O roli tyrozynazy w odporności buraków na gnicie

Tyrosinase as a factor of resistance to root rot in the sugar beet

JANUSZ TRZEBIŃSKI

Na podstawie prac Masona (1955), Webstera (1954) i Beeversa (1954) należy przypuszczać, że oksydaza fenolowa praktycznie nie gra żadnej roli w normalnym oddychaniu roślin. Pogląd o udziale systemu fenolowego w charakterze oksydazy końcowej w procesie oddychania reprezentowany przez Boswella (1938), Robinsona (1944), Wosilaita (1954) i innych jest coraz częściej podważany. Zagadnienie nie jest jeszcze ostatecznie rozstrzygnięte. Znaczenie natomiast systemu fenolowego w obronnych reakcjach roślin, wysunięte przez Szent-Györgyi (1931) i potwierdzone później na wielu przykładach należy uznać za bezsporne (Farkas G. I., Kiraly Z. 1958, Fuchs W., A. Kotte 1954, Johnson G., L. Scholl 1952, Rubin B. A., W. A. Akse-nowa 1957, Vorös J. Z. i wsp. 1957).

Mechanizm działania tego systemu polega na katalitycznym utlenieniu w miejscu zranienia, zawartych w tkance fenoli do chinonów przez oksydazy fenolowe. Działanie biologiczne chinonów jest wielostronne. Dzięki zdolności do reagowania ze związkami zawierającymi grupy sulfonohydrylowe są one inhibitorami niektórych enzymów. Chinony łatwo utleniają inne związki i wchodzi z nimi w reakcję. Wskutek tych własności mogą one działać antybiotycznie.

Najczęściej więc reakcja obronna rośliny, uwarunkowana obecnością systemu fenole-fenolazy sprowadza się do zabicia warstwy tkanek zranionych lub zaatakowanych przez mikroorganizmy i tym samym stworzenia obronnej bariery, ograniczającej ognisko zakażenia. Rozwijanie się reakcji w kierunku powstawania chinonów i dalszych produktów utlenienia możliwe jest tylko w zranionych komórkach. Odporność roślin, uwarunkowaną istnieniem tego lub podobnego systemu określa się jako odporność wynikającą z nadwrażliwości (Hypersensitivity).

Buraki cukrowe są rośliną, dla której system fenolowo-fenolazowy jest charakterystyczny. Obecność tyrozynazy i jej substratów jest przyczyną ciemnienia miazgi buraka.

Przy pracach hodowlanych stwierdzono, że buraki mogą się różnić dość znacznie intensywnością ciemnienia miazgi (K o l a g o P. 1955, T r z e b i ń s k i J. 1957). Różnice te są skorelowane z niektórymi cechami użytkowymi (zawartość niepożądanych związków azotowych) i zostały wykorzystane do praktycznej selekcji.

Przy pracach selekcyjnych stwierdzono również, że buraki o słabo ciemniejącej miazdze są silniej atakowane przez mikroorganizmy, przez co znacznie gorzej się przechowują. Ta obserwacja była bodźcem do badań mających na celu wyjaśnienie współzależności cechy intensywnego ciemnienia i odporności na gnicie wywołane przez grzyby.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiałem do badań były buraki cukrowe (odmiany AJ₃) rozdzielone na drodze selekcji pojedynków na silnie i słabo ciemniejące.

Doświadczenia przeprowadzono według następującego schematu: W pierwszej części wykonano analizy biochemiczne buraków obu typów, na zawartość związków o charakterze polifenoli i aktywność oksydaz fenolowych oraz przebadano ich rozmieszczenie w korzeniach. W części drugiej przeprowadzono badania nad zmianami aktywności oksydazy fenolowej przy zranieniu i zakażaniu buraków. W części trzeciej przeprowadzono doświadczenia z zakażaniem za pomocą *Botrytis cinerea* korzeni buraków z zahamowaną czynnością tyrozynazy.

Aktywność oksydazy oznaczono techniką manometryczną w aparacie Warburga. W naczynku głównym umieszczono 1 g skrawków buraka o średnicy 7 mm i grubości 1 mm oraz 1,6 ml buforu fosforanowego 0,15 m wg Michaelisa, o pH 6,81. W studzience — bibułkę nasyoną 0,1 ml 40% roztworu KOH. W naczynku bocznym umieszczono 0,5 ml 0,1% roztworu l'tyrozyny.

Pomiary przeprowadzano w temperaturze 25 °C. Mierzono pobieranie O₂ w ciągu 30 minut, następnie przelewano roztwór l'tyrozyny z bocznego naczynia i mierzono pobieranie O₂ w czasie następnych 30 min. Aktywność tyrozynazy określano przez przyrost pobierania tlenu po dodaniu tyrozyny wyrażony w µl na 30 min.

Związki fenolowe oznaczano wg metody Folina i Ciocalteau (Allport N. L., 1946) przystosowując ją do pracy z materiałem roślinnym.

Do prób mikrobiologicznych wybrano jako organizm testowy *Botrytis cinerea*, grzyb najczęściej znajdowany na gnijących burakach.

WYNIKI

Stwierdzono, że aktywność tyrozynazy w burakach o silnie ciemniejącej miążdze była wyższa i wahała się w granicach 30,0—45,0 μ l na 30 min — średnio 40,0 μ l, podczas gdy w burakach o miążdze jasnej wynosiła 15,0—25,0 μ l, — średnio 18,2 μ l. Badając aktywność tego enzymu w różnych częściach korzenia stwierdzono, że jest on zlokalizowany głównie w części zewnętrznej główki. Dużą aktywność wykazuje tkanka skórki, najniższą zaś środkowa i dolna część korzenia.

Podobnie są zlokalizowane związki fenolowe. Wyniki analiz przedstawiają się następująco:

Część korzenia	mg fenoli na 100 g świeżej masy	
	miazga „jasna”	miazga „ciemna”
Zewnętrzna część głowy	2,5 — 5,0	11,0 — 14,0
Skórka i warstwa pod skórą	2,5 — 4,0	7,5 — 8,5
Miazga ze środka korzenia	0,5 — 1,0	0,5 — 1,0

Różnice zawartości związków fenolowych w obu typach buraków są więc wyższe od różnic w aktywności tyrozynazy.

We wstępnych doświadczeniach stwierdzono, że związki fenolowe buraka w normalnych stężeniach nie są toksyczne wobec *Botrytis cinerea*. Dodatek zagęszczonego ekstraktu frakcji fenolowej z miazgi buraka do pożywki agarowej w takiej ilości, aby stężenie fenoli w pożywce wyniosło 25 mg⁰%, nie hamował wzrostu grzyba. To wskazuje, że przyczyn odporności nie należy doszukiwać się w toksycznym działaniu samych fenoli, lecz przypuszczać należy, że uwarunkowana jest ona zdolnością rośliny do reakcji obronnej.

Dla sprawdzenia tej hipotezy przebadano reakcję żywego korzenia na zranienie i infekcję.

Korzenie buraków typu „ciemnego” i „jasnego” dzielono (nie rozcinając) na połowy wzdłuż bruzdy. Jedną część zeskrobywano nożem zdzierając skórę, a drugą pozostawiono nie naruszoną.

Buraki, przy badaniach reakcji na zranienie, pozostawiano w takim stanie do następnego dnia. Z części zranionej i nie zranionej wycinano korkoborem o średnicy 7 mm koreczki, z których przygotowywano skrawki o grubości 1 mm. Próby pobierano z równoległych części korzenia, a skrawki brano z części korka odpowiadającej głębokości 0,5—1,0 cm pod skórą.

Skrawki poddawano badaniom intensywności oddychania i aktywności polifenolazy.

Przy badaniach reakcji na infekcję, zeskrobana powierzchnia korze-

nia była zakażana grzybem *Botrytis cinerea*. Korzenie przechowywano w eksykatorze w atmosferze pełnego nasycenia parą wodną w temperaturze 20—25 °C przez okres tygodnia.

Do prób użyto po 36 korzeni „jasnych” i „ciemnych” w obu doświadczeniach.

Wyniki tych doświadczeń ilustrują tabele 1 i 2.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotność zróżnicowania obu typów buraków w reakcji na zranienie. Przy porównaniu reakcji oddychania różnica graniczna przy $\alpha = 0,05$ wynosi 1,8, w aktywności polifenolazy 2,7 i względnej aktywności polifenolazy 5,2.

Wyniki doświadczenia wskazują, że buraki typu „ciemnego” reagują na zranienie wyraźnym wzrostem aktywności polifenolazy, a buraki „jasne” — obniżeniem. Intensywność oddychania przy burakach typu „jasnego” wzrasta, a w burakach ciemnych nieco maleje. Różnice te są nieznaczne i niewiele przekraczają granice błędu.

Wyniki badań nad reakcją obu typów buraków na infekcję pleśnią pokrywają się w zasadzie z poprzednimi. Analiza statystyczna wykazała istotność zróżnicowania reakcji obu typów buraków. Przy porównaniu reakcji w oddychaniu różnica graniczna przy $\alpha = 0,05$ wynosi 3,7, w aktywności polifenolazy w wielkościach bezwzględnych 3,8 i wielkościach względnych 5,3.

Buraki „ciemne” reagują znacznym wzrostem aktywności polifenolazy, podczas gdy w „jasnych” aktywność ta się zmniejsza. Różnice w reakcji obu typów buraków są zdecydowane — liczby wyrażające je przekraczają znacznie błąd doświadczenia. I w tym doświadczeniu obserwuje się większy przyrost pobierania tlenu przez tkanki sąsiadujące z miejscem infekcji w burakach „jasnych”.

Przeprowadzono badania nad wpływem wyciągu z *Botrytis cinerea* na oddychanie i aktywność polifenolazy. W tym celu przeprowadzono próby oddychania skrawków buraka z dodatkiem wyciągu z *Botrytis*. Wyciąg otrzymano przez ekstrakowanie acetonem zhomogenizowanej grzybni, odparowanie acetonu do sucha i rozpuszczenie pozostałości w wodzie. Do prób użyto buraków nie zranionych. W wyniku tego doświadczenia stwierdzono, że dodatek wyciągu wzmacnia intensywność oddychania i hamuje aktywność polifenolazy buraka.

Doświadczenie to wyjaśnia fakt znacznego przyrostu oddychania i spadku aktywności polifenolazy w burakach „jasnych” po porażeniu pleśnią. Reakcja nieodpornych na gnienie buraków „jasnych”, uboższych w fenole i posiadających niższą aktywność polifenolazową polega przede wszystkim na obniżeniu się aktywności polifenolazy i zwiększeniu oddychania. Buraki „ciemne” reagują również wzrostem oddychania, lecz znacznie niższym, natomiast ich aktywność polifenolazowa poważnie

T A B E L A 1

Reakcja buraków "ciemnych" i "jasnych" na zranienie

Buraki "ciemne"				Buraki "jasne"		
	intensywność oddychania	aktywność tyrozynazy w liczbach		intensywność oddychania	aktywność tyrozynazy w liczbach	
	$\mu\text{l O}_2/\text{lg}/30\text{min.}$	absolutn. $\mu\text{l O}_2/30\text{min.}$	względ.	$\mu\text{l O}_2/\text{lg}/30\text{min.}$	absolutn. $\mu\text{l O}_2/30\text{ min.}$	względ.
Część zraniona	od: 42,2	31,0	159,0	41,8	14,3	132,9
	do: 52,5	44,3	191,7	52,0	21,0	153,4
	Średnio 48,8	36,6	175,4	44,3	18,8	142,7
Część kontrolna	od: 44,0	30,0	156,1	35,0	17,5	141,1
	do: 53,5	44,0	188,0	52,0	27,5	171,4
	Średnio 49,7	34,7	170,2	43,3	22,6	152,7
Różnica	od: -1,8	0,3	1,7	0,0	-2,0	-3,7
	do: 0,0	3,2	12,2	3,0	-8,0	-18,0
	Średnio -1,15	1,8	5,2	1,0	-3,8	-10,0

T A B E L A 2

Reakcja buraków "ciemnych" i "jasnych" na infekcję pleśnią

Buraki "ciemne"				Buraki "jasne"		
	intensywność oddychania	aktywność tyrozynazy w liczbach		intensywność oddychania	aktywność tyrozynazy w liczbach	
	$\mu\text{l O}_2/\text{lg}/30\text{min.}$	absolutn. $\mu\text{l O}_2/30\text{min.}$	względ.	$\mu\text{l O}_2/\text{lg}/30\text{min.}$	absolutn. $\mu\text{l O}_2/30\text{min.}$	względ.
Część zakażona	od: 40,0	28,9	163,9	37,6	10,0	124,2
	do: 54,0	50,5	212,2	49,0	21,0	150,0
	Średnio 46,0	37,6	182,3	42,6	16,6	138,0
Część kontrolna	od: 41,3	26,4	155,1	33,1	10,6	132,6
	do: 51,0	46,5	205,7	41,0	23,4	165,8
	Średnio 45,0	32,8	174,6	37,3	18,7	149,7
Różnica	od: -1,0	1,7	3,7	1,0	-6,0	-7,1
	do: 4,0	12,0	18,2	10,0	0,0	-17,0
	Średnio 1,0	4,8	7,7	5,3	-2,1	-11,7

T A B E L A 3

Wpływ wyciągu z *Botrytis cinerea* na oddychanie i aktywność tyrozynazy

	Oddychanie $\mu\text{l O}_2/\text{lg}/30\text{min.}$	Aktywność tyrozynazy	
		$\mu\text{l O}_2/30\text{ min.}$	w liczbach wzgl.
Próba kontrolna	42,0	34,0	180,0
Próba z dodatkiem wyciągu z <i>Botrytis</i>	54,0	16,0	129,6
w % do kontroli	128,6	47,1	71,6

T A B E L A 4

Zmiany w intensywności oddychania i aktywności tyrozynazy buraków
"ciemnych" i "jasnych" w 4, 6 i 8 dniu po zakażeniu

Typ buraków	Przyrost oddychanie μl O ₂ / 1g / 30 min.			Przyrost lub spadek aktywności tyrozynazy w μl O ₂ /30 min.		
	w dniu					
	4	6	8	4	6	8
"Ciemne"	4,0	0,0	0,0	24,0	5,0	2,0
"Jasne"	13,0	11,0	10,0	4,0	-2,0	-4,0

wzrasta. Charakterystyczne są wyniki obserwacji intensywności oddychania i czynności polifenolazy w obu typach buraków wykonanych w 4-tym, 6-tym i 8-mym dniu po zakażeniu.

Aktywność polifenolazy w okresie rozwijania się pleśni (3—4 dni po zakażeniu) w burakach „ciemnych” silnie wzrosła, a w dniach następnych spadła do normalnego poziomu. Oddychanie wzrosło nieznacznie i szybko wróciło do normy.

W burakach „jasnych” obserwujemy w początku niewielki wzrost, a potem postępujący spadek aktywności polifenolazy. Intensywność oddychania tego typu buraków w 4-tym dniu po zakażeniu jest znacznie zwiększona, a w dniach następnych nieco się obniża. Te różnice w reakcji na zakażenie są charakterystyczne dla obu typów buraków i wyjaśniają istotę różnej ich odporności na zaatakowanie przez mikroorganizmy.

Dla potwierdzenia tych wyników przeprowadzono doświadczenie,

w którym przez wprowadzenie do korzenia czynnika chelatującego Cu, wyeliminowano polifenolazę i obserwowano potem zachowanie się korzenia podczas infekcji.

Doświadczenie przeprowadzono w sposób następujący: Zdrowe i nie uszkodzone korzenie buraków przecinano na połowę wzdłuż bruzdy. Jedną połowę infiltrowano 0,0025 M roztworem dwuetylodwutiokarbaminianu sodu (DIECA) w 0,15 M buforze fosforanowym o pH 6,81. Drugą połowę buraka infiltrowano samym roztworem buforowym.

Obie połówki po obeschnięciu zakażono homogenizatem z micelium *Botrytis cinerea* i umieszczono w eksykatorze napełnionym w dolnej części wodą. Eksykator był ustawiony w pomieszczeniu o temp. 25 °C. Po upływie 4 dni zaobserwowano różnice w rozwoju pleśni na obu połówkach, które pogłębiły się po dalszych kilku dniach. Połówki zainfiltrowane za pomocą DIECA były pokryte pleśnią znacznie silniej niż połówki kontrolne. Charakterystyczny był obraz wewnętrznego przekroju obu połówek buraka. Połówka z inaktywowaną tyrozynazą była mocno porośnięta pleśnią, a tkanka głęboko do wnętrza zaatakowana przez jej toksyny, co się objawiało żółknięciem i szklistym wyglądem. W połówce kontrolnej warstwa zaatakowanej przez pleśń tkanki była cieńsza i mocno poczerniała, a nadżery zgnilizny bardziej zlokalizowane. Obraz ten pokrywa się z uzyskanym przy zakażaniu buraków „ciemnych” i „jasnych” z wyżej opisanego doświadczenia nad reakcją tych typów korzeni na infekcję pleśnią.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Rola oksydaz fenolowych w procesie ciemnienia zranionych tkanek roślinnych jest dobrze poznana. Związki fenolowe, będące substratem tyrozynazy buraka, wśród których zidentyfikowano tyrozynę i dwuhydroksyfenyloalaninę (Trzebiński 1947) są jak stwierdzono nietoksyczne w stosunku do testowego mikroorganizmu. Ponieważ więc, ani znajdujące się w korzeniu związki fenolowe, ani będące produktem ich utlenienia melaniny, nie hamują rozwoju pasożyta, przyczyn odporności buraków o aktywnym systemie polifenolowym należało się doszukiwać w zdolności tkanek do reakcji obronnej, w której główna rola przypada przejściowym produktom utlenienia.

Próby przeprowadzone na żywym korzeniu wykazały, że egzemplarze o aktywniejszym systemie fenolowym — zawierające więcej fenoli i posiadające wyższą aktywność tyrozynazy — reagują na zranienie i infekcję wzmożonym utlenianiem związków fenolowych. Reakcja nie jest specyficzna i przebiega identycznie przy zranieniu i zakażeniu,

a sam mechanizm reakcji jest uruchamiany przez uszkodzenie tkanki. W wyniku reakcji uszkodzona tkanka zostaje zabita przez tworzące się przejściowo chinony, zranione zaś miejsce pokrywa się warstwą martwych komórek. W roślinach o słabszej aktywności systemu fenolowego utlenianie fenoli zachodzi wolniej, tworzy się mniej toksycznych chinonów i grzyb może się łatwiej rozwijać.

Stwierdzone zostało, że *Botrytis cinerea* wydziela bliżej nie zidentyfikowane toksyny, hamujące czynność oksydazy fenolowej i aktywujące proces oddychania. Zjawisko wydzielania przez grzyby związków inaktywujących enzymy i powodujących zakłócenia w oddychaniu jest znane (Bossi 1960, Stoll 1957). Wydzielana przez *Fusarium* toksyna — kwas fuzarynowy — posiada zdolność rozkojarzania glikolizy i fosforylacji, co w efekcie prowadzi do zwiększenia intensywności oddychania. Na podstawie omawianych wyników należy przypuszczać, że w podobny sposób działają również toksyny *Botrytis*. Prawdopodobnie wydzieliny tego grzyba hamują aktywność tyrozynazy, co również znajduje analogię w kwasie fuzarynowym, który blokuje miedź, będącą czynnym składnikiem enzymu.

Wszystkie te obserwacje dowodzą, że odporność buraków o intensywnie ciemniejącej miążdze na gnicie ma charakter odporności wynikającej z „nadwrażliwości”. Czynnikiem warunkującym tę odporność jest system oksydazy fenolowej. Wniosek powyższy znajduje dodatkowe potwierdzenie w doświadczeniu z zakażaniem korzeni, w których oksydaza fenolowa została wyłączona za pomocą DIECA.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono biochemiczne badania nad przyczynami wyższej odporności na gnicie buraków, których miążdza — po roztarciu — silnie ciemnieje. Odporność ta wynika ze zdolności do szybkiej reakcji obronnej, wynikającej z „nadwrażliwości” a uwarunkowanej istnieniem aktywnego systemu fenolowo-fenolazowego. Buraki o miążdze intensywnie ciemniejącej charakteryzują się wyższą aktywnością tyrozynazy. Korzenie takie reagują na zranienie i infekcję wzmożeniem aktywności tego enzymu, co prowadzi do zatrucia uszkodzonych tkanek produktami utlenienia fenoli, a tym samym powstania warstwy martwych komórek odgraniczającej zaatakowane miejsce od reszty korzenia. Korzenie o miążdze „jasnej” — posiadające niższą aktywność tyrozynazy i mniej fenoli — nie wykazują takiej reakcji i są łatwiej opanowywane przez grzyby.

W doświadczeniach z zakażaniem jako organizm testowy stosowano

Botrytis cinerea, grzyb najczęściej spotykany na gnijących burakach. Wyniki dotyczące obronnej roli systemu fenolowego potwierdzono w doświadczeniu z zakażaniem za pomocą *Botrytis* korzeni z tyrozynazą zahamowaną dwuetylodwutiokarbaminianem sodowym.

Zakład Buraka

i Innych Roślin Korzeniowych

IHAR Bydgoszcz

Kierownik: Prof. dr St. Rosnowski

(Wpłynęło: 5.7.1961)

SUMMARY

The causes of higher resistance to root rot of sugar beets with strongly darkening brei have been examined. It was found, that this resistance is due to a rapid defensive „hypersensitivity” reaction owing to polyphenolase-polyphenol system activity. Beet root with strongly darkening brei show higher tyrosinase activity. These roots react on wounding and infection by increased polyphenolase activity; it effects the poisoning of wounded tissues by the products of phenol oxidation — thus a barrier is created, which separates the infected spot from the rest of the root. Roots with „light” pulp, which content less phenol and lower tyrosinase activity, do not react in this way and are more liable to fungus invasion.

Botrytis cinerea was used in the experiments as test organism. The above results were confirmed by comparison the *Botrytis* infected roots with inhibited polyphenolase system by means of sodium diethyldithiocarbamate.

LITERATURA

1. Beevers H., 1954, The oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide by an ascorbate system from cucumber. *Plant Physiol.* 29:265.
2. Bossi R., 1960, Über die Wirkung der Fusarinsäure auf die Polyphenol — oxidase, *Phytopath. Zschrft.* 37:273.
3. Boswell J. G., 1938, A study of the polyphenoloxidase system in potato tubers. *Ann. Botany N.S.* 2:847.
4. Farkas G. I., Kiraly Z., 1958, Enzymological aspects of plant diseases. *Phytopath. Zschrft.* 31:251.
5. Folin O. V., Ciocalteau, 1956, Metoda oznaczania fenoli, wg N. L. Allport, *Analiza kolorymetryczna*, pp. 353, PZWL, Warszawa.
6. Fuchs W. A., Kotte B., 1954, Zur Kenntniss der Resistenz von *Solanum tuberosum* gegen *Phytophthora inf.*, *Naturwiss.* 41:169.

7. Johnson G. L., Scholl, 1952, Relation of chlorogenic acid to Scab resistance in potatoes, Science 115:627.
8. Kolágo P., 1955, Różnice w barwieniu się miazgi różnych buraków, Roczn. Nauk Roln. 72, ser. A, 1.
9. Robinson E. S., Nelson J. M., 1944, The tyrosine-tyrosinase reaction and aerobic plant respiration, Arch. Biochem. 4:111.
10. Rubin B. A., W. A. Aksenowa, 1957, Uczastie polifenolaznoj sistemy w zaszcitnych reakcijach kartofela proti *Phytophthora inf.*, Biochimija 22:202.
11. Szent-Györgyi, A. K. Vietorisz, 1931, Bemerkungen über die Funktion und Bedeutung der Polyphenolase der Kartoffeln, Bioch. Zschrft. 233:236.
12. Stoll A. i wsp., 1957, Über die Bildung von Fusarinsäure und Dehydrofusarinsäure durch das *Fusarium lyc.* in saprophyt. Kultur, Phytopath. Zschrft. 29:388.
13. Trzebiński J., 1957, Zależność enzymatycznego ciemnienia miazgi buraka cukrowego od jego stanu fizjologicznego, Hod. Rośl. Aklim. i Nasien. 1:648.
14. Webster G. C., 1954, The effect of carbon monooxide on respiration in higher plant, Plant Physiology. 29:399.
15. Wosilait W. D., A. Nason, A. J. Tereel, 1954, Pyridine nucleotide quinone reductase, J. Biol. Chem. 206:271.
16. Vörös, J. Z. Kiraly, G. I. Farkas, 1957, Role of polyphenolase in streptomycin induced resistance to *Phytophthora* in potato, Science 126, 1178.