

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.35: 632.4: 633.16  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-317-324>

Поступило в редакцию 15.10.2018  
Received 15.10.2018

**Г. Е. Савченко, Т. С. Бачище, член-корреспондент Л. Ф. Кабашникова**

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь*

## **ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО $\beta$ -1,3-ГЛЮКАНА НА ВЕЛИЧИНУ pH АПОПЛАСТА И ЦИТОПЛАЗМЫ В ТКАНЯХ ЗДОРОВЫХ И ИНФИЦИРОВАННЫХ *BIPOLARIS SOROKINIANA* (SACC.) SHOEM. ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.)**

**Аннотация.** С помощью pH-чувствительных зондов FITC-декстрана и пиранина исследовали механизмы действия  $\beta$ -1,3-глюкана из эвглены (*Euglena gracilis*) на уровне изменений pH вне и внутри клетки в тканях листа 7-дневных проростков ячменя *in vivo*. Установлено, что инкубация листьев ячменя, отделенных от корней, на растворе  $\beta$ -1,3-глюкана (0,01 %) в течение 40 мин не вызывала закисления цитоплазмы как типичного неспецифического ответа растения на раневой стресс. Инокуляция интактных проростков спорами гриба *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. приводила к защелачиванию апопласта на 1,7 единиц pH, а предобработка проростков  $\beta$ -1,3-глюканом за сутки до грибного заражения способствовала его закислению на 1,04 единиц по сравнению с инфицированным вариантом, что свидетельствует об усилении работы АТФаз, выкачивающих протоны из цитоплазмы в апопласт. Проведенные исследования способствуют подбору оптимальных концентраций  $\beta$ -1,3-глюкана для иммуномодулирующих смесей.

**Ключевые слова:** яровой ячмень,  $\beta$ -1,3-глюкан, pH апопласта, pH цитоплазмы, флуоресценция, FITC, пиранин, *Hordeum vulgare* L., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.

**Для цитирования:** Савченко, Г. Е. Влияние экзогенного  $\beta$ -1,3-глюкана на величину pH апопласта и цитоплазмы в тканях здоровых и инфицированных *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) / Г. Е. Савченко, Т. С. Бачище, Л. Ф. Кабашникова // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 3. – С. 317–324. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-317-324>

**Galina E. Savchenko, Tatsiana S. Bachyshcha, Corresponding Member Liudmila F. Kabashnikova**

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## **INFLUENCE OF EXOGENOUS $\beta$ -1,3-GLUCANE ON THE pH LEVEL OF APOPLAST AND CYTOPLASM IN HEALTHY AND *BIPOLARIS SOROKINIANA* (SACC.) SHOEM. SEEDLINGS OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.)-INFECTED TISSUES**

**Abstract.** Effects of  $\beta$ -1,3-glucan from euglena (*Euglena gracilis*) were studied *in vivo* by evaluating pH changes outside and inside the cell in the tissues of the 7-day leaves of barley seedlings with the use of pH-sensitive probes of FITC-dextran and pyranine. It was found that the incubation of barley leaves separated from the roots in the solution of  $\beta$ -1,3-glucan (0.01 %) for 40 min did not cause acidification of cytoplasm as a typical nonspecific plant response to wound stress. The inoculation of intact seedlings with *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. spores resulted in alkalization of apoplast by 1.7 pH units, and pretreatment of seedlings with  $\beta$ -1,3-glucan a day before the fungal infection promoted its acidification (1.04 pH units) compared to the infected variant, indicating an increased performance of ATPase, which pumped protons from cytoplasm into apoplast. The conducted studies contribute to the selection of optimal concentrations of  $\beta$ -1,3-glucan for immunomodulatory mixtures.

**Keywords:** barley,  $\beta$ -1,3-glucane, pH of apoplast, pH of cytoplasm, fluorescence, FITC-dextran, pyranine, *Hordeum vulgare* L., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.

**For citation:** Savchenko G. E., Bachyshcha T. S., Kabashnikova L. F. Influence of the exogenous  $\beta$ -1,3-glucane on the pH level of apoplast and cytoplasm in healthy and *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.)-infected tissues. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 3, pp. 317–324 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-317-324>

**Введение.** Повышение иммунного статуса растений путем индукции природных защитных механизмов и разработка новых экологически безопасных препаратов на основе индукторов иммунитета тесно связаны с исследованием природы системного приобретенного защитного ответа [1] и механизмов устойчивости растений к патогенным микроорганизмам. На роль защитных средств такого рода претендуют эффективные иммуномодулирующие вещества полисахаридной природы –  $\beta$ -1,3/1,6-глюканы, широко используемые в медицинской практике. Установлено, что в результате избирательного связывания этих глюканов со специфическими рецепторами в клетках животных организмов активируется фагоцитарная функция,

начинают усиленно синтезироваться и высвобождаться вещества, являющиеся сигналом для других клеток иммунной системы [2]. В настоящее время известно, что и в растениях разных видов глюканы выполняют роль сигнальных молекул, обладающих элиситорными свойствами, и вызывают спектр защитных реакций при инфицировании [3–5], приводящих к повышению устойчивости и продуктивности. С другой стороны, показано, что сигнальные пути, лежащие в основе иммунного ответа, могут активироваться секретруемыми патогеном молекулами при их взаимодействии с растением-хозяином [6]. Тем не менее, механизмы действия экзогенных  $\beta$ -глюканов как на здоровое, так и на зараженное растение пока во многом остаются неясными, особенно на клеточном уровне реализации защитных реакций.

Использованный в нашей работе грибной патоген *Bipolaris sorociniana* (Sacc.) Shoem. (далее – *Bipolaris s.*) инфицирует растение злаков посредством прямого проникновения в эпидермис молодых листьев или через устьица [7], поэтому можно ожидать влияния инфицирования этим патогеном на уровне апопласта. С другой стороны, в самых общих чертах известно, что действующие на растения неблагоприятные факторы, включая биотический стресс, могут вызывать ряд неспецифических ответных реакций в клеточных мембранах, одной из которых является закисление цитоплазмы [1]. В связи с этим исследование изменений pH вне и внутри клетки может быть полезным как для выяснения особенностей взаимодействия конкретного патогена *Bipolaris s.* с проростками ячменя, так и для исследования индуцируемых глюканами защитных механизмов.

Следует отметить, что прижизненный мониторинг изменений pH – достаточно сложная в экспериментальном отношении задача. В настоящей работе с этой целью использованы pH-зависимые флуоресцентные зонды, с помощью которых исследованы разные по времени ответы растения на уровне изменений pH. Информативность быстрой реакции на мембранном уровне, отражающей сигнальную роль стрессора или иммуномодулятора при формировании механизмов защиты в растении, не вызывает сомнений. В то же время изменение pH при продолжительном действии стрессора (или как следствие его) может иметь значение для активности ферментов, локализованных во внутри- и межклеточных компартментах. Полученные результаты позволят приблизиться к раскрытию механизмов прайминга защитных реакций к грибным патогенам в растениях ярового ячменя под действием индуктора глюкановой природы.

**Материалы и методы исследования.** Работу проводили с растениями ячменя сорта Магутны, выращенными на полихроматичном белом свете ( $120 \text{ мкмоль квантов м}^{-2}\text{с}^{-1}$ ) при температуре  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . В одном типе экспериментов осуществляли мониторинг pH цитоплазмы в срезанных листьях 7-дневных проростков, помещенных в 0,01 %-ный водный раствор  $\beta$ -1,3-глюкана из эвгланы (Sigma-Aldrich) на разное время. В другом – использовали интактные проростки, часть которых в 4-дневном возрасте опрыскивали из пульверизатора раствором глюкана, а затем через сутки инокулировали спорами гриба *Bipolaris s.* Анализ состояния pH апопласта и цитоплазмы проводили в тканях листа проростков, достигших 7-дневного возраста.

Величину pH *in vivo* измеряли с помощью pH-чувствительных флуоресцентных зондов – FITC-декстрана (Sigma) и пиранина (Sigma). В обоих типах экспериментов зонды вводили в интактные проростки с транспирационным током через слегка подрезанные корни. FITC-декстран, не проникающий в цитоплазму из-за большого размера молекул [8], используется для оценки изменений pH только во внеклеточном пространстве. Поэтому проростки разных вариантов инкубировали в растворе этого зонда (1 мМ) не менее 1 ч и оставляли их в нем вплоть до начала флуоресцентных измерений. Пиранин, напротив, легко проникает из апопласта в клетку. Чтобы охарактеризовать состояние pH только в цитоплазме, зонд необходимо удалить из апопластного пространства. Для этого инкубированные в течение 1 ч на пиранине (1 мМ) проростки перенесли не менее чем на 1 ч на дистиллированную воду [8].

При использовании интенсивности флуоресценции для оценки pH *in vivo* всегда существует проблема, связанная с количеством зонда, поступившего в тот или иной компартмент клетки. Поэтому для более точного суждения об изменении pH предпочтителен способ, при котором используется нормированная флуоресценция, нивелирующая неизбежные концентрационные эффекты. Известно, что в области физиологически значимых изменений pH (от 5,0 до 7,0) молекула FITC существует как смесь нейтральной и анионной форм с довольно широким спектром

поглощения в области 450–470 нм [9]. Это позволило использовать для возбуждения флуоресценции FITC длину волны 465 нм, а в качестве внутреннего стандарта, повышающего точность определения изменений рН, – отношение интенсивности свечения двух пиков в спектре испускания зонда с максимумами при  $520 \pm 2$  и  $550 \pm 2$  нм. Ранее было показано, что величина отношения  $I_{520}/I_{550}$  не зависит от концентрации зонда [10], но реагирует на изменения рН, а в области их физиологически важных значений калибровочная кривая имеет достаточно хорошо выраженный линейный участок. На основании данных калибровочной зависимости для определения величины рН в апопластном пространстве пользовались уравнением  $\text{pH} = (I_{520}/I_{550} + 0,66) / 0,34$  [11].

Способ определения рН цитоплазмы был основан на технике двойного возбуждения [12], при которой измеряли величину отношения интенсивности флуоресценции пиранина в максимуме испускания (520 нм) при двух длинах волн возбуждения (404 и 456 нм), соответствующих двум максимумам в спектре его поглощения [13]. Согласно полученной нами калибровочной зависимости, величина  $I_{404}/I_{456}$  линейно связана с рН в области физиологических значений последнего и может быть рассчитана по уравнению  $\text{pH} = (96,3 - I_{404}/I_{456}) / 13,2$ . Таким образом, непосредственным результатом измерений во всех экспериментах являлись нормированные величины флуоресценции соответствующего зонда, на основании которых рассчитывали значения рН.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре СОЛАР СМ 2203 (Беларусь), используя специальную приставку для твердых объектов, в которую помещали нагруженные соответствующим зондом отрезки листьев, зажатые между двумя покровными стеклами. Во всех вариантах анализировали одинаковые участки отрезков листа длиной 3 см за вычетом верхушки (1 см). Известно, что многие структурно-функциональные параметры варьируют вдоль листа злаков, поэтому морфологическая идентичность анализируемых тканей является непременным условием для проведения любых сравнительных исследований.

При статистической обработке данных использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft), с помощью которой оценивали значения средней арифметической, ошибку средней величины (число биологических повторностей – от 3 до 5),  $t$  и  $P$ .

**Результаты и их обсуждение.** Динамика изменения рН-зависимого параметра флуоресценции пиранина ( $I_{404}/I_{456}$ ) во внутриклеточном пространстве тканей листа при погружении его на разное время в раствор  $\beta$ -1,3-глюкана показана на рис. 1. В квадратных скобках приведены соответствующие значения рН, рассчитанные на основе калибровочной зависимости. Видно, что инкубация срезанных листьев на дистиллированной воде в течение 60 мин вызывала изменение рН цитоплазмы на 0,35 единицы в сторону закисления (от 6,69 до 6,34), что обычно связывают с раневым эффектом [1; 11].

Введение в лист  $\beta$ -1,3-глюкана способствовало поддержанию более высокого уровня рН и в первые 40 мин инкубации наблюдали увеличение величины рН по сравнению с контролем.

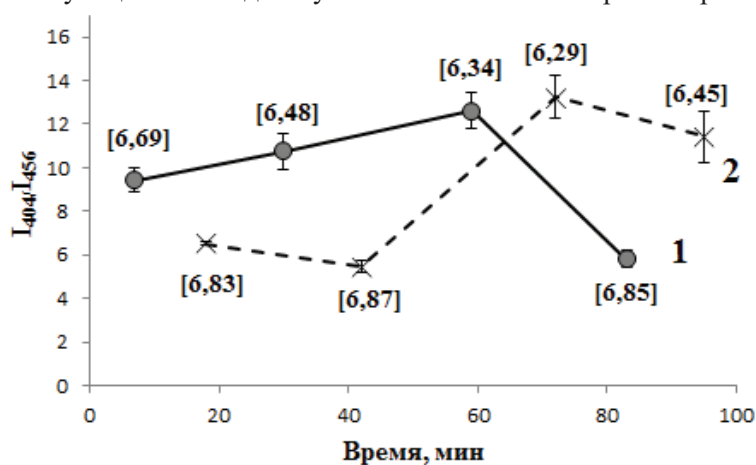


Рис. 1. Изменения рН-зависимого параметра флуоресценции пиранина ( $I_{404}/I_{456}$ ) в срезанных листьях ячменя, инкубированных на воде (1) или растворе  $\beta$ -1,3-глюкана (2) из эвглены (0,01 %). В скобках показаны соответствующие значения рН

Fig. 1. Changes in the pH-dependent fluorescence parameter of pyranine ( $I_{404}/I_{456}$ ) in cut barley leaves incubated on water (1) or on a solution of  $\beta$ -glucan (2) from Euglena (0.01 %). The respective pH values are shown in the square brackets

Таким образом, раневой эффект как неспецифическая ответная реакция на стресс, при которой частично ингибируется работа АТФаз, выкачивающих протоны из цитоплазмы, в присутствии глюкоана не обнаруживался в течение первых 40 мин. Затем значения рН в контрольном и опытном вариантах на некоторое время практически сблизились, после чего величина рН цитоплазмы в контроле увеличивалась до 6,85, а в глюкоановом варианте продолжала оставаться на уровне 6,29–6,45. В табл. 1 приведены результаты статистической обработки данных для исходного рН-зависимого флуоресцентного параметра  $I_{404}/I_{456}$ , позволяющие говорить о надежности различий минимальных и максимальных значений величины  $I_{404}/I_{456}$  в первые 40 мин инкубации на растворе глюкоана.

Т а б л и ц а 1. Результаты статистической обработки данных, характеризующих динамику изменения рН-зависимого параметра флуоресценции пиранина  $I_{404}/I_{456}$  в срезанных листьях ячменя, инкубированных на растворе  $\beta$ -1,3-глюкана из эвглены (0,01 %)

T a b l e 1. Statistical processing of data characterizing the dynamics of the pH-dependent fluorescence parameter of pyranine  $I_{404}/I_{456}$  in cut barley leaves incubated on water or on a solution of  $\beta$ -1,3-glucan from *Euglena* (0.01 %)

Вариант Variant	Время инкубации*, мин Time of incubation, min	$I_{404}/I_{456}$ Контроль Control	$I_{404}/I_{456}$ $\beta$ -1,3-глюкан $\beta$ -1,3-glucan	Варианты сравнения Comparison options	<i>t</i>	<i>P</i>
1	7	9,43 ± 0,52		1 и 4	6,19	0,001
2	18		6,51 ± 0,06	2 и 5	7,55	0,002
3	30	10,76 ± 0,58		3 и 4	6,98	0,001
4	42		6,87 ± 0,32	4 и 6	9,05	<0,001
5	59	12,61 ± 0,81		1 и 5	3,46	0,014
6	72		13,24 ± 0,96	1 и 6	3,82	0,008

П р и м е ч а н и е. \* – смещение времени инкубации между контролем и опытом обусловлено техникой последовательной прижизненной регистрации флуоресценции.

N o t e. \* – the incubation time offset between control and experiment is caused the technique of sequential lifetime registration of fluorescence.

Следует отметить, что по направленности изменений рН эффект глюкоана отличался от действия на срезанные листья ячменя использованного нами ранее иммуномодулятора иной природы –  $\beta$ -аминомасляной кислоты (АМК), под влиянием которой работа АТФаз в первые десятки минут инкубации листьев ячменя тормозилась в большей степени, чем при простом механическом повреждении, и внутриклеточная среда становилась более кислой по сравнению с контролем [11]. Таким образом, сам по себе  $\beta$ -1,3-глюкан, в отличие от АМК, действовавшей как ксенобиотик, не обладал стрессорным эффектом, во всяком случае при использованной в работе концентрации.

На рис. 2 показаны результаты действия грибного заражения интактных проростков и влияние предварительной обработки  $\beta$ -1,3-глюканом на величину рН в апопласте (*a*) и цитоплазме (*b*).

Прежде всего, видно, что в контрольном варианте содержимое апопласта было более кислым (рН = 4,90 ± 0,03), чем цитоплазмы (рН = 5,79 ± 0,40). Это можно объяснить выкачиванием протонов из цитоплазмы в апопласт. В результате заражения проростков грибом *Bipolaris s.* величина рН апопласта существенно возростала (6,60 ± 0,30) по сравнению с контролем (4,90 ± 0,03), что может свидетельствовать о снижении активности водородной помпы на плазмалемме. Предобработка глюкоаном позволила уменьшить ингибирующее влияние грибного заражения на активность выхода протонов из цитоплазмы в апопласт, в результате чего величина рН последнего (5,56 ± 0,27) снизилась на 1,04 единицы по сравнению с инфицированным вариантом (6,60 ± 0,30), отражая более активное поступление протонов в апопласт. Различия между всеми вариантами на уровне изменений рН апопласта подтверждены статистически (табл. 2).

Анализ результатов изменений рН в цитоплазме (рис. 2, *b*) при грибном заражении на фоне предобработки глюкоаном и без нее свидетельствует о более сложных регуляторных взаимоотношениях между апопластом и цитоплазмой при действии глюкоанов, которые нельзя объяснить влиянием последних только на активность водородных помп на плазмалемме. Прежде всего, через 2 суток после заражения нам не удалось обнаружить такого классического последствия

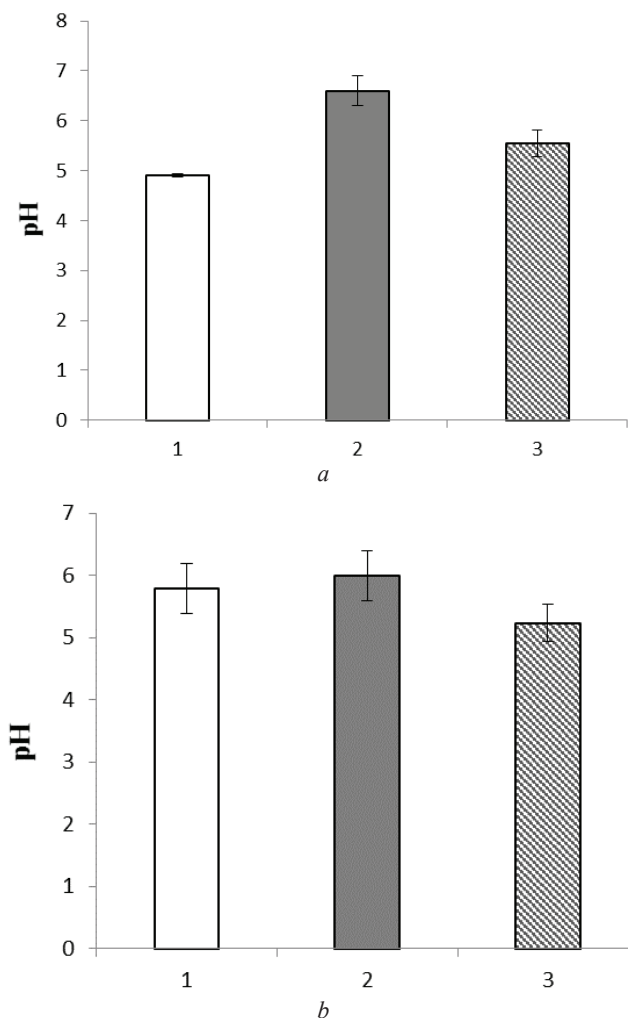


Рис. 2. Изменение рН апопласта (а) и цитоплазмы (b) в верхней части листа 7-дневных проростков ячменя, выращенных на воде (1); инокулированных в 5-дневном возрасте спорами *Bipolaris s.* (2); обработанных в 4-дневном возрасте раствором β-1,3-глюкана (0,01 %), а в 5-дневном возрасте – спорами *Bipolaris s.* (3)

Fig. 2. Changes in the pH of the apoplast (a) and of the cytoplasm (b) at the top of the leaf of 7-day-old barley seedlings grown on water (1); inoculated with *Bipolaris s.* spores at the age of 5 days (2); and treated at the age of 4 days with a solution of β-1,3-glucan (0.01 %), and at 5-day age – by the spores of *Bipolaris s.* (3)

Т а б л и ц а 2. Статистическая обработка результатов измерения величины рН в апопластах верхней части листа 7-дневных проростков ячменя, выращенных на воде (1), инокулированных спорами *Bipolaris s.* в 5-дневном возрасте (2), и проростков, обработанных в 4-дневном возрасте раствором β-глюкана из эвглены (0,01 %), а в 5-дневном возрасте – спорами *Bipolaris s.* (3)

Table 2. Statistical processing of pH measurements in apoplasts of at the top of the leaf of 7-day-old barley seedlings grown on water (1), inoculated with *Bipolaris s.* spores at the age of 5 days (2), and seedlings treated at the age of 4 days with a solution of β-glucan from euglena (0.01 %), and at 5-day age – by the spores of *Bipolaris s.* (3)

Вариант Variant	pH	Варианты сравнения Comparison options	t	P
1. Контроль	4,90 ± 0,03	1 и 2	6,33	0,002
2. <i>Bipolaris s.</i>	6,60 ± 0,30	2 и 3	3,37	0,015
3. β-1,3-глюкан + <i>Bipolaris s.</i>	5,56 ± 0,20	1 и 3	2,95	0,032

биотического стресса, как закисление цитоплазмы, которое должно было случиться при ингибировании протонной помпы на плазмалемме, если бы она была единственным регулятором рН цитоплазмы. Следует отметить, что закисление цитоплазмы при инфицировании могло происходить и в результате повреждения вакуолей, в то время как защелачивание – при избирательном активировании АТФаз на тонопласте, закачивающих протоны в вакуоли. В действительности же

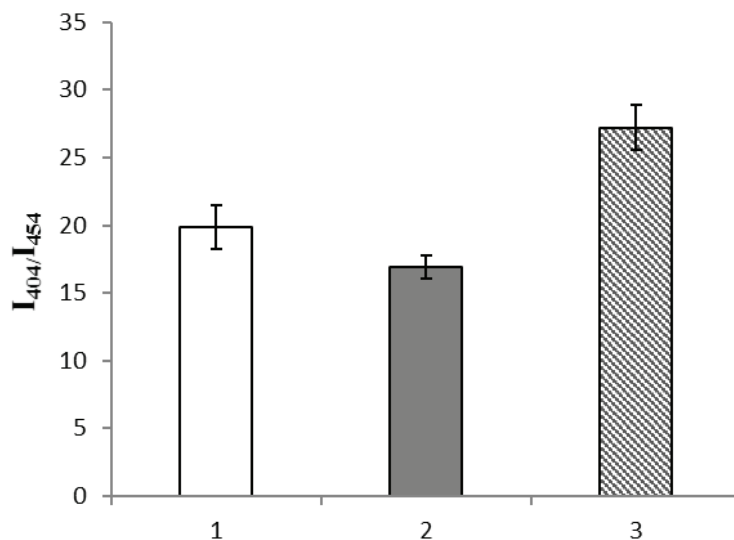


Рис. 3. Изменение параметров флуоресценции пиранина ( $I_{404}/I_{456}$ ) в верхней части листа 7-дневных проростков ячменя, выращенных на воде (1); инокулированных спорами *Bipolaris s.* в 5-дневном возрасте (2); обработанных в 4-дневном возрасте раствором  $\beta$ -1,3-глюкана (0,01 %), а в 5-дневном возрасте – спорами *Bipolaris s.* (3)

Fig. 3. The change in the fluorescence parameters of pyranine ( $I_{404}/I_{456}$ ) at the top of the leaf of 7-day-old barley seedlings grown on water (1); inoculated with *Bipolaris s.* spores at the age of 5 days (2); treated at the age of 4 days with a solution of  $\beta$ -1,3-glucan (0.01 %), and at 5-day age – by the spores of *Bipolaris s.* (3)

Т а б л и ц а 3. Статистическая обработка результатов измерения параметров флуоресценции пиранина ( $I_{404}/I_{456}$ ), введенного в верхнюю часть листа 7-дневных проростков ячменя, выращенных на воде (1), инокулированных спорами *Bipolaris s.* (2) в 5-дневном возрасте, и проростков, обработанных в 4-дневном возрасте раствором  $\beta$ -1,3-глюкана из эвглены (0,01 %), а в 5-дневном возрасте – спорами *Bipolaris s.* (3)

Table 3. Statistical processing of the results of the fluorescence parameters of pyranine ( $I_{404}/I_{456}$ ) introduced into the top of the leaf of 7-day-old barley sprouts grown on water (1), inoculated with *Bipolaris s.* spores at the age of 5 days (2), and seedlings treated at the age of 4 days with a solution of  $\beta$ -1,3-glucan from euglena (0.01 %), and at 5-day age – by the spores of *Bipolaris s.* (3)

Вариант Variant	$I_{404}/I_{456}$	Варианты сравнения Comparison options	$t$	$P$
1. Контроль	19,86 ± 1,63	1 и 2	1,6	0,183
2. <i>Bipolaris s.</i>	16,89 ± 0,87	2 и 3	4,1	0,015
3. $\beta$ -1,3-глюкан + <i>Bipolaris s.</i>	27,20 ± 1,68	1 и 3	2,6	0,063

статистически значимые различия в величине рН цитоплазмы между здоровыми и инфицированными растениями отсутствовали ( $5,79 \pm 0,40$  и  $5,99 \pm 0,40$ ), а тенденция к закислению цитоплазмы по сравнению с двумя другими вариантами выявилась только в результате предварительной обработки растений глюканом перед заражением ( $pH = 5,23 \pm 0,30$ ). Более четкая картина получена при рассмотрении исходных параметров флуоресценции пиранина (рис. 3, табл. 3), статистический анализ которых показал, что различия между вариантами 2 и 3 вполне надежны ( $p < 0,05$ ).

Известно, что рН в растительных тканях поддерживается комплексом биофизических и биохимических механизмов [14]. При этом главная роль отводится активности  $H^+$ -АТФаз, выкачивающих протоны из цитоплазмы в апопласт или тонопласт [15]. Различить активность двух типов АТФаз можно только с помощью специфических ингибиторов ферментов [15], что предстоит сделать в последующих исследованиях. В результате обработки проростков глюканом перед инфицированием, скорее всего, активизировались АТФазы на плазмалемме и поэтому апопластная среда становилась более кислой, чем при грибном заражении, хотя и не достигала значений, тестируемых в контроле. Однако при этом величина рН внутриклеточной среды изменялась также в сторону большего закисления, а не защелачивания (последнее мы наблюдали только в течение короткого времени действия глюкана в срезанных листьях, рис. 1). В связи с этим можно предположить, что последствием обработки проростков глюканом является активизация

нескольких механизмов, действующих внутри цитоплазмы и влияющих на величину ее pH (или ответственных за ее поддержание). Иными словами, наряду с тем, что глюкан каким-то образом препятствовал снижению активности протонных насосов на плазмалемме при последующем грибном заражении (возможно, оказывая опосредованное влияние на количество соответствующих АТФаз), его действие распространялось и на биохимические события в цитоплазме, поддерживающие в ней более высокий уровень протонов. Не исключено, что при этом начинал активнее работать биохимический pH-стат [14]. Такие процессы на уровне цитоплазмы явно не происходили при инфицировании растений ячменя грибным патогеном. Таким образом, используя флуоресцентные зонды *in vivo*, мы показали, что величина pH в цитоплазме отражает не только работу АТФаз на плазмалемме, но и, возможно, направленность биохимических процессов, поддерживающих, в конечном итоге, буферную емкость цитоплазмы.

**Заключение.** Полученные результаты продемонстрировали эффективность применения флуоресцентных зондов для исследования направленности прижизненных изменений pH в проростках злаков. Важно подчеркнуть, что рассчитанные величины pH для разных компартментов достаточно хорошо совпадали с имеющимися в литературе данными, полученными другими способами [15].

Установлено, что сравнительно быстрый ответ на действие водного раствора  $\beta$ -1,3-глюкана из эвглени (0,01 %) в тканях листа проростков ячменя реализовался в первые 40 мин инкубации и препятствовал наблюдавшемуся в контроле закислению цитоплазмы, характерному для типичной неспецифической реакции растения на раневой стресс. Полученный результат служит указанием на то, что использованная в работе концентрация глюкана не являлась стрессовой и может быть использована при создании иммуномодулирующих составов для защиты растений при патогенезе. Обнаружен пролонгированный эффект  $\beta$ -1,3-глюкана (0,01 %) на уровне апопласта, указывающий на возможность усиления работы АТФаз, закачивающих протоны из цитоплазмы в апопласт, активность которых снижалась при заражении *Bipolaris s.* Одновременно влияние глюкана при последующем грибном заражении проявилось также и в поддержании более кислой среды цитоплазмы, вероятно, в результате воздействия на биохимические процессы, участвующие в регуляции pH.

Проведенные исследования, помимо их важности для понимания природы механизмов действия  $\beta$ -глюкана, способствуют его оптимальному использованию в качестве иммуномодулятора, обеспечивающего повышение устойчивости растений ячменя к поражению *Bipolaris s.*

#### Список использованных источников

1. Поликсенова, В. Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) / В. Д. Поликсенова // Вестн. БГУ. Сер. 2. – 2009. – № 1. – С. 48–60.
2. Лукьянчук, В. Д. Бета-глюканы как основа создания средств иммуномодулирующего действия / В. Д. Лукьянчук, Е. М. Мищенко, М. Н. Бабенко // Український медичний часопис. – 2011. – № 5 (85). – С. 92–93.
3. An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance / J. Fliegmann [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, N 2. – P. 1132–1140. <https://doi.org/10.1074/jbc.m308552200>
4. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco / O. Klarzynski [et al.] // Plant Physiol. – 2000. – Vol. 124, N 3. – P. 1027–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1027>
5. Elicitor-active oligosaccharides from algal laminaran stimulate the production of antifungal compounds in alfalfa / A. Kobayashi [et al.] // Zeitschrift für Naturforschung. – 1993. – Vol. 48, N 7–8. – P. 575–579. <https://doi.org/10.1515/znc-1993-7-808>
6. Кабашникова, Л. Ф. Молекулярные механизмы взаимодействия растений и фитопатогенов: врожденный иммунитет / Л. Ф. Кабашникова // Журн. Белорусского государственного ун-та. Экология. – 2018. – № 2. – С. 26–37.
7. Пересыпкин, В. Ф. Атлас болезней полевых культур / В. Ф. Пересыпкин. – Киев, 1981. – 248 с.
8. pH regulation in apoplastic and cytoplasmic cell compartments of leaves / G. Savchenko [et al.] // Planta. – 2000. – Vol. 211, N 2. – P. 246–255. <https://doi.org/10.1007/s004250000280>
9. Sjoback, R. Absorbtion and fluorescence properties of fluorescein / R. Sjoback, J. Nygren, M. Kubista // Spectrochimica acta. Part A. – 1995. – Vol. 51, N 6. – P. 7–21. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01421-p](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01421-p)
10. Савченко, Г. Е. Способ определения pH в апопласте листьев растений злаков / Г. Е. Савченко, Л. В. Пашкевич, Ю. А. Власова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. ст. в 2 ч. – Минск, 2014. – Ч. 2. – С. 53–55.
11. Savchenko, G. E. Effect of exogenous  $\beta$ -amino butyric acid on *exo*- and *endo*-cellular pH and redox state of ascorbate in leaves of barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) / G. E. Savchenko, L. F. Kabashnikova, L. M. Abramchik // Genetics and Plant Physiology. – 2016. – Vol. 6, N 3–4. – P. 158–166.

12. Катичева, Л. А. Количественное определение изменений pH при генерации потенциалов возбуждения в стебле высшего растения методом спектрофлуориметрии / Л. А. Катичева, Е. К. Акинчиц, В. А. Воденев // Вестн. Нижегородского ун-та им. Н. И. Лобачевского. – 2012. – № 3 (1). – С. 118–121.

13. Giuliano, K. A. Determination of intracellular pH of BALB/c-3T3 cells using the fluorescence of pyranine / K. A. Giuliano, R. J. Gilles // *Anal. Biochim.* – 1987. – Vol. 167, N 2. – P. 362–371. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90178-3)

14. Куличихин, К. Ю. Активность ферментов биохимического pH-стата в кончиках корней злаков в условиях кислородной недостаточности / К. Ю. Куличихин, Т. В. Чиркова, К. В. Фагерстедт // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 3. – С. 418–430.

15. Особенности регуляции вакуолярной H<sup>+</sup>-АТФазы растительных клеток / А. А. Кирпичникова [и др.] // Вестн. Санкт-Петербургского ун-та. Сер. 3. – 2016. – Вып. 2. – С. 149–160.

## References

1. Poliksenova V. D. Induced resistance of plants to pathogens and abiotic stress factors. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2 [Bulletin of the Belorussian State University. Series 2]*, 2009, no. 1, pp. 48–60 (in Russian).

2. Lukianchuk V. D., Mischenko E. M., Babenko M. N. Beta-glucans as the basis for the creation of immunomodulatory agents. *Ukrainskiy medichniy chasopis [Ukrainian Medical Journal]*, 2011, no. 5 (85), pp. 92–93 (in Russian).

3. Fliegmann J., Mithöfer A., Wanner G., Ebel J. An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 2, pp. 1132–1140. <https://doi.org/10.1074/jbc.m308552200>

4. Klarzynski O., Plesse B., Joubert J. M., Yvin J. C., Kopp M., Kloareg B., Fritig B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, 2000, vol. 124, no. 3, pp. 1027–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1027>

5. Kobayashi A., Tai A., Kanzaki H., Kawazu K. Elicitor-active oligosaccharides from algal laminaran stimulate the production of antifungal compounds in alfalfa. *Zeitschrift für Naturforschung*, 1993, vol. 48, no. 7–8, pp. 575–579. <https://doi.org/10.1515/znc-1993-7-808>

6. Kabashnikova L. F. Molecular mechanisms of plants and phytopatogens interaction: innate immunity. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya = Journal of the Belorussian State University. Ecology*, 2018, no. 2, pp. 26–37 (in Russian).

7. Peresypkin V. F. *Atlas of diseases of field crops*. Kiyev, 1981. 248 p. (in Russian).

8. Savchenko G., Wiese C., Neimanis S., Hedrich R., Heber U. PH regulation in apoplastic and cytoplasmic cell compartments of leaves. *Planta*, 2000, vol. 211, no. 2, pp. 246–255. <https://doi.org/10.1007/s004250000280>

9. Sjoback R., Nygren J., Kubista M. Absorbion and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica acta. Part A*, 1995, vol. 51, no. 6, pp. 7–21. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01421-p](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01421-p)

10. Savchenko G. E., Pashkevich L. V., Vlasova Yu. A. Method for determination of pH in the apoplast of leaves of cereal plants. *Molekulyarnyye, membrannyye i kletochnyye osnovy funktsionirovaniya biosistem [Molecular, membrane and cellular basis of functioning of biosystems]*. Minsk, 2014, vol. 2, pp. 53–55 (in Russian).

11. Savchenko G. E., Kabashnikova L. F., Abramchik L. M. Effect of exogenous β-amino butyric acid on exo- and endo-cellular pH and redox state of ascorbate in leaves of barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Genetics and Plant Physiology*, 2016, vol. 6, no. 3–4, pp. 158–166.

12. Катичева Л. А., Акинчиц Е. К., Воденев В. А. Quantitation of pH changes in a higher plant stem at generation of excitation potentials using the spectrofluorimetric method. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N. I. Lobachevskogo = Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*, 2012, vol. 3, no. 1, pp. 118–121 (in Russian).

13. Giuliano K. A., Gilles R. J. Determination of intracellular pH of BALB/c-3T3 cells using the fluorescence of pyranine. *Analytical Biochemistry*, 1987, vol. 167, no. 2, pp. 362–371. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90178-3)

14. Kulichikhin K. Y., Fagerstedt K. V., Chirkova T. V. Activity of biochemical pH-stat enzymes in cereal root tips under oxygen deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2009, vol. 56, no. 3, pp. 377–388.

15. Kirpichnikova A. A., Chen T., Romanyuk D. A., Yemelyanov V. V., Shishova M. F. Peculiar features of plant cell vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase regulation. *Vestnik Sant-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3 = Vestnik of Saint Petersburg University. Series 3*, 2016, vol. 2, pp. 149–160 (in Russian).

## Информация об авторах

Савченко Галина Евсеевна – канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gesavchenko@gmail.com.

Бачище Татьяна Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatsiana.bachyshcha@gmail.com.

Кабашникова Людмила Федоровна – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kabashnikova@ibp.org.by.

## Information about the authors

Savchenko Galina Evseevna – Ph. D. (Biology), Associated professor, Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gesavchenko@gmail.com.

Bachyshcha Tatsiana Sergeevna – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatsiana.bachyshcha@gmail.com.

Kabashnikova Liudmila Fedorovna – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Associated professor, Head for the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kabashnikova@ibp.org.by.