

BIOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA TKANEK MARCHWI PORAŻONEJ PRZEZ MĄTWIKĄ PÓŁNOCNEGO

Krystyna M. Janas

Uniwersytet w Łodzi

W wyniku żerowania larw nicieni z rodzaju *Meloidogyne* na korzeniach porażonych roślin tworzą się galasowate wyrośla o różnej wielkości, uzależnionej od gatunku rośliny. W tkankach roślin porażonych wzrasta poziom wolnych aminokwasów, kwasów organicznych, białek, RNA i DNA [1, 17, 18]. Zmienia się aktywność takich enzymów, jak peroksydaza, amoniakoliza, fenyloalanina, rybonukleaza [5, 8, 10]. W tkankach porażonych przez nicienie wzrasta poziom substancji wzrostowych, zwłaszcza auksyn. Viglierchio i Yu [19] wykazali, że w wierzchołkach łodyg lucerny, których wzrost został zahamowany w wyniku porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* obniża się zawartość auksyn oraz silnie wzrasta aktywność IAA-oksydazy. Nicień zdaniem autorów, wytwarza substancję aktywującą IAA-oksydazę, co prowadzi do przyspieszonego rozpadu endogennych auksyn i zahamowania wzrostu rośliny.

Celem badań było scharakteryzowanie zmian biochemicznych zachodzących w korzeniach marchwi w odpowiedzi na porażenie przez *M. hapla*.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń używano marchwi (*Daucus corota* L.) dwu odmian: Perfekcja (wrażliwa na mątwikę) i Slendero (odporna na mątwikę). Tkanki sterylizowano powierzchniowo 0,1% roztworem chloretonu (1,1,1-trójchloro-*tert*-butanol). Inhibitory IAA-oksydazy ekstrahowano 0,2 M buforem Na-fosforanowym, pH 6,1 [13], po odwirowaniu gotowano przez 2 minuty, oziębiano i osad odwirowywano. Supernatant używano do oznaczenia aktywności inhibitorowej, w odniesieniu do standardowej IAA-oksydazy, wyekstrahowanej z siewek ogórka. Miara aktywności endogen-

nych inhibitorów IAA-oksydazy była długość indukowanej lag-fazy, w minutach, poprzedzającej moment inicjacji utleniania IAA [13].

Aktywność amoniakolizy fenyloalaniny (PAL) oznaczano w proszku acetonowym, sporządzonym z roślin indukowanych z L-fenyloalaniną (5 mM), metodą Zuckera [21]. Aktywność RNazy oznaczano w świeżej tkance [14].

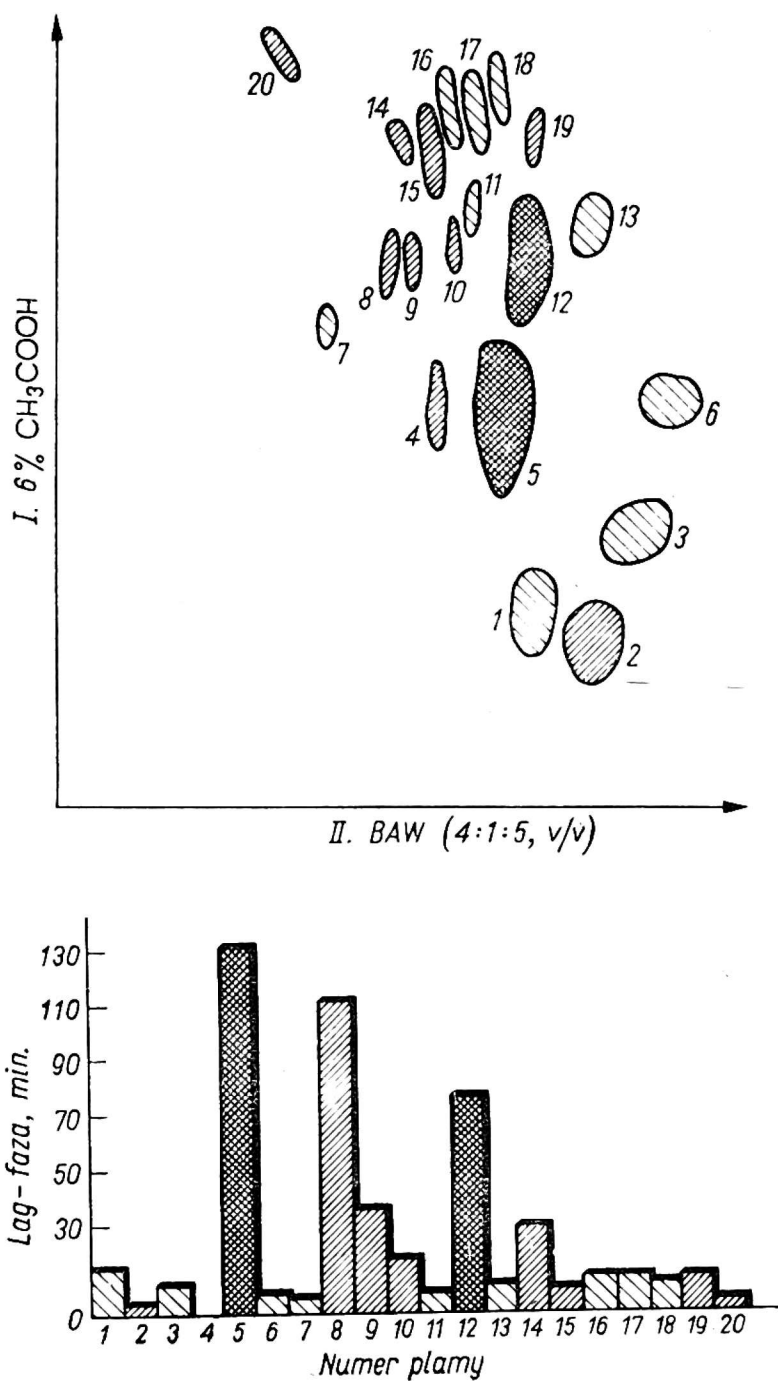
Związki fenolowe ekstrahowano na gorąco 80% etanolem [13]. Ekstrakt fenoli zagęszczano prawie do sucha, rozpuszczano w 50% metanolu i наносono na płytki szklane pokryte celulozą MN 300 G (0,3 mm). Chromatogramy rozwijano w pierwszym kierunku w roztworze 6% CH₃COOH (I), a następnie w drugim kierunku w fazie organicznej mieszaniny *n*-butanol: CH₃COOH:H₂O (4:1:5, v/v/v, BAW). W celu oznaczenia aktywności inhibitorowej w odniesieniu do IAA-oksydazy plamy wykryte w UV zeszkrobywano z chromatogramów i eluowano w 30% metanolu; 0,3 ml eluatu dodawano do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej standardową IAA-oksydazę. Analizowano włącznie ¹⁴C prekursorów do kwasów nukleinowych i białek [4].

Kwasy nukleinowe z tkanek kalusów soi zdrowej i porażonej przez *A. buetschlii* ekstrahowano metodą Cherry'ego i wsp. [3]. Tkanki kalusowe soi inkubowano przez 3 godz. w roztworze zawierającym [2-¹⁴C]-uracyl. Roztwory kwasów nukleinowych do nałożenia na kolumnę MAK rozcieńczono do 40 ml 0,05 M buforem fosforanowym pH 6,7 z dodatkiem 0,1 M NaCl. Na kolumnę наносono po 50 jednostek A₂₆₀ nm. Kolumny MAK sporządzano według Mandella i Hersheya [16]. Kwasy nukleinowe eluowano z kolumny semi-logarytmicznym gradientem NaCl (0,2 M NaCl zabuforowany 200 ml do 1,5 M NaCl zabuforowany 600 ml). Zbierano 5 ml frakcje. Radioaktywność w poszczególnych frakcjach oznaczano w spektrometrze do oznaczeń radioaktywności w płynnych scyntylatorach typ LKB-Wallak. W tym celu do fiolek dodawano po 9 ml mieszaniny „Tritosol” i 1 ml eluatu z kolumny [7]. Wyjściową hodowlę kalusów soi, wyizolowaną z liścieni hodowano według metody Millera [15] w temperaturze 25°C i słabym oświetleniu. Do zakażeń tkanek kalusowych soi używano sterylnych larw wolno żyjącego nicienia *A. buetschlii* [11].

WYNIKI

POLIFENOLE

Pod wpływem *M. hapla* w tkankach marchwi występuje więcej fenoli ogólnych i kwasu chlorogenowego, w porównaniu z tkankami roślin zdrowych. Najwięcej fenoli i kwasu chlorogenowego gromadzi się w wy-



Ryc. 1. Aktywność fenoli jako inhibitorów IAA-oksydazy wykrytych w ekstraktach z wyrosli znajdujących się na korzeniu zapasowym marchwi odm. Perfekcja porażonej przez *M. hapla*; górna część rysunku — dwukierunkowy chromatogram fenoli, dolna część rysunku — aktywność plam jako inhibitorów IAA-oksydazy; plamy zakreskowane — *orto*-dwuhydroksyfenole; plamy zakratkowane — kwasy chlorogenowe. Fenole ekstrahowano 80% etanolem z wyrosli 5-miesięcznej marchwi odm. Perfekcja. Na płytki pokryte Celulozą MN 300 G nakraplano ekwiwalent 133 mg świeżej masy. Plamy wykryte w UV zeszkrobywano i przenoszono do kolbek zawierających 9,5 ml mieszaniny inkubacyjnej dla IAA-oksydazy. Reakcję rozpoczynano dodając 0,5 ml standardowego roztworu IAA-oksydazy z ogórka

roślach [13]. Dzięki zastosowaniu TLC dwukierunkowej stwierdzono występowanie w wyrosłach 20 plam związków fenolowych (ryc. 1).

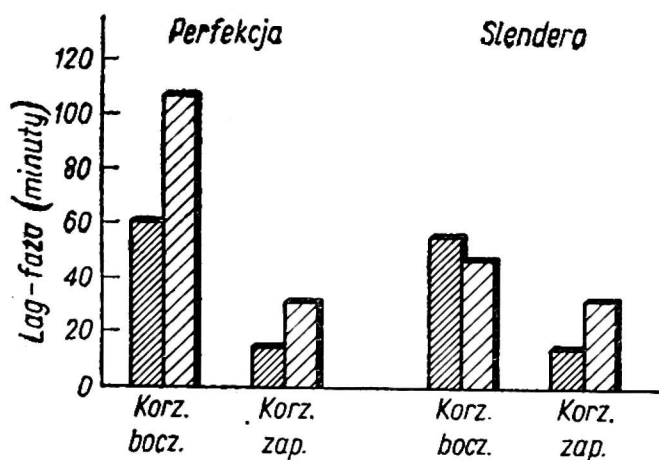
Wszystkie plamy wykryte na chromatogramach ekstraktów wyrosli

hamują aktywność IAA-oksydazy (ryc. 1). Najbardziej aktywne jako inhibitory IAA-oksydazy okazały się plamy nr 5 i 12, tzn. kwas chlorogenowy i kwas *izo*-chlorogenowy oraz plamy nr 8 i 9, odpowiadające plamie 9' na chromatogramach jednokierunkowych [11]. Są to *orto*-dwohydroksyfenole występujące w ilościach znacznie mniejszych niż kwasy chlorogenowe. Związki te nie występują w tkankach roślin zdrowych [11].

Wydaje się, że przedłużenie lag-fazy w tkankach marchwi porażonej przez *M. hapla* jest spowodowane występowaniem różnych związków fenolowych, zwłaszcza takich jak plamy nr 8 i 9.

AKTYWNOŚĆ INHIBITORÓW IAA-OKSYDAZY *IN VITRO*

Jeżeli analizuje się młode tkanki 2-miesięcznej marchwi wówczas stwierdza się, że w korzeniach bocznych odmiany Perfekcja porażonych przez *M. hapla* aktywność inhibitorów IAA-oksydazy jest dwa razy większa niż w roślinach zdrowych. U odpornej odmiany Slendero w tkankach zdrowych aktywność inhibitorów IAA-oksydazy jest podobna jak w tkankach porażonych (ryc. 2).



Ryc. 2. Aktywność inhibitorów IAA-oksydazy *in vitro* w korzeniach 2-miesięcznej marchwi zdrowej (słupki zakreskowane gęsto) i porażonej przez *M. hapla* (słupki zakreskowane rzadziej)

Można przypuszczać, że wzrost wyrosli i odporność marchwi na mątwika północnego może być uwarunkowana akumulacją inhibitorów IAA-oksydazy, zwłaszcza we wczesnych fazach porażenia.

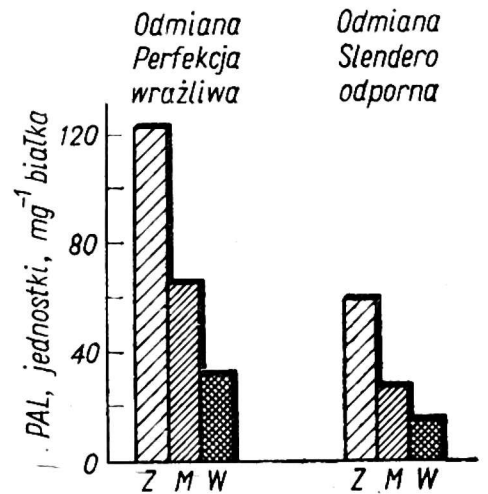
AKTYWNOŚĆ PAL I RNazy

Korzenie boczne 4-miesięcznej marchwi zdrowej odmiany Perfekcja posiadają około 2,5-krotnie wyższą aktywność PAL niż analogiczna tkanka odmiany Slendero (ryc. 3). Pod wpływem porażenia następuje spadek aktywności enzymu o około 50% w korzeniach bocznych obu odmian (ryc. 3). Można przypuszczać, że zahamowanie aktywności PAL w miejs-

cach infekcji ma bezpośredni związek z pobudzoną proliferacją tkanek, tj. powstaniem wyrosli. Aktywność RNazy w korzeniach bocznych marchwi odmiany Slendero jest dwukrotnie większa niż w analogicznej tkance odmiany Perfekcja (ryc. 4).

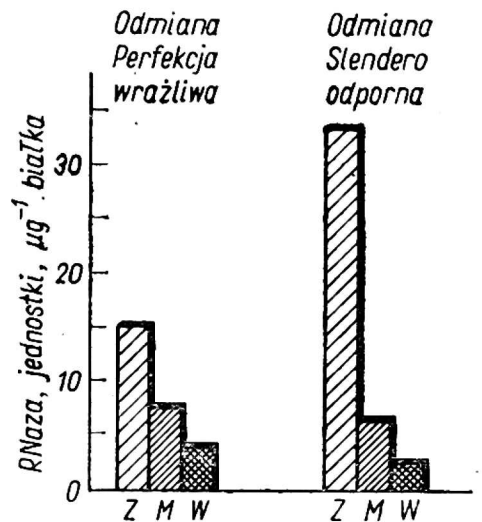
Ryc. 3. Aktywność PAL w korzeniach bocznych 4-miesięcznej marchwi zdrowej (Z) i porażonej przez *M. hapla* (M); wyrosła (W).

Rośliny indukowano z L-fenylalaniną, 5 mM w ciemności. Aktywność PAL oznaczano w proszku acetonowym [22]



Ryc. 4. Aktywność rybonukleazy w korzeniach bocznych 4-miesięcznej marchwi zdrowej (Z) i porażonej przez *M. hapla* (M). Wyrosła (W).

Aktywność RNazy oznaczano w świeżej tkance



Pod wpływem *M. hapla*, aktywność RNazy w korzeniach bocznych obniża się dwukrotnie w przypadku odmiany Perfekcja i 4, 5-krotnie — odmiany Slendero. Najniższą aktywnością tego enzymu charakteryzują się wyrosła.

SYNTEZA BIAŁEK I RNA

Stwierdzono, że pod wpływem *M. hapla* w korzeniach bocznych marchwi odmiany Perfekcja specyficzna radioaktywność frakcji białek ($\text{imp. min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ białka) jest podobna, jak w przypadku tkanek zdrowych [14]. Specyficzna radioaktywność białek w korzeniach bocznych odm. Slendero obniża się natomiast o około 50% w porównaniu z kontrolą [14]. Pod wpływem *M. hapla* następuje podwyższenie specyficznej radioaktywności frakcji RNA w korzeniach bocznych obu odmian marchwi [14].

Sprawdzono, czy zmiany indukowane przez *M. hapla* dotyczą tylko marchwi, czy też mają charakter ogólniejszy. Z tego powodu tkanki kalusa soi porażono wolno żyjącym nicieniem *A. buetschlii*.

Specyficzna radioaktywność frakcji RNA w tkankach kalusa soi porażonych przez *A. buetschlii* jest znacznie większa niż w tkankach zdrowych. Na przykład, po 19 dniach od momentu zainfekowania tkanek kalusowych soi specyficzna radioaktywność frakcji RNA w tkankach zdrowych wynosi $2,9 \text{ imp min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$, a w tkankach porażonych $50,9 \text{ imp min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$. Pod wpływem *A. buetschlii* w tkankach kalusowych soi obniża się specyficzna radioaktywność frakcji białek około dwukrotnie (tab. 1). Podobne rezultaty otrzymano w przypadku tkanek kalusów korzenia zapasowego marchwi odmiany Perfekcja [11].

W następnym etapie badań ekstrakty kwasów nukleinowych rozdzielano na kolumnach MAK. Kwasy nukleinowe izolowane z tkanek kalusa soi rozdzielano na sześć frakcji w następującej kolejności: tRNA, hybryd DNA-RNA, rRNA lekki (lrRNA) i rRNA ciężki (hrRNA), mRNA oraz frakcję TB-RNA, którą eluowano $1,5 \text{ M NH}_4\text{OH}$ (ryc. 5). Pod wpływem *A. buetschlii* w tkankach kalusa soi następuje podwyższenie syntezy tRNA, a obniżenie syntezy rRNA.

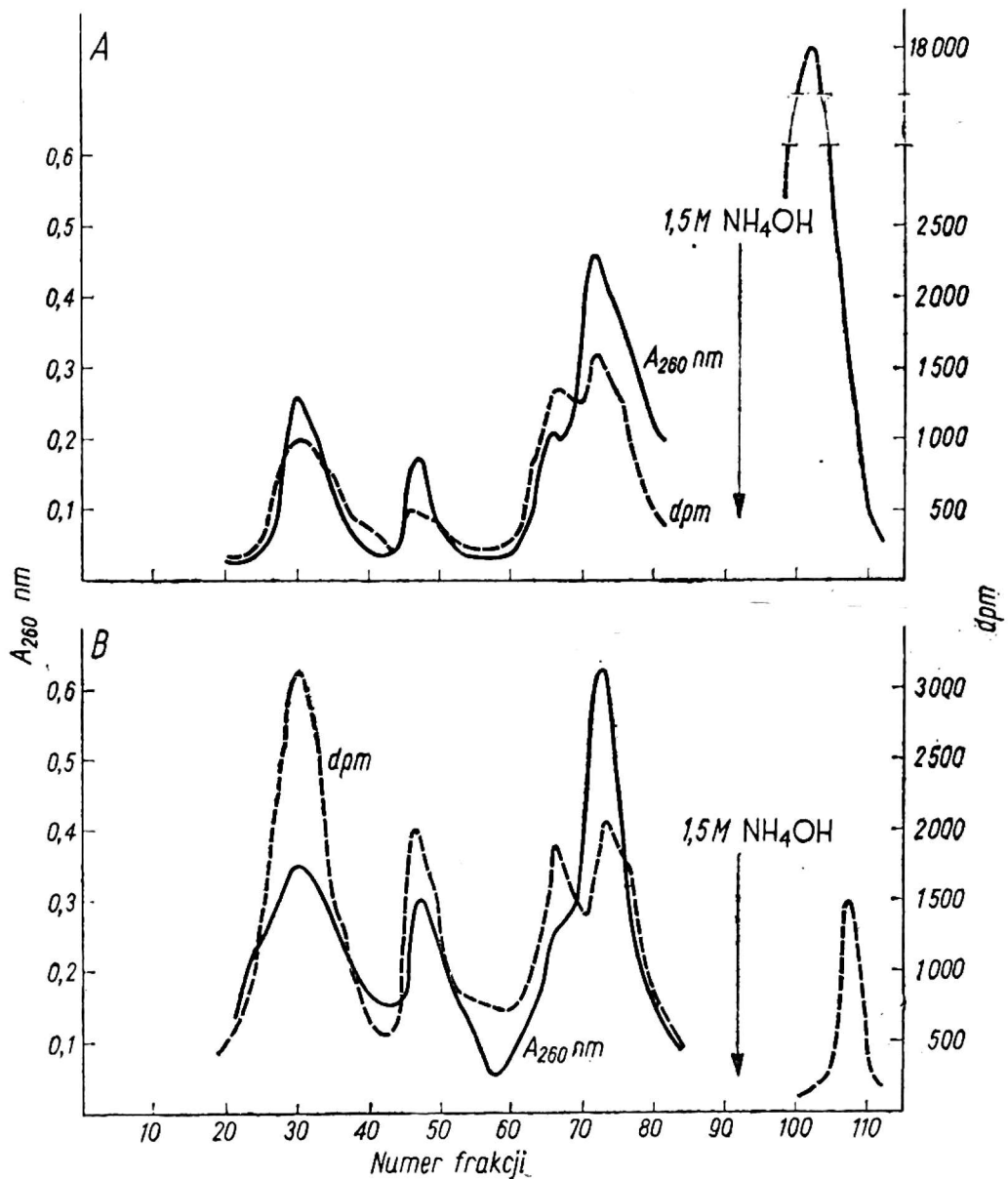
Tabela 1

Włączanie [^{14}C -2]-uracylu i [^{14}C -U]-leucyny do RNA i białek tkanek kalusa soi, zdrowej i porażonej przez wolno żyjącego nicienia *Acroboloides buetschlii*

Tkanka	Dni od infekcji			
	7	14	19	26
	imp. min ⁻¹ μg ⁻¹ RNA			
Zdrowa	3,4	2,9	2,9	2,7
Porażona	33,0	49,9	50,6	97,2
	imp. min ⁻¹ μg ⁻¹ białka			
Zdrowa	3,5	7,5	5,0	4,3
Porażona	2,9	3,8	2,7	2,2
	Wzrost tkanki porażonej, % kontroli			
	63	31	23	18

DYSKUSJA

W pracy stwierdzono, że w tkankach marchwi porażonych przez *M. hapla* wzrasta zawartość związków fenolowych, a zwłaszcza kwasu chłorogenowego [13]. W wyroślach syntetyzują się nowe substancje (plamy



Ryc. 5. Chromatografia kwasów nukleinowych ekstrahowanych z tkanki kalusów soi zdrowej (A) i porażonej przez *A. buetschlii* (B)

Roztwory kwasów nukleinowych nanoszono na kolumny MAK i eluowano semi-logarytmicznym gradientem NaCl (0,2 M zabuforowany roztwór NaCl, 200 ml do 1,5 M zabuforowany NaCl, 600 ml)

nr 8 i 9) nieobecne w tkankach z roślin zdrowych, bardzo aktywne jako inhibitory IAA-oksydazy. W młodych 2-miesięcznych korzeniach bocznych marchwi odmiany Perfekcja aktywność inhibitorów IAA-oksydazy jest dwukrotnie wyższa niż u roślin zdrowych. W analogicznej tkance odmiany Slendero w tkankach zdrowych i porażonych przez *M. hapla* aktywność inhibitorów IAA-oksydazy jest podobna. W korzeniach bocznych marchwi porażonej przez *M. hapla* podwyższa się synteza RNA, następuje zahamowanie syntezy białka i obniżenie aktywności RNazy i PAL. Pod wpływem *A. buetschlii* w tkankach kalusowych soi wzrasta synteza wszystkich rodzajów RNA z wyjątkiem rRNA i frakcji TB-RNA, oraz obniża się synteza białka.

Kwas chlorogenowy i jego izomery hamują aktywność IAA-oksydazy [9]; może on indukować lag-fazę w procesie utleniania IAA *in vivo*. Inhibitorowa aktywność kwasu chlorogenowego może być modyfikowana przez monofenole [9].

Wydaje się, że wzrost wyrosli i odporność marchwi na mątwika północnego mogą być uwarunkowane akumulacją inhibitorów IAA-oksydazy, zwłaszcza we wczesnych fazach porażenia. Zjawisko gromadzenia się inhibitorów nie występuje we wczesnych fazach porażenia odmiany Slendero. Należy przypuszczać, że w korzeniach tej odmiany początkowo nie zachodzi zaburzenie procesu degradacji auksyn, w związku z czym wzrost jest prawie normalny, a wytwarzane wyrosła są drobne.

Obniżenie aktywności PAL jest zjawiskiem korzystnym dla powstania wyrosli. Obniżenie aktywności tego enzymu może być połączone z redukcją biosyntezy lignin, co sprzyja wydłużaniu się i hipertrofii komórek. O obniżeniu syntezy lignin o 30% w korzeniach pomidorów porażonych przez mątwiki korzeniowe donosili Owens i Specht [17].

W tkankach porażonych przez nicienie następuje wzmożenie syntezy DNA, RNA oraz białek [18]. W korzeniach bocznych marchwi porażonych przez *M. hapla* następuje podwyższenie zawartości białek i RNA, zahamowanie syntezy białek oraz stymulacja syntezy RNA i zahamowanie aktywności RNazy. Dane te mogą potwierdzać słuszność sugestii Dropkina [6], że nicien reguluje czynność genomu roślinnego poprzez indukcję lub stymulację syntezy niektórych frakcji RNA.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że *M. hapla* bezpośrednio nie wpływa na aktywność IAA-oksydazy. Pod wpływem mątwika północnego gromadzą się inhibitory IAA-oksydazy, które hamują aktywność enzymu *in vivo*.

Marchew odmiany Slendero jest bardziej odporna na mątwika niż marchew Perfekcja [2]. Odmianę Slendero cechuje niższa aktywność IAA-oksydazy niż Perfekcję, co może sugerować, że tolerancja na mątwika zależy raczej od stosunku aktywności IAA-oksydazy do zawartości inhibitorów niż do absolutnej aktywności enzymu, szczególnie we wczesnych fazach porażenia.

LITERATURA

1. Brueske Ch., Dropkin V. H.: 1973, *Phytopathology* 63, 329—334.
2. Brzeski M. W.: 1974, *Zesz. prob. Post. Nauk rol.* 154, 175-182.
3. Cherry J. H., Chroboczek H., Carpenter W. J. G., Richmond A.: 1965, *Plant Physiol.* 40, 582-587.

4. Chylińska K. M., Knypl J. K., Brzeski M. W.: 1972, Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. 20, 209—211.
5. Chylińska K. M., Knypl J. S.: 1975, Nematologica, 21, 129-133.
6. Dropkin V. H.: 1969, Ann. Rev. Phytopathol. 7, 101-122.
7. Fricke U.: 1975, Anal. Biochem. 63, 555-558.
8. Giebel J.: 1973, Nematologica 19, 1-6.
9. Hare R. C.: 1964, Bot. Rev. 30, 129-165.
10. Huang C. S., Lin L. H., Huang S. P.: 1971, Nematologica 17, 460—466.
11. Janas K. M.: 1977, Acta Agrobot., 30, 13-31.
12. Janas K. M.: 1976, Praca doktorska (maszynopis).
13. Knypl J. S., Chylińska K. M., Brzeski M. W.: 1975, Physiol. Plant Pathol. 6, 51-64.
14. Knypl J. S., Janas K. M.: 1975, Physiol. Plant. Pathol. 7, 213-220.
15. Miller C. O.: 1968, Proc. 5th Int. Symp. on Plant Growth Regulation (1967), Runge Press, Ottawa 33-45.
16. Mandell I. D. Hershey A. D.: 1960, Anal. Biochem. 1, 66-74.
17. Owens R. G., Specht H. N.: 1966, Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant Res. 23, 181-198.
18. Rubinstein J., Owens R. G.: 1964, Contrib. Boyce Thompson Inst. 22, 491-502.
19. Viglierchio D. R., Yu P. K.: 1965, Science 147, 1301-1303.
20. Wollgiehn R.: 1968, Flora Abt. A 159, 58—76.
21. Zucker M.: 1965, Plant Physiol. 40, 779-784.

Кристина М. Янас

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТКАНЕЙ МОРКОВИ ПОРАЖЕННОЙ НЕМАТОДОЙ *MELOIDOGYNE HARPLA* CHITW.

Резюме

В галлах образованных на корнях моркови (*Daucus carota* L.) под влиянием *Meloidogyne harpla* Chitw. сильно снижается биосинтез протеинов с одновременным повышением содержания протеинов. Биосинтез нуклеиновых кислот ускорился 3-кратно, причем особенно сильно повышался биосинтез tRNA. Активность рибонуклеиназы и аммонолизы фенилоаланина (PAL) в пораженных нематодой боковых корнях моркови сорта Перфекция повышалось действие ингибиторов оксидазы IAA, задерживающих ее активность *in vivo*.

Причиной образования галлов под влиянием нематоды *M. harpla* является по всей вероятности местное повышение уровня физиологически активных ауксин, вызывающих размножение клеток корня. Процессу роста галлов благоприятствует задержание активности PAL, что ведет по всей вероятности к нарушению биосинтеза лигнина.

Krystyna M. Janas

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF TISSUES OF CARROT
INFESTED WITH THE *MELOIDOGYNE HAPLA* CHITW. NEMATODE

S u m m a r y

In galls on the roots of carrot (*Daucus carota* L.) caused by the *Meloidogyne hapla* Chitw. nematode a strong decrease of the protein biosynthesis at simultaneous increase of the content of proteins was observed. The biosynthesis of nucleic acids underwent a 3-fold acceleration, at an increase of the biosynthesis, particularly of the tRNA. The activity of ribonucleinase and ammonolysis of phenylalanine (PAL) in the nematode-infested lateral roots decreased. In the 2-month lateral roots of carrot of the Perfekcja variety increased the effectiveness of inhibitors on the IAA-oxydase, checking its activity *in vivo*.

The cause of forming galls under the *M. hapla* nematode effect is probably a local increase of the level of physiologically active auxines causing a proliferation of the root cells. The gall growth process is favoured by checking the PAL activity, what would probably lead to a disturbance of the biosynthesis of lignins.