

ДИНАМІКА НАКОПИЧЕННЯ КАЛОЗИ ЯК МЕХАНІЧНОГО ЗАХИСНОГО БАР'ЄРА В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦІ ЗА ПАТОГЕНЕЗУ

О.П. БОБОШКО¹, О.О. ПАНЮТА¹, О.Ю. АРТЕМЕНКО¹, В.І. ЄМЕЛЬЯНОВ², Н.Ю. ТАРАН¹

¹ Інститут біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ
E-mail: boboshko.elena@mail.ru

*Проведено мікроскопічне дослідження та кількісне визначення вмісту калози в проростках пшениці двох сортів за патогенезу. Встановлено здатність інтактних проростків сорту Ренан накопичувати більшу кількість конституційної калози на початкових етапах вегетації, що прямо корелює зі стійкістю цього сорту до збудника очкової плямистості *Pseudocercospora herpotrichoides*. У проростків сорту Миронівська 808 виявлено більш інтенсивне індукване патогеном накопичення калози порівняно з проростками сорту Ренан, що не впливало на підвищення їхньої стійкості до патогену.*

Ключові слова: калоза, проростки пшениці, патогенез, *Pseudocercospora herpotrichoides*.

Вступ. Важливою складовою мультикомпонентної захисної відповіді рослинних клітин на інфікування є механічні бар'єри. Вони бувають як конституційні, такі що існують в інтактних тканинах рослини-живителя, так і індуквані, що виникають у разі контакту з патогеном або його структурними компонентами – еліситорами, внаслідок чого відбувається модифікація клітинних стінок [1], в першу чергу, за рахунок відкладання β -1,3-глюкану – калози. У вищих рослин цей полімер входить до складу важливих конституційних структурних елементів, які виконують різноманітні функції, а саме: калоза відкладається в процесі онтогенезу у ситоподібних пластинках провідного елемента флоєми, з'являється під час формування клітинної пластинки за цитокінезу [2], є компонентом оболонки пилку [3] і клітинних стінок пилкових трубок, виявлена у плазмодесмах [4].

Наявність підвищеного рівня накопичення цієї захисної речовини у рослин може бути індикатором розвитку реакції рослини на дію біотичних або абіотичних стресорів [5]. У клітинах відкладання калози активується за трав-

матичних ушкоджень, холодового та низькотемпературного стресів, впливу важких металів, УФ-опромінення [6], патогенів і шкідників [7–10].

На початкових етапах взаємодії у системі рослина – патоген укріплення клітинних стінок відбувається за рахунок того, що із зовнішньої сторони плазмалеми на суміжному з клітинною стінкою боці накопичується β -1,3-глюкан – калоза, найчисельніший і поширений компонент апозиції клітинних стінок [11]. Грани калози є місцями накопичення антимікробних вторинних метаболітів, які кооперативно перешкоджають повільному проникненню патогену [12].

Рослини для запобігання проникненню коїдій патогену потовщують клітинну стінку в місцях контакту з мікроорганізмом, формуючи папіли – напівсферичні капсулоподібні утворення між плазмалемою та клітинною стінкою, які є загально визнаним компонентом РТІ-відповіді (pattern-triggered immunity) [11]. Папіли містять калозу, целюлозу, лігнін, суберин, фенольні поліаміни, активні форми кисню (АФК), пероксидази, арабіногалактанові білки, багаті на гідроксипролін глюкопротеїди, пектин, ксилглюкани, а також неорганічні елементи – кальцій, кремній, цинк та інші речовини [11, 13]. За рахунок кооперативної поведінки всіх зазначених компонентів системи папіли як захисного бар'єра посилюються механічні властивості клітинної стінки в цілому та її стійкість до дії екстрацелюлярних ферментів патогену [14]. Крім того, що калоза діє як фізичний бар'єр, вона також функціонує як молекулярний фільтр і, таким чином, перешкоджає вільному пересуванню певних молекул. Саме тому її відкладання навколо структур мікроорганізму порушує його живлення і призводить до сповільнення розвитку [13]. Окрім цього, калоза перешкоджає переміщенню екзотоксинів у рослинну клітину [11]. Величезна

© О.П. БОБОШКО, О.О. ПАНЮТА, О.Ю. АРТЕМЕНКО, В.І. ЄМЕЛЬЯНОВ, Н.Ю. ТАРАН, 2017

кількість проведених різними науковими групами високоякісних досліджень в галузі фітотимунітету та фізіології рослин, на жаль, ще не дали відповіді на ряд важливих питань щодо кооперативної поведінки підсистем — структурних елементів захисту та механізмів їх формування. Вивчення реакції відкладання калози як елемента структурного захисту та маркера стійкості рослин до біотичного стресу, з'ясування механізмів конституційного та індукованого накопичення глюкану є вельми актуальними.

Мета досліджень з'ясувати роль індукованого відкладання калози як маркера реакції на стрес у проростків озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сортів Миронівська 808 та Ренан при інфікуванні збудником очкової плямистості — гемібіотрофним грибом *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton.

Матеріали та методи. Семидобові проростки пшениці сортів Миронівська 808 і Ренан інфікували суспензією конідій у концентрації $1 \cdot 10^5$ колонієутворюючих одиниць у 1 мл (КУО/мл) [15] високовірулентного штаму 543 7/1 *P. herpotrichoides* із колекції Інституту захисту рослин НААН України. Контрольні варіанти обробляли дистильованою водою. Відбір рослинного матеріалу здійснювали кожні 24 год протягом п'яти діб.

Відкладання калози в клітинах проростків пшениці досліджували методом флуоресцентної мікроскопії. Середню частину листків для видалення з них автофлуоресцентного матеріалу інкубували в 95%-ному етанолі впродовж 12 год. Після цього рослинний матеріал тричі відмивали в 0,07 М фосфатному буфері (рН 9,0) та інкубували 12 год у розчині 0,01%-ного анілінового блакитного в 0,07 М фосфатному буфері (рН 9,0). Препарати готували, використовуючи як заливне середовище фосфатний буфер з 0,01%-ним аніліновим блакитним. Мікроскопічні дослідження проводили на флуоресцентному мікроскопі МЛ-2 («ЛОМО», РФ), використовуючи фільтри 340–380 нм (λ_{ex}) і 425 нм (λ_{em}).

Кількість калози визначали за модифікованим методом Каусса [4]. З листків проростків пшениці вирізали середню частину (300 мг) і витримували 1 год в 70%-ному етанолі для видалення автофлуоресцентного матеріалу. Потім

тричі промивали дистильованою водою та підсушували на фільтрувальному папері. Рослинний матеріал гомогенізували у фарфоровій ступці зі скляним порошком та 3 мл 1 М NaOH. Отриманий гомогенат витримували 15 хв на водяній бані при 80 °С для розчинення калози, після чого осаджували центрифугуванням (380 г, 5 хв). Для визначення вмісту калози до 200 мкл супернатанту додавали 400 мкл 0,01%-ного водного розчину анілінового блакитного. Розчин набував синьо-зеленого забарвлення. Після цього до розчину додавали 210 мкл 1 н HCl та 590 мкл 1 М буфера гліцин/NaOH (рН 9,5). Забарвлення розчину змінювалось на яскраво блакитно-зелене. Суміш струшували та поміщали на водяну баню. Витримували 20 хв при 50 °С, а після цього ще 30 хв при кімнатній температурі. Флуоресценцію розчину вимірювали на спектрофлуориметрі СДЛ-2 («ЛОМО», РФ). Довжина хвилі збудження (λ_{ex}) становила 397 нм, довжина хвилі вимірів (λ_{em}) — 490 нм. Результати досліджень оброблені статистичними методами [16].

Результати досліджень та їх обговорення. Мікроскопічні дослідження показали, що обробка проростків пшениці суспензією конідій *P. herpotrichoides* індукувала накопичення калози в клітинах епідерми листків (рис. 1). Калозовмісні ділянки мали яскраву жовто-зелену флуоресценцію, яка зростала впродовж усіх 120 год експерименту. Візуальне порівняння індукованого патогеном відкладання калози в клітинах епідерми листків проростків пшениці різних за стійкістю сортів [17] виявило, що інтенсивніше цей процес відбувався у клітинах епідерми проростків пшениці сприйнятливої сорту Миронівська 808 (рис. 1). В контрольних варіантах за обробки проростків пшениці водою накопичення гран калози в клітинах епідерми листків не спостерігали (рис. 1 а, б). Мікроскопічні дослідження дозволили ідентифікувати основні зони індукованої патогеном локалізації калози, але отримані дані виявилися недостатньо інформативними для порівняння інтенсивності накопичення даного глюкану в клітинах проростків пшениці обраних для експерименту сортів. Тому на наступному етапі провели кількісне визначення вмісту калози. У проростках контрольних варіантів обох досліджуваних сортів її приріст становив від

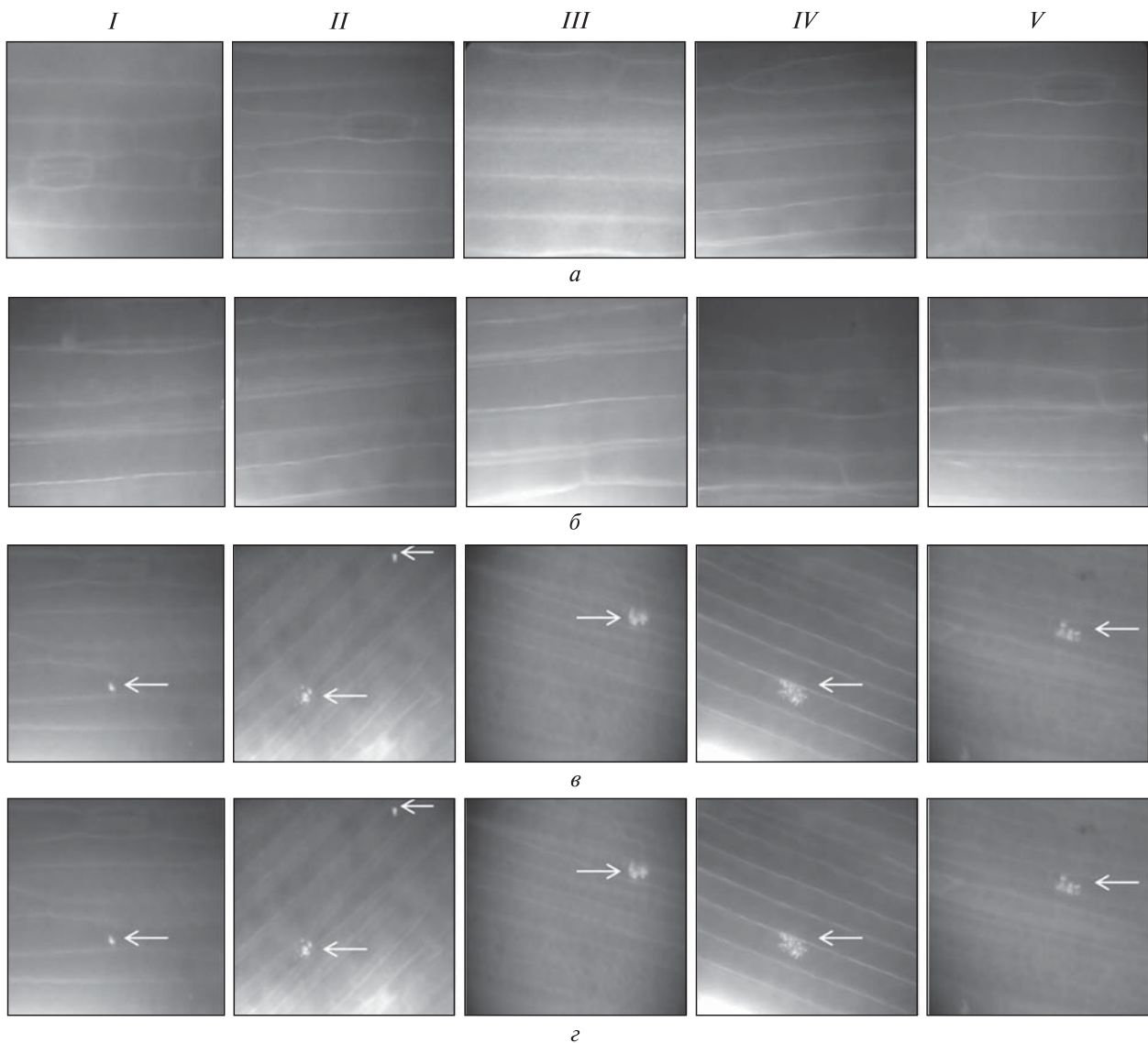


Рис. 1. Відкладання калози в клітинах епідерми листків проростків пшениці при інокуляції суспензією конідій *P. herpotrichoides*: I – 24 год; II – 48 год; III – 72 год; IV – 96 год; V – 120 год; а – контроль Миронівська 808; б – контроль Ренан; в – дослід Миронівська 808; г – дослід Ренан. Зб. 40 × 7

0,1 мкг-екв./мг маси сирої речовини за добу (рис. 2), що зумовлено онтогенетичними фізіологічними процесами рослин, які згадувались вище.

Динаміка відкладання цього полімера у контрольних (неінфікованих) проростках обох сортів пшениці була подібною. Калоза накопичувалася впродовж усіх 120 год експерименту (рис. 2), і наприкінці її приріст складав 1,2 та 1 мкг-екв./мг маси сирої речовини у

проростків сортів Ренан та Миронівська 808 відповідно. Тобто за відсутності стресу у проростків пшениці несприйнятливого сорту Ренан за 12 діб накопичується більше калози, ніж у проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808, що може впливати, наприклад, на еластичність клітинних стінок та бути передумовою більш високої стійкості проростків пшениці сорту Ренан до механічного стресу [18] на більш пізніх стадіях вегетації. Разом з тим це

Динаміка накопичення калози як механічного захисного бар'єра в проростках пшениці за патогенезу

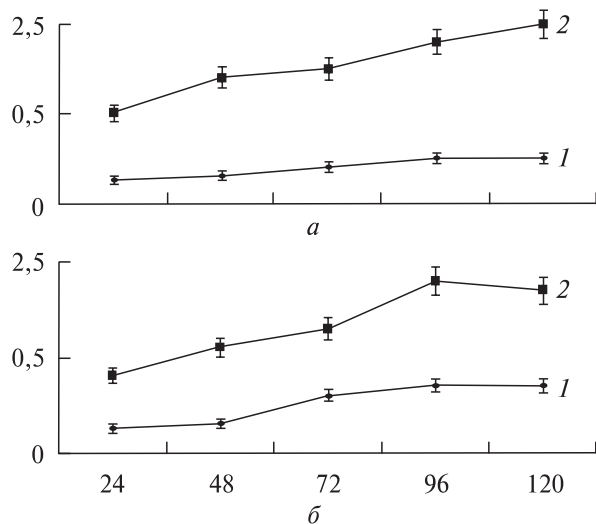


Рис. 2. Накопичення калози у проростків (по вертикалі, мкг-екв./мг маси сирової речовини) пшениці сортів Миронівська 808 (а) і Ренан (б) за інокуляції суспензією конідій *P. herpotrichoides*: 1 – контроль, 2 – дослід. По горизонталі – експозиція, год

може бути однією із причин вищої стійкості рослин пшениці сорту Ренан не тільки до переламування стебла за сильного ураження *P. herpotrichoides* [17], а і засобом формування певних конституційних захисних конгломератів рослинних клітин як еволюційно зумовлених онтогенетичних утворень, більш ефективних з позиції імунітету, наприклад, формування покривної тканини – епідерми, що здатна забезпечувати більш ефективний захист рослин сорту Ренан на перших етапах взаємодії клітин з патогеном. Якщо здатність рослин формувати кластери із захисними речовинами та папіли розглядати як онтогенетичний конституційний захисний бар'єр, який потребує у тому числі і калозу як структурного елемента, тоді наявність у проростків контрольного варіанту сорту Ренан більшої кількості цього глюкану може отримати своє пояснення, тим більше, що даний сорт має вищу стійкість до збудника очкової плямистості порівняно з сортом Миронівська 808.

За інфікування проростків пшениці обох сортів суспензією конідій *P. herpotrichoides* спостерігали істотну різницю у кількості накопичення калози порівняно з контролем. Саме швидке у часі індуковане патогеном накопичення глюкану спостерігали по завершенню першої доби після інокуляції патогеном, яке склало

1,5 мкг-екв./мг маси сирової речовини у проростків рослин пшениці сорту Миронівська 808 та 1,3 у проростків сорту Ренан (рис. 2, а, б). На 72-й годині експерименту інфіковані проростки пшениці сорту Ренан були здатні накопичувати в середньому 1,8 мкг-екв./мг маси сирової речовини, зразки сорту Миронівська 808 – в середньому 2 мкг-екв./мг маси сирової речовини. Через 96 год після зараження вміст калози в проростках пшениці обох сортів мав однаковий рівень та становив 2,3 мкг-екв./мг маси сирової речовини. У проростків пшениці несприйнятливої сорту Ренан кількість калози впродовж наступних 24 год майже не змінювалася та навіть зменшувалася, в той час як у проростків сприйнятливої сорту Миронівська 808 спостерігали незначне зростання накопичення цього полісахариду (рис. 2). Але при цьому розбіжність середньоквадратичного відхилення на часовому інтервалі досліджень 96–120 год була статистично недостовірною, тому в даному випадку можна говорити лише про тенденції. Мікроскопічний та кількісний аналіз отриманих результатів дозволив зробити припущення, що більш інтенсивне індуковане стресом накопичення калози у проростків пшениці сорту Миронівська 808 скоріше за все є наслідком переупорядкування у β -1,3-глюкановий полімерний ланцюг (калозу) мономерів глюкози та олігомерів з β -1,3-глікозидним зв'язком [19], що були зруйновані під час взаємної ферментативної атаки у системі рослина – патоген [20]. Щодо аналізу результатів досліджень у сорту Ренан, який містить ген *Pch1* [17] і має вищу стійкість до *P. herpotrichoides* порівняно з сортом Миронівська 808 при обробці однаковими концентраціями суспензії конідій *P. herpotrichoides*, то він мав максимальну кількість відкладеної калози на 96-ту годину експерименту, після чого її кількість починала зменшуватись, тобто трансформуватись [21] у інші структурні елементи клітин.

У синтезі калози бере участь β -1,3-глюкансинтаза (калозосинтаза, КФ 2.4.1.34) – трансмембранний протеїн, каталітичний домен якого розташовано у зовнішньому шарі цитоплазматичної мембрани рослинних клітин [8]. Плазмалема має певну кількість даного ферменту, який швидко активується в умовах стресу [22]. В рослинах *Arabidopsis thaliana* ідентифіковано

ген *PMR4/GSL5*, який кодує калозосинтазу і відповідає за індуковане стресом відкладання калози [8]. Дослідження мутантів *pmr4*, які втрачали здатність накопичувати калозу на ділянках проникнення збудника борошністої роси ячменю (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*), показали незначне підвищення частоти проникнення патогену. Тому можна припустити, що калоза не має важливого значення як комплексний механічний бар'єр у папілах, зокрема для проникнення збудника борошністої роси.

Кількість калози в клітині регулюється також балансом між активністю калозосинтази і β -1,3-глюканази (калази, КФ 3.2.1.39) – ферменту, який викликає її деградацію [23]. При зменшенні активності β -1,3-глюканази спостерігається уповільнення руху вірусних білків і GFP з клітини до клітини в рослинах тютюну [24] та арабідопсису [25].

Враховуючи те, що калоза перешкоджає пересуванню певних молекул, її відкладання, з одного боку, може порушувати живлення і сповільнювати таким чином розвиток патогену, а з іншого – обмежувати дифузію еліситорів патогену до сусідніх рослинних клітин, що може призводити відповідно до зниження рівня активації захисних реакцій рослинного організму [11]. Локальне накопичення калози у ситоподібних пластинках і плазмодесмах обмежує і навіть зупиняє переміщення речовин по флоемі та симпласту, що викликає порушення транспорту речовин [26]. Останнє ініціює фізіологічну ізоляцію групи клітин (до кількох сотень), де з часом ймовірніше за все, якщо блокаду не буде знято рослиною «за поважних причин», відбудеться реакція надчутливої загибелі клітин (РНЧ-загибель клітин) [27]. Використовуючи калозу зазначеним способом, рослини таким чином ізолюють зону патогенезу та у подальшому завдяки виникненню локальних некрозів разом із загибеллю своїх клітин інгібують і патоген [10], що дозволяє їм продовжувати реалізацію своїх прямих онтогенетичних програм у процесі подальшої вегетації.

В результаті проведеної експериментальної роботи методами флуоресцентної мікроскопії і кількісного визначення калози встановлено, що інфікування суспензією конідій *P. herpotrichoides* індукує патоген-залежне відкладан-

ня даного поліглюкану у проростків пшениці сортів Миронівська 808 і Ренан. Проте виявлено, що за інфікування проростки сприйнятливої сорту Миронівська 808 накопичують більшу кількість калози порівняно з проростками несприйнятливої сорту Ренан.

Вищий рівень відкладання калози у проростків сорту Миронівська 808 при індукованому патогенезі може бути пояснено необхідністю відтворення пошкоджених гідролазами гриба [28] ділянок особистої клітинної стінки, яких у рослин даного сорту могло утворюватися більше у зв'язку з недосконалою в порівнянні з проростками сорту Ренан системою конституційного захисту. Останнє призвело до ураження проростків використаними титрами патогену *P. herpotrichoides*. Таким чином, конституційні структурні речовини захисту у рослин сорту Ренан виявилися більш стійкими до ураження патогеном, що прямо корелює з їх більш високим рівнем конституційного накопичення калози.

Специфічні конституційні захисні елементи рослин – кластери клітинної стінки, які складаються у тому числі з токсичних для патогену речовин – фенолів та флавоноїдів, гідролітичних ферментів, можуть також бути ефективним локальним захисним бар'єром на перших етапах взаємодії в системі рослина – патоген та зумовлювати вищу стійкість проростків пшениці сорту Ренан до інфікування *P. herpotrichoides*. Обробка рослин високими титрами суспензії гриба [29] з часом призводить до повної його локалізації у вигляді некрозів – РНЧ-загибелі клітин [30], таким чином запобігаючи розповсюдженню мікроорганізму та збільшенню кількості його колоній. Треба підкреслити, що реакція надчутливої загибелі клітин достатньо тривала у часі, бо вона пов'язана з генетично-детермінованою відповіддю рослин на стрес і включає у себе синтез максимальної кількості біохімічних захисних речовин. Дослідження динаміки накопичення фенольних та флавоноїдних сполук у клітинах проростків даних сортів на більш тривалому проміжку часу вегетації зможе звузати коло поставлених в цій роботі питань та дати пояснення отриманим результатам. Остаточні висновки щодо механізмів стійкості рослин використаних у роботі сортів пшениці до па-

тогенного гриба *P. herpotrichoides* можна буде зробити, якнайширше вивчивши інші активні речовини і надмолекулярні конгломерати фітоімунітету об'єктів дослідження.

Висновки. Показано, що за інфікування суспензією конідій *P. herpotrichoides* у концентрації $1 \cdot 10^5$ КУО/мл відбувається накопичення калози у проростках пшениці сортів Миронівська 808 та Ренан. Індуковане патогеном відкладання калози було інтенсивнішим у проростків сприйнятливих сортів Миронівська 808, що може бути пов'язано як з наявністю більшої кількості пошкоджених у рослин ділянок клітинних стінок в ході ферментативної атаки патогену, так і за рахунок наявності у них більшої кількості ферментативних комплексів калозосинтази. У контрольних неінфікованих проростків пшениці несприйнятливих сортів Ренан вміст конституційної калози був значно вищим у порівнянні з проростками сприйнятливих сортів Миронівська 808, що скоріш за все є наслідком наявності у них надорганізованих [31] конституційних захисних структур. Результати експериментів показали, що проростки рослин пшениці сорту Ренан на початку свого онтогенезу формують більш ефективні конституційні захисні структури поверхні листкової пластинки, що прямо корелює із зростанням кількості накопичення конституційної калози.

TIME-COURSE OF PATHOGEN INDUCED ACCUMULATION OF CALLOSE AS MECHANICAL PROTECTIVE BARRIER IN WHEAT SEEDLINGS

O.P. Boboshko, O.O. Panyuta, O.Y. Artemenko, V.I. Emelyanov, N.Y. Taran

Taras Shevchenko National University of Kyiv
Institute of Biology
E-mail: boboshko.elena@mail.ru
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Results of fluorescence microscopic research and quantitative luminescent analysis of pathogen induced callose accumulation in winter wheat seedlings of two cultivars different in resistance to eye spot causal agent are presented. Higher content of constitutive callose in intact seedlings of unsusceptible cultivar at the initial stages of vegetation was determined. It correlates with resistance of this cultivar to the eye spot causal agent.

The increased pathogen induced accumulation of callose in seedlings of susceptible cultivar is revealed, but didn't influence its protection against pathogen.

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ КАЛЛОЗЫ КАК МЕХАНИЧЕСКОГО ЗАЩИТНОГО БАРЬЕРА В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ПАТОГЕНЕЗЕ

Е.П. Бобошко, О.А. Панюта, А.Ю. Артеменко, В.И. Емельянов, Н.Ю. Таран

Представлены результаты микроскопического исследования и количественного определения содержания каллозы в проростках пшеницы двух сортов при патогенезе. Определена способность интактных растений сорта Ренан накапливать большее количество конституционной каллозы на начальных этапах вегетации, что положительно коррелирует с устойчивостью этого сорта к возбудителю очковой пятнистости *Pseudocercospora herpotrichoides*. У проростков сорта Миронивская 808 выявлено более интенсивное индуцированное патогеном накопление каллозы по сравнению с проростками сорта Ренан, что тем не менее не влияло на повышение их устойчивости к патогену.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tarchevsky, I.A., *Alarm systems of plant cells under stress*, M., Nauka, 2002, 294 p.
2. Stone, B.A., and Clarke, A.E., *Chemistry and biology of (1,3)- β -D-glucans*, Melbourne, La Trobe Univ. Press, 1992, 803 p.
3. Popova, A.F., Ivanenko, G.F., Ustinova, A.Yu., and Zaslavsky, V.A., Localization of callose in microspores and pollen grains in *Sium latifolium* L. plants in different water regimes, *Cytol. Genet.*, 2008, vol. 42, no. 6, pp. 363–368.
4. Emelyanov, V.I., Kravchuk, J.N., Poliakovskiy, S.O., and Dmitriev, O.P., Callose deposition in the processing of the cells of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) biotic elicitors, *Cytol. Genet.*, 2008, vol. 42, no. 2, pp. 90–95.
5. Dmitriev, A.P., *Phytoalexins and their role in plant resistance*, Kyiv, Nauk. Dumka, 2000, 209 p.
6. Mintoff, S.J., Rookes, J. E., and Cahill, D.M., Sublethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Biol.*, 2014, vol. 17, no. 3, pp. 703–711.
7. Flors, V., Ton, J., Jakab, G., and Mauch-Mani, B., Abscisic acid and callose: team players in defense against pathogens? *J. Phytopathol.*, 2005, vol. 165, no. 7/8, pp. 377–383.
8. Chen, X.Y., and Kim, J.Y., Callose synthesis in higher plants, *Plant Signal Behav.*, 2009, vol. 4, no. 6, pp. 489–492.

9. Krzeslowska, M., The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy, *Acta Physiol. Plant.*, 2011, vol. 33, no. 1, pp. 35–51.
10. Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J., Callose deposition: a multifaceted plant defense response, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2011, vol. 24, no. 2, pp. 183–193.
11. Underwood, W., The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion, *Front. Plant Sci.*, 2012, vol. 3:85, doi: 10.3389/fpls.2012.00085. eCollection 2012.
12. León, I.P., and Montesano, M., Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 3178–3200.
13. Plotnikova, L.Y., Cytological, molecular and genetic bases of plant species immunity to fungal pathogens, *Mycol. Phytopathol.*, 2008, vol. 42, no. 5, pp. 393–410.
14. Voigt, C.A., Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae, *Front Plant Sci.*, 2014, vol. 5:168, doi: 10.3389/fpls.2014.00168. eCollection 2014.
15. Patent № 389960, Ukraine, A01N 1/04. *Method of infection to assess the stability of winter wheat to the pathogen tserkosporelozu*, Panyuta, O.O., Belava, V.N., Taran, N., Bull. № 9. Applications. 01/11/2013. Publ. 05.12.2014.
16. Welham, S.J., Gezan, S.A., Clark, S.J., and Mead, A., *Statistical methods in biology: design and analysis of experiments and regression*, Chapman and Hall/CRC, 2014.
17. Wei, L., Muranty, H., and Zhang, H., Advances and prospects in wheat eyespot research: contribution from genetics and molecular tools, *J. Phytopathol.*, 2011, vol. 159, no. 7–8, pp. 457–470.
18. Parre, E., and Geitmann, A., More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes, *Plant Physiol.*, 2005, vol. 137, no. 1, pp. 274–286.
19. Emelyanov, V.I., Independent mechanism of calcium-induced callose deposition in plant cells, *Rep. Nat. Acad. Sci. of Ukraine*, 2010, vol. 10, no. 7, pp. 146–148.
20. Boller, T., Primary signals and second messengers in the reaction of plants to pathogens, *Second messengers in plant growth and development*, Boss, W.F., Morre, D.J., Ed., New York, Alan R. Liss, 1989, pp. 227–255.
21. Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G.B., An Arabidopsis callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation, *Plant Cell*, 2003, vol. 15, no. 11, pp. 2503–2513.
22. Aidemark, M., Andersson, C.J., Rasmusson, A.G., and Widell, S., Regulation of callose synthase activity in situ in alamethicin-permeabilized Arabidopsis and tobacco suspension cells, *BMC Plant Biol.*, 2009, vol. 9, doi: 10.1186/1471-2229-9-27.
23. Wu, C.T., Leubner-Metzger, G., Meins, F., Jr., and Bradford, K.J., Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence, *Plant Physiol.*, 2001, vol. 126, no. 3, pp. 1299–1313.
24. Iglesias, V.A., and Meins, F., Jr., Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition, *Plant J.*, 2000, vol. 21, no. 2, pp. 157–166.
25. Levy, A., Guenoune-Gelbart, D., and Epel, B.L., β -1,3-glucanases: Plasmodesmal gate keepers for intercellular communication, *Plant Signal. Behav.*, 2007, vol. 2, no. 5, pp. 404–407.
26. Botha, C.E.J., and Matsiliza, B., Reduction in transport in wheat (*Triticum aestivum*) is caused by sustained phloem feeding by Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*), *S. Afr. J. Bot.*, 2004, vol. 70, no. 2, pp. 249–254.
27. Xie, B., and Hong, Z., Unplugging the callose plug from sieve pores, *Plant Signal. Behav.*, 2011, vol. 6, no. 4, pp. 491–493.
28. Piršelová, B., Mistríková V., Libantová, J., Moravčíková, J., and Matusíková, I., Study on metall-triggered callose deposition in roots of maize and soybean, *Biologia*, 2012, vol. 67, no. 4, pp. 698–705.
29. Scharte, J., Hardy S., and Engelbert W., Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*, *Plant, Cell Environ.*, 2005, vol. 28, no. 11, pp. 1421–1435.
30. Li, W., Zhao, Y., Liu, C., Yao, G., Wu, S., Hou, C., Zhang, M., and Wang, D., Callose deposition at plasmodesmata is a critical factor in restricting the cell-to-cell movement of soybean mosaic virus, *Plant Cell Rep.*, 2012, vol. 31, no. 5, pp. 905–916.
31. Kondepudi, D., and Prigogine, I., *Modern thermodynamics. from heat engines to dissipative structures*, New York, Wiley, 2015, 524 p.

Надійшла 15.04.16