

doi 10.18699/vjgb-25-57

Цитофизиологические проявления защитных реакций пшеницы от стеблевой ржавчины, индуцируемые биофунгицидом Новохизолем

А.Б. Щербань ^{1, 2}, Л.Я. Плотникова ³, В.В. Кнауб ³, Е.С. Сколотнева ^{1, 2}, В.В. Фоменко ⁴

¹ Курчатowski геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

⁴ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

 lya.plotnikova@omgau.org

Аннотация. Биологизация земледелия считается приоритетным направлением сельскохозяйственного производства. Одним из перспективных подходов к решению задачи биологизации является применение препаратов на основе хитозана для стимуляции роста и защиты растений от широкого круга патогенов. В настоящее время проводятся активные работы по созданию и испытанию новых форм хитозановых препаратов. Препарат «Новохизол» получен в результате внутримолекулярных сшивок линейных молекул хитозана и имеет глобулярную форму. Ранее установлено стимулирующее влияние Новохизола на рост и развитие мягкой пшеницы, однако индуцируемые защитные механизмы против ржавчинных болезней не изучались. Проведенные исследования показали дозовый эффект препарата на развитие стеблевой ржавчины пшеницы. При обработке за четверо суток до заражения лучшие результаты по развитию устойчивой реакции растений, сокращению числа и размеров пустул были получены с Новохизолом в концентрации 0.125 и 0.75 %. После предобработки на проростках восприимчивого сорта Новосибирская 29 проявилась устойчивая реакция и снизилось число пустул. Цитофизиологические исследования показали, что обработка 0.75 % Новохизолом стимулировала интенсивное накопление пероксида водорода H_2O_2 в листьях инфицированных и здоровых растений в течение 48 ч после инокуляции. В период 48–144 ч после инокуляции H_2O_2 постепенно исчезал из тканей, но на стадии спороношения его содержание значительно возрастало в зоне колоний и пустул. Новохизол не индуцировал развитие реакции сверхчувствительности в зараженных растениях. Применение препарата способствовало более раннему и интенсивному (по сравнению с необработанными растениями) накоплению фенольных веществ с разным спектром автофлуоресценции в зоне колоний патогена. Препарат повлиял на изменение соотношения фенолов с разными спектральными характеристиками в сторону соединений с повышенным содержанием остатков сирингина. Данная работа является первым этапом изучения действия Новохизола на защитные механизмы пшеницы против стеблевой ржавчины. Исследования будут продолжены с применением молекулярно-генетических и биохимических методов.

Ключевые слова: биопестициды; Новохизол; мягкая пшеница; стеблевая ржавчина; механизмы устойчивости; АФК; фенолы

Для цитирования: Щербань А.Б., Плотникова Л.Я., Кнауб В.В., Сколотнева Е.С., Фоменко В.В. Цитофизиологические проявления защитных реакций пшеницы от стеблевой ржавчины, индуцируемые биофунгицидом Новохизолом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):539-548. doi 10.18699/vjgb-25-57

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, № 23-16-00119, <https://rscf.ru/project/23-16-00119/>

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Cytophysiological manifestations of wheat's defense reactions against stem rust induced by the biofungicide Novochizol

A.B. Shcherban ^{1, 2}, L.Ya. Plotnikova ³, V.V. Knaub ³, E.S. Skolotneva ^{1, 2}, V.V. Fomenko ⁴

¹ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

⁴ N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 lya.plotnikova@omgau.org

Abstract. Biologization is a priority direction of agricultural production. One of the promising approaches to solve the biologization problem is the use of chitosan-based biopreparations to stimulate plant growth and protect plants from a wide range of pathogens. Currently, active work is underway to create and test new chitosan preparations. Novochizol was obtained as a result of intramolecular crosslinking of linear chitosan molecules and has a globular shape. Previ-

ously, a Novochizol-stimulating effect on the growth and development of common wheat was demonstrated. However, the induced resistance mechanisms against rust diseases have not been studied before. The reported studies have revealed the dose effect of the preparation on the development of wheat stem rust. The best results of visual estimation of plant reactions were obtained with 0.125 and 0.75 % Novochizol pretreatment four days before rust infection. After pretreatment of susceptible cv. Novosibirsk 29 seedlings, a resistant reaction appeared and the urediniopustule density was decreased. Cytophysiological studies have shown that 0.75 % Novochizol stimulated an intensive accumulation of hydrogen peroxide H_2O_2 in the leaves of the infected and healthy plants within 48 hours post inoculation (h p/in). During the period of 48–144 h p/in, H_2O_2 gradually disappeared from tissues, but its content increased significantly at the sporulation stage around pustules. However, Novochizol did not induce the hypersensitivity reaction in infected plants. The preparation induced an earlier and more intensive (compared with untreated plants) accumulation of phenolic substances with different autofluorescence in the zones around pathogen colonies. Novochizol induced a change in the ratio of phenols with different spectral characteristics towards compounds with an increased content of syringin derivatives. This work is the first stage in the study of Novochizol effects on wheat defense mechanisms against stem rust. The research will be continued using molecular genetics, biochemical and cytophysiological methods.

Key words: biopesticides; Novochizol; common wheat; stem rust; resistance mechanisms; ROS; phenols

For citation: Shcherban A.B., Plotnikova L.Ya., Knaub V.V., Skolotneva E.S., Fomenko V.V. Cytophysiological manifestations of wheat's defense reactions against stem rust induced by the biofungicide Novochizol. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):539-548. doi 10.18699/vjgb-25-57

Введение

В связи с прогнозируемым к 2050 г. ростом населения Земли до 9.5 млрд человек необходимо увеличить производство зерна в 1.7 раза (USDA, 2016). Повышение сборов зерна пшеницы может быть обеспечено за счет создания более продуктивных и устойчивых к стрессам сортов, а также снижения потерь от действия абиотических и биотических факторов. Для защиты посевов от болезней и вредителей традиционно используют химические пестициды. Эти средства защиты высокоэффективны, однако могут накапливаться в растениях и почве, оказывая отрицательное действие на экологическую ситуацию в агроценозах и качество продукции (Штерншис и др., 2016). По мере изучения механизмов устойчивости к стрессам усиливается применение биологических средств защиты растений (Chandler et al., 2011).

Биологические средства защиты растений (БСЗР), основанные на природных соединениях и полезных микроорганизмах, привлекают внимание исследователей и практиков, поскольку по эффективности они часто близки к химическим препаратам, но не имеют их недостатков (Chakraborty et al., 2020). Спектр биопестицидов и схемы их применения очень разнообразны, что определяется биологией патогенов и вредителей, а также особенностями их взаимодействия с растениями. БСЗР могут оказывать прямое ингибирующее воздействие на патогенов или вредителей либо индуцировать комплекс защитных реакций растений (Orzali et al., 2017; Яруллина и др., 2023).

В качестве БСЗР широко используют производные хитина и хитозана (Тютерева, 2015; Malerba, Cerana, 2016). Полимерный углевод хитин распространен в природе и является компонентом покровов членистоногих, включая ракообразных и насекомых, и грибов. Хитозан получают путем гидролиза и деацетилирования хитина. Препараты на основе хитозана обладают стимулирующим действием на рост и развитие растений и усиливают их устойчивость к абиотическим стрессам (Haggag et al., 2014; Orzali et al., 2017). Производные хитозана также представляют особый интерес в качестве индукторов резистентности к грибным, бактериальным и вирусным заболеваниям (Chakraborty et al., 2020; Щербань, 2023).

Хитозановые препараты могут различаться по основным характеристикам: молекулярной массе, степени деацетилирования и индексу полидисперсности (Richter et al., 2012). Эффективность действия производных хитозана может быть значительно усилена путем их модификации: введения функциональных групп оснований Шиффа, атомов галогенов (Cl или F), наночастиц металлов, групп мочевины и др. (Варламов и др., 2020; Яруллина и др., 2023). Перспективными для защиты растений от грибных и вирусных болезней оказались препараты, созданные на основе конъюгатов хитозана с фенольными гидроксикоричными кислотами (феруловой и кофейной) (Rkhaila et al., 2021; Yarullina et al., 2024a). Установлен положительный защитный эффект сочетания хитозановых препаратов с другими биологически активными веществами (БАВ) и полезными микроорганизмами (plant growth promoting bacteria, PGPB) (Rkhaila et al., 2021; Yarullina et al., 2024b). Усиление защитных эффектов обусловлено синергетическим воздействием разных компонентов препаратов (Тютерева, 2015). В настоящее время в мире создан широкий спектр БСЗР на основе хитозана и проведены их испытания на различных культурах. Сравнение результатов показало, что стимулирующие и защитные эффекты зависели от состава препаратов, а также от видов растений и патогенов (Rabea et al., 2005; Orzali et al., 2017).

В России разработан ряд комплексных препаратов хитозана с добавлением БАВ: «Нарцисс» с янтарной и глутаминовой кислотами, «Хитозар М» с салициловой кислотой (СК), «Хитозар Ф» с арахидоновой кислотой, препарат с СК и ванилином и др. (Тютерева, 2015; Попова и др., 2018). Комбинированные препараты были эффективны против различных патогенных грибов, вирусов и вредителей. После их применения повышалась устойчивость: пшеницы – к бурой ржавчине, темно-бурой пятнистости и корневым гнилям; риса – к пирикулярриозу; томатов – к фитофторозу и фузариозу; картофеля – к фитофторозу и вирусу Y; огурцов – к ложной мучнистой росе и т.д. (Тютерева, 2015; Баданова и др., 2016; Попова и др., 2018).

В качестве БСЗР перспективно новое производное хитозана – «Новохизоль», полученный путем внутримолекулярной сшивки линейных молекул хитозана. Новохизоль

имеет глобулярную форму, что дает ему ряд преимуществ по сравнению с хитозаном: повышенную растворимость в водных растворах, химическую стабильность, устойчивость к биodeградации, высокую адгезию и способность проникать в ткани. Такое соединение способно поглощать различные вещества и медленно высвобождать их после обработки растений (Novochizol SA, www.novochizol.ch). Эти свойства важны для создания перспективных комбинированных препаратов с другими биологически активными веществами. Новохизоль проявляет ростостимулирующее действие при обработке семян и листьев. На примере мягкой пшеницы показано, что вещество усиливало прорастание семян, способствовало увеличению массы корней и общей массы растений (Terlyakova et al., 2022). В полевых условиях выявлена эффективность комплексных препаратов Новохизоля с усниновой кислотой или экстрактом коры сосны сибирской для защиты мягкой пшеницы от корневой гнили и септориоза (Бурлакова и др., 2025).

Известно, что после узнавания растениями эффекторов (элисаторов) неспециализированных или авирулентных патогенов активируется набор защитных реакций. К самым ранним ответам относится генерация активных форм кислорода (АФК) и оксида азота NO (Manjunatha et al., 2009; Singh et al., 2021; Плотникова, Кнауб, 2024). Накопление АФК (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2) приводит к всплеску окислительных реакций – окислительному взрыву. Фермент супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксид-анион O_2^- в менее токсичный пероксид водорода H_2O_2 (Максимов, Черепанова, 2006). H_2O_2 оказывает токсическое действие на патогенов, а также является мессенджером в НАДФ-Н-оксидазной сигнальной системе, реализующейся через СК-зависимый сигнальный каскад (Тарчевский, 2000; Яруллина и др., 2023). В результате действия СК-зависимого каскада в зоне инфекции развивается комплекс защитных механизмов от биотрофных патогенов: генерация АФК, реакция сверхчувствительности (СВЧ), синтез защитных PR-белков (pathogenesis related proteins) и фенольных веществ. Защитные реакции против некротрофных патогенов регулируются с помощью сигнального каскада, зависящего от жасмоновой кислоты (ЖК), абсцизовой кислоты и этилена. Устойчивость к гембиотрофам обеспечивается за счет совместного действия СК- и ЖК-зависимых каскадов (Singh et al., 2021; Яруллина и др., 2023). Изучение влияния хитозанов на защитные реакции против патогенов показало активацию ферментов обмена АФК и фенольного метаболизма, накопление фенолов, защитных PR-белков и укрепление клеточных стенок с помощью лигнина и каллозы (Orzali et al., 2017; Щербань, 2023).

Для разработки технологии применения БСЗР необходимо изучить их действие на защитные механизмы и развитие наиболее вредоносных болезней. Влияние Новохизоля на механизмы устойчивости пшеницы против ржавчинных болезней ранее не исследовалось. Целью работы было изучение влияния Новохизоля на защитные механизмы восприимчивого сорта мягкой пшеницы при заражении возбудителем стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Eriks. et Henn.

Материалы и методы

Объектом исследования были 10-суточные проростки восприимчивого к стеблевой ржавчине сорта яровой мягкой пшеницы Новосибирская 29. Растения выращивали в сосудах с почвой, что рекомендовано международными протоколами для экспериментов с ржавчинными грибами (Woldeab et al., 2017). Проростки обрабатывали растворами Новохизоля в концентрации 0.125, 0.75, 1.5, 2.5 %. Растворы наносили на растения с помощью пульверизатора (15 мл/100 растений) за четверо суток до заражения стеблевой ржавчиной. Такой срок предобработки достаточен для индукции защитных эффектов биопрепаратами, в том числе производными хитозана, против оомицетов и ржавчинных грибов (Faoro et al., 2008; Bellameche et al., 2021; Elsharkawy et al., 2022). Контролем служили растения, обработанные бидистиллированной водой.

Инокуляцию проростков проводили урединиоспорами сборного образца западносибирской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* (Pgt), включающего изоляты с генами авирулентности/вирулентности к генам устойчивости пшеницы *Sr11Sr24Sr30Sr31/Sr5Sr9aSr9bSr9dSr9gSr10Sr17Sr38SrMcN*. Урединиоспоры хранили до эксперимента при $-70^\circ C$ и рекультивировали на восприимчивом сорте мягкой пшеницы Хакасская (Рсалиев А.С., Рсалиев Ш.С., 2018). Суспензию урединиоспор с концентрацией 0.8 мг/мл Novex 7100 (Sørensen et al., 2016) наносили на проростки пульверизатором. Инокулированные растения инкубировали в течение 24 ч во влажной камере в темноте при температуре $15-20^\circ C$ для обеспечения максимального прорастания спор. Далее растения переносили в ростовые камеры и инкубировали при 16-часовом освещении фитолампами с интенсивностью 10000 люкс при температуре $26-28^\circ C$. Такая температура является критичной для формирования полноценной структуры аппрессориев, проникновения патогена в устьица и развития инфекционных гиф в межклетниках растения (Roelfs et al., 1992).

Фитопатологическая оценка реакции зараженных растений. Влияние препарата оценивали с помощью количественной и качественной характеристик, применяемых к описанию устойчивости проростков пшеницы к стеблевой ржавчине: количества пустул на лист (шт./лист, по 10 растений в варианте) и типа реакции. Реакцию растений (IT, infection type) определяли через 12–14 дней после инокуляции с использованием модифицированной шкалы Стэкмана, где IT «0», «1», «2» интерпретировали как устойчивые (R, resistance), а «3», «3+» и «4» – как восприимчивые (S, susceptible) (Roelfs et al., 1992).

Цитологические и цитохимические исследования были проведены на растениях, обработанных Новохизолем с концентрацией 0.75 %. Материал фиксировали через 0, 24, 96, 144 и 240 ч после инокуляции (п/ин) в лакто-фенольном фиксаторе (фенол, молочная кислота, глицерин, дистиллированная вода, 96 % этанол в соотношении 1:1:1:1:8) (Плотникова, Мешкова, 2009). Инфекционные структуры на поверхности и в тканях растений выявляли с помощью флуоресцентного красителя Uvitex 2B (Sigma-Aldrich, США) по модифицированному методу (Moldenhauer et al., 2006). Для этого фиксированный в

лактофеноле материал промывали дистиллированной H₂O и выдерживали 3 ч в уксусно-кислом спирте (96 % этанол : ледяная уксусная кислота = 3 : 1). Затем промывали дистиллированной H₂O и выдерживали: в 50 % этаноле – 20 мин, 0.5N NaOH – 30 мин, дистиллированной H₂O – 5 мин, буфере 0.1M Tris-HCl (pH 5.8) – 30 мин, дистиллированной H₂O – 5 мин. Кусочки листьев окрашивали в течение 15 мин в 0.1 % Uvitex 2B в 0.1M Tris-HCl буфере (pH 5.8), предварительно прогревом при 60 °C. Для дифференциации окраски материал выдерживали 90 мин в дистиллированной воде. Наблюдения проводили в отраженном свете с волной возбуждения $\lambda_{max} = 355$ нм и эмиссии $\lambda_{max} = 420$ нм. Неповрежденные структуры гриба проявляли синее свечение, поврежденные клетки растений и гифы патогена в зоне интенсивного накопления H₂O₂ – голубое или белое.

Для локализации в тканях пероксида водорода H₂O₂ до фиксации выполняли витальное окрашивание материала 0.02%-м 3,3'-диаминобензидин тетрахлоридом (ДАБ) (Sigma-Aldrich, США) (Плотникова, Мешкова, 2009). Раствор вводили в листья путем вакуум-инфильтрации и инкубировали 30 мин. В присутствии H₂O₂ образовывался нерастворимый вишневого цвета формазан.

Распределение фенольных веществ в листьях изучали с помощью общей реакции на фенолы (низкомолекулярные и полимерный лигнин) с использованием 1 % сернокислого анилина (сульфат анилина : ледяная уксусная кислота : 50 % этиловый спирт = 1 : 2 : 97) в течение 1 ч с последующей промывкой в дистиллированной воде (Джапаридзе, 1953). Лигнин в проводящих пучках и клетках растений в зоне инфекции приобретали желто-коричневую окраску. Дополнительно исследовали автофлуоресценцию фенолов в отраженном свете с волной возбуждения $\lambda_{max} = 355$ нм и эмиссии $\lambda_{max} = 530$ нм (зеленое свечение) или $\lambda_{max} = 605$ нм (красное свечение) (Плотникова, Мешкова, 2009). Цитологические исследования проводили с использованием светового микроскопа ARSTEK E62 (ARSTEK, Китай) с цифровой камерой Sony Alpha A6400 APS-C с разрешением 24.2 Мпк/дюйм (Sony, Япония).

В ходе экспериментов изучали развитие 30–50 урединиоспор *Pgt* на каждом из пяти растений по варианту. Результаты развития *Pgt* на листьях учитывали как повторности опыта. Через 240 ч п/ин были измерены площади мицелия и урединиопустул (35–50 шт./вариант) с применением программного обеспечения фотокамеры. По всем данным рассчитывали средние значения и ошибки средних (приведены в таблицах и на графиках), а также вычисляли НСР при $p \leq 0.05$.

Результаты

Визуальная оценка влияния Новохизоля на развитие стеблевой ржавчины

На первом этапе работы было изучено влияние различных концентраций Новохизоля на развитие болезни на проростках восприимчивого сорта Новосибирская 29. В экспериментах был применен широкий спектр концентраций препарата – от 0.125 до 2.5 %. На растениях, обработанных водой (контроль), формировались пустулы с ИТ «4». Результаты показали, что препарат в любой концентрации влиял на развитие болезни, что проявлялось в уменьшении плотности расположения урединиопустул, сокращении их размеров и появлении зон хлороза различных размеров вокруг спороношений (табл. 1). В наименьшей степени ИТ снижался при обработке 2.5 % раствором Новохизоля (ИТ «3», «3+»). Препарат в концентрациях 0.125, 0.75 и 1.5 % индуцировал устойчивую реакцию растений. В наибольшей степени размеры пустул уменьшались при обработке препаратом с концентрацией 0.75 % (ИТ «2», «2–»). Этот вариант опыта был использован для дальнейшего изучения защитных реакций растений.

Результаты цитофизиологических исследований влияния Новохизоля на патогенез

Действие Новохизоля было оценено по развитию поверхностных и внутритканевых структур *Pgt* и реакций растений в зоне инфекции. После попадания на увлажненную поверхность растений урединиоспоры набухали и образовывали ростковые трубки (рис. 1, а). На концах большинства ростковых трубок формировались аппрессории, необходимые для проникновения в устьица (см. рис. 1, б). Значительная часть аппрессориев (73–78 %) располагалась на устьицах, и более 93 % из них обеспечивали проникновение патогена в устьица. Достоверных различий в развитии *Pgt* на поверхности необработанных и обработанных Новохизелем растений не установлено (табл. 2). Основная доля аппрессориев формировалась через 18–24 ч п/ин. После проникновения в устьица гриб формировал инфекционные гифы с материнскими клетками гаусторий (МКГ) (см. рис. 1, в), а первые гаустории в клетках мезофилла образовывались через 24–48 ч п/ин. Через 240 ч п/ин гриб формировал крупные пустулы со следующим поколением урединиоспор (см. рис. 1, г).

Для выявления активных реакций растений была изучена локализация пероксида водорода и фенольных соединений в листьях. Во всех вариантах опыта (контрольные незараженные, обработанные Новохизелем, инфициро-

Таблица 1. Результаты визуальной оценки влияния концентрации Новохизоля на развитие *P. graminis* f. sp. *tritici* на проростках пшеницы

Показатель	Контроль	Концентрация Новохизоля, %			
		0.125	0.75	1.5	2.5
Тип реакции, ИТ	4	2	2, 2–	2, 2+	3, 3+
Среднее количество пустул, шт./лист	20.4 ± 0.54	8.3 ± 0.35*	18.1 ± 0.32*	15.1 ± 0.28*	14.3 ± 0.28*

* Достоверные различия с контролем при $p \leq 0.05$.

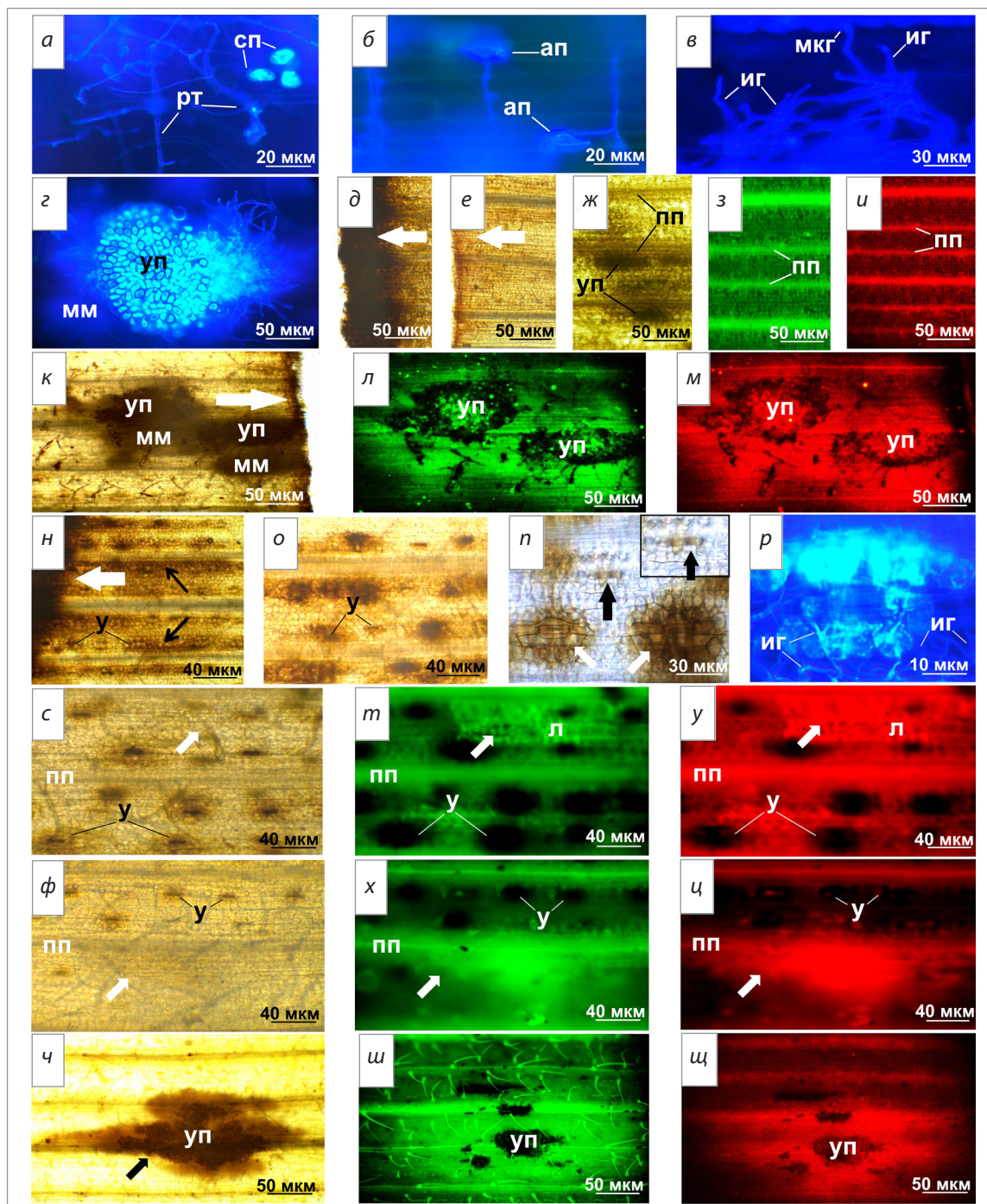


Рис. 1. Развитие *P. graminis* f. sp. *tritici* и распределение пероксида водорода и фенолов в тканях: а–г, ж, к–м – растения без обработки; д, е, з, и – контрольные незараженные растения; н–щ – растения, обработанные Новохизолом.

а – развитие ростковых трубок на поверхности; б – образование аппрессориев на устьицах; в – инфекционные гифы и материнская клетка гаустории в ткани; г – колония с урединиопустулой; д – интенсивное образование H_2O_2 на срезе листа контрольного растения, 24 ч п/ин; е – слабое накопление H_2O_2 на срезе листа контрольного растения, 240 ч п/ин; ж – фенолы в цитоплазме растений в зоне урединиопустулы и лигнина в проводящих пучках; з, и – автофлуоресценция фенолов в листе контрольного растения; к – накопление H_2O_2 в зонах колоний с урединиопустулами и на срезе листа (стрелка), 240 ч п/ин; л, м – накопление фенолов с зеленой и красной автофлуоресценцией вокруг урединиопустул; н – интенсивное накопление H_2O_2 на срезе листа и в ткани растения, 24 ч п/ин (стрелки); о – локализация H_2O_2 в зоне устьиц, 96 ч п/ин; п – пустая оболочка аппрессория на устьице растения (черная стрелка, выделенный фрагмент) и интенсивное накопление H_2O_2 под другими устьицами (белые стрелки), 48 ч п/ин; р – автофлуоресценция отмерших клеток растения и инфекционных гиф гриба (голубая), и нормальных гиф (синяя), 48 ч п/ин; с – abortивная колония (стрелка); т, у – автофлуоресценция фенолов и лигнина в зоне abortивной колонии (стрелки), 96 ч п/ин; ф – активно развивающаяся колония (стрелка); х, ц – автофлуоресценция фенолов в зоне активно развивающейся колонии (стрелки), 144 ч п/ин; ч – интенсивное накопление H_2O_2 (стрелка) в зоне колонии с урединиопустулой, 240 ч п/ин; ш, щ – интенсивное накопление фенолов с различным спектром свечения в зоне колонии с урединиопустулой, 240 ч п/ин. Обозначения: ап – аппрессорий; иг – инфекционная гифа; л – лигнин; мкг – материнская клетка гаустории; мм – мицелий; пп – проводящий пучок; рт – ростковая трубка; сп – спора; у – устьице; уп – урединиопустула. Окраска: а–г, р – Uvitex 2В; д, е, к, н–п, с, ф, ч – ДАБ; ж – сернокислый анилин; з, л, т, х, ш – автофлуоресценция фенолов при эмиссии $\lambda_{max} = 530$ нм; и, м, у, ц, щ – автофлуоресценция фенолов при эмиссии $\lambda_{max} = 605$ нм.

Таблица 2. Влияние Новохизоля на развитие *P. graminis* f. sp. *tritici* на поверхности растений мягкой пшеницы

Вариант	Доля проросших спор, %	Доля аппрессориев, %		
		от проросших спор	на устьицах от их общего количества	проросших в устьицах
Контроль	77.2 ± 1.6	61.3 ± 5.1	72.7 ± 3.6	93.8 ± 1.3
Новохизол	80.2 ± 1.9	63.8 ± 3.9	78.0 ± 2.7	93.2 ± 1.5
НСР _{0.05}	3.2	3.4	6.2	2.1

ванные *Pgt*, а также обработанные Новохизолом зараженные растения) в начале эксперимента ДАБ интенсивно окрашивал срезы листьев (см. рис. 1, *д, н*), а в удаленных от срезов зонах окраска была слабой (см. рис. 1, *д*). В конце эксперимента интенсивность окраски срезов всех листьев значительно снижалась (см. рис. 1, *е, к*). Вероятно, образование H₂O₂ было связано со стрессовой реакцией растений на механическое повреждение.

Распределение общих фенолов в листьях было сначала изучено с помощью специальной окраски серноокислым анилином. Фенолы выявлены в стенках проводящих пучков, что соответствует присутствию полимерного лигнина, а также в цитоплазме и на клеточных стенках растений в зоне развития *Pgt*. В других частях листьев содержание фенолов было низким (см. рис. 1, *ж*). Автофлуоресценция фенолов совпадала с их локализацией, определенной с помощью окраски серноокислым анилином. При разных режимах наблюдения проявлялось яркое зеленое или красное свечение (при эмиссии λ_{max} = 530 нм или λ_{max} = 605 нм соответственно), что связано с присутствием разных форм фенолов. В контрольных растениях красное свечение активнее проявлялось в крупных проводящих пучках, а зеленое – в мелких пучках, в стенках замыкающих клеток устьиц и мезофилльных клеток (см. рис. 1, *з, и*).

При развитии колоний *Pgt* в необработанных Новохизолом листьях не установлено значимых изменений клеток растений в зоне колоний вплоть до стадии спороношения. Через 240 ч п/ин определено накопление H₂O₂ в тканях под пустулами, и меньшее – в зоне остального мицелия (см. рис. 1, *к*). Вокруг пустул в зоне мицелия выявлено умеренное накопление фенолов с зеленым свечением, и более интенсивное – с красной автофлуоресценцией (см. рис. 1, *л, м*).

В обработанных Новохизолом растениях (незараженных и зараженных) отмечены зоны накопления H₂O₂ в листьях в виде пятен различной интенсивности в течение 48 ч п/ин. Распределение H₂O₂ значительно колебалось, что может быть связано с неравномерным нанесением препарата в ходе опрыскивания. При этом сильно окрашивались замыкающие клетки устьиц, а также мезофилльные клетки под устьицами и между проводящими пучками (см. рис. 1, *н*). Через 96–144 ч п/ин H₂O₂ постепенно исчезал из тканей, но в небольшом количестве оставался в замыкающих клетках устьиц и небольших зонах под ними (см. рис. 1, *о, с, ф*).

В обработанных Новохизолом инфицированных растениях содержание пероксида водорода в тканях в течение 96 ч п/ин было аналогично вышеописанному. Между локусами накопления H₂O₂ проникновение гриба в устьица происходило без отклонений, на поверхности устьиц

оставались пустые оболочки аппрессориев (см. рис. 1, *п*). В зонах с высоким содержанием АФК цитоплазма мертвых клеток растений проявляла белое свечение, поврежденных – голубое. Отмершие гифы патогена имели белую автофлуоресценцию, а неповрежденные – синюю (см. рис. 1, *р*). В локусах накопления АФК колонии погибали (абортировали) на ранних этапах развития. В зонах отмерших колоний через 96 ч п/ин накапливались фенолы в цитоплазме и лигнин на клеточных стенках с зеленой и менее выраженной красной автофлуоресценцией. Накопление зеленых и красных лигнинов усиливалось также в соседних участках проводящих пучков. При этом в зоне устьиц с повышенным содержанием H₂O₂ фенолы не накапливались (см. рис. 1, *т, у*).

Около активно развивающихся колоний значительной генерации H₂O₂ через 144 ч п/ин не обнаружено, также снизилось содержание пероксида водорода в зонах устьиц (см. рис. 1, *ф*). Фенолы с более выраженной зеленой и менее яркой красной автофлуоресценцией накрывали весь мицелий (см. рис. 1, *х, ц*). Через 240 ч п/ин в зоне крупных колоний и пустул отмечено интенсивное накопление H₂O₂ (см. рис. 1, *ч*). Вокруг таких колоний выявлено интенсивное накопление фенолов в более широкой зоне, чем H₂O₂. Фенолы и лигнин с зеленой автофлуоресценцией синтезировались интенсивнее и распространялись на большей площади, чем с красным свечением (см. рис. 1, *ш, иц*).

Изучение результатов развития *Pgt* показало, что в обработанных Новохизолом растениях средние площади колоний и пустул уменьшились по сравнению с необработанными в 1.5 и 2.2 раза соответственно (рис. 2, *а*). Влияние препарата привело к достоверному изменению соотношения колоний и пустул с разными размерами, по сравнению с необработанными растениями. При этом резко увеличилась доля мелких колоний и пустул, а часть колоний (22 %) погибла до спороношения (см. рис. 2, *б, в*).

Обсуждение

Биологические свойства препаратов, созданных на основе хитина и хитозана, начали исследовать с 1980-х годов. За это время были проведены многочисленные испытания влияния хитозановых препаратов на развитие патогенов (грибов, бактерий, вирусов) и проявления болезней. Фунгицидное действие хитозанов преимущественно изучено на патогенах с некротрофным или гемибiotрофным типом питания, включая наиболее вредоносные виды родов *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* и др. (Chakraborty et al., 2020; Zheng et al., 2021; Щербань, 2023). Культивация этих грибов возможна на искусственных средах, что позволяет оценить влияние препаратов *in vitro*. На различных видах грибов

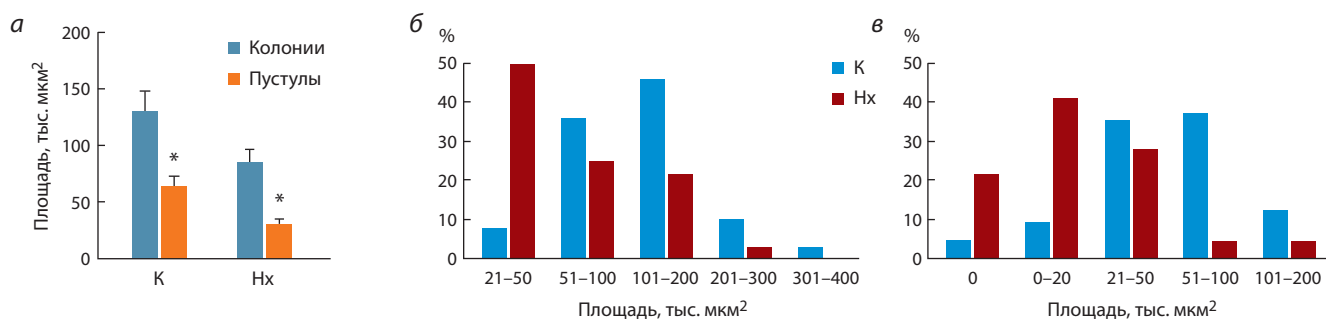


Рис. 2. Влияние Новохизоля на развитие колоний и пустул *P. graminis* f. sp. *tritici*.

а – средняя площадь; *б* – распределение колоний по площади; *в* – распределение пустул по площади. К – контроль; Нх – Новохизолем. * Достоверно при $p \leq 0.05$.

установлено, что фунгицидное действие хитозановых препаратов проявлялось в подавлении прорастания спор, ингибировании развития ростковых трубок, нарушении клеточных стенок и мембран, образовании непроницаемой пленки вокруг грибов (Ghaouth et al., 1994; Abd El-Kareem, Haggag, 2014). Подавление роста также могло быть связано с хелатированием ионов кальция и меди и отложением комплексов на поверхности клеток патогена, что снижало метаболическую активность грибов (Chakraborty et al., 2020). У живых растений влияние хитозанов реализуется после узнавания рецепторами и активации сигнальных систем растений (Яруллина и др., 2023).

Механизмы действия Новохизоля на развитие стеблевой ржавчины пшеницы изучены нами впервые. Установлен эффект концентрации Новохизоля на развитие стеблевой ржавчины пшеницы. Это подтверждает результаты ранее проведенных исследований о влиянии доз препаратов на защитные реакции (Orzali et al., 2017; Варламов и др., 2020). В варианте с 0.75 % Новохизолом отмечен наибольший ингибирующий эффект на развитие *Pgt*, хотя значительная площадь листьев проявляла признаки хлороза. В наших экспериментах, в отличие от вышеприведенных данных (Ghaouth et al., 1994; Abd El-Kareem, Haggag, 2014), Новохизолем не оказывал отрицательного действия на прорастание урединиоспор, развитие ростковых трубок и аппрессориев, а также проникновение в устьица.

В варианте с обработкой 0.125 % Новохизолом установлено более интенсивное подавление образования пустул. Действие препарата в концентрации 0.125 % будет изучено на следующих этапах исследований.

В 2000-х годах была сформулирована гипотеза двухуровневой организации иммунитета растений, получившая название РТИ-ЕТИ (Gill et al., 2015). Предполагалось, что у растений существуют рецепторы PRR (pattern recognition receptor), распознающие молекулы непатогенных (MAMP, microbe-associated molecular pattern) и неспециализированных патогенных микроорганизмов (PAMP, pathogen-associated molecular pattern), а также продукты разрушения клеток растений (DAMP, damage-associated molecular pattern). В результате узнавания этих молекул запускается первый уровень защиты РТИ (PAMP-triggered immunity). После преодоления РТИ активируется второй уровень защиты, связанный с узнаванием специфических эффекторов – ЕТИ (effector-triggered immunity). Действие

РТИ соответствует ответу видов-нехозяев, а ЕТИ – сортовой устойчивости и обычно сопровождается реакцией СВЧ (Gill et al., 2015). Позже была предложена усовершенствованная модель иммунитета, согласно которой ЕТИ является модулем амплификации реакций, зависящей от РТИ, а не изолированной системой (Yuan M. et al., 2021; Zhao et al., 2022).

В устойчивых растениях выявлено два пика образования АФК. Первый пик возникает через несколько минут после узнавания элиситоров и связан с активацией конститутивно существующего в мембране фермента НАДФ-Н-оксидазы и образованием $O_2^{\cdot-}$, который с помощью фермента СОД быстро превращается в H_2O_2 (Boller, Keen, 2000). Второй пик проявляется через 3–5 сут и связан с *de novo* синтезом ферментов про/антиоксидантной системы (пероксидаз, оксалаксоксидаз). Про/антиоксидантная система поддерживает оптимальный уровень АФК в тканях. Каталаза расщепляет H_2O_2 до воды, а различные пероксидазы, полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза утилизируют АФК в окислительных реакциях (Максимов, Черепанова, 2006).

Ранее при взаимодействии ржавчинных грибов *P. tritici* и *P. coronata* с видами-нехозяевами (овсом и пшеницей соответственно) выявлена генерация $O_2^{\cdot-}$ замыкающими клетками устьиц после контакта с аппрессориями, что приводило к гибели патогенов (Плотникова, 2008). *Pgt* погибал на поверхности растений до внедрения в устьица видов-нехозяев *Secale cereale* и *Thinopyrum ponticum*, а при взаимодействии с сортами, несущими гены устойчивости этих видов (*Sr31*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*), аппрессории отмирали после образования супероксид-аниона замыкающими клетками устьиц пшеницы (Plotnikova et al., 2022, 2023). На примере риса, обработанного хитозаном, был показан НАДФ-Н-зависимый синтез $O_2^{\cdot-}$ (Lopez-Moya et al., 2021). Усиление синтеза ферментов, участвующих в образовании АФК, установлено и в растениях проса, обработанных хитозаном и инфицированных *Alternaria kikuchiana* (Meng et al., 2010). Применение хитозана на ячмене индуцировало окислительный взрыв и синтез фенольных соединений, что повышало устойчивость к комплексу грибных болезней (Faoro et al., 2008).

Новохизолем по своему происхождению соответствует МАР. Гистохимическое изучение материала было начато через четверо суток после обработки препаратом,

при этом установлено интенсивное накопление H_2O_2 в листьях. Очевидно, это связано с проявлением второго пика окислительного взрыва и подтверждает элиситорную активность Новохизоля. Зоны с высоким содержанием H_2O_2 обнаружены как в районах устьиц, так и между проводящими пучками. Такие результаты могут быть связаны с повышенной способностью Новохизоля проникать через покровные ткани листьев и индуцировать образование АФК. Это объясняет появление больших зон хлороза на листьях. Через 96–144 ч п/ин содержание H_2O_2 в тканях уменьшалось. К концу эксперимента снизилось травматическое накопление АФК на срезах листьев во всех вариантах опыта. Такая динамика АФК может быть связана с синтезом ферментов и неферментативных компонентов антиоксидантной системы, утилизирующих АФК. Активизация антиоксидантных ферментов вслед за накоплением АФК показана на примере картофеля, обработанного конъюгатом хитина с феруловой кислотой в комплексе с полезными бактериями *Bacillus subtilis* (Yarullina et al., 2024a). Не исключено также, что антиоксидантная активность повышалась с возрастом растений.

В инфицированных растениях без обработки Новохизолем защитные реакции до стадии спорогенеза не проявлялись. После обработки Новохизолем отмечено отмирание небольшого числа клеток растений и фрагментов мицелия в зонах усиленного накопления H_2O_2 . Однако погибшие клетки растений не имели желтого свечения, характерного для реакции СВЧ (Vander et al., 1998). Это свидетельствует о том, что Новохизоль индуцирует реакции, частично отличающиеся от происходящих в устойчивых сортах пшеницы.

Часть колоний погибала на ранних этапах патогенеза. При этом в их зонах уже через 96 ч п/ин не обнаружен H_2O_2 , но происходило накопление фенолов с зеленым и красным свечением в цитоплазме, а также лигнина с зеленой автофлуоресценцией на клеточных стенках. В зоне средних и крупных развивающихся колоний тоже не установлено накопления АФК до спорогенеза и даже отмечено снижение H_2O_2 вблизи колоний. Уменьшение содержания H_2O_2 может быть объяснено как накоплением антиоксидантных ферментов растений, так и деятельностью патогена. В настоящее время известно, что биотрофные ржавчинные грибы секретируют сотни эффекторов в цитоплазму и апопласт. С помощью эффекторов патогены подавляют защитные реакции, а также изменяют или репрограммируют метаболизм хозяина. На примере вирулентного изолята возбудителя желтой ржавчины пшеницы *P. striiformis* f. sp. *tritici* показано, что выделение эффектора в форме каталазы, разлагающей H_2O_2 , приводило к подавлению устойчивости растений (Yuan P. et al., 2021). В то же время обработка Новохизолем стимулировала усиленное накопление H_2O_2 в зоне колоний на стадии спорогенеза.

На основании ранее проведенных исследований было установлено, что образование фенолов и укрепление клеточных стенок с помощью лигнина после обработки хитозанами – наиболее типичные защитные реакции против некротрофных и гембиотрофных грибов (Orzali et al., 2017; Щербань, 2023). В наших экспериментах обработка

Новохизолем стимулировала более раннее и интенсивное накопление фенолов, чем в необработанных растениях. Впервые показано, что влияние препарата изменяло соотношение фенолов с разными спектральными характеристиками в сторону соединений с зеленым свечением, тогда как в необработанных растениях преобладали фенолы с красным свечением. Ранее было определено, что лигнины с зеленой автофлуоресценцией проявляли специфическую реакцию на остатки сиригина и накапливались в тканях пшеницы после обработки индуктором системной приобретенной устойчивости Бионорм (Плотникова, 2009). Вероятно также накопление в тканях PR-белков, не определяемых с помощью цитологических методов. После применения хитозанов у растений, инфицированных некротрофными грибами, усиливалась экспрессия генов, кодирующих PR-белки (хитиназы, глюканазы, пероксидазы, полифенолоксидазы, PR-1, PR-5 и др.) (Manjunatha et al., 2008, 2009; Nandeeshkumar et al., 2008; Orzali et al., 2014). Накопление в тканях PR-белков с различными функциями выявлено и на примере картофеля, обработанного конъюгатами хитозана с феруловой и кофейной кислотами (Yarullina et al., 2024a, b). Комплексное действие индуцированных Новохизолем защитных механизмов приводило к гибели значительной части колоний на ранних этапах развития, а также к значительному сокращению плотности пустул патогена и подавлению его размножения.

Проведенные исследования были первым этапом изучения действия Новохизоля на защитные механизмы пшеницы против стеблевой ржавчины. В дальнейшем будет детально исследовано влияние препарата на патогенез с применением молекулярно-генетических, биохимических и цитофизиологических методов.

Выводы

Исследования показали, что Новохизоль может быть использован в качестве индуктора устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы. Выявлен дозовый эффект обработки, при этом лучшие результаты были получены с концентрацией препарата 0.125 и 0.75 %.

Обработка листьев Новохизолем в концентрации 0.75 % не влияла на прорастание урединиоспор и развитие структур гриба на поверхности растений, но приводила к значительному сокращению числа развившихся колоний, а также размеров мицелия и пустул.

Через 4–8 сут после обработки препаратом (соответствует 0–4 сут после инокуляции) выявлено интенсивное накопление пероксида водорода в тканях инфицированных и незараженных растений, которое снижалось к концу эксперимента.

В зонах интенсивного накопления H_2O_2 отмечено частичное отмирание клеток растений и мицелия патогена. При этом клетки растения не проявляли характерного для реакции СВЧ свечения.

Новохизоль стимулировал более раннее и интенсивное накопление фенолов в зоне колоний и пустул и изменение соотношения фенольных соединений с разными спектральными характеристиками в сторону соединений с повышенным содержанием остатков сиригина (зеленая автофлуоресценция).

Список литературы / References

- Баданова Е.Г., Давлетбаев И.М., Сироткин А.С. Препараты на основе хитозана для сельского хозяйства. *Вестник технологического университета*. 2016;19(16):89-95 [Badanova E.G., Davletbaev I.M., Sirotkin A.S. Preparations based on chitosan for agriculture. *Vestnik Tekhnologicheskogo Universiteta = Herald of Technological University*. 2016;19(16):89-95 (in Russian)]
- Бурлакова С.В., Егорычева М.Т., Фоменко В.В., Салахутдинов Н.Ф., Щербань А.Б. Биологическое обоснование применения Новохизоля с природными фунгицидами при возделывании мягкой пшеницы. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2025;3:303-314 [Burlakova S.V., Egorycheva M.T., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F., Shcherban A.B. Biological justification of the use of Novo-hisol with natural fungicides in the cultivation of bread wheat. *Chemistry for Sustainable Development*. 2025;3:303-314 (in Russian)]
- Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*. 2020;60:317-368 [Varlamov V.P., Ilyina A.V., Shagdarova B.T., Lunkov A.P., Mysyakina I.S. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches. *Biochemistry*. 2020;85:154-176. doi 10.1134/S0006297920140084]
- Джапаридзе Л.И. Практикум по микроскопической химии растений. М.: Сов. наука, 1953 [Japaridze L.I. Practicum on Microscopic Chemistry of Plants. Moscow: Sovetskaya Nauka Publ., 1953 (in Russian)]
- Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про-/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам. *Успехи современной биологии*. 2006;126(3):250-261 [Maksimov I.V., Cherepanova E.A. Pro-/antioxidant system and resistance of plants to pathogens. *Uspehi Sovremennoy Biologii = Advances in Current Biology*. 2006;126(3):250-261 (in Russian)]
- Плотникова Л.Я. Влияние свойств поверхности и физиологических реакций растений-нехозяев на развитие клеточных структур ржавчинных грибов. *Цитология*. 2008;50(5):439-446 [Plotnikova L.Ya. Influence of the surface features and physiological reactions of non-host species on the development of cellular structures of rust fungi. *Tsitologiya*. 2008;50(5):439-446 (in Russian)]
- Плотникова Л.Я. Влияние индуктора системной устойчивости бензотиадиазола на патогенез бурой ржавчины пшеницы. *Физиология растений*. 2009;56(4):571-580 [Plotnikova L.Ya. Effect of benzothiadiazole, an inducer of systemic acquired resistance, on the pathogenesis of wheat brown rust. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2009;56(4):517-526. doi 10.1134/S1021443709040116]
- Плотникова Л.Я., Кнауб В.В. Использование генетического потенциала родов *Thinopyrum* и *Agropyron* для защиты пшеницы от болезней и абиотических стрессов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):536-553. doi 10.18699/vjgb-24-60 [Plotnikova L., Knaub V. Exploitation of the genetic potential of *Thinopyrum* and *Agropyron* genera to protect wheat from diseases and environmental stresses. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(5):536-553. doi 10.18699/vjgb-24-60]
- Плотникова Л.Я., Мешкова Л.В. Эволюция цитофизиологических взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы при преодолении устойчивости, детерминированной геном *Lr19*. *Микология и фитопатология*. 2009;43(4):343-357 [Plotnikova L.Y., Meshkova L.V. Evolution of cytophysiological relationships between leaf rust causal agent and common wheat in the process of overcoming of resistance determined by the gene *Lr19*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2009;43(4):343-357 (in Russian)]
- Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Сокорнова С.В., Тюттерев С.Л. Влияние гибридных производных хитозана на устойчивость пшеницы к патогенам с разной стратегией питания. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018;54(5):540-545. doi 10.1134/S055510991805015X [Popova E.V., Domnina N.S., Kovalenko N.M., Sokornova S.V., Tyuterev S.L. Influence of chitosan hybrid derivatives on induced wheat resistance to pathogens with different nutrition strategies. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(5):535-539. doi 10.1134/S0003683818050150]
- Рсалиев А.С., Рсалиев Ш.С. Основные подходы и достижения в изучении расового состава стеблевой ржавчины пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(8):967-977. doi 10.18699/VJ18.439 [Rsaliyev A.S., Rsaliyev Sh.S. Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2018;22(8):967-977. doi 10.18699/VJ18.439 (in Russian)]
- Тарчевский И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие. *Физиология растений*. 2000;47(2):321-331 [Tarchevsky I.A. Elicitor-induced signaling pathways and their interaction. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000;47(2):285-294]
- Тюттерев С.Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам. *Вестник защиты растений*. 2015;1(83):3-13. [Tyuterev S.L. Ecologically safe inducers of plant resistance to diseases and physiological stresses. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2015;1(83):3-13 (in Russian)]
- Штерншис М.В., Беляев А.А., Цветкова В.П., Шпатова Т.В., Ле-ляк А.А., Бахвалов С.А. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2016. [Sternshis M.V., Belyaev A.A., Tsvetkova V.P., Shpatova T.V., Lelyak A.A., Bakhvalov S.A. Biopreparations Based on Bacteria of the Genus *Bacillus* for Plant Health Management. Novosibirsk: Publishing House of SB RAS, 2016 (in Russian)]
- Щербань А.Б. Хитозан и его производные как перспективные средства защиты растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):1010-1021. doi 10.18699/VJGB-23-116 [Shcherban A.B. Chitosan and its derivatives as promising plant protection tools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(8):1010-1021. doi 10.18699/VJGB-23-116]
- Яруллина Л.Г., Калацкая Ж.Н., Черепанова Е.А., Еловская Н.А., Цветков В.О., Овчинников И.А., Бурханова Г.Ф., Рыбинская Е.И., Сорокань А.В., Герасимович К.М., Заикина Е.А., Николайчук В.В., Гилевская К.С., Марданшин И.С. Перспективы повышения биологической активности биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* и нанокмпозитов хитозана (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023;59(5):427-439. doi 10.31857/S0555109923050185 [Yarullina L.G., Kalatskaja J.N., Cherepanova E.A., Yalouskaya N.A., Tsvetkov V.O., Ovchinnikov I.A., Burkhanova G.F., Rybinskaya K.I., Sorokan A.V., Herasimovich K.M., Zaikina E.A., Nikolaichuk V.V., Hileuskaya K.S., Mardanshin I.S. Approaches to improving biological activity of agricultural formulations based on bacteria of the genus *Bacillus* and chitosan nanocomposites (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2023;59(5):549-560. doi 10.1134/s0003683823050186]
- Abd El-Kareem F., Haggag W. Chitosan and citral alone or in combination for controlling early blight disease of potato plants under field conditions. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2014;5(6):941-949. [https://rjpbcs.com/pdf/2014_5\(6\)/%5B141%5D.pdf](https://rjpbcs.com/pdf/2014_5(6)/%5B141%5D.pdf)
- Bellameche F., Jasim M., Mauch-Mani B., Mascher F. Histopathological aspects of resistance in wheat to *Puccinia triticina*, induced by *Pseudomonas protegens* CHA0 and β -aminobutyric acid. *Phytopathol Mediterr*. 2021;60(3):441-453. doi 10.36253/phyto-13123
- Boller T., Keen N.T. Perception and transduction of elicitor signals in host-pathogen interactions. In: Slusarenko A.J., Fraser R.S.S., van Loon L.C. (Eds) Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Dordrecht: Springer, 2000;189-230. doi 10.1007/978-94-011-3937-3_7
- Chakraborty M., Hasanuzzaman M., Rahman M., Khan Md.A.R., Bhowmik P., Mahmud N.U., Tanveer M., Islam T. Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. *Agriculture*. 2020;10:624. doi 10.3390/agriculture10120624

- Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J., Grant W.P. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366:1987-1998. doi 10.1098/rstb.2010.0390
- Elsharkawy M.M., Omara R.I., Mostafa Y.S., Alamri S.A., Hashem M., Alrumman S.A., Ahmad A.A. Mechanism of wheat leaf rust control using chitosan nanoparticles and salicylic acid. *J Fungi*. 2022; 8(3):304. doi 10.3390/jof8030304
- Faoro F., Maffi D., Cantu D., Iriti M. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzo-thiadiazole. *BioControl*. 2008;53(2):387-401. doi 10.1007/s10526-007-9091-3
- Ghautho A., Arul J., Grenier J., Benhamou N., Asselin A., Belanger G. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reaction. *Phytopathology*. 1994;84(3):313-320. doi 10.1094/PHTO-84-31
- Gill U.S., Lee S., Mysore K.S. Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals. *Phytopathology*. 2015;105(5):580-587. doi 10.1094/PHTO-11-14-0298-RVW
- Haggag W.M.W., Hussein M.M., Medhat M.T., El Habbasha S.F. Enhancement of wheat resistant to diseases by elicitors. *Int J Sci Res*. 2014;3(11):1526-1530
- Lopez-Moya F., Martin-Urdiroz M., Osés-Ruiz M., Were V.M., Fricker M.D., Littlejohn G.R., Lopez-Llorca L.V., Talbot N.J. Chitosan inhibits septin-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in a protein kinase C and Nox1 NADPH oxidase-dependent manner. *New Phytol*. 2021;230(4):1578-1593. doi 10.1111/nph.17268
- Malerba M., Cerana R. Chitosan effects on plant systems. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):996. doi 10.3390/ijms17070996
- Manjunatha G., Roopa K.S., Prashanth G.N., Shetty H.S. Chitosan enhances disease resistance in pearl millet against downy mildew caused by *Sclerospora graminicola* and defence-related enzyme activation. *Pest Manag Sci*. 2008;64:1250-1257. doi 10.1002/ps.1626
- Manjunatha G., Niranjana-Raj S., Prashanth G.N., Deepak S., Amruthesh K.N., Shetty H.S. Nitric oxide is involved in chitosan-induced systemic resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Pest Manag Sci*. 2009;65(7):737-743. doi 10.1002/ps.1710
- Meng X., Yang L., Kennedy J.F., Tian S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydr Polym*. 2010;81(1):70-75. doi 10.1016/j.carbpol.2010.01.057
- Moldenhauer J., Moerschbacher B.M., van der Westhuizen A.J. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) development in resistant and susceptible wheat cultivars. *Plant Pathology*. 2006;55:469-474. doi 10.1111/j.1365-3059.2006.01385.x
- Nandeeshkumar P., Sudisha J., Ramachandra K.K., Prakash H., Niranjana S., Shekar S.H. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2008;72(4-6):188-194. doi 10.1016/j.pmp.2008.09.001
- Orzali L., Forni C., Riccioni L. Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Seed Sci Technol*. 2014;42(2):132-149. doi 10.15258/sst.2014.42.2.03
- Orzali L., Corsi B., Forni C., Riccioni L. Chitosan in agriculture: a new challenge for managing plant disease. In: Shalaby E.A. (Ed.) Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides. *InTech*. 2017;87-96. doi 10.5772/66840
- Plotnikova L., Pozherukova V., Knaub V., Kashuba Y. What was the reason for the durable effect of *Sr31* against wheat stem rust? *Agriculture*. 2022;12:2116. doi 10.3390/agriculture12122116
- Plotnikova L., Knaub V., Pozherukova V. Nonhost resistance of *Thinopyrum ponticum* to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and the effects of the *Sr24*, *Sr25*, and *Sr26* genes introgressed to wheat. *Int J Plant Biol*. 2023;14:435-457. doi 10.3390/ijpb14020034
- Rabea E.I., Badawy M.E., Rogge T.M., Stevens C.V., Höfte M., Steurbaut W., Smagghe G. Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Manag Sci*. 2005;61(10):951-960. doi 10.1002/ps.1085
- Richter T., Gulich M., Richter K. Quality control and good manufacturing practice (GMP) for chitosan-based biopharmaceutical products. In: Sarmiento B., das Neves J. (Eds) Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. John Wiley & Sons, 2012;503-542. doi 10.1002/9781119962977.ch26
- Rkhaila A., Chtouki T., Erguig H., El Haloui N., Ounine K. Chemical proprieties of biopolymers (chitin/chitosan) and their synergic effects with endophytic bacillus species: unlimited applications in agriculture. *Molecules*. 2021;26(4):1117. doi 10.3390/molecules26041117
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Cimmyt, Mexico DF, Mexico, 1992.
- Singh Y., Nair A.M., Verma P.K. Surviving the odds: from perception to survival of fungal phytopathogens under host-generated oxidative burst. *Plant Commun*. 2021;2:100142. doi 10.1016/j.xplc.2021.100142
- Sørensen C.K., Thach T., Hovmøller M.S. Evaluation of spray and point inoculation methods for the phenotyping of *Puccinia striiformis* on wheat. *Plant Disease*. 2016;100(6):1064-1070. doi 10.1094/PDIS-12-15-1477-RE
- Tepliyakova O.I., Fomenko V.V., Salakhutdinov N.F., Vlasenko N.G. Novochizol™ seed treatment: effects on germination, growth and development in soft spring wheat. *Nat Prod Chem Res*. 2022;10(5): 1-4. doi 10.35248/naturalproducts.10.5.1-04
- USDA. World Agricultural Production; USDA Foreign Agricultural Service. Washington, DC, USA, 2016.
- Vander P., Vårum K.M., Domard A., El Gueddari N.E., Moerschbacher B.M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol*. 1998;118(4):1353-1359. doi 10.1104/pp.118.4.1353
- Woldeab G., Hailu E., Bacha N. Protocols for race analysis of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). Ambo, Ethiopia: EIAR, 2017.
- Yarullina L.G., Burkhanova G.F., Tsvetkov V.O., Cherepanova E.A., Sorokan A.V., Zaikina E.A., Mardanshin I.S., Fatkullin I.Y., Maksimov I.V., Kalatskaja J.N., Yaloukaya N.A., Rybinskay E.I. The effect of chitosan conjugates with hydroxycinnamic acids and *Bacillus subtilis* bacteria on the activity of protective proteins and resistance of potato plants to *Phytophthora infestans*. *Appl Biochem Microbiol*. 2024a;60(2):231-240. doi 10.1134/S0003683824020194
- Yarullina L., Kalatskaja J., Tsvetkov V., Burkhanova G., Yaloukaya N., Rybinskaya K., Zaikina E., Cherepanova E., Hileuskaya K., Nikalaichuk V. The influence of chitosan derivatives in combination with *Bacillus subtilis* bacteria on the development of systemic resistance in potato plants with viral infection and drought. *Plants*. 2024b;13: 2210. doi 10.3390/plants13162210
- Yuan M., Pok B., Ngou M., Ding P., Xin X.-F. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*. 2021;62: 102030. doi 10.1016/j.pbi.2021.102030
- Yuan P., Qian W., Jiang L., Jia C., Ma X., Kang Z., Liu J. A secreted catalase contributes to *Puccinia striiformis* resistance to host-derived oxidative stress. *Stress Biol*. 2021;1(1):22. doi 10.1007/s44154-021-00021-2
- Zhao Y., Zhu X., Chen X., Zhou J. From plant immunity to crop disease resistance. *J Genet Genom*. 2022;49(8):693-703. doi 10.1016/j.jgg.2022.06.003
- Zheng K., Lu J., Li J., Yu Y., Zhang J., He Z., Ismail O.M., Wu J., Xie X., Li X., Xu G., Dou D., Wang X. Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defence mechanisms in potato. *Int J Biol Macromol*. 2021;182:1670-1680. doi 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.097