ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНА НА СОДЕРЖАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ ЦИТОКИНИНОВ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ, ИНФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММАМИ ГРИБА *STAGONOSPORA NODORUM* BERK.

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

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН
E-mail: veselova75@rambler.ru

Важнейший фактор вирулентности возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. – многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба (SnTox), взаимодействующие с продуктами генов восприимчивости хозяина (*Snn*). Взаимодействия SnTox-*Snn* осуществляются по типу ген-на-ген и ведут к развитию болезни. Изучено влияние некротрофного эффектора патогена *Stagonospora nodorum* SnTox3 на содержание активных форм цитокининов в проростках пшеницы. Для этого в работе были использованы изоляты *S. nodorum*, различающиеся по экспрессии гена SnTox3: SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻), и два сорта мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), контрастные по устойчивости к возбудителю септориоза и отличающиеся по аллельному составу локуса восприимчивости *Snn3-B1*: Жница (восприимчивая) и Омская 35 (устойчивая). Показано, что SnTox3 направленно активировал биосинтез и сигнальный путь этилена, что приводило к снижению содержания зеатина в инфицированных растениях и обеспечивало регуляцию редокс-метаболизма, т.е. уменьшение содержания перекиси водорода и активности пероксидазы, необходимое для успешной колонизации хозяина на начальных этапах инфицирования.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, некротрофные эффекторы, этилен, цитокинины, активные формы кислорода

EFFECT OF ETHYLENE ON THE CONTENT OF ACTIVE FORMS OF CYTOKININS IN WHEAT LEAVES INFECTED WITH THE FUNGUS *STAGONOSPORA NODORUM* BERK. STRAINS WITH DIFFERENT VIRULENCE

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

Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal
Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: veselova75@rambler.ru

The fungus *Stagonospora nodorum* Berk. is the causal agent of Septoria nodorum blotch (SNB) of wheat. The most important factor of virulence of the *Stagonospora nodorum* are multiple fungal necrotrophic effectors (NEs) coded by SnTox genes that interact with the matching products of host susceptibility genes (*Snn*). SnTox-*Snn* interactions are mirror images of classical gene-for-gene interactions and lead to the development of disease. In the present work, we studied the effect of *Stagonospora nodorum* necrotrophic effector SnTox3 on the content of active forms of cytokinins in wheat seedlings. For this, we used *S. nodorum* isolates differing in expression of the NEs genes SnTox3 (SnB (Tox3⁺), Sn4VD (Tox3⁻)) and two cultivars of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.), contrasting in resistance to the causal agents of Septoria nodorum blotch and differing in the allelic composition of the susceptibility locus *Snn3-B1*: Zhnitsa (susceptible) and Omskaya 35 (resistant). It was shown that SnTox3 activated the biosynthesis and signaling pathway of ethylene, which led to a decrease in the zeatin content in infected plants and provided the regulation of redox metabolism, i.e. a reduce in the content of hydrogen peroxide and peroxidase activity necessary for successful colonization of the host in the initial stages of infection.

Keywords: *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, necrotrophic effectors, ethylene, cytokinins, reactive oxygen species

Поступила в редакцию: 17.03.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-1-91-101](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-91-101)

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим фактором вирулентности возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. являются многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба (SnTox),

которые взаимодействуют с продуктами генов восприимчивости хозяина – *Snn*, т.е. взаимодействие в патосистеме «пшеница – *S. nodorum*» осуществляется по типу ген-на-ген [McDonald, Solomon, 2018]. Эти взаимоотношения выражаются в том, что продукты генов вирулентности патогена (=некротрофные эффекторы) (*SnTox*) при взаимодействии с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*) вызывают совместимость, т.е. развитие болезни [Phan et al., 2016]. Однако генетика взаимоотношений пшеницы и *S. nodorum* очень сложная и расо-специфичная устойчивость объясняет только около 40 % фенотипических проявлений [McDonald, Solomon, 2018].

Взаимодействие эффектора патогена с продуктом *R*-гена растения-хозяина активирует белковые медиаторы той или иной сигнальной системы, от которой будет зависеть развитие или ингибирование защитных реакций растений против патогена. При этом сигнальные молекулы, в том числе перекись водорода (H_2O_2), играют ключевую роль в индукции системной устойчивости против фитопатогенов [Kazan, Lyons, 2014]. Показано, что продукция активных форм кислорода (АФК) является самой ранней реакцией растений на инфицирование и контролируется ферментами про-/антиоксидантной системы и фитогормонами [Barna et al., 2012]. Фитогормональные сигнальные системы, проявляющие множественное взаимодействие, активируются в растениях для обеспечения эффективной защиты [Broekgaarden et al., 2015]. Эффекторы патогенов в свою очередь манипулируют биосинтезом и сигнальными путями фитогормонов и влияют на генерацию АФК для ускорения инфекционного процесса [Shen et al., 2018].

Гормональные сигнальные пути этилена и цитокининов (ЦК) играют важную роль при ответе растений на биотические стрессовые факторы. Известно, что этилен может вызывать как устойчивость, так и восприимчивость растений к патогенам, в зависимости от патосистемы [Broekgaarden et al., 2015], а ЦК участвуют в формировании устойчивости растений через регуляцию салицилат-зависимых защитных реакций [O'Brien, Benková, 2013]. Кроме того, и ЦК, и этилен участвуют в регуляции редокс-статуса инфицированных растений [Barna et al., 2012]. Ранее нами было установлено, что, с одной стороны, устойчивость сорта определялась интенсивной генерацией АФК и повышенным содержанием активных форм ЦК в листьях пшеницы на начальной стадии инфицирования патогеном (до 3-х суток) [Веселова и др., 2016]. А с другой стороны, этилен на ранней стадии инфицирования подавлял накопление H_2O_2 за счет регуляции работы различных ферментов про-/антиоксидантной системы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях и обеспечивал тем самым благоприятные условия для развития *S. nodorum* и проникновения патогена в ткани пшеницы [Веселова и др., 2018]. Однако взаимодействие ЦК и этилена в патосистеме пшеница – *S. nodorum* не изучалось, хотя одним из важных аспектов расшифровки роли фитогормонов в иммунитете растений является изучение взаимодействий фитогормонов друг с другом.

Эффектор *SnTox3* является одним из основных НЭ *S. nodorum*, определяющих вирулентность того или иного штамма, взаимодействие *Snn3-B1-SnTox3* играет важную роль в развитии септориоза [McDonald, Solomon, 2018]. Предполагается, что результатом этого взаимодействия является развитие инфекции на листьях с образованием обширных зон поражения, что связано с влиянием *SnTox3* на генерацию АФК, однако механизмы этих процессов еще изучаются [Winterberg et al. 2014].

Ранее нами было показано, что эффектор патогена *SnTox3* активировал биосинтез и сигнальный путь этилена с целью регуляции редокс-статуса инфицированных растений пшеницы для успешной колонизации хозяина [Веселова и др., 2019]. Устойчивость растений

к патогену была связана с подавлением этиленового сигнального пути и развитием окислительного взрыва. В связи с этим, целью настоящей работы было изучение влияния НЭ SnTox3 и этилена на содержание активных форм ЦК в инфицированных *S. nodorum* листьях пшеницы сортов контрастных по устойчивости к патогену.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 2 сорта мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) контрастные по устойчивости к *Stagonospora nodorum* Berk.: Жница (Жн) (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый) с различным аллельным состоянием локуса восприимчивости *Snn3-B1* [Веселова и др., 2019]. Также было использовано 2 изолята гриба *S. nodorum* - SnБ и Sn4ВД, экспрессирующего (Tox3⁺) и неэкспрессирующего (Tox3⁻) SnTox3, соответственно. Для изучения влияния SnTox3 на содержание ЦК в работе были использованы различные комбинации генотипов сорт/изолят: *Snn3*⁺/*Tox3*⁺ (Жн/SnБ), *snn3*⁻/*Tox3*⁺ (Ом35/SnБ), *Snn3*⁺/*tox3*⁻ (Жн/Sn4ВД), *snn3*⁻/*tox3*⁻ (Ом35/Sn4ВД).

Растения выращивали в водной культуре (10%-ый раствор питательной среды Хогланда-Арнона) в климатостате КС-200 СПУ (Россия) с условиями культивирования: температура 20/24°C (ночь/день), 16 ч светопериод, интенсивность света 146 Вт/м² ФАР (лампы Osram L 36W/77). После 6 сут роста часть проростков, помещенных в отдельные сосуды, обрабатывали раствором ингибитора рецепции этилена (1 -метилциклопропен - 1-МЦП) в концентрации 2 мМ (AgroFresh Inc, Spring House PA, США), а часть - 1.5 мМ раствором этефона (ЭТ) (2-хлорэтилфосфоновой кислотой) (Sigma, Германия), сосуды закрывали и помещали в темноту. Через 24 ч листья инфицировали суспензией пикноспор изолятов гриба *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) или Sn4ВД (Tox3⁻) (10⁵ - 10⁶ спор/мл) из коллекции лаборатории и переносили в климатостат КС-200 СПУ. Развитие симптомов септориоза на листьях пшеницы фиксировали с помощью фотоаппарата SP-800UZ Image Stabilization (Olympus, Индонезия) на 7-ые сутки инфицирования. Площадь зоны поражения измеряли с помощью ПК и компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html), выражали в % от общей площади листа.

Для измерения генерации H₂O₂ и активности ферментов пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ) растительный материал (1 : 5 вес/об.) через 24 ч после инфицирования гомогенизировали в 0.05 М растворе Na-фосфатного буфера (ФБ), pH 6.2 и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Для измерения активности оксалаксоксидазы (ОО) растительный материал гомогенизировали с использованием 0,05 М сукцинатного буфера, pH 3,8. Супернатанты отделяли центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин (5415K Eppendorf, США). Концентрацию H₂O₂ в супернатанте определяли с использованием ксиленол оранжевого в присутствии Fe²⁺ при 560 нм по методу [Bindschedler et al., 2001]. Активность ПО определяли микрометодом в 96-луночных планшетах (Nunc, США) по окислению (o-) фенилендиамина (ОФД) в присутствии H₂O₂ при 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (BioRad, США) [Веселова и др., 2018]. Активность фермента выражали в оптических ед./мг белка в мин. Содержание белка определяли по методу Бредфорд. Активность КАТ определяли микрометодом, основанном на способности H₂O₂ образовывать с солями молибдата стойкий окрашенный комплекс [Веселова и др., 2018]. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (BioRad, США). Активность КАТ рассчитывали с использованием калибровочной кривой и выражали в мкМ H₂O₂/мг сырой

массы в мин). Активность ОО определяли микрометодом по окислению ОФД в присутствии щавелевой кислоты (Реахим, Россия) и коммерческой ПО хрена (ДиаэМ, Россия) при 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (BioRad, США) [Веселова и др., 2018].

Содержание фитогормонов (ЦК) определяли в листьях растений пшеницы через 24 ч после инфицирования. Для этого растительный материал растирали в 80% этаноле (соотношение 1 : 10), экстрагировали в течение 16-20 ч при 4°C и упаривали экстракт до водного остатка. Активные формы цитокининов - зеатин, рибозид зеатина содержащиеся в аликвоте водного остатка, концентрировали с использованием обращенно фазной колонки картриджа на основе силикагеля с привитой фазой C 18 (Bond Elut, RP C18; "Varian Ltd.", Великобритания). Элюированные с колонки цитокинины разделяли по формам с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе растворителей бутанол : аммиак : вода (6 : 1 : 2). Цитокинины, элюировали 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.4) из силикагеля, собраного из определенной зоны пластины ТСХ, затем силикагель удаляли путем центрифугирования и далее в надосадочной жидкости определяли содержание зеатина и рибозид зеатина с помощью иммуноферментного анализа с использованием специфических антител [Веселова и др., 2016].

Для иммунолокализации зеатина через 24 часа после инокуляции патогеном отрезки листьев по 5 мм из зоны инфицирования фиксировали в течение 4 ч смесью 4 %-ого раствора параформальдегида (Panreac, Испания) и 0.1 %-ого раствора глутарового альдегида (Sigma, Германия). После отмывания тканей в 0.1 М растворе ФБ pH 7.4 проводили дегидратацию образцов в растворах этанола возрастающих концентраций (30 - 96 %), и образцы заключали в метакрилатную смолу JB-4 (Electron Microscopy Sciences (EMS), США) в соответствии с рекомендацией производителя. С помощью ротационного микротом (HM 325, MICROM Laborgerate, Германия) готовили гистологические срезы толщиной 2 мкм. Иммунолокализацию зеатина проводили во влажной камере при комнатной температуре (24-26°C), как описано ранее [Ахиярова, Архипова, 2010], с использованием специфичных антител к зеатину (любезно предоставленных проф. Веселовым С.Ю., Башкирский государственный университет, Уфа), вторичных антител козы к антителам кролика, меченных коллоидным золотом (EMS, США) и препаратом серебра (EMS, США) для усиления окрашивания. Специфичность иммунного окрашивания проверяли, обрабатывая часть срезов неиммунной сывороткой кролика. Иммунологические срезы изучали с помощью исследовательского универсального светового микроскопа Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия), микрофотографии были получены с помощью цифровой камеры Infinity 1 Digital Kit.

Все эксперименты повторяли 3 раза и проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях (общее n = 9), кроме опытов по анализу площади поражения, где эксперименты включали в себя не менее 30 биологических повторов (общее n = 90). На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Иммуногистохимическое определение ЦК проводили на 36 срезах с 3 растений в каждом варианте опыта, на микрофотографиях представлены результаты характерного варианта из серии опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе изучено два контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сорта мягкой яровой пшеницы, отличавшихся аллельным составом *Snn3-B1* локуса [Веселова и др., 2019],

что может свидетельствовать об их чувствительности ($Snn3^+$) и нечувствительности ($snn3^-$) к НЭ SnTox3 [Shi et al., 2016]. Таким образом, при использовании двух изолятов, *S. nodorum* SnБ ($Tox3^+$) и Sn4ВД ($Tox3^-$), и двух сортов мягкой яровой пшеницы с разными генотипами были подобраны четыре различные комбинации сорт/изолят для изучения влияния SnTox3 на содержание ЦК в листьях пшеницы.

Рис. 1. Развитие симптомов септориоза на листьях пшеницы двух сортов инокулированных изолятами *S. nodorum* SnБ ($Tox3^+$) (А) и Sn4ВД ($Tox3^-$) (Б) под влиянием обработки этефоном (ЭТ) – химическим предшественником этилена и 1-метилциклопропеном (1-МЦП) – ингибитором рецепции этилена.

В комбинации сорт/изолят Жн/SnБ ($Snn3^+/Tox3^+$) проявлялась полная реакция совместимости, инфицирование патогеном приводило к образованию больших зон поражения до 85% от общей площади листа (табл. 1, рис. 1, А). В остальных комбинациях сорт/изолят (Ом35/SnБ, Жн/Sn4ВД, Ом35/Sn4ВД) была выявлена реакция устойчивости

(табл. 1, рис. 1). Предварительная обработка ЭТ, как чувствительных к SnTox3 (Жн), так и не чувствительных к SnTox3 (Ом35) растений, увеличивала их восприимчивость только к изоляту SnБ (Tox3⁺) и не влияла на восприимчивость к изоляту Sn4ВД (Tox3⁻) (табл. 1, рис. 1Б). Предварительная обработка растений, не чувствительных к SnTox3 (Ом35), ингибитором рецепции этилена 1-МЦП, существенно не воздействовала на их устойчивость, независимо от изолята, которым инокулировали растения: SnБ (Tox3⁺) или Sn4ВД (Tox3⁻) (табл. 1, рис. 1). Обработка чувствительных к SnTox3 (Жн) растений ингибитором рецепции этилена 1-МЦП увеличивала их устойчивость к изоляту SnБ и не изменяла устойчивость к изоляту Sn4ВД (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Влияние этилена на степень поражения листьев двух сортов пшеницы инокулированных изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻)

Омская 35		Жница	
Сорт/изолят	Зона поражения, % от общей площади листа	Сорт/изолят	Зона поражения, % от общей площади листа
Ом35/SnБ	10.9 ± 2.5	Жн/SnБ	85.0 ± 3.2
Ом35/SnБ + ЭТ*	65.2 ± 2.7	Жн/SnБ+ЭТ	96.7 ± 2.3
Ом35/SnБ + 1-МЦП*	3.2 ± 0.9	Жн/SnБ+1-МЦП	3.6 ± 1.6
Ом35/Sn4ВД	1.6 ± 0.5	Жн/Sn4ВД	10.4 ± 2.0
Ом35/Sn4ВД + ЭТ	1.9 ± 1.1	Жн/Sn4ВД+ЭТ	9.8 ± 1.7
Ом35/Sn4ВД + 1-МЦП	1.6 ± 0.5	Жн/Sn4ВД+1-МЦП	7.5 ± 1.6

Примечание. *За 24 ч до инокуляции *S. nodorum* растения пшеницы были обработаны или этефоном (ЭТ), или ингибитором рецепции этилена (1-МЦП).

Таблица 2. Влияние этилена на содержание перекиси водорода (мкМ H₂O₂ / г сырой массы) в листьях двух сортов Жница и Омская 35 через 24 ч после инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻)

Вариант обработки	Омская 35		Жница	
	SnБ (Tox3 ⁺)	Sn4ВД (Tox3 ⁻)	SnБ (Tox3 ⁺)	Sn4ВД (Tox3 ⁻)
Контроль*	27.3 ± 1.4		26.6 ± 1.2	
Sn	49.3 ± 1.8	51.5 ± 2.2	20.4 ± 0.9	50.0 ± 2.4
ЭТ	29.5 ± 0.9	28.5 ± 1.7	23.2 ± 1.5	27.3 ± 1.5
Sn + ЭТ	21.4 ± 1.2	32.2 ± 1.9	16.3 ± 1.4	36.2 ± 1.9
1-МЦП	29.2 ± 1.8	29.8 ± 1.2	31.2 ± 2.0	30.5 ± 1.4
Sn + 1-МЦП	54.3 ± 1.6	65.5 ± 3.1	48.8 ± 1.7	56.4 ± 2.8

Примечание. *Варианты обработки: Контроль – неинфицированные растения; Sn – инфицирование изолятами *S. nodorum*; ЭТ – обработка этефоном; Sn + ЭТ – инфицирование + обработка ЭТ; 1-МЦП – обработка 1-метилциклопропеном; Sn + 1-МЦП – инфицирование + обработка 1-МЦП.

Реакция совместимости как у восприимчивых растений (Жн/SnБ), так и у растений, обработанных ЭТ (Жн/SnБ+ЭТ, Ом35/SnБ+ЭТ), характеризовалась снижением содержания H₂O₂ (табл. 2) за счет повышения активности КАТ (рис. 2, д, е), снижения активности ПО (рис. 2, а, б) и ОО (см. рис. 2, в, г). Для реакции несовместимости в комбинациях сорт/изолят Ом35/SnБ, Ом35/Sn4ВД, Жн/Sn4ВД, а также растений, обработанных 1-МЦП, во всех комбинациях было характерно повышение генерации H₂O₂ (табл. 2) за счет снижения или отсутствия повышения активности КАТ, а также за счет резкого увеличения активности ПО и ОО (рис. 2) на раннем этапе инфицирования (24 ч), что приводило к развитию СВЧ-реакции и остановке роста патогена (табл. 1, рис. 1). Обработка ЭТ не влияла на характер

ответной реакции как чувствительных, так и не чувствительных к SnTox3 растений, инокулированных изолятом Sn4ВД (Tox3⁻) (табл. 2, рис. 2).

Рис. 2. Влияние этилена на активность пероксидазы (а, б), оксалатоксидазы (в, г) и каталазы (д, е) в листьях двух сортов, Омская 35 (а, в, д) и Жница (б, г, е), через 24 ч после инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻).

Таким образом, подавление окислительного взрыва в первые сутки инфицирования было связано с наличием у изолята патогена НЭ SnTox3, что в дальнейшем приводило к ингибированию защитных реакций растений пшеницы, размножению и распространению мицелия гриба и образованию обширных зон поражения. Наши результаты показывают, что как увеличение восприимчивости растений пшеницы к *S. nodorum* после обработки ЭТ, так и повышение устойчивости после обработки 1-МЦП, зависело от генотипа изолята патогена: SnБ (Tox3⁺) или Sn4ВД (Tox3⁻). Это может говорить о том, что НЭ SnTox3, действуя как фактор вирулентности, влиял на защитную систему растений посредством регуляции

биосинтеза и сигнального пути этилена в результате взаимодействия по типу ген-на-ген *Snn3-B1-SnTox3*.

Ранее было показано, что этилен обеспечивал благоприятные условия для проникновения и развития *S. nodorum* в тканях растений пшеницы на начальном этапе инфицирования за счет регуляции редокс-метаболизма и снижения генерации H_2O_2 [Веселова и др., 2016; 2018]. Напротив, накопление АФК в растениях пшеницы на начальной стадии инфицирования патогеном *S. nodorum* определяло устойчивость сорта, индуцируя экспрессию генов защитных белков [Веселова и др., 2016; 2018]. Наши результаты показали, что этилен подавлял накопление H_2O_2 в чувствительных к SnTox3 растениях, в том числе за счет снижения активности ПО (рис. 2).

Таблица 3. Влияние этилена на содержание цитокининов в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы Омская 35 и Жница через 24 ч после инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) и Sn4ВД (Tox3⁻)

Вариант обработки	Омская 35		Жница	
	Зеатин (нг / г сырой массы)	Рибозид зеатина (нг / г сырой массы)	Зеатин (нг / г сырой массы)	Рибозид зеатина (нг / г сырой массы)
	SnБ (Tox3 ⁺)			
Контроль*	6.3 ± 0.7	4.5 ± 0.7	8.9 ± 1.2	4.1 ± 0.5
Sn	18.1 ± 1.9	13.6 ± 2.4	6.6 ± 0.9	4.0 ± 0.7
ЭТ	7.9 ± 1.1	4.6 ± 0.6	8.0 ± 1.6	5.5 ± 0.9
Sn + ЭТ	6.6 ± 0.8	6.0 ± 0.9	7.1 ± 1.2	5.7 ± 0.8
1-МЦП	7.2 ± 1.2	4.7 ± 0.5	8.5 ± 1.3	5.0 ± 0.5
Sn + 1-МЦП	18.8 ± 2.1	14.2 ± 2.7	17.7 ± 2.9	14.3 ± 2.6
	Sn4ВД (Tox3 ⁻)			
Контроль*	8.7 ± 0.9	4.2 ± 0.9	8.7 ± 0.9	4.1 ± 0.8
Sn	15.4 ± 2.8	8.6 ± 1.2	15.4 ± 2.5	6.8 ± 1.1
ЭТ	8.8 ± 1.6	5.2 ± 0.8	10.9 ± 1.8	5.4 ± 0.7
Sn + ЭТ	10.3 ± 1.9	8.3 ± 1.1	13.9 ± 2.2	6.4 ± 0.9
1-МЦП	7.7 ± 0.9	5.8 ± 0.7	15.9 ± 2.9	4.1 ± 0.6
Sn + 1-МЦП	19.4 ± 3.2	9.9 ± 1.4	19.7 ± 3.4	6.2 ± 0.8

Примечание.* Варианты обработок, обозначения см. таблица 2.

При совместимом взаимодействии *Snn3⁺/Tox3⁺* (Жн/SnБ), при котором происходит активация биосинтеза и сигнального пути этилена, обнаружено снижение содержания активной формы ЦК – зеатина (табл. 3). При несовместимом взаимодействии (Ом35/SnБ, Ом35/Sn4ВД, Жн/Sn4ВД), где биосинтез и сигнальный путь этилена ингибируется, мы обнаружили повышение содержания обеих активных форм ЦК - зеатина и его рибозида, но в большей степени зеатина (табл. 3). Также ингибирование рецепции этилена с помощью 1-МЦП приводило к накоплению зеатина и его рибозида в листьях инфицированных растений независимо от генотипа растения и генотипа патогена (Жн/SnБ + 1-МЦП, Ом35/SnБ + 1-МЦП, Жн/Sn4ВД + 1-МЦП, Ом35/Sn4ВД + 1-МЦП) (табл. 3). Такие результаты измерения содержания активных форм ЦК в инфицированных растениях с применением ингибирования рецепции этилена с помощью 1-МЦП доказывают влияние этилена на уровень ЦК (табл. 3).

Предварительная обработка ЭТ инфицированных растений независимо от генотипа пшеницы и генотипа патогена приводила к снижению суммарного содержания активных форм ЦК (зеатина и его рибозида) почти в 2 раза по сравнению с несовместимым

взаимодействием Ом35/SnБ, при котором биосинтез и сигнальный путь этилена подавляется (табл. 3).

Рис. 3. Иммуногистохимическая локализация зеатина в листьях пшеницы восприимчивого сорта Жница, не инфицированных патогеном (I), и через 24 часа после инфицирования изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3⁺) (II) и Sn4ВД (Tox3⁻) (III) без обработки (а) и под влиянием этефона (б) и 1 – метилциклопропена (в). Представлены результаты характерного варианта из серии опытов. Сокращения, представленные на рисунке: гф – гифы гриба, хл – хлоропласты, в – вакуоль, ц – цитоплазма, яд – ядро.

Также нами изучена гистохимическая локализация активной формы ЦК – зеатина в листьях восприимчивого сорта Жница под воздействием различных по вирулентности изолятов *S. nodorum*, экспрессирующих или не экспрессирующих эффектор SnTox3 и под влиянием обработок ЭТ и 1-МЦП. На срезах контрольных листьев восприимчивого сорта Жница было выявлено иммунное окрашивание на зеатин в проводящих пучках, устьицах и клетках мезофилла, где интенсивно окрашивались хлоропласты и цитоплазма (рис. 3, I, а). Иммунное окрашивание на зеатин в обработанных ЭТ неинфицированных тканях листа пшеницы не отличалось от контрольных растений (рис. 3, I, б), а в обработанных 1-МЦП растениях иммунное окрашивание было более интенсивным, что говорит о повышенном содержании зеатина (рис. 3, I, в). Через 24 ч после инфицирования в случае совместимого взаимодействия (Жница/SnБ) и при обработке ЭТ (Жн/SnБ+ЭТ) клетки инфицированного листа не окрашивались на зеатин или окрашивались слабо. При этом были обнаружены гифы гриба, окрашенные на зеатин (рис. 3, II, а, б). Обработка листьев пшеницы восприимчивого сорта Жница 1-МЦП не оказывала существенного влияния на распределение зеатина в

тканях листа, но при этом было выявлено более интенсивное окрашивание клеток мезофилла. При несовместимом взаимодействии (Жн/Sn4ВД) независимо от обработок ЭТ или 1-МЦП наблюдали повышенный уровень ЦК в клетках мезофилла по сравнению с неинфицированным контролем. Наибольшее повышение обнаружено в варианте с обработкой 1-МЦП (рис. 3, III), что совпадает с данными по эндогенному уровню активной формы ЦК, полученными с помощью иммуноферментного анализа (табл. 3). Стоит отметить, что в этих вариантах обработки не было выявлено развития грибных структур. Таким образом, результаты иммунолокализации зеатина еще раз подтверждают влияние этилена на содержание ЦК в листьях пшеницы и показывают важность зеатина для развития реакций устойчивости в растениях пшеницы против *S. nodorum*.

Таким образом, при реализации реакции несовместимости в комбинациях сорт/изолят Ом35/SnБ, Ом35/Sn4ВД, Жн/Sn4ВД, а также у растений обработанных 1-МЦП во всех комбинациях было характерно достоверное увеличение содержания зеатина и его рибозида через 24 ч после инфицирования (табл. 3). Реакция совместимости как у восприимчивых растений (Жн/SnБ), так и у растений, обработанных ЭТ (Жн/SnБ+ЭТ, Ом35/SnБ+ЭТ), характеризовалась достоверным снижением содержания активных форм ЦК (табл. 3). Однако обработка ЭТ не влияла на содержание зеатина и его рибозида в листьях как чувствительных, так и нечувствительных к SnTox3 растений, инокулированных изолятом Sn4ВД (Tox3⁻) (табл. 3). Это может говорить о том, что НЭ SnTox3, действуя как фактор вирулентности, влиял на содержание зеатина и его рибозида в результате взаимодействия по типу ген-на-ген *Snn3-B1-SnTox3*.

Таким образом, наши результаты показывают, что взаимодействие *Snn3-B1-SnTox3*, ведущее к индукции биосинтеза и сигнального пути этилена, направленно снижает содержание зеатина и его рибозида в инфицированных листьях. Это обеспечивает регуляцию редокс-метаболизма растений в пользу патогена, в частности, приводит к подавлению окислительного взрыва и снижению активности пероксидазы на начальной стадии инфицирования, что ведет к успешной колонизации растения-хозяина. Известно, что этилен способен активировать распад ЦК [Taverner et al., 1999]. Кроме того, ранее нами было показано, что транскрипция маркерных генов салицилат-зависимого сигнального пути *PR-1* и *PR-2* в инфицированных SnБ (Tox3⁺) растениях пшеницы увеличивалась только в вариантах с повышенным содержанием эндогенных ЦК [Веселова и др., 2016]. Так у трансгенных растений с повышенным уровнем ЦК, наблюдалось усиление сигналов салициловой кислоты (СК) [Choi et al., 2010], а снижение уровня ЦК у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена ЦК-оксидазы подавляло СК-зависимую активацию *PR* генов [Igari et al., 2008]. Также имеются данные об антагонистическом взаимодействии сигнальных путей, индуцируемых этиленом и СК, при ответе растений на патогены [O'Brien, Benková, 2013]. На основании наших результатов можно предположить, что НЭ патогена *S. nodorum* SnTox3 направленно активирует биосинтез и сигнальный путь этилена, обеспечивая тем самым снижение содержания ЦК в инфицированных растениях и невозможность индукции СК-зависимых защитных реакций: увеличения генерации H₂O₂, развития СВЧ-реакции, повышения активности ПО и т.д.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № АААА-А16-116020350027-7 (2019-2021), а также финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-04-00978.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахиярова Г.Р., Архипова Т.Н. Накопление экзогенного зеатина в клетках корней растений пшеницы и его значение в регуляции транспорта цитокининов // Цитология. 2010. Т. 52. С. 1024–1030.
2. 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. С. 649–660. DOI: 10.7868/S0015330316050158
3. Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В. и др. Влияние этилена и активных форм кислорода на развитие патогена *Stagonospora nodorum* Berk. в тканях растений пшеницы // Биомика. 2018. Т. 10(4). С. 387–399. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-50
4. Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В. и др. Влияние хозяин-специфичного токсина SnTOX3 патогена *Stagonospora nodorum* на сигнальный путь этилена и редокс-статус растений мягкой яровой пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 7. С. 856–864. DOI: 10.18699/VJ19.559
5. Barna B., Fodor J., Harrach B.D. et al. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 59. P. 37–43. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.01.014
6. Bindschedler L.V., Minibaeva F., Gardner S.L. et al. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+} // New Phytol. 2001. V. 151. № 1. P. 185–194. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x
7. Broekgaarden C., Caarls L., Vos I.A. et al. Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense // Plant Physiol. 2015. V. 169. P. 2371–2379.
8. O'Brien J.A., Benková E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses // Front Plant Sci. 2013. V. 4. P. 451.
9. Choi J., Huh S.U., Kojima M. et al. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis // Dev. Cell. 2010. V. 19. P. 284–295.
10. Igari, K. Endo S., Hibara K. et al. Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway in Arabidopsis // Plant J. 2008. V. 55(1). P. 14–27.
11. Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 2285–2309. DOI: 10.1105/tpc.114.125419
12. McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors // Current Opinion in Microbiology. 2018. V. 46. P. 14–18. DOI: 10.1016/j.mib.2018.01.019
13. Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E. et al. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease // The Plant Journal. 2016. V. 87. P. 343–354. DOI: 10.1111/tpj.13203
14. Shen Q., Liu Y., Naqvi N.I. Fungal effectors at the crossroads of phytohormone signaling // Curr. Opin. Microbiol. 2018. V. 46. P. 1–6. DOI: 10.1016/j.mib.2018.01.006
15. Shi G., Zhang Z., Friesen T.L. et al. Marker development, saturation mapping, and high-resolution mapping of the *Septoria nodorum* blotch susceptibility gene *Snn3-B1* in wheat // Mol. Genet. Genomics. 2016. V. 291. P. 107–119. DOI: 10.1007/s00438-015-1091-x
16. Taverner E., Letham D., Wang J. et al. Influence of ethylene on cytokinin metabolism in relation to *Petunia corolla* senescence // Phytochemistry. 1999. V. 51. P. 341–347.
17. Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M. et al. The necrotrophic effector protein SnTox3 reprograms metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. P. 215. DOI: 10.1186/s12870-014-0215-5