ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2023, том 70, № 1, с. 45–57

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1.575.113.1

СОРТОСПЕЦИФИЧНОЕ ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА ХИТИНАЗНУЮ И ГЛЮКАНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В КОРНЯХ ЧЕСНОКА *Allium sativum* L.

© 2023 г.
М. А. Филюшин[a], *, Б. Ц. Шагдарова[a], А. В. Ильина[a], Е. З. Кочиева[a], А. В. Щенникова[a], В. П. Варламов[a]

[a] *Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук, Москва, Россия*

**e-mail: michel7753@mail.ru*

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.
После доработки 08.04.2022 г.
Принята к публикации 08.04.2022 г.

Хитозан является природным полисахаридом и при внешнем применении способен стимулировать как рост, так и защиту растения, повышая устойчивость к абиотическим стрессам и подавляя развитие многих фитопатогенов. Иммунный ответ включает активацию защитных белков – карбогидраз, таких как хитиназы и глюканазы, которые также известны своим участием в регуляции морфогенеза. В работе впервые исследовано влияние обработки нефракционированным (гидролизат) хитозаном низкой (ГХ1) и средней (ГХ2) молекулярной массы на хитиназную и глюканазную активности, а также на экспрессию генов хитиназ и β-1,3-глюканаз в корнях двух сортов чеснока *Allium sativum* L., различающихся устойчивостью к фузариозной гнили. Продемонстрировано, что воздействие хитозанов на ферментативную активность и экспрессию генов β-1,3-глюканаз (*AsPR2a*, *AsPR2b* и *AsPR2c*) и хитиназ (*AsCHI1*, *AsCHI3*, *AsCHI7*, *AsCHI17* и *AsCHI23*) сортоспецифично, что может быть связано с различиями в чувствительности сортов к фузариозу. Сходная между сортами экспрессия генов хитиназ *AsCHI10*, *AsCHI27* и *AsCHI34* предполагает их участие в морфогенезе корневой ткани. Результаты свидетельствуют о большем стимулирующем эффекте ГХ2 в сравнении с ГХ1 на хитиназную и глюканазную активность. Большее ингибирующее воздействие ГХ2 в сравнении с ГХ1 на экспрессию генов хитиназ и β-1,3-глюканаз коррелирует с меньшим фунгицидным эффектом ГХ2 на *Fusarium proliferatum*. Полученные данные могут быть использованы в селекционной биотехнологии для повышения устойчивости чеснока к фузариозу.

Ключевые слова: *Allium sativum*, *Fusarium proliferatum*, хитозан, устойчивость к фузариозу, хитиназы, β-1,3-глюканазы, ферментативная активность, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330322050050, **EDN:** AKUGBK

ВВЕДЕНИЕ

Область сельскохозяйственной биотехнологии, связанная с повышением урожайности культур, направлена на изучение стимулов регуляции физиологического развития растений, а также их защиты от абиотических и биотических стрессов. Эти два направления исследований могут быть объединены, благодаря существованию широко распространенного в природе полисахарида хитина и его производного хитозана.

Особенное место в исследованиях занимают фитопатогенные грибы, приводящие к значительным потерям урожая. Защищаясь, растения подавляют развитие инфекции путем разрушения клеточной стенки гриба, состоящей на 80–90% из полисахаридов – β-(1,3)- и β-(1,6)-глюканов, хитина (состоящего из звеньев β-(1→4)-N-ацетил-D-глюкозамина) и хитозана (состоящего из различных звеньев β-(1→4)-N-ацетил-D-глюкозамина и преимущественно β-(1→4)-D-глюкозамина) [1–3].

При заражении растение воспринимает хитин и хитозан как сигнальные молекулы, которые запускают микроб/патоген-ассоциированный молекулярный паттерн (MAMP/PAMP), что, в частности, приводит к активации белков, связанных с патогенезом (PR-белки) [1–3]. С разрушением клеточной стенки гриба связаны семейства белков PR2–PR5, куда входят β-1,3-глюканазы, хитиназы и хитозаназы [4]. Эти ферменты считаются наиболее важными для самозащиты растений от грибов. β-1,3-Глюканазы катализируют расщепление β-1,3/1,6-глюканов [5]. Хитиназы гидролизуют хитин/хитозан путем расщепления β-1,4-гликозидных связей, связывающих ацетилированные мономеры D-глюкозамина [6]. Хитозаназы способствуют расщеплению деацетилированных компонентов хитозана [7]. При этом активация хитиназ зави-

сит от степени ацетилирования и полимеризации хитина/хитозана [6].

В настоящее время хитозан активно тестируется на применение в биотехнологии растений [8, 9]. Дополнительным преимуществом использования хитозана в сравнении с фунгицидами является его биоразлагаемость, отсутствие токсичности и аллергенности [9]. Сообщается также о положительном влиянии хитозана на рост и развитие растений, включая усиление фотосинтетической и антиоксидантной активности, накопление эндогенных гормонов и хлорофилла в листьях, а также улучшение качественных и количественных характеристик урожая [3, 8, 9].

Хитозан не только стимулирует иммунный ответ растения, но и негативно действует на грибные патогены, плазматическая мембрана которых обогащена полиненасыщенными жирными кислотами [10, 11]. Так, наиболее экономически вредоносные грибные патогены – почвенные гемибиотрофные аскомицеты рода *Fusarium*, чувствительны к хитозану [11–15].

Грибы рода *Fusarium* наносят серьезный ущерб урожаю чеснока (*Allium sativum* L.), важнейшей луковичной культуры, которая восприимчива к *F. oxysporum* (f. sp. *cepae*), *F. proliferatum*, *F. acutatum*, *F. anthophilium*, *F. verticilloides*, *F. solani* и *F. acuminatum* [16–18]. Предыдущие исследования устойчивых и восприимчивых к фузариозу сортов чеснока показали, что в иммунном ответе растения на инфекцию *Fusarium* участвуют белки семейств PR1–5, включая хитиназы, β-1,3-глюканазы и тауматин-подобные белки [19–21].

В настоящей работе было исследовано влияние экзогенной обработки гидролизатами хитозана с низкой и средней молекулярной массой (MW) на хитиназную и глюканазную активности, а также на экспрессию генов, кодирующих отдельные хитиназы и β-1,3-глюканазы, в зубках чеснока двух сортов, различающихся устойчивостью к фузариозу. Была протестирована фунгицидная активность экстракта корней, полученных при укоренении обработанных гидролизатами хитозана зубков чеснока. Анализ результатов исследования будет способствовать углубленному пониманию воздействия хитозана на *A. sativum* и *F. proliferatum*, что может быть использовано при разработке мер по защите чеснока от фузариоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал, патогены. Для проведения исследования были выбраны образцы двух озимых сортов чеснока (*A. sativum*) – Сармат и Стрелец, устойчивого и чувствительного к фузариозной гнили, соответственно. Луковицы сортов урожая 2021 г. были любезно предоставлены Федеральным научным центром овощеводства (ФНЦО, Московская область, Россия).

Штамм *F. proliferatum*, предоставленный Лабораторией фитопатологии ФНЦО, был предварительно выделен из луковиц выращенного в полевых условиях чувствительного к фузариозной гнили сорта Стрелец [22].

Гидролизаты хитозана. Исходный хитозан из панциря краба с молекулярной массой (MW) 1000 кДа и степенью деацетилирования (СД) 85% (ООО Биопрогресс, Щелково, Россия) был использован для получения гидролизатов хитозана (ГХ) путем химической деполимеризации с помощью азотной кислоты, как описано ранее [23] с некоторыми модификациями. Для этого 10 г исходного хитозана диспергировали в 200 мл 6.5% (для ГХ1) или 1.95% (для ГХ2) азотной кислоте, инкубировали в течение 7 ч при 70°C с перемешиванием, охлаждали до комнатной температуры и выдерживали без перемешивания в течение 16 ч при 23°C. Затем доводили pH до 5.0–5.2 25% раствором гидроксида аммония и разбавляли дистиллированной водой до конечного объема 400 мл.

Средневесовую молекулярную массу полученных гидролизатов определяли методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии на хроматографе S2100 Sykam (Sykam, Германия) с использованием разделительной колонки (8 × 300 мм; PSS NOVEMA Max analytic 1000 A) и предколонки (8.0 × 50 мм) [24]. В качестве калибровочных стандартов использовали пуллуланы (α-1,4- и α-1,6-глюканы).

Для определения СД гидролизатов хитозана методом протонного ядерного магнитного резонанса (^{1}H-ЯМР) готовили образцы в дейтерированной воде, и регистрировали протонные спектры (спектрометр Bruker AMX 400, Brucker, США). В качестве стандарта использовали 4,4-диметил-4-силапентансульфоновую кислоту.

Экзогенная обработка чеснока хитозаном. Отдельные зубки луковиц чеснока очищали от покровных чешуй и стерилизовали замачиванием в солевом растворе (10% NaCl, 2.5% $NaHCO_3$) в течение 30 мин. Затем зубки промывали дистиллированной водой, выдерживали 3 мин в 70% этаноле и снова промывали (2–3 раза) дистиллированной водой. Далее зубки делили поровну на 5 групп и замачивали на 24 ч в воде W (1), растворе P1 [контроль для ГХ1, содержащий 60 г/л NH_4NO_3, pH 5.0–5.2] (2), растворе P2 [контроль для ГХ2, содержащий 18 г/л NH_4NO_3, pH 5.0–5.2] (3), растворе ГХ1 (4) и растворе ГХ2 (5). Затем зубки подсушивали на воздухе в течение 20 мин, выкладывали в чашки Петри на смоченную дистиллированной водой фильтровальную бумагу и инкубировали в темноте при комнатной температуре до образования корней. Массу и длину корней измеряли через 5 сут после замачивания. Ткани корней использовали для

измерения хитиназной и глюканазной активности и анализа экспрессии отдельных генов хитиназ и β-1,3-глюканаз. Также экстракт ткани корней был использован для определения степени влияния карбогидраз чеснока на метаболическую активность (МА) штамма *F. proliferatum*.

Выделение суммарной РНК и синтез кДНК. Суммарную РНК выделяли из ткани корня (~ 0.2–0.5 г), предварительно растертой в жидком азоте и хранящейся при –80°C, с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). Препараты очищали от примеси геномной ДНК (RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия), анализировали с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле и использовали для синтеза (с праймером oligo-dT) первой цепи кДНК (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Концентрации РНК и кДНК измеряли флуориметрически (Qubit® Fluorometer, Thermo Fisher Scientific).

Анализ экспрессии генов хитиназ и эндо-β-1,3-глюканаз. Количественную ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) проводили в двух биологических и трех технических повторах с использованием CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США), 3.0 нг кДНК, ген-специфических праймеров и смеси SYBR Green RT-PCR (Синтол, Россия) при следующих условиях: денатурация при 95°C в течение 5 мин, далее 40 циклов денатурации (95°C, 15 с) и отжига/синтеза (60°C, 40 с). Для нормализации данных генной экспрессии использовали референсные гены *GAPDH* и *UBQ* [20].

Анализ общей хитиназной и общей глюканазной активностей. Для биохимического анализа использовали корни чеснока, растертые в жидком азоте и хранящейся при –80°C. В пробирке на 1.5 мл смешивали 0.2 г материала с 0.2 мл предварительно охлажденного 0.05 М натрий-фосфатного буфера (pH 6.0), активно встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали при 14000 *g* в течение 20 мин при комнатной температуре. Супернатант использовали для определения активности ферментов [25] в двух биологических и трех технических повторах.

Для определения хитиназной активности получали коллоидный хитин по методике [26] с некоторыми модификациями. 10 г хитина из панциря крабов тщательно перемешивали с 50 мл 85% фосфорной кислоты и инкубировали в течение 20 ч при комнатной температуре. Полученную суспензию фильтровали под вакуумом через стеклянный пористый фильтр № 1, фильтрат разбавляли дистиллированной водой в 20 раз. После интенсивного перемешивания выпавший в осадок хитин промывали водой декантацией до pH 5.5–6.0, лиофильно высушивали и суспендировали (10 г/л) в стерильной дистиллированной воде.

Для отработки методики определения хитиназной и глюканазной активности подбирали оптимальные значения pH (в диапазоне pH 4.5–7.6), используя 0.05 М Na-ацетатный и Na-фосфатный буферные растворы, температуры (в диапазоне 37–60°C) и времени определения активностей (в диапазоне 20–90 мин).

Для определения общей хитиназной активности использовали коллоидный хитин в качестве субстрата и N-ацетилглюкозамин (стандарт), согласно [27] с некоторыми модификациями. А именно, смешивали 10 мкл коллоидного хитина, 10 мкл 0.05 М натрий-фосфатного буфера (pH 6.0) и 10 мкл супернатанта корневого экстракта (1 мг/мл). Смесь инкубировали 60 мин при 50°C, после чего реакцию останавливали прогреванием на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Затем смесь центрифугировали при 5000 *g* в течение 5 мин при комнатной температуре. К 10 мкл надосадочной жидкости добавляли 90 мкл стерильной воды и 150 мкл динитросалициловой кислоты (DNS) и инкубировали в кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения смесь центрифугировали при 5000 *g* в течение 5 мин при комнатной температуре. Значения оптической плотности (OD) супернатанта при длине волны 540 нм использовали для расчета содержания редуцирующих сахаров. За единицу хитиназной активности принимали количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкг редуцирующих сахаров за 1 мин на 1 мг сырой ткани.

Общую глюканазную активность определяли с использованием ламинарина (субстрат) и D-глюкозы (стандарт), как описано ранее [28] с модификациями. А именно, смесь из 5 мкл супернатанта корневого экстракта (1 мг/мл), 5 мкл 0.05 М натрий-фосфатного буфера (pH 6.0) и 10 мкл ламинарина (2 мг/мл) инкубировали 60 мин при 50°C. Реакцию останавливали прогреванием в кипящей водяной бане в течение 5 мин. Затем смесь центрифугировали (5000 *g*, 5 мин, комнатная температура). 10 мкл супернатанта смешивали с 90 мкл стерильной воды и 150 мкл DNS и инкубировали в кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения смесь центрифугировали (5000 *g*, 5 мин, комнатная температура), и рассчитывали содержание редуцирующих сахаров (на основе данных OD_{540}). Одну единицу активности β-глюканазы определяли как количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкг редуцирующих сахаров за 1 мин на 1 мг сырой ткани.

Статистический анализ. Статистическая обработка результатов (вычисление стандартного отклонения) проводилась с помощью программы Graph Pad Prism v. 8 (https://www.graphpad.com, США). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение (SD) на основе трех технических повторов двух биологических повторов. Для оценки различий применяли кри-

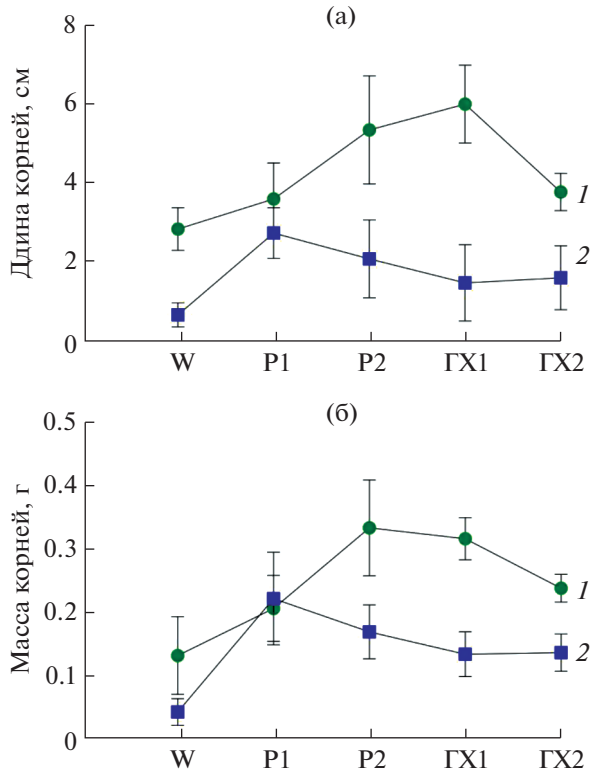

Рис. 1. Зависимость длины (а) и массы (б) корней чеснока от раствора для предпосевной обработки зубков: W – вода, P1 – раствор для ГХ1, P2 – раствор для ГХ2, ГХ1 и ГХ2. *1* – сорт Сармат, *2* – сорт Стрелец.

терий Стьюдента; $P < 0.01$ считалось показателем статистической значимости.

Анализ влияния экстракта чеснока на метаболическую активность (МА) *F. proliferatum*. Растертую ткань корней тщательно смешивали 1 : 1 (w/v) с предварительно охлажденным 0.05 М натрий-фосфатным буфером (pH 6.0), центрифугировали при 14000 *g* в течение 20 мин при комнатной температуре. Серию разведений супернатанта (от 0.0039 до 0.125 мг ткани/мл экстракта) в картофельно-декстрозной среде (PD, potato dextrose) распределяли по 100 мкл/лунку 96-луночного плоскодонного планшета.

В каждую из этих лунок добавляли суспензию *F. proliferatum* до конечной концентрации 1.25×10^4 конидий/мл. Культура предварительно выращивалась в течение 7 дней на PD-агаре (PDA), затем мицелий с конидиями суспендировали в 10 мл жидкой среды PD и фильтровали через стерильную вату.

Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 25°C в темноте. Действие экстракта корней чеснока определяли с использованием модифицированного тетразолиевого метода (МА клетки коррелирует с образованием пурпурных кристаллов формазана в результате активности НАДФ·Н-зависимой оксидоредуктазы). Для этого в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора йодонитротетразолия хлорида (5 мг/мл в 0.1 М PBS, pH 7.4), содержащего 1-метоксифеназин-метосульфат (4 мг/мл). Планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем удаляли надосадочную жидкость и растворяли кристаллы формазана в 150 мкл диметилсульфоксида в течение 16 ч при 37°C с перемешиванием (100 об/мин). OD_{540} определяли с помощью MultiskanTM FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Метаболическую активность *F. proliferatum* рассчитывали по формуле (1):

$$MA = OD_t/OD_c \times 100\%, \quad (1)$$

где OD_t и OD_c – средние значения OD в опытной и контрольной лунках соответственно.

Анализ проводили в трех биологических повторах с тремя техническими повторами для каждой тестируемой концентрации. Концентрацию экстракта, вызывающую 50% ингибирование МА грибов (EC_{50}), принимали за эталон.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение гидролизатов хитозана и обработка ими зубков чеснока сортов, различающихся по устойчивости к фузариозной гнили. Путем химической деполимеризации крабового хитозана были получены два гидролизата – ГХ1 и ГХ2. Определены их основные характеристики: средневесовая MW – 29 кДа (ГХ1) и 135 кДа (ГХ2); СД – 90% (ГХ1) и 85% (ГХ2); индекс полидисперсности (ИП) – 2.4 (ГХ1) и 2.6 (ГХ2). Хитозаны ГХ1/ГХ2 в концентрации 2 мг/мл были использованы для замачивания зубков чеснока двух сортов – Стрелец и Сармат, восприимчивого и устойчивого к фузариозной гнили, соответственно. В качестве контролей использовали обработку водой (W) и растворами P1 и P2.

Инициация корнеобразования началась через 72 ч (сорт Сармат) и 96 ч (сорт Стрелец) после замачивания. Спустя 120 ч было проведено измерение длины и массы корней, а также отобраны пробы для анализа ферментативной активности и генной экспрессии.

Было выявлено, что в сравнении с W-контролем, обработка зубков растворами ГХ1 и P2 действует положительно на длину корней у сорта Сармат, тогда как у сорта Стрелец такое действие оказывает раствор P1 (рис. 1а). Рост массы корней стимулируется всеми растворами, за исключением действия P1 у сорта Сармат (нет отличий от W-контроля) (рис. 1б). При этом стимулирующее воздействие растворов существенно выше у сорта Стрелец, чем у сорта Сармат, за исключением P1-образцов (рис. 1).

Таким образом, наибольшая активизация роста корней происходила при обработке раствора-

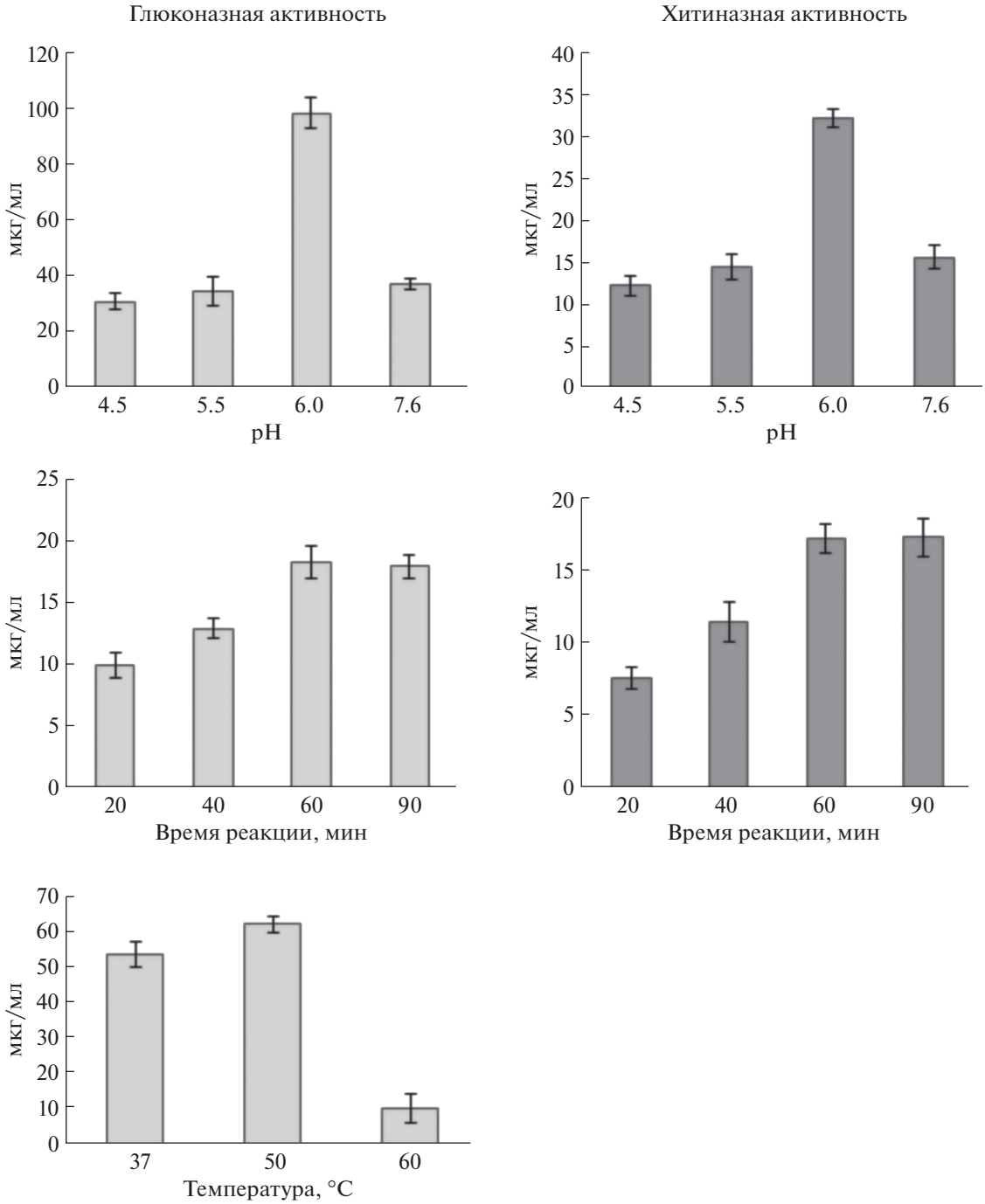

Рис. 2. Подбор оптимального значения pH, времени и температуры для определения хитиназной и глюканазной активностей.

ми P2 и ГХ1 у сорта Сармат (устойчивого к фузариозу), и при обработке растворами P1 и P2 – у сорта Стрелец (восприимчивого к фузариозу).

Подбор условий для определения ферментативной активности. Ранние исследования очищенных хитиназ (MW 25–40 кДа) из различных растительных источников продемонстрировали влияние pH (в диапазоне 4.0–8.0) и температуры (в диапазоне 40–50°C) на активность ферментов [37]. С использованием растительных экстрактов (1 мг/мл) из корней чеснока сорта Сармат, предварительно обработанных ГХ1 и ГХ2, были подобраны оптимальные значения pH (6.0), температуры (50°C) и времени реакции (60 мин) для определения хитиназной и глюканазной активностей (рис. 2).

Анализ ферментативной активности в корнях чеснока. Для выявления ответа сортов чеснока с различной чувствительностью к фузариозу на об-

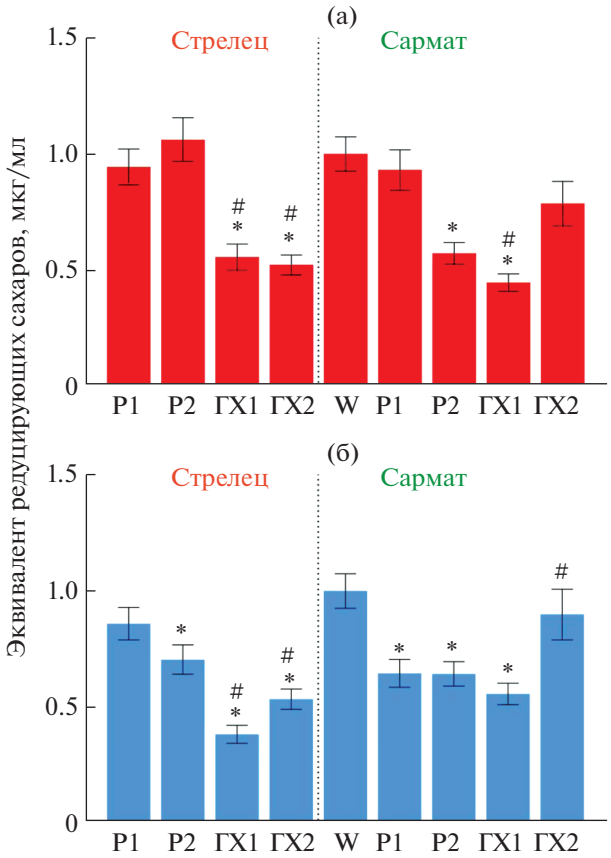

Рис. 3. Результаты анализа общей хитиназной (а) и общей β-глюканазной (б) активностей в корнях зубков чеснока сортов Стрелец и Сармат, предварительно обработанных водой (W), раствором P1, раствором P2, раствором ГХ1 и раствором ГХ2. Значение W несущественно различается между сортами, поэтому дано с учетом данных по обоим сортам и приравнено к единице. * $P < 0.01$ – статистически значимое различие от значений W-контроля. # $P < 0.01$ – статистически значимое отличие значений ГХ от соответствующих значений P.

работку хитозанами с разной MW, полученные после обработки корни чеснока были использованы для измерения хитиназной и глюканазной активности. Было обнаружено, что в сравнении с W-контролем общая хитиназная активность существенно падает в образцах ГХ1 (оба сорта), ГХ2 (Стрелец) и P2 (Сармат); остальные значения сходны с W-контролем (рис. 3а). Глюканазная активность снижается в образцах P2, ГХ1, ГХ2 (оба сорта) и P1 (Сармат) (рис. 3б). В сравнении с образцами P1 и P2, образцы ГХ1 и ГХ2 демонстрировали подавление хитиназной и глюканазной активности в случае сорта Стрелец (восприимчивого к фузариозу). У сорта Сармат (устойчивого к фузариозу) образец ГХ2 в сравнении с P2 показал активацию обеих активностей, тогда как ГХ1 в сравнении с P1 – ингибирование хитиназной активности и отсутствие влияния на глюканазную активность (рис. 3).

Анализ экспрессии генов β-1,3-глюканаз и хитиназ в корнях сортов чеснока. Для сравнительного анализа возможного молекулярного ответа на обработку хитозанами разной MW в корнях чеснока двух сортов, различающихся чувствительностью к фузариозу, была определена экспрессия отдельных генов β-1,3-глюканаз (*AsPR2a–c*) и хитиназ семейств GH18 (*AsCHI7*, *10* и *17*) и GH19 (*AsCHI1*, *3*, *23*, *27*, *28* и *34*).

Было обнаружено, что ответ генов β-1,3-глюканаз на обработку анализируемыми растворами существенно различается между сортами. Так, по сравнению с обработанными водой образцами (W-контролем), в опытных образцах устойчивого сорта Сармат существенно снижается экспрессия одного из генов – *AsPR2c*, тогда как экспрессия других двух генов не меняется (рис. 4). В опытных образцах сорта Стрелец значительно возрастает экспрессия генов *AsPR2a* и *AsPR2b*, тогда как уровень транскриптов *AsPR2c* повышается в P2-образцах, падает в P1- и ГХ1-образцах и не меняется в ГХ2-образцах (рис. 4). В сравнении с воздействием на генную экспрессию растворов P1 и P2, соответствующие гидролизаты хитозана оказывают нейтральное (*AsPR2a* и *AsPR2b* в образце ГХ1 против P1 у обоих сортов), угнетающее (*AsPR2a*, *AsPR2b* и *AsPR2c* – ГХ2 против P2 у сорта Стрелец) или стимулирующее (*AsPR2c* – ГХ1/2 против P1/2 у сорта Сармат; ГХ1 против P1 у сорта Стрелец) влияние (рис. 4).

В случае генов хитиназ семейства GH18 было показано, что экспрессия *AsCHI10* в образцах P1/2, ГХ1/2 обоих сортов подавляется в сравнении с W-контролем. При этом ГХ1-обработка в сравнении с P1 имеет стимулирующее влияние у восприимчивого сорта Стрелец и подавляющее влияние у неустойчивого сорта Сармат, а ГХ2 и P2 – одинаковы по воздействию. Экспрессия гена *AsCHI7* повышена во всех опытных образцах обоих сортов в сравнении с W-контролем, за исключением нейтрального эффекта ГХ2 у сорта Сармат. При этом стимулирующее влияние приблизительно в 5–6 раз выше у сорта Стрелец по сравнению с сортом Сармат. Экспрессия гена *AsCHI17* повышена в образцах P2 и ГХ2 и не меняется в образцах P1 и ГХ1 сорта Стрелец в сравнении с W-контролем. У сорта Сармат уровень транскрипции *AsCHI17* существенно падает (ГХ2) или остается неизменным (P1/2 и ГХ1) (рис. 5).

Анализ экспрессии шести генов хитиназ семейства GH19 выявил существенные различия между ответом анализируемых сортов на обработку растворами P1, P2, ГХ1 и ГХ2 (рис. 6). Так, в сравнении с W-контролем, транскрипция гена *AsCHI23* в опытных образцах снижается у сорта Стрелец и повышается (кроме P1) у сорта Сармат.

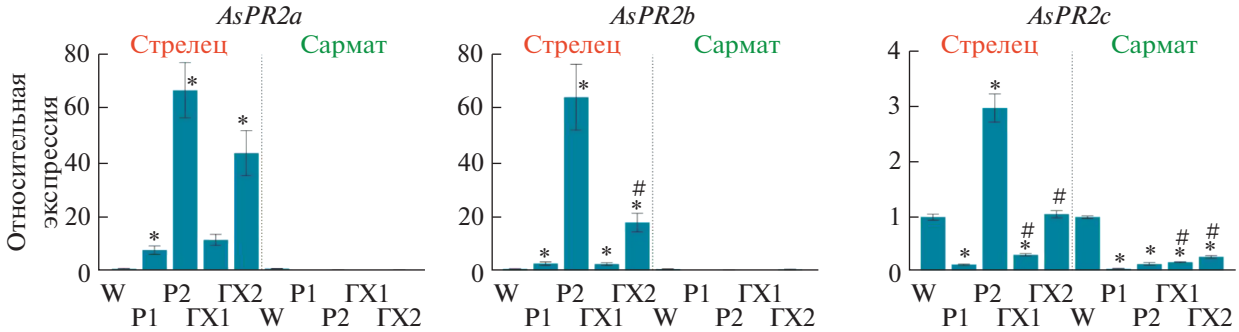

Рис. 4. Экспрессия генов β-глюканаз *AsPR2a*, *AsPR2b* и *AsPR2c* в корнях зубков чеснока сортов Стрелец и Сармат через 120 ч после обработки зубков водой (W), раствором P1, раствором P2, раствором ГХ1 и раствором ГХ2. Использованные пары праймеров: 5'-GCTAGAAACCATATCGTTGCCT-3' и 5'-GCATACCGTAGCATACTCCGA-3' (*AsPR2a*; Asa2G01057.1), 5'-GGTCGCATTTCTCCTAGGCAT-3' и 5'-GCGTCGCCTGCTGATGGAA-3' (*AsPR2b*; Asa2G01195.1), 5'-GGCCCATTGTCCAGTTCTTG-3' и 5'-AGGCGCCGTGAATAATGCGTA-3' (*AsPR2c*; Asa6G02021.1). Значения нормализованы относительно W-контроля, принятого за единицу. * $P < 0.01$ – статистически значимое различие от значений W-контроля. # $P < 0.01$ – статистически значимое отличие значений ГХ от соответствующих значений P.

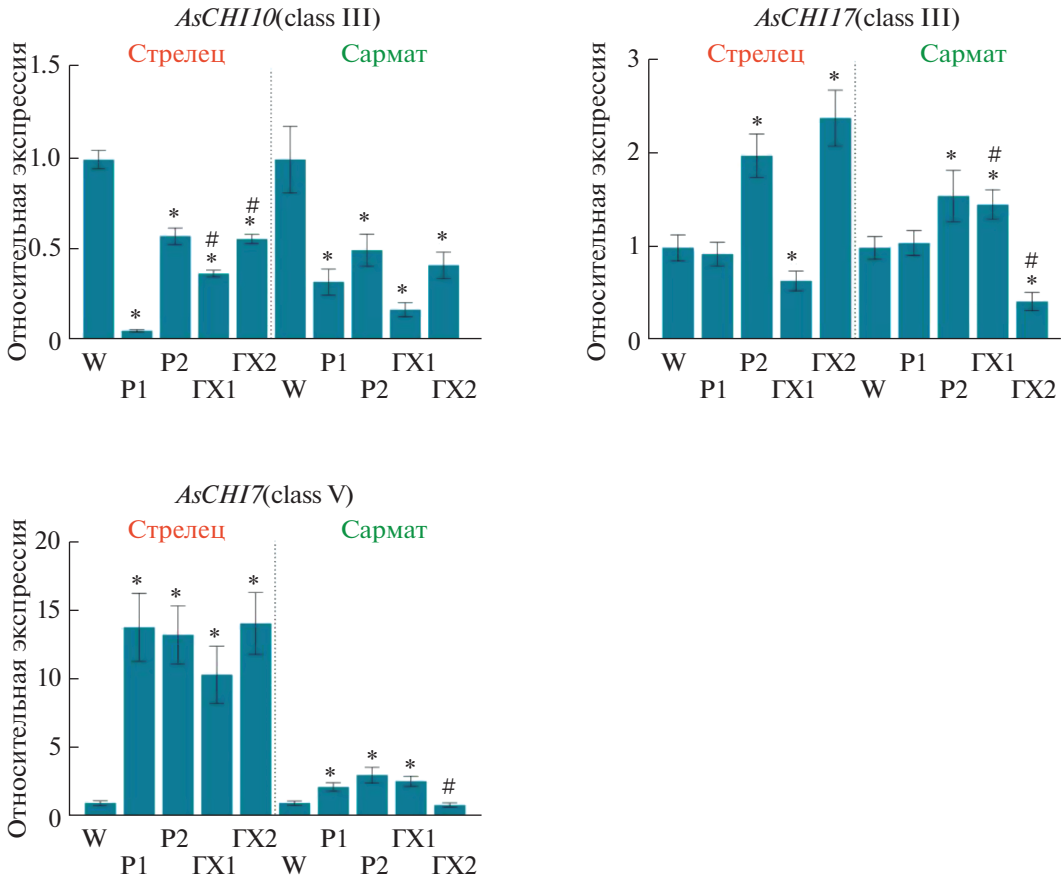

Рис. 5. Экспрессия генов хитиназ семейства GH18 (*AsCHI10*, *AsCHI17* и *AsCHI7*) в корнях зубков чеснока сортов Стрелец и Сармат через 120 ч после обработки зубков водой (W), раствором P1, раствором P2, раствором ГХ1 и раствором ГХ2. Использованные пары праймеров: 5'-TGAGCCCAACACCTTGGTTTC-3' и 5'-CGCTGGCTTTAACAGCATCAC-3' (*AsCHI10*; Asa4G01559.1), 5'-TCGACAACGTTTGGGTGCAG-3' и 5'-CAGCAGGCAGACCAAGGTAT-3' (*AsCHI17*; Asa7G04760.1), 5'-GATTCCACTGTGCCTCTCGAT-3' и 5'-TCAGTCACATTCCAGCTTCCG-3' (*AsCHI7*; Asa6G04947.1). Значения нормализованы относительно W-контроля, принятого за единицу. *$P < 0.01$ – статистически значимое различие от значений W-контроля. # $P < 0.01$ – статистически значимое отличие значений ГХ от соответствующих значений P.

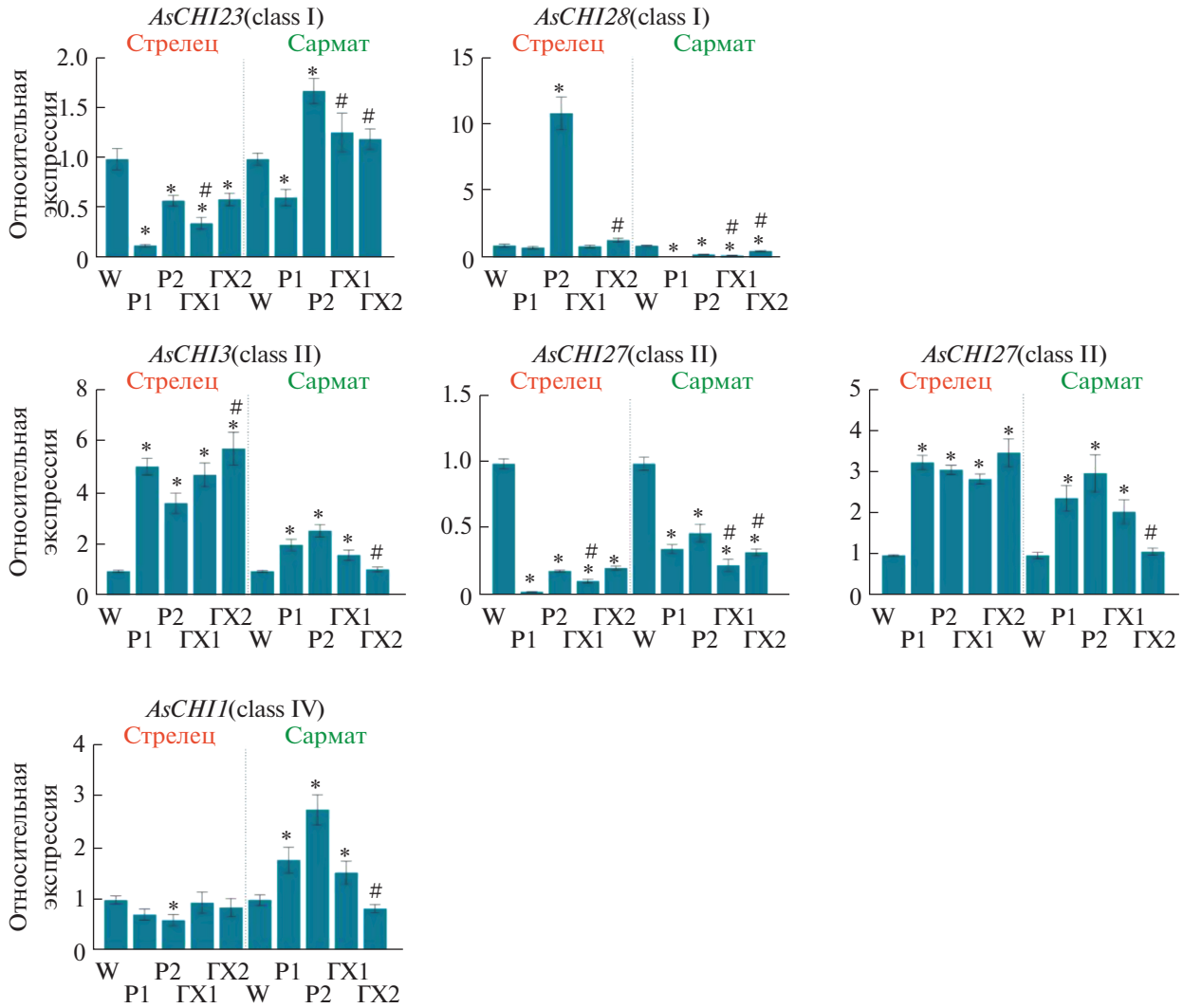

Рис. 6. Экспрессия генов хитиназ семейства GH19 (*AsCHI23*, *AsCHI28*, *AsCHI3*, *AsCHI27*, *AsCHI34* и *AsCHI1*) в корнях чеснока сортов Стрелец и Сармат через 120 ч после обработки зубков водой (W), раствором P1, раствором P2, раствором ГХ1 и раствором ГХ2. Использованные пары праймеров: 5'-GTACCACTGGGGATACCGAT-3' и 5'-CCCCATGAATATGGTCCATCG-3' (*AsCHI23*; Asa5G03841.1), 5'-GGAACCACTGGAGACATCAATG-3' и 5'-GCCTTGTTCTTGCTTGAAGCAG-3' (*AsCHI28*; Asa6G07412.1), 5'-CCGCTTTCTTCGCACAGACTT-3' и 5'-TCCCCTGCTCTTCCACAAAG-3' (*AsCHI1*; Asa1G02082.1), 5'-CTTTTCTTGGCCATGTTGGTGC-3' и 5'-TCAGCACAATAGGACTGGCTC-3' (*AsCHI34*; Asa7G05194.1), 5'-CCTAGCCAATCCTACTGCACAG-3' и 5'-GTGGTCAAGGAGGTCGATTTTG-3' (*AsCHI3*; Asa7G03617.1), 5'-ACTCCACCGACAAAGAATGGC-3' и 5'-CGGGTTTCTTAACCCATCGAAG-3' (*AsCHI27*; Asa6G02204.1). Значения нормализованы относительно W-контроля, принятого за единицу. *$P < 0.01$ – статистически значимое различие от значений W-контроля. # $P < 0.01$ – статистически значимое отличие значений ГХ1/2 от соответствующих значений P1/2.

Экспрессия гена *AsCHI28* падает во всех опытных образцах (сорт Сармат), но при этом растет (P2 и ГХ2) или не меняется (P1 и ГХ1) у сорта Стрелец. Заметное стимулирующее влияние оказывает обработка P2 против ГХ2 по отношению к генам *AsCHI23* (сорт Сармат) и *AsCHI28* (сорт Стрелец), а также ГХ1 против P1 по отношению к *AsCHI23* (оба сорта) и *AsCHI28* (сорт Сармат). Экспрессия генов *AsCHI3* и *AsCHI34* значительно повышена во всех опытных образцах обоих сортов, за исключением ГХ2 сорта Сармат. В противоположность этому экспрессия гена *AsCHI27* резко снижена во всех опытных образцах обоих сортов. При этом наблюдается стимулирующее влияние P2 против ГХ2 (*AsCHI3*, *27* и *34*, сорт Сармат), ГХ2 против P2 (*AsCHI3*, сорт Стрелец), P1 против ГХ1 (*AsCHI34*, сорт Стрелец; *AsCHI27*, сорт Сармат) и ГХ1 против P1 (*AsCHI27*, сорт Стрелец). Экспрессия гена *AsCHI1* в ответ на воздействие практически не меняется (ГХ1 и ГХ2) или снижается (P1 и P2) у образцов сорта Стрелец в сравнении с W-контролем, тогда как у образцов сорта Сармат она

возрастает, кроме ГХ2 (не меняется). Отмечено сильное негативное влияние ГХ2 против Р2 на экспрессию *AsCHI1* у сорта Сармат (рис. 6).

Анализ влияния карбогидраз из экстрактов чеснока на метаболическую активность *F. proliferatum*. В результате проведенного теста было определено, что карбогидразы из экстракта чеснока восприимчивого к фузариозу сорта Стрелец способны подавлять МА *F. proliferatum* как минимум на 50% при концентрациях 0.06 и 0.125 мг ткани/мл экстракта для контролей (W, P1 и P2) и образца, обработанного ГХ1, и при концентрации 0.125 мг ткани/мл экстракта – для ГХ2-образца (рис. 7).

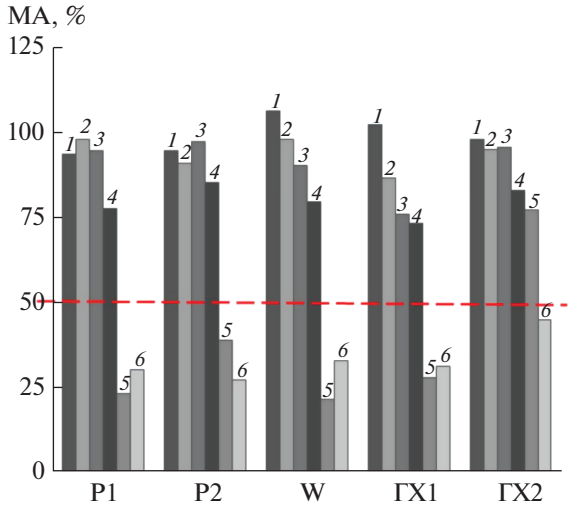

Рис. 7. Метаболическая активность (МА) *F. proliferatum* при действии карбогидраз (хитиназ и глюканаз) из экстрактов корней образцов чеснока сорта Стрелец после обработки зубков водой (W), раствором P1, раствором P2, раствором ГХ1 и раствором ГХ2. *1* – 0.0039 мг/мл, *2* – 0.007 мг/мл, *3* – 0.015 мг/мл, *4* – 0.03 мг/мл, *5* – 0.06 мг/мл, *6* – 0.125 мг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хитозан, являясь безопасным и дешевым продуктом деацетилирования природного полисахарида хитина, имеет огромный потенциал применения в сельском хозяйстве в качестве стимулятора как роста и развития, так и устойчивости растений к стрессам [9]. Обработка растений хитозаном вызывает, в числе прочего, рецептор-опосредованную активацию генов PR-белков β-1,3-глюканаз и хитиназ [29]. При грибной инфекции данные карбогидразы гидролизуют полисахариды стенки грибных клеток, приводя к их лизису. Одновременно образуются олигосахаридные элиситоры, которые служат сигналом для индукции иммунного ответа растения [30–32].

Кроме защиты растения, β-1,3-глюканазы и хитиназы задействованы в морфогенезе тканей и органогенезе, участвуя в обеспечении межклеточной коммуникации и регуляции организации клеточной стенки, удлинения клетки и развития эмбриональных клеток [33–36]. Так, во время дифференцировки клеток растения, а также в ответ на различные стрессы β-1,3-глюканаза совместно с каллозосинтазой регулирует уровень каллозы (β-1,3-глюкановый полисахарид) в плазмодесмах. Тем самым происходит контроль проницаемости плазмодесм, через которые проходят симпластические молекулярные обмены, определяющие межклеточную коммуникацию [37]. С возрастом растения увеличивается экспрессия конститутивных хитиназ, что предполагает их участие в программируемом апоптозе клеток [35]. Отдельные хитиназы вовлечены в симбиотическое взаимодействие растений с азотфиксирующими бактериями или микоризными грибами [35], а также выступают в роли плод-специфичных запасных белков, служащих источником аминокислот для синтеза белков, ассоциированных с созреванием [38]. Некоторые хитиназы способны ингибировать активность аспарагиновых протеаз [39] и α-амилаз [40]. Более того, имеются свидетельства наличия положительной обратной связи между активностью хитиназ и синтезом этилена – гормона стресса, повышенное содержание которого регулирует экспрессию многих белков [34].

Таким образом, обработка растения хитозаном может стимулировать не только фунгицидную активность, но и многие базовые процессы развития в растениях, включая прорастание и укоренение.

В данной работе был исследован эффект воздействия нефракционированного (гидролизата) хитозана на рост корней, а также корневую активность хитиназ и глюканаз и экспрессию генов отдельных хитиназ и β-1,3-глюканаз у двух сортов чеснока, различающихся восприимчивостью к фузариозу. Кроме того, была проанализирована зависимость фунгицидной (против *F. proliferatum*) активности чеснока от обработки гидролизатами хитозана.

Биологическая активность хитозана зависит от структурных характеристик, таких как молекулярный вес, степень деацетилирования и индекс полидисперсности [41–44]. Наибольший стимулирующий защитный эффект в условиях окислительного стресса наблюдается для хитозанов с низкой и средней MW [45]. При этом обработка хитозаном в концентрации 2–4 мг/мл стимулирует развитие проростков, накопление эндогенных гормонов, активность альфа-амилазы и содержание хлорофилла в листьях, равно как и иммунитет растения [8]. Поэтому для поверхностной обработки зубков чеснока нами были получены и применены хитозаны с низкой (39 кДа) и средней

(135 кДа) MW с высокой СД (85–90%) в концентрации 2 мг/мл.

Помимо воды (W-контроль), для замачивания зубков были использованы растворы P1 и P2 в качестве контролей для гидролизатов хитозана, различающиеся содержанием нитрата аммония, так как химическая деполимеризация осуществлялась с использованием азотной кислоты с последующей нейтрализацией гидроксидом аммония. Известно, что соединения аммония и нитратов являются главными поставщиками критического для роста растений азота [46]. Обработка P1 и P2 не меняла или ингибировала (в том числе в зависимости от сорта), но не стимулировала хитиназную и глюканазную активности (рис. 3), что предполагает незначительность (в случае P2) или избыточность (P1) нитрата аммония в данных растворах. Тем не менее, по отношению к W-контролю воздействие P1 и P2 на рост корней было либо аналогичным (сорт Сармат), либо стимулирующим (сорт Стрелец), причем P1 оказался эффективнее P2 (рис. 1). Таким образом, концентрация аммонийной соли 60 г/л (P1) имеет более выраженный стимулирующий эффект в сравнении с 18 г/л (P2). При этом влияние обоих растворов сортоспецифично. Учитывая восприимчивость сорта Стрелец к фузариозной гнили, можно предположить более активную индуцируемость его защиты в сравнении с устойчивым к фузариозу сортом Сармат. Подтверждение сортоспецифичности воздействия было получено при добавлении гидролизатов хитозана ГХ1 и ГХ2, которое не меняло картину воздействия P1 и P2 на параметры роста корней чеснока (рис. 1), однако усиливало ингибирующее действие на хитиназную и глюканазную активности у сорта Стрелец, тогда как у сорта Сармат стимулировало (обе активности, ГХ2), подавляло (хитиназы, ГХ1) или не изменяло (глюканазы, ГХ1) (рис. 3).

Общая ферментативная активность, как для хитиназ, так и для глюканаз, состоит из суммы активностей отдельных ферментов, среди которых могут быть участвующие как в процессах развития, так и в регуляции иммунитета растения. Анализ экспрессии отдельных генов хитиназ и β-1,3-глюканаз способен, таким образом, помочь прояснить направленность роли отдельных карбогидраз. Поскольку информация о генах хитиназ и β-1,3-глюканаз крайне ограничена, список выбранных в анализ генов основывался на наших ранних исследованиях ответа сортов Стрелец и Сармат на инфекцию *F. proliferatum* [19, 20] и транскриптомных данных по этим сортам (не опубликовано).

Полученные данные не показали какой-либо очевидной корреляции с воздействием хитозанов. Однако профиль транскрипции генов β-1,3-глюканаз *AsPR2a*, *AsPR2b* и *AsPR2c*, а также генов хитиназ *AsCHI1*, *AsCHI3*, *AsCHI7*, *AsCHI17* и *AsCHI23* оказался сортоспецифичным (рис. 4–6). Вероятно, это связано с различиями в устойчивости сортов к фузариозу и, в меньшей степени, с отложенной инициацией корнеобразования у восприимчивого сорта Стрелец в сравнении с устойчивым к инфекции сортом Сармат. Гены *AsCHI10*, *AsCHI27* и *AsCHI34* экспрессировались сходным между сортами образом (рис. 5, 6), что указывает на их возможное участие в программах развития клеток корня.

В целом, рассматривая эффект воздействия растворов P1/P2 и гидролизатов хитозана ГХ1/ГХ2, можно сделать вывод о большем стимулирующем эффекте P1 и ГХ2 (в сравнении с P2 и ГХ1) в отношении хитиназной и глюканазной активности. Большее ингибирующее воздействие ГХ2 (в сравнении с ГХ1) на экспрессию генов хитиназ и β-1,3-глюканаз, большинство которых, предположительно, связано с иммунитетом, коррелирует с результатами анализа влияния экстракта корней на МА *F. proliferatum*. А именно, получено свидетельство о меньшем фунгицидном эффекте ГХ2 по сравнению не только с ГХ1, но и с контролями W, P1 и P2 (рис. 7). Заметим, однако, что фунгицидная активность, ассоциированная с ГХ1, оказалась примерно на том же уровне, что и контроли (включая W-контроль) (рис. 7). Это может быть связано с восприимчивостью к фузариозу сорта Стрелец, чьи корни были использованы в тесте, но также с общей предрасположенностью к устойчивости видов *Allium* spp., совмещение с которыми посевов других культур считается эффективным методом биологической борьбы с фузариозом [47–49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные указывают, в первую очередь, на зависимость уровня стимуляции роста корней от количества нитрата аммония при предпосевной обработке луковиц чеснока. В то же время воздействие растворов нитрата аммония P1 и P2 сортоспецифично и может быть связано с различиями в устойчивости сортов к фузариозной гнили. Это также верно для гидролизатов хитозана различной молекулярной массы ГХ1 и ГХ2 в отношении как ферментативной активности, так и экспрессии большинства проанализированных генов хитиназ и β-1,3-глюканаз. Сходные между сортами профили экспрессии генов *AsCHI10*, *AsCHI27* и *AsCHI34* предполагают возможное участие соответствующих хитиназ в программах развития корневых клеток. В целом, можно говорить о большем стимулирующем эффекте P1 и ГХ2 (в сравнении с P2 и ГХ1) в отношении ферментативных активностей, а также о большем ингибирующем воздействии ГХ2 (в сравнении с ГХ1) на экспрессию генов хитиназ и β-1,3-глюканаз. Последнее коррелирует с меньшим фунгицидным

эффектом ГХ2 по сравнению с ГХ1, выявленным в результате анализа влияния экстракта корней на метаболическую активность *F. proliferatum*.

Таким образом, полученные результаты дополняют известные данные о влиянии хитозана на экспрессию и активность хитиназ и глюканаз, участвующих в регуляции роста корней и/или защитных реакциях *A. sativum*, и могут быть использованы для разработки агрономических мер по повышению устойчивости чеснока к фузариозным инфекциям.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-76-00007), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-016-00205) и Министерства науки и высшего образования РФ, с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, Федерального исследовательского центра Биотехнологии РАН).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gow N.A.R., Latge J.P., Munro C.A.* The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function // Microbiology Spectrum. 2017. V. 5: FUNK-0035-2016. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
2. *Pusztahelyi T.* Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions // Mycology. 2018. V. 9. P. 189. https://doi.org/10.1080/21501203.2018.1473299
3. *Kumaraswamy R.V., Saharan V., Kumari S., Chandra Choudhary R., Pal A., Sharma S.S., Rakshit S., Raliya R., Biswas P.* Chitosan-silicon nanofertilizer to enhance plant growth and yield in maize (*Zea mays* L.) // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 159. P. 53. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.054
4. *Ali S., Ganai B.A., Kamili A.N., Bhat A.A., Mir Z.A., Bhat J.A., Tyagi A., Islam S.T., Mushtaq M., Yadav P., Rawat S., Grover A.* Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance // Microbiol. Res. 2018. V. 212–213. P. 29. https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008
5. *Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N.* Plant β-1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 1983. https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6
6. *Li P., Linhardt R.J., Cao Z.* Structural Characterization of Oligochitosan Elicitor from *Fusarium sambucinum* and Its Elicitation of Defensive Responses in *Zanthoxylum bungeanum* // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17: 2076. https://doi.org/10.3390/ijms17122076
7. *Fukamizo T., Shinya S.* Chitin/Chitosan-Active Enzymes Involved in Plant-Microbe Interactions // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1142. P. 253. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_12
8. *Jogaiah S., Satapute P., De Britto S., Konappa N., Udayashankar A.C.* Exogenous priming of chitosan induces upregulation of phytohormones and resistance against cucumber powdery mildew disease is correlated with localized biosynthesis of defense enzymes // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 162. P. 1825. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.124
9. *Katiyar D., Hemantaranjan A., Singh B., Bhanu A.N.* A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides // Advances in Plants and Agriculture Research. 2014. V. 1 : 00006. https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006
10. *Lopez-Moya F., Suarez-Fernandez M., Lopez-Llorca L.V.* Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20: 332. https://doi.org/10.3390/ijms20020332
11. *Palma-Guerrero J., Lopez-Jimenez J.A., Perez-Berna A.J., Huang I.C., Jansson H.B., Salinas J., Villalain J., Read N.D., Lopez-Llorca L.V.* Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. P. 1021. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x
12. *Narula K., Elagamey E., Abdellatef M.A.E., Sinha A., Ghosh S., Chakraborty N., Chakraborty S.* Chitosan-triggered immunity to *Fusarium* in chickpea is associated with changes in the plant extracellular matrix architecture, stomatal closure and remodeling of the plant metabolome and proteome // Plant J. 2020. V. 103. P. 561. https://doi.org/10.1111/tpj.14750
13. *Nakkeeran S., Rajamanickam S., Saravanan R., Vanthana M., Soorianathasundaram K.* Bacterial endophytome-mediated resistance in banana for the management of *Fusarium* wilt // 3 Biotech. 2021. V. 11: 267. https://doi.org/10.1007/s13205-021-02833-5
14. *Degani O., Kalman B.* Assessment of Commercial Fungicides against Onion (*Allium cepa*) Basal Rot Disease Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Fusarium acutatum* // Journal of Fungi (Basel). 2021. V. 7: 235. http://doi: https://doi.org/10.3390/jof7030235
15. *Francesconi S., Steiner B., Buerstmayr H., Lemmens M., Sulyok M., Balestra G.M.* Chitosan Hydrochloride Decreases *Fusarium graminearum* Growth and Virulence and Boosts Growth, Development and Systemic Acquired Resistance in Two Durum Wheat Genotypes // Molecules. 2020. V. 25: 4752. https://doi.org/10.3390/molecules25204752
16. *Kalman B., Abraham D., Graph S., Perl-Treves R., Meller Harel Y., Degani O.* Isolation and Identification of Fusarium spp., the Causal Agents of Onion (*Allium cepa*) Basal Rot in Northeastern Israel // Biology. 2020. V. 9: 69. https://doi.org/10.3390/biology9040069
17. *Galvez L., Urbaniak M., Waskiewicz A., Stępien L., Palmero D. Fusarium proliferatum* – Causal agent of garlic bulb rot in Spain: Genetic variability and mycotoxin production // Food Microbiol. 2017. V. 67. P. 41. http://doi: https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.05.006

18. *Delgado-Ortiz J.C., Ochoa-Fuentes Y.M., Cerna-Chavez E., Beltran-Beache M., Rodriguez-Guerra R., Aguirre-Uribe L.A., Vazquez-Martinez O. Fusarium* species associated with basal rot of garlic in North Central Mexico and its pathogenicity // Rev. Argent. Microbiol. 2016. V. 48. P. 222.
https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.003

19. *Filyushin M.A., Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V.* Genome-Wide Identification and Expression of Chitinase Class I Genes in Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars Resistant and Susceptible to *Fusarium proliferatum* // Plants (Basel). 2021. V. 10: 720.
https://doi.org/10.3390/plants10040720

20. *Anisimova O.K., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z., Filyushin M.A.* Pathogenesis-Related Genes of PR1, PR2, PR4, and PR5 Families Are Involved in the Response to *Fusarium* Infection in Garlic (*Allium sativum* L.) // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22: 6688. http://doi:
https://doi.org/10.3390/ijms22136688

21. *Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V., Filyushin M.A.* Thaumatin-like Protein (TLP) Genes in Garlic (*Allium sativum* L.): Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression in Response to *Fusarium proliferatum* Infection // Plants (Basel). 2022. V. 11: 748.
https://doi.org/10.3390/plants11060748

22. *Anisimova O.K., Seredin T.M., Danilova O.A., Filyushin M.* First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Garlic clove Rot in Russian Federation // Plant Dis. 2021. V. 105.
https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2743-PDN

23. *Shagdarova B.T., Ilyina A.V., Lopatin S.A., Kartashov M.I., Arslanova L.R., Dzhavakhiya V.G., Varlamov V.P.* Study of the protective activity of chitosan hydrolyzate against Septoria leaf blotch of wheat and brown spot of tobacco // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. P. 71.
https://doi.org/10.1134/S0003683818010118

24. *Lopatin S.A., Derbeneva M.S., Kulikov S.N., Varlamov V.P., Shpigun O.A.* Fractionation of chitosan by ultrafiltration // J. Anal. Chem. 2009. V. 64. P. 648.
https://doi.org/10.1134/S1061934809060197

25. *Khan M.F., Umar U.U.* Application of a robust microplate assay to determine induced β-1,3-glucanase and chitinase activity in the cotton plant // Biotechniques. 2021. V. 70. P. 202. http://doi:
https://doi.org/10.2144/btn-2020-0015

26. *Mourya V.K., Inamdar N.N., Choudhari Y.M.* Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications // Polymer Science Series A. 2011. V. 53. P. 583.
https://doi.org/10.1134/s0965545x11070066

27. *Dai D.H., Hu W.L., Huang G.R., Li W.* Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1 // African Journal of Biotechnology. 2011. V. 10. P. 2476.
https://doi.org/10.5897/AJB10.1029

28. *Abeles F.B., Forrence L.E.* Temporal and Hormonal Control of β-1,3-Glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. // Plant Physiol. 1970. V. 45. P. 395. http://doi:
https://doi.org/10.1104/pp.45.4.395

29. *Malik A.* Purification and properties of plant chitinases: A review // J. Food Biochem. 2019: e12762.
https://doi.org/10.1111/jfbc.12762

30. *Orlando M., Buchholz P.C.F., Lotti M., Pleiss J.* The GH19 Engineering Database: Sequence diversity, substrate scope, and evolution in glycoside hydrolase family 19 // PLoS One. 2021. V. 16: e0256817.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256817

31. *Tobias P.A., Christie N., Naidoo S., Guest D.I., Kulheim C.* Identification of the *Eucalyptus grandis* chitinase gene family and expression characterization under different biotic stress challenges // Tree Physiol. 2017. V. 37. P. 565.
https://doi.org/10.1093/treephys/tpx010

32. *Durechova D., Jopcik M., Rajninec M., Moravcikova J., Libantova J.* Expression of *Drosera rotundifolia* Chitinase in Transgenic Tobacco Plants Enhanced Their Antifungal Potential // Mol. Biotechnol. 2019. V. 61. P. 916.
https://doi.org/10.1007/s12033-019-00214-1

33. *Helleboid S., Hendriks T., Bauw G., Inze D., Vasseur J., Hilbert J.-L.* Three major somatic embryogenesis related proteins in Cichorium identified as PR protein // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 1189.

34. *Zhong R., Kays S.J., Schroeder B.P., Ye Z.-H.* Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 165.
https://doi.org/10.1105/tpc.010278

35. *Kasprzewska A.* Plant chitinases—regulation and function // Cell Mol. Biol. Lett. 2003. V. 8. P. 809.

36. *Vaddepalli P., Fulton L., Wieland J., Wassmer K., Schaeffer M., Ranf S., Schneitz K.* The cell wall-localized atypical β-1,3 glucanase ZERZAUST controls tissue morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* // Development. 2017. V. 144. P. 2259. http://doi:
https://doi.org/10.1242/dev.152231.

37. *Wu S.W., Kumar R., Iswanto A.B.B., Kim J.Y.* Callose balancing at plasmodesmata // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. 5325.
https://doi.org/10.1093/jxb/ery317

38. *Peumans W.J., Proost P., Swennen R.L., Van Damme E.J.M.* The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and mast probably serves as an important supply of amino acid for the synthesis of ripening-associated proteins // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 1063.
https://doi.org/10.1104/pp.006551

39. *Guevara M.G., Oliva C.R., Machinaadiarena M., Daleo G.R.* Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase // Physiol. Plant. 1999. V. 106. P. 164.

40. *Ary M.B., Richardson M., Shewry P.R.* Purification and characterization of an insect α-amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears (*Coix lachryma-jobi*) // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 913. P. 260.
https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90007-1

41. *Malerba M., Cerana R.* Chitosan Effects on Plant Systems // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. 996. http://doi:
https://doi.org/10.3390/ijms17070996

42. *Li K., Xing R., Liu S., Li P.* Chitin and Chitosan Fragments Responsible for Plant Elicitor and Growth Stimulator // J. Agric. Food Chem. 2020. V. 68. P. 12203.
https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05316

43. *Santoso J., Adiputra K.C., Soerdirga L.C., Tarman K.* Effect of acetic acid hydrolysis on the characteristics of water soluble chitosan // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. V. 414: 012021. https://doi.org/10.1088/1755-1315/414/1/012021

44. *Lopez-Velazquez J.C., Haro-Gonzalez J.N., Garcia-Morales S., Espinosa-Andrews H., Navarro-Lopez D.E., Montero-Cortes M.I., Qui-Zapata J.A.* Evaluation of the Physicochemical Properties of Chitosans in Inducing the Defense Response of *Coffea arabica* against the Fungus *Hemileia vastatrix* // Polymers. 2021. V. 13: 1940. https://doi.org/10.3390/polym13121940

45. *Quitadamo F., De Simone V., Beleggia R., Trono D.* Chitosan-Induced Activation of the Antioxidant Defense System Counteracts the Adverse Effects of Salinity in Durum Wheat // Plants (Basel). 2021. V. 10: 1365. https://doi.org/10.3390/plants10071365

46. *Kiba T., Krapp A.* Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture // Plant Cell Physiol. 2016. V. 57. P. 707. https://doi.org/10.1093/pcp/pcw052

47. *Zhang H., Mallik A., Zeng R.S.* Control of Panama disease of banana by rotating and intercropping with Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler): Role of plant volatiles // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. P. 243. https://doi.org/10.1007/s10886-013-0243-x

48. *Zuo G.W., Li C.Y., Li B., Wei Y.R., Hu C.H., Yang Q.S., Yang J., Sheng O., Kuang R.B., Deng G.M., Biswas M.K., Yi G.* The toxic mechanism and bioactive components of Chinese leek root exudates acting against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, tropical race 4 // Eur. J. Plant Pathol. 2015. V. 143. P. 447. http://doi: https://doi.org/10.1007/s10658-015-0697-5

49. *Mylona K., Garcia-Cela E., Sulyok M., Medina A., Magan N.* Influence of Two Garlic-Derived Compounds, Propyl Propane Thiosulfonate (PTS) and Propyl Propane Thiosulfinate (PTSO), on Growth and Mycotoxin Production by *Fusarium* Species In Vitro and in Stored Cereals // Toxins. 2019. V. 11: 495. https://doi.org/10.3390/toxins11090495