

ФИТОПАТОЛОГИЯ

К. СУХОРУКОВ, Е. КЛИНГ и К. ОВЧАРОВ

ВОЗДЕЙСТВИЕ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* DE BARY НА ФЕРМЕНТЫ ПОРАЖЕННОГО РАСТЕНИЯ

(Представлено академиком А. А. Рихтером 29 I 1938)

Phytophthora infestans является специализированным паразитом, вызывающим заболевание, сухую гниль, у нескольких видов *Solanum*. На культурном картофеле эпидемии фитофторной гнили известны с 40-х годов прошлого столетия (де-Бари, 1862; Ячевский, 1933; Salaman, 1937).

Морфологические описания и биологические свойства *Phytopht. infestans* (= *Peronospora infestans*), анатомическое исследование пораженного картофеля даны в работах А. de Bary (1886), не утративших своего значения и до настоящего времени.

Изучение *Phytopht. infestans* в сапрофитных условиях начато Неске (1898) и Matruchot и Molliard (1900). Неске получал чистые культуры *Phytopht. infestans* на различных отварах; рост замедлялся на средах при высоком содержании в них растворимых веществ, осмотическое давление не определялось. Matruchot и Molliard (1903), не зная работы Неске, провели наблюдение над развитием *Phytopht. infestans* также на различных отварах и простерилизованных ломтиках различных вареных овощей (тыква, дыня, картофель и др.). На вареном картофеле роста не было.

Brefeld (1883) до опубликования исследований Неске и Matruchot и Molliard считал *Phytopht. infestans* полупаразитным грибом и впоследствии (1908) получал хороший рост гриба на вытяжке из высушенных клубней картофеля, при холодной экстракции, с добавлением пивного сусла. Clinton (1911) и Pethybridge и M rphy (1913) наблюдали образование ооспор у *Phytopht. infestans*, выращенной на различных агаризированных средах; но осталось не ясным—возникают ли ооспоры в результате полового процесса или партеногенетически.

Биохимические особенности *Phytopht. infestans* не изучены. Химическое исследование клубней картофеля, пораженных *Phytopht. infestans*, проведено Lepik (1929); он получил в больных клубнях падение содержания крахмала и нарастание сахара.

Хороший рост *Phytopht. infestans* на клубнях картофеля с образованием сахара заставлял предполагать наличие у гриба активной амилазы. Однако в наших опытах посевы на среды с крахмалом как источником углерода всегда давали отрицательные результаты, гриб не рос; при стерильном введении в среду диастаза *Phytopht. infestans* давала рост.

Непосредственное определение амилазы в мицелии показало ее отсутствие. Представлялось интересным вскрыть неясный до сих пор механизм воздействия *Phytopht. infestans* на картофельное растение и дать ему физиологическое толкование, особенно в отношении мобилизации запасного крахмала в пораженных тканях.

Исследования Haehn и Schweigart (1923) амилазы из клубней картофеля показали ее низкую активность, еще более снижающуюся при диализе. Minagawa (1933, 1934) обнаружил и получил препарат фермента амило-синтеазы из риса и клубней картофеля; амило-синтеаза переводила декстрины по данным Minagawa в крахмал, показывала низкий температурный оптимум и нацело разрушалась при 50°.

Наши определения амилазы в клубнях и листьях картофеля (см. ниже) вполне согласуются с данными Haehn и Schweigart. Низкую активность амилазы у картофеля можно объяснить или низким содержанием фермента или наличием тормозителей реакций. К числу последних относятся ингибиторы многих ферментативных реакций, не специфические для амилазы, только как дубильные вещества (Опарин и сотрудники, 1928, 1933, 1934), и специфические тормозители амилолитической реакции; сюда можно отнести амило-синтеазу Minagawa и систоамилазу, обнаруженную Chrzaszcz и Janicki (1933) в семенах и проростках гречи и злаков. Систоамилаза является ингибитором амилолитической реакции на всех ее этапах: гидратация крахмала, декстринирование и осахаривание. Для выяснения вопроса, есть ли в клубнях картофеля ингибиторы амилазы, мы провели несколько опытов качественного и количественного характера. Перейдем к описанию опытов и результатам.

Взяты клубни четырех сортов картофеля различной устойчивости к *Phytopht. infestans*: Ранняя роза (очень устойчива), Лорх (неустойчив), Вольтман (средней устойчивости) и 8670 ИКХ (устойчивый). Из клубней при тщательном измельчении получены водные вытяжки (1 : 2).

В серию колб с 25 см³ 1% растворимого крахмала +1 см³ 0.1 n фосфатного буфера с pH=7.0+3 капли 0.5% солодового диастаза добавлено по 4 см³ вытяжки. Все растворы предварительно были нагреты до 45° и смеси поставлены в водяную баню с температурой 45°. Скорость декстринирования определена иодным методом Wohlgemut. Результаты даны в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Число минут	Контроль (диастаз+вода)	Вытяжка Ранней розы+диастаз	Вытяжка Лорха+диастаз	Вытяжка Вольмана+диастаз	Вытяжка 8670+диастаз
0	Сине-фиолетовый цвет	Сине-фиолетовый цвет	Сине-фиолетовый цвет	Сине-фиолетовый цвет	Сине-фиолетовый цвет
10	Красный цвет	Фиолетовый цвет	Фиолетово-красный цвет	Сине-фиолетовый цвет	Сине-фиолетовый цвет
20	Желтый цвет	Фиолетовый цвет	Красный цвет	Сине-фиолетовый цвет	Сине-фиолетовый цвет

Все вытяжки задержали скорость декстринирования крахмала и особенно сильно вытяжки из клубней сорта Вольтман и 8670 ИКХ. Следовательно ингибиторы амилазы в клубнях содержатся. Действие ингибитора не снижалось при добавлении к вытяжкам растворов желатинны и пептона, т. е. его нельзя отнести к дубильным веществам, кипячение же вытяжек заметно уменьшало его действие; есть все основания отнести инги-

битор к специфическим тормозителям; в дальнейшем мы его будем называть систоамилазой.

Для определения силы торможения осахаривания систоамилазой мы провели ряд количественных определений следующим методом: в три круглодонных колбы емкостью 150 см³ вносится:

Колба I: 15 см³ вытяжки из растения (1:2)
+30 см³ 2% крахмального раствора
+ 4.5 см³ 0.1 n фосфатного буфера с pH=7.0
+ 0.5 см³ дистиллированной воды

Колба II: 15 см³ вытяжки
+30 см³ 2% крахмального раствора
+ 4.5 см³ 0.1 n фосфатного буфера с pH=7.0
+ 0.5 см³ 1% диастаза (в 2% NaCl)

Колба III: 15 см³ дистиллированной воды
+30 см³ 2% крахмального раствора
+ 4.5 см³ 0.1 n фосфатного буфера с pH=7.0
+ 0.5 см³ 1% диастаза

Все растворы предварительно прогреты при 45° и после смешения по колбам в указанных пропорциях выдержаны в водяном термостате при 45° 30 мин. В 10 см³ смеси через 30 мин. определяется сахар (глюкоза + мальтоза) подометрически по Вильштеттеру.

В колбе III идет гидролиз крахмала в присутствии только препарата диастаза, в колбе I—гидролиз под влиянием диастаза вытяжки и в колбе II гидролиз под влиянием препарата диастаза и диастаза вытяжки. Арифметическим сложением содержания сахаров в 10 см³ смеси из III колбы и 10 см³ из I колбы и вычитанием из этой суммы содержания сахаров в 10 см³ смеси II колбы получаем относительную величину систоамилазы, выраженную в см³ 0.1 n J. Расчет поясним еще схемой (III сахара в 10 см³ + I сахара в 10 см³ - II сахара в 10 см³ = относительной величине систоамилазы в 1 см³ тканевого сока).

Приведем результаты количественных определений систоамилазы.

Таблица 2

№	Препараты амилазы и систоамилазы	Колич. сахаров в см ³ 0.1 n J	Величина систоамилазы в см ³ 0.1 n J	Характеристика сортов по фитотроустойчивости
1	Только диастаз	9.00	—	} Очень неустойчивый
2	Вытяжка из Ранняя роза . . .	0.35	—	
3	Вытяжка из Ранняя роза + диастаз	7.60	1.75	
4	Вытяжка из Эпикур	0.50	—	} Неустойчивый
5	Вытяжка из Эпикур + диастаз .	7.50	2.00	
6	Вытяжка из Лорх	0.45	—	} Неустойчивый (более устойчивый, чем Эпикур)
7	Вытяжка из Лорх + диастаз . .	7.40	2.05	
8	Вытяжка из Смысловский . . .	0.65	—	} По устойчивости близкий к Лорх
9	Вытяжка из Смысловский + диастаз	7.00	2.65	
10	Вытяжка из Вольтман	0.60	—	} Средней устойчивости, устойчивее предыдущего
11	Вытяжка из Вольтман + диастаз	6.40	3.20	

Взяты клубни 5 сортов картофеля различной фитофтороустойчивости. Клубни получены весной из хранилищ Института картофельного хозяйства (под Москвой) без всяких повреждений и явных признаков прорастания. Результаты определений амилазы и систоамилазы даны в табл. 2.

Из приведенных цифр видно, что клубни всех сортов картофеля содержат систоамилазу, тормозящую реакцию амилазного осахаривания крахмала. Величина систоамилазы у разных сортов не одинакова, она высока у устойчивого сорта и относительно низка у сильно поражаемого. Активность амилазы в клубнях всех сортов довольно низка.

Величина систоамилазы в клубнях не остается постоянной, но заметно изменяется от состояния покоя.

У одного картофельного растения, выращенного в глиняном вазоне с небольшим объемом почвы, часть клубней заложилась на поверхности почвы; поверхностные клубни под влиянием света позеленели и на материнском растении стали прорастать. Клубни, скрытые почвой, не прорастали и имели нормальный вид. Для определения систоамилазы клубни разделены на три группы: прорастающие, слабо прорастающие и непрорастающие. Результаты определений даны в табл. 3.

Таблица 3

№	Препараты амилазы и систоамилазы	Количество сахаров в см ³ 0.1 п J	Величина систоамилазы в см ³ 0.1 п J
1	Только диастаз	8.90	—
2	Вытяжка из прорастающих клубней	1.90	—
3	Вытяжка из прорастающих клубней + диастаз	8.40	1.10
4	Вытяжка из слабо прорастающих клубней	1.30	—
5	Вытяжка из слабо прорастающих клубней + диастаз	7.10	3.10
6	Вытяжка из непрорастающих клубней	0.80	—
7	Вытяжка из непрорастающих клубней + диастаз	6.70	3.00

При прорастании клубней активность амилаз повышается, систоамилаза падает. Как известно, прорастание клубней сопровождается накоплением в них и особенно в ростовых почках сахаров. Систоамилаза в процессах превращения углеводов клубня, как видим, имеет некоторое значение.

Систоамилаза обнаружена нами и в листьях картофеля, собранных в период максимального клубнеобразования (1 VIII).

Таблица 4

№	Препараты амилазы и систоамилазы	Количество сахаров в см ³ 0.1 п J	Величина систоамилазы в см ³ 0.1 п J
1	Только диастаз	7.30	—
2	Вытяжка из <i>Sol. demissum</i>	2.60	—
3	» » <i>Sol. demissum</i> + диастаз	2.80	7.10
4	» » 8670 ИКХ	1.90	—
5	» » 8670 ИКХ + диастаз	2.40	6.80
6	» » Ранняя роза	1.30	—
7	» » Ранняя роза + диастаз	3.40	5.20

Приведем показатели систоамилазы для листьев трех форм картофеля, различающихся между собой по фитофтороустойчивости: *Solanum demissum*, иммунный, сорт 8670 ИКХ, очень устойчивый и Ранняя роза, очень неустойчивый. Результаты определений приводим в табл. 4.

Перейдем к рассмотрению результатов определения систоамилазы в клубнях, зараженных *Phytopht. infestans*. Опыт проведен с сортом Лорх. Клубни после протирания поверхности спиртом стерильным ланцетом разрезаны на кружочки толщиной в 0.5 см и заражены в разные сроки нанесением зооспор в каплях воды.

Ко времени анализа развитие грибка на картофеле было различным от самых первых стадий (начало темнения картофеля) до полного заражения зараженных кружочков мицелием.

Величина амилазы и систоамилазы в зараженных клубнях приведена в табл. 5.

Таблица 5

№	Препараты амилазы и систоамилазы	Количество	Величина
		сахаров в см ³ 0.1 п J	систоами- лазы в см ³ 0.1 п J
1	Только диастаз	8.20	—
2	Вытяжка из здорового клубня	0.30	—
3	Вытяжка из здорового клубня + диастаз	5.00	3.50 (100.0)
4	Вытяжка из зараженного клубня (начало темнения, заражение 1 сутки)	0.30	—
5	Вытяжка из зараженного клубня (заражение 1 сут-ки) + диастаз	5.30	3.20 (91.4)
6	Вытяжка из зараженного клубня (мицелий по краям, заражение 3 суток)	0.30	—
7	Вытяжка из зараженного клубня (заражение 3 су-ток) + диастаз	5.60	2.90 (82.8)
8	Вытяжка из зараженного клубня (полное покрытие мицелием, заражение 5 суток)	0.50	—
9	Вытяжка из зараженного клубня (заражение 5 су-ток) + диастаз	7.10	1.60 (45.7)

Развитие *Phytopht. infestans* на клубнях сопровождается постепенным снятием в них систоамилазы; это свойство фитофторы повидимому имеет большое значение в ее биологии и хозяйственной вредности паразита. Постепенным снятием систоамилазы *Phytopht. infestans* исключает возможность быстрого повышения осмотического давления в среде, наличие систоамилазы задерживает развитие других микробов. Рост *Phytopht. infestans* на клубне не бывает продолжительным, большое снятие систоамилазы влечет за собой поселение в клубне гнилостных микробов, фитофтора начинает гнилостный процесс (Appel, 1905—1908).

В клубнях и листьях культурного и дикого картофеля обнаружена систоамилаза.

При заражении картофеля *Phytopht. infestans* наблюдается снятие систоамилазы и слабое активирование амилазы.

Наблюдается зависимость между устойчивостью сорта к фитофторе и содержанием систоамилазы.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева.
Академия Наук СССР.
Москва.

Поступило
1 II 1938.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ O. Appel, Lafars Handb. d. techn. Mykol., **11** (1905—1908). ² А. де-Бари, О болезни картофеля, перев. Бекетова (1862); A. de Bary, Bot. Ztg., № 37—39 (1881). ³ O. Brefeld, Untersuch. aus d. Gesamtgeb. d. Mykologie, H. 5 (1883); **14** (1908). ⁴ Chrzaszczu Janicki, Bioch. ZS., **265** (1933). ⁵ G. P. Clinton, Science, **33** (1911). ⁶ H. Haehn u. Schweigart, Bioch. ZS., **143** (1923). ⁷ L. Hecke, Journ. f. Landwirtsch., **46** (1898). ⁸ E. Lepik, Phytopath. ZS., **1** (1929). ⁹ L. Matruchot et M. Molliard, Bull. Soc. Mycol. de France, **16** (1900); Ann. Mycol., № 6 (1903). ¹⁰ M. Minagawa, Proc. of Imp. Acad. Tokyo, **9** (1933); **10** (1934). ¹¹ А. Опарин у. А. Курсанов, Bioch. ZS. (1928). ¹² А. Опарин, Манскаја у. Glasunow, Bioch. ZS., **272** (1934). ¹³ E. H. Pethybridge a. P. A. Murphy, Sc. Proc. Roy. Dublin Soc., XIII, № 36 (1913). ¹⁴ R. N. Salaman, Cambr. Un. Agr. Soc. Magazine, **5**, № 2 (1937). ¹⁵ А. А. Ячевский, Основы микологии, ред. П. А. Наумова (1933).