



УДК 577.144.5.088

РАЗЛИЧИЯ В СТРУКТУРЕ  $\beta$ -ГЛЮКАНОВ ДВУХ РАС  
ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА

Васюкова Н. И., Озерецковская О. Л., Леонтьева Г. В.,  
Чаленко Г. И., Елякова Л. А.\*, Звягинцева Т. Н.\*,  
Широкова Н. И.\*

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва;

\* Тихоокеанский институт биорганической химии ДВНЦ  
Академии наук СССР, Владивосток

Исследованы особенности строения низкомолекулярных цитоплазматических глюканов возбудителя фитофтороза картофеля, являющихся детерминантой его расовой специфичности. Показано, что при совместимых взаимоотношениях глюканы патогена выполняют роль иммуносупрессоров. С помощью химического и ферментативного анализов установлены различия в строении молекул глюканов, выделенных из двух рас возбудителя фитофтороза, которые заключаются в разной степени полимеризации  $\beta 1 \rightarrow 3$ ,  $\beta 1 \rightarrow 6$ -D-глюканов, а также в количестве и распределении по цепи остатков  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связанной глюкозы.

В 1979 г. экспериментально было показано, что в составе мицелия и выделений *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary присутствуют соединенные, специфически ингибирующие защитные механизмы в тканях картофеля, в частности реакцию сверхчувствительности и образование фитоалексинов [1]. Эти метаболиты получили название иммуоингибиторов, или супрессоров. Они были идентифицированы как водорастворимые низкомолекулярные глюканы, поскольку в их составе был обнаружен единственный мономер углеводной природы — глюкоза [2]. Результаты  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии позволили установить, что молекулы глюкана-супрессора, выделенного из расы 1 возбудителя фитофтороза, содержат не менее 14 глюкозных единиц, соединенных  $\beta 1 \rightarrow 3$ -глюкозидной связью в основной цепи, с редкими ответвлениями  $\beta$ -глюкозидных остатков в 6-м положении. Каких-либо заместителей неуглеводной природы в молекулах глюканов обнаружить не удалось. Молекулярная масса глюкана, по данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра и по определению содержания концевых восстанавливающих групп, составляла 3—4 тыс. [2].

Установлено [3], что иммуносупрессоры являются детерминантой расовой специфичности патогена: в совместимой комбинации картофеля и паразита\* супрессоры препятствовали включению защитных реакций в тканях картофеля, в несовместимой такого действия не оказывали. Характер действия супрессора возбудителя фитофтороза как бы противоположен действию индуктора, обнаруженного у этого же паразита. В то время как индуктор вызывал фитофтороустойчивость у растения-хозяина, супрессор препятствовал ее индуцированию [2, 3].

Поскольку глюканы-супрессоры возбудителя фитофтороза являются пока единственными претендентами на роль продуктов генов вирулентности паразита [2], чрезвычайную важность представляет вопрос о том, какие именно группировки в молекуле этих полимеров ответственны за его специфическую активность. Можно предположить, что специфичность различных рас *P. infestans* определяется размером боковых цепей присутствующих им глюканов, местом присоединения ответвлений к основной цепи или же какими-то иными различиями в тонкой структуре полимеров.

Целью настоящей работы и явились поиски различий в строении глюканов, выделенных из разных рас возбудителя фитофтороза.

\* Совместимая комбинация — сорт картофеля заражается совместимой с ним расой гриба; несовместимая — раса гриба не способна поражать данный сорт картофеля.

Влияние глюкозав, выделенных из разных рас возбудителя фитофтороза, на распространение несовместимой расы этого же патогена \*  
Число покоричневевших клеток  $\cdot 10^{-2}$ ,  $M \pm \Delta$

Предобработка поверхности диска	Сорта картофеля с генами фитофтороустойчивости				
	R <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub> R <sub>3</sub>
Водой (контроль)	400±25	235±19	346±32	256±17	288±25
Глюкозавми из расы:					
1.4	580±38 <sup>c</sup>	599±45 <sup>c</sup>	544±50 <sup>c</sup>	264±30 <sup>н</sup>	284±20 <sup>н</sup>
3.4	388±39 <sup>н</sup>	235±25 <sup>н</sup>	312±35 <sup>н</sup>	371±22 <sup>c</sup>	279±31 <sup>н</sup>

\* н и с — несовместимый и совместимый тип взаимоотношений сорта картофеля и расы гриба, из которой выделен глюкозав.

Таблица 2

Влияние глюкозав, изолированных из разных рас возбудителя фитофтороза, на образование ришитина в дисках клубней картофеля, инфицированных несовместимой расой патогена \*  
Количество мкг ришитина на 1 г некротизированной ткани

Предобработка поверхности диска	Сорта картофеля с генами фитофтороустойчивости				
	R <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub> R <sub>3</sub>
Водой (контроль)	160	170	173	150	138
Глюкозавми, изолированными из расы:					
1.4	84 <sup>c</sup>	135 <sup>c</sup>	158 <sup>c</sup>	188 <sup>н</sup>	130 <sup>н</sup>
3.4	194 <sup>н</sup>	195 <sup>н</sup>	180 <sup>н</sup>	127 <sup>c</sup>	161 <sup>н</sup>

\* См. примечание к табл. 1.

Глюкозавы выделяли из мицелия двух рас патогена (1.4 и 3.4) [2]. Испытывали их биологическую активность на сортах картофеля с различными генами фитофтороустойчивости (три сорта с геном R<sub>1</sub>, один сорт с геном R<sub>3</sub> и один сорт с геном R<sub>1</sub>R<sub>3</sub>). Раса гриба 1.4 совместима с сортами картофеля с геном R<sub>1</sub>, тогда как с двумя другими сортами несовместима. Несовместимый тип взаимоотношений имеет место у расы 3.4 с сортами картофеля, обладающими генами фитофтороустойчивости R<sub>1</sub> и R<sub>1</sub>R<sub>3</sub>, в то время как с сортом картофеля с геном R<sub>3</sub> раса 3.4 совместима.

Известно, что фитофтороустойчивость картофеля обуславливается реакцией сверхчувствительности, состоящей в быстрой локализации проникновения и распространения паразита в зоне некротизированных клеток. Чем выше устойчивость картофеля, тем меньше количество его клеток некротизируется в ответ на инфицирование. И наоборот, при ослаблении устойчивости паразит проникает в большее число клеток растения-хозяина, в результате чего область некротизации расширяется. Поэтому число некротизированных клеток может характеризовать степень распространения инфекции по тканям или степень их поражения. Если испытываемые вещества подавляли защитные реакции и гриб сильнее, чем в контроле, распространялся по тканям диска \* (о чем свидетельствовало большее число некротизированных клеток), биологическая активность расценивалась как супрессорная.

В табл. 1 представлены результаты распространения несовместимой с испытываемыми сортами картофеля расы возбудителя фитофтороза по тканям диска, предварительно обработанным глюкозавми, выделенными из рас 1.4 и 3.4 *P. infestans*.

Полученные данные свидетельствовали о том, что глюкозавы возбудителя фитофтороза вызывали расширение зоны последующего поражения дис-

\* См. «Экспериментальную часть».

Химические сдвиги С-атомов в <sup>13</sup>С-ЯМР-спектрах глюкоанов, выделенных из двух рас возбудителя фитофтороза

Глюкоан из расы	Тип связи	C1	C2	C3	C4	C5	C6	1 → 3- и 1 → 6-связи, %
1.4		92,7		85,6				
	1 → 3	96,4	73,9	86,3	68,9	76,3	61,5	99
	1 → 6	103,4	74,2	76,7	70,4	75,2	69,4	9
3.4		92,7		85,6				
	1 → 3	96,4	73,8	89,9	68,9	76,3	61,5	99
	1 → 6	103,4	74,2	76,6	70,4	75,2	69,4	9

Таблица 4

Определение молекулярных масс глюкоанов, изолированных из двух рас возбудителя фитофтороза, и количество в них β-1,6-связанной глюкозы

Глюкоаны из расы	Молекулярная масса	Степень полимеризации (n)		Количество β1 → 6-связанной глюкозы, %	
	G-50	концевой анализ	<sup>13</sup> С-ЯМР	<sup>13</sup> С-ЯМР	действие экзо-1,3-глюкоаназы
1.4	2800±500	18±2	17	9	12
3.4	2800±500	13±2	12	9	9,7

ков патогеном несовместимой расы только в том случае, если сорт картофеля был восприимчив к расе, из которой выделен глюкоан. Если взаимоотношения сорта картофеля и расы патогена несовместимы, глюкоаны, наоборот, либо задерживали распространение гриба, либо не влияли на его поведение в ткани дисков исследуемых сортов картофеля.

Подобное влияние глюкоаны оказывали и на процесс фитоалексинаобразования. Образование фитоалексинов, как известно, препятствует развитию фитофтороза и является одной из важнейших защитных реакций картофеля [4, 5].

Согласно полученным данным (табл. 2), предобработка поверхности дисков исследуемых сортов картофеля глюкоанами совместимой с ними расы патогена тормозила образование и накопление ришитина — одного из фитоалексинов картофеля, в результате чего наблюдалось более сильное распространение инфекции по тканям диска. У глюкоанов несовместимой с данными сортами картофеля расы гриба способность ингибировать процесс образования ришитина отсутствовала, причем в некоторых случаях даже обнаруживалось стимулирование его образования.

Вышеизложенное побудило нас заняться детальным исследованием особенностей строения молекул глюкоанов из двух рас патогена (1.4 и 3.4) с целью выявить их отличия, позволяющие объяснить различия в биологической активности.

Анализ моносахаридного состава полисахаридной фракции, выделенной из мицелия двух рас возбудителя фитофтороза (ГЖХ в виде альдононитрилов), показал присутствие одной глюкозы.

Структуру глюкоанов устанавливали, анализируя их <sup>13</sup>С-ЯМР-спектры, данные деградации по Смитту, определения молекулярных масс методами концевой анализа и гель-фильтрации, а также результаты гидролиза глюкоанов β1 → 3-экзоглюкоаназой, выделенной из *Eulota maakii* [11] [6].

Из анализа <sup>13</sup>С-ЯМР-спектров вытекает, что исследуемые препараты являются β1 → 3, β1 → 6-D-глюкоанами [7]. В их спектрах обнаружены сигналы с химическими сдвигами 86,3 и 69,4 м. д. (табл. 3). Соотношение количества 1 → 3- и 1 → 6-связанных остатков глюкозы, а также степень полимеризации определяли из значений интегральных интенсивностей

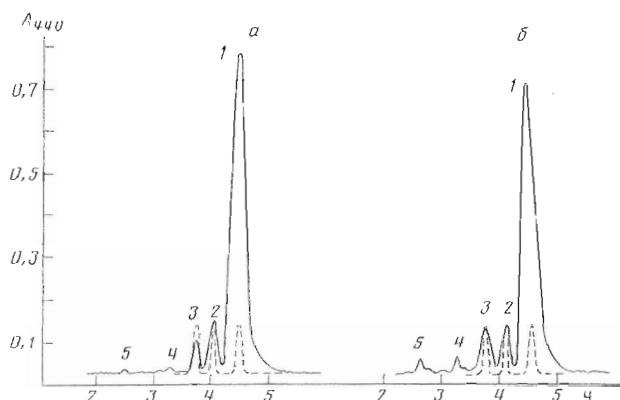
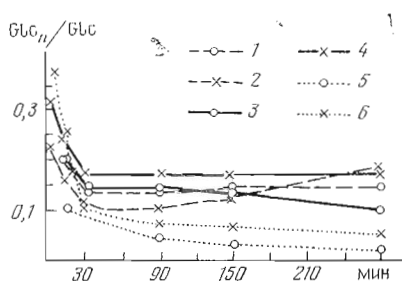


Рис. 1. Разделение на биоэле Р-2 конечных продуктов ферментативного гидролиза глюканов, выделенных из рас 1.4 (а) и 3.4 (б) возбудителя фитофтороза: 1 — глюкоза, 2 — дисахариды, 3 — трисахариды, 4 — тетрасахариды, 5 — высокомолекулярные олигосахариды. Пунктиром обозначены свидетели: 1 — глюкоза, 2 — смесь ламинарибиозы с гевцилопозой, 3 — ламинаритриоза

Рис. 2. Накопление ди- (1,2), три- (3,4) и тетра- (5,6) олигосахаридов в процессе ферментативного гидролиза глюканов, выделенных из рас 1.4 (1, 3, 5) и 3.4 (2, 4, 6) возбудителя фитофтороза картофеля



сигналов с химическими сдвигами 68,9 и 70,4 м.д., 103,2; 103,4; 92,7 и 96,4 м.д. соответственно.

Деградация по Смуту [8] обоих глюканов не приводила к распаду их молекул на более мелкие фрагменты; следовательно, основная масса  $1 \rightarrow 6$ -связанных остатков глюкозы находится в молекулах в виде ответвлений от основной  $\beta 1 \rightarrow 3$ -цепи или расположена на концах цепи полимера (только при этом условии используемый для разделения смеси после обработки по Смуту метод гель-фильтрации на сефадексе G-50 не «почувствует» изменения молекулярной массы деградированного глюкана).

Молекулярные массы глюканов двух рас возбудителя фитофтороза были установлены: а) гель-фильтрацией на сефадексе G-50 с использованием маркерных декстранов; б) концевым анализом [9, 10]; в)  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопией (табл. 4). Видно, что, хотя при использовании первого метода молекулярные массы исследуемых глюканов неразличимы, два других метода позволили получить уточненные данные, коррелирующие между собой. Степень полимеризации глюкозных остатков, установленная с помощью метода кощечевого анализа и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии, выше у глюкана из расы 1.4 ( $n \sim 18$ ), чем из расы 3.4 ( $n \sim 13$ ).

По данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров, приведенным в табл. 4, содержание  $\beta 1,6$ -связанной глюкозы в глюканах из рас 1.4 и 3.4 одинаково (9%), однако по содержанию олигосахаридов на конечной стадии ферментативной дегградации под действием глюканазы ЛПІ (см. ниже) количество  $1,6$ -связанной глюкозы в исследуемых глюканах несколько отличается.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что глюкан, выделенный из расы 1.4 фитофторы, является более высокополимерным, чем глюкан из расы 3.4, и содержит 12%  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связанных остатков глюкозы по сравнению с 9,7% у глюкана из расы 3.4.

Результаты ферментативного гидролиза глюканов, выделенных из двух рас возбудителя фитофтороза, с помощью глюканазы ЛПІ (экзо- $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -D-глюкапазы из *E.maakii*) представлены на рис. 1,2. Как установлено ранее проведенными исследованиями [6], этот фермент катализирует

Содержание продуктов ( $P$ , %) гидролиза глюканов с помощью экзо-1  $\rightarrow$  3- $\beta$ - $D$ -глюканазы (ЛП) в реакционной смеси \*  
 1 — глюкоза, 2 — дисахарид, 3 — трисахарид, 4 — тетрасахарид,  
 5 — высокомолекулярные продукты

Время гидролиза, мин	Продукты гидролиза	Глюкан из расы 3.4	Глюкан из расы 1.4
6	1	3,08	
	2	0,73	
	3	0,93	
	4	1,22	
	5	94,00	
15	1	16,40	15,00
	2	2,74	3,15
	3	4,11	3,15
	4	4,41	1,57
	5	72,60	72,20
30	1	25,70	22,30
	2	3,00	3,40
	3	4,50	3,40
	4	3,00	2,30
	5	63,60	69,20
90	1	60,80	69,10
	2	6,76	10,10
	3	10,80	10,80
	4	4,73	3,60
	5	16,90	6,50
150	1	70,00	72,80
	2	10,60	10,00
	3	12,90	10,60
	4	5,30	2,65
	5	5,30	4,00
270	1	68,60	76,80
	2	12,10	11,60
	3	12,10	8,00
	4	3,50	1,78
	5	3,50	1,78

\* Содержание продуктов ( $P$ , %) при различных глубинах ферментативного гидролиза (6, 15, 30 и т. д. мин) определяли по площади пиков на серии хроматограмм, полученных разделением продуктов на биоэле Р-2, принимая общую площадь пиков на отдельной хроматограмме за 100%. Хроматограммы конечных продуктов ферментативного гидролиза глюканов из рас 3.4 и 1.4 (270 мин) приведены на рис. 2.

последовательное расщепление связей, начиная с невозстанавливающего конца молекулы полисахарида. ЛП расщепляет смешанные  $\beta 1 \rightarrow 3$ ,  $\beta 1 \rightarrow 6$ - $D$ -глюканы, например ламинарины из бурых водорослей с образованием глюкозы (Glc) и генциобиозы (Glc<sub>2</sub>). Можно представить, что отношение Glc<sub>2</sub>/Glc в процессе гидролиза  $\beta 1 \rightarrow 3$ ,  $\beta 1 \rightarrow 6$ - $D$ -глюканов экзо-1  $\rightarrow$  3- $\beta$ -глюканазой отражает распределение 1  $\rightarrow$  6-ответвлений по цепи глюкана: если это отношение постоянно, распределение  $\beta 1 \rightarrow 6$ -разветвлений по цепи должно быть равномерным; если отношение Glc<sub>2</sub>/Glc уменьшается в процессе реакции, то основная часть разветвлений сосредоточена на невозстанавливающем конце молекул глюкана, если отношение увеличивается, то на восстанавливающем конце [11].

Картина расщепления глюканов из рас 1.4 и 3.4 с помощью экзо-1  $\rightarrow$  3- $\beta$ - $D$ -глюканазы оказалась более сложной: помимо дисахаридов, который, как показано с помощью бумажной хроматографии фракции биоз, является генциобиозой, из глюканов образуется трисахарид и тетрасахарид, о чем свидетельствуют данные, полученные с помощью жидкостной хроматографии продуктов гидролиза (рис. 2).

Полученный гель-фильтрацией на биоэле Р-2 ряд картин разделения продуктов ферментативного гидролиза для различных глубин реакции был обчислен (табл. 5, рис. 2). Из рис. 2 видно, что глюканы из расы 1.4 и 3.4

различаются распределением по цепи молекул фрагментов, из которых под действием ЛШ образуются ди-, три- и тетрасахариды. Области вблизи невосстанавливающих концов молекул обоих глюканов обогащены фрагментами, из которых образуются олигосахариды. В остальной части молекул глюкана, выделенного из расы 1.4, количество фрагментов, из которых образуются ди-, трисахариды, практически одинаково, и, исключая область вблизи невосстанавливающего конца, эти фрагменты равномерно статистически распределены по молекулам глюкана. Напротив, в глюкане из расы 3.4 количество и распределение таких фрагментов (рис. 2) в центральной части молекулы неравномерно. Глюкан из расы 3.4 обогащен по сравнению с глюканом из расы 1.4 фрагментами, дающими трисахарид, причем они равномерно распределены по цепям молекул глюкана. Значительно больше в глюкане 3.4 по сравнению с глюканом из расы 1.4 и фрагментов, дающих тетрасахарид (табл. 5, рис. 2). Основная часть  $1 \rightarrow 6$ -разветвлений, из которых образуется генциобиоза, сосредоточена на концах молекул глюкана 3.4, середина обеднена  $1 \rightarrow 6$ -разветвлениями.

Для выяснения структуры фрагментов глюканов, из которых под действием экзо-1  $\rightarrow$  3- $\beta$ -D-глюканазы образуются три- и тетрасахариды, необходимо провести более детальное изучение структуры этих олигосахаридов, что и является предметом наших дальнейших исследований. Образование их под действием фермента, зафиксированное нами, обусловлено, вероятно, наличием  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связанных остатков глюкозы как в точке разветвления, так и в цепи\*. Возможно, что и в последнем случае  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связь способна защищать соседние  $\beta 1 \rightarrow 3$ -связи от гидролиза их ферментом.

Установлено также, что исследуемые глюканы не обладают упорядоченной пространственной структурой: они не образуют комплекс с Congo Red [12].

Итак, представленные выше данные свидетельствуют о том, что исследуемые нами препараты полисахаридов, выделенные из разных по генам вирулентности рас возбудителя фитофтороза, представляют собой  $\beta 1 \rightarrow 3$ ,  $\beta 1 \rightarrow 6$ -D-глюканы, отличающиеся друг от друга по степени полимеризации и по количеству и распределению  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связанных глюкозных остатков в  $\beta 1 \rightarrow 3$ -цепи. Вероятно, именно эти отличия обуславливают различия в биологической активности этих глюканов.

Исследование  $\beta 1 \rightarrow 3$ ,  $\beta 1 \rightarrow 6$ -D-глюканов возбудителя фитофтороза представляется нам важным в связи с их участием в процессе специфического узнавания партнеров в системе картофель — возбудитель фитофтороза [13, 14]. Возможно, что высокомолекулярные глюканы-элисители и низкомолекулярные глюканы-супрессоры конкурируют друг с другом за рецепторные участки у растения, по-видимому, локализованные на его цитоплазматической мембране. При совместимых взаимоотношениях, вероятно, структура молекулы глюкана-супрессора имеет модификацию, позволяющую ему занять соответствующий сайт на цитоплазматической мембране картофеля и тем самым изменить конфигурацию рецептора элисителя так, что он становится некомплементарным ему, нарушая при этом процесс узнавания элисителя. Наоборот, если детали строения молекулы глюкана-супрессора из несовместимой с данным сортом картофеля расы гриба не позволяют ему взаимодействовать с рецептором на мембране клеток картофеля, то сайт на плазмалемме, комплементарный элиситеру, будет оккупирован последним, что приведет к индуцированию устойчивости.

Согласно вышеизложенной гипотезе, каждый ген вирулентности возбудителя фитофтороза должен определять строение глюкана-супрессора у этого паразита. Число генов вирулентности патогена должно соответствовать числу структурных модификаций глюканов, а это в свою очередь должно равняться количеству вариаций из рецепторов у картофеля. Обнаруженные различия в структуре глюканов-супрессоров двух рас *P. infestans* являются первым подтверждением справедливости этой гипотезы.

\* См. также данные обработки по Смиуту.



$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры глюканов были получены на спектрометре НХ-90Е (Brüker, ФРГ) в  $\text{D}_2\text{O}$ . Химические сдвиги выражены в миллионных долях относительно метанола (50,4 м.д.).

Хроматографию продуктов проводили на бумаге FN-15 в системе пиридин — *n*-бутанол — вода (6 : 4 : 3).

Для определения молекулярной массы нативных и деградированных по Смиту глюканов использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-50 (колонка  $100 \times 1$  см). Элюцию проводили дистиллированной водой, скорость элюции 7 мл/ч. Тестирование сахаров проводили фенол-серноокислотным методом [9]. Для калибровки применяли образцы: декстраны ( $M_r$  10 и 20 тыс.) и ламинария из *Laminaria cichorioides* ( $M_r$  5 тыс.).

Для конечного анализа в навеске определяли количество сахаров ( $P$ , мкг) фенол-серноокислотным методом [9], количество восстанавливающих концов ( $N$ , мкг) — методом Нельсона [10].

Анализ полного гидролизата глюканов (1 г,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 8 ч,  $100^\circ\text{C}$ ) осуществляли в виде альдоонитрилов с помощью ГЖХ на хроматографе Chrom-44, колонка ( $0,3 \times 200$  см) с ХЕ-60 на хроматоне N-AW при температуре колонки  $207^\circ\text{C}$  и испарителя —  $270^\circ\text{C}$ .

Деградацию по Смиту и анализ образующихся при гидролизе полиспирта продуктов проводили как описано нами ранее [8].

Глюканы получали из 14-суточного мицелия двух рас возбудителя фитотфтороза с разными генами вирулентности (1.4 и 3.4), выращенного на жидкой картофельной среде с минеральными добавками. Метод получения включает обработку 1 г перазрушенного мицелия гриба 70% кипящим этиловым спиртом (10 мл) в течение 20 мин [15]. Экстракцию мицелия повторяли дважды. Объединенные экстракты фильтровали через стеклянный фильтр № 2, спирт удаляли. Водный остаток подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-50 ( $3 \times 67$  см,  $v_0$  65 мл.) с элюцией водой. Собирали фракции по 3 мл. В каждой фракции определяли белок по Лоури [16] и углеводы фенол-серноокислотным методом [9]. Фракции глюкана (95—130 мл) собирали и использовали для биотестирования.

*Ферментативный гидролиз.* Экзо-1  $\rightarrow$  3- $\beta$ -глюканаза (ЛП) была получена из моллюска *E. taakii* по методу [6]. Субстраты (1 мг/мл) инкубировали с ЛП ( $10^{-2}$  ед. акт./мл) в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,4, при  $37^\circ\text{C}$ . В ходе гидролиза, проводимого от 5 до 270 мин, отбирали по 1 мл реакционной смеси, инактивировали фермент нагреванием при  $100^\circ\text{C}$  в течение 5 мин и анализировали продукты с помощью хроматографии на колонке ( $1 \times 100$  см) с биогелем P-2 (200—400 меш), используя хроматограф Jeol-J4C-6АН [17].

*Метод биотестирования.* Фракцию глюканов, взятых в концентрации 300 мкг/мл, наносили на поверхность дисков из клубней сортов картофеля с разными генами фитотфтороустойчивости. Диаметр диска составлял 16 мм, высота 5 мм. После 2-часового инкубирования во влажной камере обработанную глюканами поверхность дисков инфицировали 0,05 мл суспензии зооспор несовместимой с исследуемыми сортами картофеля расы патогена плотностью  $10^8$  зооспор/мл. Через 72 ч оценивали степень проникновения несовместимой расы в ткань дисков, учитывая количество покоричневевших (некротизированных) клеток в поверхностном слое ткани 0,5 мм толщиной. Подсчет клеток проводили под микроскопом МБИ-3 при увеличении  $10 \times 20 \times 1,5$ . Контролем служило количество некротизированных клеток в дисках, обработанных водой, а затем инфицированной зооспорой несовместимой расы фитотфторы. Результаты оценки поражения диска выражали в абсолютных величинах и обрабатывали статистически.

*Фитоалексин* картофеля — ришитин — определяли в поверхностном слое диска с помощью метода Кина [18], модифицированного для тканей картофеля. Для этого инфицированный поверхностный слой диска срезали, измельчали и заливали *n*-гексаном из расчета 15 мл на 1 г ткани. Гексан с помощью вакуума инфильтрировали в ткань, а затем ришитин экстрагировали на качалке в течение 1 ч. Для полноты экстракции операцию повторяли дважды с новой порцией гексана. Объединенные гексановые экстракты упаривали в фарфоровых чашках досуха. Для определения

ришитина в чашки добавляли по 3 мл концентрированной серной кислоты. Интенсивность развивающейся окраски колориметрировали при 500 нм, количество ришитина выражали в мкг/г некротизированной ткани.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л., Юрганова Л. А., Чаленко Г. И., Леонтьева Г. В. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 245. № 2. С. 479—483.
2. Озерецковская О. Л., Васюкова Н. И., Леонтьева Г. В., Чалова Л. И., Чаленко Г. И., Юрганова Л. А., Караетян Т. Э., Метлицкий Л. В. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 6. С. 852—866.
3. Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1978. № 5. С. 700—706.
4. Tomiyama K., Sakuma T., Ishizaka N. // Phytopathology. 1968. V. 58. № 1. P. 115, 116.
5. Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л. Фитоалексины. М.: Наука, 1973. 176 с.
6. Елякова Л. А., Широкова Н. И. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 12. С. 1656—1662.
7. Saito H., Ohki T., Takasuka M., Sasaki K. // Carbohydr. Res. 1977. V. 58. P. 293—305.
8. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 241—248.
9. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Roberts P. A., Smith F. // Analyt. Chem. 1965. V. 28. № 3. P. 350—355.
10. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 375—377.
11. Nevis J., Yamamoto R., Huber D. I. // Phytochemistry. 1978. V. 17. № 9. P. 1503—1505.
12. Sasaki T., Takasuka N., Chihara G., Maeda J. // Jap. J. Cancer Res. 1976. V. 67. P. 191—195.
13. Bartnicki-Garcia S. // Ann. Rev. Microbiol. 1968. V. 22. P. 87—108.
14. Чалова Л. И., Озерецковская О. Л., Юрганова Л. А., Барамидзе В. Г. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 230. № 3. С. 722—725.
15. Чалова Л. И., Барамидзе В. Г., Юрганова Л. А., Дьяков Ю. Т., Озерецковская О. Л., Метлицкий Л. В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 235. № 5. С. 1215—1218.
16. Lowry O. H., Rosenbouch N. J., Farr O. L., Sandall N. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265—275.
17. Зягинцева Т. И., Денисенко Н. Н., Елякова Л. А. // Химия природ. соединений. 1977. Т. 5. С. 697—699.
18. Keen N. T. // Phytopathology. 1978. V. 12. № 2. P. 221—226.

Поступила в редакцию

6.V.1986

После доработки

4.XII.1986

#### DIFFERENCES IN STRUCTURE OF $\beta$ -GLUCANS ISOLATED FROM TWO RACES OF *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

VASJUKOVA N. I., OZERETSKOVSKAYA O. L., LEONTYEVA G. V.,  
CHALENKO G. I., ELYAKOVA L. A.\*, ZVYAGINTSEVA T. N.\*,  
SHIROKOVA N. I.\*

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR,  
Moscow; \*Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Centre  
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

Some differences were detected in structure of  $\beta 1 \rightarrow 3$ ,  $\beta 1 \rightarrow 6$  — D-glucans isolated from two races of *Phytophthora infestans*, obtaining various virulence genes. These differences are considered to determine the race specificity of *Phytophthora infestans*.