lowry'ego

i in. [6]. Wszystkie operacje związane z ekstrakcją i wirowaniem odbywały się w temperaturze około 4°C.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W pierwszym etapie badań zauważono wyraźne różnice w sumarycznej aktywności peroksydazy w tkankach porażonych w porównaniu ze zdrowymi (tab. 1). Pod wpływem porażenia nastąpił bardzo wyraźny

Tabela 1

Względna aktywność peroksydazy w zdrowych i porażonych przez *Didymella applanata* pędach dwóch odmian maliny (aktywność na 100 mg białka; średnie z 3 powtórzeń)

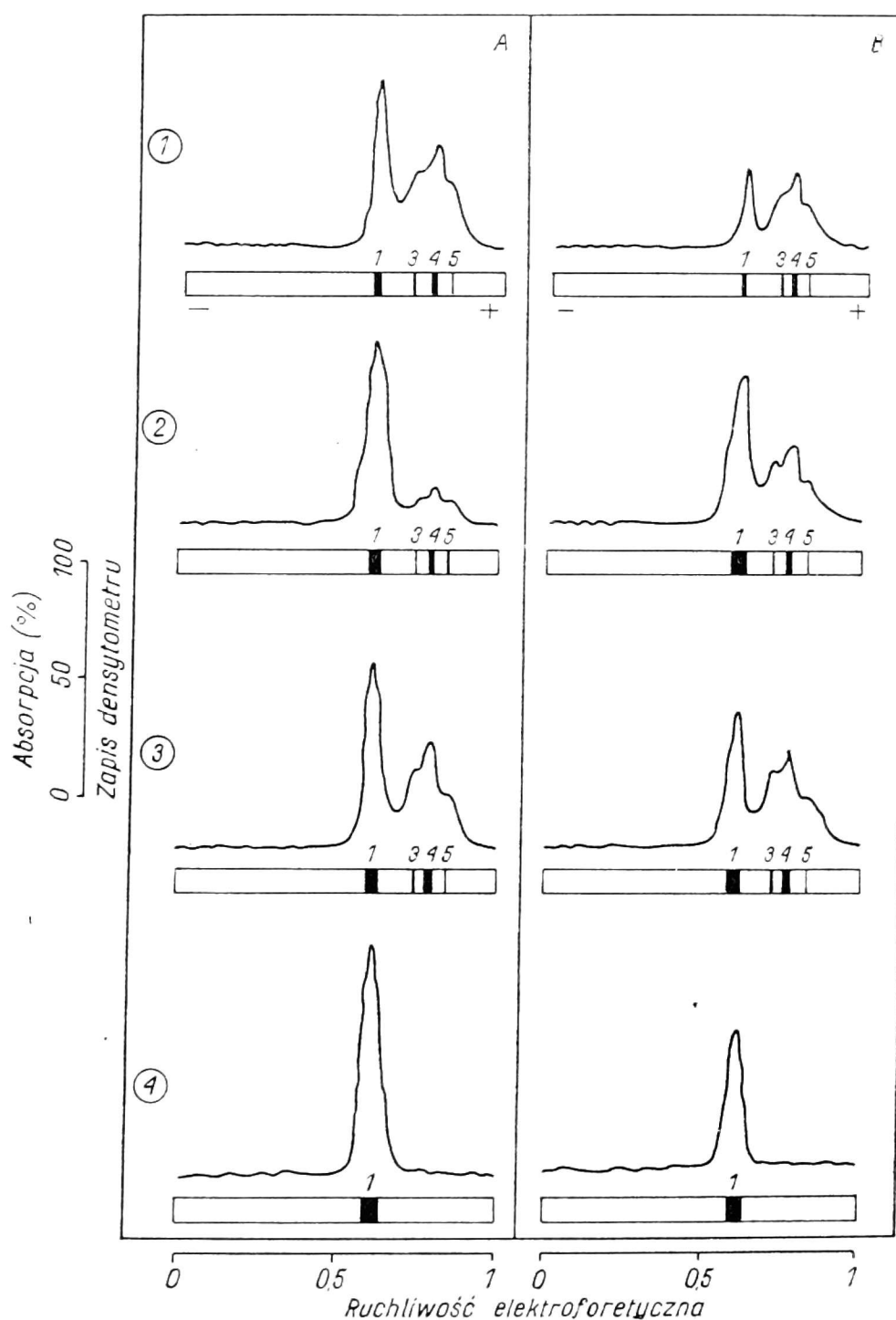
Kombinacja	Poziom nawożenia	Odmiana	
		<i>M. Promise</i>	Latham
1 a			
Zdrowe	A	1,52	2,15
	B	1,54	2,61
Porażone	A	9,43	48,80
	B	8,37	34,96
1 b			
Zdrowe	A	1,71	2,15
	B	1,68	2,61
Porażone wokół plam	A	2,44	7,83
	B	3,08	7,33
Plamy	A	10,29	43,93
	B	6,34	37,60

wzrost aktywności, dochodzący u odmiany podatnej do 600% w stosunku do kontroli (zdrowe), a u odmiany względnie odpornej aż do 2300%. Ta zwyżka aktywności była mniejsza u roślin z kombinacji nawożonej mineralnie, co było szczególnie widoczne u odmiany Latham. Omawiany wzrost aktywności był właściwy nie tylko tkankom z widocznymi objawami, ale i tkankom przyległym do nich, bez tych objawów.

Wzrost aktywności peroksydazy pod wpływem infekcji, dla innych anizeli malina i *D. applanata* układów roślina-gospodarz i patogen grzybowy, jest znany w piśmiennictwie [5, 11, 13, 15]. Bezpośredni związek między wspomnianą zwyżką aktywności tego enzymu a odpornością nie został jednak dotąd w pełni wyjaśniony. Ponieważ enzym peroksydaza odgrywa ważną rolę w przemianach związków fenolowych, zaś produkty

jego działania wpływają przypuszczalnie na zmianę aktywności innych enzymów oraz na biosyntezę białka i rybosomów [14], rola jego w reakcjach obronnych jest bardzo prawdopodobna.

Zaobserwowane różnice skłoniły nas do zbadania składu izoenzymowego peroksydazy. Poznanie tego składu w pędach zdrowych dwóch zróżnicowanych pod względem odporności odmian oraz poznanie ewentualnych zmian w tym składzie w następstwie infekcji i rozwoju choroby wydaje się nam bardzo interesujące, gdyż zmiany w składzie izoenzymowym enzymów wieloskładnikowych oraz zmiany aktywności poszczegól-



Rys. 1. Elektroforogramy peroksydazy zawartej w wyciągu z pędów odmiany Malting Promise; A — kombinacja bez nawożenia mineralnego, B — kombinacja z nawożeniem mineralnym (NPK), 1 — tkanki zdrowe, 2 — tkanki porażone, 3 — tkanki wokół plamy infekcyjnej, 4 — tkanki objęte plamą infekcyjną

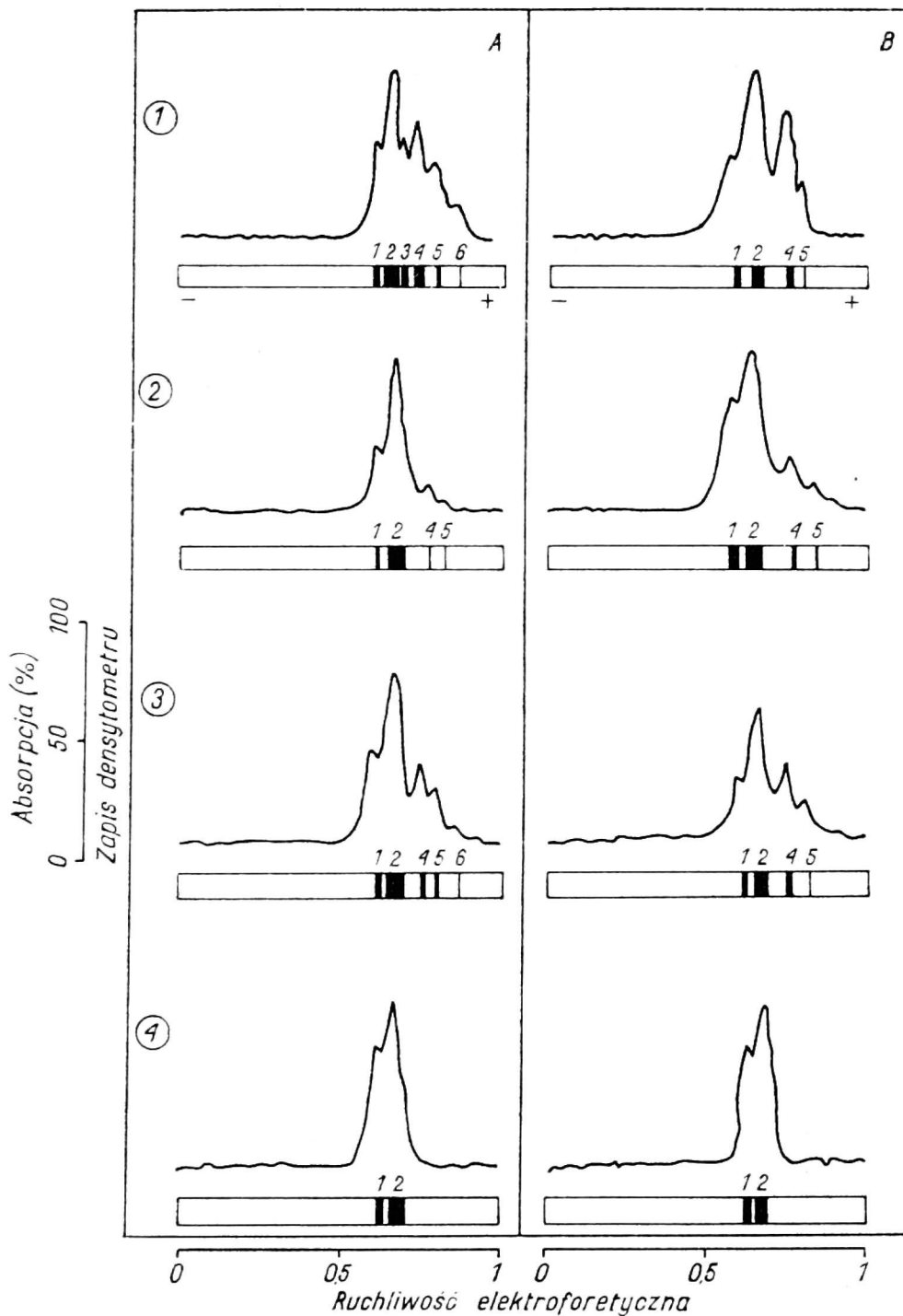
nych izoenzymów można traktować jako objawy chorobowe na poziomie molekularnym [10]. Można przy tym przyjąć, że zmiany te stanowią podstawę dla zmienionego metabolizmu porażonej rośliny, co z kolei może u form odpornych prowadzić do osłabienia rozwoju choroby. Poza tym interakcja pomiędzy podjednostkami enzymów obydwu partnerów (roślina - gospodarz i patogen) może być jednym z czynników odpowiedzialnych za specyficzność tego układu.

Ryciny 1 i 2 obrazują skład izoenzymowy peroksydazy obydwu badanych odmian, w pędach zdrowych i porażonych. Warto zwrócić najpierw uwagę na różnice ilościowe i jakościowe w zymogramach omawianego enzymu w tkankach zdrowych. Odmiana względnie odporna (Latham) posiadała sześć pasm [1-6] natomiast odmiana podatna (*M. Promise*), cztery pasma [1-5]. Pasma 2 i 6 były specyficzne tylko dla odmiany Latham, przy czym pasmo nr 2 pochodziło od izoenzymu, który dominował pod względem ilościowym w porównaniu z pozostałymi. Różna ilość składników mineralnych w glebie pociągnęła za sobą zmiany w składzie izoenzymów, ale tylko u odmiany Latham, gdzie w kombinacji z nawożeniem brak było dwóch pasm (nr 3 i 6). Czy te preinfekcyjne różnice międzyodmianowe w składzie izoperoksydaz rzutują w jakiś sposób na poziom odporności, trudno orzec bez dalszych badań obejmujących większą liczbę odmian, o zróżnicowanej podatności na *D. applanata*.

W następstwie infekcji, wraz z postępującym rozwojem choroby, liczba izoenzymów uległa zmniejszeniu, u odmiany względnie odpornej z sześciu, względnie czterech, do dwóch, a u odmiany podatnej, z czterech do jednego. Jednakże aktywność pozostałych uległa zwiększeniu, co uwiadcza się w szerszych i ciemniej zabarwionych pasmach. Różnic w składzie ilościowym między kombinacjami nawozowymi w porażonych pędach nie stwierdzono. Wydaje się jednak, iż wzrost aktywności pozostałych izoenzymów był nieco niższy w kombinacji z nawożeniem mineralnym.

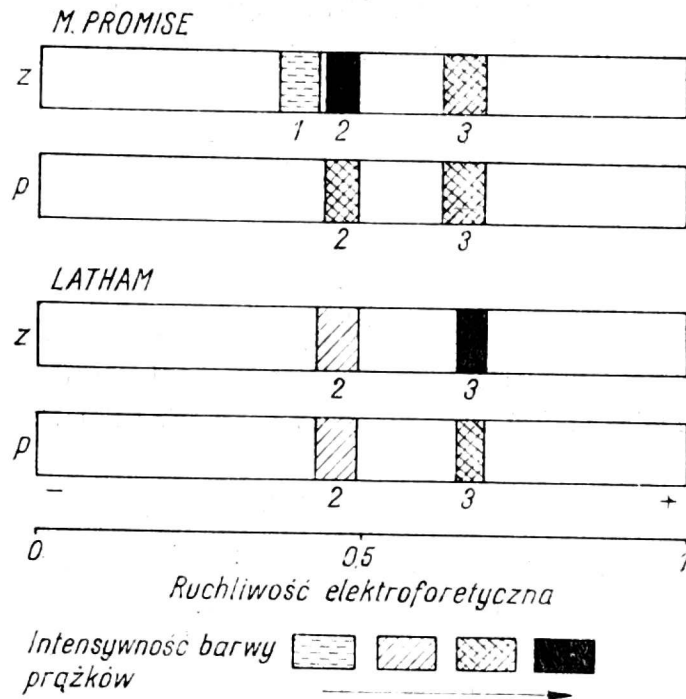
Przeprowadzono również próby określenia składu izoenzymowego peroksydazy w wyciągu z proszku acetonowego z grzybni *D. applanata*. Mimo 10-krotnie większej ilości białka na żel (200  $\mu$ g) i przedłużonego do 15 minut czasu inkubacji w  $H_2O_2$ , wykryto tylko jedno pasmo, o prawie zerowej ruchliwości elektroforetycznej. Świadczy to dodatkowo o tym, iż wykryte izoenzymy peroksydazy w pędach są pochodzenia rośliny - gospodarza.

Uzyskane wyniki dotyczące zmian składu izoenzymowego peroksydazy były dość nieoczekiwane, gdyż na ogół notuje się wzrost liczby izoenzymów tego enzymu w następstwie infekcji [10, 12]. Tym niemniej zaobserwowane w tej pracy zmiany oraz różna reakcja badanych odmian, wydają się interesujące i prowokują do dalszych badań w tym kierunku.



Rys. 2. Elektroforogramy peroksydazy zawartej w wyciągu z pędów odmiany Latham; Objasnienia jak do rys. 1

Rycina 3 obrazuje skład izoenzymowy kwaśnej fosfatazy, enzymu, który ze względu na małą specyficzność wobec substratu, może odgrywać dość wszechstronną rolę w metabolizmie fosforu. Skład ten w tkankach zdrowych badanych odmian był zbliżony (odmiana *M. Promise* — 3 pasma, odmiana Latham — 2), chociaż intensywność dwóch głównych pasm była różna. Pod wpływem porażenia liczba izoenzymów wspomnianego enzymu zmniejszyła się u odmiany *M. Promise* do dwóch, zaś u odmiany Latham pozostała bez zmian. Zmniejszyła się także intensywność barwy pasm, a tym samym i aktywność poszczególnych izoenzymów i to w sposób różny w każdej z badanych odmian.



Rys. 3. Elektroforogramy kwaśnej fosfatazy zawartej w wyciągu z pędów zdrowych (z) i porażonych (p) dwóch odmian maliny

Stwierdzone w niniejszej pracy zmiany w aktywności i składzie izoenzymów badanych dwóch enzymów, wykazujące przy tym pewne różnicowanie pomiędzy badanymi odmianami, świadczą niewątpliwie o tym, że „odpowiedź” rośliny - gospodarza na infekcję ma charakter metaboliczny. Rzeczą dalszych badań będzie wyjaśnienie, w jakim stopniu zaobserwowane zmiany pozostają w przyczynowym związku z poziomem odporności tych odmian maliny na *D. applanata*.

#### LITERATURA

1. Bojarkin A. W.: 1954, *Biochimija*, 16.
2. Davis B. J.: 1964, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 28
3. Gertych Z., Oleksiak W., Kostrzewa Z.: 1959, *Prace Inst. Sad.*, 4
4. Jennings D. L.: 1962, *Hort. Res.*, 1.
5. Krzywański Z.: 1968, *Prace Kom. Nauk. Roln. i Kom. Nauk Leśn. PTPN*, 24.
6. Lowry O. M., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.: 1951, *J. Biol. Chem.*, 193.
7. Pieniążek S. A., Oleksiak W., Wojtkiewicz W.: 1959, *Prace Inst. Sad.*, 4.
8. Rebandel Z.: 1968, *Prace Kom. Nauk Rol. i Kom. Nauk Leśn. PTPN*, 24.
9. Rebandel Z., Hołubowicz T.: 1974, *Co nowego w sadownictwie?*, 1, (41).
10. Reedy M. N., Stahmann M. A.: 1972, *Phytopath. Z.*, 74.
11. Rubin B. A., Arcichowska E. W.: 1971, *Biochemia i fizjologia odporności roślin*, PWRiL, Warszawa.
12. Sako N., Stahmann M. A.: 1972, *Physiol. Plant Pathol.*, 2.
13. Stahmann M. A., 1967, W: *The dynamic role of molecular constituents in plant parasite interaction*. Amer. Phytopath. Soc., St. Paul.

14. Stahmann M. A., Demorest D. M.: 1972, Symp. Biol. Hung., 13  
 15. Tomiyama K., Stahmann M. A.: 1964, Plant Physiol., 39.

*Zenon Krzywański, Andrzej Stroiński, Monika Czech*

ИЗОЭНЗИМНЫЙ СОСТАВ ПЕРОКСИДАЗЫ И КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ  
 В ПОБЕГАХ МАЛИНЫ ЗДОРОВЫХ И ПОРАЖЕННЫХ  
*DIDYMELLA APPLANATA* (NISSL.) SACC.

Резюме

Исследовали суммарную активность пероксидазы (РО) и изоэнзимный состав РО и кислой фосфатазы (КФ) в годовых побегах двух культурных сортов малины различающихся друг от друга степенью восприимчивости к *Didymella applanata* (Латам — сравнительно устойчивый, Маллинг Промиз — восприимчивый сорт). Изоэнзимный состав исследовали с помощью техники дискового электрофореза в полиакриламидном желе.

Установлены количественные и качественные различия в изоэнзимном составе РО в здоровых побегах исследуемых сортов. У сорта Латам установлено наличие шести изоэнзимов (1, 2, 3, 4, 5 и 6), из которых два (2 и 6) характерны для данного сорта, а у сорта М. Промиз — четыре изоэнзима (1, 3, 4 и 5).

В результате поражения и развития болезни установлен значительный рост суммарной активности РО, особенно характерный для сорта Латам. Количество же изоэнзимов уменьшилось у сорта Латам до двух, а у сорта М. Промиз до одного, причем одновременно было обнаружено повышение интенсивности остальных линий спектра.

Изоэнзимный состав КФ был следующий: в здоровых побегах сорта М. Промиз установлено три линии спектра (1, 2, 3), а у сорта Латам — две (2, 3). Под влиянием инфекции этот состав не подвергался более значительным изменениям, а изменялась различным образом для обоих исследуемых сортов интенсивность цвета некоторых линий спектра.

*Zenon Krzywański, Andrzej Stroiński,  
 Monika Czech*

ISOENZYME PATTERN OF PEROXIDASE AND ACID PHOSPHATASE  
 IN RASPBERRY CANES, HEALTHY AND INFESTED WITH  
*DIDYMELLA APPLANATA* (NISSL.) SACC.

Summary

Total activity of peroxidase (PO) and isoenzyme pattern of PO and acid phosphatase (KF) in annual canes of two cultivated raspberry varieties differing with the susceptibility degree to *Didymella applanata* (Latham — relatively resistant, Malling Promise — susceptible) was tested. The isoenzyme pattern was determined by the technique of disc electrophoresis in polyacrylamide gel.

Quantitative and qualitative differences in the isoenzyme pattern of PO in



healthy canes of the varieties investigated have been proved. In the Latham variety the occurrence of six isoenzymes (1, 2, 3, 4, 5, 6), two of which were characteristic for this variety, in the *M. Promise* variety — the occurrence of four enzymes (1, 3, 4, 5) have been detected.

In consequence of the infestation and development of the disease a considerable increase of total activity of PO, particularly characteristic for the Latham variety, has been proved. The number of enzymes, instead decreased in the Latham variety to two and in the *M. Promise* variety to one, at which a simultaneous increase of intensity of these remaining bands took place.

The isoenzyme pattern of KF was as follows: in healthy canes of the *M. Promise* variety three bands (1, 2, 3) and in the Latham variety two bands (2, 3) have been noticed. Under influence of the infection the above pattern did not undergo any distinct changes, while the colour intensity of some bands changed in different way in both varieties tested.