

УДК [632.4+58.036]:633.16+547.587.11

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ PR-БЕЛКОВ (β -1,3-ГЛЮКАНАЗЫ, ХИТИНАЗЫ) И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЗАЩИТНОГО ОТВЕТА В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ ПРИ ГЕЛЬМИНТОСПОРИОЗЕ

© 2020 г. Л. В. Пашкевич, Т. Г. Курьянчик,
Л. Ф. Кабашникова

Институт биофизики и клеточной инженерии

Национальной академии наук Беларуси

(Минск, Беларусь)

Изучено влияние кратковременной гипертермии (40°C, 3 ч) и экзогенной салициловой кислоты (СК, 10^{-4} М) на экспрессию генов двух гидролаз: β -1,3-глюканазы (КФ 3.2.1.39) и хитиназы (КФ 3.2.1.14), относящихся к белкам защитного ответа, в инфицированных гембиотрофным грибом *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Schoem. проростках ярового ячменя. Обнаружено, что ответ растений ячменя на два вида воздействия проявлялся в увеличении экспрессии генов β -1,3-глюканазы и хитиназы через 72 ч после инокуляции патогеном и превышал показатели их транскрипционной активности в инфицированных растениях без обработок. В этих условиях наблюдалось также повышение активности других компонентов защитного ответа растений при патогенезе – мембранной НАДФН-оксидазы (Rboh, КФ 1.6.3.1) и *L*-фенилаланинаммонийлиазы (ФАЛ, КФ 4.1.3.5). Таким образом, воздействие высокой температуры, как и экзогенный салицилат, могут рассматриваться в качестве индукторов защитного механизма, повышающего устойчивость растений к грибному инфицированию путем активации экспрессии генов β -1,3-глюканазы и хитиназы и повышения активности защитных белков (НАДФН-оксидазы и ФАЛ).

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, *Bipolaris sorokiniana*, салициловая кислота, гипертермия, β -1,3-глюканаза, хитиназа, *L*-фенилаланинаммонийлиаза, НАДФН-оксидаза, активные формы кислорода

DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2021.01.067>

В процессе эволюции у растений развивались различные механизмы для контратак патогенов, в том числе несколько уровней конститутивной и индуцируемой защиты (Jones, Dangl, 2006). Для передачи сигналов у растений выработались иммунные рецепторы, которые активируют эффективные защитные реакции при обнаружении молекул патогенов. Иммунный ответ у растений запускается при обнаружении молекулярных паттернов на мембране, связанных с патогенами (MAMPs, PAMPs) или

повреждениями (DAMPs), которые приводят к иммунитету, запускаемому паттерном (PTI), а при проникновении патогена внутрь клетки иммунитет запускается эффектором (ETI) (Win et al., 2012). Распознавание PAMP и эффектора запускает локальные сигнальные события в растительной клетке, включая потоки ионов, генерацию активных форм кислорода (АФК) и индукцию протеинкиназ, что приводит к синтезу фитогормонов, фитоалексинов, фенольных соединений и белков, связанных с патогенезом (PR) (van Loon et al., 2006), и в конечном итоге – к гиперчувствительной реакции (тип запрограммированной гибели клеток), которая происходит в месте вторжения патогена (Coll et al., 2011).

Адрес для корреспонденции: Пашкевич Любовь Валерьевна, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь;
e-mail: ljubi.k87@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Салициловая кислота (СК) и жасмонат (ЖК) признаны наиболее важными гормонами для иммунных ответов растений, при этом биосинтез и передача сигналов СК и ЖК исторически связаны с защитой от биотрофных или некротрофных патогенов, соответственно (Glazebrook, 2005; Shigenaga et al., 2017). У растений СК является сигнальной молекулой, регулирующей реакции устойчивости к заболеваниям (Klessig et al., 2018). Фенилаланинаммонийлиаза (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) – ключевой фермент в синтезе фенилпропаноидных соединений в растительной клетке, активность которого коррелирует с накоплением фенольных соединений, и в частности, с уровнем сигнального посредника – эндогенной СК (Campos-Vargas R. et al., 2005). Накопление СК и скоординированная с этим процессом активация PR-генов необходимы для формирования системной приобретенной устойчивости (СПУ) в растительных тканях, удаленных от места первичной инфекции (Dong, 2004; Liu et al. 2016).

СПУ – это защитный механизм, который индуцируется в растениях большинством патогенов, вызывающих некроз тканей (Kumar, 2014; Klessig et al., 2018). Он обеспечивает защиту неинфицированных частей растения от широкого спектра патогенов и обусловлен активностью белков, связанных с патогенезом (PR-белки), таких как хитиназа и глюканаза, обладающих антимикробной активностью (Dempsey, Klessig, 2017). В настоящее время общепризнано, что экспрессия PR-генов служит удобным маркером для мониторинга СПУ (Gao, 2015).

PR-белки были впервые выделены из экстрактов листьев табака, инфицированных вирусом табачной мозаики (TMV) (van Loon, van Kammen, 1970). В 1980 году (Antoniw et al., 1980) был введен термин «pathogenesis-related proteins» (белки, связанные с патогенезом, или PR-белки), которые были определены как «белки, кодируемые растением-хозяином, но индуцируемые только в патологических или сходных с ними ситуациях», причем последние подразумевают ситуации непатогенного происхождения. Это белки с низкой молекулярной массой (6-43 кДа), селективно экстрагируемые, стабильные при низком pH и термостабильные (Van Loon, 1999). PR-белки участвуют в активной защите, потенциально ограничивая развитие патогенных микроорганизмов и их распространение (Voccardo et al., 2019). Транскрипты, соответствующие PR-белкам, накапливаются в течение нескольких минут или часов после ин-

дукции РТ1 и ЕТ1, экспрессия большинства из них регулируется СК (Klessig et al., 2018). Следовательно, PR-белки включают группу индуцибельных и функционально разнообразных белков, которые продуцируются в ответ на атаку патогена. Однако, помимо инфекционных процессов, PR-белки также индуцируются применением физиологически активных соединений, таких как этилен, ЖК и СК, которые имитируют эффект патогенной инфекции или вызывают аналогичные стрессовые состояния (Sels, 2008).

К настоящему времени описано 17 семейств PR белков (от PR-1 до PR-17) у многих видов растений (Voccardo et al., 2019). Большинство семейств PR-белков включают протеины, активность которых согласуется с ролью в защите растений от грибных и/или оомицетных патогенов: β -1,3-эндоглюканазы (PR-2), эндохитиназы (PR-3, 4, 8 и 11), тауматиноподобные белки (PR-5), дефензины (PR-12), тионины (PR-13) и белки-переносчики липидов (PR-14) (Jain, Khurana, 2018). Что касается их роли в защитном ответе, то PR-белки могут непосредственно влиять на целостность патогенов и/или генерировать сигнальные молекулы за счет своей ферментативной активности, которые действуют как элиситоры, чтобы индуцировать другие пути, связанные с защитой растений (Jain, Khurana, 2018).

Двумя хорошо известными примерами PR-белков являются β -1,3-глюканаза (EC 3.2.1.39) и хитиназа (EC 3.2.1.14). β -1,3-глюканаза, известная как ламинариназа, повышает устойчивость растений к грибным патогенам (Kirubakaran, Sakthivel, 2007). Эти эндоглюканазы катализируют гидролитическое расщепление (1,3)- β -D-глюкозидных связей в (1,3)- β -глюканах и действуют в первую очередь на глюканы, присутствующие в клеточной стенке грибов. Функции β -1,3-глюканаз связаны не только с их антимикробной активностью, но и с участием в репродуктивных процессах у растений. Так, β -1,3-глюканазы локализируются в различных органах на разных стадиях развития и репродукции растений, а именно, при микроспорогенезе, прорастании пыльцы, росте пыльцевой трубки, развитии плодов и созревании, развитии семян и прорастании, соматическом эмбриогенезе (Shi, 2006). Эта группа белков также экспрессируется в растениях, чтобы противостоять ряду абиотических стрессоров (Balasubramanian et al., 2012).

Хитиназы, принадлежащие к PR-3 группе защитных белков, катализируют гидролиз β -

1,4-связей полимера N-ацетилглюкозамина, называемого хитином, который является основным компонентом клеточных стенок многих грибов (Kasprzewska, 2003). В отличие от глюканаз, которые помимо антипатогенного эффекта обладают рядом других жизненно необходимых функций, хитиназы участвуют в основном в разрушении клеточной стенки грибов, демонстрируя высокую антифунгальную активность в отношении большого числа патогенов (González-Teuber, et al., 2010; Gupta et al., 2013). Экспрессия генов, кодирующих хитиназу, считается важным молекулярно-генетическим механизмом защиты растений от грибных патогенов (Li, 2019).

Альтернативным механизмом, с помощью которого оба PR-белка активируют защитные реакции в растениях, служит высвобождение β -1,3-глюкана и хитиновых олигосахаридов, которые в дальнейшем действуют как элиситоры (Shi, 2006). Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что защитные эффекты хитиназ и β -1,3-глюканаз синергически усиливаются в присутствии обоих ферментов (Gonzalez-Teuber et al., 2010).

Результаты исследований показывают, что в естественных условиях определенные стрессовые состояния, возникающие последовательно или одновременно, могут повышать устойчивость растений к другим абиотическим или биотическим стрессорам (Foyer et al., 2016; Hossain et al., 2018). Несколько общих сигнальных компонентов, в том числе АФК, растительные гормоны и чувствительные к стрессу гены, активизируются, чтобы запустить механизм перекрестной толерантности в ответ на стрессовые воздействия окружающей среды (Atkinson, Urwin, 2012; Lin et al., 2014). Петля обратной связи между передачей сигналов АФК и Ca^{2+} может генерировать самоподдерживающийся ответ на тепловой шок (ТШ) у растений. Подобно патоген-индуцированному пути развития СПУ, воздействие кратковременного ТШ повышает устойчивость растений к гипертермии и вызывает формирование системной приобретенной акклиматизации (SAA) (Suzuki et al., 2013). На основании этих и других исследований была предложена модель передачи стрессовых сигналов АФК/ Ca^{2+} в SAA-растениях (Gilroy et al., 2016). В этой модели ТШ увеличивает концентрацию цитозольного $[\text{Ca}^{2+}]$ и активирует Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют и активируют локализованные в мембране НАДФН-оксидазы (Rboh, КФ 1.6.3.1) растений. Затем активиро-

ванные Rboh генерируют АФК во внеклеточном пространстве; АФК воспринимаются соседними клетками, запуская новый раунд передачи Ca^{2+} -сигналов. В результате запуска данного механизма ответ SAA распространяется по растениям со скоростью 8,4 см/мин (Gilroy et al., 2016).

Обнаружено, что стимулами, побуждающими растения переходить в праймированное состояние, обеспечивающее повышение устойчивости при патогенезе, являются предшествующие стрессы, а также природные или синтетические химические соединения (Savvides et al., 2016). Интересно, что одним из таких праймирующих факторов является повышенная температура. Показано, что при многих взаимодействиях хозяин-патоген устойчивость растений и/или восприимчивость зависит от температуры (Kubienová et al., 2013; Lebeda et al., 2014). Тепловой стресс может изменить уровень эндогенной концентрации химических соединений, которые впоследствии влияют на устойчивость и (или) восприимчивость растений к возбудителю. В свою очередь, гормоны стресса растений и АФК также вовлечены в реакции растений на тепловой стресс (Larkindale, Huang, 2005; Kotak et al. 2007; Clarke et al., 2009). Такие соединения как абсцизовая кислота (АБК), ЖК и СК, как известно, действуют как сигналы теплового стресса (Lopez-Delgado et al., 2004). Обнаружено, что СК может поддерживать устойчивость к тепловому стрессу у растений различных видов и способствует развитию приобретенной системной акклиматизации (Larkindale et al., 2005; Wang et al., 2010) за счет усиления антиоксидантной системы и повышения уровня экспрессии белков теплового шока HSP70 и HSF (Snyman, Cronje, 2008; Khan et al., 2013). Кроме того, выявлено значительное перекрытие сигнальных путей в ответ на повышенную температуру и окислительный стресс (Reddy et al. 2009). Было обнаружено наличие причинно-следственной связи между содержанием СК, окислительным стрессом и синтезом антиоксидантов после термической обработки растений, что может играть важную роль в сопротивлении патогенам (Schweizer et al., 1995; Dat et al., 2000; Wiese et al., 2004; Cingoz, Gurel, 2016). Так, у высших растений экзогенные СК и метилжасмонат не только повышали устойчивость к тепловому стрессу, но также усиливали противовирусную активность (Calil, Fontes, 2017; Li et al., 2017; 2018a). Соответственно, гены, связанные с реакциями термотолерантности и СПУ, имеют перекрывающиеся паттерны экспрессии (Clarke et al., 2004).

Показано, что в растениях томата транскрипция генов PR-белков, связанных с салицилатом, индуцировалась нагреванием и запускалась эвгенолом в ответ на заражение вирусом желтой курчавости (TYLCV) (Wang, Fan, 2014). Праймированное состояние, индуцированное СК, включало активацию каскада митоген-активируемых киназ, активацию NPR1 и увеличение количества транскриптов PR-генов (Yi et al., 2015). Сообщалось о снижении инфекционного процесса у растений ячменя и томата и индукции резистентности после термообработки, причем наибольшая активация сигнальных путей с участием АФК и СК вызывалась именно комбинированным стрессом (Nožková et al., 2019).

Как уже отмечалось выше, устойчивость растений к болезням может быть обусловлена как конститутивными, так и другими индуцированными механизмами. Накопление PR-белков является одним из наиболее распространенных маркеров индуцированной защиты растений. Более того, известно, что воздействие некоторых химических и физических факторов может приводить к снижению повреждения, вызванного грибной инфекцией, за счет повышения уровня экспрессии PR-белков. Следовательно, понимание молекулярного механизма устойчивости к болезням, опосредованного белками, связанными с патогенезом (PR), и праймингом защитных реакций при экзогенных воздействиях, может создать научные основы для разработки новых молекулярных инструментов борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений.

Целью работы явилось изучение влияния ТШ и экзогенного салицилата на экспрессию генов хитиназы и глюканазы, а также активность ферментов защитного ответа (ФАЛ и НАДФН-оксидазы) в проростках ячменя, инфицированных гемитрофным грибом *Bipolaris sorokiniana*, вызывающим заболевание темнобурой пятнистостью (гельминтоспориоз).

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили первые листья проростков ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) белорусского сорта Магутны, выращенные при 16-часовом фотопериоде на полихроматическом белом свете ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) при температуре 22/16°C (день/ночь) на специальных сетках на слое фильтровальной бумаги, увлажненной водой.

ТШ вызывали, помещая 5-дневные растения в воздушный термостат ТС-80М-2 на 3 ч при температуре 40°C и постоянном освещении ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). В случае зараженных растений кратковременный ТШ создавали сразу после инокуляции патогеном. В опытах с экзогенной СК зеленые 4-дневные проростки ячменя за 1 сутки до инокуляции патогеном опрыскивали водным раствором гормона в концентрации 10^{-4} М. Инокуляцию зеленых проростков ячменя патогеном *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. осуществляли путем опрыскивания 5-дневных листьев споровой взвесью, содержащей 10^6 спор/мл из расчета 5 мл/на растение. Гриб *B. sorokiniana* предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение двух недель. Контрольные растения соответствующего возраста обрабатывали дистиллированной водой. Анализ проростков проводили через 72 ч после последней обработки (ТШ или инокуляции).

Экспрессию генов *PR-2* и *PR-3*, кодирующих ключевые антипатогенные белки – β -1,3-глюканазу и хитиназу, соответственно, определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), как описано в работе (Ребриков и др., 2015). Для определения уровня экспрессии защитных генов из листьев ячменя выделяли общую рибонуклеиновую кислоту (РНК) с помощью реагента TRIzolTM (AppliChem, Германия). Для этого 0,1 г растительного материала растирали в 1 мл реагента TRIzolTM, выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин и центрифугировали 10 мин при 4°C и 12000 g. Далее к супернатанту, содержащему РНК, добавляли 0,2 мл хлороформа, перемешивали и центрифугировали 15 мин при 4°C и 12000 g. Водную фазу, содержащую РНК, промывали 0,5 мл изопропанола, перемешивали и выдерживали 5-10 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 10 мин при 4°C и 12000 g. Образовавшийся осадок РНК промывали 1 мл 75% этанола, подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл DEPC-воды, выдерживали 10 мин при 55-65°C. Количество выделенной РНК определяли по поглощению при 260 нм на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США). Степень чистоты полученных образцов оценивали по соотношению A_{260}/A_{280} (данный показатель должен быть больше 1,7) (Доманская и др., 2011). Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез кДНК прово-

дили с использованием ProtoScriptII Reverse Transcriptase (BioLabs, США) в амплификаторе MJMini (Bio-Rad, США). Для этого к 1 мкл 10- \times реакционного буфера с MgCl₂ для DNase 1 добавляли 1 мкл пробы, 5,8 мкл DEPC-воды, 1 мкл DNase 1 (1 ед/мкл) и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем добавляли 1 мкл 25 мМ EDTA и инкубировали в течение 10 мин при 65°C. Далее готовили смесь, состоящую из следующих реагентов: 2 мкл RandomPrimerMix (60 мкМ), 4 мкл 5XProtoScriptII buffer, 2 мкл 0,1 М DTT, 1 мкл ProtoScriptII RT (200 ед/мкл), 1 мкл 10 мМ дНТФ, 0,2 мкл RNaseInhibitor (40 ед/мкл). Затем в каждую пробу добавляли по 10,2 мкл полученной смеси и инкубировали последовательно: 5 мин при 25°C, 60 мин при 42°C, 10 мин при 70°C и 5 мин при 10°C. Полученную кДНК хранили в морозильной камере при -20°C. Расчет и дизайн праймеров для белков хитиназы и β -1,3-глюканазы проводили самостоятельно в программе Vector NTI, используя последовательности клонированной ДНК и базу данных Nucleotide (NCBI). Для генов β -1,3-глюканазы и хитиназы были подобраны следующие олигонуклеотидные праймеры с прямой (F) и обратной (R) последовательностью: F – 5' CGCCATGTTCAACGAGAACC3' и R – 5' ACTTGTCCGGGTTGAAGAGC3' для β -1,3-глюканазы; F – 5' CCAATGGGGCTACTGCTTCA3' и R – 5' TGGGTCCCCGTCATAGTAG3' для гена хитиназы. Праймеры для гена-нормализатора 18S rRNA (F-ATGATAACTCGACGGATCGC и R-STTGGATGTGGTAGCCGTTT) были взяты из работы (Доманская и др., 2011). Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси и ООО «АртБиоТех» (Минск, Беларусь).

Реакционная смесь для ПЦР (10 мкл) содержала: 1 мкл кДНК, 10 пмоль каждого праймера, 4 мкл 2,5 \times реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии Eva Green (Синтол, Россия) и 5 мкл DEPC-воды. ПЦР-РВ проводили с использованием термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим реакционным модулем CFX96 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: предварительная денатурация при 95°C – 5 мин; плавление при 95°C – 15 с; отжиг при 55-65°C – 45 с. Количество циклов амплификации – 40. Обработку полученных результатов проводили в программе Bio-Rad CFX Maestro. Уровень экспрессии генов определяли в относительных единицах, нормируя его по экспрессии гена-нормализатора 18S rRNA.

Активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН (Pinton, 1994). Листья растений (1 г) растирали в 8 мл 50 мМ HEPES-буфера и центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин. К реакционной смеси, состоящей из 0,8 мл реакционного буфера (50 мМ HEPES-KOH (pH 7,8), 0,1 мМ ЭДТА и 1 мкМ KCN), добавляли 0,2 мл пробы и предынкубировали 1 мин при 30°C. Реакцию инициировали добавлением 110 мкМ НАДФН, скорость окисления которого регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV-2401» (Япония) по уменьшению адсорбции при 340 нм в течение 5 мин. Для расчетов использовали коэффициент экстинкции 6,22 мМ⁻¹·см⁻¹.

Активность ФАЛ определяли по образованию коричной кислоты из L-фенилаланина. Навеску замороженного в жидком азоте растительного материала (1 г) гомогенизировали на холоде в 0,1 М боратном буфере (10 мл), pH 8,8, содержащем 5 мМ ЭДТА и 3 мМ дитиотреитола с добавлением поливинилпирролидона (поликлар АТ, 25 % от веса сырой ткани). Гомогенат фильтровали и центрифугировали 20 мин при 25000 g и 4°C. Супернатант использовали для определения удельной активности фермента. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) при длине волны 290 нм. Активность ФАЛ выражали в нмоль·мг⁻¹ белка·ч⁻¹ (Олениченко и др., 2008).

Содержание белка в пробах измеряли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Все эксперименты проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Excel 2010 (Microsoft, США), ANOVA. Оценивали среднюю стандартную ошибку среднего арифметического. С помощью *t*-критерия Стьюдента определена достоверность различий между исследуемыми вариантами при уровне доверительной вероятности $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии гена, кодирующего антипатогенный белок β -1,3-глюканазу, показал наличие ампликонов гена PR-2 (*glu*) во всех изученных вариантах, в том числе в контрольном (рис. 1). Однако, если у зараженных растений на 3-и сутки после инокуляции активность экспрессии гена β -1,3-глюканазы превышала контроль только на 50%, то наибольшее увеличение числа ампликонов данного гена в сравнении с контролем было обнаружено в расте-

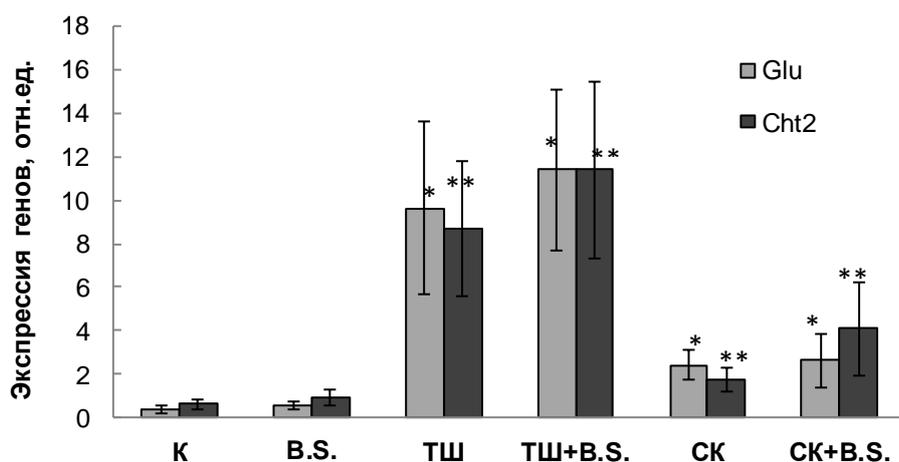


Рис. 1. Экспрессия генов β -1,3-глюканазы (*glu*) и хитиназы (*cht2*) в 8-дневных проростках ячменя: К – контроль, B.S. – *B. sorokiniana*, ТШ-тепловой шок (40°C, 3 ч), СК – салициловая кислота (10^{-4} М).

Различия по сравнению с контролем достоверны при $P < 0,05$ (* – для гена *glu*, ** – для гена *cht2*).

[Fig. 1. Expression of β -1,3-glucanase (*glu*) and chitinase (*cht2*) genes in 8-days-old barley seedlings: K – control, B. S. – *B. sorokiniana*, HS (ТШ) – heat shock (40°C, 3 h), SA (СК) – salicylic acid (10^{-4} M).

Comparison with the control are significant at $P < 0.05$ (* – for gene *glu*, ** – for gene *cht2*)].

ниях после ТШ как здоровых (в 25 раз), так и инфицированных образцов (в 29 раз). Следовательно, содержание PR-белков в растениях ячменя увеличивается не только под воздействием грибной инфекции, но и при ТШ. Экзогенная СК увеличивала уровень экспрессии гена PR-2 в 6-7 раз как в инфицированных, так и в здоровых листьях ячменя.

Результаты ПЦР-анализа (рис. 1) показали, что уровень экспрессии гена *chi2*, кодирующего хитиназу II класса, в листьях проростков ячменя изменялся аналогично изменению количества ампликонов гена β -1,3-глюканазы во всех опытных вариантах, что еще раз подтверждает синергизм функционирования этих двух антипатогенных генов. Влияние на экспрессию гена *chi2* предварительного ТШ также было очевидным. При этом усиление экспрессии изученных генов в инфицированных проростках ячменя после ТШ намного превышало таковое у инфицированных растений без теплового стресса, что указывает на участие обоих факторов в генерации защитного ответа. Экзогенная СК вызывала увеличение экспрессии гена *chi2* по сравнению с контролем, причем в инфицированных проростках наблюдалось более сильное увеличение ампликонов гена хитиназы по сравнению со здоровыми. Следует отметить, что в отношении генов, кодирующих глюканазу, такая зависимость не была обнаружена.

Ранее было показано, что содержание PR-белков в растительных клетках увеличивается не только под воздействием биотических, но и абиотических факторов внешней среды, что может вызывать перекрестную адаптацию растений к разным типам стресса (Kuwabara et al., 2002). Сравнительный анализ наших результатов свидетельствует об одинаковой направленности, но разном количественном проявлении действия ТШ и СК на экспрессию генов β -1,3-глюканазы и хитиназы, причем потенцирующий эффект ТШ на экспрессию двух генов был существенно выше, чем действие СК или инфицирование патогеном. Тепловая индукция экспрессии генов PR-белков указывает на биохимический путь защиты растений, вероятно, связанный с Ca^{2+} -опосредованной передачей сигналов путем изменения его концентрации в клетках совместно с другими молекулами, такими как H_2O_2 , генерируемый с участием НАДФН-оксидазы, и СК (Ma et al., 2009). Можно предположить, что ТШ вызывает глубокие и взаимосвязанные изменения в «нормальной» физиологии растений, повышая толерантность к другим стрессорам, в частности, к инфицированию фитопатогеном. Однако необходимы дополнительные исследования, чтобы дифференцировать механизмы, благодаря которым ТШ влияет на синтез изученных PR-белков.

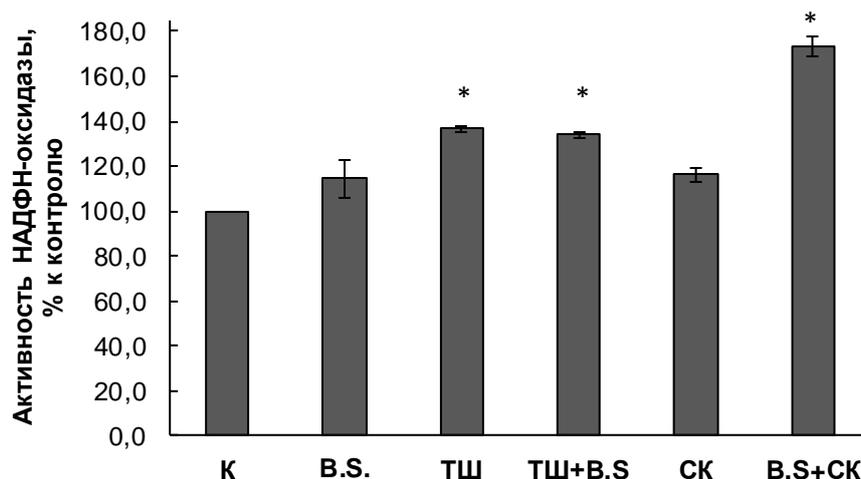


Рис. 2. Активность фермента НАДФН-оксидазы в 8-дневных проростках ячменя: К – контроль, B.S. – *B. sorokiniana*, TШ – тепловой шок (40°C, 3 ч), СК – салициловая кислота (10⁻⁴ М).

* – различия по сравнению с контролем достоверны при $P < 0,05$.

[Fig. 2. The activity of NADPH-oxidase in 8-days-old barley seedlings: К – control, B.S. – *B. sorokiniana*, HS (TШ) – heat shock (40°C, 3 h), SA (СК) – salicylic acid (10⁻⁴ M).

* – differences in comparison with the control are significant at $p < 0.05$.]

Известно, что развитие патогена и гипертермия могут нарушать гомеостатический баланс в растении, вызывая накопление АФК в апопласте (Awasthi et al., 2015; Carmo et al., 2017). Принято считать, что образование АФК активирует защитные реакции растений, а фитогормоны – это центральный узел, который связывает, интегрирует и перепрограммирует множественные реакции при стрессе (Golldeck et al., 2014; Gilroy et al., 2016).

Согласно литературным данным, АФК, зависимые от гомолога оксидазы респираторного взрыва (НАДФН-оксидазы), могут активироваться тепловым стрессом и впоследствии действовать как сигналы на большие расстояния при патогенной атаке (Suzuki, Katano, 2018). В наших исследованиях обнаружено, что в 8-дневных здоровых растениях ячменя активность фермента составила 0,512 мкМ НАДФН/(мкг белка·с). Действие TШ и СК вызывало увеличение активности НАДФН-оксидазы относительно контроля на 37 и 16% соответственно (рис. 2). В то же время, в инфицированных листьях повышение активности НАДФН-оксидазы составило только 14% по сравнению с контролем. При этом в инфицированных листьях действие TШ и салицилата приводило к активации данного фермента на 34 и 73% соответственно. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что праймирующие эффекты TШ и СК имеют общий механизм, опосредованный активацией

НАДФН-оксидазы, что, по-видимому, способствует развитию защитных реакций в растениях, инфицированных грибом *B. sorokiniana*.

В литературе имеются сведения, что АФК могут участвовать в раннем ответе на гипертермию и функционировать как первичные сигнальные молекулы, играя критическую роль в регуляции термотолерантности растений и в дальнейшем в развитии СПУ (Choudhury et al., 2017). Как показывают наши данные, термоиндукция наравне с экзогенным салицилатом активирует НАДФН-оксидазу, локализованную в плазматической мембране. Можно предположить, что эта активация увеличивает продукцию в апопластическом пространстве АФК, которые затем импортируются в клетку через аквапорины и участвуют в клеточных реакциях, вызывая увеличение содержания эндогенного салицилата, участвующего в механизмах регуляции экспрессии генов PR защиты (Bienert et al., 2007; Tsai et al., 2019).

Как отмечалось ранее, регуляция ответов на TШ может происходить через сигнальный путь с участием СК, который зависит от уровня АФК (Zhao et al., 2018). Есть сведения о том, что СК индуцирует накопление H₂O₂, тем самым усиливая окислительный стресс (Chao et al., 2010), а повышение содержания H₂O₂, в свою очередь, может приводить к биосинтезу СК (Vlot et al., 2017). Когда СК и H₂O₂ накапливаются до определенного уровня, локальная

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

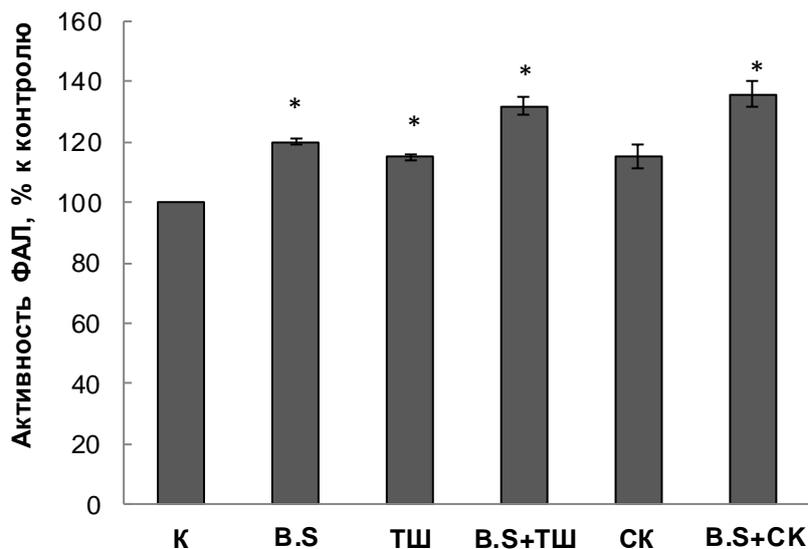


Рис. 3. Активность ФАЛ в 8-дневных проростках ячменя: К – контроль, B. S. – *B. sorokiniana*, ТШ – тепловой шок (40°C, 3 ч), СК – салициловая кислота (10⁻⁴ М).

* – различия по сравнению с контролем достоверны при $P < 0,05$.

[Fig. 3. PAL activity in 8-days-old barley seedlings: К – control, B. S. – *B. sorokiniana*, HS (ТШ) – heat shock (40°C, 3 h), SA (СК) – salicylic acid (10⁻⁴ M).

* – differences in comparison with the control are significant at $P < 0.05$.]

экспрессия генов PR-белков также может возрастать (Devadas, Raina, 2002; Jin et al., 2017). Таким образом, ТШ через стимуляцию образования АФК вызывает увеличение эндогенного содержания СК, что приводит к повышению экспрессии защитных генов при патогенезе (Larkindale et al., 2005; Wang et al., 2010; Khan et al., 2013; Tsai et al., 2019).

На примере ряда растений показано увеличение свободной эндогенной СК в клетках растений при действии гипертермии (Guo et al., 2020; Wang et al., 2020). Увеличение содержания свободной СК сопровождалось возрастанием активности ФАЛ, которая является ферментом, лимитирующим скорость синтеза СК на первом его этапе (Ван и др., 2005). Повышение активности ФАЛ рассматривается как один из механизмов формирования устойчивости растений к патогенам (Wang et al., 2019). Известно, что абиотические стрессоры также активируют клеточный сигнальный процесс, что приводит к усилению транскрипции генов фенилпропаноидного пути, который представляет собой перекрестный ответ на действие разных факторов окружающей среды (Sharma et al., 2019; Wang et al., 2019).

Наши исследования показали увеличение активности ФАЛ в 8-дневных проростках ячменя как под действием биотического (гриб *B. sorokiniana*), так и абиотического (ТШ, 40°C, 3 ч) факторов (рис. 3), причем наиболее интенсивно – после кратковременной гипертермии в

инфицированных растениях. Так, в контрольном варианте активность ФАЛ составила 22,9 нмоль/(мг белка×ч). В результате тепловой обработки активность фермента в инфицированных растениях возросла на 36% по сравнению с контролем и на 12-17% превышала таковые показатели, полученные в вариантах с грибным заражением или после ТШ. Наиболее значимое повышение активности ФАЛ (в 1,4 раза) наблюдалось после применения экзогенной СК, предшествующего грибному заражению. Полученные данные свидетельствуют о синергизме действия ТШ и грибного заражения, а также экзогенного салицилата и грибного заражения на активность ФАЛ в растениях ячменя.

Одним из путей повышения активности ФАЛ в инфицированных фитопатогеном растениях может быть влияние гипертермии на посттранскрипционную регуляцию, позволяющую растениям точно настраивать экспрессию своих генов на внешние раздражители. Исследования некоторых транскриптов генов, кодирующих белки теплового шока (БТШ), показали, что полиаденилирование мРНК может способствовать более быстрой реакции на тепловой стресс у животных и растений (Wu et al., 2020). Накапливается все больше данных, показывающих, что гены *hsp*, кодирующие БТШ, важны для нормального развития растений. Показано, что БТШ предотвращают агрегацию белков и обеспечивают рефолдинг денатурированных молекул, участвуя таким образом в ре-

гуляции активности ферментов, в том числе, и ферментов фенилпропаноидного пути (Kim, Hwang, 2015). Кроме того, было продемонстрировано, что праймирование растений томата (*Solanum lycopersicum*) и огурца (*Cucumis sativus*) экзогенной СК снижает повреждение растений при тепловом стрессе за счет повышения уровня экспрессии генов *hsp70* и *hsf* (Snyman, Stojic, 2008), что также косвенно указывает на существование перекрестных связей между БТШ и метаболизмом фенилпропаноидов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что защитный ответ растений ячменя на грибную инфекцию, вызванную *Bipolaris sorokiniana*, реализуется с участием НАДФН-оксидазы и ФАЛ и приводит к активации генов двух PR-белков (β -1,3- глюканазы и хитиназы). Эти ответные реакции модулируются кратковременной гипертермией и экзогенным салицилатом путем неспецифических перестроек клеточного метаболизма. В результате происходит усиление защитного ответа за счет включения сигнальных путей через стимуляцию образования АФК с участием НАДФН-оксидазы и увеличения эндогенного содержания СК, опосредованного активацией ФАЛ, что в итоге приводит к повышению экспрессии защитных генов, кодирующих PR-белки (β -1,3- глюканазу и хитиназу), которые тормозят развитие патогена. Таким образом, ТШ (40°C, 3 ч) и обработку экзогенной СК (10^{-4} М) можно рассматривать в качестве праймирующих факторов, индуцирующих защитный ответ растений ячменя при гельминтоспориозе, и обладающих определенным синергизмом действия в запуске защитных реакций, но при этом отличающихся разной амплитудой действия.

ЛИТЕРАТУРА

- Ван Л.-Ж., Хуан В.-Д., Лю Ю.-П., Чжан Ж.-Ч. 2005. Влияние тепловой обработки растений винограда на содержание салициловой и абсцизовой кислот и теплоустойчивость растений. Физиология растений. 52 (4) : 578-583.
- Доманская И. Н., Радюк М. С., Будакова Е. А., Самович Т. В., Спивак Е. А., Шальго Н. В. 2011. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: Метод. указания. Минск : 31 с.
- Олениченко Н.А., Загоскина Н.В., Астахова Н.В., Трунова Т.И., Кузнецов Ю.В. 2008. Первичный и вторичный метаболизм озимой пшеницы при холодном закаливании и действии антиоксидантов. Прикл. биохимия и микробиология. 44 (5) : 523-529.
- Ребриков Д.В. Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А. 2015. ПЦР в реальном времени. Москва : 233с.
- Antoniw J.F., Ritter C.E., Pierpoint W.S., Van Loon L.C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol. 47 : 79-87.
- Atkinson N.J., Urwin P.E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J. Exp. Bot. 63 (10) : 3523-3543.
- Awasthi R., Bhandari K., Nayyar H. 2015. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. Front. Environ. Sci. 3 : 110.
- Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N. 2012. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. Biotechnol Lett. 34 (11) : 1983-1990.
- Bienert G.P., Møller A.L.B., Kristiansen K.A., Schulz A., Møller I.M., Schjoerring J.K., Jahn T.P. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. J. Biol. Chem. 282 : 1183-1192.
- Boccardo N.A., Segretin M.E., Hernandez I., Mirkin F.G., Chacón O., Lopez Y., Borrás-Hidalgo O., Bravo-Almonacid F.F. 2019. Expression of pathogenesis-related proteins in transplastomic tobacco plants confers resistance to filamentous pathogens under field trials. Sci. Rep. 9 : 2791.
- Calil I.P., Fontes E. 2017. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. Ann. Bot. 119 (5) : 711-723.
- Campos-Vargas R., Nonogaki H., Suslow T., Saltveit M. 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. Physiol. Plant. 123 (1) : 82-91.
- Carmo L.S., Murad A.M., Resende R.O., Boiteux L.S., Ribeiro S.G., Jorrín-Novo J.V., Mehta A. 2017. Plant responses to tomato chlorotic mottle virus: Proteomic view of the resistance mechanisms to a bipartite begomovirus in tomato. J. Proteomics. 151 : 284-292.
- Chao Y. Y., Hong C. Y., Kao C. H. 2010. The decline in ascorbic acid content is associated with cadmium toxicity of rice seedlings. Plant Physiol. Biochem. 48 : 374-381.
- Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. Plant. J. 90 : 856-867.
- Cingoz G.S., Gurel E. 2016. Effects of salicylic acid on thermotolerance and cardenolide accumulation under high temperature stress in *Digitalis trojana* Ivanina. Plant Physiol. Biochem. 105 : 145-149.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

- Clarke S.M., Cristescu S.M., Miersch O., Harren F.J.M., Wasternack C., Mur L.A.J. 2009. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 182 : 175-187.
- Clarke S.M., Mur L.A., Wood J.E., Scott I.M. 2004. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38 (3) : 432-447.
- Coll N.S., Eppele P., Dangl, J.L. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation.* 18 : 1247-1256.
- Dat J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H., Scott I.M. 2000. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J. Plant Physiol.* 156 : 659-665.
- Dempsey D. M. A., Klessig, D. F. 2017. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biol.* 15 : 23.
- Devadas S. K., Raina R. 2002. Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis hrl1* mutant. *Plant Physiol.* 128 : 1234-1244.
- Dong X. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7 : 547-552.
- Foyer C.H., Rasool B., Davey J.W., Hancock R.D. 2016. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *J. Exp. Bot.* 67 (7) : 2025-2037.
- Gao Q.M., Zhu S., Kachroo P., Kachroo A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 6 : 228.
- Gilroy S., Białasek M., Suzuki N., Górecka M., Devireddy A.R., Karpiński S., Mittler R. 2016. ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiol.* 171 (3) : 1606-1615.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43 : 205-227.
- Golldack D., Li C., Mohan H., Probst N. 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.* 5 : 151.
- González-Teuber M., Pozo M. J., Muck A., Svatos A., Adame-Alvarez R. M., Heil M. 2010. Glucanases and chitinases as causal agents in the protection of *Acacia* extrafloral nectar from infestation by phytopathogens. *Plant Physiol.* 152 (3) : 1705-1715.
- Guo X. L., Yuan S. N., Zhang H. N., Zhang Y. Y., Zhang Y. J., Wang G. Y., Li Y. Q., Li G. L. 2020. Heat-response patterns of the heat shock transcription factor family in advanced development stages of wheat (*Triticum aestivum* L.) and thermotolerance-regulation by TaHsfA2-10. *BMC Plant Biol.* 20 (1) : 364.
- Gupta P., Ravi I., Sharma V. 2013. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *J. Plant Interact.* 8(2) : 155-161.
- Hossain M.A., Li Z.G., Hoque T.S., Burritt D.J., Fujita M., Munné-Bosch S. 2018. Heat or cold priming-induced cross-tolerance to abiotic stresses in plants: key regulators and possible mechanisms. *Protoplasma.* 255 (1) : 399-412.
- Jain D., Khurana J.P. 2018. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In: *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction.* Springer, Singapore, pp. 265-281.
- Jin J.B., Cai B., Zhou J.M. 2017. Salicylic acid. In: *Hormone Metabolism and Signaling in Plants: Hormone Metabolism and Signaling in Plants.* London, Academic Press, pp. 273-289.
- Jones J. D., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444 : 323-329.
- Kasprzewska A. 2003. Plant chitinases – regulation and function. *Cellul. Mol. Biol. Lett.* 8: 809-824.
- Khan M.I., Iqbal N., Masood A., Per T.S., Khan N.A. 2013. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signal. Behav.* 8 : e26374.
- Kim N.H., Hwang B.K. 2015. Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT and triggers plant cell death and immunity. *Plant Physiol.* 167 (2) : 307-322.
- Kirubakaran S.I., Sakthivel N. 2007. Cloning and over expression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 52 : 1159-1166.
- Klein P., Seidel T., Stöcker B., Dietz K.J. 2012. The membrane tethered transcription factor ANAC089 serves as redox dependent suppressor of stromal ascorbate peroxidase gene expression. *Front Plant Sci.* 3 : 247.
- Klessig D.F., Choi H.W., Dempsey D.M.A. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31 : 871-888.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Doring P., Vierling E., Scharf K.D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 10 : 310-316
- Kubienová L., Sedlářová M., Vitečková-Wünschová A., Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Navrátil M., Petřivalský M. 2013. Effect of extreme temperatures on powdery mildew development and Hsp70 induction in tomato and wild *Solanum* spp. *Plant Protection Science, 49 (Spec. Iss.)* : 41-54.
- Kumar D. 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* 228 : 127-34.
- Kuwabara C, Takezawa D, Shimada T, Hamada T, Fujikawa S, Arakawa K. 2002. Abscisic acid- and cold-

- induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiol Plant.* 115(1) : 101-110.
- Larkindale J., Hall J. D., Knight M. R., Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* 138 : 882-897.
- Larkindale J., Huang B.R. 2005. Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. *Plant Growth Regulation.* 47: 17-28.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petřivalský M., Luhová L., Špundová M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková V., PinkD.A.C. 2014. Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. *Eur. J. Plant Pathol.* 138 : 569-596.
- Li B., Gao K., Ren H., Tang W. 2018. Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *J. Integr. Plant Biol.* 60: 757-779.
- Li C., Li X., Bai C., Zhang Y., Wang Z. 2019. A chitinase with antifungal activity from naked oat (*Avena chinensis*) seeds. *J. Food Biochem.* 43(2) : e12713.
- Li Y.Z., Muhammad T., Wang Y., Zhang D.L., Crabbe M.J.C., Liang Y. 2018a. Salicylic acid collaborates with gene silencing to tomato defense against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Pak. J. Bot.* 50 : 2041-2054.
- Liao C., Zheng Y., Guo Y. 2017. MYB30 transcription factor regulates oxidative and heat stress responses through ANNEXIN-mediated cytosolic calcium signaling in *Arabidopsis*. *New. Phytol.* 216 : 163-177.
- Lin J.S., Lin H.H., Li Y.C., King Y.C., Sung R.J., Kuo Y.W., Lin C.C., Shen Y.H., Jeng S.T. 2014. Carbon monoxide regulates the expression of the wound-inducible gene ipomoelin through antioxidation and MAPK phosphorylation in sweet potato. *J. Exp. Bot.* 65 (18) : 5279-5290.
- Liu L., Sonbol F.M., Huot B., Gu Y., Withers J., Mwimba M., Yao J., He S.Y., Dong X. 2016. Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat. Commun.* 7 : 13099.
- Lopez-Delgado H., Mora-Herrera M.E., Zavaleta-Mancera H.A., Cadena-Hinojosa M., Scott I.M. 2004. Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *Amer. J. Potato Res.* 81 : 171-176.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1) : 265-275.
- Ma B.C., Tang W.L., Ma L.Y., Li L.L., Zhang L.B., Zhu S.J., Zhuang C., Irving D. 2009. The role of chitinase gene expression in the defense of harvested banana against anthracnose disease. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134 (3) : 379-386.
- Nožková V., Mieslerová B., Luhová L., Piterková J., Novák O., Špundová M., Lebeda A. 2019. Effect of heat-shock pre-treatment on tomato plants infected by powdery mildew fungus. *Plant Protect. Sci.* 55 : 31-42.
- Pinton R., Cakmak I., Marschner H. 1994. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. *J. Exp. Bot.* 45 (1) : 45-50.
- Reddy R.A., Kumar B., Reddy P.S., Mishra R.N., Mahanty S., Kaul T., Nair S., Sopory S.K., Reddy M.K. 2009. Molecular cloning and characterization of genes encoding *Pennisetum glaucum* ascorbate peroxidase and heat-shock factor: Interlinking oxidative and heat-stress responses. *J. Plant Physiol.* 166 : 1646-1659.
- Savvides A., Ali S., Tester M., Fotopoulos V. 2016. Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible? *Trends Plant Sci.* 21 (4) : 329-340.
- Schweizer P., Vallélian-Bindschedler L., Mosinger E. 1995. Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47 : 51-66.
- Seidel T., Scholl S., Krebs M., Rienmüller F., Marten I., Hedrich R., Hanitzsch M., Janetzki P., Dietz K.J., Schumacher K. 2012. Regulation of the V-type ATPase by redox modulation. *Biochem J.* 448 : 243-251.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B., Cammue B., De Bolle M.F.C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46 : 941-950.
- Shaikhali J., Norén L., de Dios Barajas-López J., Srivastava V., König J., Sauer U.H., Wingsle G., Dietz K.J., Stand A. 2012. Redox-mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the F-group of basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 287 : 27510-27525.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules.* 24(13) : 2452.
- Shigenaga A.M., Berens M.L., Tsuda K., Argueso C.T. 2017. Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38 : 164-172.
- Snyman M., Cronjé M.J. 2008. Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *J. Exp. Bot.* 59 (8) : 2125-2132.
- Suzuki N., Katano K. 2018. Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack. *Front. Plant Sci.* 9 : 490.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

- Suzuki N., Miller G., Salazar C., Mondal H.A., Shulaev E., Cortes D.F., Shuman J.L., Luo X., Shah J., Schlauch K., Shulaev V., Mittler R. 2013. Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *Plant Cell*. 25 : 3553-3569.
- Tian S.P., Yao H.J., Deng X., Xu X.B., Qin G.Z., Chan Z.L. 2007. Characterization and expression of beta-1,3-glucanase genes in jujube fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathol.* 97(3) : 260-8.
- Tsai W.A., Weng S.H., Chen M.C., Lin J.S., Tsai W.S. 2019. Priming of Plant Resistance to Heat Stress and Tomato Yellow Leaf Curl Thailand Virus With Plant-Derived Materials. *Front. Plant Sci.* 10 : 906.
- Türkeri H., Schweer J., Link G. 2012. Phylogenetic and functional features of the plastid transcription kinase cpCK2 from *Arabidopsis* signify a role of cysteinyl SH-groups in regulatory phosphorylation of plastid sigma factors. *FEBS J.* 279 : 395-409.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 44 : 135-162.
- Van Loon L.C., van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*. 40 : 199-211.
- Van Loon L.C. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*, pp. 1-19.
- Wang C., Fan Y. 2014. Eugenol enhances the resistance of tomato against tomato yellow leaf curl virus. *J. Sci. Food Agric.* 94 (4) : 677-682.
- Wang J., Hu H., Wang W., Wei Q., Hu T., Bao C. 2020. Genome-wide identification and functional characterization of the heat shock factor family in eggplant (*Solanum melongena* L.) under abiotic stress conditions. *Plants*. 9 (7) : 915.
- Wang J., Yuan B., Huang B. 2019. Differential heat-induced changes in phenolic acids associated with genotypic variations in heat tolerance for hard fescue. *Crop Sci.* 59 : 667-674.
- Wang L.J., Fan L., Loescher W., Duan W., Liu G.J., Cheng J.S., Luo H.B., Li S.H. 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biol.* 10 : 34.
- Wiese J., Kranz T., Schubert S. 2004. Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biol.* 6 : 529-536.
- Win J., Chaparro-Garcia A., Belhaj K., Saunders D.G., Yoshida K., Dong S., Schornack S., Zipfel C., Robatzek S., Hogenhout S.A., Kamoun S. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77 : 235-247.
- Wu X., Wang J., Wu X., Hong Y., Li Q.Q. 2020. Heat shock responsive gene expression modulated by mRNA Poly(A) Tail Length. *Front. Plant Sci.* 11 : 1255.
- Yi S.Y., Min S.R., Kwon S.Y. 2015. NPR1 is instrumental in priming for the enhanced flg22-induced MPK3 and MPK6 activation. *Plant Pathol. J.* 31 (2) : 192-194.
- Zhao L.N., Liu Z.H., Duan S.N., Zhang Y.Y., Li G.L., Guo X.L. 2018. Cloning and characterization of heat shock transcription factor gene TaHsfB2d and its regulating role in thermotolerance. *Acta. Agron. Sin.* 44 : 53-62.

REFERENCES

- Wang L.-J., Huang W.-D., Liu Y.-P., Zhang J.-Ch. 2005. Changes in salicylic and abscisic acid contents during heat treatment and their effect on thermotolerance of grape plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 52 (4) : 516-520.
- Domanskaya I. N., Radyuk M. S., Budakova Ye. A., Samovich T. V., Spivak Ye. A., Shalygo N. V. 2011. Tekhnologiya DNK-tipirovaniya genov ustoychivosti yachmenya k zasukhe: metod. ukazaniya. (Technology of DNA typing of genes of barley resistance to drought: method. Directions). Minsk : 31p. (In Russian).
- Olenichenko N.A., Zagoskina N.V., Astakhova N.V., Trunova T.I., Kuznetsov Yu.V. 2008. Primary and secondary metabolism of winter wheat under cold hardening and treatment with antioxidants. *Appl. Biochem. Microbiol.* 44 (5) : 535. <https://doi.org/10.1134/S0003683808050141>
- Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu., Semenov P.A. 2015. PTSR v real'nom vremeni (Real time PCR). Moscow. 233p.
- Antoniw J.F., Ritter C.E., Pierpoint W.S., Van Loon L.C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* 47 : 79-87.
- Atkinson N.J., Urwin P.E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63 (10) : 3523-3543.
- Awasthi R., Bhandari K., Nayyar H. 2015. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Front. Environ. Sci.* 3 : 110.
- Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N. 2012. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol Lett.* 34 (11) : 1983-1990.
- Bienert G.P., Møller A.L.B., Kristiansen K.A., Schulz A., Møller I.M., Schjoerring J.K., Jahn T.P. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282 : 1183-1192.

- Boccardo N.A., Segretin M.E., Hernandez I., Mirkin F.G., Chacón O., Lopez Y., Borrás-Hidalgo O., Bravo-Almonacid F.F. 2019. Expression of pathogenesis-related proteins in transplastomic tobacco plants confers resistance to filamentous pathogens under field trials. *Sci. Rep.* 9 : 2791.
- Calil I.P., Fontes E. 2017. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Ann. Bot.* 119 (5) : 711-723.
- Campos-Vargas R., Nonogaki H., Suslow T., Saltveit M. 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiol. Plant.* 123 (1) : 82-91.
- Carmo L.S., Murad A.M., Resende R.O., Boiteux L.S., Ribeiro S.G., Jorrín-Novo J.V., Mehta A. 2017. Plant responses to tomato chlorotic mottle virus: Proteomic view of the resistance mechanisms to a bipartite begomovirus in tomato. *J. Proteomics.* 151 : 284-292.
- Chao Y. Y., Hong C. Y., Kao C. H. 2010. The decline in ascorbic acid content is associated with cadmium toxicity of rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 48 : 374-381.
- Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* 90 : 856-867.
- Cingoz G.S., Gurel E. 2016. Effects of salicylic acid on thermotolerance and cardenolide accumulation under high temperature stress in *Digitalis trojana* Ivanina. *Plant Physiol. Biochem.* 105 : 145-149.
- Clarke S.M., Cristescu S.M., Miersch O., Harren F.J.M., Wasternack C., Mur L.A.J. 2009. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 182 : 175-187.
- Clarke S.M., Mur L.A., Wood J.E., Scott I.M. 2004. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38 (3) : 432-447.
- Coll N.S., Eppele P., Dangl J.L. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation.* 18 : 1247-1256.
- Dat J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H., Scott I.M. 2000. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J. Plant Physiol.* 156 : 659-665.
- Dempsey D. M. A., Klessig, D. F. 2017. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biol.* 15 : 23.
- Devadas S. K., Raina R. 2002. Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis hrl1* mutant. *Plant Physiol.* 128 : 1234-1244.
- Dong X. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7 : 547-552.
- Foyer C.H., Rasool B., Davey J.W., Hancock R.D. 2016. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. *J. Exp. Bot.* 67 (7) : 2025-2037.
- Gao Q.M., Zhu S., Kachroo P., Kachroo A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 6 : 228.
- Gilroy S., Białasek M., Suzuki N., Górecka M., Devireddy A.R., Karpiński S., Mittler R. 2016. ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiol.* 171 (3) : 1606-1615.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43 : 205-227.
- Golldack D., Li C., Mohan H., Probst N. 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.* 5 : 151.
- González-Teuber M., Pozo M. J., Muck A., Svatos A., Adame-Alvarez R. M., Heil M. 2010. Glucanases and chitinases as causal agents in the protection of *Acacia* extrafloral nectar from infestation by phytophagous. *Plant Physiol.* 152 (3) : 1705-1715.
- Guo X. L., Yuan S. N., Zhang H. N., Zhang Y. Y., Zhang Y. J., Wang G. Y., Li Y. Q., Li G. L. 2020. Heat-response patterns of the heat shock transcription factor family in advanced development stages of wheat (*Triticum aestivum* L.) and thermotolerance-regulation by TaHsfA2-10. *BMC Plant Biol.* 20 (1) : 364.
- Gupta P., Ravi I., Sharma V. 2013. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *J. Plant Interact.* 8(2) : 155-161.
- Hossain M.A., Li Z.G., Hoque T.S., Burritt D.J., Fujita M., Munné-Bosch S. 2018. Heat or cold priming-induced cross-tolerance to abiotic stresses in plants: key regulators and possible mechanisms. *Protoplasma.* 255 (1) : 399-412.
- Jain D., Khurana J.P. 2018. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In: *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Springer, Singapore, pp. 265-281.
- Jin J.B., Cai B., Zhou J.M. 2017. Salicylic acid. In: *Hormone Metabolism and Signaling in Plants: Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. London, Academic Press, pp. 273-289.
- Jones J. D., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444 : 323-329.
- Kasprzewska A. 2003. Plant chitinases – regulation and function. *Cellul. Mol. Biol. Lett.* 8: 809-824.
- Khan M.I., Iqbal N., Masood A., Per T.S., Khan N.A. 2013. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

- production and ethylene formation. *Plant Signal. Behav.* 8 : e26374.
- Kim N.H., Hwang B.K. 2015. Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT and triggers plant cell death and immunity. *Plant Physiol.* 167 (2) : 307-322.
- Kirubakaran S.I., Sakthivel N. 2007. Cloning and over expression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 52 : 1159-1166.
- Klein P., Seidel T., Stöcker B., Dietz K.J. 2012. The membrane tethered transcription factor ANAC089 serves as redox dependent suppressor of stromal ascorbate peroxidase gene expression. *Front Plant Sci.* 3 : 247.
- Klessig D.F., Choi H.W., Dempsey D.M.A. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31 : 871-888.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K.D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 10 : 310-316
- Kubienová L., Sedlářová M., Vítečková-Wünschová A., Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Navrátil M., Petřivalský M. 2013. Effect of extreme temperatures on powdery mildew development and Hsp70 induction in tomato and wild *Solanum* spp. *Plant Protection Science*, 49 (Spec. Iss.) : 41-54.
- Kumar D. 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* 228 : 127-34.
- Kuwabara C, Takezawa D, Shimada T, Hamada T, Fujikawa S, Arakawa K. 2002. Abscisic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiol Plant.* 115(1) : 101-110.
- Larkindale J., Hall J. D., Knight M. R., Vierling E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* 138 : 882-897.
- Larkindale J., Huang B.R. 2005. Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. *Plant Growth Regulation.* 47: 17-28.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petřivalský M., Luhová L., Špundová M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková V., PinkD.A.C. 2014. Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. *Eur. J. Plant Pathol.* 138 : 569-596.
- Li B., Gao K., Ren H., Tang W. 2018. Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *J. Integr. Plant Biol.* 60: 757-779.
- Li C., Li X., Bai C., Zhang Y., Wang Z. 2019. A chitinase with antifungal activity from naked oat (*Avena chinensis*) seeds. *J. Food Biochem.* 43(2) : e12713.
- Li Y.Z., Muhammad T., Wang Y., Zhang D.L., Crabbe M.J.C., Liang Y. 2018a. Salicylic acid collaborates with gene silencing to tomato defense against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Pak. J. Bot.* 50 : 2041-2054.
- Liao C., Zheng Y., Guo Y. 2017. MYB30 transcription factor regulates oxidative and heat stress responses through ANNEXIN-mediated cytosolic calcium signaling in *Arabidopsis*. *New. Phytol.* 216 : 163-177.
- Lin J.S., Lin H.H., Li Y.C., King Y.C., Sung R.J., Kuo Y.W., Lin C.C., Shen Y.H., Jeng S.T. 2014. Carbon monoxide regulates the expression of the wound-inducible gene ipomoelin through antioxidant and MAPK phosphorylation in sweet potato. *J. Exp. Bot.* 65 (18) : 5279-5290.
- Liu L., Sonbol F.M., Huot B., Gu Y., Withers J., Mwimba M., Yao J., He S.Y., Dong X. 2016. Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat. Commun.* 7 : 13099.
- Lopez-Delgado H., Mora-Herrera M.E., Zavaleta-Mancera H.A., Cadena-Hinojosa M., Scott I.M. 2004. Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *Amer. J. Potato Res.* 81 : 171-176.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1) : 265-275.
- Ma B.C., Tang W.L., Ma L.Y., Li L.L., Zhang L.B., Zhu S.J., Zhuang C., Irving D. 2009. The role of chitinase gene expression in the defense of harvested banana against anthracnose disease. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134 (3) : 379-386.
- Nožková V., Mieslerová B., Luhová L., Piterková J., Novák O., Špundová M., Lebeda A. 2019. Effect of heat-shock pre-treatment on tomato plants infected by powdery mildew fungus. *Plant Protect. Sci.* 55 : 31-42.
- Pinton R., Cakmak I., Marschner H. 1994. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. *J. Exp. Bot.* 45 (1) : 45-50.
- Reddy R.A., Kumar B., Reddy P.S., Mishra R.N., Mahanty S., Kaul T., Nair S., Sopory S.K., Reddy M.K. 2009. Molecular cloning and characterization of genes encoding *Pennisetum glaucum* ascorbate peroxidase and heat-shock factor: Interlinking oxidative and heat-stress responses. *J. Plant Physiol.* 166 : 1646-1659.
- Savvides A., Ali S., Tester M., Fotopoulos V. 2016. Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible? *Trends Plant Sci.* 21 (4) : 329-340.
- Schweizer P., Vallélian-Bindschedler L., Mosinger E. 1995. Heat-induced resistance in barley to the pow-

- dery mildew fungus *Erysiphe graminis* f. sp. hordei. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47 : 51-66.
- Seidel T., Scholl S., Krebs M., Rienmüller F., Marten I., Hedrich R., Hanitzsch M., Janetzki P., Dietz K.J., Schumacher K. 2012. Regulation of the V-type ATPase by redox modulation. *Biochem J.* 448 : 243-251.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B., Cammue B., De Bolle M.F.C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46 : 941-950.
- Shaikhali J., Norén L., de Dios Barajas-López J., Srivastava V., König J., Sauer U.H., Wingsle G., Dietz K.J., Stand A. 2012. Redox-mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the F-group of basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 287 : 27510-27525.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules.* 24(13) : 2452.
- Shigenaga A.M., Berens M.L., Tsuda K., Argueso C.T. 2017. Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38 : 164-172.
- Snyman M., Cronjé M.J. 2008. Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *J. Exp. Bot.* 59 (8) : 2125-2132.
- Suzuki N., Katano K. 2018. Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack. *Front. Plant Sci.* 9 : 490.
- Suzuki N., Miller G., Salazar C., Mondal H.A., Shulaev E., Cortes D.F., Shuman J.L., Luo X., Shah J., Schlauch K., Shulaev V., Mittler R. 2013. Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *Plant Cell.* 25 : 3553-3569.
- Tian S.P., Yao H.J., Deng X., Xu X.B., Qin G.Z., Chan Z.L. 2007. Characterization and expression of beta-1,3-glucanase genes in jujube fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathol.* 97(3) : 260-8.
- Tsai W.A., Weng S.H., Chen M.C., Lin J.S., Tsai W.S. 2019. Priming of Plant Resistance to Heat Stress and Tomato Yellow Leaf Curl Thailand Virus With Plant-Derived Materials. *Front. Plant Sci.* 10 : 906.
- Türkeri H., Schweer J., Link G. 2012. Phylogenetic and functional features of the plastid transcription kinase cpCK2 from *Arabidopsis* signify a role of cysteinyl SH-groups in regulatory phosphorylation of plastid sigma factors. *FEBS J.* 279 : 395-409.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 44 : 135-162.
- Van Loon L.C., van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology.* 40 : 199-211.
- Van Loon L.C. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*, pp. 1-19.
- Wang C., Fan Y. 2014. Eugenol enhances the resistance of tomato against tomato yellow leaf curl virus. *J. Sci. Food Agric.* 94 (4) : 677-682.
- Wang J., Hu H., Wang W., Wei Q., Hu T., Bao C. 2020. Genome-wide identification and functional characterization of the heat shock factor family in eggplant (*Solanum melongena* L.) under abiotic stress conditions. *Plants.* 9 (7) : 915.
- Wang J., Yuan B., Huang B. 2019. Differential heat-induced changes in phenolic acids associated with genotypic variations in heat tolerance for hard fescue. *Crop Sci.* 59 : 667-674.
- Wang L.J., Fan L., Loescher W., Duan W., Liu G.J., Cheng J.S., Luo H.B., Li S.H. 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biol.* 10 : 34.
- Wiese J., Kranz T., Schubert S. 2004. Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biol.* 6 : 529-536.
- Win J., Chaparro-Garcia A., Belhaj K., Saunders D.G., Yoshida K., Dong S., Schornack S., Zipfel C., Robatzek S., Hogenhout S.A., Kamoun S. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77 : 235-247.
- Wu X., Wang J., Wu X., Hong Y., Li Q.Q. 2020. Heat shock responsive gene expression modulated by mRNA Poly(A) Tail Length. *Front. Plant Sci.* 11 : 1255.
- Yi S.Y., Min S.R., Kwon S.Y. 2015. NPR1 is instrumental in priming for the enhanced flg22-induced MPK3 and MPK6 activation. *Plant Pathol. J.* 31 (2) : 192-194.
- Zhao L.N., Liu Z.H., Duan S.N., Zhang Y.Y., Li G.L., Guo X.L. 2018. Cloning and characterization of heat shock transcription factor gene TaHsfB2d and its regulating role in thermotolerance. *Acta. Agron. Sin.* 44 : 53-62.

Надійшла до редакції
07.07.2020 р.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

EFFECT OF HYPERTHERMIA AND EXOGENOUS SALICYLIC ACID ON EXPRESSION OF PR-PROTEIN GENES (β -1,3-GLUCANASE, CHITINASE) AND ACTIVITY OF ENZYMES OF PROTECTIVE RESPONSE IN BARLEY PLANTS UNDER HELMINTHOSPORIOSIS

L. V. Pashkevich, T. G. Kuryanchik, L. F. Kabashnikova

*Institute of Biophysics and Cell Engineering
of the National Academy of Sciences of Belarus
(Minsk, Belarus)
E-mail: ljubi.k87@gmail.com*

The effect of short-term hyperthermia (40°C, 3 h) and exogenous salicylic acid (SA, 10⁻⁴ M) on the expression of genes of two hydrolases: β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) and chitinase (EC 3.2.1.14), related to proteins of protective response, in seedlings of spring barley infected with the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Schoem. was studied. It was found that the response of barley plants to two types of treatment included an increase in the expression of β -1,3-glucanase and chitinase genes in 72 h after inoculation with the pathogen and exceeded the indices of their transcriptional activity in infected plants without processing. Under these conditions, an increase in the activity of other components of plant defense response during pathogenesis was also observed, namely, membrane NADPH oxidase (Rboh, EC 1.6.3.1) and *L*-phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.1.3.5). Thus, heat treatment, as well as exogenous salicylate, can be considered as inducers of a protective mechanism that increases plant resistance to fungal infection by activation the expression of genes of β -1,3-glucanase and chitinase and increasing the activity of protective proteins (NADPH oxidase and PAL).

Key words: *Hordeum vulgare*, *Bipolaris sorokiniana*, salicylic acid, hyperthermia, β -1,3-glucanase, chitinase, *L*-phenylalanine ammonia-lyase, NADPH oxidase, reactive oxygen species

ВПЛИВ ГІПЕРТЕРМІЇ ТА ЕКЗОГЕННОЇ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ PR-БІЛКІВ (β -1,3-ГЛЮКАНАЗИ, ХІТИНАЗИ) І АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ЗАХИСНОЇ ВІДПОВІДІ У РОСЛИН ЯЧМЕНЮ ПРИ ГЕЛЬМІНТОСПОРІОЗІ

Л. В. Пашкевич, Т. Г. Кур'янич, Л. Ф. Кабашникова

*Інститут біофізики і клітинної інженерії
Національної академії наук Білорусі
(Мінськ, Білорусь)
E-mail: ljubi.k87@gmail.com*

Вивчено вплив короткочасної гіпертермії (40°C, 3 год) і екзогенної саліцилової кислоти (СК, 10⁻⁴ М) на експресію генів двох гідролаз: β -1,3-глюканази (КФ 3.2.1.39) і хітинази (КФ 3.2.1.14), що належать до білків захисної відповіді, в інфікованих гемібіотрофним грибом *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Schoem. у проростках ярого ячменю. Встановлено, що відповідь рослин ячменю на два види впливу виявлялася у збільшенні експресії генів β -1,3-глюканази і хітинази через 72 год після інокуляції патогеном і перевищувала показники їх транскрипційної активності в інфікованих рослинах без обробок. У цих умовах спостерігалось також підвищення активності інших компонентів захисної відповіді рослин при патогенезі – мембранної НАДФН-оксидази (Rboh, КФ 1.6.3.1) і *L*-фенілаланінамонійліази (ФАЛ, КФ 4.1.3.5). Таким чином, вплив високої температури, як і екзогенного саліцилату, можуть розглядатися як індуктори захисного механізму, що підвищує стійкість рослин до грибного інфікування шляхом активації експресії генів β -1,3-глюканази і хітинази та підвищення активності захисних білків (НАДФН-оксидази і ФАЛ).

Ключові слова: *Hordeum vulgare*, *Bipolaris sorokiniana*, саліцилова кислота, гіпертермія, β -1,3-глюканаза, хітиназа, *L*-фенілаланінаммонійліаза, НАДФН-оксидаза, активні форми кисню