

В. Ф. КУПРЕВИЧ

**ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ РЖАВЧИНЫХ И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ГРИБОВ**

(Представлено академиком Н. И. Вавиловым 7 I 1940)

Ферменты облигатных паразитных грибов порядков *Uredinales*, *Erysiphales*, *Peronosporales* (за исключением семейства *Pythiaceae* и *Phytophthoraceae*) оставались до последнего времени неизвестными. Грибы перечисленных порядков не имеют в своем онтогенезе сапрофитной стадии, за исключением двух указанных семейств и, повидимому, вследствие этого не поддаются культуре на искусственных средах в лабораторных условиях. Этим обстоятельством объясняется отсутствие данных о ферментном аппарате названных групп облигатных паразитных грибов.

Исследование характера и набора экстрацеллюлярных ферментов у облигатных паразитных грибов представляет большой интерес для решения вопроса о происхождении и эволюции паразитных грибов. Большое значение эти исследования должны иметь также для выяснения природы физиологического иммунитета растений.

В предпринятом исследовании я исходил из предположения, что экстрацеллюлярные ферменты не поддающихся культуре на искусственных средах паразитных грибов могут быть обнаружены на ферментной деятельности ростков спор этих грибов. Дальнейшие работы вполне подтвердили такое предположение, по крайней мере для ржавчинных (*Uredinales*) грибов. В соответствии с чрезвычайно ничтожным количеством живого вещества, не превышающим 1 мг, которое можно получить, проращивая споры в каплях воды, при разработке метода определения ферментов ставилось целью лишь качественное определение их наличия.

Для исследования взяты уредоспоры *Puccinia coronifera* Kleb. с листьев овса, сорт Тулунский, эцидиоспоры *Puccinia dispersa* Erikss. с *Anchusa officinalis* (уредо- и телеитоспоры развиваются на ржи), хламидоспоры *Tilletia tritici* (Berk). Wint. с яровой и озимой пшеницы и конидии *Sepatoria populi* Desmz. (сумчатая стадия *Mycosphaerella populi* (Ausw.) (Schroet.) из культуры гриба на искусственном субстрате, представленной микологом Н. И. Васильевским. В целях сравнения активности и набора ферментов у сапрофитных и паразитных грибов одновременно определялось тем же методом наличие соответствующих ферментов, которые выделялись ростками спор *Penicillium* sp. и *Rhizopus* sp., взятых из загрязненных культур других грибов.

Споры опытных паразитных и сапрофитных грибов вносились в капли дистиллированной воды на предметных стеклах; стекла помещались в чаш-

ки Петри на смоченную водой фильтровальную бумагу. В тех же чашках Петри вместе с опытными помещались предметные стекла с «контрольными» каплями воды. Для создания стерильных условий все стеклянные предметы, а также игла, пинцет и пр. проводились через пламя спиртовой горелки либо нагревались до 130—150° в сушильном шкафу. Стерилизации также подвергались вода и фильтровальная бумага, помещавшаяся на дно чашек. В тех же целях листья овса и *Anchusa* с кучками спор ржавчинных грибов промывались в струе водопроводной воды и затем в стерильной дистиллированной воде. Споры *Tilletia tritici*, заключенные в оболочку разрушенного семени, проводились через пламя с таким расчетом, чтобы лежащие под оболочкой споры остались неповрежденными. В целях исключения возможности внесения обрывков ткани питающего растения в опытные капли воды со спорами последние добывались путем выдерживания листа (или части его) с кучками спор на сухом предметном стекле в течение 16—18 час.; высыпающиеся на поверхность стекла споры переносились в опытные капли.

В работе со спорами грибов для целей стерилизации, как показал опыт, совершенно непригодны толуол и тимол. Присутствие кристаллика или даже наличие запаха тимола в чашке Петри неизменно приводило споры ржавчинных и головневых грибов к гибели.

Появление ростков спор устанавливалось в параллельных пробах, поставленных тем же методом, как и опытные. По окончании определения ферментов наличие ростков спор проверялось также и в опытных каплях. Для прорастания спор требовались следующие сроки: уредоспоры *Puccinia coronifera* и эцидиоспоры *P. dispersa*, в среднем, 24 часа при температуре 17—19°; *Tilletia tritici*, *Septoria populi*, *Rhizopus* sp. и *Penicillium* sp.—48—72 часа. При наличии ростков в капли воды с проросшими спорами и в контрольные без спор вносился соответствующий субстрат в количестве равном или несколько меньшем, чем опытная капля.

Определялись следующие ферменты: каталаза, пероксидаза, оксигеназа, тирозиназа, амилаза, сахараза, уреазы, аспарагиназа, протеолитические ферменты. Соответственно в качестве субстрата вносились: 1%-ный раствор  $H_2O_2$ , то же +1%-ный раствор гваяковой смолы, вода +1%-ный раствор гваяковой смолы, 0,05%-ный раствор тирозина, 0,1%-ный раствор растворимого крахмала, 5%-ный раствор сахарозы, 2%-ный раствор мочевины, 2%-ный раствор аспарагина, 1%-ный раствор желатинины. Субстрат одновременно вносился в опытные и контрольные капли.

Опыты велись в отдельных чашках Петри для каждого вида паразитных грибов. Экспозиция при температуре 18—20° для амилазы и сахаразы—24—48 час., для каталазы, пероксидазы и оксигеназы—от нескольких минут до 1 часа, для уреазы и аспарагиназы—6—12 час., тирозиназы 48—72 часа; для протеолитических ферментов 24—48 час.

Действие ферментов устанавливалось по истечении определенной экспозиции после внесения субстрата либо непосредственно (каталаза, пероксидаза, оксигеназа, тирозиназа), либо внесением соответствующего индикатора на субстрат (амилаза) или на продукты распада (сахараза—реакция Селиванова на кетозы, амидазы—0,2%-ный раствор розоловой кислоты). В процессе работы наибольшие затруднения вызвало определение активности протеолитических ферментов. Ничтожное количество раствора желатинины в опытной и контрольной каплях не позволяет с достаточной надежностью установить наличие гидролитических процессов. Прибавление капли раствора формалина (рН=7,6), усиливающего кислотные свойства аминокислот, все же в известной мере делает заметным смещение рН среды при внесении 0,2%-ного раствора (рН=7,6) бромтимолблау вследствие изменения синей окраски на зеленоватосинюю или зеленую

(в контрольной капле с раствором желатины окраска не изменяется). Более четкие результаты дает нингидриновая реакция на аминокислоты (1 %-ный водный раствор нингидрина—трикетогидринденгидрат), хуже—с гидратом окиси меди.

Основной недостаток метода—невозможность точных количественных определений активности фермента. Объясняется это тем, что даже при относительно одинаковом количестве спор в сравниваемых каплях число проросших будет всегда различно, так как не все споры прорастают. Даже в случае, если бы удалось прорастить все споры, различия в количестве «активного» живого вещества все же сохраняются, ибо размеры ростков спор, как и количество последних не могут быть вполне одинаковыми. Тем не менее при значительном различии активности фермента у некоторых грибов (например активность амилазы у *Puccinia coronifera* и *P. dispersa*) степень активности фермента может быть сопоставлена.

Результаты исследования, сведенные в следующей таблице, свидетельствуют о сравнительно широком наборе экстрацеллюлярных ферментов, выделяемых ростками спор сапрофитных грибов; набор ферментов, выделяемых ростками спор облигатных паразитов, представляется в сокращенном виде. Ростки уредоспор *Puccinia dispersa* располагают четырьмя ферментами (каталаза, пероксидаза, амилаза, инвертаза) из общего числа 9, на которые производились определения. Примерно тот же набор ферментов обнаружен у ростков эцидоспор *Puccinia dispersa*. Набор ферментов *Tilletia tritici* и *Septoria populi* расширен за счет аспарагиназы; тогда как сапрофитный *Penicillium* sp. располагает всеми девятью ферментами, на которые производились определения.

Экстрацеллюлярные ферменты паразитных и сапрофитных грибов

Видовое название гриба	Ката-лаза	Перо-кси-даза	Окси-гена-за	Тиро-зина-за	Ами-лаза	Ин-вер-таза	Уре-аза	Аспа-раги-наза	Про-теоли-тиче-ские фер-менты
<i>Puccinia dispersa</i> Erikss., ростки эцидоспор . . .	++*	—	—	—	(+)	(+)	+	—	—
<i>Puccinia coronifera</i> Kleb., ростки уредоспор . . .	++	+	—	—	+	—	+	—	—
<i>Tilletia tritici</i> (Berk.) Wint., проросшие хламидоспоры . . .	++	+	—	—	+	—	+	(+)	—
<i>Septoria populi</i> Desmz., проросшие конидии . . .	++	+	—	—	(+)	—	+	+	—
<i>Rhizopus</i> sp., то же . . .	++	+	+	—	++	+	+	+	—
<i>Penicillium</i> sp., то же	++	+	+	(+)	++	++	++	+	+

Широкий набор экстрацеллюлярных ферментов у сапрофитных и полупаразитных грибов подтверждается также рядом исследований, проведенных в разное время (1, 2).

Активность экстрацеллюлярных ферментов, за исключением каталазы и уреазы (активность последних для всех исследованных грибов примерно одинакова), у паразитных грибов, особенно облигатных, значительно

\* + фермент есть; — фермента нет; (+) низкая активность фермента; ++ сравнительно высокая активность.

ниже в сравнении с сапрофитными грибами. Активность ферментов ростков спор *Puccinia coronifera*, *P. dispersa* и *Tilletia tritici* далеко не всегда проявляется с одинаковой силой даже при относительно одинаковом числе проросших спор. Ферменты сапрофитных грибов ведут себя в этом отношении более ровно.

**В ы в о д ы.** 1. Экстрацеллюлярные ферменты облигатных паразитных грибов, не поддающихся культуре на искусственных субстратах, могут быть исследованы на ферментативной деятельности ростков спор этих грибов при условии внесения субстрата в количестве, доступном переработке в течение общепринятых экспозиций.

2. Ростки спор облигатных паразитов и, особенно, сапрофитных грибов располагают сравнительно широким набором экстрацеллюлярных ферментов, которыми они в состоянии активно воздействовать на субстрат, где споры случайно остановились и проросли.

3. Набор экстрацеллюлярных ферментов ростков спор облигатных паразитных грибов в отличие от сапрофитных грибов характеризуется отсутствием или низкой активностью ферментов, разрушительно действующих на живую ткань питающего растения. В силу этой особенности, имеющей явно адаптивный характер, воздействие облигатного паразита на живую ткань не влечет за собой глубокого нарушения общей координации работы ферментного аппарата, питающего растения.

Ботанический институт  
Академия Наук СССР  
Ленинград

Поступило  
25 XII 1940

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. H. Birkinshaw, Biol. Rev., XII, 3 (1937). <sup>2</sup> K. H. Garren, Phytopathology, XXVIII, 11 (1938).