



ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ SnTOX НА СТЕПЕНЬ ВИРУЛЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ ПАТОГЕННОГО ГРИБА *STAGONOSPORA NODORUM*

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

Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Россия, Уфа, 450054, пр. Октября, 71, e-mail: veselova75@rambler.ru

Резюме

Возбудитель септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. синтезирует специфические для хозяина некротрофные эффекторы (НЭ), которые облегчают процесс заражения и обеспечивают вирулентность изолята патогена к растению-хозяину, имеющего доминирующий ген восприимчивости. Взаимоотношения в патосистеме пшеница – *S. nodorum* осуществляются по типу «ген-на-ген» в зеркальном отражении, и выражаются в том, что продукты генов вирулентности патогена (=некротрофные эффекторы (НЭ) белковой природы) при взаимодействии с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*) вызывают совместимость, т.е. развитие болезни. В данной работе были изучены три основных НЭ SnToxA, SnTox1, SnTox3, идентифицированные у *S. nodorum* на геномном уровне. Роль НЭ в развитии септориоза доказана, однако общий ответ хозяина при поражении *S. nodorum* не всегда строго подчиняется обратной модели ген-на-ген, так как множественные взаимодействия SnTox-*Snn* могут проявлять аддитивность или эпистаз. В связи с этим цель работы заключалась в идентификации генов НЭ у трех изолятов *S. nodorum* и изучении влияния транскрипционной активности генов этих НЭ на степень вирулентности изолята. Нами показано, что все три НЭ SnToxA, SnTox3 и SnTox1 играли важную роль в развитии болезни в совместимых взаимодействиях. Эффекторы SnTox3 и SnTox1 проявляли эпистатическое взаимодействие, которое снималось при тройном совместимом взаимодействии (SnTox3-*Snn3*, SnToxA-*Tsn1* и SnTox1-*Snn1*), что показано нами впервые. Механизм эпистаза и аддитивного взаимодействия был связан с регуляцией транскрипционной активности генов НЭ, также как и вирулентность изолята. У авирулентного изолята Sn4ВД отсутствовала транскрипция всех трех генов НЭ, а вирулентный изолят Sn9МН отличался высоким уровнем накопления мРНК всех трех генов НЭ при инокуляции восприимчивого сорта. Мы также показали, что экспрессия *SnTox* зависела как от генотипа хозяина у *SnToxA* и *SnTox3*, так и от числа совместимых взаимодействий, проявляющих аддитивность или эпистаз у *SnTox1* и *SnTox3*. В конечном итоге вирулентность изолята *S. nodorum* зависела от качественного и количественного состава НЭ.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum* Berk.; *Triticum aestivum* L.; некротрофные эффекторы SnToxA, SnTox3 и SnTox1; взаимодействие ген-на-ген; эпистаз.

Цитирование: Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д., Нужная Т.В. Влияние эффекторов SnTOX на степень вирулентности изолятов патогенного гриба *Stagonospora nodorum* // Биомика. 2020. Т.12(3). С. 343-351. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-22

© Авторы

EFFECT OF SnTOX EFFECTORS ON THE VIRULENCE DEGREE OF *STAGONOSPORA NODORUM* ISOLATES

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

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, 450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71, e-mail: veselova75@rambler.ru

Resume

Stagonospora nodorum Berk. is the causal agent of Septoria nodorum blotch (SNB) of wheat (*Triticum aestivum* L.). It synthesizes host-specific necrotrophic effectors (NEs), which facilitate infection process and ensure virulence of pathogen on host plant with a dominant susceptibility gene. The interaction of virulence genes products of the NEs pathogen (SnTox) with susceptibility genes products of the host plant (*Snn*) in the *S. nodorum* - wheat pathosystem is carried out in inverted gene-for-gene system and causes the development of disease. In this study, we tested three main NEs SnToxA, SnTox1, SnTox3, which have already been identified in *S. nodorum* at the gene level. The NEs role in the development of SNB has already been proven; however, the overall host response to SNB does not always strictly follow the inverted gene-for-gene system, as multiple SnTox-*Snn* interactions can be additive or epistatic. In this regard, the aim of the work was to identify the NE genes in three *S. nodorum* isolates and to study effect of NEs genes transcriptional activity on the isolate virulence. We have shown that all three NEs SnToxA, SnTox3 and SnTox1 played an important role in the development of the disease in compatible interactions. Effectors SnTox3 and SnTox1 exhibited epistatic interaction that was removed by a triple compatible interaction (SnTox3-*Snn3*, SnToxA-*Tsn1* and SnTox1-*Snn1*). This effect was shown by us for the first time. The mechanisms of epistatic and additive interactions, as well as the virulence of the isolate were associated with the regulation of the NEs genes transcriptional activity. The avirulent isolate Sn4VD lacked transcription of all three NEs genes, and the virulent isolate Sn9MN was characterized by a high level of mRNA accumulation of all three NEs genes during infection on susceptible cultivar. We also showed that SnTox expression depended both on the host genotype in SnToxA and SnTox3 and on the number of compatible interactions exhibiting additive or epistatic interactions in SnTox1 and SnTox3. Finally, the virulence of the *S. nodorum* isolate depended on the qualitative and quantitative composition of NEs.

Key words: *Stagonospora nodorum* Berk.; *Triticum aestivum* L.; necrotrophic effectors SnToxA, SnTox3 и SnTox1; gene-for-gene interaction; epistasis.

Citation: Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Nuzhnaya T.V. Effect of SnTOX effectors on the virulence degree of *Stagonospora nodorum* isolates. *Biomcs*. 2020. V. 12(3). P. 343-351. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-22 (In Russian)

© The Authors

Введение

Возбудитель септориоза (пятнистости) пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. принадлежит к отряду грибковых патогенов Pleosporales, представители которого синтезируют специфические для хозяина некротрофные эффекторы (НЭ), облегчающие процесс заражения [McDonald, Solomon, 2018]. Такие НЭ обеспечивают вирулентность штамма патогена к растению-хозяину, в геноме которого присутствует соответствующий эффектору доминирующий ген восприимчивости [Tan et al., 2010]. Взаимоотношения в патосистеме пшеница – *S. nodorum* осуществляются по типу «ген-на-ген» в зеркальном отражении, и выражаются в том, что продукты генов вирулентности патогена (=некротрофные эффекторы (НЭ) белковой природы) при взаимодействии с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*) вызывают совместимость, т.е. развитие болезни [McDonald, Solomon, 2018].

В настоящее время у патогена *S. nodorum* на генном уровне идентифицировано только три НЭ (*SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3*) [Faris et al., 2010; Zhang et al., 2011; Liu et al., 2012]. Ген эффектора *SnToxA* кодирует

пептид размером 13,2 кДа, продукт этого гена вызывает некрозы и хлорозы в тканях растений, несущих ген *Tsn1* [Faris et al., 2010]. Ген *SnTox1* кодирует цистеин-богатый пептид с хитин-связывающим мотивом размером 10,3 кДа. НЭ *SnTox1* вызывает развитие болезни на пшенице с геном *Snn1* локализованным на 1BS хромосоме [Liu et al., 2012]. Ген *SnTox3* кодирует пептид 17,5 кДа с 6 остатками цистеина, чувствительность пшеницы к этому НЭ определяется двумя генами *Snn3-B1* и *Snn3-D1*, локализованными на 5BS и 5DS хромосомах пшеницы, соответственно [Zhang et al., 2011]. Эффекторы *SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3* считаются основными у патогена *S. nodorum* и достаточно широко распространены среди изолятов и штаммов [Liu et al., 2012]. Дополнительно, выявлены еще несколько взаимодействий, такие как *SnTox2-Snn2*, *SnTox4-Snn4* and *SnTox5-Snn5*, *SnTox6-Snn6* и *SnTox7-Snn7*, но гены, кодирующие НЭ патогена, и гены восприимчивости хозяина этих взаимодействий еще не идентифицированы [Phan et al., 2016].

Роль НЭ в развитии септориоза определена с помощью мутантов *S. nodorum* несущих делеции в генах эффекторов, что приводило к потере

вирулентности патогенов на сортах пшеницы с соответствующими генами восприимчивости [Rybak et al., 2017]. Кроме того, в некоторых странах по устойчивости к трем НЭ SnToxA, SnTox1, SnTox3 ведется эффектор-ассоциированная селекция [Phan et al., 2016]. Следовательно, изучение вклада каждого НЭ в степень вирулентности изолята *S. nodorum* представляет как научный, так и практический интерес.

Однако общий ответ хозяина при поражении *S. nodorum* не всегда строго подчиняется обратной модели ген-на-ген и тяжесть заболевания иногда не является функцией количества взаимодействий SnTox-Snn. Это происходит из-за того, что множественные взаимодействия SnTox-Snn проявляют различные эффекты, такие как аддитивность и эпистаз или на ответ хозяина влияют другие гены с незначительными эффектами [Phan et al., 2016]. Так для совместимых взаимодействий SnToxA-Tsn1 и SnTox1-Snn1 показан аддитивный эффект [Chu et al., 2010]. Недавно было обнаружено, что взаимодействие SnTox1-Snn1 эпистатично по отношению к SnTox3-Snn3, а эпистаз проявлялся в дифференциальной экспрессии гена SnTox3 [Phan et al., 2016]. Тем не менее, на сегодняшний день имеющиеся в литературе данные не могут объяснить всех эффектов взаимодействий SnTox-Snn. В связи с этим цель работы заключалась в идентификации генов НЭ у трех изолятов *S. nodorum* различной вирулентности и изучении влияния транскрипционной активности генов этих НЭ на степень вирулентности изолята при заражении сортов пшеницы с различным аллельным состоянием соответствующих генов восприимчивости.

Материалы и методы

Объектом исследования служили три сорта мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., с разным аллельным состоянием генов восприимчивости к патогену *S. nodorum* Berk.: Жница (*Tsn1/Snn1/Snn3*), Казахская 10 (Каз10) (*tsn1/Snn3/Snn1*) и Омская 35 (Ом35) (*tsn1/snn3/Snn1*) [Нужная и др. (Nuzhnaya et al.), 2020]. В работе были использованы три изолята гриба *S. nodorum*: Sn4ВД (Sn4VD) (авирулентный) и Sn9МН (Sn9MN) (вирулентный) (Республика Беларусь) и SnБ (SnB) (вирулентный) (Республика Башкортостан). Грибы культивировали на картофельно-глюкозном агаре. Растения выращивали в контейнерах с 10% раствором питательной среды Хогланда–Арнона на специально оборудованной светоплощадке с условиями культивирования: температура 20/24°C (ночь/день), 16 ч светопериод, интенсивность света 146 Вт/м² ФАР (лампы Osram L 36W/77) в течение 7 сут.

Проростковую устойчивость сортов оценивали методом газончиков, как описано ранее [Веселова и др., 2016]. Развитие симптомов септориоза на листьях

пшеницы фиксировали на шестые сутки после инфицирования изолятами *S. nodorum* с помощью фотоаппарата SP-800UZ Image Stabilization (Olympus, Индонезия), площадь зоны поражения измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html) и выражали в процентах от общей площади листа. Кроме того, оценку зон поражения проводили по международной шкале, которая также предусматривает учет степени пораженности различных органов растений: RR (0–5%) – сорта с очень высокой и высокой устойчивостью; R (до 10–15%) – устойчивые сорта; M (до 25%) – слабовосприимчивые сорта; S (до 40–65%) – восприимчивые сорта; SS (до 90–100%) – сорта с очень высокой и высокой восприимчивостью; и бальной системе, как описано у Liu et al. (2004).

Выделение ДНК из семидневной культуры гриба осуществляли с помощью фенольно-детергентного метода. Идентификацию генов НЭ SnToxA, SnTox1 и SnTox3 у изолятов *S. nodorum* SnБ, Sn9МН и Sn4ВД выполняли посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными праймерами к SnToxA (JX997419), SnTox1 (JX997402) [Shi et al., 2016] и SnTox3 (FJ823644) [Winterberg et al., 2014], в качестве внутреннего контроля на присутствие грибной ДНК использовали праймеры на ген «домашнего хозяйства» тубулина (S56922) [Fraaije et al., 2002]. ПЦР осуществляли в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-Терцик (ДНК-Технология, Россия). Продукты ПЦР разделяли в 7% ПААГ, окрашенном бромистым этидием, с использованием маркерной ДНК Gene Ruler DNA Ladder (Fermentas). Гели фотографировали с помощью документирующей системы GelDoc XR (BioRad Laboratories, США).

Экспрессию генов SnToxA, SnTox1 и SnTox3 у разных изолятов *S. nodorum* во время инокуляции растений пшеницы анализировали с теми же геноспецифичными праймерами методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США) с применением интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Тотальную РНК из контрольных и опытных листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 24 и 96 ч после инфицирования изолятами *S. nodorum*, выделяли с помощью реагента Trizol, согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия). Для нормирования результатов экспрессии исследуемых генов использовали праймеры к гену тубулина гриба *S. nodorum* (S56922) [Fraaije et al., 2002]. Изменения в экспрессии интересующего гена определяли по вычислению уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения iCycler iQ5 Real-Time Detection System Software (BioRad Laboratories, США).

Статистическая обработка. Все эксперименты повторяли три раза и выполняли в трех биологических и трех аналитических повторностях (общее n = 9). На рисунке 2 приведены характерные варианты из серии опытов (n=90). На рисунке 3 и таблице 1 приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам.

Результаты и обсуждение

Три изолята *S. nodorum* тестировали методом ПЦР на наличие генов НЭ - *SnToxA*, *SnTox3* и *SnTox1* (рис. 1). У изолятов Sn4ВД и Sn9МН в геноме были обнаружены 3 гена НЭ - *SnToxA*, *SnTox3* и *SnTox1* (рис.1). У изолята SnБ были обнаружены только два гена НЭ – *SnToxA* и *SnTox3* (рис. 1).

Известно, что НЭ гриба (*SnTox*) поражают только те сорта пшеницы, которые несут в своем геноме соответствующие им гены восприимчивости (*Snn*) [Phan et al., 2016; McDonald, Solomon, 2018]. Ранее нами были идентифицированы сорта мягкой яровой пшеницы с различным аллельным состоянием генов восприимчивости [Нужная и др. (Nuzhnaya et al.), 2020]. Сорт Жница содержал три доминантные аллели (*Tsn1/Snn1/Snn3*) к трем НЭ *S. nodorum* - *SnToxA*, *SnTox1* и *SnTox3*, сорт Каз10 содержал две доминантные аллели (*tsn1/Snn3/Snn1*) к двум НЭ - *SnTox1* и *SnTox3*, сорт Ом35 содержал одну доминантную аллель (*tsn1/snn3/Snn1*) к НЭ *SnTox1* [Нужная и др. (Nuzhnaya et al.), 2020].

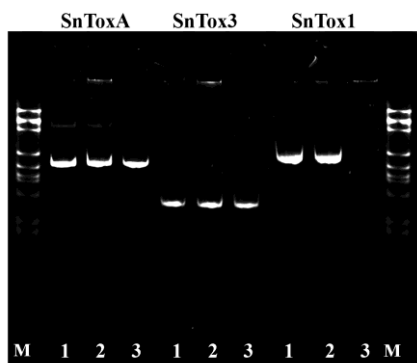
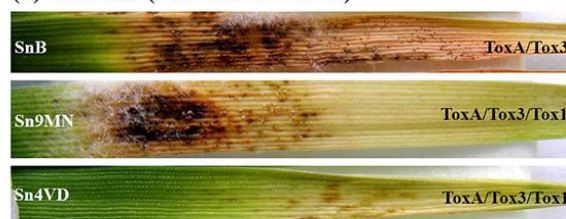


Рис.1. Идентификация генов *SnToxA*, *SnTox3* и *SnTox1* методом ПЦР у трех изолятов *S. nodorum*: 1 -Sn4ВД; 2 - Sn9МН; 3 - SnБ; М - ДНК-маркеры, 100–1000 п.н.
Fig. 1. Identification of the *SnToxA*, *SnTox3* and *SnTox1* genes by PCR in tree isolates of *S. nodorum*: 1- Sn4ВД; 2 - Sn9МН; 3 – SnБ; М - DNA molecular weight ladder 100–1000 bp.

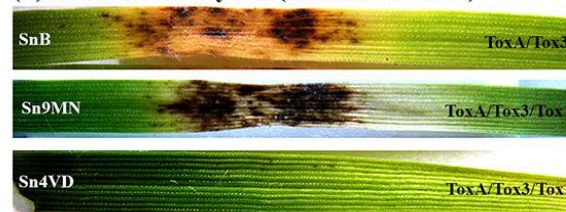
Для изучения влияния НЭ на вирулентность изолята нами был проведен анализ реакции каждого сорта на инокуляцию тремя изолятами *S. nodorum* (рис. 2, табл. 1) и исследована транскрипционная активность всех трех генов НЭ (рис. 3).

Изоляты Sn9МН и Sn4ВД содержали гены всех трех НЭ, однако авирулентный изолят Sn4ВД не вызывал значительных видимых повреждений на листьях всех трех сортов (рис. 2, табл. 1). Напротив, вирулентный изолят Sn9МН (*ToxA/Tox3/Tox1*) поражал все исследуемые сорта, но в разной степени (рис. 2, табл. 1). Другой вирулентный изолят SnБ содержал два гена НЭ - *SnToxA* и *SnTox3* и поражал со значительными повреждениями сорта Жница и Каз10, имеющие гены восприимчивости к данным эффекторам, и не поражал сорт Ом35 нечувствительный к данным токсинам (рис. 2, табл. 1).

(a) Zhnitsa (*Tsn1/Snn3/Snn1*)



(b) Kazhastanskaya10 (*tsn1/Snn3/Snn1*)



(c) Omskaya 35 (*tsn1/snn3/Snn1*)

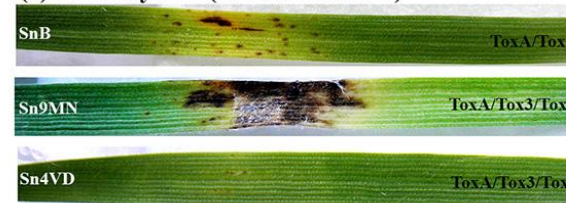


Рис. 2. Анализ фенотипических проявлений взаимодействия ген-на-ген в различных совместимых и несовместимых сочетаниях в патосистеме *S. nodorum* – *T. aestivum*. Развитие симптомов зафиксировано через 6 суток после заражения трех сортов мягкой яровой пшеницы с различным аллельным состоянием генов восприимчивости Жница (Zhnitsa) (a), Казахстанская 10 (Kazhastanskaya 10) (b) и Омская 35 (Omskaya 35) (c) тремя изолятами *S. nodorum* SnБ, Sn9МН, Sn4ВД.

Fig. 2. Analysis of phenotypes of gene-for-gene interactions in various compatible and incompatible combinations in the *S. nodorum* - *T. aestivum* pathosystem. The development of symptoms was recorded 6 days after infection of three bread spring wheat varieties with different allelic states of susceptibility genes Zhnitsa (a), Kazhastanskaya 10 (b) and Omskaya 35 (c) with three isolates *S. nodorum* SnБ, Sn9МН, Sn4ВД.

Таблица 1.

Реакция на инокуляцию изолятами *S. nodorum* SnБ (ToxA/Tox3), Sn9MH (ToxA/Tox3/Tox1) и Sn4ВД (ToxA/Tox3/Tox1) трех сортов пшеницы с различным аллельным состоянием соответствующих генов восприимчивости к эффекторам

Table 1. Reaction of three wheat varieties with different allelic states of the corresponding genes susceptibility to effectors to inoculation with *S. nodorum* SnB (ToxA/Tox3), Sn9MN (ToxA/Tox3/Tox1) and Sn4VD (ToxA/Tox3/Tox1) isolates

| Сорт / Реакция на поражение Variety / Reaction to damage | Изолят <i>S. nodorum</i> / Isolate <i>S. nodorum</i> | | |
|---|--|---------------|---------------|
| | SnБ / SnB | Sn9MH / Sn9MN | Sn4ВД / Sn4VD |
| Жница / Zhnitsa (<i>Tsn1/Snn1/Snn3</i>) | | | |
| Некрозы / Necrosis, % | 18 ± 2 | 27 ± 2 | 1 ± 0.1 |
| Хлорозы / Chlorosis, % | 55 ± 4 | 57 ± 5 | 2 ± 0.2 |
| Общая зона поражения / Damage zone, % | 73 ± 6 | 84 ± 6 | 3 ± 0.3 |
| Балл пораженности и Группа устойчивости / Damage score and Resistance group* | 5 / SS | 5 / SS | 1 / RR |
| Казахстанская 10 / Kazahstanskaya 10 (<i>tsn1/Snn3/Snn1</i>) | | | |
| Некрозы / Necrosis, % | 16 ± 2 | 31 ± 3 | 0.05 ± 0.002 |
| Хлорозы / Chlorosis, % | 35 ± 3 | 25 ± 2 | 0 |
| Общая зона поражения / Damage zone, % | 51 ± 5 | 56 ± 4 | 0.05 ± 0.001 |
| Балл пораженности и Группа устойчивости / Damage score and Resistance group* | 4 / S | 4 / S | 1 / RR |
| Омская 35 / Omskaya 35 (<i>tsn1/snn3/Snn1</i>) | | | |
| Некрозы / Necrosis, % | 5 ± 0.7 | 23 ± 2 | 0.05 ± 0.002 |
| Хлорозы / Chlorosis, % | 3 ± 0.5 | 0 | 0 |
| Общая зона поражения / Damage zone, % | 8 ± 1 | 23 ± 2 | 0.05 ± 0.001 |
| Балл пораженности и Группа устойчивости / Damage score and Resistance group* | 2 / R | 3 / M | 1 / RR |

Примечание: * RR (0–5%) – сорта с очень высокой и высокой устойчивостью; R (до 10–15 %) – устойчивые сорта; M (до 25 %) – слабовосприимчивые сорта; S (до 40–65 %) – восприимчивые сорта; SS (до 90–100 %) – сорта с очень высокой и высокой восприимчивостью.

Note: *RR (0 - 5%) - varieties with very high and high resistance; R (up to 10 - 15%) - resistant varieties; M (up to 25%) - slightly susceptible varieties; S (up to 40 - 65%) - susceptible varieties; SS (up to 90 - 100%) - varieties with very high and high susceptibility.

При инокуляции сорта Ом35 (*tsn1/snn3/Snn1*) изолятом SnБ (ToxA/Tox3) наблюдали минимальные зоны поражения, которые можно объяснить реакцией сверхчувствительности или влиянием других генов или эффекторов с незначительными эффектами [Phan et al., 2016]. При инокуляции сорта Ом35 изолятом Sn9MH (совместимое взаимодействие SnTox1-*Snn1*) наблюдали влияние SnTox1 на развитие болезни и вирулентность изолята Sn9MH (рис. 2, табл. 1). Из рис. 2 видно, что SnTox1 вызывает некрозы, занимающие почти 25% площади листа и не вызывает хлорозы (рис. 2, табл. 1). При инокуляции сорта Каз10 (*tsn1/Snn3/Snn1*) изолятом SnБ (совместимое взаимодействие SnTox3-*Snn3*) наблюдали влияние SnTox3 на развитие болезни (рис. 2, табл. 1). По симптомам поражения видно, что SnTox3 вызывает некрозы и значительные хлорозы, совместно занимающие более 50% площади листа (рис. 2, табл.

1). Следовательно, оба эффектора SnTox1 и SnTox3 играют важную роль в развитии болезни при совместимых взаимодействиях. При инокуляции сорта Каз10 изолятом Sn9MH (два совместимых взаимодействия SnTox1-*Snn1* и SnTox3-*Snn3*) не обнаружили ожидаемого значительного увеличения зон поражения по сравнению с вариантом Каз10/SnБ (SnTox3-*Snn3*) (рис. 2, табл. 1). Такая реакция могла быть вызвана эпистатическим взаимодействием SnTox1-*Snn1* по отношению к SnTox3-*Snn3* [Phan et al., 2016]. Напротив, при инокуляции сорта Жница (*Tsn1/Snn1/Snn3*) изолятом SnБ (два совместимых взаимодействия SnTox3-*Snn3* и SnToxA-*Tsn1*) обнаружили значительное увеличение зон поражения по сравнению с вариантом Каз10/SnБ (SnTox3-*Snn3*), хлорозы и некрозы занимали более 70% площади листа (рис. 2, табл. 1). Такая реакция указывает на отсутствие эпистаза и аддитивный эффект

взаимодействий SnTox3-*Snn3* и SnToxA-*Tsn1* [Haugrud et al., 2019] и говорит о важной роли SnToxA в развитии болезни при совместимых взаимодействиях. При инокуляции сорта Жница изолятом Sn9MN наблюдали реакцию трех совместимых взаимодействий SnTox3-*Snn3*, SnToxA-*Tsn1* и SnTox1-*Snn1* и обнаружили увеличение зон поражения по сравнению с вариантом Жница/SnБ (SnTox3-*Snn3* и SnToxA-*Tsn1*), в основном за счет увеличения образования некрозов (рис. 2, табл. 1). Такая реакция может говорить об отсутствии эпистатического взаимодействия между SnTox1-*Snn1* и SnTox3-*Snn3* в присутствии SnToxA-*Tsn1*.

Эпистатические и аддитивные взаимодействия между SnTox-*Snn* выявлялись и в предыдущих исследованиях, но механизмы этих явлений до конца не раскрыты [Friesen et al., 2008; Chu et al., 2010; Phan et al., 2016; Rybak et al., 2017; Haugrud et al., 2019]. Предполагают, что возможные механизмы эпистаза могут включать регуляцию экспрессии эффекторного гена, действие генов хозяина или взаимодействия между сигнальными путями, используемыми двумя НЭ [Friesen et al., 2008; Phan et al., 2016]. Недавно было показано, что эпистаз SnTox1-*Snn1* по отношению к SnTox3-*Snn3* проявлялся в подавлении транскрипции гена *SnTox3* [Phan et al., 2016]. Однако это эпистатическое взаимодействие было рассмотрено только для одного варианта совместимых взаимодействий SnTox1-*Snn1* и SnTox3-*Snn3* [Phan et al., 2016]. Для того чтобы выявить связь между изменением уровня мРНК генов эффекторов, их аддитивным или эпистатическим взаимодействием и вирулентностью изолята нами был проведен транскрипционный анализ все трех генов НЭ.

При анализе транскрипционной активности генов эффекторов *SnToxA*, *SnTox3* и *SnTox1* в нашем исследовании были обнаружены отличия в накоплении мРНК генов НЭ в разных сортах при инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ, Sn9MN, Sn4ВД (рис. 3). При инокуляции растений пшеницы изолятом Sn4ВД не обнаружено транскрипции всех трех генов НЭ (рис. 3). Это может объяснить отсутствие видимых поражений на листьях всех исследуемых сортов (рис. 2, табл. 1). Такая реакция доказывает важность SnToxA, SnTox3 и SnTox1 в обеспечении вирулентности изолятов в совместимых взаимодействиях [Rybak et al., 2017]. Ген *SnTox1* не был обнаружен в геноме изолята SnБ, следовательно, при анализе транскрипционной активности этого гена у данного изолята при инокуляции всех исследуемых сортов не выявлено накопления какого-либо количества мРНК (рис. 3b).

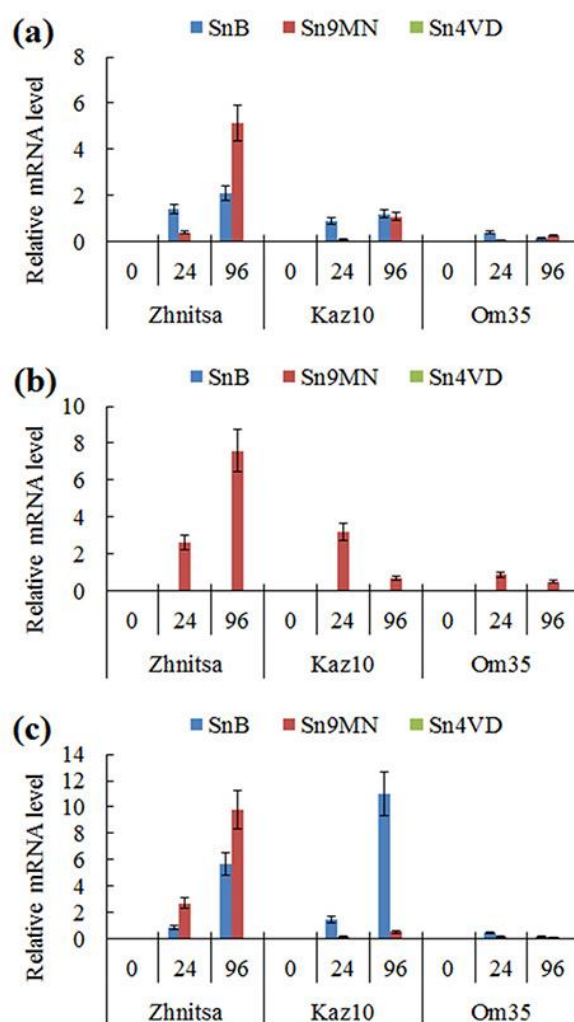


Рис.3. Транскрипционная активность генов эффекторов *SnToxA* (a), *SnTox1* (b) и *SnTox3* (c) (*in planta*) в сортах мягкой яровой пшеницы с разным аллельным состоянием генов восприимчивости инокулированных водой (0) и тремя изолятами *S. nodorum* SnБ (SnБ), Sn9MN (Sn9MN), Sn4VD (Sn4ВД) (24 и 96 часов после заражения).

Fig. 3. Transcriptional activity of *SnToxA* (a), *SnTox1* (b), and *SnTox3* (c) effector genes (*in planta*) in soft bread spring wheat cultivars with different allelic states of susceptibility genes inoculated with water (0) and three isolates of *S. nodorum* SnБ (SnБ), Sn9MN (Sn9MN), Sn4VD (Sn4ВД) (24 and 96 hours after infection)

Накопление транскриптов гена *SnToxA* было значительно выше у обоих изолятов SnБ и Sn9MN при инокуляции сорта Жница (*Tsn1*) чувствительного к этому НЭ, чем при инокуляции сортов Kaz10 и Om35 не имеющих соответствующего гена восприимчивости (рис. 3a). Ранее для изолята Sn5 было показано влияние генотипа пшеницы на экспрессию гена

SnToxA – при совместимом взаимодействии *SnToxA-Tsn1* экспрессия гена *SnToxA* была в 2 раза выше, чем при несовместимом взаимодействии *SnToxA-tsn1* [Faris et al., 2011]. Кроме того, транскрипция гена *SnToxA* у изолята Sn9МН была в 2.4 раза выше, чем у изолята SnБ через 96 ч после инокуляции чувствительного сорта Жница (рис. 3а), что может объяснить более высокую агрессивность изолята Sn9МН по сравнению с изолятом SnБ. Этот вывод согласуется с наблюдением некоторых авторов о положительной корреляции между уровнем экспрессии *SnToxA* и вкладом в болезнь взаимодействия *SnToxA-Tsn1* [Faris et al., 2011; Viridi et al., 2016].

Транскрипционная активность гена *SnTox1* была обнаружена только у изолята Sn9МН (рис. 3б). Чувствительными к этому НЭ были все три сорта Жница, Каз10 и Ом35 (*Snn1*), однако накопление мРНК данного гена у сортов отличалось (рис. 3б). Максимальное накопление мРНК гена *SnTox1* обнаружили при инокуляции сорта Жница, а минимальное – при инокуляции сорта Ом35 (рис. 3б). Очевидно, что уровень транскрипции гена *SnTox1* зависит от числа совместимых взаимодействий у сорта при инокуляции данным изолятом Sn9МН. Так в варианте Ом35/Sn9МН с самой низкой транскрипционной активностью гена *SnTox1* присутствует одно совместимое взаимодействие *SnTox1-Snn1*; в варианте Каз10/Sn9МН – два совместимых взаимодействия *SnTox1-Snn1* и *SnTox3-Snn3*; а в варианте Жница/Sn9МН с самой высокой транскрипционной активностью гена *SnTox1* – три совместимых взаимодействия *SnToxA-Tsn1*, *SnTox1-Snn1* и *SnTox3-Snn3*. Такая реакция может говорить о наличии общего механизма регуляции транскрипции генов НЭ, этот регуляторный механизм может быть связан с активностью транскрипционных факторов, позитивно и негативно регулирующих экспрессию генов НЭ [Rybak et al., 2017; Tan, Oliver, 2017].

Транскрипционная активность гена *SnTox3* в совместимых взаимодействиях Жница/SnБ, Жница/Sn9МН, Каз10/SnБ (*SnTox3-Snn3*) была выше, чем в несовместимых взаимодействиях Ом35/SnБ и Ом35/Sn9МН (*SnTox3-snn3*) в 5.5 раз и более (рис. 3с). Мы впервые показали для двух изолятов *S. nodorum* SnБ и Sn9МН, что генотип пшеницы влиял на транскрипционную активность гена *SnTox3*. Сходное влияние генотипа пшеницы на транскрипционную активность гена *SnToxA*, ранее было обнаружено другими авторами для других изолятов *S. nodorum* [Faris et al., 2011; Viridi et al., 2016]. При совместимом взаимодействии Каз10/Sn9МН (*SnTox3-Snn3*), напротив, мы обнаружили ингибирование накопления транскриптов гена *SnTox3* (рис. 3с). Этот эффект являлся проявлением эпистатического взаимодействия *SnTox1-Snn1* по отношению к *SnTox3-Snn3*, что

совпадает с недавно полученными результатами других авторов [Phan et al., 2016]. Кроме того, в варианте Жница/Sn9МН (*SnTox3-Snn3*, *SnToxA-Tsn1* и *SnTox1-Snn1*), где нами был обнаружен аддитивный эффект трех совместимых взаимодействий, мы не выявили подавления транскрипционной активности гена *SnTox3* или гена другого эффектора, напротив, накопление транскриптов генов эффекторов в этом варианте было самым большим (рис. 3). Аддитивный эффект тройного совместимого взаимодействия показан нами впервые.

Таким образом, нами обнаружено, что все три НЭ *SnToxA*, *SnTox3* и *SnTox1* играли важную роль в развитии болезни в совместимых взаимодействиях. Эффекторы *SnTox3* и *SnTox1* проявляли эпистатическое взаимодействие, которое снималось при тройном совместимом взаимодействии (*SnTox3-Snn3*, *SnToxA-Tsn1* и *SnTox1-Snn1*). Механизм эпистаза и аддитивного взаимодействия был связан с регуляцией транскрипционной активности генов НЭ, следовательно, вирулентность изолята также была связана с транскрипционной активностью генов НЭ. У авирулентного изолята Sn4ВД отсутствовала транскрипция всех трех генов НЭ, а вирулентный изолят Sn9МН отличался высоким уровнем накопления мРНК всех трех генов НЭ при инокуляции восприимчивого сорта. Мы также предполагаем, что экспрессия *SnTox* зависит как от генотипа хозяина, как в случае с *SnToxA* и *SnTox3*, так и от числа совместимых взаимодействий, проявляющих аддитивность или эпистаз, как в случае с *SnTox1* и *SnTox3*. В конечном итоге вирулентность изолята *S. nodorum* зависела от качественного и количественного состава НЭ.

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 и № 20-316-80047-мол-эв-а с использованием оборудования РЦКП “Агидель” и УНУ “КОДИНК” в рамках ГК №05.621.21.0033.

Литература

1. 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* // Физиол. раст. 2016. Т. 63(5). С. 649-660. DOI: 10.7868/S0015330316050158
2. Нужная Т.В., Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д. Роль эффекторов *Stagonospora nodorum* в подавлении защитного ответа растений пшеницы за счет регуляции работы компонентов про/антиоксидантной системы // Экобиотех. 2020. Т. 3(2). С. 166-173. doi. 10.31163/2618-964X-2020-3-2-166-173

3. Chu C.-G., Faris J.D., Xu S.S., Friesen T.L. Genetic analysis of disease susceptibility contributed by the compatible Tsn1–SnToxA and Snn1–SnTox1 interactions in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem // *Theor Appl Genet.* 2010. V. 120. P. 1451–1459. DOI 10.1007/s00122-010-1267-z
4. Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens // *PNAS.* 2010. V. 107(3). P. 13544–13549. doi.10.1073/pnas.1004090107
5. Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B., Friesen T.L. Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector SnToxA among isolates is correlated with levels of disease in wheat // *MPMI.* 2011. V. 24(12). P. 1419–1426. doi:10.1094/MPMI-04-11-0094
6. Fraaije B.A., Lovell D.J., Baldwin S. Septoria epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics to identify mechanisms of disease escape // *Plant Protect. Sci.* 2002. V. 38 (2). P. 421–424. DOI: 10.17221/10512-PPS
7. Friesen T.L., Zhang Z., Solomon P.S., Oliver R.P., Faris J.D. Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. P. 682–693. DOI:10.1104/pp.107.108761
8. Haugrud A.R.P., Zhang Z., Richards J.K., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of variable disease expression conferred by inverse gene-for-gene interactions in the wheat-*Parastagonospora nodorum* pathosystem // *Plant Physiology.* 2019. V. 180. P. 420–434. DOI:10.1104/pp.19.00149
9. Liu Z.H., Friesen T.L., Rasmussen J.B., Ali S., Meinhardt S.W., Faris J.D. Quantitative trait loci analysis and mapping of seedling resistance to *Stagonospora nodorum* leaf blotch in wheat // *Phytopathology.* 2004. V. 94. P. 1061-1067. DOI:10.1094/PHYTO.2004.94.10.1061
10. Liu Z., Zhang Z., Faris J.D., Oliver R.P., Syme R., McDonald M.C., McDonald B.A., Solomon P.S., Lu S., Shelver W.L., Xu S., Friesen T.L. The Cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1* // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8(1). e1002467. doi:10.1371/journal.ppat.1002467
11. McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors // *Curr. Opin. Microbiol.* 2018. V. 46. P. 14-18. doi. 10.1016/j.mib.2018.01.019
12. 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 // *Plant J.* 2016. V. 87. P. 343-354. DOI 10.1111/tbj.13203
13. Rybak K., SEE P.T., Phan H.T.T., Syme R.A., Moffat C.S., Oliver R.P., Tan K.-C. A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat // *Molecular Plant Pathology.* 2017. V. 18(3). P. 420–434. DOI: 10.1111/mpp.125
14. 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 Snn3-B1 in wheat // *Mol. Genet. Genomics.* 2016. V. 291. P. 107-119. DOI 10.1007/s00438-015-1091-x
15. Tan K.C., Oliver R.P., Solomon P.S., Moffat C.S. Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence // *Funct. Plant Biol.* 2010. V. 37. P. 907–912. DOI: 10.1071/FP10067
16. Tan K.-C., Oliver R.P. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13(4):e1006241. doi. 10.1371/journal.ppat.1006241
17. Virdi S.K., Liu Z., Overlander M.E., Zhang Z., Xu S.S., Friesen T.L., Faris J.D. New insights into the roles of host gene-necrotrophic effector interactions in governing susceptibility of durum wheat to tan spot and *Septoria nodorum* Blotch. // *Durum-Necrotrophic Pathogen Interactions.* 2016. V. 6. P. 4139 – 4150. doi: 10.1534/g3.116.036525
18. 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 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
19. Zhang Z., Friesen T.L., Xu S.S., Shi G., Liu Z., Rasmussen J.B., Faris J.D. Two putatively homoeologous wheat genes mediate recognition of SnTox3 to confer effector-triggered susceptibility to *Stagonospora nodorum* // *Plant J.* 2011. V. 65. P. 27–38. doi. 10.1111/j.1365-313X.2010.04407.x

References

1. Chu C.-G., Faris J.D., Xu S.S., Friesen T.L. Genetic analysis of disease susceptibility contributed by the compatible Tsn1–SnToxA and Snn1–SnTox1 interactions in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem. *Theor Appl Genet.* 2010. V. 120. P. 1451–1459. DOI 10.1007/s00122-010-1267-z
2. Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *PNAS.* 2010. V. 107(3). P. 13544–13549. doi. 10.1073/pnas.1004090107

3. Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B., Friesen T.L. Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector SnToxA among isolates is correlated with levels of disease in wheat. *MPMI*. 2011. V. 24(12). P. 1419–1426. doi:10.1094 /MPMI -04-11-0094
4. Fraaije B.A., Lovell D.J., Baldwin S. Septoria epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics to identify mechanisms of disease escape. *Plant Protect. Sci.* 2002. V. 38(2). P. 421–424. DOI: 10.17221/10512-PPS
5. Friesen T.L., Zhang Z., Solomon P.S., Oliver R.P., Faris J.D. Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene. *Plant Physiol.* 2008. V. 146. P. 682–693. DOI:10.1104/pp.107.108761
6. Haugrud A.R.P., Zhang Z., Richards J.K., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of variable disease expression conferred by inverse gene-for-gene interactions in the wheat-*Parastagonospora nodorum* pathosystem. *Plant Physiology*. 2019. V. 180. P. 420–434. DOI:10.1104/pp.19.00149
7. Liu Z.H., Friesen T.L., Rasmussen J.B., Ali S., Meinhardt S.W., Faris J.D. Quantitative trait loci analysis and mapping of seedling resistance to *Stagonospora nodorum* leaf blotch in wheat. *Phytopathology*. 2004. V. 94. P. 1061-1067. DOI:10.1094/PHYTO.2004.94.10.1061
8. Liu Z., Zhang Z., Faris J.D., Oliver R.P., Syme R., McDonald M.C., McDonald B.A., Solomon P.S., Lu S., Shelver W.L., Xu S., Friesen T.L. The Cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1*. *PLoS Pathog.* 2012. V. 8(1). e1002467. doi:10.1371/journal.ppat.1002467
9. McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018. V. 46. P. 14-18. doi. 10.1016/j.mib.2018.01.019
10. Nuzhnaya T.V., Veselova S.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D. The role of *Stagonospora nodorum* effectors in suppressing the defense response of wheat plants by regulating the work of pro-/antioxidant system components. *Ecobiotech.* 2020. V. 3(2). P. 166-173. doi. 10.31163/2618-964X-2020-3-2-166-173
11. 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. *Plant J.* 2016. V. 87. P. 343-354. DOI 10.1111/tpj.13203
12. Rybak K., SEE P.T., Phan H.T.T., Syme R.A., Moffat C.S., Oliver R.P., Tan K.-C. A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat. *Molecular Plant Pathology*. 2017. V. 18(3). P. 420–434. DOI: 10.1111/mpp.125
13. 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 *Snn3-B1* in wheat. *Mol. Genet. Genomics*. 2016. V. 291. P. 107-119. DOI 10.1007/s00438-015-1091-x
14. Tan K.C., Oliver R.P., Solomon P.S., Moffat C.S. Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence. *Funct. Plant Biol.* 2010. V. 37. P. 907–912. DOI: 10.1071/FP10067
15. Tan K.C., Oliver R.P. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2017. V. 13(4):e1006241. doi. 10.1371/journal.ppat.1006241
16. Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Roles of ethylene and cytokinins in development of defense responses in *Triticum aestivum* plants infected with *Septoria nodorum*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63(5). P. 609-619. DOI 10.1134/S1021443716050150
17. Virdi S.K., Liu Z., Overlander M.E., Zhang Z., Xu S.S., Friesen T.L., Faris J.D. New insights into the roles of host gene-necrotrophic effector interactions in governing susceptibility of durum wheat to tan spot and Septoria nodorum Blotch. *Durum-Necrotrophic Pathogen Interactions*. 2016. V. 6. P. 4139 – 4150. doi: 10.1534/g3.116.036525
18. 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 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
19. Zhang Z., Friesen T.L., Xu S.S., Shi G., Liu Z., Rasmussen J.B., Faris J.D. Two putatively homoeologous wheat genes mediate recognition of SnTox3 to confer effector-triggered susceptibility to *Stagonospora nodorum*. *Plant J.* 2011. V. 65. P. 27–38. doi. 10.1111/j.1365-313X.2010.04407.x