



УДК 577.152.34.042

## РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ В ЗАЩИТЕ КАРТОФЕЛЯ

© 2003 г. Т. А. Валуева<sup>#</sup>, Т. А. Ревина, Е. Л. Гвоздева, Н. Г. Герасимова, О. Л. Озерецковская

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

Поступила в редакцию 06.09.2002 г. Принята к печати 02.12.2002 г.

При механическом раневом повреждении или инфицировании возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans* в экссудатах клубней картофеля накапливались только ингибиторы сериновых протеиназ. Среди них преобладали белки, близкие по структуре присутствующим в здоровых клубнях ингибитору трипсина с молекулярной массой 22 кДа и ингибитору сериновых протеиназ с молекулярной массой 21 кДа, состоящему из двух полипептидных цепей, а также картофельному ингибитору химотрипсина I с молекулярной массой 8 кДа, который синтезировался *de novo*. Накапливающиеся белки подавляли рост гиф и прорастание зооспор *P. infestans*. Обработка сигнальными соединениями (элиситорами), жасмоновой и арахидоновой кислотами, усиливала накопление этих ингибиторов в клубнях в ответ на раневой стресс, в то время как салициловая кислота блокировала этот процесс. Полученные данные позволяют сделать предположение, что липоксигеназный метаболизм играет существенную роль в трансдукции сигнала защитной системы покоящихся клубней картофеля.

*Ключевые слова:* ингибиторы протеиназ; клубни картофеля; *Phytophthora infestans*; элиситоры.

### ВВЕДЕНИЕ

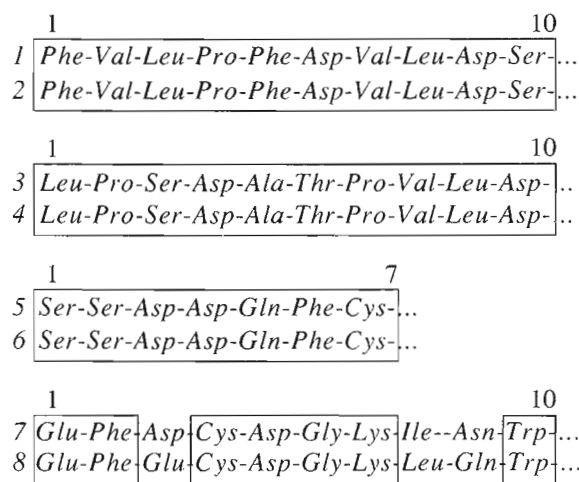
В процессе эволюции растения выработали защитные механизмы, позволяющие им противостоять неблагоприятным воздействиям, в том числе вредителям и патогенным микроорганизмам. Важными компонентами большинства таких механизмов являются ингибиторы протеиназ, широко распространенные в репродуктивных и запасующих органах растений. Одни из них представляют собой конститутивные компоненты, другие – индуцируются в ответ на неблагоприятные воздействия. В наших ранних работах было показано, что большинство конститутивных белков клубней картофеля сорта Истринский представлены ингибиторами сериновых и цистеиновых протеиназ [1–3]. Из здоровых клубней картофеля были выделены и охарактеризованы три белка-ингибитора протеолитических ферментов с молекулярными массами 21, 22 и 23 кДа. Молекула 21-кДа белка состояла из двух полипептидных цепей с молекулярными массами 16.5 и 4.5 кДа, соединенных дисульфидной связью. Молекулы 22- и 23-кДа белков представлены одной полипептидной цепью. 21-кДа белок эффективно подавлял активность эластазы из лейкоцитов человека ( $K_i$  0.8 нМ) и слабее действовал на трипсин ( $K_i$  1.5 нМ) и химотрипсин ( $K_i$  1.8 нМ). 22-кДа белок эффективно действовал на трипсин ( $K_i$  0.6 нМ)

и слабо – на химотрипсин ( $K_i$  24.9 нМ). 23-кДа белок являлся ингибитором цистеиновых протеиназ ( $K_i$  0.3 нМ для папаина) и не взаимодействовал с сериновыми протеиназами. Анализ *N*-концевых аминокислотных последовательностей этих белков указывал на высокую степень их гомологии и свидетельствовал в пользу того, что биосинтез этих белков кодируется семейством гомологичных генов [1, 2]. Была установлена первичная структура 21-кДа белка [3], которая выявляла значительное сходство со структурами ряда белков растений, входящих в состав суперсемейства соевого ингибитора Кунитца. При этом аминокислотная последовательность 21-кДа белка проявляла наибольшее сходство (от 70 до 90% идентичных остатков) с последовательностями ингибиторов протеиназ семейства Кунитца, выделенных рядом исследователей из клубней картофеля [4], что позволило отнести обнаруженные нами белки к подсемейству ингибиторов PKPIs (Potato Kunitz-type Proteinase Inhibitors).

При механическом повреждении ткани, а также атаке насекомыми-вредителями и микроорганизмами в растениях индуцируется каскад защитных реакций, действие которых направлено на репарацию раневого повреждения и предотвращение инвазии патогена. Эти реакции, с одной стороны, приводят к уплотнению клеточной стенки путем синтеза каллозы, лигнина и оксипролинбогатых гликопротеинов, а с другой – к синтезу ингибиторов протеолитических ферментов и литических ферментов, таких, как хитиназы и глюканазы [5]. За исключением каллозы, синтез которой осуще-

Сокращения: PVDF – поливинилиденфторид; AA – арахидоновая кислота; JA – жасмоновая кислота; SK – салициловая кислота.

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (095) 954-27-32; эл. почта: valueva@inbi.ras.ru).



**Рис. 1.** Сравнение *N*-концевых аминокислотных последовательностей ингибиторов химотрипсина, преимущественно накапливающихся в экссудатах клубней картофеля, инфицированного зооспорами *P. infestans* (1, 3, 5, 7), и ингибиторов с близкой молекулярной массой, обнаруженных в здоровых клубнях (2, 4, 6, 8). Белки из экссудатов с  $M_r$  22 (1), 16.5 (3), 4.5 (5) и 8.0 кДа (7); белки из здоровых клубней: 22-кДа белок (2) [1, 2], А-цепь (4) и Б-цепь (6) двухцепочечного 21-кДа белка (16.5 и 4.5 кДа соответственно) [3], субъединица А ингибитора химотрипсина I (8) [11]. Идентичные остатки заключены в рамки.

ствляется каллозасинтетазой [6], индукция синтеза всех известных защитных белков в ответ на повреждение вызывается транскрипционной активацией соответствующих генов, которая инициируется сигнальными соединениями, элиситорами, возникающими на участке повреждения, и коррелирует с экспрессией этих генов в растениях [7]. Накопление ингибиторов протеиназ в ответ на повреждение было обнаружено у целого ряда культурных растений, принадлежащих к различным родам и семействам. Из исследованных растений наибольшее количество ингибиторов протеиназ накапливалось при механическом раневом повреждении надземных органов и действии на них насекомых-вредителей и фитопатогенных микроорганизмов в листьях томатов, табака и картофеля, принадлежащих к семейству пасленовых [8].

Цель настоящей работы – изучение динамики накопления и состава белков-ингибиторов протеиназ в клубнях картофеля при поражении возбудителем фитофтороза грибом *Phytophthora infestans*, а также в процессе их обработки жасмоновой, арахиноновой и салициловой кислотами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клубни картофеля сорта Истринский инфицировали расой 1.3 *P. infestans* Mont de Vary, которая совместима с данным сортом. Изучали белки-ингибиторы химотрипсина в экссудатах, получен-

ных к 48 ч инкубации клубней с зооспорами гриба, поскольку ранее было показано, что значительная ингибиторная активность в экссудатах достигается через 48 ч инокуляции [9]. Белки-ингибиторы химотрипсина выделяли из экссудатов методом аффинной хроматографии на иммобилизованном химотрипсине. Следует отметить, что в экссудатах из контрольных клубней, которые инкубировали без зооспор, практически отсутствовали белки, проявляющие активность ингибиторов.

Выделенный комплексный препарат белков-ингибиторов химотрипсина в условиях SDS-ПААГ-электрофореза разделялся, по крайней мере, на восемь белковых зон, среди которых преобладали белки с  $M_r$  22000, 16500, 8000, 4500 и 3000.

Для определения *N*-концевых последовательностей отдельные белки после SDS-ПААГ-электрофореза переносили с гелевой пластины на PVDF-мембрану с помощью электроблоттинга. Белковая зона, соответствующая  $M_r$  3000, содержала набор низкомолекулярных пептидов, последовательности которых не поддавались расшифровке. Наличие таких пептидов в клубнях картофеля было обнаружено нами ранее [10] и было показано, что они способны достаточно прочно связываться с химотрипсин-сефарозой [10]. Для белков с  $M_r$  22000, 16500 и 4500, преимущественно накапливающихся в экссудатах инфицированных *P. infestans* клубней, были установлены *N*-концевые последовательности, содержащие 10 (или 7) а. о. (рис. 1). *N*-Концевые последовательности белка с  $M_r$  22000 и 22-кДа ингибитора трипсина из здоровых клубней были идентичны.

Первые 10 а. о. белка с  $M_r$  16500 совпадали с соответствующей последовательностью А-цепи, а первые 7 а. о. белка с  $M_r$  4500 – Б-цепи двухцепочечного 21-кДа ингибитора сериновых протеиназ. *N*-Концевая последовательность белка с  $M_r$  8000 характеризовалась высокой степенью гомологии (70% идентичных остатков) с соответствующей последовательностью субъединицы А, входящей в состав олигомерной молекулы ингибитора химотрипсина I, который обнаружен рядом исследователей в здоровых клубнях картофеля [11].

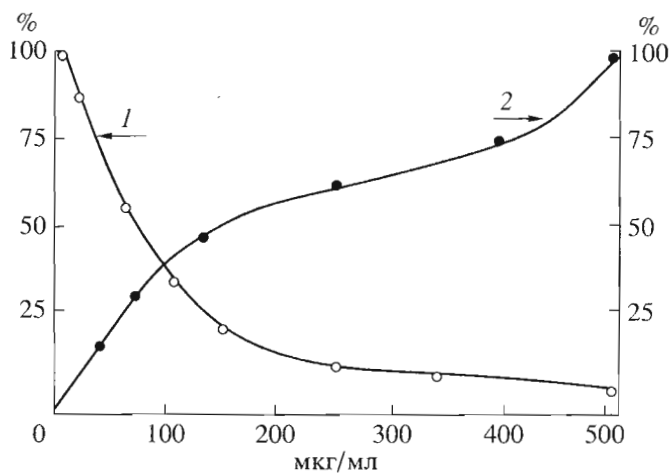
Таким образом, можно заключить, что при поражении клубней картофеля сорта Истринский грибом *P. infestans* индуцировалось накопление 21- и 22-кДа ингибиторов сериновых протеиназ, присутствующих в здоровых клубнях и отнесенных ранее к подсемейству RPKIs, или близких к ним по первичной структуре форм, а также 8-кДа белка, являющегося субъединицей ингибитора химотрипсина I. Интересен тот факт, что картофельный ингибитор I отсутствовал в здоровых клубнях картофеля сорта Истринский [9] и синтезировался *de novo* в ответ на действие патогена.

Необходимо отметить, что мы впервые обнаружили индукцию синтеза ингибиторов химотрипсина в ответ на поражение фитопатогеном клубней картофеля. До нашей работы считалось, что синтез ингибиторов протеиназ у растений семейства пасленовых может индуцироваться только в ответ на поражение надземных частей (стеблей и листьев) [12].

На следующем этапе мы исследовали действие суммарного препарата белков-ингибиторов химотрипсина, выделенных из экссудатов инфицированных клубней, на рост и развитие гриба *P. infestans*. Из рис. 2 видно, что при концентрации ингибиторов, равной 80 мкг/мл, длина прорастающих гиф уменьшалась на 50% по сравнению с контролем, а при концентрации 500 мкг/мл обнаруживалось практически полное подавление прорастания спор гриба, при этом практически все зооспоры оказывались поврежденными. Таким образом, эти белки обладали высокой токсичностью по отношению к патогену, подавляя прорастание гиф и ускоряя разрушение спор гриба.

Известно, что один из путей активации генов защитных белков инициируется элиситорами, возникающими на участке повреждения в случае атаки насекомыми или фитопатогенными микроорганизмами [13]. Один из классов элиситоров представляет собой олигосахаридные фрагменты, образующиеся на начальной стадии вторжения патогена в результате ферментативного расщепления клеточных стенок растения-хозяина или микроорганизма [14]. Предполагают, что олигосахаридные элиситоры, связываясь с потенциальным рецептором, вызывают освобождение из сложных мембранных липидов ненасыщенных жирных кислот октадеканойдного ряда, которые запускают сигнальную липоксигеназную (или, как ее чаще называют, октадеканойдную) систему. В результате ее включения линоленовая кислота превращается в 12-оксофитодиеновую кислоту, а затем в жасмоновую кислоту [15]. Эти два циклопентадиена и являются потенциальными активаторами транскрипции генов защитных белков, в том числе ингибиторов протеиназ [16]. Близким образом функционирует липоксигеназный метаболизм у животных, при котором освобождение арахидоновой кислоты в ответ на действие полипептидного гормона приводит к синтезу простагландинов и лейкотриенов [17].

Было показано, что арахидоновая и эйкозопентаеновая кислоты, входящие в состав гриба *P. infestans*, – активные элиситоры защитных реакций картофеля. Арахидоновая кислота вызывала некротизацию клеток клубней и образование в них фитоалексинов, а также системную защиту растения от болезней [18]. Салициловая кислота также могла в ряде случаев проявлять элиситорную активность, индуцируя локальную и



**Рис. 2.** Зависимость длины гиф (1) и количества лизированных спор (2) гриба *P. infestans* от концентрации суммарного препарата ингибиторов химотрипсина из экссудатов клубней картофеля, инфицированных зооспорами гриба. Представлены средние значения трех независимых экспериментов со стандартной ошибкой от 2 до 10%. По оси абсцисс отложены концентрации ингибиторов, по левой оси ординат – длина гиф, % от контроля, по правой оси ординат – количество лизированных зооспор, % поврежденных.

системную фитотроустойчивость тканей клубней, однако уже через месяц эти клубни не только не сохраняли устойчивость, но наоборот приобретали восприимчивость к фитотрозу [19]. В то же время известно, что салициловая кислота и ее производные блокируют передачу сигнала, запускающего липоксигеназную систему у растений. Так, эти соединения подавляли экспрессию генов ингибиторов протеиназ в листьях томатов, индуцируемую раневым повреждением [20] и жасмоновой кислотой [21].

Мы исследовали влияние элиситоров – жасмоновой, арахидоновой и салициловой кислот, на накопление ингибиторов протеиназ в разрезанных клубнях картофеля, используя метод экссудатов. Оказалось, что в экссудатах как контрольных, так и клубней, обработанных элиситорами, практически полностью отсутствовала активность ингибиторов папаина даже после 48 ч инкубации. Это отличало ткани клубней от тканей надземных органов картофеля, в которых концентрация ингибиторов цистеиновых протеиназ сильно возросла после обработки жасмоновой кислотой [22].

В таблице приведена характеристика экссудатов, полученных после 24 и 48 ч инкубации клубней картофеля с элиситорами. Видно, что после 24 ч инкубации содержание белка и активность ингибиторов практически одинакова в экссудатах контрольных и обработанных салициловой кислотой клубнях. После 48 ч инкубации количество белка в этих экссудатах сохранялось на том же уровне, но активность ингибиторов снижалась

Характеристика экссудатов клубней картофеля (30 мл), обработанных элиситорами

Элиситор	Время инкубации клубней, ч	Содержание белка, мг	Активность ингибиторов химотрипсина	
			суммарная, ИЕ	удельная, ИЕ/мг
Вода (контроль)	24	1.52 ± 0.03	1695 ± 165	1130 ± 115
	48	1.25 ± 0.02	330 ± 30	275 ± 15
JA, 10 <sup>-6</sup> М	24	2.15 ± 0.04	9095 ± 600	4331 ± 243
	48	3.83 ± 0.06	21964 ± 930	5780 ± 256
AA, 10 <sup>-6</sup> М	24	1.94 ± 0.03	7323 ± 462	3907 ± 178
	48	3.27 ± 0.05	16039 ± 801	5012 ± 227
SK, 7 × 10 <sup>-7</sup> М	24	1.54 ± 0.03	1755 ± 165	1170 ± 146
	48	1.52 ± 0.03	285 ± 25	190 ± 15

почти в 5 раз. В отличие от контроля в экссудатах клубней, обработанных жасмоновой или арахидоновой кислотой, происходило накопление белка и его содержание увеличивалось почти в 2 раза к 48 ч инкубации, при этом активность ингибиторов также значительно увеличивалась. Это указывало на то, что весь накапливающийся в этих случаях белок содержит ингибиторы химотрипсина.

Полученные результаты позволяют сделать предположение, что при обработке клубней жасмоновой или арахидоновой кислотой происходило дополнительное выделение в экссудат ингибиторов химотрипсина. Отсутствие в них ингибиторов папаина свидетельствовало в пользу того, что накопление ингибиторов химотрипсина не обусловлено их простой диффузией из клубней при разрушении клеток ткани картофеля, но являлось следствием индукции их синтеза в ответ на действие элиситора. Обработка клубней салициловой кислотой приводила к торможению накопления ингибиторов химотрипсина в экссудатах. Аналогичное ингибирование салициловой кислотой синтеза ингибиторов протеиназы, индуцированного механическим раневым повреждением листьев томатов, было обнаружено в работе [20].

Изучение состава белков, накапливающихся в экссудатах, проводили после их выделения с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном химотрипсине [9]. При SDS-ПААГ-электрофорезе белки из экссудатов после 24 ч инкубации контрольных и обработанных жасмоновой кислотой клубней содержали одинаковые компоненты с  $M_r$  22000, 21000, 16500, 8000, а также компонент с  $M_r$  ниже 4000. Аналогичные белковые компоненты накапливались к 48 ч инкубации с жасмоновой и арахидоновой кислотой. Однако в экссудатах контрольных и обработанных салициловой кислотой клубней к этому часу инкубации присутствовал только компонент с низкой молекулярной массой. Поскольку в этих экссудатах обнаруживался низкий уровень активности ингибиторов химотрипсина (см. таблицу), можно

полагать, что низкомолекулярные продукты образовались вследствие деградации белков-ингибиторов в процессе репарации клубней.

Для определения *N*-концевых последовательностей белки после SDS-ПААГ-электрофореза переносили с гелевой пластины на PVDF-мембрану с помощью электроблоттинга. Последовательности первых трех *N*-концевых аминокислотных остатков исследуемых белков (Phe-Val-Leu – для 22 кДа; Leu-Pro-Ser – для 16.5 кДа; Glu-Phe-Asp – для 8 кДа) были идентичны последовательностям белков с близкими молекулярными массами, накапливающимися при инфицировании клубней грибом *P. infestans* (см. рис. 1).

Таким образом, есть все основания предполагать, что в ответ на раневой стресс в экссудатах клубней картофеля накапливались ингибиторы химотрипсина, идентичные тем ингибиторам, которые были обнаружены при инфицировании клубней грибом *P. infestans*. Жасмоновая и арахидоновая кислоты были способны активировать индуцированное механическим раневым повреждением накопление этих белков, в то время как салициловая кислота блокировала этот процесс. Можно предположить, что жасмоновая и арахидоновая кислоты и индуцировали системный синтез ингибиторов, который развивался через 24 ч после первоначального поранения и сохранялся в течение достаточно длительного времени, запуская тем самым механизм развития системной индуцированной устойчивости.

Обращает на себя внимание, что в экссудатах клубней картофеля в ответ на раневой стресс и инфицирование патогенным грибом *P. infestans* обнаруживались одинаковые белки-ингибиторы химотрипсина, способные подавлять рост и развитие патогена. Это с большой степенью вероятности указывает на то, что запуск сигнала активации генов ингибиторов и в случае действия элиситоров, и в случае инфицирования патогеном осуществляется по единому механизму. Тот факт, что индукция ингибиторов в ответ на раневое поврежде-

ние ингибировалась салициловой кислотой, может свидетельствовать в пользу того, что передача сигнала в рассматриваемых случаях осуществляется с участием липоксигеназного (октадеканоида) пути метаболизма растения.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования служили клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Истринский с геном фитофтороустойчивости R1, которые хранились в течение 5 месяцев при 4°C. Для инфицирования использовали расу 1.3 *P. infestans* Mont de Bar, совместимую с данным сортом.

Суспензию зооспорангиев для инфицирования получали, смывая их с поверхности 11-суточного мицелия, выросшего на овсяно-агаровой среде. Стимуляцию непрямого прорастания зооспорангиев вызывали выдерживанием их при 3°C в течение 1 ч. Для инфицирования тканей клубней использовали суспензию  $5 \times 10^4$  зооспор/мл.

Салициловую ( $7 \times 10^{-7}$  М), жасмоновую и арахидоновую кислоты ( $1 \times 10^{-6}$  М) растворяли в дистиллированной воде. Клубни картофеля инкубировали с суспензией зооспор или растворами элиситоров в течение 24 и 48 ч. Экссудаты (30 мл из 500 г клубней) получали по методу [9]. Контрольные клубни (500 г) инкубировали со стерильной дистиллированной водой.

**Аффинную хроматографию** осуществляли на колонке (3.0 × 3.0 см) с химотрипсин-сефарозой 4В, уравновешенной 50 мМ Трис-НСl-буфером, рН 8.0, содержащим 0.5 М NaCl. Экссудат (30 мл) смешивали с 30 мл 0.1 М Трис-НСl-буфера, рН 8.0, содержащего 1.0 М NaCl, и наносили на колонку с иммобилизованным химотрипсином. Не связавшийся с аффинным сорбентом материал удаляли, промывая колонку стартовым буфером. Белки, образовавшие комплекс с химотрипсином, элюировали 7 М мочевиной при рН 3.0. Фракции, содержащие белки-ингибиторы химотрипсина, собирали, обессоливали на колонке (2.0 × 80.0 см) с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

**Активность ингибиторов** оценивали по степени подавления активности химотрипсина и папаина. Активность ферментов определяли по методу [23, 24], используя в качестве субстрата 1% раствор казеина.

Содержание белка определяли по методу Бредфорд, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

**Электрофорез** в 20% ПААГ в присутствии β-меркаптоэтанола и додецилсульфата натрия (SDS-ПААГ) проводили по методу Лэммли [25]. Электроблоттинг проводили на Immobilon-P PVDF-мембрану (Millipore) в течение 2 ч при 15°C и 400 мА в 0.025 М NaHCO<sub>3</sub> (рН 9.0), содержащем 20% метанола и 0.1% SDS. Мембрану промывали

метанолом и окрашивали 0.1% раствором амидо черного 10В. Полосы, содержащие белок, вырезали и использовали для секвенирования [26].

Секвенирование белка осуществляли на газофазном секвенаторе 470А (Applied Biosystems, США) с автоматическим детектированием фенилтиогидантоинов аминокислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 01-04-48072).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Валуева Т.А., Ревина Т.А., Мосолов В.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1367–1374.
2. Valueva T.A., Revina T.A., Kladnitskaya G.V., Mosolov V.V. // FEBS Lett. 1998. V. 426. P. 131–134.
3. Valueva T.A., Revina T.A., Mosolov V.V., Mentele R. // Biol. Chem. 2000. V. 381. P. 1215–1221.
4. Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. // Plant Cell Physiol. 1994. V. 35. P. 303–312.
5. Bowles D.J. // Annu. Rev. Biochem. 1990. V. 59. P. 873–900.
6. Fink J., Jeblick W., Blaschek W., Kauss H. // Planta. 1987. V. 171. P. 130–135.
7. Lawton M.A., Lamb C.J. // Mol. Cell Biol. 1987. V. 7. P. 335–341.
8. Ryan C.A. // Annu. Rev. Phytopathol. 1990. V. 28. P. 425–449.
9. Кладницкая Г.В., Валуева Т.А., Ермолова Н.В., Ильинская Л.И., Герасимова Н.Г., Мосолов В.В. // Физиология растений. 1996. Т. 43. С. 701–706.
10. Ревина Т.А., Чередникова Т.В., Валуева Т.А., Ромашикин В.И., Мосолов В.В. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1988. С. 866–872.
11. Richardson M., Barker R.D.J., McMillan R.T. // Biochem. Soc. Trans. 1976. V. 4. P. 1077–1079.
12. Suh S.-C., Stiekema W.J., Hannapel D.J. // Planta. 1991. V. 184. P. 423–430.
13. Ryan C.A. // Plant Mol. Biol. 1992. V. 19. P. 123–133.
14. Darvill A.G., Albersheim P. // Annu. Rev. Plant Physiol. 1984. V. 35. P. 243–275.
15. Vick B.A., Zimmerman D.C. // Plant. Physiol. 1984. V. 75. P. 458–461.
16. Bleichert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Xia Z.-Q., Zenk M.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4099–4105.
17. Needleman P., Turk J., Jachshik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. // Annu. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 69–102.
18. Озерецковская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И. // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 626–633.
19. Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Чаленко Г.И., Озерецковская О.Л. // Докл. РАН. 1996. Т. 347. С. 418–420.
20. Pena-Cortes H., Albrecht T., Prat S., Weller E.W., Willmitzer L. // Planta. 1993. V. 191. P. 123–128.

21. Doares S.H., Narvaez-Vasquez J., Conconi A., Ryan C.A. // *Plant Physiol.* 1995. V. 108. P. 1741–1746.
22. Gruden K., Strukelj B., Ravnikar M., Poljsak-Prijatelj J., Mavric I., Brzin J., Pugercar J., Kregar I. // *Plant Mol. Biol.* 1997. V. 34. P. 317–323.
23. Kunitz M. // *J. Gen. Physiol.* 1947. V. 30. P. 291–310.
24. Arnon R., Shapira E. // *Biochemistry.* 1967. V. 242. P. 3942–3950.
25. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
26. Vasilyeva O.V., Kolygo K.B., Leonova Yu.F., Potapenko N.A., Ovchinnikova T.V. // *FEBS Lett.* 2002. V. 526. P. 66–70.

## Role of Protease Inhibitors in Potato Protection

T. A. Valueva<sup>#</sup>, T. A. Revina, E. L. Gvozdeva,  
N. G. Gerasimova, and O. L. Ozeretskovskaya

<sup>#</sup>Fax: +7 (095) 954-2732; e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

Mechanical damage or infection of potatoes with *Phytophthora infestans* caused an accumulation of only serine protease inhibitors in exudates of potato tubers. Among them, proteins prevailed that are structurally similar to those present in healthy tubers: a 22-kDa trypsin inhibitor, a 21-kDa serine protease inhibitor consisting of two polypeptide chains, and a 8-kDa potato chymotrypsin I inhibitor produced *de novo*. The accumulated proteins inhibited the growth of hyphae and germination of zoospores of *P. infestans*. Treatment with elicitors, jasmonic and arachidonic acids, intensified the accumulation of these inhibitors in tubers in response to the wound stress, whereas salicylic acid blocked this process. These results suggest that the lipoxygenase metabolism plays a substantial role in signal transduction of the protective system of resting potato tubers. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* elicitors, *Phytophthora infestans*, potato tubers, protein inhibitors