

## **Двойная роль каталаз в патосистеме *Triticum aestivum* - *Stagonospora nodorum*: фактор вирулентности или защиты**

**Веселова С. В.<sup>А\*</sup>, Бурханова Г. Ф.<sup>А</sup>, Нужная Т. В.<sup>А,Б</sup>, Румянцев С. Д.<sup>А</sup>,  
Максимов И. В.<sup>А</sup>**

<sup>А</sup> *Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Уфа, Россия. \*E-mail: veselova75@rambler.ru*

<sup>Б</sup> *Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Уфа, Россия.*

Патогены растений ежегодно вызывают серьезные потери урожая многих сельскохозяйственных культур, в том числе и пшеницы. В соответствии с современными представлениями иммунные реакции растений в ответ на атаку патогенов индуцируются на нескольких уровнях [1]. Первый уровень защиты заключается в неспецифическом узнавании патогенов, что приводит к развитию базального иммунитета, известного как РАМР-триггерный иммунитет или РТИ (от pattern triggered immunity) [1]. Второй уровень защиты сводится к специфическому узнаванию эффекторов патогенов продуктами эффекторно-специфических генов растений, называется ЕТИ (от effector-triggered immunity) и соответствует специфическому ответу ген-на-ген [1]. При атаке биотрофных патогенов ЕТИ приводит к ограничению роста патогена и развитию устойчивости. У некротрофных патогенов эффекторы подавляют РТИ и используют путь ЕТИ хозяина для развития восприимчивости, что приводит к восприимчивости, запускаемой некротрофными эффекторами (НЭ) NETS (necrotrophic effectors triggered susceptibility), это соответствует обратному взаимодействию ген-на-ген [2]. Известно, что индукция неспецифического (РТИ) и специфического (ЕТИ) иммунитета вызывает у растений сходные реакции: регуляцию генерации активных форм кислорода (АФК), перепрограммирование генома, синтез вторичных метаболитов и др. [3]. Генерация АФК – окислительный взрыв является одной из наиболее ранних ответных реакций растений на внедрение патогена и играет важную роль в иммунитете растений [4]. В настоящее время считается, что в растительно-микробном взаимодействии АФК образуются в апопласте при участии ферментов НАДФН-оксидазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы (СОД) и оксалаксоксидазы и этот процесс строго контролируется фитогормонами салициловой (СК), жасмоновой кислотами (ЖАК), этиленом и др. [4, 5]. Однако следует отметить, что существуют сильные различия в отношении роли АФК в развитии устойчивости растений к некротрофным и биотрофным патогенам [4]. Резкое и многократное повышение содержания АФК, ведущее к окислительному взрыву и гибели клеток растения, приводит к

остановке роста биотрофных патогенов, но способствует колонизации тканей растений некротрофами [4].

Окислительный взрыв может привести к окислению и разрушению липидов, белков и ДНК в стрессовых клетках, поэтому у растений существуют антиоксидантные механизмы для борьбы с избыточным количеством АФК [6]. Детоксикация АФК в апопласте может осуществляться с помощью антиоксидантных ферментов (аскорбатпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы и др.) или низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, глутатиона, каротиноидов,  $\alpha$ -токоферола и др.) [5]. Каталазы (CAT) считаются наиболее мощными поглотителями АФК из-за их сильного сродства к  $H_2O_2$  [7]. Каталазы обнаружены почти во всех живых организмах, они участвуют в регуляции роста, развития и реакции на стимулы окружающей среды [4, 5, 7]. Каталазы являются уникальными антиоксидантами, разлагающими АФК напрямую без присутствия каких-либо восстановителей. Каталаза непосредственно активирует реакцию дисмутации двух молекул  $H_2O_2$  в  $H_2O$  и  $O_2$  [5]. Каталазы занимают особое место в растительно-микробном взаимодействии, так как способствуют усилению вирулентности некоторых грибных патогенов, за счет снижения концентрации АФК в зоне инфицирования и подавления окислительного взрыва [8]. Работа каталаз регулируется фитогормонами и микроРНК [4, 7]. СК может напрямую связываться и ингибировать каталазу, а этилен, напротив, способен активировать каталазу [4, 6]. Недавние работы показали, что экспрессия генов *CAT* может регулироваться несколькими семействами микроРНК, miR395, miR408, miR531, miR9666 и miR1137 [7].

Фитопатогенный гриб *Stagonospora nodorum* вызывает септориоз листьев и колоса яровой и озимой пшеницы [9]. Главными факторами вирулентности патогена считаются некротрофные эффекторы (НЭ), кодируемые генами *SnTox*, продукты которых взаимодействуют с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*), вызывая развитие болезни [10]. На сегодняшний день охарактеризовано около десятка взаимодействий [10]. Эффекторы *SnTox1* и *SnTox3* достаточно широко распространены среди штаммов и изолятов, вызывают некроз и хлороз у восприимчивых генотипов пшеницы, несущих гены восприимчивости *Snn1* и *Snn3-B1*, соответственно, а их роль в подавлении РТІ и развитии NETS активно изучается. [10, 11]. В настоящее время считается, что основной ролью НЭ является индукция гибели клеток хозяина с помощью манипулирования редокс-статусом и гормональными путями растения [10]. Однако механизмы, лежащие в основе этих процессов, в настоящее время до конца не выяснены. Также известно, что *SnTox1-Snn1* и *SnTox3-Snn3-B1*

взаимодействия эпистатичны по отношению друг к другу, однако механизм эпистаза до конца не раскрыт [10, 11]. Ранее было выдвинуто предположение, что предполагаемый путь РТІ, активируемый совместимым взаимодействием SnTox1-*Snn1*, может ингибировать путь ЕТІ, активированный другим взаимодействием SnTox3-*Snn3-B1*. Кроме того, ранее было показано, что каталаза является фактором вирулентности SnTox3-продуцирующих изолятов *S. nodorum* [8].

В данной работе было изучено влияние SnTox3-продуцирующего изолята *S. nodorum* SnB и SnTox1-продуцирующего изолята *S. nodorum* Sn1SP на содержание перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), активность каталазы (САТ), экспрессию генов транскрипционных факторов (ТФ) гормональных сигнальных путей и экспрессию некоторых консервативных микроРНК у четырех сортов мягкой яровой пшеницы контрастных по чувствительности к НЭ SnTox1 и SnTox3 – Омская 35 (Ом35), Казахстанская 10 (Каз10), Жница и Салават Юлаев (СЮ). Также для выявления роли НЭ SnTox1 и SnTox3 в манипулировании гормональными сигнальными путями СК и этилена растения были обработаны СК и этефоном (ЕТ) (химическим предшественником этилена).

Наши результаты показали, что сорт Ом35 был нечувствителен к SnTox3 и устойчив к изоляту SnB и чувствителен к SnTox1 и восприимчив к изоляту Sn1SP (табл. 1). Сорта Каз10 и Жница, напротив, показали чувствительность к SnTox3 и восприимчивость к изоляту SnB и нечувствительность к SnTox1 и устойчивость к изоляту Sn1SP (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние обработки фитогормонами на площадь поражения на листьях трех сортов пшеницы разной степени чувствительности к НЭ SnTox1 и SnTox3 инфицированных изолятами *S. nodorum* SnB и Sn1SP.**

Вариант обработки	Ом35 ( <i>snn3/Snn1</i> )		Каз10( <i>Snn3/snn1</i> )		Жница( <i>Snn3/snn1</i> )	
	SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP
<i>S. nodorum</i>	14.2 ± 0.8	50.3 ± 5.2	77.1 ± 7.3	11.2 ± 1.1	85.2 ± 7.7	2.3 ± 0.2
<i>S. nodorum</i> +СК	12.2 ± 0.2	63.7 ± 7.1	15.2 ± 0.6	18.5 ± 2.5	25.8 ± 2.1	31.7 ± 3.7
<i>S. nodorum</i> +ЕТ	75.3 ± 5.6	27.7 ± 3.4	94.7 ± 8.4	12 ± 1.6	95.6 ± 4.2	15.7 ± 1.5

*Примечание:* Площадь листьев и площадь зон поражения измеряли через 6 дней после инфицирования изолятами патогена. Площадь зон поражения представлена в % от общей площади листа, которая принята за 100%. СК – салициловая кислота, ЕТ – этефон, химический предшественник этилена.

Обработка СК повышала устойчивость SnTox3-чувствительных сортов к изоляту SnB и снижала устойчивость SnTox1-чувствительного сорта к изоляту Sn1SP (табл. 1). Обработка ЕТ, напротив, повышала устойчивость SnTox1-чувствительного сорта к изоляту Sn1SP и снижала устойчивость всех сортов к изоляту SnB (табл. 1). У сорта Ом35 активность САТ

снижалась, а содержание  $H_2O_2$  повышалось при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP (табл. 2). Однако в первом случае это приводило к устойчивости, а во втором к восприимчивости. У сорта Жница мы обнаружили противоположную реакцию. Активность САТ повышалась, а содержание  $H_2O_2$  снижалось при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP, и это приводило в первом случае к восприимчивости, а во втором случае к устойчивости (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние обработки фитогормонами на содержание перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и активность каталазы (САТ) в листьях трех сортов пшеницы разной степени чувствительности к НЭ SnTox1 и SnTox3 инфицированных изолятами *S. nodorum* SnB и Sn1SP.**

Параметр	Обработка	Время, ч	Ом35 ( <i>snn3/Snn1</i> )		Каз10( <i>Snn3/snn1</i> )		Жница( <i>Snn3/snn1</i> )	
			SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP	SnB	Sn1SP
Содержание $H_2O_2$	Контроль	24	19.0 ± 1.9	20 ± 1.8	19.4 ± 1.6	20 ± 2	20.6 ± 1.9	21 ± 2.0
		72	20.5 ± 2	22 ± 2	18.7 ± 1.7	13 ± 1.1	18.7 ± 1.4	13.6 ± 1.0
	Sn	24	30.3 ± 3	36 ± 3.2	21.4 ± 1.9	32 ± 2.5	19.8 ± 1.7	24 ± 2.1
		72	21.1 ± 2	18 ± 1.5	15.3 ± 1.1	11 ± 0.8	15.2 ± 1.2	14 ± 0.8
	Sn+СК	24	42.5 ± 3.5	55 ± 4.8	45.7 ± 3.8	30 ± 2.7	48.6 ± 4.1	59.3 ± 4.4
		72	24.0 ± 2.1	20.8 ± 2	23.8 ± 2.1	19 ± 1.5	20.3 ± 2.1	12 ± 0.7
	Sn+ЕТ	24	17.5 ± 1.8	17 ± 1.1	16.6 ± 2.2	15.7 ± 1.2	15.6 ± 1.1	21.1 ± 1.8
		72	15.9 ± 1.7	10 ± 0.8	14.7 ± 1.4	5.1 ± 0.5	14.2 ± 0.9	13 ± 0.9
Активность САТ	Контроль	24	326 ± 35	386 ± 35	359 ± 38	398 ± 36	326 ± 28	342 ± 25
		72	345 ± 31	395 ± 38	365 ± 32	375 ± 45	342 ± 25	360 ± 32
	Sn	24	268 ± 25	250 ± 21	606 ± 52	253 ± 23	700 ± 63	601 ± 55
		72	312 ± 30	316 ± 28	632 ± 56	417 ± 45	755 ± 68	361 ± 3
	Sn+СК	24	208 ± 21	225 ± 18	304 ± 35	276 ± 25	321 ± 28	265 ± 20
		72	182 ± 15	272 ± 26	263 ± 22	204 ± 18	281 ± 21	248 ± 22
	Sn+ЕТ	24	696 ± 51	627 ± 56	612 ± 60	493 ± 30	726 ± 56	430 ± 35
		72	670 ± 56	725 ± 69	589 ± 59	715 ± 61	730 ± 70	315 ± 24

Примечание: Содержание  $H_2O_2$  (мкМ  $H_2O_2$  / мг сырой массы), активность САТ (мкМ  $H_2O_2$ /мг белка\* мин). Sn – *S. nodorum*.

Обработка растений СК ингибировала активность САТ у всех сортов при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP, что приводило к накоплению  $H_2O_2$  и окислительному взрыву (табл. 2). Обработка растений ЕТ повышала активность САТ у всех сортов при инфицировании изолятами SnB и Sn1SP, что приводило к снижению содержания  $H_2O_2$  (табл. 2). Анализ транскрипционной активности генов ТФ гормональных сигнальных путей показал, что при инфицировании изолятом SnB у SnTox3-чувствительных сортов индуцировался этиленовый сигнальный путь, повышалась транскрипция генов *EIN3*, *ERF1* и *WRKY53*, а у SnTox3-нечувствительного сорта активировался СК-сигнальный путь, накапливались транскрипты гена *WRKY13*. При инфицировании изолятом Sn1SP у SnTox1-

чувствительного сорта индуцировался СК-сигнальный путь, накапливались транскрипты гена *WRKY13*, а у SnTox1-нечувствительных сортов активировался этиленовый сигнальный путь, повышалась транскрипция генов *EIN3*, *ERF1* и *WRKY53*.

Результаты работы показали, что сигнальный путь СК участвует в развитии восприимчивости к НЭ SnTox1 и устойчивости к НЭ SnTox3, а сигнальный путь этилена участвует в развитии устойчивости растений пшеницы к НЭ SnTox1 и в развитии восприимчивости к НЭ SnTox3. НЭ SnTox1 захватывает сигнальный путь СК и использует его для подавления активности САТ, накопления  $H_2O_2$  и формирования некроза и одновременного подавления сигнального пути этилена с помощью СК. НЭ SnTox3 захватывает сигнальный путь этилена и использует его для подавления накопления  $H_2O_2$  и одновременного подавления сигнального пути СК. На основе результатов данной работы раскрывается возможный механизм эпистаза между двумя НЭ SnTox1 и SnTox3, который может быть связан с захватом и манипулированием НЭ гормональных путей у растений.

Мы предполагаем, что НЭ манипулируют гормональными сигнальными путями для регулирования экспрессии растительных микроРНК, которые отвечают за тонкую настройку всей транскрипции во всем растении. Все больше данных показывает, что микроРНК участвуют в РТИ и ЕТИ в ответ на вирусы, грибы и бактерии. В частности, микроРНК участвуют в регуляции различных защитных сигналов и путей, включая гормональные сигналы и продукцию АФК [12, 13]. В данной работе изучена экспрессия девяти консервативных микроРНК (миР156, миР159, миР160, миР164, миР166, миР393, миР396, миР398 и миР408) у четырех генотипов пшеницы сортов Ом35, Каз10, Жница и СЮ на ранних стадиях заражения изолятом *S. nodorum* SnB. Известно, что все исследованные в данной работе консервативные микроРНК регулируют процессы роста и развития растений, а также участвуют в ответе на абиотические и биотические воздействия [13]. Наши результаты показали, что все девять микроРНК были активированы у SnTox3-нечувствительного сорта Ом35, инфицированного изолятом SnB. У SnTox3-чувствительных сортов НЭ SnTox3 подавлял экспрессию четырех микроРНК (миР159, миР166, миР393 и миР408), что говорит об участии этих микроРНК в развитии устойчивости к SnTox3-продуцирующему изоляту. Функции двух микроРНК миР159 и миР408 при атаке патогена связаны с регуляцией окислительно-восстановительного метаболизма у растений [12]. Недавно было показано, что миР408 пшеницы нацелена на гены каталазы [14]. А мишенью для миР159 являются ферменты СОД и пероксидаза [7].

Для проверки влияния миР408 на ее гены мишени - *TaCAT2-A*, *TaCAT2-B*, были синтезированы *in vitro* модифицированные оцРНК408-F

и оцРНК408-Р (одноцепочечные РНК) и получена дцРНК408 (двуцепочечная РНК) с добавлением на 3'-конец метилированного кэпа, а на 5' конец фосфатной группы для защиты молекул от действия различных нуклеаз. Растения сорта Каз10 были обработаны дцРНК408 с помощью техники SIGS (спрей-индуцированного сайленсинга генов) и инфицированы изолятом SnВ. Симптомы заболевания на опрысканных дцРНК408 растениях практически отсутствовали, патоген не мог размножаться, при этом мы обнаружили накопление  $H_2O_2$ , снижение активности каталазы и уменьшение экспрессии генов *TaCAT2-A* и *TaCAT2-B* у таких растений.

Таким образом, роль каталазы в развитии устойчивости пшеницы или вирулентности патогена будет зависеть от наличия НЭ у изолята патогена. Патогены развили различные стратегии нападения и для этого синтезируют различные НЭ. НЭ SnTox1 и SnTox3 противоположно влияют на сигнальный путь СК для регуляции активности каталазы. При этом вовлекаются механизмы РНК-интерференции и гормональные сети посредством регуляции экспрессии ТФ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00266.

### **Библиографические ссылки**

1. Jones J.D.G., Dang J.L. The plant immune system // Nature. 2006. Vol. 444. P. 323–329. doi: 10.1038/nature05286.
2. Tan K.C., Oliver R.P., Solomon P.S., Moffat C.S. Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence // Functional Plant Biology. 2010. Vol. 37. P. 907–912. DOI:10.1071/FP10067.
3. Ngou B.P.M., Ding P., Jones J.D.G. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system // The plant cell. 2022. Vol. 34. P. 1447–1478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>.
4. Barna B., Fodor J., Harrach B.D., Pogány M., Király Z. 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
5. Podgórska A., Burian M. and Szal B. Extra-Cellular But Extra-Ordinarily Important for Cells: Apoplastic Reactive Oxygen Species Metabolism. Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1353. doi: 10.3389/fpls.2017.01353
6. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. Front. Plant Sci. 2016. 7:187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187
7. Zhang Y., Zheng L., Yun L., Ji L., Li G., Ji M., et al. Catalase (CAT) Gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.): evolution, expression pattern and function analysis. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23: 542. doi: 10.3390/ijms23010542
8. Maksimov I.V., Yarullina L.G., Burkhanova G.F., Zaikina E.A. Relationship between the aggressiveness and catalase activity of *Septoria nodorum* Berk. in wheat. Biology Bulletin. 2013. V. 40. № 5. P. 441–446. doi: 10.1134/s1062359013050099
9. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Khusnutdinova E.K., Maksimov I.V. Ethylene-cytokinin interaction determines early defense response of

wheat against *Stagonospora nodorum* Berk. // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11. P. 174. <https://doi.org/10.3390/biom11020174>.

10. Haugrud A.R.P., Zhang Z., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of resistance to *Septoria nodorum* blotch in wheat // *Theoretical and Applied Genetics*. 2022. Vol. 135. P. 3685–3707. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04036-9>.

11. Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., et al. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease. *Plant J*. 2016; 87: P. 343-354. doi: 10.1111/tpj.13203

12. Yang X., Zhang L., Yang Y., Schmid M., Wang Y. miRNA mediated regulation and interaction between plants and pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 2913. doi: 10.3390/ijms22062913

13. Jiang C-H., Li Z-J., Zheng L-Y., Yu Y-Y., Niu D-D. Small RNAs: Efficient and miraculous effectors that play key roles in plant–microbe interactions. *Mol. Plant Pathol.* 2023; 7. doi: 10.1111/mpp.13329

14. Li Y., Lu Y.G., Shi Y., Wu L., Xu Y.J., Huang F., et al. Multiple rice MicroRNAs are involved in immunity against the blast fungus *magnaporthe oryzae*. *Plant Physiol.* 2014; 164: 1077–1092. doi: 10.1104/pp.113.230052

## **Воздействие гипоксии в комбинации с депривацией N, S и Cu на рост и продукцию биоводорода клетками *Parachlorella kessleri***

**Вечерек М. С.<sup>А</sup>, Мыслейко М. А.<sup>А</sup>, Савицкий А. С.<sup>А</sup>,  
Мацкевич В. С.<sup>А</sup>, Соколик А. И.<sup>А</sup>, Самович Т. В.<sup>Г</sup>, Козел Н. В.<sup>Б,Д</sup>,  
Маноян Д. Г.<sup>Б</sup>, Габриелян Л. С.<sup>Б</sup>, Муравицкая А. О.<sup>А</sup>,  
Демидчик В. В.<sup>А</sup>**

<sup>А</sup> *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь*

<sup>Б</sup> *Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии, Ереван, Армения*

<sup>В</sup> *Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>Г</sup> *Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>Д</sup> *КФХ «Серебряный ручей»*

Некоторые водоросли, благодаря наличию гидрогеназы, способны продуцировать H<sub>2</sub> в ходе, так называемого «биофотолиза». Выделяют прямой и непрямой биофотолиз. В первом случае электроны для восстановления водорода поступают от H<sub>2</sub>O, во втором от органических соединений. Индукция гидрогеназ стимулируется анаэробнозом. Также активность гидрогеназ может увеличиваться при депривации N, P, K, S. Целью настоящей работы являлось установление особенностей роста и продукции H<sub>2</sub> зелёными микроводорослями *Parachlorella kessleri* в условиях