

В.И. ЕМЕЛЬЯНОВ, Ж.Н. КРАВЧУК,
С.А. ПОЛЯКОВСКИЙ, А.П. ДМИТРИЕВ

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
03143, Киев, ул. Заболотного, 148
E-mail: dmyt@iatp.org.ua

ОТЛОЖЕНИЕ КАЛЛОЗЫ ПРИ ОБРАБОТКЕ КЛЕТОК ТОМАТОВ (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* L.) БИОТИЧЕСКИМИ ЭЛИСИТОРАМИ



Изучена динамика индуцированного накопления каллозы в клетках томатов. Методами флюоресцентной микроскопии исследована локализация каллозы в клетках и оптимизировано время ее количественного определения. Установлено количество каллозы в клетках томатов при их обработке разными биотическими элиситорами. Установлена нелинейная зависимость отложения каллозы от концентрации олигомеров хитина, содержащих 3–5 остатков N-ацетилглюкозамина, и пропорциональное увеличение содержания каллозы в клетках при повышении концентрации димера хитина и хитозана в культуральной среде.

© В.И. ЕМЕЛЬЯНОВ, Ж.Н. КРАВЧУК, С.А. ПОЛЯКОВСКИЙ,
А.П. ДМИТРИЕВ, 2008

Введение. Растения в природе окружены огромным количеством потенциально патогенных микроорганизмов, однако устойчивы к большинству из них [1]. Это определяется способностью растений своевременно распознавать метаболиты проникающего патогена — биотические элиситоры [2]. Благодаря системе вторичных мессенджеров происходит последовательная трансдукция элиситорного сигнала в клетке, что вызывает изменения процессов фосфорилирования/дефосфорилирования белков [3], активацию факторов регуляции транскрипции и экспрессию защитных генов [4].

Одной из наиболее важных защитных реакций растительных клеток на биотический стресс является механическое укрепление клеточной стенки за счет отложения β -1,3-глюкана — каллозы [5]. Уже через 20 мин после распознавания рецепторами плазматической мембраны водорастворимых элиситоров патогена в растительных клетках обнаруживаются первые вкрапления каллозы [6, 7]. Ее роль как активной защитной реакции в ответ на инфицирование хорошо иллюстрирует образование «паппил» — утолщений клеточной стенки растения, которые препятствуют проникновению растущей гифы гриба [8, 9]. Каллоза откладывается на внешней стороне плазматической мембраны, смежной с клеточной стенкой [10, 11]. Ярким примером защитного действия каллозы является «запечатывание» плазмодесм уже через несколько минут после инфицирования клеток вирусами [12]. В процессе цитокинеза каллоза накапливается в местах образования клеточной стенки между сестринскими клетками, а также образуется при механическом повреждении клеток на первом этапе репарации их структур [8].

Каллоза впервые обнаружена более ста лет назад. Ее химическая структура была изучена значительно позже Аспинелем и Кеслером [1]. Оказалось, что это линейный β -1,3-глюкан, отличающийся по структуре от целлюлозы, главного компонента клеточных стенок растений. Обнаружено, что в процессе образования каллозы принимает участие β -1,3-глюкансинтаза (калосинтаза II), которая является трансмембранным белком плазматической мембраны [6]. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что около 80 % индуцированного накопления каллозы является кальций-зависимым процессом, причем

для ее синтеза в клетках необходимо изменение ионной проводимости плазмалеммы [13] и процессов фосфорилирования/дефосфорилирования белков [1]. Вместе с тем Нишимура и др. [14] показали, что при быстром отложении каллозы в клетках репрессируются более поздние защитные реакции, которые кодируются ядерным геномом, что предполагает отсутствие деполяризации плазматической мембраны и изменения ионных токов [4]. Таким образом, в растительных клетках наряду с кальций-зависимым синтезом каллозы за счет изменения проводимости плазмалеммы может реализовываться и другой механизм, при котором не происходит внутриклеточное увеличение концентрации ионов кальция за счет периплазматического пула. В этом случае накопление каллозы может определяться конформационными изменениями каллозосинтазы за счет кальция, поступающего из внутриклеточных депо. По нашему мнению, также не исключена возможность ее аллостерической регуляции за счет элиситор-связывающего эффекта, который может вызывать изменение активности каталитического домена каллозосинтазы.

Несмотря на большое количество экспериментальных данных, механизм индуцированного накопления каллозы в растительных клетках остается не совсем понятным. Какую роль в реализации того или иного механизма отложения каллозы в клетках играет химическое строение и концентрация биотических элиситоров – остается пока неизвестным.

Целью нашей работы было проведение исследований индуцированного накопления каллозы у томатов в ответ на обработку клеток отличающимися по химическому строению биотическими элиситорами с использованием полного диапазона их активных концентраций.

Материалы и методы. *Суспензионная культура.* Для получения суспензионной культуры клеток томатов брали 10–12-дневные клетки каллусной ткани, выращивали их в жидкой питательной среде Т+ с фитогормонами БАП (0,6 мг/л) и НУК (3 мг/л). Длительность культивирования клеток в суспензии на протяжении пассажа составляла 13–15 сут. Лог-фаза продолжалась от 2 до 9 сут. Клетки инкубировали на ротационном шейкере (60 об/мин) при 25 °С в темноте. Перед использованием

в экспериментах суспензию клеток культивировали в течение двух-трех пассажей. Пересадку осуществляли через каждые 4–6 дней.

Индукцию накопления каллозы в суспензионной культуре клеток томатов стимулировали добавлением биотических элиситоров олигомеров хитина (N-ацетилглюкозамин) с разной длиной цепи – от 2 до 5 остатков (Хт₂-, Хт₃-, Хт₄-, Хт₅-), а также хитозаном (поли-β-1,4 – D-глюкозамин, 6·10⁶ Da, («Sigma»), приготовленным по методу Каусса [9]. Олигомеры хитина были любезно предоставлены нам проф. Томасом Боллером (Базель, Швейцария).

Отложение каллозы в клетках томатов изучали при помощи люминесцентной микроскопии при окрашивании анилиновым голубым. Готовили 0,1%-ный раствор анилинового голубого (м/о) в 1 М буфере глицин/NaOH (рН 9,5). Краситель к суспензии клеток добавляли непосредственно на микроскопическом стекле. Клетки предварительно адгезировали нанесенным на стекло 0,01%-ным раствором поли-L-лизина и выдерживали их во влажной камере в течение 1–1,5 ч, после чего промывали дистиллированной водой и оставляли еще на 30 мин. Затем на стеклянные пластинки наносили по 10 мкл суспензии клеток и опять выдерживали 40 мин во влажной камере. Микроскопические исследования отложения каллозы проводили при помощи люминесцентного микроскопа «ЛОМО» (Санкт-Петербург, Россия). Используя систему фильтров, наблюдали голубовато-зеленую люминесценцию [9].

Количество каллозы определяли с помощью модифицированного нами метода Каусса [9]. Для этого отбирали 300 мг клеток и ресуспендировали в 20 мл свежеприготовленной питательной среды Т+. Добавляли 200 мкл элиситора и инкубировали на ротационном шейкере в течение 4,5 ч в темноте. Затем клетки осаждали на капроновом фильтре и трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Для удаления автолюминесцентного материала клетки выдерживали 1 ч в 70%-ном этаноле. Трижды промывали дистиллированной водой. Капроновый фильтр подсушивали на фильтровальной бумаге. В фарфоровой ступке 300 мг клеток гомогенизировали с 3 мл 1 М NaOH. Для растворения каллозы полученный гомогенат выдерживали 15 мин на водяной бане при 80 °С.

Остатки клеточных структур осаждали центрифугированием (380 g, 5 мин).

Для определения содержания каллозы к 200 мкл супернатанта прибавляли 400 мкл 0,01%-ного водного раствора анилинового голубого. Раствор приобретал интенсивную фиолетово-красную окраску. После этого к раствору добавляли 200 мкл 1 н HCl и 600 мкл 1 М буфера глицин/NaOH (pH 9,5). Окраска раствора становилась ярко-голубой. Смесь встряхивали и помещали на водяную баню. Выдерживали 20 мин при 50 °С, после чего еще 30 мин при комнатной температуре. Люминесценцию раствора измеряли на спектрофлуориметре СДЛ-2 («ЛОМО», Россия). Длина волны возбуждения ($\lambda_{\text{вк}}$) составляла 397 нм, длина волны измерений ($\lambda_{\text{эм}}$) – 490 нм. Для построения калибровочной кривой использовали свежеприготовленный раствор β -1,3-глюкана – пахимана, растворенного в 1 М NaOH, диапазон концентраций от 2 до 30 мкг/мл. Содержание каллозы выражали в мкг-экв. пахимана/мг белка. Содержание белка в супернатанте определяли по методу Лоури [16].

Результаты исследований и их обсуждение.

Микроскопические исследования показали, что хитозан индуцировал отложение каллозы в суспензионной культуре клеток томатов в концентрациях от 0,5 до 2 мг/г. Первые вкрапления каллозы появлялись через 30 мин после добавления элиситора. Участки, содержащие каллозу, имели яркую голубовато-зеленую люминесценцию, которая возрастала со временем и достигала максимума своей интенсивности через 10–12 ч после обработки хитозаном (рис. 1, д).

Существенным для такого рода экспериментов является время фиксации отложения каллозы. В ряде работ показано, что через 5–6 ч после обработки хитозаном в растительных клетках синтезируется значительное количество вторичных метаболитов, которые при окрашивании анилиновым голубым могут быть ошибочно приняты за вкрапления каллозы [6]. Некоторые вторичные метаболиты имеют сходные с каллозой спектры эмиссии и экстинкции [9], что существенно влияет на люминесценцию клеток и препятствует ее выявлению. Поэтому, чтобы достоверно отличить исследуемый глюкан от других люминесцирующих

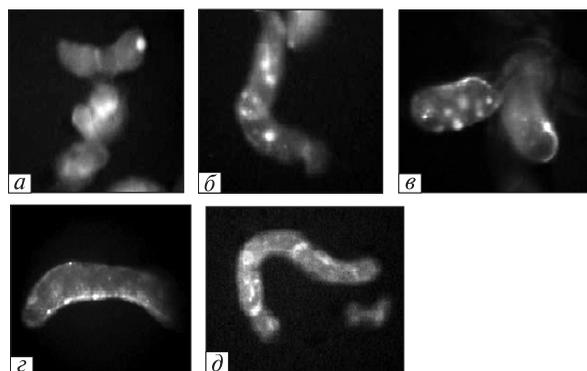


Рис. 1. Микроскопические исследования каллозы через 4,5 ч (а–с) и 10 ч (д) после элиситации: а – контроль; б – хитозан 1 мг/г; в – хитозан 2 мг/г; г – Хт 10^{-8} М; д – хитозан 1 мг/г

веществ, изучение отложения каллозы в клетках томатов проводили через 4,5 ч после элиситации. Обработка клеток хитозаном показала, что с увеличением его концентрации содержание каллозы в обработанных клетках возрастало. Через 4,5 ч после добавления хитозана в концентрации 2 мг/г на поверхности клеток наблюдали многочисленные точечные вкрапления каллозы, которые составляли непрерывные цепочки (рис. 1, в). В клетках, обработанных хитозаном при его концентрации в культуральной среде 1 мг/г, наблюдали лишь точечные вкрапления (рис. 1, б).

Добавление наномолярных концентраций (10^{-10} – 10^{-6} М) олигомеров хитина с разной длиной цепи к суспензии *L. esculentum* индуцировало отложение каллозы в клетках томатов. Количество и размер вкраплений каллозы, отложенных клетками в ответ на обработку этими элиситорами, не имели четкой линейной зависимости от длины цепи и концентрации. Следует отметить, что во всех экспериментальных образцах, к которым добавляли олигомеры хитина, точечных вкраплений каллозы было больше, чем в клетках, обработанных хитозаном, но при этом они имели небольшой размер. Вкрапления сосредоточивались практически по всей поверхности клетки (рис. 1, г).

В контрольных вариантах наблюдали одиночные небольшие вкрапления каллозы, в основном в зонах межклеточного взаимодействия (рис. 1, а). Это, вероятно, связано с конституционной активностью каллозосинтазы,

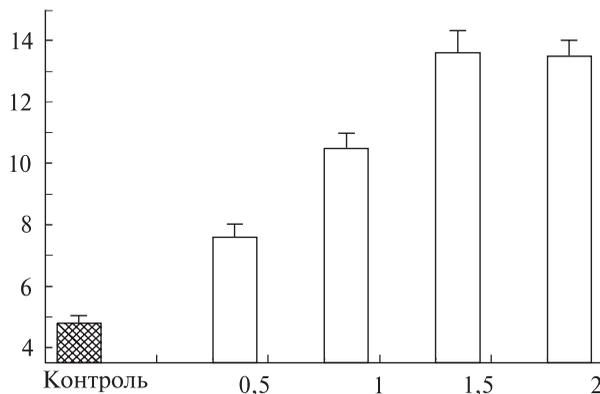


Рис. 2. Индукция отложения каллозы хитозаном: по вертикали — каллоза, мкг-экв./мг белка; по горизонтали — концентрация хитозана, мг/г клеток

которая обеспечивает синтез каллозы, необходимый для нормального роста и развития клеток [9, 15].

Результаты микроскопических исследований индуцируемого хитозаном отложения каллозы показали, что интенсивность ее накопления в суспензионной культуре клеток томатов зависит от концентрации этого элиситора. Увеличение концентрации хитозана выше 2 мг/г существенно не влияло на содержание каллозы и интенсивность ее люминесценции.

При обработке клеток олигомерами хитина было невозможно определить четкий концентрационный порог, при превышении которого увеличения ее накопления не происходит. В одних случаях он составлял 10^{-8} М, в других даже 10^{-9} М. Таким образом, микроскопические исследования не оказались достаточно информативными для установления четкой зависимости количества накопленной каллозы в клетках томатов от концентрации отдельно взятого элиситора, но позволили выбрать оптимальное время для ее дальнейшего количественного определения.

Количество каллозы в суспензионной культуре клеток *L. esculentum* определяли через 4,5 ч после их обработки биотическими элиситорами в тех же концентрациях. Полученные результаты свидетельствуют о том, что индукция накопления каллозы зависела от концентрации использованного индуктора.

В диапазоне концентраций 0,5–1,5 мг/г хитозан индуцировал отложение каллозы в коли-

чествах, которые имели зависимость, близкую к линейной (рис. 2). При увеличении концентрации элиситора выше 1,5 мг/г дальнейшего увеличения индуцируемого отложения каллозы в клетках не наблюдали.

Олигомеры хитина индуцировали отложение каллозы в суспензионной культуре клеток томатов в концентрациях 10^{-10} – 10^{-6} М. Обработка клеток димером хитина (X_{T_2}) приводила к постепенному увеличению синтеза каллозы от 6 до 10,7 мкг-экв./мг белка. Максимальное количество каллозы X_{T_2} -фрагмент индуцировал при его концентрации в культуре 10^{-6} – 10^{-7} М (рис. 3).

Добавление к клеткам олигомера хитина с тремя остатками N-ацетилглюкозамина (X_{T_3}) показало иную картину. При его концентрации 10^{-10} и 10^{-9} М количество отложенной в клетках каллозы составляло 7,9 и 8,6 мкг-экв./мг белка соответственно. При добавлении X_{T_3} -элиситора в концентрации 10^{-8} М наблюдали максимальное для упомянутого индуктора количество каллозы — 13,3 мкг-экв./мг белка. Дальнейшее повышение его концентрации в культуральной среде приводило к снижению накопления каллозы клетками (рис. 4). При добавлении этого элиситора в концентрации 10^{-7} М количество каллозы в клетках составляло 8,4 мкг-экв./мг белка, а при увеличении его концентрации в исследуемом образце до 10^{-6} М — снижалось до 8 мкг-экв./мг белка. Таким образом, наивысшую индуцирующую активность этот элиситор проявляет в концентрации 10^{-8} М.

Максимальную активность X_{T_4} -элиситора наблюдали в исследуемых образцах при его концентрации 10^{-9} и 10^{-8} М. Количество образующейся каллозы при этом составляло соответственно 10,25 и 9,25 мкг-экв./мг белка. Дальнейшее повышение концентрации этого элиситора, как и в случае обработки клеток томатов X_{T_3} -фрагментами, приводило к снижению накопления каллозы (рис. 5).

Аналогичную картину наблюдали при добавлении к клеткам олигомеров хитина с пятью остатками N-ацетилглюкозамина (X_{T_5}). В отличие от X_{T_3} - и X_{T_4} -фрагментов, наивысшую индуцирующую активность X_{T_5} -элиситор проявлял в концентрации 10^{-9} М. При его концентрации в суспензии 10^{-6} М количество

каллозы в клетках составляло лишь 6,3 мкг-экв./мг белка. Обработка культуры ХТ₅-элиситором в концентрации 10⁻¹⁰ М приводила к накоплению клетками 9,3 мкг-экв./мг белка каллозы, а при повышении его концентрации до 10⁻⁹ М количество глюкана достигало максимума — 11,6 мкг-экв./мг белка (рис. 6). Дальнейшее увеличение концентрации ХТ₅-элиситора приводило к постепенному снижению количества образующейся в клетках каллозы.

Результаты проведенных экспериментов показали, что олигомеры хитина при повышении их концентрации в культуральной среде индуцировали постепенное увеличение отложения каллозы в клетках. При достижении элиситором определенной концентрации количество синтезируемого клетками глюкана начинало постепенно уменьшаться с увеличением концентрации индуктора.

При сравнении влияния одинаковых концентраций олигомеров хитина с разной длиной цепи нами отмечена следующая закономерность. Добавление олигомеров хитина в концентрации 10⁻¹⁰ М приводило к постепенному увеличению накопления каллозы клетками (рис. 7). При этом, чем больше была длина хитинового фрагмента, тем больше каллозы накапливалось в клетках *L. esculentum*. Исключением стали экспериментальные образцы, обработанные ХТ₃- и ХТ₄-фрагментами. Добавление к клеткам томатов олигохитиновых фрагментов в концентрации 10⁻⁹ М вызывало последующее увеличение отложения каллозы, которое зависело от длины цепи элиситора. Так, при обработке клеток томатов ХТ₂-фрагментом синтезировалось 8 мкг-экв./мг белка, ХТ₃-фрагментом — 8,4, ХТ₄-фрагментом — 10,25, ХТ₅-фрагментом — 11,6 мкг-экв./мг белка (рис. 7).

Повышение концентрации олигомеров хитина в суспензионной культуре клеток томатов до 10⁻⁸ М приводило к увеличению отложения каллозы в пробах, к которым добавляли ХТ₂- и ХТ₃-фрагменты, и снижению синтеза каллозы в пробах, к которым добавляли ХТ₄- и ХТ₅-фрагменты (рис. 7). При обработке клеток олигомерами хитина в концентрации 10⁻⁸ М накопление каллозы в пробах составляло: ХТ₂-фрагментом — 8,6 мкг-экв./мг белка, ХТ₃-

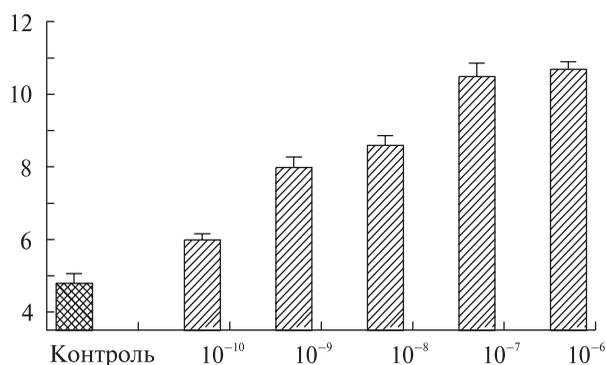


Рис. 3. Индукция отложения каллозы ХТ₂-элиситором: по вертикали — каллоза, мкг-экв./мг белка; по горизонтали — концентрация элиситора, М

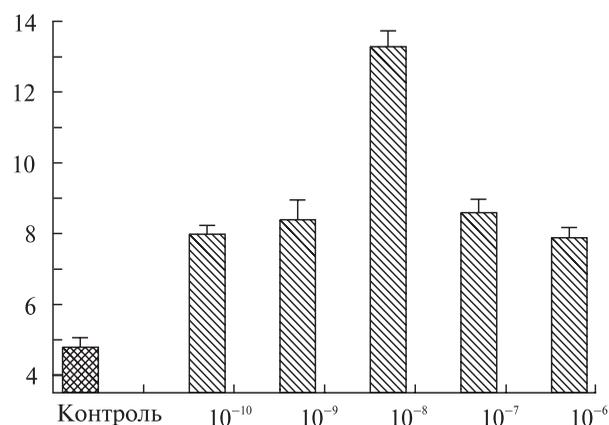


Рис. 4. Индукция отложения каллозы ХТ₃-элиситором: по вертикали — каллоза, мкг-экв./мг белка; по горизонтали — концентрация элиситора, М

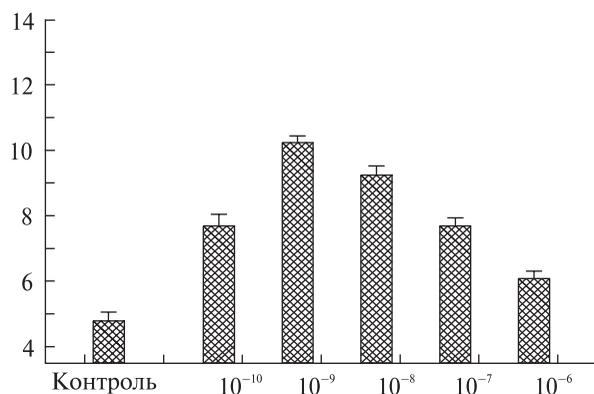


Рис. 5. Индукция отложения каллозы ХТ₄-элиситором: по вертикали — каллоза, мкг-экв./мг белка; по горизонтали — концентрация элиситора, М

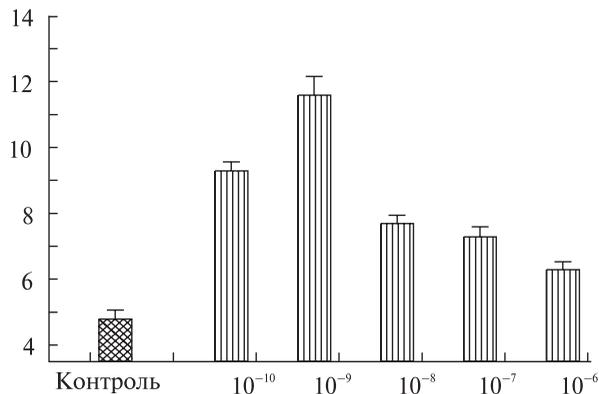


Рис. 6. Индукция отложения каллозы ХТ₅-элиситором по вертикали – каллоза, мкг-экв./мг белка; по горизонтали – концентрация элиситора, М

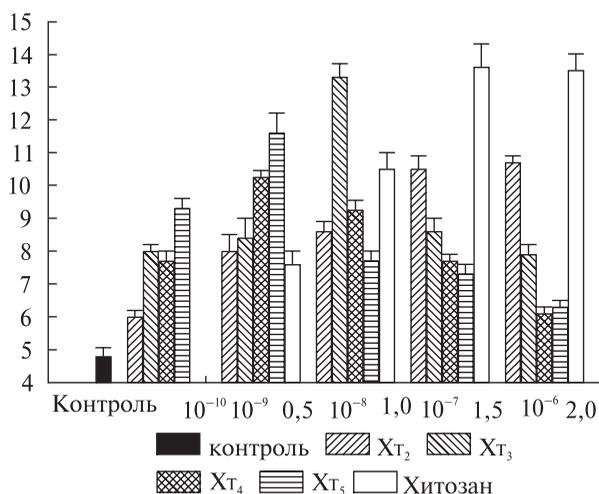


Рис. 7. Индуцируемое отложение каллозы при обработке клеток разными концентрациями биотических элиситоров: по вертикали – каллоза, мкг-экв./мг белка; по горизонтали – концентрация элиситоров (Моль) и хитозана (мг/г клеток)

фрагментом – 13,3 мкг-экв./мг белка. В то же время обработка клеток ХТ₄-фрагментом вызывала отложение каллозы, которое составляло 9,25 мкг-экв./мг белка, а ХТ₅-фрагментом – 7,7 мкг-экв./мг белка (рис. 7).

Повышение концентрации олигомеров хитина в суспензии клеток томатов до 10^{-7} М приводило к последующему увеличению отложения каллозы в пробе, к которой добавляли ХТ₂-фрагмент. Количество накопленной клетками каллозы при этом составляло 10,5 мкг-экв./мг белка. В образцах, к которым прибавляли олигомеры хитина с другой длиной цепи в этой же концен-

трации, количество накопленной клетками каллозы снижалось при увеличении длины элиситорного фрагмента (рис. 7).

Повышение концентрации олигомерных элиситоров до 10^{-6} М показало такую же закономерность, как и в случае обработки клеток томатов предыдущей концентрацией. После добавления ХТ₂-фрагмента количество каллозы в клетках возрастало до 10,7 мкг-экв./мг белка, а в клетках, обработанных другими олигомерами хитина, продолжало снижаться по сравнению с их действием в концентрации 10^{-7} М (рис. 7).

Таким образом, резюмируя полученные результаты можно отметить, что при добавлении хитозана к суспензии томатов в концентрациях 0,5–2,0 мг/г происходило постепенное увеличение количества накопленной клетками каллозы с повышением его концентрации в культуральной среде. Обработка клеток олигомерами хитина позволила выявить нелинейную зависимость накопления каллозы при повышении концентрации элиситоров. Исключением стал ХТ₂-фрагмент, при повышении концентрации которого отложение каллозы в клетках томатов продолжало увеличиваться с повышением его концентрации в культуре, что можно объяснить его более слабой элиситорной активностью. Однако остается невыясненным, с чем связано нелинейное накопление каллозы у томатов при их обработке олигомерами хитина.

Не исключено, что уменьшение количества каллозы в клетках томатов при увеличении концентрации олигомеров хитина в культуральной среде связано с тем, что элиситоры достигли своего порогового уровня в реакции отложения каллозы. Возможно, что при таком развитии событий в клетках могут происходить опосредованные сигнальными системами биохимические изменения, которые, в конечном счете, приводят к формированию более эффективных ответных реакций – синтезу фитоалексинов и накоплению РR-белков [1]. Результаты наших более ранних работ показали, что добавление олигомеров хитина к суспензионной культуре клеток томатов индуцировало увеличение хитиназной активности [17]. Ингибирование кальциевой сигнальной системы при индуцировании хитиназной ак-

тивности олигомерами хитина существенно снижало активность хитиназы [18]. Блокировка потенциал-зависимых кальциевых каналов и хелатирование периплазматического пула кальция в клетках лука и томатов приводили к значительному снижению накопления каллозы [15].

Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение концентрации цитозольного кальция за счет поступления его из периплазматического пула является важным условием индукции защитных реакций. Кальциевая сигнальная система играет ключевую роль в индукции накопления каллозы в клетках томатов.

Выводы. Нами изучена способность суспензионной культуры клеток томатов (*L. esculentum*) накапливать каллозу в ответ на обработку биотическими элиситорами. Различия в накоплении каллозы при обработке томатов активными концентрациями отличающихся по химическому строению элиситоров зависят, по-видимому, от механизмов трансдукции сигнала ее синтеза. Пороговые концентрации олигомеров хитина могут вызывать опосредованную сигнальными системами активацию факторов регуляции транскрипции и последующую экспрессию генов более эффективных защитных реакций, что в свою очередь может приводить к уменьшению синтеза каллозы в клетках.

SUMMARY. Time-course of induced accumulation of callose in tomato cells has been studied. Localization of callose in *L. esculentum* cells was investigated by fluorescent microscopy technique, and the optimal time for its determination was found. Callose accumulation in tomato cells treated with different biotic elicitors was determined. Non-linear dependence between callose accumulation and concentration of chitin oligomers (with 3–5 N-acetylglucosamine fragments) was established. Increasing of callose accumulation in tomato cells was proportional to the increase of concentration of chitin dimer and chitosan in the culture medium.

РЕЗЮМЕ. Вивчено динаміку накопичення калози в клітинах томатів. Методами флуоресцентної мікроскопії досліджено локалізацію калози в клітинах та оптимізовано час її кількісного визначення. Встановлено кількість накопиченої калози при обробці клітин різними біотичними еліситорами. Визначено

нелінійну залежність відкладання калози від концентрації олигомерів хітину, які складаються з 3–5 залишків N-ацетилглюкозаміну, та пропорційне збільшення накопичення калози в клітинах, при підвищенні концентрації димера хітину та хітозану в культуральному середовищі.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дмитриев А.П.* Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. — К.: Наук. думка, 2000. — 208 с.
2. *Дмитриев А.П.* Сигнальные системы иммунитета растений // Цитология и генетика. — 2002. — **36**, № 3. — С. 58–68.
3. *Дячок Ю.В., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М.* Роль Ca^{2+} как вторичного мессенджера в индукции синтеза фитоалексинов и каллозы в культуре клеток *Allium cepa* L. // Физиология растений. — 1997. — **44**. — С. 385–391.
4. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 298 с.
5. *Kauss H.* Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions // The Plant Plasma Membrane — Structure, Function and Molecular Biology. — Berlin : Springer, 1990. — P. 126–143.
6. *Kauss H.* Callose synthesis // Membranes: Specialized Functions in Plants. — Guildford : Bios Sci. Publ., 1996. — P. 77–92.
7. *Aist J.K.* Papillae and related wound plugs of plant cells // Annu. Rev. Phytopathol. — 1976. — **14**. — P. 145–165.
8. *Hong Z., Zhang Z., Olson J.M., Verma D.P.* A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate // Plant Cell. — 2001. — **13**. — P. 769–779.
9. *Kauss H., Jeblick W., Domard A.* The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus* // Planta. — 1989. — **178**. — P. 385–393.
10. *Woodward S., Pegg G.F.* Rishitin accumulation elicited in resistant and susceptible isolines of tomato by mycelial extracts and filtrates from cultures of *Verticillium albo-atrum* // Physiol. Mol. Plant Pathol. — 1986. — **29**. — P. 337–347.
11. *Conrath U., Domard A., Kauss H.* Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives by parsley cell suspensions // Plant Cell Rep. — 1989. — **8**. — P. 152–155.
12. *Iglesias V.A., Meins F.J.* 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. — **21**. — P. 157–166.
13. *Kudlicka K., Brown R.M.* Cellulose and callose biosynthesis in higher plants. 1. Solubilization and separation

- of (1–3) and (1–4)- β -glucan synthase activities from mung bean // *Plant Physiol.* – 1997. – **115**. – P. 643–656.
14. Nishimura M.T., Stein M., Hou B.H., Vogel J.P., Edwards H., Somerville S. Loss of callose synthase result in salicylic acid-dependent disease resistance // *Science.* – 2003. – **301**. – P. 969–972.
15. Емельянов В.И., Кравчук Ж.Н. Сравнительная характеристика индукции каллозообразования в суспензионных культурах клеток лука и томата // *Вісн. Дніпропетр. ун-ту.* – 2001. – № 2. – С. 235–241.
16. Скоупс Р. Методы очистки белков : Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 260 с.
17. Емельянов Ж.Н., Дмитриев О.П., Гродзінський Д.М. Індукція хітиназної активності хітиновими фрагментами різної довжини в суспензійній культурі клітин томату (*Lycopersicon esculentum*) // *Доп. НАН України.* – 1999. – **11**. – С. 156–158.
18. Емельянов В.И., Поздренко Д.М., Семенець В.А. Участь кальцієвої сигнальної системи в індукваному накопиченні калози та зростанні хітиназної активності // *Проблеми регуляції фізіологічних функцій : Вісн. Київ. нац. ун-ту.* – 2006. – **11**. – С. 47–49.

Поступила 15.02.07