

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРА *STAGONOSPORA NODORUM* SnTOX3 НА БИОСИНТЕЗ ЭТИЛЕНА И РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, Т.В. Нужная, И.В. Максимов

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия, veselova75@rambler.ru

Аннотация. Изучено влияние двух различающихся по вирулентности и экспрессии эффектора SnTox3 штаммов фитопатогена *Stagonospora nodorum* Berk. на редокс-статус и биосинтез этилена у двух контрастных по устойчивости к патогену видов пшеницы - восприимчивый *Triticum aestivum* L. и устойчивый *T. timopheevii* Zhuk. Обнаружено отрицательное влияние SnTox3 на генерацию перекиси водорода на биотрофной стадии развития патогена за счет регуляции экспрессии генов оксидоредуктаз и манипуляции метаболизмом этилена.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum* Berk., пшеница, эффекторы, редокс-статус, этилен

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-190-194

Проблема устойчивости растений к фитопатогенам – одна из наиболее важных в физиологии растений. Исследования септориоза интенсивно ведутся последние 2 десятилетия, но до сих пор нет четкого понимания механизмов, лежащих в основе устойчивости/восприимчивости пшеницы к инфекции, с одной стороны, и вирулентности патогена, с другой стороны [Friesen et al., 2006; Phan et al., 2016; Shi et al., 2016]. Однако в 2006 г. было показано, что важнейшим фактором вирулентности *Stagonospora nodorum* Berk. являются многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба [Friesen et al., 2006]. На сегодняшний день в геноме *S. nodorum* идентифицировано 4 гена эффектора (SnToxA, SnTox1, SnTox2, SnTox3) [Phan et al., 2016]. Эффекторы SnToxA, SnTox1, SnTox3 считаются основными у патогена *S. nodorum* и достаточно широко распространены среди штаммов и изолятов.

Эффекторы патогенов вносят большой вклад в развитие взаимоотношений паразит-хозяин. Они напрямую или косвенно взаимодействуют с продуктами генов устойчивости/восприимчивости, локализованных в геноме пшеницы [Winterberg et al., 2014; Shi et al., 2016]. Взаимодействие эффектора с продуктом R-гена – это в основном взаимодействие с трансмембранными рецепторными киназами плазмалеммы или цитоплазматическими рецепторными NBS-LRR белками [Тарчевский и др., 2012; Shi et al., 2016]. После узнавания эффектора рецептором активируются белковые медиаторы той или иной сигнальной системы и осуществляется передача сигнала в ядро, что в результате приводит к появлению защитного ответа [Тарчевский и др., 2012] или как в случае доминирующей восприимчивости – развитию инфекции [Shi et al., 2016].

Показано, что НЭ SnToxA, SnTox1, SnTox3 влияют на генерацию АФК в растениях пшеницы [Winterberg et al., 2014; Shi et al., 2016]. По данным литературы взаимодействие токсина SnToxA с рецептором приводит к коллапсу фотосинтеза, накоплению АФК и смерти клеток. Однако путь передачи сигнала до конца не расшифрован. Токсин SnTox1 участвует в образовании некрозов, за счет СВЧ-реакции, запускает MAP-киназный каскад, однако дальнейший путь трансдукции сигнала неизвестен [Shi et al., 2016]. Токсин *S. nodorum* SnTox3 участвует в образовании некрозов и хлорозов по неизвестному механизму [Winterberg et al., 2014]. Однако

недавно было показано, что SnTox3 влияет на процесс фотосинтеза, активирует фенилпропаноидный метаболизм и экспрессию ряда генов PR-белков, а также индуцирует накопление метионина и синтез этилена у растений уже через 24 часа после инфицирования [Winterberg et al., 2014]. На сегодняшний день считается, что основной ролью данного эффектора SnTox3 является индукция гибели клеток хозяина с помощью манипулирования защитными сигнальными путями растения [Winterberg et al., 2014]. Однако механизмы, лежащие в основе этого процесса, в настоящее время неясны. Несмотря на активное изучение эффекторов *S. nodorum* и генов устойчивости/восприимчивости к ним у пшеницы, остается много пробелов в наших знаниях и понимании всего пути трансдукции сигнала, приводящего в одном случае к устойчивости, а в другом – к восприимчивости.

Все сигнальные системы растений находятся под контролем фитогормонов [Kazan, Lyons, 2014]. Так, важную роль в регуляции иммунитета растений играют салициловая (СК) и жасмоновая (ЖАК) кислоты, а также этилен [Kazan, Lyons, 2014]. Роль этилена при биотическом стрессе неоднозначна и зависит от типа патогена и вида растения. Показано, что активация сигнального пути этилена в различных патосистемах может приводить как к увеличению устойчивости растений к патогенам [Kazan, Lyons, 2014], так и к развитию патогенных микроорганизмов в тканях растений [Vleeschauver et al., 2010]. Некоторые патогены могут индуцировать выделение этилена, что способствует распространению инфекции в растении [Vleeschauver et al., 2010]. Ранее нами была показана отрицательная роль этилена в развитии устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum* [Веселова и др., 2016].

В данной работе было изучено влияние двух штаммов *S. nodorum* – высокоагрессивного SnБ, экспрессирующего ген эффекторного белка *SnTox3*, и низкоагрессивного Sn4, не экспрессирующего ген *SnTox3* – на экспрессию гена фермента биосинтеза этилена АЦК-оксидазы (*TaACC*), генов PR-белков, кодирующих ферменты про-/антиоксидантной системы (*TaPrx* – анионную пероксидазу, *TaRboh* – НАДФН-оксидазу, *TaSod* – супероксиддисмутазу), содержание перекиси водорода (H_2O_2) и активность пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ) у пшеницы двух контрастных по устойчивости видов – *Triticum aestivum* сорт Экада 113 (Э113) (восприимчивый) и *T. timopheevii* образец к-58666 (устойчивый).

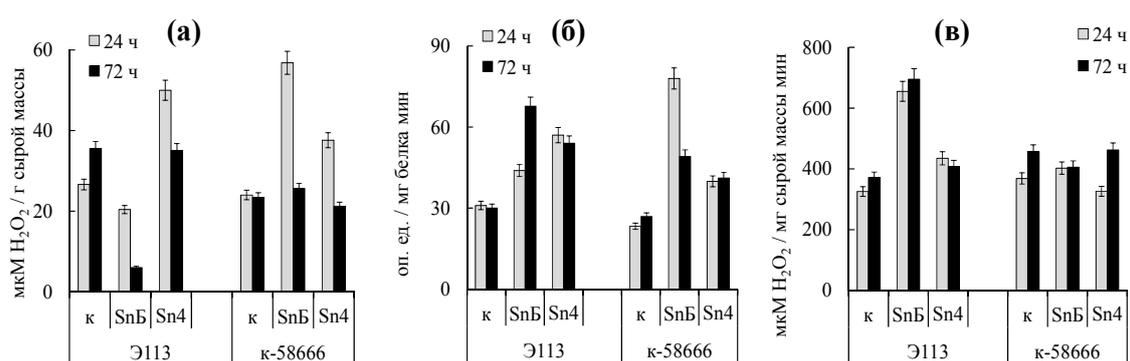


Рисунок. Изменение содержания H_2O_2 (а), активности пероксидазы (б) и каталазы (в) в растениях пшеницы контрастных по устойчивости видов, инфицированных высокоагрессивным штаммом *S. nodorum* (SnБ) или низкоагрессивным штаммом (Sn4).

В начальный период инфицирования высокоагрессивным штаммом SnБ, содержащим ген *SnTox3*, восприимчивый сорт Э113 отличала низкая генерация H_2O_2 , более медленное повышение активности ПО и усиление каталазной активности (рисунок), что, скорее всего, было причиной интенсивного развития патогена в листьях

(таблица). Устойчивый образец *T. timopheevii* к-58666 отличала интенсивная генерация H₂O₂, более быстрая и повышенная активность ПО и отсутствие увеличения активности КАТ (рисунок), что приводило к задержке и остановке роста патогена в листьях (таблица). При инфицировании слабоагрессивным штаммом Sn4, не содержащим ген *SnTox3*, и *Triticum aestivum* Э113, и *T. timopheevii* образец к-58666 развивали защитные реакции одинаково, как устойчивый фенотип при инфицировании высокоагрессивным штаммом SnБ, что приводило к образованию минимальных зон поражения на листьях (рисунок, таблица). Наши результаты показывают, что SnTox3 влияет на редокс-статус растений и участвует в образовании некрозов, что совпадает с данными литературы [Winterberg et al., 2014].

Таблица.

Влияние штаммов *S. nodorum* с различной агрессивностью на развитие симптомов заболевания, изменение экспрессии гена фермента биосинтеза этилена АЦК-оксидазы и генов PR-белков, кодирующих ферменты про-/антиоксидантной системы, у контрастных по устойчивости видов пшеницы

Показатели		Время после инфицирования, сутки	Виды пшеницы					
			<i>Triticum aestivum</i> Э113			<i>T. timopheevii</i> к-58666		
			Контр.	<i>S. nodorum</i>		Контр.	<i>S. nodorum</i>	
SnБ	Sn4	SnБ		Sn4				
Содержание мРНК генов, % от контроля	<i>TaACC</i>	1	100	146	80	0	16	0
	<i>TaRboh</i>	1	100	70	160	100	121	158
		3	100	160	150	100	69	154
	<i>TaPrx</i>	1	100	71	320	100	401	365
		3	100	283	300	100	853	300
	<i>TaSod</i>	1	100	69	144	100	320	110
3		100	192	213	100	150	100	
Площадь поражения, мм ²		9	0	91±6,1	9,6±2,2	0	2,8±0,5	0,8±0,1

В нашей работе было также показано, что у восприимчивого сорта Э113 через 24 часа инфицирования высокоагрессивным штаммом SnБ, содержащим ген *SnTox3*, на биотрофной стадии развития патогена уменьшалось содержание транскриптов *TaPrx*, *TaRboh*, *TaSod* генов, кодирующих ферменты, участвующие в генерации АФК (таблица), что совпадало со снижением генерации H₂O₂ у этого сорта (рисунок). Напротив, у устойчивого образца к-58666 в тех же условиях было обнаружено накопление транскриптов всех трех генов (таблица), что совпадало с повышением генерации H₂O₂ у данного вида (рисунок). Через трое суток после инфицирования, в начале некротрофной фазы развития патогена была обнаружена противоположная реакция контрастных видов. У восприимчивого сорта Э113 содержание мРНК двух генов (*TaRboh*, *TaSod*) повышалось, что впоследствии могло привести к образованию обширных зон поражения с некрозами, у устойчивого образца к-58666 содержание мРНК этих генов снижалось (таблица). Такие данные могут объяснить участие SnTox3 в образовании некрозов на листьях пшеницы, способствующих росту *S. nodorum* в некротрофную стадию развития. Интересно, что инфицирование обоих видов низкоагрессивным штаммом Sn4, не содержащим ген эффектора SnTox3, не приводило к снижению экспрессии генов *TaPrx*, *TaRboh*, *TaSod* на биотрофной стадии развития и к увеличению экспрессии этих генов на некротрофной стадии развития (таблица). Таким образом, влияние SnTox3 на редокс-статус растений осуществляется через регуляцию экспрессии генов оксидоредуктаз.

Также нами показано влияние SnTox3 на экспрессию гена фермента биосинтеза этилена АЦК-оксидазу (таблица). Инфицирование высокоагрессивным штаммом SnБ, содержащим ген *SnTox3*, повышало содержание транскриптов гена *TaACC*, а инфицирование слабоагрессивным штаммом Sn4, не содержащим ген *SnTox3*, не влияло на экспрессию данного гена у восприимчивого сорта Э113 через 24 часа инфицирования (таблица). У устойчивого образца к-58666 в тех же условиях практически не обнаруживалось мРНК данного гена (таблица). Интересно, что ранее нами было показано отрицательное влияние обработки растений химическим предшественником этилена - этефоном на редокс-статус инфицированных *S. nodorum* растений пшеницы, как восприимчивых, так и устойчивых фенотипов [Веселова и др., 2016]. Обработка этефоном приводила к снижению содержания H₂O₂, уменьшению активности ПО и повышению активности КАТ у инфицированных *S. nodorum* растений, а обработка ингибитором рецепции этилена 1-МЦП (1-метилциклопропеном) снимала эффект этефона [Веселова и др., 2016]. Таким образом, исходя из полученных данных, можно предположить, что эффектор SnTox3 влияет на редокс-статус растений, манипулируя биосинтезом и сигнальным путем этилена.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00978 с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

Литература

Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum* // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 5. – С. 649–660.

Тарчевский И. А., Яковлева В. Г., Егорова А. М. Индукция салициловой кислотой компонентов олигомерных белковых комплексов // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 4. – С. 532–542.

Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // Nat. Genet. – 2006. – V. 38. – P. 953–956.

Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors // Plant Cell. – 2014. – V. 26. – P. 2285–2309.

Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease // The Plant Journal. – 2016. – V. 87. – P. 343–354.

Shi G., Zhang Z., Friesen T.L., Bansal U., Cloutier S., Wicker T., Rasmussen J.B., Faris J.D. Marker development, saturation mapping, and high-resolution mapping of the *Septoria nodorum* blotch susceptibility gene *Snn3B1* in wheat // Mol. Genet. Genomics. – 2016. – V. 291. – P. 107–119.

Vleeschauver D.D., Yinong Y., Casiana V.C., Monica H. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling // Plant Physiol. – 2010. – V. 152. – P. 2036–2052.

Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., Solomon P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves // BMC Plant Biol. – 2014. – V. 14. – P. 215.

INFLUENCE OF *STAGONOSPORA NODORUM* EFFECTOR SnTOX3 ON ETHYLENE BIOSYNTHESIS AND REDOX-METABOLISM OF WHEAT PLANTS

S.V. Veselova, G.F. Burkhanova, T.V. Nuzhnaya, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, veselova75@rambler.ru

Abstract. The effect of two strains of *Stagonospora nodorum* Berk with various virulence and expression of the its effector SnTox3 on the redox status and ethylene biosynthesis in two wheat species *Triticum aestivum* L. (susceptible) *T. timopheevii* Zhuk. (resistant) was studied. The negative effect of SnTox3 on the generation of hydrogen peroxide during the biotrophic stage of pathogen development was detected. This effect of SnTox3 was due to the regulation of oxidoreductase genes expression and manipulation of ethylene metabolism.

Keywords: *Stagonospora nodorum* Berk., wheat, pathogen effector, redox status, ethylene