

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 632.4:635.63:577.352.38

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-263-274>

Поступила в редакцию 21.02.2020

Received 21.02.2020

**Л. В. Пашкевич**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СИСТЕМНОЙ ПРИОБРЕТЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У РАСТЕНИЙ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ТЕМНО-БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ**

**Аннотация.** Исследованы физиолого-биохимические ответные реакции растений ярового ячменя на заражение гемибитрофным фитопатогенным грибом *Bipolaris sorokiniana*. Показано, что данные ответы регулируются сигнальными путями с участием медиатора салициловой кислоты (СК), что связано с локализованным накоплением активных форм кислорода (АФК) в подвергшихся инфицированию и/или соседних клетках. Выявлено активирование выделенной из листьев ячменя на 1-е и 3-и сутки после грибного заражения микросомальной фракции НАДФН-оксидазы, которая, как известно, ответственна за быстрое образование АФК в растительных клетках под влиянием грибного заражения. При этом активность фермента пероксидазы, осуществляющего детоксикацию АФК, в частности  $H_2O_2$ , на 1-е и 3-и сутки после воздействия увеличилась по отношению к контролю (незараженные растения) в 1,6 и 2,2 раза соответственно. Включение механизмов антиоксидантной защиты привело к стабилизации процессов перекисного окисления липидов через несколько суток после инфицирования. Показано достоверное возрастание в инфицированных тканях растений общего содержания водорастворимых фенольных веществ, оказывающих защитное действие на растения в условиях стресса, а также увеличение свободного пула эндогенной СК на 9 и 30 % в течение первых 24 ч и последующих 3 сут после инфицирования соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эндогенная СК вовлечена в ответные реакции на заражение проростков ячменя *Bipolaris sorokiniana* и является необходимым элементом для активации SAR (systemic acquired resistance), что проявляется в накоплении свободной СК и уменьшении содержания ее конъюгированной формы в ответ на заражение.

**Ключевые слова:** салициловая кислота, системная приобретенная устойчивость, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, пероксидаза, НАДФН-оксидаза, фенольные вещества, яровой ячмень *Hordeum vulgare*, *Bipolaris sorokiniana*

**Для цитирования:** Пашкевич, Л. В. Механизмы формирования системной приобретенной устойчивости у растений ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) при инфицировании возбудителем темно-бурой пятнистости / Л. В. Пашкевич // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 263–274. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-263-274>

**Lyubov V. Pashkevich**

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

## **MECHANISMS FORMATION OF SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE IN SPRING BARLEY PLANTS (*HORDEUM VULGARE* L.) DURING INFECTION BY THE PATHWAY OF DARK BROWN SPOT**

**Abstract.** The physiological and biochemical responses in spring barley plants to infection with a hemibiotrophic phytopathogenic fungus *B. sorokiniana* was studied. It was found that these responses of the plant organism are regulated by signaling pathways with the participation of the salicylic acid mediator (SA) and are associated with oxidative stress-localized accumulation of reactive oxygen molecules (ROS) in infected cells and/or neighboring cells. The activation of the microsomal fraction of NADPH oxidase isolated from barley leaves on days 1 and 3 after fungal infection was revealed, which is known to be responsible for the rapid formation of ROS in plant cells under the influence of fungal infection. At the same time, an increase in the activity of the peroxidase enzyme detoxifying ROS, in particular  $H_2O_2$ , was observed in relation to the control (uninfected plants) by 1.6 and 2.2 times on the 1st and 3rd day after exposure, respectively. The inclusion of antioxidant defense mechanisms led to the stabilization of lipid peroxidation processes several days after infection. A reliable increase in the total content of water-soluble phenolic substances in the infected plant tissues was shown to have a protective effect on plants under stress, as well as an increase in the free pool of endogenous SA by 9 and 30 % during the first 24 hours and the next 3 days after infection, respectively.

The data obtained indicate that endogenous SA is involved in the responses to infection of *B. sorokiniana* barley seedlings and is a necessary factor for the activation of SAR (systemic acquired resistance), which manifests itself in the accumulation of free SA and a decrease in its conjugated form in response to infection.

**Keywords:** salicylic acid, systemic acquired resistance, lipid peroxidation, reactive oxygen species, peroxidase, NADPH-oxidase, phenolic substances, spring barley *Hordeum vulgare*, *Bipolaris sorokiniana*

**For citation:** Pashkevich L. V. Mechanisms formation of systemic acquired resistance in spring barley plants (*Hordeum vulgare* L.) during infection by the pathway of dark brown spot. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 263–274 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-263-274>

**Введение.** В процессе своей жизнедеятельности растения постоянно получают биотические и абиотические сигналы из окружающей среды, поэтому вынуждены различать безвредные сигналы и потенциально опасные. Как следствие, у растений развились различные адаптивные иммунные механизмы, которые обеспечивают им естественную защиту против патогенных факторов [1].

С помощью специальных рецепторов (pattern-recognition receptor, PRR), расположенных на поверхности растительной клетки, происходит распознавание патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs), что приводит к активации паттерн-активированного иммунитета (pattern-triggered immunity, PTI) [2]. PAMP представляют собой широко консервативные микробные молекулы, такие как липополисахариды, пептидогликаны, бактериальный флагеллин или грибковый хитин. Во многих случаях PTI предотвращает дальнейшую колонизацию растений патогеном. Тем не менее некоторые патогены в процессе эволюции выработали эффекторный белки, нацеленные на компоненты сигнальных путей (фитогормоны) в растении-хозяине [3]. Патогенные «имитаторы фитогормонов», структурно и/или функционально напоминающие фитогормоны или сигнальные компоненты фитогормонов, вызывают подавление PTI. С такими патогенами растения борются с помощью эффекторного иммунитета (effector-triggered immunity, ETI), который опосредуется белками внутриклеточной резистентности (R-белками), распознающими молекулы T3SEs, так называемые эффекторы, вводимые патогенами в клетки растений [4]. Гены распознавания патогенных микроорганизмов (PPRs), по-видимому, не способны различать патогены по их типу питания, чтобы модулировать специфический ответ. Они участвуют в восприятии инвазии патогена и запуске неспецифических реакций иммунной системы [5, 6]. И PTI, и ETI связаны с активацией защитных процессов в инокулированной ткани, в том числе генерацией АФК, увеличением внутриклеточного потока  $Ca^{2+}$ , активацией митоген-активированных протеинкиназ (MAPKs), повышенной экспрессией различных защитных генов, синтезом антимикробных соединений и накоплением салициловой кислоты (СК) [2, 7].

Таким образом, активация путей защитной сигнализации (PTI или ETI) приводит к генерации мобильного сигнала, который перемещается из локальной инфицированной ткани в дистальную ткань, вызывая формирование системной приобретенной устойчивости (SAR), являющейся формой долговременного иммунитета к широкому спектру возбудителей [8]. СК при этом выступает важным медиатором иммунного ответа как PTI, так и ETI [9] и необходимым элементом активации SAR [10].

SAR опосредует генерацию в первичном очаге инфекции ряда мобильных сигналов, которые распространяются в более отдаленные ткани главным образом через флоэму, благодаря чему растения становятся устойчивее к последующему заражению [11]. Реализация такого вида устойчивости в растении происходит, как отмечалось ранее, через сигнальные системы с участием СК [12]. Этот тип устойчивости является неспецифическим; он эффективен по отношению к различным стрессорам и повторному заражению растений, прежде всего к биотическим и абиотическим факторам, которые индуцируют некрозы клеток и тканей растений [13]. Молекулярно SAR характеризуется повышением экспрессии большого числа патоген-зависимых генов (PR-генов) как в местных, так и в системных тканях [14]. В последние годы выявлена ключевая роль ко-активатора транскрипционных факторов NPR1 (non-expresser of pathogenesis-related proteins 1) в передаче сигналов от СК в ядро [10]. Скрининг мутантов показал, что NPR1 является основным регулятором СК-опосредованных ответов при реализации SAR [15]. В норме его экспрессия в растении небольшая, но под влиянием стресс-фактора и при обработке СК возрастает в несколько раз [16].

В ответ на увеличение внутриклеточного содержания СК регуляторный белок распадается на мономеры за счет уменьшения межмолекулярных мостиков, перемещается в ядро и взаимодействует с факторами транскрипции TGA, индуцируя экспрессию PR-генов [17]. Активация экспрессии гена *PR-1* вызывается факторами TGA 2, TGA 5 и TGA 6 [18]. Возможно, регуляция ядерной локализации NPR1 и активация TGA-факторов контролируется изменением окислительно-восстановительного потенциала клетки после ее обработки СК. Недавние исследования показали, что СК напрямую связывается с адапторными белками NPR1, NPR3 и NPR4, регулирует их взаимодействие с NPR1, а также контролирует стабильность белка NPR1 [19].

Запуск SAR может быть индуцирован вирулентными, авирулентными и непатогенными микроорганизмами, а также иммуномодуляторами, которые представляют собой доступные для растений продукты промежуточных реакций иммунного ответа. Такими веществами могут выступать экзогенная СК, метилсалицилат, 2,6-дихлор-изоникотиновая кислота (INA), бензо(1,2,3)тиадизол-7-карботионовой кислоты S-этиловый эфир (BTH), системин и др. [20, 21]. В зависимости от вида растения и элиситора для создания SAR необходимо определенное время для накопления в растении СК и патогензависимых белков [22].

Широко распространенный во всем мире гемибіотрофный грибок *Bipolaris sorokiniana* (= *Drechslera sorokiniana*, *Helminthosporium sativum*) вызывает темно-бурую пятнистость листьев (гельминтоспориоз) зерновых культур, а также белоколось, корневую гниль и черный зародыш семян [23]. Гельминтоспориоз – одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний ячменя, поражающих растения в период от всходов до созревания [24]. Вредоносный потенциал гриба снижает урожайность зерновых культур (потери урожая зерна составляют от 38 до 87 %) [25]. Ситуация осложняется отсутствием устойчивых к данному заболеванию форм пшеницы и ячменя [26]. Исключение составляют самоклональные линии этих культур, которые способны в условиях относительно жесткого инфекционного фона сохранять урожайность.

В мировом масштабе потери урожая пшеницы и ячменя, вызванного *B. sorokiniana*, указывают на необходимость поиска альтернативных стратегий для борьбы с этим патогеном, которые обеспечивали бы запуск естественных защитных систем.

Цель работы – исследование механизмов SAR и веществ, индуцирующих в растениях высокоэффективный иммунный ответ.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования служили проростки ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Магутны, выращенные при 16-часовом фотопериоде на полихроматическом белом свете ( $120 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) при температуре 22/16 °C (день/ночь) на специальных сетках на слое фильтровальной бумаги, увлажненной водой. Листья 4-дневных растений равномерно опрыскивали из пульверизатора водным раствором, содержащим СК ( $10^{-4} \text{ М}$ ), из расчета 5 мл раствора на сетку. Инокуляцию зеленых проростков ячменя патогеном *Bipolaris sorokiniana* осуществляли путем опрыскивания 5-дневных листьев споровой взвесью, содержащей  $10^6$  спор/мл. Грибок *Bipolaris sorokiniana* предварительно выращивали на картофельно-глюкозном агаре в течение 2 недель. Анализ исследуемых проростков проводили через сутки и на 3-и сутки после воздействия неблагоприятных факторов. В качестве контрольного варианта использовали незараженные растения, выращенные в идентичных условиях.

Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) тестировали по количеству малонового диальдегида (МДА) [27]. Растительный материал гомогенизировали в 5 мМ фосфатном буфере (рН 7,2). К гомогенату добавляли равный объем 0,5 %-ной тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 20 %-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Полученные образцы нагревали на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали при 7000 об/мин. Супернатант измеряли фотометрически при  $\lambda = 532 \text{ нм}$ . Количество МДА рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА с ТБК, который с поправкой на неспецифическое поглощение при  $\lambda = 600 \text{ нм}$  ( $1,5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) составил  $1,55 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [28].

Общий уровень АФК оценивали с помощью флуоресцентного теста, в основе которого лежит образование дихлорфлуоресцеина (ДХФ) из нефлуоресцирующего дихлорфлуоресцеин-диацетата (ДХФДА) в экстрактах листьев. Навески листьев по 0,25 г гомогенизировали в 2 мл 0,2 н  $\text{HClO}_4$ . Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g. Для нейтрализации кислотности

к 500 мкл суспензии добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение pH – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 g. Для определения АФК к 950 мкл 0,15 М Трис-НСL буфера (pH 7,5) последовательно добавляли 25 мкл нейтрализованного супернатанта и 25 мкл 0,15 мМ раствора ДХФДА. Контролем служила проба, состоящая из 975 мкл 0,15 М Трис-НСL буфера и 25 мкл 0,15 мМ ДХФДА. Все пробы инкубировали в течение 20 мин в термостате при 37 °С в темноте. Уровень АФК определяли, регистрируя флуоресценцию ДХФ ( $\lambda_{\text{возб}} = 496$ ,  $\lambda_{\text{пер}} = 524$ ) с помощью спектрофлуориметра «Солар СМ 2203» («Солар», Беларусь) [29].

Содержание пероксида водорода в экстрактах листьев определяли с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ , катализируемая пероксидазой хрена [30]. Навески листьев по 0,3 г растирали в фарфоровой ступке в жидком азоте до порошка. Затем приливали 1 мл 0,2 н  $\text{HClO}_4$  и растирали до гомогената. Последний переносили в центрифужные пробирки, смывая ступку еще 1 мл 0,2 н  $\text{HClO}_4$ . Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 g на центрифуге К-24. Для нейтрализации кислотного значения pH к 500 мкл супернатанта добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение pH – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 g на центрифуге для эпиндорфов Beckman culter Microfuge 16. Для определения количества пероксида водорода к 930 мкл 0,1 М Трис-НСL буфера (pH 7,0) последовательно добавляли 10 мкл раствора пероксидазы хрена (200 ед/мл) и 10 мкл 0,1 мМ раствора скополетина. Реакцию запускали путем добавления 50 мкл супернатанта. Контролем служила проба, состоящая из 950 мкл 0,1 М Трис-НСL буфера и 50 мкл супернатанта. Вторым контролем служила проба, состоящая из 980 мкл 0,1 М Трис-НСL буфера, 10 мкл раствора пероксидазы хрена (2500 ед/мл) и 10 мкл 0,1 мМ раствора скополетина. Содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяли, регистрируя флуоресценцию скополетина ( $\lambda_{\text{возб}} = 370$  нм,  $\lambda_{\text{пер}} = 464$  нм) на спектрофлуориметре «Солар СМ 2206» (Беларусь). Содержание пероксида водорода рассчитывали в относительных единицах по снижению интенсивности флуоресценции скополетина.

Функциональную активность пероксидазы измеряли спектрофотометрически [31], используя в качестве субстрата бензидин, в результате окисления которого пероксидазой в присутствии пероксида водорода образуется соединение синего цвета. Метод основан на измерении времени, за которое исследуемый раствор достигает определенной оптической плотности. Навеску листьев (50 мг) растирали в 10 мл 0,2 М ацетатного буфера (pH 5,4) и центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин. Далее к 5 мл гомогената добавляли 5 мл ацетатного буфера и 5 мл бензидина. Реакцию окисления субстрата инициировали путем добавления 50 мкл 1 %-ного пероксида водорода. Измерение кинетики реакции окисления проводили с ежесекундным шагом в течение 300 с на спектрофотометре при  $\lambda = 605$  нм.

Активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН в микросомальной и цитозольной фракциях, полученных в результате дифференциального ультрацентрифугирования [32]. Для этого зеленые листья (4–5 г) гомогенизировали в предварительно охлажденной во льду ступке с 50 мМ HEPES-КОН буфером (pH 7,8), содержащим 250 мМ сахарозы и 1 мМ ЭДТА. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань для удаления нерастертых фрагментов и центрифугировали при 600 g 15 мин для осаждения тяжелых органелл и компонентов клетки. Надосадочную жидкость центрифугировали при 42 000 g в течение 20 мин для осаждения митохондрий. Полученный супернатант центрифугировали в течение 1 ч при 140 000 g для разделения на цитозольную (супернатант) и микросомальную (осадок) фракции. Осадок ресуспендировали в буфере, используемом для гомогенизации листьев. В полученных фракциях (цитозольной и микросомальной) определяли активность НАДФН-оксидазы по методу, предложенному в работе [33]. Для этого к реакционной среде, состоящей из 0,8 мл буфера (50 мМ HEPES-КОН, pH 7,8), 0,1 мМ ЭДТА и 1 мкМ KCN, добавляли 0,2 мл растительной пробы и предынкубировали 1 мин при 30 °С. Реакцию инициировали путем добавления 100 мкМ НАДФН, скорость окисления которого регистрировали на спектрофотометре, определяя степень его уменьшения в адсорбции при 340 нм (A340) в течение 5 мин. Для расчетов использовали коэффициент экстинции  $6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Для нормирования данных по содержанию белка в анализируемом материале измеряли его содержание по методу Лоури [34], используя коммерческий реактив Фолина.

Содержание общего пула водорастворимых фенольных соединений оценивали с помощью реактива Фолина–Чокальтеу [35]. Для этого 0,5 г свежих листьев ячменя измельчали и растирали в фарфоровой ступке в 5 мл горячей воды ( $\approx 90^\circ\text{C}$ ). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 7000 об/мин, используя центрифугу ОПН-8. Полученный супернатант переносили в стеклянные пробирки, осадок ресуспендировали в 5 мл горячей воды и центрифугировали в течение 10 мин при 7000 об/мин. Супернатанты объединяли. Данную процедуру повторяли еще раз. Объединенный супернатант доводили водой до 15 мл. Далее в отдельную пробирку последовательно приливали 250 мкл супернатанта, 1500 мкл дистиллированной воды, 125 мкл реактива Фолина и инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре. Затем приливали 250 мкл насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 375 мкл дистиллированной воды, выдерживали полученный раствор в течение 1 ч при комнатной температуре и определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре «Солар РВ 2201» («Солар», Беларусь) при 750 нм. Содержание фенольных соединений рассчитывали в относительных единицах.

Содержание СК определяли методом ВЭЖХ [36]. Для этого навеску (0,8 г) сухих листьев ячменя растирали в ступке в порошок и добавляли небольшое количество кварцевого песка. Фенольные компоненты экстрагировали 50 %-ным этанолом, содержащим 0,05 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Полученный гомогенат переносили в пробирки и помещали на 45 мин в ультразвуковую баню при комнатной температуре. Экстракты дважды осветляли посредством центрифугирования при 13 000 об/мин в течение 15 мин. Объемы осветленных экстрактов объединяли с супернатантом, полученным после ресуспендирования осадка в 2 мл среды и последующего центрифугирования при 13 000 об/мин в течение 15 мин. Полученный объединенный экстракт использовали для определения содержания СК. Объединенный экстракт упаривали до 1 мл, затем центрифугировали и делили на две части. Для определения содержания свободной СК к одной части приливали эквивалентное количество 10 %-ной ТХУ. Для определения связанной СК к другой части добавляли эквивалентное количество 8 н  $\text{HCl}$  и инкубировали 1 ч при  $80^\circ\text{C}$  для прохождения химического гидролиза конъюгатов СК. По окончании инкубации пробы охлаждали и центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин, затем супернатанты переносили в чистые пробирки и переводили в органическую фазу, дважды разделяя в 3 мл смеси этилацетата с циклогексаном (1:1). Верхний органический слой, содержащий фенольные соединения, переносили в свежие пробирки и упаривали. Концентрат ресуспендировали в 0,5 мл подвижной фазы, центрифугировали и отбирали по 300 мкл для разделения на ВЭЖХ. Для изократного разделения СК использовали содержащую 25 % ацетонитрила и 75 % ацетатного буфера (рН 5,5) подвижную фазу со скоростью потока 0,5 мл/мин, для регистрации выхода СК – флуоресцентный детектор ( $\lambda_{\text{возб}}$  – 300 нм,  $\lambda_{\text{рег}}$  – 415 нм). Содержание СК рассчитывали по площади регистрируемых пиков.

**Результаты и их обсуждение.** Одним из первых цитологически выявляемых симптомов взаимодействия растительного организма с патогеном выступает накопление АФК, особенно  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в месте заражения патогеном, что может служить маркером ранней диагностики степени грибного поражения растений [37]. Связь между клетками в передаче сигналов с помощью АФК на большие расстояния играет ключевую роль в реакции растений на вредителей, механическое поражение и экстремальные условия окружающей среды. В работе [38] сообщается о быстром системном сигнале у *Arabidopsis thaliana*, который распространялся со скоростью 8,4 см/мин и зависел от гена *RbohD* – гомолога оксидазы респираторного взрыва. Распространение сигнала, сопровождавшееся накоплением АФК во внеклеточных пространствах, и его постепенное затухание в местах, удаленных от места инициации, подтверждает важную роль АФК в передаче быстрых, дальних и межклеточных сигналов в растениях.

Согласно полученным нами экспериментальным данным, через 24 ч после инфицирования грибом *B. sorokiniana* зеленых проростков ячменя уровень АФК в зараженных листьях превышал контроль более чем в 3 раза (рис. 1). Тенденция к увеличению количества АФК в клетках растений в ответ на действие грибного заражения сохранялась и на протяжении последующих двух суток, что свидетельствует о протекании в растении защитно-адаптационных реакций в ответ на проникновение гифов гриба в эпидермальные клетки.

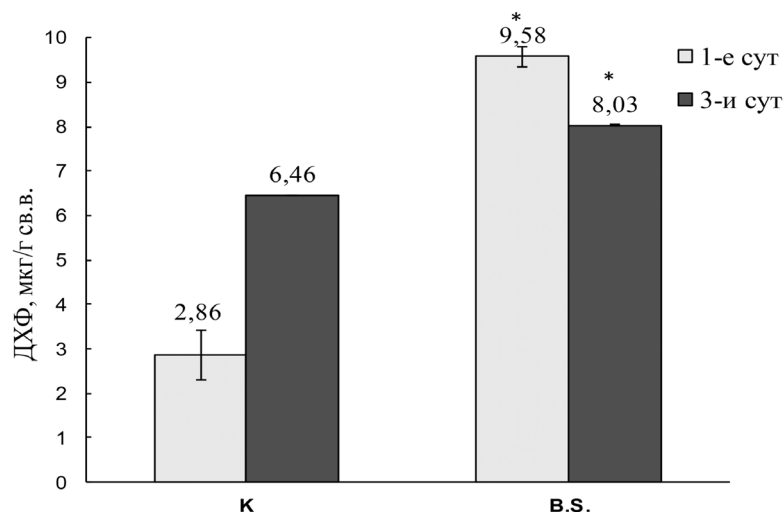


Рис. 1. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на содержание АФК в листьях 6- и 8-дневных зеленых проростков ячменя. \* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $p < 0,05$

Fig. 1. Influence of the pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* on the ROS content in the 6- and 8-day-old leaves of green barley seedlings. \* – differences in comparison with the control are significant at  $p < 0.05$

Известно, что наиболее стабильным из продуктов восстановления кислорода является пероксид водорода. Время жизни этой АФК составляет 1 мс, поэтому она способна диффундировать на значительные расстояния от места образования и тем самым выполнять сигнальную функцию, запуская в растениях другие адаптационные механизмы [37]. Определение содержания пероксида водорода в экстрактах листьев через 24 ч после инокуляции патогеном показало достоверное увеличение (на 50 %) содержания данной АФК по сравнению с таковым в контрольном варианте (рис. 2).

В результате 3-дневной колонизации растительной ткани грибом *B. sorokiniana* в листьях ячменя отмечалось статистически достоверное повышение содержания пероксида водорода на 15,6 % по сравнению с аналогичным показателем у контрольных растений (уровень исследуемой АФК у них также увеличился в ходе онтогенеза).

Для выяснения природы окислительного стресса, развивающегося при грибном заражении, была изучена активность НАДФН-оксидазы, поскольку считается, что за быстрое образование

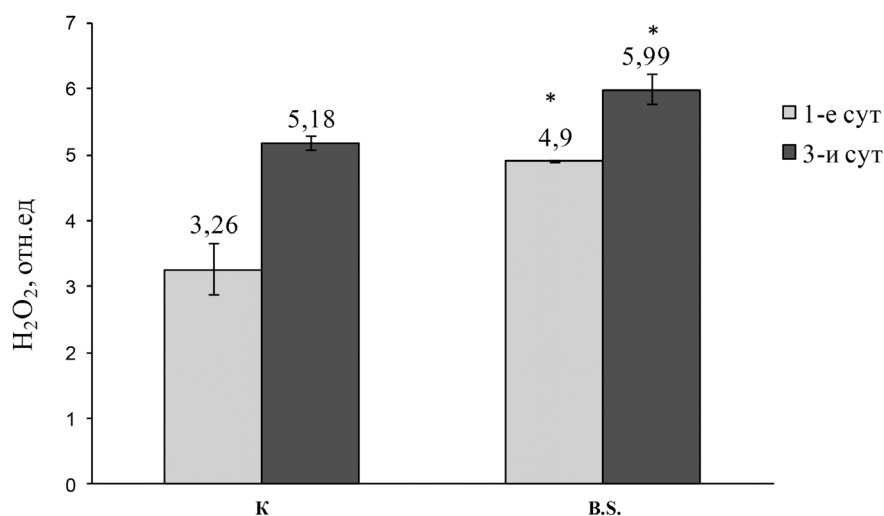


Рис. 2. Влияние патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на содержание  $H_2O_2$  в листьях 6- и 8-дневных зеленых проростков ячменя. \* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $p < 0,05$

Fig. 2. Influence of the pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* on the  $H_2O_2$  content in the leaves of 6- and 8-day-old green barley seedlings. \* – differences in comparison with the control are significant at  $p < 0.05$

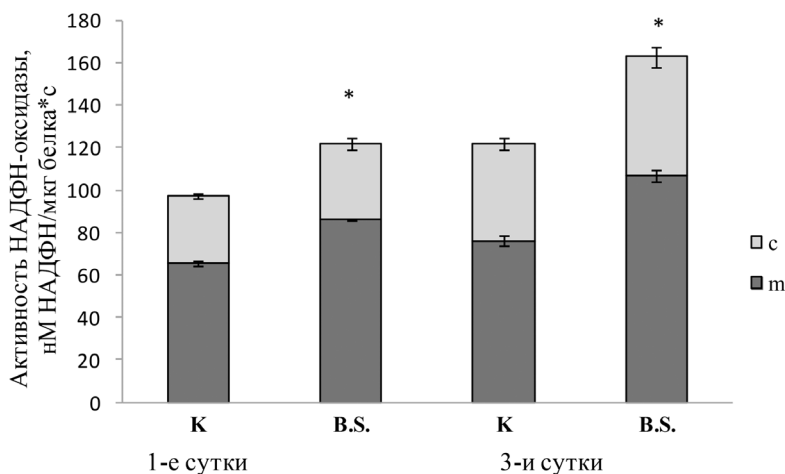


Рис. 3. Активность НАДФН-оксидазы в зеленых проростках ячменя в течение 3 сут после заражения грибом *B. sorokiniana*. \* – различия по сравнению с контролем достоверны при  $p < 0,05$

Fig. 3. The activity of NADPH-oxidase in green barley seedlings for 3 days after infection with *B. sorokiniana* (B.S). \* – differences in comparison with the control are significant at  $p < 0.05$

АФК в клетках растений ответственен именно этот фермент. Предполагается, что супероксид анион-радикал, производимый НАДФН-оксидазой, превращается с участием супероксиддисмутазы в  $H_2O_2$ , наиболее стабильную форму АФК, способную пересекать цитоплазматическую мембрану через аквапорины и опосредующую быстрый системный сигнал [38]. Волна АФК распространяется относительно быстро (около 8 см/мин). Она передает сигнал тревоги от пораженных частей растения к незатронутой части, которая не получила первичный стимул, и, таким образом, играет важную роль в процессах защиты.

В наших экспериментах активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН в микросомальной и цитозольной фракциях, полученных путем дифференциального ультрацентрифугирования. В результате исследований установлено возрастание на 1-е и 3-и сутки после начала воздействия грибного патогена активности данного фермента в инфицированных грибом проростках ячменя на 25 и 33,5 % соответственно (рис. 3). При этом в обоих исследуемых вариантах ферментативная активность в микросомальной фракции была выше, чем в цитозольной, что подтверждает данные о мембранной локализации НАДФН-оксидазного ферментного комплекса.

Увеличение активности НАДФН-оксидазы в результате инокуляции и дальнейшей колонизации грибного патогена, таким образом, опосредует развитие и формирование локального окислительного всплеска, приводящего в дальнейшем к формированию системных сигналов, включающих последующие механизмы защиты растений в ответ на действие стресс-фактора.

Стресс-индуцированное возрастание содержания АФК, а также их токсичных продуктов в результате активации работы окислительных ферментов может негативно отразиться на жизнеспособности растительных клеток, что требует контроля их уровня. Важную роль в защите клеток и тканей от окислительных повреждений и поддержании нормального редокс-баланса играют системы естественной детоксикации, в том числе специализированные ферментные антиоксиданты. Одним из таких ферментов, которые важны для защиты растения от вредного воздействия АФК, является пероксидаза, катализирующая реакции окисления органического и неорганического субстратов с использованием в качестве окислителя пероксида водорода [37]. Кроме того, она принимает участие в лигнификации и связывании белков клеточных стенок, в метаболизме фенолов (превращает их в токсичные для фитопатогенов хиноны), в генерации АФК и способствует синтезу фитоалексинов и других защитных соединений [3]. Пероксидаза – это фермент, осуществляющий две независимые функции – оксидазную и пероксидазную и способный катализировать разнообразные реакции в зависимости от использования конкретного субстрата. Антиоксидантная активность пероксидазы проявляется во внутриклеточном пространстве в реакции с бензидином, в апопласте – с аскорбатом, прооксидантная – во внеклеточном

пространстве с НАД(Ф)Н и ИУК [39]. Таким образом, активация бензидин-пероксидазы может указывать на накопление в растительных образцах пероксида водорода при действии разных стресс-факторов и запуске механизмов его детоксикации. Согласно полученным данным (табл. 1), в результате инокуляции 5-дневных проростков спорами гриба *B. sorokiniana* на 1-е и 3-и сутки после воздействия наблюдалось увеличение активности пероксидазы по отношению к контролю (незараженные растения) в 1,6 и 2,2 раза соответственно.

Т а б л и ц а 1. Активность пероксидазы в зеленых проростках ячменя разного возраста в условиях заражения грибом *B. sorokiniana*

Table 1. Peroxidase activity in green barley seedlings of different ages under conditions of infection with *B. sorokiniana*

Вариант	Активность пероксидазы, нМ бензидина/мг белка·с (% к контролю)	
	6-дневные проростки	8-дневные проростки
Контроль	23,2 ± 2,2 (100)	34,5 ± 4,8 (100)
<i>B. sorokiniana</i>	38,6 ± 1,9* (166,4)	76,1 ± 1,2* (220,6)

\* Различия по сравнению с контролем достоверны при  $p < 0,05$ . То же в табл. 2, 3.

Таким образом, можно предположить, что пероксидаза участвует в формировании ответной реакции растений на инфицирование грибным патогеном, а ее активность положительно коррелирует с высокой адаптационной возможностью растительного организма и может служить маркером индукции неспецифической устойчивости у растений.

Данные о развитии цепи ответных защитных реакций растений при инфицировании их грибом, связанные как с активацией АФК, так и с последующей детоксикацией, согласуются с полученными результатами о накоплении в клетке продуктов ПОЛ вследствие изменения состояния мембран и переокисления липидов в ответ на действие стресс-факторов, что свидетельствует о стабилизации окислительных процессов (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Содержание продуктов ПОЛ в зеленых проростках ячменя разного возраста в условиях заражения патогенным грибом *B. sorokiniana*

Table 2. The content of lipid peroxidation products in green barley seedlings of different ages under conditions infection with pathogenic fungus *B. sorokiniana*

Вариант	Содержание МДА, мМ/мг сырой массы (% к контролю)	
	6-дневные проростки	8-дневные проростки
Контроль	4,73 ± 0,06 (100)	6,11 ± 0,12 (100)
<i>B. sorokiniana</i>	4,40 ± 0,13 (93,02)	4,77 ± 0,08* (76,44)

Известно, что в клетке при нормальных условиях ее жизнедеятельности постоянно происходят процессы ПОЛ, способные приводить к разнообразным структурно-функциональным нарушениям в ней, однако благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты данные процессы удерживаются на определенном уровне. Казалось бы, что такой достаточно агрессивный и продолжительный по времени стресс-фактор, как грибное инфицирование, должен приводить к повреждению биомембран, однако в наших экспериментах наблюдалась стабилизация процессов ПОЛ в течение первых 3 сут после инфицирования, что можно объяснить как включением механизмов антиоксидантной защиты, в частности возрастанием активности фермента пероксидазы, так и особенностями жизнедеятельности гемибиотрофного гриба, продуцирующего в растительной клетке в биотрофной фазе своего развития вещества цитокининовой природы [40], которые участвуют в стабилизации биомембран через стимуляцию синтеза белков.

Таким образом, активация путей защитной сигнализации приводит к генерации мобильного сигнала, который перемещается из локальной инфицированной ткани в дистальную ткань, вызывая формирование SAR, важным медиатором и индуктором которой является СК [8]. Исследования, проведенные на различных видах растений, подтвердили тот факт, что патогенная инфекция



приводит к накоплению СК не только в зараженных, но и в неинфицированных листьях, которые становятся устойчивыми к действию патогена [12, 20]. При этом накопление СК часто идет параллельно или предшествует увеличению экспрессии *PR*-генов и вызывает развитие SAR [7]. Кроме того, результаты исследования с использованием СК-дефицитного или дикого типа табака показали, что для развития SAR в неинфицированных листьях необходимо накопление СК. Это дает основания предполагать, что именно СК является мобильным SAR-индуцирующим сигналом, который передается от инокулированных к системным листьям [13].

По результатам наших исследований, в инфицированных тканях растений в течение первых 24 ч и последующих 3 сут после инфицирования достоверно возрастают общее содержание водорастворимых фенольных веществ, оказывающих защитное действие на растения в условиях стресса, а также свободный пул эндогенной СК – на 9 и 30 % соответственно (табл. 3). Уровень связанной СК заметно снижался через сутки после инокуляции и оставался ниже, чем в контрольных листьях, спустя 3 сут. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении эндогенной СК в ответные реакции на заражение проростков ячменя *B. sorokiniana*, что проявляется в накоплении свободной СК и уменьшении содержания ее конъюгированной формы.

Таблица 3. Изменение содержания связанной и свободной эндогенной СК (мкг/г сухой массы) в листьях зеленых проростков ячменя после инокуляции спорами гриба *B. sorokiniana*

Table 3. Content change of bound and free endogenous SA ( $\mu\text{g/g}$  dry weight) in the seedlings of barley green leaves after inoculation with spores of the fungus *B. sorokiniana*

Вариант	1-е сутки после инокуляции <i>B. s.</i>		3-и сутки после инокуляции <i>B. s.</i>	
	Свободная СК	Связанная СК	Свободная СК	Связанная СК
Контроль	1,56 ± 0,09	3,67 ± 0,11	1,43 ± 0,15	3,69 ± 0,10
<i>B. sorokiniana</i>	1,70 ± 0,27	2,99 ± 0,08*	2,26 ± 0,21*	3,01 ± 0,19*

Как известно, увеличение содержания СК в тканях растений может быть связано не только с активацией ее синтеза, но и с гидролизом *o*- $\beta$ -D-глюкозилсалицилата, локализованного в клеточной стенке растений [12]. И хотя в наших экспериментах явное увеличение свободной СК регистрировали на 3-и сутки, в ранних ответных реакциях на действие *B. sorokiniana* определенно была задействована СК, высвобожденная из конъюгированных форм.

**Заключение.** Установлено, что инфицирование проростков ячменя спорами гриба *B. sorokiniana*, вызывающего темно-бурую пятнистость, приводит к различным биохимическим ответам, которые отражают присущие растению стратегии борьбы с гембиотрофным патогеном. Данные ответы растительного организма регулируются сигнальными путями, связанными с окислительным ответом – локализованным накоплением АФК в подвергшихся инфицированию и/или соседних клетках. Межклеточная продукция АФК в сочетании с работой фермента НАДФН-оксидазы индуцирует «окислительный взрыв», который активирует защитные механизмы в соседних клетках и неинфицированной части растений, вызывая формирование SAR. Таким образом, активация путей защитной сигнализации в растительной клетке приводит к генерации мобильного сигнала, который перемещается из локальной инфицированной ткани в дистальную, вызывая формирование системной приобретенной устойчивости – долговременного иммунитета к широкому спектру возбудителей. Возрастание уровня СК в клетке в ответ на действие грибного патогена подтверждает ее важную роль в формировании защитных реакций растительной клетки при патогенезе.

#### Список использованных источников

1. Spoel, S. H. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells / S. H. Spoel, X. Dong // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12, N 2. – P. 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
2. Plant innate immunity – sunny side up? / S. Stael [et al.] // Trends Plant Sci. – 2015. – Vol. 20, N 1. – P. 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>
3. Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques / D. Balmer [et al.] // Front. Plant Sci. – 2013. – Vol. 4. – Art. 82. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00082>

4. Jones, J. D. G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // *Nature*. – 2006. – Vol. 444, N 7117. – P. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
5. Kumar, H. Pathogen recognition by the innate immune system / H. Kumar, T. Kawai, S. Akira // *Int. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 30, N 1. – P. 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
6. Plant disease resistance genes: current status and future directions / M. A. Gururani [et al.] // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2012. – Vol. 78. – P. 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2012.01.002>
7. Seyfferth, C. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming / C. Seyfferth, K. Tsuda // *Front. Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 697. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00697>
8. Asai, S. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors / S. Asai, K. Shirasu // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2015. – Vol. 28. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.008>
9. Network properties of robust immunity in plants / K. Tsuda [et al.] // *PLoS Genet.* – 2009. – Vol. 5, N 12. – P. e1000772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>
10. Durrant, W. E. Systemic acquired resistance / W. E. Durrant, X. Dong // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2004. – Vol. 42, N 1. – P. 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
11. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance / J. Shah [et al.] // *Plant J.* – 2014. – Vol. 79, N 4. – P. 645–658. <https://doi.org/10.1111/tpj.12464>
12. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present and future / D. F. Klessig [et al.] // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2018. – Vol. 31, N 9. – P. 871–888. <https://doi.org/10.1094/mpmi-03-18-0067-cr>
13. Systemic immunity in plants: biochemical signals and the challenge for practical application / A. L. Ádám [et al.] // *EC Agriculture*. – 2019. – Vol. 5, N 2. – P. 57–60.
14. Shah, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance / J. Shah, J. Zeier // *Front Plant Sci.* – 2013. – Vol. 4. – Art. 30. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>
15. Characterization of LhSorTGA2, a novel TGA2-like protein that interacts with LhSorNPR1 in oriental hybrid lily Sorbonne / L. Wang [et al.] // *Bot. Stud.* – 2017. – Vol. 58. – Art. 46. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0201-y>
16. Vallad, G. E. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture / G. E. Vallad, R. M. Goodman // *Crop Sci.* – 2004. – Vol. 44, N 6. – P. 1920–1934. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
17. Шамрай, С. Н. Гены устойчивости растений: молекулярная и генетическая организация, функция и эволюция / С. Н. Шамрай // *Журн. общ. биол.* – 2003. – Т. 64, № 3. – С. 195–214.
18. Shaw, M. W. Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) on winter wheat in the UK / M. W. Shaw, D. J. Royle // *Plant Pathol.* – 1993. – Vol. 42, N 6. – P. 882–899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb02674.x>
19. Zheng, Q. F. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense / Q. F. Zheng, D. Xinnian // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2013. – Vol. 64. – P. 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
20. Malamy, J. Salicylic acid and plant disease resistance / J. Malamy, D. F. Klessig // *Plant J.* – 1992. – Vol. 2, N 5. – P. 643–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1992.tb00133.x>
21. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance / S.-W. Park [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 318, N 5847. – P. 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>
22. Ward, E. R. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance / E. R. Ward // *Plant Cell*. – 1991. – Vol. 3, N 10. – P. 1085–1094. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.10.1085>
23. Bashyal, B. M. Emergence of aggressive population in the *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.) through anastomosis / B. M. Bashyal, R. Chand, R. Aggarwal // *Proceedings of the National Academy of Sciences India. Section B, Biological sciences.* – 2015. – Vol. 85, N 4. – P. 935–941. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0391-y>
24. Morphology, physiology, and virulence of *Bipolaris sorokiniana* isolates / A. Poloni [et al.] // *Curr. Microbiol.* – 2009. – Vol. 59, N 3. – P. 267–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9429-4>
25. Acharya K. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas / K. Acharya, A. K. Dutta, P. Pradhan // *AJCS*. – 2011. – Vol. 5, N 9. – P. 1064–1071.
26. Screening of barley germplasm for leaf blight (*Bipolaris sorokiniana*) resistance / N. Jain [et al.] // *Indian J. Agricult. Res.* – 2014. – Vol. 48, N 1. – P. 67–71. <https://doi.org/10.5958/j.0976-058x.48.1.012>
27. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М. Н. Мерзляк // *Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений.* – 1989. – Т. 6. – С. 111–123.
28. Heath, R. L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation / R. L. Heath, L. Packer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1968. – Vol. 125, N 1. – P. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
29. LeBel, C. P. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress / C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – Vol. 5, N 2. – P. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
30. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dehydroxyphenoxazine derivative / J. G. Mohanty [et al.] // *J. Immunol. Meth.* – 1997. – Vol. 202, N 2. – P. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
31. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по физиологии растений / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина. – М. : Высш. школа, 1975. – 392 с.
32. Shen, W. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars / W. Shen, K. Nada, S. Tachibana // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 124, N 1. – P. 431–440. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.431>

33. Pinton, R. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxider radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants / R. Pinton, I. Cakmak, H. Marschner // *J. Exp. Bot.* – 1994. – Vol. 45, N 1. – P. 45–50. <https://doi.org/10.1093/jxb/45.1.45>
34. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
35. Запрометов, М. Н. Основы биохимии фенольных соединений / М. Н. Запрометов. – М. : Высш. школа, 1974. – 214 с.
36. Евдокимова, О. В. Содержание салициловой кислоты и активных форм кислорода в листьях ячменя (*Hordeum vulgare*) при обработке салицилатами / О. В. Евдокимова, Л. Ф. Кабашникова, Г. Е. Савченко // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2014. – № 3. – С. 57–61.
37. Reactive oxygen species during plant – microbe early interactions / A. K. Nanda [et al.] // *J. Integ. Plant Biol.* – 2010. – Vol. 52, N 2. – С. 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00933.x>
38. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli / G. Miller [et al.] // *Sci. Signal.* – 2009. – Vol. 2, N 84. – P. ra45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000448>
39. Томилин, М. В. Пероксидазная ферментная система проростков пшеницы при развитии окислительного стресса в условиях смены светового режима : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 03.01.04 / М. В. Томилин ; Нижегород. гос. ун-т. – Нижн. Новгород, 2011. – 20 с.
40. Великанов, Л. Л. Почвенные фитопатогенные грибы / Л. Л. Великанов, Е. П. Дурнынина. – М. : Изд-во МГУ, 1984. – 107 с.

## References

1. Spoel S. H., Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 2012, vol. 12, no. 2, pp. 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
2. Stael S., Kmiciek P., Willems P., van der Kelen K., Coll N. S., Teige M., Van Breusegem F. Plant innate immunity – sunny side up? *Trends in Plant Science*, 2015, vol. 20, no. 1, pp. 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>
3. Balmer D., Flors V., Glauser G., Mauch-Mani B. Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4, art. 82. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00082>
4. Jones J. D. G., Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*, 2006, vol. 444, no. 7117, pp. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
5. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 2011, vol. 30, no. 1, pp. 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
6. Gururani M. A., Venkatesh J., Upadhyaya C. P., Nookaraju A., Pandey S. K., Park S. W. Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2012, vol. 78, pp. 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002>
7. Seyffferth C., Tsuda K. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, 2014, vol. 5, art. 697. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00697>
8. Asai S., Shirasu K. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, vol. 28, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.008>
9. Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J., Katagiri F. Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genetics*, 2009, vol. 5, no. 12, p. e1000772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>
10. Durrant W. E., Dong X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, vol. 42, no. 1, pp. 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
11. Shah J., Chaturvedi R., Chowdhury Z., Venables B., Petros R. A. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant Journal*, 2014, vol. 79, no. 4, pp. 645–658. <https://doi.org/10.1111/tpj.12464>
12. Klessig D. F., Choi H. W., Dempsey D. A. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present and future. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2018, vol. 31, no. 9, pp. 871–888. <https://doi.org/10.1094/mpmi-03-18-0067-cr>
13. Ádám A. L., Nagy Z. Á., Viczián O. Systemic immunity in plants: biochemical signals and the challenge for practical application. *EC Agriculture*, 2019, vol. 5, no. 2, pp. 57–60.
14. Shah J., Zeier J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4, art. 30. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>
15. Wang L., Guo Z., Zhang Y., Wang Y., Wang L., Yang G., Li W., Wang R., Xie Z. Characterization of LhSorTGA2, a novel TGA2-like protein that interacts with LhSorNPR1 in oriental hybrid lily Sorbonne. *Botanical Studies*, 2017, vol. 58, art. 46. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0201-y>
16. Vallad G. E., Goodman R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 2004, vol. 44, no. 6, pp. 1920–1934. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
17. Shamrai S. N. Genes for plant resistance: molecular and genetic organization, function and evolution. *Zhurnal obshchei biologii* [Biology bulletin reviews], 2003, vol. 64, no. 3, pp. 195–214 (in Russian).
18. Shaw M. W., Royle D. J. Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) on winter wheat in the UK. *Plant Pathology*, 1993, vol. 42, no. 6, pp. 882–899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb02674.x>
19. Zheng Q. F., Xinnian D. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, vol. 64, pp. 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>

20. Malamy J., Klessig D. F. Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant Journal*, 1992, vol. 2, no. 5, pp. 643–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1992.tb00133.x>
21. Park S.-W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S. L., Klessig D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 2007, vol. 318, no. 5847, pp. 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>
22. Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P., Metraux J. P., Ryals J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 1991, vol. 3, no. 10, pp. 1085–1094. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.10.1085>
23. Bshyal B. M., Chand R., Aggarwal R. Emergence of aggressive population in the *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.) through anastomosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences India. Section B, Biological sciences*, 2015, vol. 85, no. 4, pp. 935–941. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0391-y>
24. Poloni A., Pessi I. S., Frazzon A. P. G., van der Sand S. T. Morphology, physiology, and virulence of *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Current Microbiology*, 2009, vol. 59, no. 3, pp. 267–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9429-4>
25. Acharya K., Dutta A. K., Pradhan P. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, vol. 5, no. 9, pp. 1064–1071.
26. Jain N., Malik R., Selvakumar R., Kumar R., Pande V., Verma R. P. S. Screening of barley germplasm for leaf blight (*Bipolaris sorokiniana*) resistance. *Indian Journal of Agricultural Research*, 2014, vol. 48, no. 1, pp. 67–71. <https://doi.org/10.5958/j.0976-058x.48.1.012>
27. Merzlyak M. N. Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes. *Itogi nauki i tekhniki. Seriya Fiziologiya rastenii* [Results of science and technology. Plant physiology series], 1989, vol. 6, pp. 111–123 (in Russian).
28. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, vol. 125, no. 1, pp. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
29. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 1992, vol. 5, no. 2, pp. 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
30. Mohanty J. G., Jaffe J. S., Schulman E. S., Raible D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dehydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*, 1997, vol. 202, no. 2, pp. 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(96\)00244-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(96)00244-x)
31. Gavrilenko V. F., Ladygina M. E., Khandobina L. M. *Large workshop on plant physiology*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1975. 392 p. (in Russian).
32. Shen W., Nada K., Tachibana S. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology*, 2000, vol. 124, no. 1, pp. 431–440. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.431>
33. Pinton R., Cakmak I., Marschner H. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxideradical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. *Journal of Experimental Botany*, 1994, vol. 45, no. 1, pp. 45–50. <https://doi.org/10.1093/jxb/45.1.45>
34. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, p. 265.
35. Zaprometov M. N. *Fundamentals of biochemistry of phenolic compounds*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1974. 214 p. (in Russian).
36. Evdokimova O. B., Kabashnikova L. F., Savchenko G. E. The content of salicylic acid and reactive oxygen species in barley leaves (*Hordeum vulgare*) when treated with salicylates. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2014, vol. 3, pp. 57–61 (in Russian).
37. Nanda A. K., Andrio E., Marina D., Pauly N., Dunand C. Reactive oxygen species during plant–microbe early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, vol. 52, no. 2, pp. 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00933.x>
38. Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M. A., Shulaev V., Dangl J. L., Mittler R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling*, 2009, vol. 2, no. 84, p. 45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000448>
39. Tomilin M. V. *Peroxidase enzyme system of wheat seedlings during the development of oxidative stress under conditions of changing light conditions*. Abstract of Ph. D. diss. Nizhny Novgorod, 2011. 20 p. (in Russian).
40. Velikanov L. L., Durygina E. P. *Soil phytopathogenic fungi*. Moscow, Moscow State University Publishing House, 1984. 107 p. (in Russian).

### Информация об авторе

Пашкевич Любовь Валерьевна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Ljubi.k87@gmail.com

### Information about the author

Lyubov V. Pashkevich – 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: Ljubi.k87@gmail.com