ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ В ТКАНЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ОБРАБОТКЕ ИНДУКТОРАМИ УСТОЙЧИВОСТИ И ИНФИЦИРОВАНИИ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* (MONT.) DE BARY

Яруллина Л.Г.[1,2], Цветков В.О.[2], Сорокань А.В.[1], Шпирная И.А.[2], Бурханова Г.Ф.[1], Калачева К.А.[2]

[1] Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Россия
[2] Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия
E-mail: yarullina@bk.ru

Изучали влияние обработки салициловой и жасмоновой кислотами (СК и ЖК) на активность протеолитических и амилолитических ферментов и их белковых ингибиторов в каллусах и растениях картофеля *Solanum tuberosum* L. в культуре in vitro при инфицировании патогенным грибом *Phytophthora infestans* Mont. de Bary – возбудителем фитофтороза. Обработка СК и ЖК вызывает уменьшение проникающей способности патогена в ткани растений и вызывает существенное повышение уровня транскрипции генов растительных ингибиторов амилаз и протеиназ. Обсуждается влияние салициловой и жасмоновой кислот на регуляцию устойчивости картофеля к *Ph. infestans* с участием гидролитических ферментов и их ингибиторов..

Ключевые слова: Solanum tuberosum, Phytophthora infestans, гидролазы, ингибиторы амилаз и протеаз, салициловая и жасмоновая кислоты, индуцированная устойчивость

THE CHANGE OF ACTIVITY OF HYDROLYTIC ENZYMES AND THEIR PROTEIN INHIBITORS IN THE TISSUES OF POTATO UNDER THE TREATMENT WITH INDUCERS OF RESISTANCE AND INFECTION *OF PHYTOPHTHORA INFESTANS* (MONT.) DE BARY

Yarullina L.G.[1,2], Tsvetkov V.O.[2], Sorokan A.V.[1], Shpirnaya I.A.[2], Burkhanova G.F.[1], Kalacheva K.A.[2]

[1] Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, Russia
[2] Bashkir State University, Ufa, Russia
E-mail: yarullina@bk.ru

The influence of resistance inducers salicylic and jasmonic acids (SA and JA) treatment on the activity of proteolytic and amylolytic enzymes and the protein inhibitors of these enzymes in callus and test tube plants of potato *Solanum tuberosum* L. under infection with *Phytophthora infestans* Mont. de Bary was studied.
It was shown that treatment with salicylic and jasmonic acids helps to reduce the penetrating ability of *Ph. infestans* mycelium into plant tissues and has a high stimulating effect on the transcriptional activity of proteinases and amylases inhibitors genes of potato.
Regulation of potato resistance to *Ph. infestans* under the influence of SA and JA with the participation of the "hydrolase - inhibitor" complex is discussed.

Keywords: Solanum tuberosum, Phytophthora infestans, hydrolases, amylase and proteinase inhibitors, salicylic and jasmonic acids, induced resistance

Поступила в редакцию: 29.08.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-425-433

ВВЕДЕНИЕ

Важным фактором патогенного действия микроорганизмов, вызывающих заболевания культурных растений, являются гидролитические ферменты, обеспечивающие усвоение растительных соединений [Кудрявцева и др., 2013; Silva et al., 2013]. Одним из ключевых факторов защитных реакций растений на воздействие патогенных организмов является образование молекул, подавляющих активность гидролитических ферментов микроорганизмов [Яруллина, Ибрагимов, 2006]. Ингибиторов гидролаз, по многочисленным данным, вовлечены в защитные реакции растений [Мосолов, Валуева, 2005; Ревина и др., 2008], в ряде работ показано изменение относительного содержания ингибиторов протеиназ в растениях под влиянием стрессовых факторов биотической и абиотической природы [Домаш и др., 2008;

Фролова, Титов, 2008; Воронкова, 2014]. По-видимому, снижение уровня активности гидролитических ферментов патогенов является важной частью приспособительных механизмов растений, главным образом, при заражении патогенными микроорганизмами.

В активации и реализации защитного ответа растений участвуют разнообразные сигнальные системы. Показана важная роль салициловой и жасмоновой кислот как сигнальных молекул (медиаторов) в развитии защитного ответа растений [Тарчевский, 2002]. Ввиду положительного влияния СК и ЖК на устойчивость растений к ряду заболеваний, а также их способности к повышению продуктивности растений, эти соединения широко применяются в растениеводстве [Hukkanen et al., 2007; Плотникова, 2009]. В свете вышесказанного, исследование ферментативных реакций, происходящих в тканях растений, обработанных СК и ЖК при заражении патогенными микроорганизмами, представляет интерес и с научной, и с практической точек зрения.

Устойчивость растений картофеля к *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – возбудителю фитофтороза – значительная часть исследователей связывает с реакцией сверхчувствительности (СВЧ-реакция) клеток хозяина в зоне контакта с внедряющимися гифами [Васюкова и др., 2008].

Цель работы – сравнительное изучение изменений активности амилолитических и протеолитических ферментов и их белковых ингибиторов в каллусах и листьях растений картофеля при заражении возбудителем фитотофтороза *Phytophthora infestans* на фоне воздействия салициловой и жасмоновой кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Объектом исследований были каллусы и растения в культуре in vitro картофеля (*Solanum tuberosum L.),* сорт Ранняя роза.

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали зеленые листья пробирочных растений. Листья надрезали вдоль жилок и культивировали на агаризованной среде Мурасиге и Скуга (МС) в темноте при температуре 26 °С. Через 10 суток культивирования экспланты теряли зеленую окраску и начиналось образование каллусной ткани по краям надрезов. Через 30 суток на листьях образовывалась хорошо развитая каллусная ткань. Полученные каллусы помещали в чашки Петри на поверхность агаризованной среды Мурасиге и Скуга, содержащей салициловую или жасмоновую кислоты в конечных концентрациях 10^{-6} М и 10^{-7} М соответственно. В качестве контроля использовали каллусы, растущие на среде МС без регуляторов. На третьи сутки каллусы инфицировали суспензией зооспор *Ph. infestans* (10^5 спор/мл) объемом 2 мкл.

Для получения зооспор возбудитель фитофтороза *Ph. infestans* (штамм Башкирский) выращивали в пробирках на картофельно-глюкозной среде в течение 11 суток. Затем зооспорангии оомицета заливали дистиллированной водой и выдерживали 45 мин при 4 °С, а затем 45 мин при комнатной температуре. Концентрацию зооспор определяли в камере Горяева.

Пробирочные растения картофеля культивировали в течение 30 суток на агаризованной среде МС [Полевой, Чиркова, 2001], содержащей СК или ЖК в конечных концентрациях 10^{-6} М и 10^{-7} М соответственно [Озерецковская и др., 2004]. Растения заражали путем нанесения суспензии зооспор (10^5 спор/мл) объемом 5 мкл на лист. В качестве контроля использовали неинфицированные и инфицированные растения, выращенные на среде МС. Степень развития

Ph. infestans на листьях картофеля оценивали через 7 дней после инокуляции по площади поражения листовой пластинки.

Через 6, 48 и 72 ч в растения фиксировали и оценивали транскрипционную активность генов амилазы XM006351484 и протеиназы JX683427.

Активность протеиназ определяли с использованием спектрофотометра по гидролизу синтетического хромогенного субстрата БАПНА и по гидролизу желатина [Erlanger, Kokowski, Cohen, 1961].

Активность амилаз оценивали по гидролизу крахмала, иммобилизованного в геле агарозы [Шпирная и др., 2009].

Активность ингибиторов трипсина определяли по методу Гофмана-Вайсблая [Гофман, Вайсблай, 1975] с некоторыми модификациями. В 0.5 мл 0.05 М трис-HCl-буфера, pH 8.2, вносили 1.0 мл экстракта и 0.5 мл фермента (1 мг/мл). Затем к смеси добавляли 1.0 мл (1 мг/мл) раствора *n*-нитроанилид N,α-бензоил-DL-аргинина (БАПНА) и выдерживали на водяной бане 10 минут при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 30%-ной уксусной кислоты. В качестве контроля использовали смесь, не содержащую фермент, который добавляли после остановки реакции. Оптическое поглощение растворов определяли на спектрофотометре Biospek-Mini («Shimadzu», Япония) при 405 нм. Ингибиторную активность выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ). За единицу ингибиторной активности принимали количество ингибитора, необходимое для полного подавления единицы активности трипсина.

Активность ингибиторов амилаз измеряли методом агарозных гелевых пластин [Шпирная и др., 2009].

Для окраски мицелия по Граму использовали краситель генциановый фиолетовый, приготовленный с применением анилина [Барыкина, Веселова, Девятов, 2004].

Выделение тотальной РНК из листьев картофеля, зафиксированных в жидком азоте, проводили с использованием тризола согласно протоколу фирмы-поставщика (“Sigma”, Германия). Содержание нуклеиновых кислот измеряли при *A*260/*A*280 на спектрофотометре Smart Spec Plus (“Bio-Rad, США”), предварительно растворив образцы в Трис-ЭДТА-буфере. Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика (“Синтол”, Россия). Анализ накопления транскриптов генов ингибитора амилазы XM006351484 и ингибитора протеиназы JX683427 осуществляли с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием прибора “iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System” (“Bio-Rad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Изменения в транскрипционной активности генов (оценка числа копий мРНК для каждого гена) определяли относительного референсного гена St_act («ген домашнего хозяйства», актин X55749) с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США).

Статистическая обработка данных осуществлялась в компьютерной программе StatSoft Statistica 6.0. Эксперименты включали не менее трех биологических повторов. На рисунках приведены выборочные средние и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Каллусная ткань картофеля, на которой можно наблюдать развитие оомицета на экто- и эндофитных стадиях развития, представляет удобную модель для исследования

механизмов развития защитного ответа растений к *Ph. infestans*. Наши наблюдения за ростом возбудителя фитофтороза на каллусах картофеля восприимчивого сорта Ранняя Роза позволили установить, что через 24 ч после инокуляции *Ph. infestans* проникновение гиф оомицета в каллусы было достаточно глубоким (доходило до 1/3 объема каллусной ткани) (рис. 1). Через 48 ч гриб проникал в каллусы на глубину в половину от их диаметра. Многочисленные гифы патогенного гриба росли на каллусной ткани, причем большая часть из них была утолщена и имела интенсивную окраску.

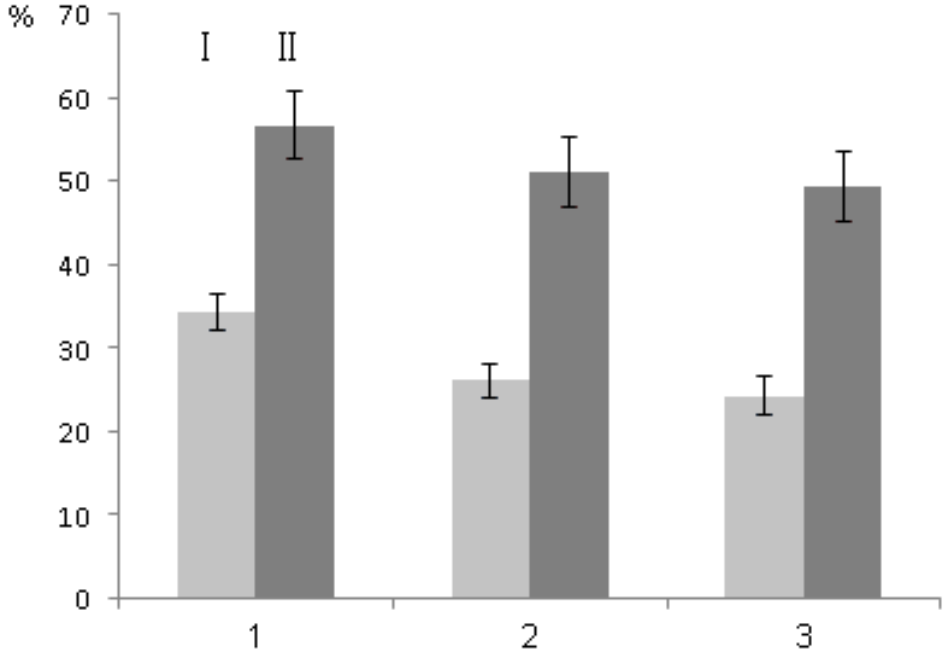

Рис. 1. Влияние обработки СК и ЖК на размер инфицированных зон в каллусах картофеля. 1 – контроль; 2 – обработка СК; 3 – обработка ЖК. I – 24 ч. и II – 48 ч. после инокуляции.

Культивирование каллусов на средах, содержащих СК и ЖК, несколько тормозило рост грибов. По-видимому, СК и ЖК оказывали влияние на скорость роста *Ph. infestans* опосредованно через каллус картофеля.

Важным «оружием» патогенов являются продуцируемые ими гидролитические ферменты, обеспечивающие внедрение гриба в ткани, прежде всего амилазы [Silva et al., 2013]. Ответная защитная реакция растений сопровождается синтезом ингибиторов этих ферментов [Protsenko, Bulantseva, Korableva, 2010; Ma et al., 2011].

Как показали наши исследования, при поражении каллусов картофеля *Ph. infestans* наблюдается изменение активности гидролаз и их ингибиторов (рис. 2, 3). Причем активность протеаз, амилаз и их ингибиторов изменяется как при инфицировании, так и при воздействии СК и ЖК. Инфицирование каллусов патогеном приводит к резкому повышению активности протеиназ (рис. 2А). В инфицированных каллусах активность этих ферментов в несколько раз превышает аналогичный показатель в контрольном варианте.

Высокая протеолитическая активность в зараженных тканях не только обеспечивает аминокислотами рост и развитие патогенного микроорганизма, но и одновременно может нейтрализовать защитные белки картофеля, такие как лектины, ингибиторы гидролаз. Так, показано, что внеклеточная металлопротеиназа *E. carotovora* (Jones) Waldee способна расщеплять лектины картофеля, которые также участвуют в защитных реакциях растений [Feng et al., 2014].

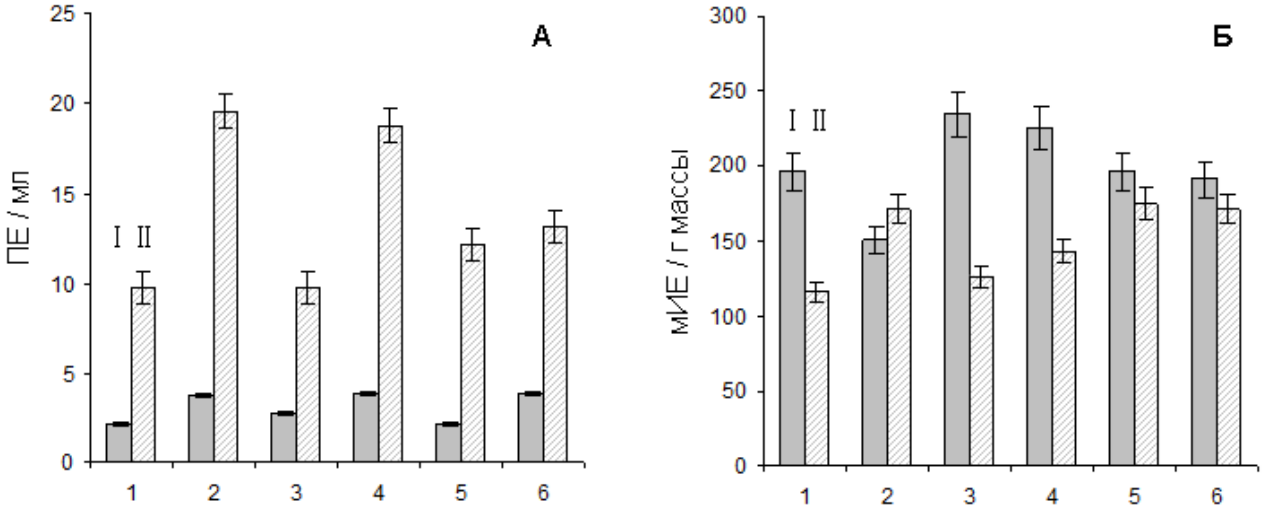

Рис. 2. Активность протеиназ (А) и их ингибиторов (Б) в каллусах картофеля, обработанных салициловой и жасмоновой кислотами и зараженных *Ph. infestans.* 1- контроль; 2 - *Ph. infestans*; 3 - обработка СК; 4 - СК+ *Ph. infestans*; 5 - обработка ЖК; 6 - ЖК + *Ph. infestans.* I – 3 сут. и II – 10 сут. после инокуляции.

Интересно отметить, что в наших опытах на начальных стадиях инфицирования патогеном (3 сутки) наблюдалась снижение активности ингибиторов, подавляющих действие трипсина (рис. 2Б). Однако на десятые сутки после инфицирования активность ингибиторов протеаз в каллусах картофеля повышалась во всех вариантах опыта. При этом необходимо отметить, что обработка каллусов СК и ЖК стимулировала и антипротеолитическую активность как в инфицированных, так и в неинфицированных тканях (рис. 2Б). Причем, во всех вариантах опыта с обработкой каллусов СК и ЖК активность ингибиторов протеиназ была значительно выше, чем в незараженном и зараженном контроле.

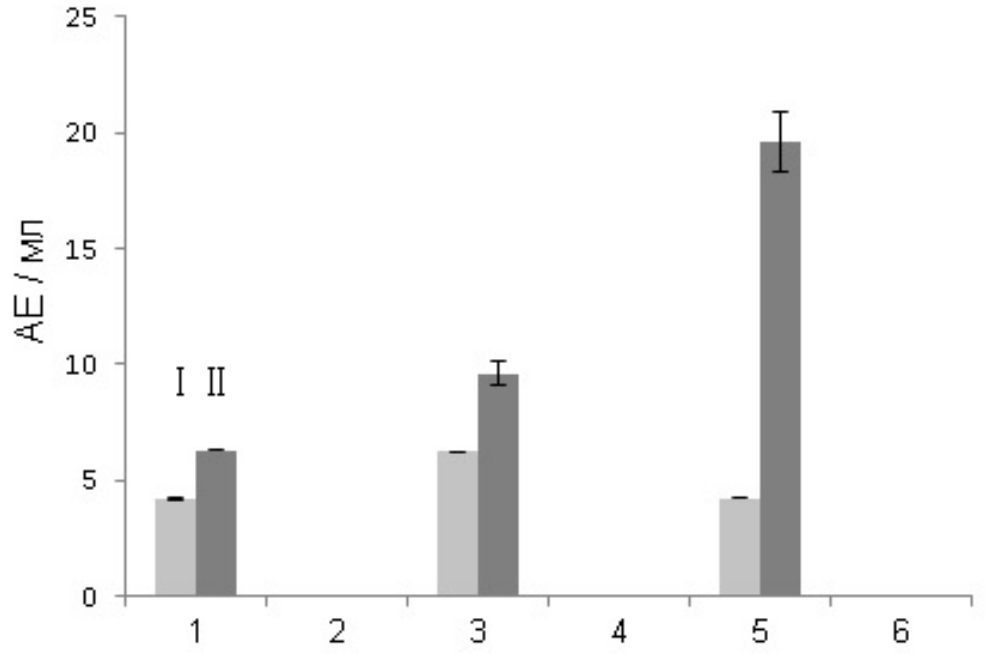

Рис. 2. Влияние СК и ЖК на активность амилолитических ферментов в каллусах картофеля через 3 и 10 суток после заражения *Ph. infestans.* 1- контроль; 2 - *Ph. infestans*; 3 - обработка СК; 4 - СК+ *Ph. infestans*; 5 - обработка ЖК; 6 - ЖК + *Ph. infestans.* I – 3 сут. и II – 10 сут. после инокуляции.

Исследование активности амилаз в зараженных каллусах выявило совсем иную картину по сравнению с динамикой протеолитической активности. Оказалось, что заражение каллусов картофеля *Ph. infestans* приводит к полному подавлению амилолитической активности в тканях (рис. 3). Во всех вариантах опыта с неинокулированным материалом наблюдается амилолитическая активность. Нужно отметить, что обработка незараженных каллусов салициловой и жасмоновой кислотами значительно увеличивает активность амилаз в незараженных тканях. Напротив, в зараженных *Ph. infestans* каллусах, в т.ч. и при обработке индукторами устойчивости, активность амилаз не выявлялась (рис. 3).

Известно, что амилолитическая активность наблюдается у большей части представителей грибов и, как правило, амилазы грибов являются конститутивными белками, даже у ксилотрофов [Valencia-Jimenez, Arboleda, Grossi, 2008]. Однако у оомицетов, в частности у грибов рода *Phytophthora*, амилаза отсутствует, поскольку данные грибы используют для расщепления крахмала ферменты растений, активируя их биосинтез в пораженных клубнях [Gappa-Adachi et al., 2012]. Можно предположить, что отсутствие амилолитической активности при заражении каллусов можно объяснить высоким уровнем активности высокоспецифичных ингибиторов амилаз, продуцируемых растительными тканями в ответ на внедрение патогенов.

В связи с этим предположением нами было проведено измерение уровня экспрессии гена ингибитора амилазы в листьях картофеля при инфицировании *Ph. infestans* и обработке СК и ЖК.

Исследования показали, что в течение первых суток после инфицирования в растениях картофеля начинается повышение уровня транскрипции гена ингибитора амилазы (рис. 4).

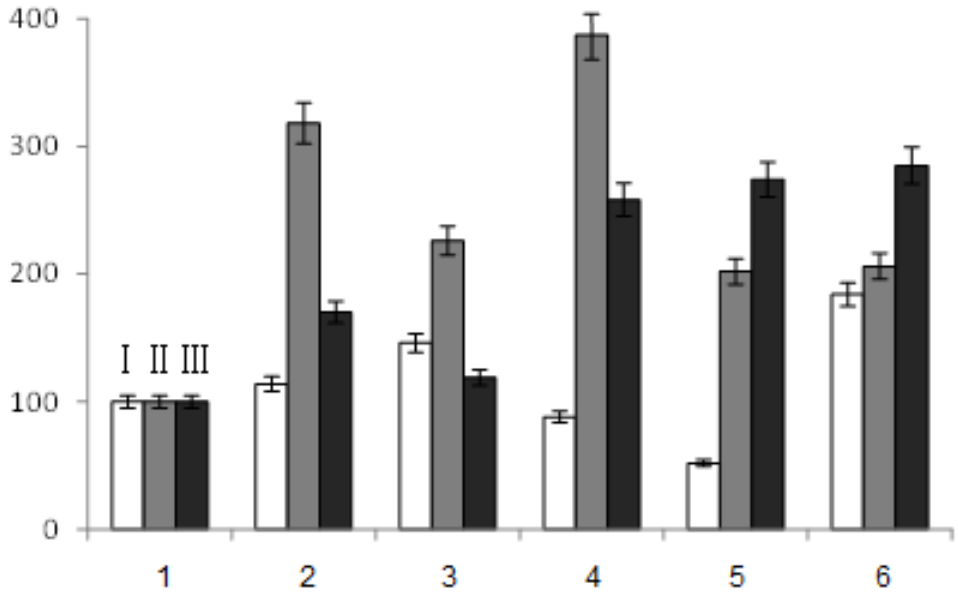

Рис. 4. Изменение транскрипционной активности гена ингибитора амилазы в листьях картофеля под влиянием обработки СК и ЖК и заражения *Ph. infestans*. 1- контроль; 2 - *Ph. infestans*; 3 - обработка СК; 4 - СК+ *Ph. infestans*; 5 - обработка ЖК; 6 - ЖК + *Ph. infestans*. I - 6 ч, II - 24 ч, III - 48 ч после инокуляции.

Так, через 24 часа после инфицирования транскрипционная активность этого гена превышала аналогичный показатель контрольных растений в 3 раза. В растениях, предобработанных СК и ЖК, при инфицировании также обеспечивался высокий уровень транскрипционной активности гена амилазы, который сохранялся в течение 48 ч (рис. 4).

Вероятно, в ответ на инфицирование *Ph. infestans* в растениях картофеля могут синтезироваться *de novo* ингибиторы ферментов, которые способны полностью подавлять активность собственных амилаз. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что предобработка растений СК и ЖК стимулирует процессы синтеза этих ингибиторов.

Схожие результаты получены нами и при исследовании транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы JX683427. Так, инфицирование листьев картофеля *Ph. infestans* приводило к двухкратному повышению уровня транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы уже через 6 ч после инокуляции (рис. 5). Причем такой высокий уровень транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы в инфицированных растениях сохранялся на протяжении 48 ч.

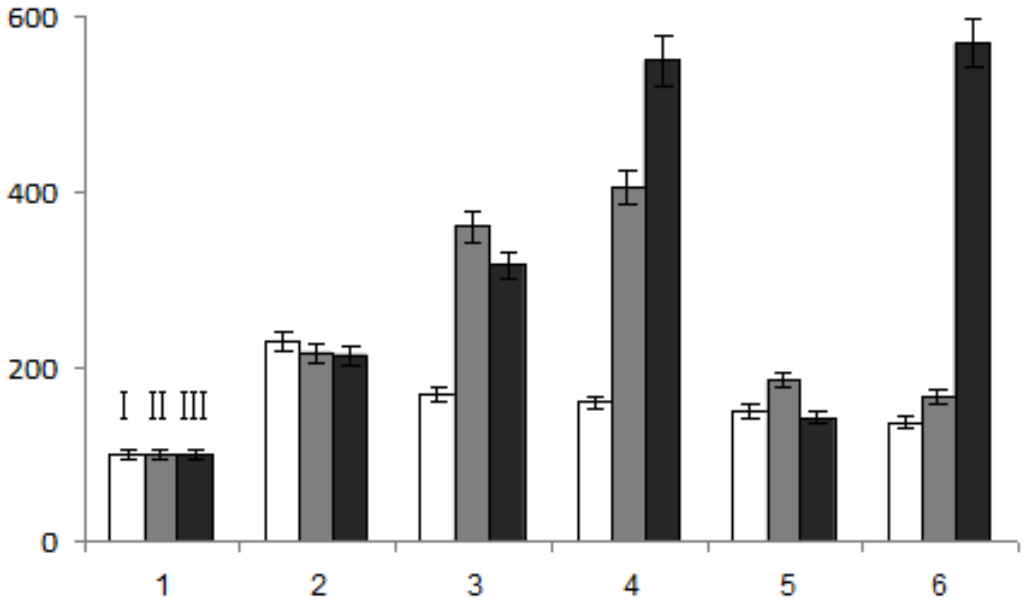

Рис. 5. Изменение транскрипционной активности гена ингибитора протеиназы в листьях картофеля под влиянием обработки СК и ЖК и заражения *Ph. infestans*. 1- контроль; 2 - *Ph. infestans*; 3 - обработка СК; 4 - СК+ *Ph. infestans*; 5 - обработка ЖК; 6 - ЖК + *Ph. infestans*. I - 6 ч, II - 24 ч, III - 48 ч после инокуляции.

Интересно отметить, что предобработка растений СК и ЖК оказывала значительное стимулирующее действие на активность транскрипции гена ингибитора протеиназы в незараженных растениях, но особенно при инфицировании (рис. 3). Так, в варианте с предобработкой СК и ЖК и последующим инфицированием *Ph. infestans* транскрипционная активность гена ингибитора протеиназы через 48 ч после заражения в 6 раз превышала аналогичный показатель в контрольном варианте (рис. 5).

На основании проведенных исследований можно предположить, что ингибитор протеиназы не обладает специфичностью к желатин-гидролизующим ферментам картофеля, поскольку активность этих гидролаз значительно возрастала в растительных тканях картофеля при заражении *Ph. infestans* (рис. 2А).

Образование ингибиторов протеаз является частью ответных реакций растений на инфицирование патогенами и насекомыми-вредителями. Важным участником защитной реакции является мембранный рецептор системин. При механических повреждениях растительных тканей с его участием происходит деполяризация мембраны, что вызывает открытие ионных каналов и резкое увеличение концентрации ионов кальция внутри клетки. В результате происходит активация MAP-киназы и фосфолипазы, и, в ходе последующих

реакций, образуется жасмоновая кислота, по-видимому, вызывающая активацию транскрипции генов защитных белков [Ryan, 2000; Васюкова, Озерецковская, 2009].

Проведенные нами исследования на каллусах и растениях картофеля подтверждают эту гипотезу и свидетельствуют о том, что СК и ЖК оказывают влияние на развитие *Ph. infestans*. Оно выражается в снижении проникающей способности мицелия патогена и высоком стимулирующем действии этих веществ на транскрипционную активность генов ингибиторов гидролаз в инфицированных тканях.

Полученные данные позволяют говорить о том, что активация синтеза ингибиторов гидролаз в тканях растений картофеля под воздействием СК и ЖК может служить одним из факторов формирования устойчивости к *Ph. infestans*.

Работа выполнялась частично по теме госзадания, № гос. регистрации АААА-А16-116020350027-7, и при частичной финансовой поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных – кандидатов наук, № соглашения 075-15-2019-293.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. Москва: Издательство МГУ, 2004. 312 с.
2. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 5. С. 643-653.
3. Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Валуева Т.А., Озерецковская О.Л. Активизация защитных свойств элиситоров с помощью системных сигнальных молекул при взаимодействии картофеля и возбудителя фитофтороза // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 236-240.
4. Воронкова М.В. Исследование активности ингибиторов протеиназ в листьях картофеля // Защита и карантин растений. 2014. № 10. С. 45-46.
5. Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха // Прикладная биохимия и микробиология. 1975. № 5. С. 777-783.
6. Домаш В.И., Шарпио Т.П., Забрейко С.А., Сосновская Т.Ф. Протеолитические ферменты и ингибиторы трипсина высших растений в условиях стресса // Биоорганическая химия. 2008. Т. 1. № 3. С. 353-357.
7. Кудрявцева Н.Н., Софьин А.В., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Иевлева Е.В., Валуева Т.А. Секреция протеолитических ферментов тремя фитопатогенными микроорганизмами // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. С. 513 -521.
8. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т.41. №3. С. 261-282.
9. Озерецковская О.Л., Варламов В.П., Васюкова Н.И., Чаленко Г.И. Воздействие сигнальных молекул на скорость распространения по тканям картофеля иммунизирующего действия элиситоров // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 2. С. 252-256.
10. Плотникова Л.Я. Влияние бензотиодазола – индуктора системной приобретенной устойчивости – на патогенез бурой ржавчины пшеницы // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 571-580.
11. Полевой В.В., Чиркова Т.В. Практикум по росту и устойчивости растений: Учебное пособие. С-Пб.: Изд-во С. - Петерб. Ун-та. 2001. 212 с.

12. Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Кладницкая Г.В., Чаленко Г.И., Валуева Т.А. Влияние белковых ингибиторов протеиназ из клубней картофеля на рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т.44. №1. С. 101-105.
13. Тарчевский И. А. Сигнальные системы растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
14. Фролова С.А., Титов А.Ф. Активность протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в листьях пшеницы в начальный период действия и в последействии низкой закаливающей температуры // Физиология растений. 2008. №5. С. 549-552.
15. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов с использованием субстратов, иммобилизованных в геле агарозы // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. №4. С. 497-501.
16. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. Уфа: Гилем, 2006. 232 с.
17. Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrutes of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. P. 271-278.
18. Feng T., Nyffenegger C., Hojrup P., Vidal-Melgosa S., Yan K., Ulrik Fangel J., Meyer A.S., Kirpekar F. Characterization of an extension-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* // Prt. Appl Microbiol Biotechnol. 2014. V.98. No. 24. P. 10077-10089.
19. Gappa-Adachi R., Yano1 K., Takeuchi S., Morita Y., Uematsu S. Phytophthora blight of southern star (*Oxypetalum caeruleum*) caused by *Phytophthora palmivora* in Japan // J. Gen Plant Pathol. 2012. V. 78. P. 39-42.
20. Hukkanen A.T., Kokko H.I., Buchala A.J., McDougall G.J., Stewart D., Karenlampi S.O., Karjalainen R.O. Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries // J. Agric. Food Chem. 2007. V.55. P.1862−1870.
21. Ma J., Zhao Q., Lu M., Wang J. Kunitz-type trypsin inhibitor gene family in *Arabidopsis* and *Populus trichocarpa* and its expression response to wounding and herbivore in *Populus nigra* // Tree genetics & genomes. 2011. V. 7. No. 2. P. 431-441.
22. Protsenko M.A., Bulantseva E.A., Korableva N.P. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant fleshy fruits during their ripening and infections // Russian Journal of Plant Physiology. 2010. V. 57. № 3. P. 356-362.
23. Ryan C.A. The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1477. P. 112–121.
24. Silva T.M., Damasio A.R., Maller A., Michelin M., Squina F.M., Jorge J.A., Teixeira M. Polizeli purification, partial characterization, and covalent immobilization-stabilization of an extracellular α-amylase from Aspergillus niveus // Folia Microbiol. 2013. V. 58. P. 495 - 502.
25. Silva T.M., Damasio A.R., Maller A., Michelin M., Squina F.M., Jorge J.A., Teixeira M. Polizeli purification, partial characterization, and covalent immobilization-stabilization of an extracellular α-amylase from *Aspergillus niveus* // Folia Microbiologica. 2013. V. 58. P. 495-502.
26. Valencia-Jimenez A., Arboleda V., Grossi de Se M.F. Activity of α-amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive α-amylases of the coffee berry borer // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008. Vol. 56. No. 7. P. 2315-2320.