Role of the *Stagonospora nodorum* effector SnTox3 in regulation of cytokinins synthesis and metabolism in infected wheat plants

Rumyantsev S.D., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F.

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

E-mail: rumyantsev-serg@mail.ru

Key message. The effect of the *Stagonospora nodorum* effector SnTox3 on the biosynthesis and metabolism of cytokinins of host plant was studied. The SnTox3 effector influenced the biosynthesis of cytokinins along an ethylene-dependent and ethylene-independent pathway.

Keywords: *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, pathogen effector SnTox3, ethylene, cytokinins.

The most important virulence factors of the *Stagonospora nodorum* are multiple fungal necrotrophic effectors (NEs). The SnTox3 pathogen effector interacts with the matching product of host susceptibility gene *Snn3-B1*. This interaction leads to activation of the biosynthesis and signaling pathway of ethylene, the change in redox-status of plant and the development of infection on wheat leaves. It is assumed that mechanism of the ethylene signaling pathway suppression is associated with activation of the cytokinin signaling pathway. The interaction of two phytohormones - cytokinins (CK) and ethylene - in the wheat - *S. nodorum* pathosystem is being studied for the first time. The aim of the work was to study the role of NE SnTox3 and ethylene in the regulation of CK synthesis and metabolism in wheat plants infected with *S. nodorum*. The objects of the study were two cultivars of soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) contrasting in resistance to *S. nodorum*: susceptible cv. Zhnitsa (*Snn3*⁺) and resistant cv. Omskaya 35 (*snn3*⁻) and two isolates of the fungus *S. nodorum*: Sn4VD (Tox3⁻) and SnB (Tox3⁺). We analyzed the transcriptional activity of genes responsible for CK biosynthesis and metabolism (*TalPT*, *TaZOG*, *TaGLU*, *TaCKX*) by real-time PCR. The content of CK various forms in infected plants was assayed by means of ELISA using specific antibodies. CK were previously separated by thin-layer chromatography. Our results showed that an increase in the content of CK active forms during the development of resistance reaction occurred due to the CK synthesis *de novo*, release from bound forms and the decrease in their oxidative degradation. The decrease in the total content of CK active forms during the development of the susceptibility reaction (*Snn3-B1*-SnTox3) occurred due to a greater extent to glucosylation reaction, i.e. the translation of active forms into bound ones and due to the oxidative degradation of CK and the inhibition of CK biosynthesis. While effect of ethylene on CK biosynthesis was determined by the gene-for-gene interaction and NE SnTox3, and effect of ethylene on CK metabolism (glucosylation and oxidative degradation) was independent of NE SnTox3. This work was supported by State Project no. 0246-2018-0035 and the RFBR project no. 18-04-00978.

Роль эффектора *Stagonospora nodorum* SnTox3 в регуляции синтеза и метаболизма цитокининов в инфицированных растениях пшеницы

Румянцев С.Д., Веселова С.В., Нужная Т.В., Бурханова Г.Ф.

Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

Аннотация. Исследовано влияние эффектора *Stagonospora nodorum* SnTox3 на биосинтез и метаболизм цитокининов растения-хозяина. Эффектор SnTox3 оказывал влияние на биосинтез цитокининов по этилен-зависимому и этилен-независимому пути.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, эффектор патогена SnTox3, этилен, цитокинины.

Важнейшим фактором вирулентности возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. являются многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба. Эффектор патогена SnTox3 взаимодействует с продуктом гена восприимчивости хозяина *Snn3-B1*, что ведет к активации биосинтеза и сигнального пути этилена, изменению редокс-статуса растения и развитию инфекции на листьях пшеницы. Предполагается, что механизм подавления сигнального пути этилена связан с активацией цитокининового сигнального пути. Взаимодействие двух фитогормонов – цитокининов (ЦК) и этилена - в патосистеме пшеница - *S. nodorum* изучается впервые. Цель работы состояла в исследовании роли НЭ SnTox3 и этилена в регуляции синтеза и метаболизма ЦК в инфицированных *S. nodorum* растениях пшеницы. В работе использовано два штамма *S. nodorum* SnБ (экспрессирующий SnTox3) и Sn4ВД (неэкспрессирующий SnTox3), и два контрастных по устойчивости сорта мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum*: восприимчивый - Жница (*Snn3*⁺) и устойчивый - Омская35 (*snn3*⁻). С помощью метода ПЦР в режиме реального времени исследована экспрессия генов ответственных за биосинтез и метаболизм ЦК (*TalPT*, *TaZOG*, *TaGLU*, *TaCKX*). С помощью иммуноферментного анализа с использованием специфических антител определено содержание различных форм ЦК в инфицированных растениях, предварительно разделенных с помощью тонкослойной хроматографии. Наши результаты показали, что увеличение содержания активных форм ЦК при развитии реакции устойчивости происходило за счет синтеза ЦК *de novo*, высвобождения из связанных форм и уменьшения их окислительного распада. Уменьшение суммарного содержания активных форм ЦК при развитии реакции восприимчивости (*Snn3-B1*-SnTox3) происходило в большей степени за счет реакции гликозилирования, т.е. перевода активных форм в связанные, за счет реакции окислительного распада ЦК и подавления синтеза ЦК. При этом влияние этилена на биосинтез ЦК определялось взаимодействием ген-на-ген и НЭ SnTox3, а влияние этилена на метаболизм ЦК (гликозилирование и окислительный распад) не зависело от НЭ SnTox3.

Работа выполнена в рамках госзадания № 0246-2018-0035 и при финансовой поддержке РФФИ №18-04-00978.