

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 633:581.2:581.19:577.15

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-50-58>

Поступила в редакцию 10.09.2019

Received 10.09.2019

**В. И. Домаш¹, М. А. Белозерский², Я. Е. Дунаевский², О. А. Иванов¹,
Т. П. Шарпио¹, С. А. Забрейко¹, Т. Г. Шабашова¹**

¹*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ,
Москва, Российская Федерация*

АНТИФУНГАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БЕЛКОВ НЕКОТОРЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Аннотация. Приведены результаты исследований на наличие в семенах бобовых и злаковых культур белковых ингибиторов, активных против протеиназ животного происхождения (трипсина) и экзогенных пептидаз фитопатогенных микроорганизмов. Показано, что секретируемые протеолитические ферменты исследуемых фитопатогенов представлены главным образом цистеиновыми протеиназами, в меньшей степени – сериновыми и аспаратными. Установлено, что тесная положительная корреляция устойчивости растений к патогенам наблюдается не с хорошо известными и широко распространенными ингибиторами трипсина, а с ингибиторами, активность которых направлена против экзогенных пептидаз, секретируемых грибными патогенами родов *Fusarium*, *Colletotrichum* и *Helminthosporium*. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, могут быть использованы в селекционно-генетических исследованиях по созданию сортов и видов сельскохозяйственных культур с повышенной устойчивостью к патогенной микрофлоре и насекомым-вредителям, а также для создания препаратов защитного действия.

Ключевые слова: фитопатогенные микроорганизмы, ингибиторы экзогенных пептидаз, злаковые и бобовые культуры, коэффициенты корреляции, устойчивость к патогенам

Для цитирования: Антифунгальный потенциал белков некоторых сельскохозяйственных растений / В. И. Домаш [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 50–58. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-50-58>

**Valentina I. Domash¹, Mikhail A. Belozersky², Yakov E. Dunaevsky², Oleg A. Ivanov¹,
Tamara P. Sharpio¹, Svetlana A. Zabreiko¹, Tatyana G. Shabashova¹**

¹*Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of the Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

ANTIFUNGAL POTENTIAL OF SOME PROTEINS AGRICULTURAL PLANTS

Abstract. The results of studies on the presence in the seeds of legumes and cereals of protein inhibitors that are active against animal proteinases (trypsin) and exogenous peptidases of phytopathogenic microorganisms are presented. It has been shown that secreted proteolytic enzymes of the studied phytopathogens are mainly represented by cysteine proteinases, to a lesser extent, serine and aspartane proteinases are present. It has been established that a close positive correlation between plant resistance to pathogens is observed not with well-known and widespread trypsin inhibitors, but with the activity of inhibitors directed against exogenous peptidases secreted by fungal pathogens of the genus *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Helminthosporium*. The results obtained in the course of the work can be used in breeding and genetic studies on the creation of varieties and types of crops with increased resistance to pathogenic microflora and insect pests, as well as to create protective preparations.

Keywords: phytopathogenic microorganisms, exogenous peptidase inhibitors, cereals and legumes, correlation coefficients, resistance to pathogen

For citation: Domash V. I., Belozersky M. A., Dunaevsky Y. E., Ivanov O. A., Sharpio T. P., Zabreiko S. A., Shabashova T. G. Antifungal potential of some proteins agricultural plants. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 50–58 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-50-58>

Введение. В процессе роста и развития растения постоянно подвергаются воздействию стрессовых биотических и абиотических факторов. Болезни, вызываемые фитопатогенными микроорганизмами, наносят большой урон урожаю сельскохозяйственных культур. Патогенные организмы способны продуцировать сложную смесь внеклеточных пептидаз, которые, обеспечивая преодо-

ление защитных барьеров растительной клетки, могут участвовать в развитии болезни [1]. С помощью гидролитических ферментов грибных патогенов происходит разложение покровных тканей растений и насекомых, что способствует преодолению барьеров на пути прорастания спор, осуществляющих первые этапы заражения – внедрение паразита внутрь клетки хозяина. Известно, что агрессивность и патогенность микроорганизмов в значительной степени обусловлены активностью внеклеточных пептидаз [2, 3]. К настоящему времени некоторые из них уже выделены и охарактеризованы. Среди внеклеточных пептидаз преобладают в основном сериновые протеиназы, относящиеся к группам трипсино- и субтилизиноподобных ферментов [4]. Возможность получения рекомбинантных ферментов расширила практическое применение пептидаз грибов, которые обладают фибринолитической и антикоагулянтной активностью, расщепляют олигопептиды, придающие пищевым продуктам горький вкус, и др. [5, 6]. К сожалению, сведения о внеклеточных пептидазах патогенов пока немногочисленны. Во многих случаях не исследована связь между активностью внеклеточных пептидаз и патогенностью того или иного микроорганизма. Вследствие этого исследование биохимических свойств секретируемых белков и их функциональной роли является весьма актуальной задачей.

В процессе эволюции растения выработали защитные механизмы, которые позволяют противостоять неблагоприятным факторам, в том числе фитопатогенным микроорганизмам и вредителям. Высшие растения отвечают на стрессовые воздействия рядом биохимических и физиологических изменений, включая, например, такие, как образование и накопление (как один из наиболее эффективных ответов на воздействие неблагоприятных факторов) веществ, которые обладают протекторными свойствами. Среди большого спектра белковых молекул особого внимания заслуживают биологически активные белки – ингибиторы протеиназ. К ним относят большую группу разнообразных белков растений, объединенных способностью образовывать с ферментами обратимые белок-белковые комплексы, в составе которых ферменты утрачивают свою активность [7–9]. Несмотря на значительные успехи в исследовании свойств и структуры (первичной и пространственной) белковых ингибиторов, сведения о физиологических функциях этих белков весьма разноречивы. Белковые ингибиторы не только участвуют в регуляции активности эндогенных протеиназ, но и выступают как защитные агенты, нейтрализующие активность протеиназ патогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. Создается впечатление, что ингибиторы протеолитических ферментов могут играть роль в нескольких процессах, т. е. их можно рассматривать как полифункциональные белки [10].

Цель настоящей работы – сравнительный анализ активности различных классов ингибиторов протеиназ у растений, различающихся по устойчивости к фитопатогенной микрофлоре, в частности белковых ингибиторов экзогенных протеиназ у бобовых и злаковых культур в связи с их устойчивостью к болезням.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили полученные из коллекции MSK-F гербария Института экспериментальной ботаники НАН Беларуси различные сорта яровой и озимой пшеницы, озимой ржи, ячменя, желтого и узколистного люпина, а также фитопатогенные микромицеты родов *Fusarium*, *Colletotrichum* и *Helminthosporium*, поражающие злаковые и бобовые культуры. Поверхностное культивирование патогенов проводили на агаризованной среде сусло–агар. Для получения секретируемых пептидаз в культуральной жидкости использовали модифицированную среду Чапека. Модификация состояла в том, что в среду добавляли картофельный отвар, а вместо NaNO_3 – дрожжевой экстракт. Культуру грибов выращивали в конических колбах (объем 250–300 мл) в условиях термостата (25 °С в течение 7 дней). Активность экзогенных пептидаз определяли с использованием в качестве субстратов казеина и БАПА (N α -бензоил–DL-аргинин-п-нитроанилид).

Активность нейтральных протеаз (в условиях нейтральных pH) определяли по модифицированному методу Ансона [11]. Реакционная смесь состояла из 1 мл 1 %-ного раствора казеина по Хаммарстену, 1 мл экстракта фермента и 1 мл 1/15 М фосфатного буфера, pH 7,0. Смесь инкубировали 30 мин при 37 °С (время определяли экспериментально, учитывая линейность реакции). Реакцию останавливали 3 мл 5 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Затем смесь фильтровали и по поглощению света при 280 нм определяли количество продуктов протеолиза, не осаждаемых

ТХУ. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывает образование 1 мкМ тирозина за 1 мин инкубации.

Активность щелочной протеазы (БАПАазы), действующей в условиях щелочных рН, определяли по методу Эрлангера [12]. Инкубационная смесь состояла из 1 мл 1/15 М фосфатного буфера, рН 8,5, 0,5 мл экстракта и 1 мл 2,3 мМ БАПА. Инкубирование проводили при 37 °С в течение 30 мин. За единицу активности принимали изменение оптической плотности опытных растворов относительно контрольных на 0,01.

Активность белков-ингибиторов трипсина определяли по уменьшению скорости гидролиза субстрата ферментом в присутствии белковых ингибиторов [13]. В качестве субстрата использовали БАПА. Для анализа ингибирующей активности исследуемые семена экстрагировали 0,2 М NaCl. Соотношение навески исследуемого материала и 0,2 М NaCl (масса:объем) подбирали таким образом, чтобы была достигнута максимальная степень извлечения белков. Полученную смесь центрифугировали в течение 30 мин при 5500 g и температуре 4 °С. Супернатант отделяли, «балластные» белки осаждали путем доведения значения рН до 4,0 при помощи 0,1 н. HCl, раствор с осадком отстаивали в течение 4–6 ч и повторно центрифугировали при тех же условиях. Полученный экстракт использовали для определения активности ингибиторов трипсина. Реакционная среда состояла из 0,4 мл трипсина в 0,001 М HCl (20 мкг/мл), 0,6 мл 0,05 М трис-HCl буфера, рН 8,2, содержащего 0,2 М CaCl₂, и 1 мл экстракта ингибитора. Смесь инкубировали при 25 °С в течение 10 мин, после чего добавляли 1 мл БАПА. Контрольный образец вместо 1 мл экстракта содержал 1 мл буфера. Реакцию проводили при 37 °С в течение 30 мин и останавливали 0,5 мл 30 %-ного CH₃COOH. За одну ингибиторную единицу принимали такое количество ингибитора в экстракте, которое тормозит расщепление 1 мкмоль субстрата за 1 мин инкубации.

Активность ингибиторов экзогенных пептидаз фитопатогенных микроорганизмов определяли с использованием 1 % казеина в 1/15 М фосфатном буфере, рН 6,8. Реакционная смесь состояла из 1 мл 1/15 М фосфатного буфера, рН 6,8, 1 мл препарата ингибиторов и 1 мл культуральной жидкости, обладающей протеолитической активностью. Смесь инкубировали при 25 °С в течение 10 мин, после чего добавляли 1 мл казеина. Контрольный образец вместо препарата ингибитора содержал буфер. Инкубацию проводили 30 мин при 37 °С. После этого белки осаждали 3 мл 5 %-ной ТХУ. Смеси фильтровали и определяли поглощение при 280 нм. Уровень активности рассчитывали так же, как и в случае ингибиторов трипсина. За единицу активности принимали снижение оптической плотности реакционной смеси по сравнению с контрольным образцом на 0,01.

Содержание белка определяли по методу Брэдфорда [14].

Устойчивость растений к патогенам определяли по ГОСТ 21507-2013. Для определения устойчивости семян использовали концентрацию спор патогена 50 000 на 1 мл. При анализе подсчитывали количество спор, проросших на 3-и сутки в 10 мкл раствора ингибиторов из изученных растений, и получали средние значения на основании анализа при микроскопировании 10 полей зрения. Расчет производили по следующей формуле: устойчивость (%) = $(\Pi_k - \Pi_0) \cdot 100 / \Pi_k$, где Π_k – степень поражения семян в контроле, Π_0 – степень поражения в опыте.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерной программы Microsoft Excel и включала расчет стандартных ошибок средних арифметических.

Таблица 1. Активность нейтральных и щелочных протеиназ в культуральной жидкости исследуемых грибов, ЕА/мл

Table 1. The activity of neutral and alkaline proteinases in the culture fluid of the studied fungi, EA/ml

Вид гриба	Нейтральные протеазы	Щелочные протеазы
<i>Fusarium avenaceum</i>	40,0	6,0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	14,0	9,0
<i>Helminthosporium teres</i>	50,0	5,4

Результаты и их обсуждение. Проведенные исследования влияния различных условий культивирования фитопатогенных микромицетов показали, что наиболее высокая секреция экзогенных пептидаз фитопатогенов наблюдалась на 20-е сутки культивирования при рН 7,0 и температуре 25 °С. В культуральной жидкости изученных патогенов обнаружена казеинолитическая и БАПАазная активность (табл. 1).

Как видно из табл. 1, активность щелочных пептидаз варьируется в пределах от 11 до 64 %

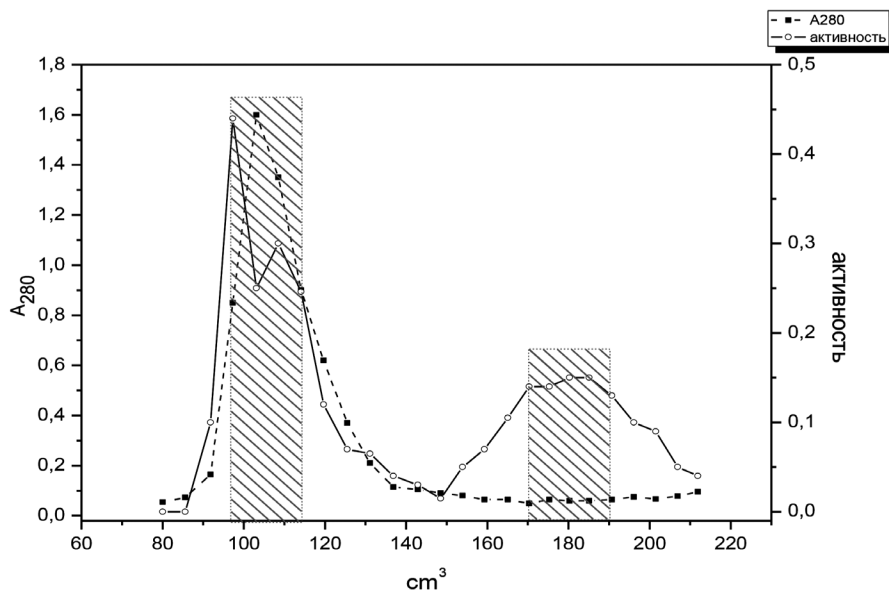


Рис. 1. Гель-хроматография на акрилексе P-30 белков из культуральной жидкости *Fusarium avenaceum*. Заштрихованные области – отобранные фракции с наибольшей активностью

Fig. 1. Acrylex P-30 gel chromatography of proteins from *Fusarium avenaceum* culture medium. Shaded areas – selected fractions with the highest activity

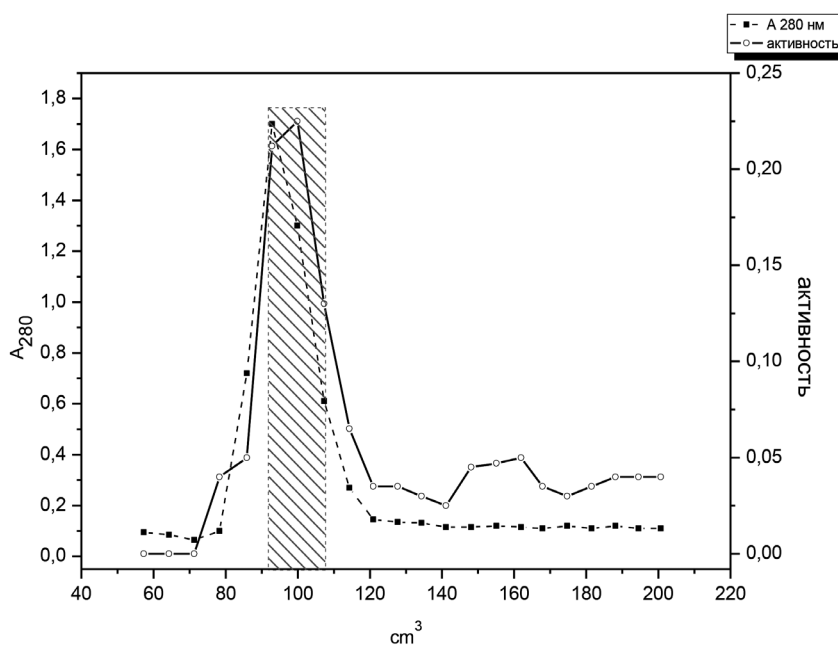


Рис. 2. Гель-хроматография на акрилексе P-30 белков из культуральной жидкости *Colletotrichum gloeosporioides*. Заштрихованная область – отобранные фракции с наибольшей активностью

Fig. 2. Acrylex P-30 gel chromatography of proteins from the culture medium *Colletotrichum gloeosporioides*. The shaded area – selected fractions with the highest activity

относительно общей казеинолитической активности. В процессе изучения экзогенных пептидаз патогенных микроорганизмов проведена работа по их выделению и частичной очистке. Общий вид гель-хроматографии экзогенных пептидаз представлен на рис. 1, 2.

Согласно результатам гель-хроматографии, в культуральной жидкости *F. avenaceum* имеются протеиназы, молекулярные массы которых заметно различаются. Первый хроматографический пик активности приходится на протеолитические ферменты с молекулярной массой в области 40 кДа, второй – на протеиназы с молекулярной массой около 25 кДа. Пик активности протеиназ

C. gloeosporioides находится в диапазоне 38–43 кДа. Анализ функциональных групп активного центра секретируемых пептидаз с использованием синтетических ингибиторов позволил установить, что среди секретируемых протеолитических ферментов преобладают цистеиновые протеазы, в меньшей степени присутствуют сериновые и аспартатные протеазы. В связи с тем что растения отвечают на атаку фитопатогенов синтезом патогенез-ассоциированных белков (PR-белки), среди которых существенное место занимают ингибиторы пептидаз, представляло интерес исследовать взаимосвязь между активностью этих ингибиторов и устойчивостью растений к болезням.

В табл. 2–4 приведены уровни активности ингибиторов трипсина и ингибиторов экзогенных пептидаз у различных по устойчивости к патогенам родов *Colletotrichum*, *Fusarium* и *Helminthosporium* бобовых и злаковых культур.

Таблица 2. Активность ингибиторов протеиназ у сортов люпина узколистного с различной устойчивостью к патогену, ИЕ/г абс. сух. массы

Table 2. The activity of proteinase inhibitors in varieties of narrow-leaved lupine with different resistance to the pathogen, IE/g a. s. m.

Сортообразец люпина	Активность ингибиторов		Устойчивость, %
	трипсина	экзогенных пептидаз <i>Colletotrichum gl.</i>	
Верас (н)	3,47 ± 0,01	0,59 ± 0,00	6
П-УБПЛ-12 (н)	3,67 ± 0,06	0,68 ± 0,04	0
Эдельвейс (н)	3,41 ± 0,02	0,76 ± 0,09	0
П-УБПЛ-11 (н)	3,39 ± 0,04	0,44 ± 0,02	27
Миртан (у)	2,14 ± 0,04	1,79 ± 0,00	84
Альянс (у)	2,86 ± 0,03	1,56 ± 0,02	72
Першцвет (у)	3,92 ± 0,01	1,32 ± 0,06	78
М-УПБЛ-32 (у)	3,06 ± 0,02	2,02 ± 0,01	80

Примечание. Сорта: н – неустойчивые, у – устойчивые (определены по ГОСТу).

Результаты исследований показали (см. табл. 2), что между активностью ингибиторов трипсина и активностью ингибиторов экзогенных пептидаз *Colletotrichum gl.* существует слабая отрицательная корреляционная связь ($r = -0,37$), между активностью ингибиторов трипсина и устойчивостью растений к болезни – также отрицательная ($r = -0,35$), а между активностью ингибиторов пептидаз фитопатогенного гриба, вызывающего антракноз, и устойчивостью к нему люпина узколистного – тесная положительная ($r = 0,89$).

Таблица 3. Активность ингибиторов трипсина и ингибиторов экзопептидаз *Helminthosporium teres* в зерне ячменя, ИЕ/г абс. сух. массы

Table 3. The activity of trypsin inhibitors and exopeptidase inhibitors of *Helminthosporium teres* in barley grain, IE/g a. s. m.

Сорт ячменя	Активность ингибиторов		Устойчивость, %
	трипсина	экзогенных пептидаз <i>Helminthosporium teres</i>	
Адам	16,58 ± 0,14	5,06 ± 0,17	80
Дева	17,71 ± 0,00	4,89 ± 0,19	40
Корнет	16,89 ± 0,00	5,21 ± 0,13	80
Магутны	16,45 ± 0,00	5,36 ± 0,00	90
Харис	15,70 ± 0,00	5,28 ± 0,06	60

Результаты исследований (табл. 3) позволили также выявить, что между активностью ингибиторов трипсина и активностью ингибиторов экзогенных пептидаз *Helminthosporium teres* существует тесная отрицательная корреляция ($r = -0,77$), между активностью ингибиторов трипсина и устойчивостью ячменя к гельминтоспориозу – средняя отрицательная ($r = -0,42$), а между активностью ингибиторов экзогенных пептидаз патогена и устойчивостью растений ячменя к *Helminthosporium teres* – высокая положительная ($r = +0,70$).

Таблица 4. Активность ингибиторов трипсина и экзопептидаз *Fusarium avenaceum* в семенах культурных растений, ИЕ/г абс. сух. массыTable 4. Activity of trypsin and exopeptidase inhibitors of *Fusarium avenaceum* in seeds of cultivated plants, IE/g a. s. m.

Сорт растений	Активность ингибиторов		Устойчивость, %
	трипсина	экзогенных пептидаз <i>Fusarium avenaceum</i>	
<i>Пшеница озимая</i>			
Аркадия	1,57 ± 0,01	4,27 ± 0,06	90
Ахим	0,63 ± 0,00	3,57 ± 0,29	69
Вилена	1,73 ± 0,00	3,83 ± 0,17	72
Элеганта	1,57 ± 0,00	3,83 ± 0,27	83
Мроя	1,23 ± 0,03	4,00 ± 0,18	82
Люцеус	1,26 ± 0,02	4,07 ± 0,16	80
<i>Пшеница яровая</i>			
КСИ 9/16	3,29 ± 0,00	5,10 ± 0,10	76
КСИ 27/16	3,19 ± 0,01	5,00 ± 0,00	88
№ 132	3,77 ± 0,05	4,25 ± 0,02	60
№ 139	3,90 ± 0,22	4,55 ± 0,07	90
<i>Рожь озимая</i>			
Пралеска	14,88 ± 0,41	3,89 ± 0,13	70
Плиса	16,40 ± 0,00	4,96 ± 0,05	80
Златка	13,68 ± 0,21	3,24 ± 0,16	52
Бинто	11,78 ± 0,00	1,07 ± 0,49	72
Винетто	11,97 ± 0,00	0,87 ± 0,06	55
Полновесная	9,39 ± 0,00	2,61 ± 0,00	70
Вердена	5,04 ± 0,08	9,10 ± 0,10	85
Юбилейная	4,23 ± 0,00	5,90 ± 0,10	84
Дзива × ПД5	4,90 ± 0,17	9,60 ± 0,00	84
Каупо × КП-97	5,47 ± 0,00	9,20 ± 0,00	83
Бирюза	5,03 ± 0,05	8,70 ± 0,00	68

Анализ данных табл. 4 показал, что у озимой пшеницы между активностью ингибиторов трипсина и активностью ингибиторов экзогенных пептидаз *Fusarium avenaceum* коэффициент корреляции равен +0,58. Примерно такая же корреляция между активностью ингибиторов трипсина и устойчивостью озимой пшеницы к фузариозу – +0,49, тогда как между активностью ингибиторов экзогенных пептидаз и устойчивостью к патогену она составляет +0,86. У пшеницы яровой эти показатели более резко расходятся и составляют –0,87; –0,19 и +0,51 соответственно.

Анализ зерна ржи озимой позволил установить наличие высокой обратной корреляционной зависимости ($r = -0,72$) между активностью ингибиторов трипсина и активностью ингибиторов экзогенных пептидаз фитопатогена. Установлено также, что между активностью ингибиторов трипсина и устойчивостью растений к фузариозу коэффициент корреляции составляет –0,53, а между активностью ингибиторов экзогенных пептидаз и устойчивостью к болезни – +0,68.

В табл. 5 представлены данные о действии ингибиторов экзогенных пептидаз из культурных растений на прорастание спор патогенов.

Как показали результаты исследований, ингибиторы пептидаз фитопатогенов из сортов ржи угнетали прорастание спор *Colletotrichum gl.* на 61,5–92,3 %, *Fusarium avenaceum* – на 44,5–75,6 %. Угнетение же прорастания спор этих патогенов ингибиторами из сортов озимой пшеницы составляло 46,2–80,8 и 28,9–77,8 % соответственно. Ингибиторы экзогенных пептидаз из различных сортов ячменя угнетали прорастание спор на 65,4–69,3 и 66,7–77,8 %, а из семян люпина – на 84,6–92,3 и 15,6–82,2 % соответственно.

Следует отметить, что наиболее высокое угнетение прорастания спор наблюдалось при действии ингибиторов экзогенных пептидаз из семян люпина желтого и узколистного в отношении фитопатогена *Colletotrichum gl.*, который является возбудителем болезни антракноза. Наиболее

Таблица 5. Действие ингибиторов экзогенных пептидаз из культурных растений на прорастание спор патогенных грибов

Table 5. Effect of exogenous peptidase inhibitors from cultivated plants on spore germination of pathogenic fungi

Сорт растений	<i>Colletotrichum gl.</i>		<i>Fusarium avenaceum</i>	
	Число проросших спор	Доля непроросших спор, %	Число проросших спор	Доля непроросших спор, %
Контроль	26	0	45	0
<i>Озимая рожь</i>				
Пралеска	4	84,6	11	75,6
Плиса	3	88,5	18	60,0
Винетта	2	92,3	19	57,8
Бинто	10	61,5	25	44,5
<i>Озимая пшеница</i>				
Нутка	14	46,2	32	28,9
Аркадий	5	80,8	10	77,8
<i>Ячмень кормовой</i>				
Дева	9	65,4	15	66,7
Харис	8	69,3	10	77,8
<i>Люпин узколистный</i>				
Миртан	2	92,3	24	46,7
Альянс	2	92,3	38	15,6
<i>Люпин желтый</i>				
Владко	2	92,3	8	82,2
Алтан	4	84,6	9	80,0

сильным было угнетение прорастания спор фитопатогена рода *Fusarium* ингибиторами экзогенных пептидаз из зерна злаковых культур. Полученные нами результаты свидетельствуют о наличии у культурных видов злаковых и бобовых растений ингибиторов пептидаз патогенов, специфичных к грибным возбудителям болезней. Имеющиеся литературные сведения подтверждают полученные нами результаты [15, 16].

Заключение. Результаты исследований показали наличие в семенах различных видов культурных растений не только белковых ингибиторов протеиназ животного происхождения (трипсина), но и ингибиторов экзогенных пептидаз фитопатогенных микроорганизмов. Проведенный анализ различных по устойчивости к патогенам родов *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Helminthosporium* сортообразцов злаковых и бобовых растений позволил выявить взаимосвязь между активностью ингибиторов трипсина, ингибиторов экзогенных пептидаз и устойчивостью растений к патогенам. Следует отметить, что тесная положительная корреляционная связь устойчивости растений к патогенам наблюдается не с активностью хорошо известных и широко распространенных ингибиторов трипсина, а с активностью ингибиторов, угнетающих экзогенные пептидазы, секретируемые патогенами ($r = 0,51-0,89$). Результаты исследований вносят вклад в выяснение механизма взаимодействия патоген–растение и роли в этом процессе специфических белковых ингибиторов экзогенных пептидаз патогенных микроорганизмов. Полученные сведения могут быть полезны при селекции растений и в дальнейшей работе по созданию препаратов защитного действия.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского и Российского фондов фундаментальных исследований (гранты № Б18Р-053 и № 18-54-00008-Бел.).

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian and Russian Foundation for Basic Research (grants no. B18R-053 and no. 18-54-00008-Bel.).

Список использованных источников

1. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity / M. Chandrasekaran [et al.] // J. Gen. Plant Pathol. – 2016. – Vol. 82, N 5. – P. 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
2. Павлюкова, Е. Б. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов (обзор) / Е. Б. Павлюкова, М. А. Белозерский, Я. Е. Дунаевский // Биохимия. – 1998. – Вып. 8. – С. 1039–1089.

3. Extracellular peptidases as possible markers of fungal ecology / T. A. Semenova [et al.] // *Appl. Soil Ecol.* – 2017. – Vol. 113. – P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.002>
4. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* / Y. Mercado-Flores [et al.] // *Mycologia.* – 2003. – Vol. 95, N 2. – P. 327–339. <https://doi.org/10.2307/3762044>
5. Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi / Y. A. Neto [et al.] // *Bioengineered.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 30–37. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1373531>
6. Ward, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi / O. P. Ward // *Biotechnol. Adv.* – 2012. – Vol. 30, N 5. – P. 1119–1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>
7. Mosolov V. V. The role of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review) / V. V. Mosolov, L. I. Grigor'eva, T. A. Valueva // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 2001. – Т. 37, № 2. – С. 131–140.
8. Активность ингибиторов протеаз и устойчивость пшеницы к возбудителю твердой головне / А. М. Ямалеев [и др.] // *Сельскохозяйств. биология.* – 1980. – Т. 15, № 1. – С. 143–144.
9. Взаимосвязь между уровнем ингибиторов протеиназ и устойчивостью озимой пшеницы к фузариозу / А. Г. Волчевская [и др.] // *Физиол. и биохимия культур. растений.* – 1991. – Т. 23, № 4. – С. 365–370.
10. Мосолов, В. В. Ингибиторы протеиназ из растений как полифункциональные белки (обзор) / В. В. Мосолов, Л. И. Григорьева, Т. А. Валуева // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 2001. – Т. 37, № 6. – С. 643–650.
11. Anson, M. Z. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin / M. Z. Anson // *J. Gen. Physiol.* – 1938. – Vol. 22, N 1. – P. 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
12. Erlanger, F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1961. – Vol. 95, N 2. – P. 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-x)
13. Гофман, Ю. Я. Определение активности ингибиторов трипсина в семенах гороха / Ю. Я. Гофман, И. М. Вайсблай // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 1975. – Т. 11, вып. 5. – С. 777–787.
14. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
15. Ибрагимов, Р. И. Подавление активности внеклеточных протеиназ патогенного гриба *Fusarium sp.* ингибиторами из семян и вегетативных органов растений / Р. И. Ибрагимов // *Докл. РАСХН.* – 1997. – № 2. – С. 15–17.
16. Яруллина, Л. Г. Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы в регуляции взаимоотношений растений с патогенами / Л. Г. Яруллина, А. Р. Ахатова, Р. И. Касимова // *Физиол. растений.* – 2016. – Т. 63, № 2. – С. 205–217.

References

1. Chandrasekaran M., Thangavelu B., Chun S. C., Sathiyabama M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. *Journal of General Plant Pathology*, 2016, vol. 82, no. 5, pp. 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
2. Pavlyukova E. B., Belozerskii M. A., Dunaevskii Ya. E. Extracellular proteolytic enzymes of mycelial fungi (review). *Biochemistry*, 1998, iss. 8, pp. 1039–1089 (in Russian).
3. Semenova T. A., Dunaevsky Y. E., Beljakova G. A., Borisov B. A., Shamraichuk I. L., Belozersky M. A. Extracellular peptidases as possible markers of fungal ecology. *Applied Soil Ecology*, 2017, vol. 113, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.002>
4. Mercado-Flores Y., Hernandez-Rodriguez C., Ruiz-Herrera J., Villa-Tanaca L. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 2003, vol. 95, no. 2, pp. 327–339. <https://doi.org/10.2307/3762044>
5. Neto Y. A., da Rosa Garzon N. G., Pedezzi R., Cabral H. Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi. *Bioengineered*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 30–37. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1373531>
6. Ward O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 2012, vol. 30, no. 5, pp. 1119–1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>
7. Mosolov V. V., Grigor'eva L. I., Valueva T. A. The role of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied of Biochemistry and Microbiology*, 2001, vol. 37, no. 2, pp. 131–140 (in Russian).
8. Yamaleev A. M., Mukhsinov V. Kh., Isaev R. F., Yamaleeva A. A., Krivchenko V. I. The activity of protease inhibitors and the resistance of wheat to the pathogen of hard smut. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural biology]*, 1980, vol. 15, no. 1, pp. 143–144 (in Russian).
9. Volchevskaya A. G., Adamovskaya V. G., Levitskii A. P., Vovchuk S. V. The relationship between the level of proteinase inhibitors and the resistance of winter wheat to Fusarioz. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii [Physiology and biochemistry of cultivated plants]*, 1991, vol. 23, no. 4, pp. 365–370 (in Russian).
10. Mosolov V. V., Grigor'eva L. I., Valueva T. A. Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins (review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied of Biochemistry and Microbiology*, 2001, vol. 37, no. 6, pp. 643–650 (in Russian).
11. Anson M. Z. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 1938, vol. 22, no. 1, pp. 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
12. Erlanger F., Kokowsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1961, vol. 95, no. 2, pp. 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-x)
13. Gofman Yu. Ya., Vaisblai I. M. Determination of the activity of trypsin inhibitors in pea seeds. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied of Biochemistry and Microbiology*, 1975, vol. 11, no. 5, pp. 777–787 (in Russian).

14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

15. Ibragimov R. I. Suppression of the activity of extracellular proteinases of the pathogenic fungus *Fusarium sp.* inhibitors from seeds and vegetative organs of plants. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk* [Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences], 1997, no. 2, pp. 15–17 (in Russian).

16. Yarullina L. G., Akhatova A. R., Kasimova R. I. Hydrolytic enzymes and their protein inhibitors in the regulation of plant relationships with pathogens. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 2016, vol. 63, no. 2, pp. 205–217 (in Russian).

Информация об авторах

Домаш Валентина Иосифовна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: valdomash@mail.ru

Белозерский Михаил Андреевич – профессор, заведующий отделом. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии МГУ (Ленинские горы, 1, стр. 40, 119992, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: mbeloz@belozersky.msu.ru

Дунаевский Яков Ефимович – гл. науч. сотрудник, профессор. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии МГУ (Ленинские горы, 1, стр. 40, 119992, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: dun@belozersky.msu.ru

Иванов Олег Александрович – канд. биол. наук, заведующий сектором. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: protlife1984@gmail.ru

Шарпио Тамара Петровна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Забрейко Светлана Алексеевна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Шабашова Татьяна Гарьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Valentina I. Domash – D. Sc. (Biol.), Chief researcher. Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valdomash@mail.ru

Mikhail A. Belozersky – Professor, Head of the Department. A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of the Moscow State University (1, build. 40, Leninskiye gory, 119992, Moscow, Russian Federation). E-mail: mbeloz@belozersky.msu.ru

Yakov E. Dunaevsky – Professor, Chief researcher. A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of the Moscow State University (1, build 40, Leninskiye gory, 119992, Moscow, Russian Federation). E-mail: dun@belozersky.msu.ru

Oleg A. Ivanov – Ph. D. (Biol.), Head of the Department. Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: protlife1984@gmail.ru

Tamara P. Sharpio – Researcher. Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Svetlana A. Zabreiko – Researcher. Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Tatyana G. Shabashova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).