



DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-4-390-402

Научная статья / Research article

Quantitative determination of trypsin inhibitor as a breeding marker in maize varieties with different resistance to fungal diseases

Galina V. Shekhvatova^{1*}, Viktor V. Ashin²,
Elena F. Sotchenko³

¹Scientific Research Production Company Gamma,
Pushchino, Russian Federation

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS,
Pushchino, Russian Federation

³Russian Research Institute of Maize, *Pyatigorsk, Russian Federation*

*Correspondent author: shgal06@gmail.com

Abstract. Determination of plant resistance to fungal pathogens is an important breeding component. Thus, the study of protein profiles from corn kernels (13 genotypes) revealed a constitutively pronounced 14 kDa protein, trypsin inhibitor (TI), which is present at a relatively high level of concentration in seven *Aspergillus flavus* — resistant maize lines, but at low concentrations or is absent in six sensitive lines. The 14 kDa trypsin inhibitor (TI) also showed antifungal activity against other mycotoxigenic species. In this regard, the task was to determine the content of TI in varieties of maize with known properties, resistance, or sensitivity to such fungal pathogens of maize as head smut, common smut, and Fusarium stalk rot. According to the data obtained, the content of TI varies in different varieties and can vary by 4 times. However, in disease-resistant varieties its content is increased, which may be the primary marker of resistance of the variety to fungal pathogens.

Key words: maize, trypsin inhibitor, trypsin-agarose, fungal pathogens, head smut, common smut, Fusarium stalk rot

Article history:

Received: 9 July 2019. Accepted: 04 November 2019

For citation:

Shekhvatova GV, Ashin VV, Sotchenko EF. Quantitative determination of trypsin inhibitor as a breeding marker in maize varieties with different resistance to fungal diseases. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2019; 14(4):390—402. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-4-390-402

© Шехватова Г.В., Ашин В.В., Сотченко Е.Ф., 2019.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Определение количества ингибитора трипсина как маркера селекции сортов кукурузы с различной устойчивостью к грибковым заболеваниям

Г.В. Шехватова^{1*}, В.В. Ашин², Е.Ф. Сотченко³

¹Научно-производственная фирма «Гамма»,
Пушино, Российская Федерация

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Российская Федерация

³Всероссийский научно-исследовательский институт кукурузы,
Пятигорск, Российская Федерация

*shgal06@gmail.com

Аннотация. Устойчивость растений к патогенным грибам является важной селекционной составляющей. Механизмы устойчивости очень разнообразны и могут включать в себя взаимодействия ферментов и их ингибиторов. В связи с этим проведено сравнение содержания ингибитора трипсина (ИТ), как возможного маркера селекции, в зрелых зернах сортов кукурузы с известной устойчивостью к пыльной головне, пузырчатой головне и стеблевой гнили. В качестве изучаемых объектов взяты 6 устойчивых и 12 чувствительных сортов. Для гарантированного извлечения из экстрактов молотых зерен кукурузы только ИТ применялась колоночная аффинная хроматография на трипсин-агарозе в аналитическом варианте. В результате выяснилось, что содержание ИТ варьирует внутри обеих групп сортов кукурузы: в устойчивой группе — максимум 347 и минимум 162 мкг/г, в чувствительной группе — максимум 200 и минимум 84 мкг/г. Соотношения максимумов к минимумам (2,3) одинаковы в обеих группах, но максимальное и минимальное содержание почти в два раза выше в группе устойчивых сортов кукурузы. В среднем в устойчивых сортах кукурузы содержание ИТ выше в 1,7 раза. Полученные данные подтверждают возможность использования содержащегося в кукурузных зернах ИТ в качестве маркера при выведении новых сортов кукурузы, устойчивых к пыльной головне, пузырчатой головне и стеблевой гнили.

Ключевые слова: кукуруза, ингибитор трипсина, трипсин-агароза, грибковые патогены, пыльная головня, пузырчатая головня, стеблевые гнили.

История статьи:

Поступила в редакцию 9 июля 2019 г. Принята к публикации 04 ноября 2019 г.

Для цитирования:

Шехватова Г.В., Ашин В.В., Сотченко Е.Ф. Определение количества ингибитора трипсина как маркера селекции сортов кукурузы с различной устойчивостью к грибковым заболеваниям // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2019. Т. 14. № 4. С. 390—402. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-4-390-402

Introduction

Plants are exposed to a large number of infectious pathogenic fungi. For maize, common smut, head smut, stem rot, fusarium disease are the most common fungal pathogens in the Russian Federation. While in countries with a hot and arid climate, pathogens of the genus *Aspergillus* are most common, the effects of which are most fully studied.

Thus, a study of protein profiles from maize grains (13 genotypes) revealed a constitutively expressed 14 kDa protein, a trypsin inhibitor (TI), which was present in relatively high concentrations in seven maize *A. flavus* resistant lines, but in low concen-

trations or was absent altogether in six sensitive lines [1]. 14 kDa TI also showed antifungal activity against other mycotoxigenic species [2].

Although plants do not have an immune system, they use protective mechanisms, including the synthesis of low molecular weight compounds, proteins and peptides with antifungal activity. To date, 13 classes of antifungal proteins are known, among them PR-1 proteins, 1,3- β -glucanases, chitinases, chitin-binding proteins, thaumatin-like proteins, defensins, cyclophilin-like proteins, proteinase inhibitors and other proteins [3].

Proteinase inhibitors are an integral part of protection system against pests and diseases [4]. It was shown that pathogenic fungi *Fusarium* and *Helminthosporium* secrete enzymes into the environment that break down protein and synthetic substrates. Different types of fungi are characterized by unequal activity of extracellular proteinases. The high content of extracellular proteinase inhibitors of the pathogenic fungi *Fusarium* and *Helminthosporium* in the seeds of pea, buckwheat, and corn can be one of the important factors ensuring the resistance of these crops to root rot [5].

Similarly, TI content of 14 kDa in maize seeds was shown to correlate with resistance to *A. flavus* disease [3] and, therefore, aflatoxin accumulation.

In addition to trypsin-inhibiting activity, TI from 14 kDa maize was shown to have alpha-amylase activity, and, when added to the nutrient medium, it suppressed growth of conidia and growth of phytopathogen hyphae *Aspergillus flavus*, *Asp. paprasiticus*, *F. moniliforme*, and also showed antifungal activity against other mycotoxigenic species [2, 6].

We held experiments to study TI content of 14 kDa in maize samples with known properties, resistance or sensitivity to fungal pathogens, such as head smut (pathogen — *Sphacelotheca reiliana*), common smut (pathogen — *Ustilago maydis*, *U. zea*) and stalk rot of maize (pathogen — *Fusarium moniliforme* fungus).

Materials and methods

Object of study. Maize varieties with known properties of resistance (sensitivity) to fungal pathogens (head smut, common smut and stalk rot) were provided from Russian Research Institute of Maize in Pyatigorsk. Six varieties resistant to fungal infections and 12 varieties sensitive to fungal pathogens were investigated.

Sample preparation. The seeds were ground, each maize sample (10 g) was extracted with 20 ml of a 0.2 M NaCl solution, stirred for 2.5 hours, then filtered, and approximately 15 ml of extract was obtained. To each sample, 6 g of ammonium sulfate (60% concentration) was added, left in the refrigerator for 18 hours overnight. Then it was centrifuged for 10 minutes, the precipitate was dissolved in 5 ml of buffer (20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 6,8) and used for application on trypsin agarose or on HPLC.

Trypsin agarose affinity chromatography. An affinity sorbent, trypsin agarose, was chosen as the isolation method [7]. Trypsin agarose was obtained by immobilizing TPCK trypsin on BrCN agarose.

To quantify the method, a standard sample of 14 kDI TI, 200 μ g in 1 ml of equilibration buffer was used.

Samples of 1.2 ml of each extract were applied to a trypsin-agarose column (4 ml) at a rate of 0.5 ml/min. After washing with equilibration buffer (10 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 7.0), an elution with 0.15 M acetic acid was performed.

HPLC (hydrophobic chromatography). Sample analysis was performed on an RP-304 (250×4.6) Bio Rad column. The following conditions were used: 3' — 0% CH₃CN; 40' — 100% CH₃CN; 50' — 100% CH₃CN, 65' — 0% CH₃CN.

200 µg of 14 kDI TI was previously used as a standard.

Electrophoresis in page. SDS-PAGE 15% gel electrophoresis was used to analyze samples.

Results

6 smut-resistant maize varieties and 12 varieties susceptible to smut and stalk rot were studied. The samples of maize grains with known properties of resistance (sensitivity) to fungal pathogens were provided from Russian Research Institute of Maize in Pyatigorsk.

Peak areas obtained by trypsin-agarose chromatography were calculated by mathematical methods. The amount of 14 kDa TI was determined on the basis of calibration; for this, a sample containing 200 µg TI was used (Fig. 1).

A typical chromatography picture of extracts of maize kernels on trypsin agarose is shown in Fig. 2.

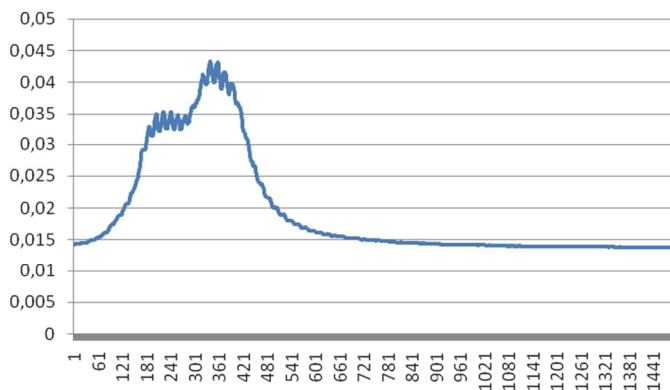


Fig. 1. Standard chromatography curve on trypsin-agarose. In this case, 200 µg of 14 kDa TI is applied for calibration

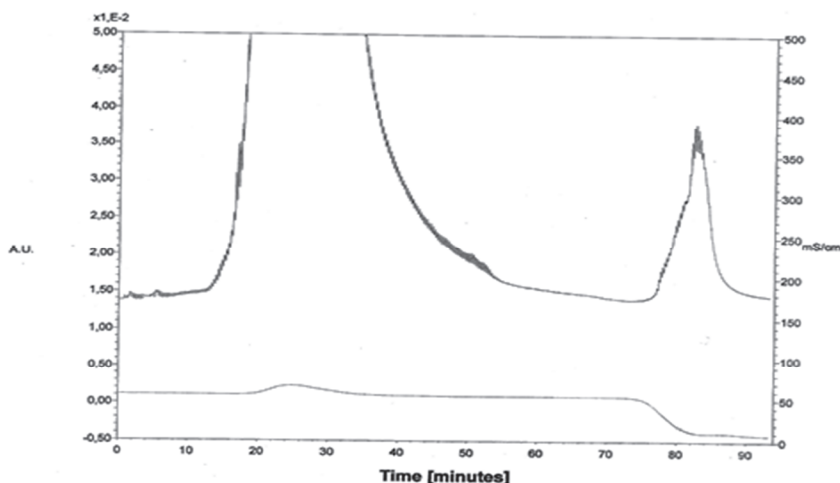


Fig. 2. Typical chromatography curve of maize grains extract on trypsin-agarose: second peak — TI elution

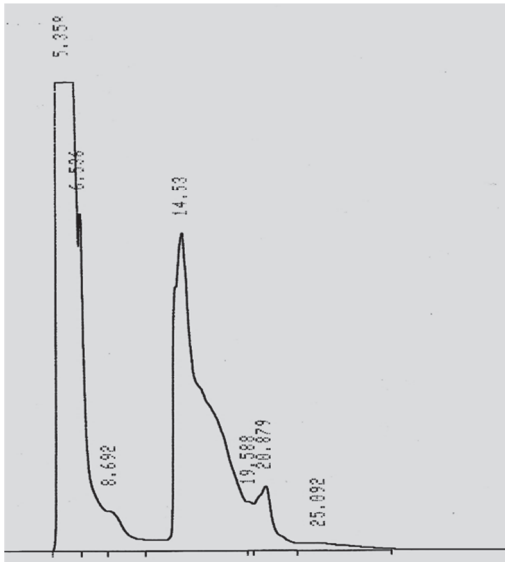


Fig. 3. Typical elution profile of maize grain extract on HPLC

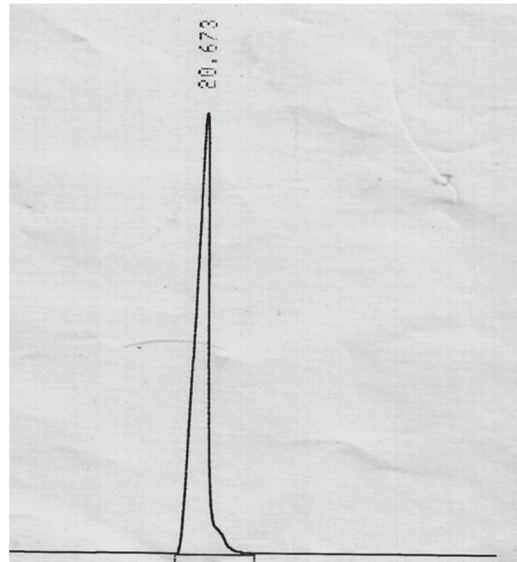


Fig. 4. 14 kDa trypsin inhibitor as a standard in HPLC (200 µg)

According to HPLC, 4 extracts of different maize varieties were studied (Fig. 3, 4). The following results were obtained:

- 1st sample — 4.14% 14 kDa TI (resistant to *Sphacelotheca*, R);
- 2nd sample — 0.09% 14 kDa TI (susceptible to *Sphacelotheca*, S);
- 3rd sample — 3.40% 14 kDa TI (resistant to *Ustilago*, R);
- 4th sample — 3.60% 14 kDa TI (susceptible to *Ustilago*, S).

Subsequently, an analysis of extracts of different varieties of maize grains was carried out (R — resistant varieties, S — susceptible) using affinity chromatography on trypsin agarose (Table 1). An additional 18 samples were examined. A standard sample containing 200 µg of 14 kDI TI was used for calibration.

Table 1

Results of screening maize varieties by quantity of 14 kDa trypsin inhibitor

Elution peak area	Calculated TI per 1 g of corn grains	Resistance to fungal diseases
11.3	290 mcg	R <i>Ustilago</i> (580/14)
6.85	174 mcg	VR <i>Sphacelotheca</i> (4716/11)
8.94	228 mcg	R <i>Ustilago</i> (3867/11)
13.59	347 mcg	R <i>Ustilago</i> (3941/11)
6.3	162 mcg	VR <i>Sphacelotheca</i> (1358/12)
10.9	278 mcg	VR <i>Sphacelotheca</i> (4683/11)
3.29	84 mcg	S <i>Ustilago</i> , <i>Fusarium</i> (2617/09)
4.53	115 mcg	S <i>Fusarium</i> 2597/09
3.59	86 mcg	S <i>Sphacelotheca</i> П2/27 2013
6.35	162 mcg	S <i>Sphacelotheca</i> (3398/14)
5.83	149 mcg	S <i>Fusarium</i> (2613/09)
7.73	197 mcg	S <i>Ustilago</i> (2599/09)
7.6	190 mcg	S <i>Ustilago</i> (2075/12)
8.09	200 mcg	S <i>Ustilago</i> (2613/09)
5.8	140 mcg	S <i>Ustilago</i> (1200/13)
5.5	132 mcg	S <i>Ustilago</i> (3358/14)
5.7	138 mcg	S <i>Ustilago</i> (1506/14)
7.7	190 mcg	S <i>Ustilago</i> (605/12)
7.83	200 mcg	TI, standard sample

Results and discussion

Earlier [1], in the study of maize grain extracts (13 genotypes), the presence of constitutive 14 kDa TI at a relatively high concentration level was shown in seven *A. flavus* resistant varieties of maize, but in six susceptible varieties TI was present in low concentration or was absent altogether.

The mechanism of action of TI against fungal growth may be partially due to the inhibition of fungal amylase, which restricts access of *A. flavus* to simple sugars [5], which is necessary not only for the growth of pathogenic fungi, but also for their production of toxins. TI also demonstrated antifungal activity against other mycotoxigenic species [2].

In [6], TI content was studied in different varieties of Indian maize, resistant and susceptible to *A. Parasiticus*, the data are shown in Table 2.

Proteomic analysis of wheat germ proteins and endosperm proteins of maize varieties resistant and susceptible to *Aspergillus flavus*, separated by two-dimensional electrophoresis (2 D PAGE), showed that there were 5 more constitutive marker proteins, namely — storage proteins (globulin 1 and globulin 2), proteins of late embryogenesis (LEA), proteins associated with drought (LEA3 and LEA14) or osmotic stress (WSI18 and aldose reductase) and proteins associated with heat stress (HSP16.9). Aldose reductase activity, measured in resistant and susceptible genotypes before and after infection, indicates the importance of constitutive levels of this enzyme for resistance [7].

Table 2

Trypsin inhibitor concentration in Indian maize varieties [6]

Variety	Trypsin inhibitor concentration in Indian maize varieties	Response to <i>A. parasiticus</i> infections
LM-6	242.2	Resistant
P(Y)S-8-185-6-B8B	258	
GY-37-1-328	420	
CML-142	421-2	
CML-176	90	Susceptible
Pob-24-FSRS-C-1	90	
Hyd-9745	132	
Maduri	134	
CML-185	158	
CML-430	188	
CML-291	266	Moderately susceptible
CML-161	36	
African tail	130	
CML-150	130	
MPQ-13	131	
Pob31(ALM) HHH-XB	132	
Local	190.8	
Shaktiman-1	211.6	
CM-119	302	
Panchaganga	356	

Most proteomic studies are related to resistance to genus *Aspergillus* (*flavus* and *parasiticus*) [8]; our studies of the content of TI in different varieties of maize resistant (susceptible) to smut and stalk rot showed that the number of TI was increased in resistant varieties and reduced in susceptible varieties, however, there were intermediate variants, called in the literature as “moderately susceptible” [6].

Conclusions

Based on the importance of presence of proteinase inhibitors in plants, various maize varieties were screened for trypsin inhibitor content. Isolation of TI was performed using an affinity sorbent, trypsin agarose.

Estimating the amount of TI in maize grains can serve as a primary marker of resistance (susceptibility) to fungal pathogens such as smut and stalk rot. The number of TIs is increased in resistant varieties and reduced in susceptible varieties, but there are also intermediate variants — varieties, which are called moderately susceptible in the literature.

Введение

Растения подвергаются воздействию большого количества инфекционных патогенных грибов. Для кукурузы наиболее распространенными грибковыми патогенами на территории РФ являются пыльная головня, пузырчатая головня, стеблевые гнили, фузариоз. В то время как в странах с жарким и засушливым климатом наиболее распространены патогены рода *Aspergillus*, воздействие которых наиболее полно изучено.

Так, исследование профилей белка из зерен кукурузы (13 генотипов) выявили конститутивно-выраженный 14 кДа белок, ингибитор трипсина (ТИ), который присутствовал в относительно высоких концентрациях в семи устойчивых к *A. flavus* линиях кукурузы, но в низких концентрациях или отсутствовал вообще в шести чувствительных линиях [1]. 14 кДа ТИ также проявлял антигрибковую активность против других микотоксикогенных видов [2].

Хотя растения не имеют иммунной системы, они используют защитные механизмы, включающие синтез низкомолекулярных соединений, белков и пептидов, имеющих антигрибковую активность. К настоящему времени известно 13 классов антигрибковых белков, среди них можно отметить PR-1 белки, 1,3-β-глюканазы, хитиназы, хитин-связывающие белки, тауматин подобные белки, дефензины, циклофилин-подобные белки, ингибиторы протеиназ и другие белки [3].

Ингибиторы протеиназ являются составной частью системы защиты от вредителей и болезней [4]. Было показано, что патогенные грибы *Fusarium* и *Helminthosporium* выделяют в окружающую среду ферменты, расщепляющие белковые и синтетические субстраты. Разные виды грибов характеризуются неодинаковой активностью внеклеточных протеиназ. Высокое содержание ингибиторов внеклеточных протеиназ патогенных грибов *Fusarium* и *Helminthosporium* в семенах гороха, гречихи и кукурузы может служить одним из важных факторов, обеспечивающих устойчивость этих культур к поражению корневыми гнилями [5].

Аналогично, было показано, что содержание ИТ 14 кДа в семенах кукурузы коррелирует с устойчивостью сортов к заболеванию *A. flavus* [3] и, соответственно, накоплению афлатоксина.

ИТ из кукурузы 14 кДа, как было показано, помимо трипсин-ингибирующей активности, обладает активностью альфа-амилазы, и, будучи добавленным в питательную среду, он подавлял прорастание конидий и рост гиф фитопатогенов *Aspergillus flavus*, *Asp. paprasiticus*, *F. moniliforme*, а также проявлял антигрибковую активность против других микотоксикогенных видов [2, 6].

Нами была предпринята экспериментальная работа по исследованию содержания ИТ 14 кДа в образцах кукурузы с заведомо известными свойствами, устойчивости или чувствительности к грибковым патогенам, таким как пыльная головня (возбудитель — *Sphacelotheca reiliana*), пузырчатая головня (возбудитель болезни — *Ustilago maydis*, *U. zaeae*) и стеблевые гнили кукурузы (возбудитель — гриб *Fusarium moniliforme*).

Материалы и методы

Объект исследования. Сорты кукурузы с известными свойствами устойчивости (чувствительности) к грибковым патогенам (пыльная головня, пузырчатая головня, стеблевые гнили) были предоставлены из ВНИИ кукурузы г. Пятигорск. Были исследованы 6 сортов, устойчивых к грибковым инфекциям и 12 сортов, чувствительных к грибковым патогенам.

Подготовка образцов. Семена размалывали, каждый образец кукурузы (10 г) экстрагировали 20 мл 0,2 М раствора NaCl, перемешивали 2,5 ч, затем фильтровали, получали примерно по 15 мл экстракта. К каждому образцу добавляли по 6 г сульфата аммония (60% насыщения), оставляли в холодильнике на ночь на 18 ч. Затем центрифугировали 10 мин, осадок растворяли в 5 мл буфера (20 мМ трис-HCl, 0,15 М NaCl, pH 6,8). Использовали для нанесения на трипсин-агарозу или на ВЭЖХ.

Аффинная хроматография на трипсин-агарозе. В качестве метода выделения был выбран аффинный сорбент — трипсин-агароза [7]. Трипсин-агароза получена иммобилизацией ТРСК-трипсина на ВrCN-агарозе.

Для количественной оценки метода использовали стандартный образец 14 кДа ТИ, 200 мкг в 1 мл уравнивающего буфера.

Образцы по 1,2 мл каждого экстракта наносили на колонку с трипсин-агарозой (4 мл) со скоростью 0,5 мл/мин. После промывки уравнивающим буфером (10 мМ трис-HCl, 0,3 М NaCl, pH 7,0) проводили элюцию 0,15 М раствором уксусной кислоты.

ВЭЖХ (гидрофобная хроматография). Анализ образцов проводили на колонке RP-304 (250x4,6) Bio Rad. Использовали следующие условия: 3' — 0% CH₃CN; 40' — 100% CH₃CN; 50' — 100% CH₃CN, 65' — 0% CH₃CN.

200 мкг 14 кДа ТИ предварительно использовали в качестве стандарта.

Электрофорез в ПААГ. SDS-PAGE электрофорез в 15% геле использовали для анализа образцов.

Результаты

Исследовано 6 устойчивых к пузырчатой головне и пыльной головне и 12 сортов, неустойчивых к пузырчатой головне, пыльной головне и стеблевым гнилям. Данные образцы зерен кукурузы с заведомо известными свойствами устойчивости (чувствительности) к таким грибковым патогенам были предоставлены из ВНИИ кукурузы г. Пятигорск.

Площади пиков, полученных в результате хроматографии на трипсин-агарозе, рассчитывались математическими методами. Количество 14 кДа ТИ определяли на основании калибровки, для этого использовали образец, содержащий 200 мкг ТИ (рис. 1).

Типичная картина хроматографии экстрактов зерен кукурузы на трипсин-агарозе приведена на рис. 2.

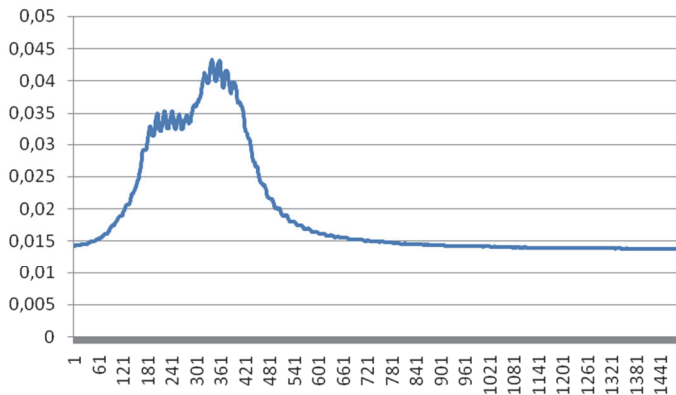


Рис. 1. Стандартная кривая хроматографии с трипсин-агарозы. В данном случае нанесено 200 мкг 14 кДа ТИ для калибровки

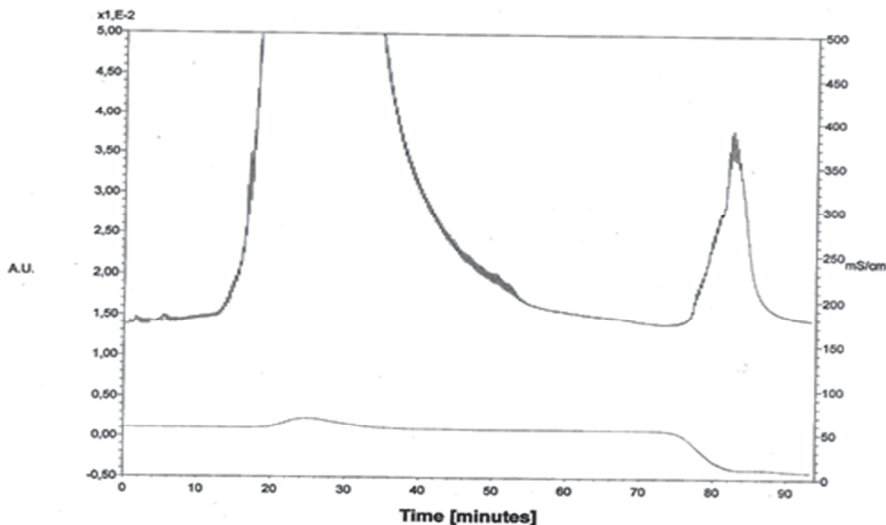


Рис. 2. Типичная кривая хроматографии экстракта зерен кукурузы на трипсин-агарозе: второй пик — элюция ТИ

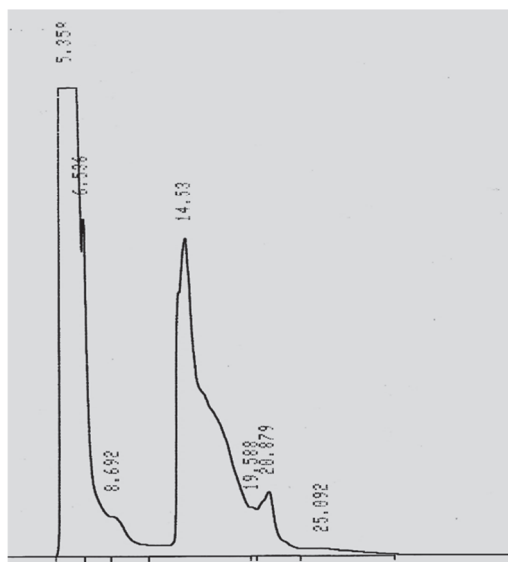


Рис. 3. Типичный профиль элюции экстракта зерен кукурузы на ВЭЖХ

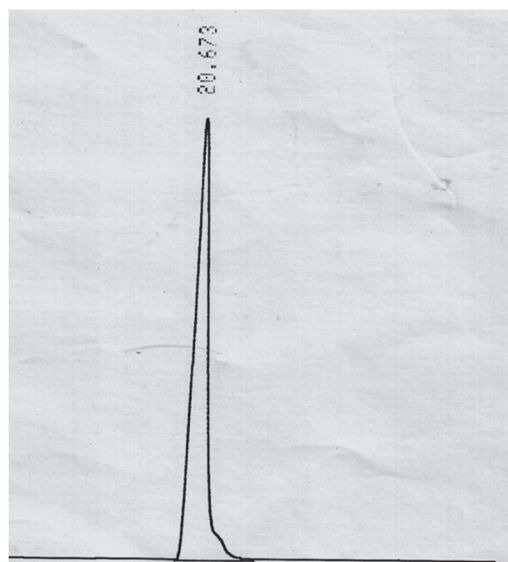


Рис. 4. 14 кДа ТИ в качестве стандарта при ВЭЖХ (200 мкг)

Методом ВЭЖХ были исследованы 4 экстракта разных сортов кукурузы (рис. 3, 4). Были получены следующие результаты:

- 1-й образец — 4,14% 14 кДа ТИ (устойчив к пыльной головне, R);
- 2-й образец — 0,09% 14 кДа ТИ (чувствителен к пыльной головне, S);
- 3-й образец — 3,40% 14 кДа ТИ (устойчив к пузырчатой головне, R);
- 4-й образец — 3,60% 14 кДа ТИ (чувствителен к пузырчатой головне, S).

В дальнейшем был проведен анализ экстрактов зерен разных сортов кукурузы (R — устойчивые сорта, S — чувствительные) с использованием аффинной хроматографии на трипсин-агарозе (табл. 1). Было исследовано еще 18 образцов. Для калибровки использовали стандартный образец, содержащий 200 мкг 14 кДа ТИ.

Таблица 1

Результаты скрининга сортов кукурузы по количеству 14 кДа ТИ

Площадь пика элюции	Рассчитанное количество ТИ на 1 г зерен кукурузы	Устойчивость к грибковым заболеваниям
11,3	290 мкг	R пuz гол (580/14)
6,85	174 мкг	VR пыльн гол (4716/11)
8,94	228 мкг	R пuz гол (3867/11)
13,59	347 мкг	R пuz гол (3941/11)
6,3	162 мкг	VR пыльн гол (1358/12)
10,9	278 мкг	VR пыльн гол (4683/11)
3,29	84 мкг	S пuz гол, стебл гн (2617/09)
4,53	115 мкг	S стебл гн 2597/09
3,59	86 мкг	S пыльн гол П2/27 2013 г
6,35	162 мкг	S пыльн гол (3398/14)
5,83	149 мкг	S стебл гнили (2613/09)
7,73	197 мкг	S пuz гол (2599/09)
7,6	190 мкг	S пuz гол (2075/12)
8,09	200 мкг	S пuz гол (2613/09)
5,8	140 мкг	S пuz гол (1200/13)
5,5	132 мкг	S пuz гол (3358/14)
5,7	138 мкг	S пuz гол (1506/14)
7,7	190 мкг	S пuz гол (605/12)
7,83	200 мкг	ТИ, стандартный образец

Обсуждение результатов

Ранее [1], при исследовании экстрактов зерен кукурузы (13 генотипов) было показано присутствие конститутивного 14 кДа ТИ на относительно высоком уровне концентрации в семи устойчивых к *A. flavus* сортах кукурузы, но в шести чувствительных сортах ТИ присутствовал в низкой концентрации или отсутствовал вовсе.

Механизм действия ТИ против грибкового роста может быть частично обусловлен ингибированием грибковой амилазы, приводящим к ограничению доступа *A. flavus* к простым сахарам [5], необходимым не только для роста патогенных грибов, но и для производства ими токсинов. ТИ также продемонстрировал противогрибковую активность и в отношении других микотоксигенных видов [2].

В [6] исследовалось содержание ТИ в разных сортах индийской кукурузы, устойчивых и чувствительных к *A. Parasiticus*, данные приведены в табл. 2.

Протеомный анализ белков зародышей пшеницы и белков эндосперма сортов кукурузы, устойчивых и чувствительных к *Aspergillus flavus*, разделенных методом двумерного электрофореза (2 D PAGE), показал, что имеется еще 5 конститутивных маркерных белков, а именно: запасающие белки (глобулин 1 и глобулин 2), белки позднего эмбриогенеза (LEA), белки, связанные с засухой (LEA3 и LEA14) или осмотическим стрессом (WSI18 и альдозоредуктаза) и белки, связанные с тепловым стрессом (HSP16.9). Альдозоредуктазная активность, измеряемая у резистентных и восприимчивых генотипов до и после заражения, свидетельствует о важности конститутивных уровней этого фермента для устойчивости [7].

Таблица 2

Скрининг сортов индийской кукурузы устойчивых и чувствительных к *A. parasiticus*, на содержание ТИ [6]

Сорт	Концентрация ингибитора трипсина в индийских сортах кукурузы	Чувствительность к <i>A. parasiticus</i> infections
LM-6	242.2	Устойчивые
P(Y)S-8-185-6-B8B	258	
GY-37-1-328	420	
CML-142	421-2	
CML-176	90	Чувствительные
Pob-24-FSRS-C-1	90	
Hyd-9745	132	
Maduri	134	
CML-185	158	
CML-430	188	
CML-291	266	
CML-161	36	Относительно устойчивые
African tail	130	
CML-150	130	
MPQ-13	131	
Pob31(ALM)	132	
HHH-XB		
Local	190.8	
Shaktiman-1	211.6	
CM-119	302	
Panchaganga	356	

Большинство протеомных исследований связано с изучением устойчивости к роду *Aspergillus* (*flavus* и *parasiticus*) [8]; проведенные нами исследования содержания ТИ в разных сортах кукурузы, устойчивых (чувствительных) к пыльной головне, пузырчатой головне, стеблевым гнилям показали, что количество ТИ повышено в устойчивых сортах и понижено в чувствительных, однако имеются и промежуточные варианты, в литературе такие сорта названы «умеренно чувствительными» [6].

Выводы

Исходя из важности присутствия ингибиторов протеиназ в растениях предприняли скрининг разных сортов кукурузы на содержание ингибитора трипсина. Выделение ТИ производили с использованием аффинного сорбента — трипсин-агарозы.

Оценка количества ТИ в зернах кукурузы может служить первичным маркером устойчивости (чувствительности) к грибковым патогенам, таким как пыльная головня, пузырчатая головня и стеблевые гнили. Количество ТИ повышено в устойчивых сортах и снижено в чувствительных, однако имеются и промежуточные варианты — сорта, в литературе называемые умеренно чувствительными.

References

1. Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Guo BZ, Cleveland TE, Russin JS. Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14-kDa protein. *Phytopathology*. 1998; 88(4):276—281. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.4.276
2. Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(3):1320—1324.
3. Selitrennikoff CP. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(7):2883—2894. doi: 10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001
4. Zaynutdinova GF. *Belkovye inhibitory ekzogennykh proteinaz v tkanyakh rastenii i ikh fiziologicheskaya rol'* [Protein inhibitors of exogenous proteinases in plant tissues and their physiological role]. [Dissertation] Ufa; 2001. (In Russ).
5. Chen ZY, Brown RL, Russin JS, Lax AR, Cleveland TE. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* α -amylase. *Phytopathology*. 1999; 89:902—907. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.10.902
6. Hajare SS, Hajare SN, Sharma A. Screening of Indian corn varieties for aflatoxin resistance. *BARC News Letter, Founder's Day Special Issue*. 2006; (273):218—230.
7. Lei MG, Reeck GR. Combined use of trypsin-agarose affinity chromatography and reversed — phase high-performance liquid chromatography for the purification of single-chain protease inhibitor from corn seeds. *Journal of Chromatography*. 1986; 363(2):315—321. doi: 10.1016/S0021-9673(01)83751-1
8. Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE. Proteomics analysis of kernel embryo and endosperm proteins of corn genotypes resistant or susceptible to *Aspergillus flavus* infection. In: Robens J, Cary JW, Campbell BC. (eds.) *Proceedings of the USDA-ARS Aflatoxin Elimination Workshop held at Yosemite*. 2000. p. 88.
9. Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology*. 2002; 92(10):1084—1094. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.10.1084
10. Mosolov VV, Valueva TA. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005; 41(3):227—246. doi: 10.1007/s10438-005-0040-6

Библиографический список

1. Chen Z.-Y., Brown R. L., Lax A.R., Guo B.Z., Cleveland T.E., Russin J.S. Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14-kDa Protein // *Phytopathology*. 1998. Vol. 88. No. 4. P. 276—281. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.4.276
2. Chen Z-Y., Brown R.L., Lax A.R., Cleveland T.E., Russin J.S. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. No. 65. P. 1320—1324.
3. Selitrennikoff C.P. Antifungal proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. No 7. P. 2883—2894. doi: 10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001
4. Зайнутдинова Г.Ф. Белковые ингибиторы экзогенных протеиназ в тканях растений и их физиологическая роль: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2001.
5. Chen Z-Y., Brown R.L., Russin J.S., Lax A.R., Cleveland T.E. A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* α -amylase // *Phytopathology*. 1999. No 89. P. 902—907. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.10.902
6. Hajare S.S., Hajare S.N., Sharma A. Screening of indian corn varieties for aflatoxin resistance // *Founder's day*. 2006. No. 273. P. 218—230.
7. Lei M.-G., Reeck G.R. Combined use of trypsin-agarose affinity chromatography and reversed — phase high-performance liquid chromatography for the purification of single-chain protease inhibitor from corn seeds // *J. Chrom.* 1986. No. 363. P. 315—321. doi: 10.1016/S0021-9673(01)83751-1
8. Chen Z-Y., Brown R.L., Damann K.E., Cleveland T.E. Proteomics analysis of kernel embryo and endosperm proteins of corn genotypes resistant or susceptible to *Aspergillus flavus* infection // *Proceedings of the USDA-ARS Aflatoxin Elimination Workshop held at Yosemite / eds Robens J., Cary J.W., Campbell B.C.* CA, 2000. P. 88.
9. Chen Z-Y., Brown R.L., Damann K.E., Cleveland T.E. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis // *Phytopathology*. 2002. No. 92. P. 1084—1094. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.10.1084
10. Mosolov V.V., Valueva T.A. Proteinase inhibitors and their function in plants: review // *Appl Biochiv Microbiol.* 2005. No 41. P. 227—246. doi: 10.1007/s10438-005-0040-6

About the authors:

Shekhvatova Galina Vladimirovna — Senior Researcher, Research and Production Company Gamma, Pushchino, Russian Federation, 142290; e-mail: shgal06@gmail.com

Ashin Viktor Vasilievich — Candidate of Biological sciences, Junior Researcher, Laboratory of Adaptation of Microorganisms, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 5 Nauki avenue, Pushchino, Russian Federation, 142290; e-mail: ashin@ibpm.pushchino.ru

Sotchenko Elena Fedorovna — Candidate of Biological sciences, leading researcher, Department of Selection for immunity, Russian Research Institute of Corn, 14-B Ermolova st., Pyatigorsk, 357528, Russian Federation; e-mail: elena.minenkova@list.ru

Об авторах:

Шехватова Галина Владимировна — старший научный сотрудник, Научно-производственная фирма «Гамма», Российская Федерация, 142290, г. Пушкино; e-mail: shgal06@gmail.com

Ашин Виктор Васильевич — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Российская Федерация, 142290, г. Пушкино, проспект Науки, д. 5; e-mail: ashin@ibpm.pushchino.ru

Сотченко Елена Федоровна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела селекции на иммунитет ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института кукурузы, Российская Федерация, 357528, г. Пятигорск, ул. Ермолова, 14-Б; e-mail: elena.minenkova@list.ru