Dekarboksylacja kwasu glutaminowego w liściach tytoniu zakażonego wirusem mozaiki tytoniowej

Decarboxylation of glutamic acid in the tobacco mosaics leaves

M. GUBAŃSKI

Dekarboksylazę kwasu glutaminowego w roślinach wyższych po raz pierwszy stwierdził uczony japoński Okunuki (Schales i współprac. 1946a). Nieco później Schales i współprac. (1946a, b, c) pod tym kątem przebadali ponad 40 gatunków różnych roślin i prawie we wszystkich stwierdzili ten enzym. W dalszych badaniach wyjaśniono, że koenzymem dekarboksylazy glutaminowej jest fosfopirydoksal.

Więcej uwagi temu procesowi zaczęto poświęcać dopiero w ostatnich latach w związku ze stwierdzeniem w wielu roślinach i zwierzętach kwasu gamma-aminomasłowego (Elliot 1958, Steward i Pollard 1957) produktu dekarboksylacji kwasu glutaminowego.

Z dotychczasowych badań wynika, że kwas gamma-aminomasłowy nie wchodzi w skład białek ani związków biologicznie czynnych typu witamin. Stosując znakowane izotopami metabolity stwierdzono, że kwas gamma-aminomasłowy włączany jest szybko w cykl Krebsa (Władimirow i Sytyński 1961).

Segraittain i Hirth (1953) dowiedli, że spośród 17 aminokwasów jedynie kwas glutaminowy wzmaga syntezę WMT. Z badań Farkasa (1958), Pekka i Milnera (1959) można wnosić, że między metabolizmem kwasu glutaminowego, α -ketoglutazarowego, glutaminy i aktywnością dekarboksylazy w normalnych oraz patologicznych tkankach roślinnych istnieje ścisła współzależność.

Okoliczności te skłoniły mnie do przebadania enzymów uczestniczących w przemianach kwasu glutaminowego w tytoniu zdrowym i zakażonym wirusem mozaiki tytoniowej. W pracy niniejszej podane są wyniki dotyczące dekarboksylazy glutaminowej.

MATERIAŁ, METODA BADAŃ I WYNIKI

Do badań stosowano tytoń odmiany White Burley. Rośliny doświadczalne hodowano w szklarni, w glebie na parapetach.

Zakażanie roślin przeprowadzano wg ogólnie przyjętej zasady (Gubański 1961).

Do poszczególnych oznaczeń pobierano próbki liści zawsze z tego samego piętra rośliny, reprezentujących co najmniej 10 roślin.

Doświadczenia wstępne wykazały, że aktywność interesującego nas enzymu zależy od 3 okoliczności: od wieku liści (piętra) i wieku rośliny jako całości. Stwierdzono, iż aktywność dekarboksylazy jest większa w liściach starych (z dolnych pięter) niż w młodych (górne liście). W miarę starzenia się całej rośliny powyższe różnice maleją. Wychodząc z tych danych oraz biorąc pod uwagę biologię rośliny zawirusowanej w pracach poświęconych badaniom porównawczym przyjęto jako regułę pobieranie liści do analiz zawsze z tych samych pięter.

Materiał do oznaczeń enzymatycznych przygotowywano następująco: z liści, z tej samej okolicy, odważano próbkę o masie 5 g, którą z kolei szybko rozcierano w moździerzu porcelanowym uprzednio wychłodzonym w lodówce. Do roztartej tkanki dodawano 10 ml buforu fosforanowego 1/15 M i rozcierano dalej do uzyskania jednorodnej zawiesiny (pH 5,8). Część powtórzeń wykonano z homogenatami liści uprzednio zamrożonych w lodówce oraz krążkami mrożonymi bez rozcierania.

Pomiary aktywności enzymu przeprowadzano w aparacie Warburga w temp. 30° przy 120 wstrząsach na min.

Do poszczególnych naczynek wlewano 2 ml homogenatu (bądź też 8 krążków liściowych o $\varnothing$ 1 cm), a do bocznych banieczek 1,0—1,5 ml kwasu glutaminowego o stężeniu 0,5—0,3%. Po wyrównaniu temperatury między manometrami i łaźnią aparatu kwas glutaminowy przelewano do homogenatu i natychmiast rozpoczynano pomiar. Wyniki podane w tabelach odnoszą się do czasu 30 minut, odczyty jednak robiono co 15 min. Wyniki śledzono również na drodze chromatograficznej (Gubański 1958), ilość kwasu gamma-aminomasłowego oceniano wizualnie.

Z serii roślin zakażonych w tym samym terminie pobierano codziennie partię liści i oznaczano w niej aktywność dekarboksylazy glutaminowej. Aktywność enzymu w liściach zdrowych przyjęto jako 100% i w stosunku do tej wielkości obliczono aktywność enzymu w liściach chorych. Wyniki jednej z analiz przedstawione są na wykresie. Jak widać z tych danych, w liściach tytoniu pozbawionych symptomów chorobowych (symptomy chorobowe pojawiają się po 10—15 dniach) aktyw-

ność dekarboksylazy nie podlega zmianom. Wyraźne wzmożenie tego procesu zachodzi po 7—9 dniach.

Bardzo silne wzmożenie dekarboksylacji (200%) stwierdza się dopiero w okresie formowania się mozaiki na liściach (14—15 dni po zakażeniu).

Aktywność dekarboksylazy glutaminowej w tytoniu zakażonym WMT (%).
Activity of glutamic acid decarboxylase in tobacco infected with TMV (%)

Rzędne — aktywność enzymu w %; odczytane — czas od zakażenia tytoniu w dniach
Axis X — Activity of decarboxylase in %
Axis Y — Time of the infection in days

Stosując 3 różne sposoby przygotowania materiału do badań przebadano szczegółowiej aktywność dekarboksylazy w liściach mozaikowatych.

Dekarboksylacja kwasu glutaminowego w liściach zdrowych i mozaikowatych
Decarboxylation of glutamic acid in healthy and mosaics tobacco leaves

Długość liścia Leaf length	Aktywność dekarboksylazy glutaminowej w $\mu\text{mol CO}_2/30 \text{ min}/30^\circ$ Glutamic-decarboxylase activity in $\mu\text{mol CO}_2/30' /30^\circ$								
	homogenaty świeże fresh homogenates			homogenaty liści mrożonych homogenates of frozen leaves			krążki mrożone frozen discs		
	zdrowe healthy	mozaika mosaics	%*	zdrowe healthy	mozaika mosaics	%	zdrowe healthy	mozaika mosaics	%
40 cm	180	360	200	120	205	170	78	110	140
30 cm	163	262	163	116	215	184	50	70	140
20 cm	105	178	170	81	130	160	—	—	—

* Jako 100% przyjęto aktywność anizmu w liściach kontrolnych, Długość liścia charakteryzuje jego położenie na roślinie oraz wiek. Każda wielkość stanowi średnią arytmetyczną z 5 powtórzeń.

The enzymatic activity in control leaves as 100 %. The length of leaf is characteristic for its position on plant and of its age. Each entry is an arithmetic mean from five repetitions.

W tabeli widać, że niezależnie od sposobu przygotowania materiału do analizy aktywność dekarboksylazy glutaminowej jest zawsze wyższa w liściach mozaikowatych.

Wzmoczoną aktywność dekarboksylazy glutaminowej stwierdzono również w liściach mozaikowatych pomidorów.

przemiana kwasu ketoglutazarowego do bursztynowego stanowi wąskie gardło cyklu Krebsa i tym samym ogranicza sprawność cyklu jako całości. Dzięki temu, proces dekarboksylacji kwasu glutaminowego może wtórnie regulować cykl Krebsa. Powyższa hipoteza wymaga dalszych potwierdzeń eksperymentalnych.

Dalsze badania nad powyższym procesem są kontynuowane.

Na zakończenie pragnę złożyć serdeczne podziękowanie Panu Prof. Drowi W. Moycho za cenne wskazówki i krytyczne uwagi w czasie wykonywania niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

Aktywność dekarboksylazy glutaminowej w tytoniu mozaikowatym jest wyższa niż w zdrowym. Zmian w aktywności nie stwierdza się w pierwszych dniach po zakażeniu rośliny. Wsuwa się przypuszczenie, że aktywacja dekarboksylazy w tytoniu mozaikowym może pozostawać w związku z oddychaniem.

SUMMARY

The activity of glutamic acid decarboxylase in tobacco mosaic leaves (infected with TMV) is higher than in control one. No change in activity of decarboxylase was found the first few days after infection. Therefore it is supposed that this phenomenon is connected with respiration.

LITERATURA

- Commoner B., Nehari Varda., 1953, The effect of TMV synthesis on free amino acids and amid composition of host, *J. Gen. Physiol.* 36: 791.
- Elliott K. A. C., 1958, γ -aminobutyric acid and factor 1, *Rev. Canad. Biol.* 17: 367.
- Farkas G. L., 1957, Biochemische probleme der rostkrankheiten des Weizens, *Verhandlungen des IV Internationalen Pflanzenschutz Kongresses, Hamburg*, bd. 9: 81.
- Gubański M., 1958, Analiza transaminacji i dekarboksylacji kwasu glutaminowego w liściach różnych roślin metodą chromatograficzną, *Acta Soc. Bot. Poloniae* 27: 291.
- Gubański M., 1961, Metody hodowli i ilościowych oznaczeń WMT, *Wiad. Bot.* 5: 19.
- Hanson A., 1959, Action of phenylamine metabolites on glutamic acid decarboxylase and aminobutyric acid-ketoglutaric acid transaminase in brain, *Acta Chem. Scand.* 13: 1366.
- Linko Pekka, Milner M., 1959, Enzyme activation in wheat grains in relation to water. Glutamic acid alanine transaminase and glutamic acid decarboxylase, *Plant Physiol.* 34: 392.
- Schaes O., Schaes S. S., 1957, Decarboxylation and transamination in Extracts of Higher Plants, *Archives Biochem. Biophys.* 69: 378.
- Schaes O., Selma V. M., Schaes S. S., 1946a, Glutamic acid decarboxylase, *Archives of Biochem.* 10: 455.

- Schales O., Selma V. M., Schales S. S., 1946b, Glutamic acid decarboxylase, Archives of Biochem. 11: 155.
- Ségraitain G., Hirth L., 1953, Action de la substances arotées sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac en culture de tissus, Compt. Rend. Soc. Biol. 147, 1042.
- Steward F. C., Pollard J. K., 1957, Nitrogen metabolism in plants, Ann., Rev. Plant Physiol. 8: 65.
- Suchow K. S., 1956, Wirusy, wyd. Akad. Nauk ZSRR, Moskwa.
- Władimirow T. E., Sytyński I. A., 1961, Obmion aminomasłanoj kisloty i jego rol w pobuditielnoj diejatielnosti nerwnoj sistiemy, Usp. Sowr. Biol. 51: 3.