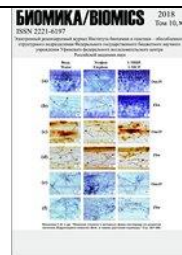




БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomics.ru>



**ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНА И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА РАЗВИТИЕ ПАТОГЕНА
STAGONOSPORA NODORUM BERK. В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ**

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

Хорошо известно, что растения реагируют на атаку патогенов интенсивной генерацией активных форм кислорода (АФК) – окислительным взрывом, и показано, что АФК играют центральную роль в иммунитете растений. Про-/антиоксидантный статус растений находится под строгим контролем фитогормонов. Среди них этилен, роль которого при биотическом стрессе неоднозначна и зависит от типа патогена и вида растения. Целью настоящей работы являлось изучение роли этилена в регуляции генерации АФК в инфицированных возбудителем септориоза (*Stagonospora nodorum* Berk.) листьях контрастных по устойчивости к патогену сортов мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), а также исследование влияния этилена и АФК на развитие и рост патогена. Гистохимический анализ супероксид радикала ($O_2^{\cdot-}$) и перекиси водорода (H_2O_2) показал, что обработка растений этефоном (химическим предшественником этилена) приводила к снижению накопления $O_2^{\cdot-}$ и почти полному ингибированию генерации H_2O_2 в местах проникновения патогена и общему низкому содержанию H_2O_2 в инфицированных листьях, что способствовало интенсивному размножению мицелия гриба и обширному поражению растений. Так показано, что низкие концентрации АФК являются индукторами морфогенеза у грибов и способствуют их усиленному росту и развитию. Подавление генерации АФК, скорее всего, происходило за счет снижения активности оксалаксоксидазы, уменьшения накопления мРНК генов *TaRbohD* и *TaRbohF*, кодирующих изоформы НАДФН-оксидазы, и увеличения активности каталазы при инфицировании. При ингибировании рецепции этилена с помощью 1-метилциклопропена наблюдали противоположный результат - интенсивная локальная генерация $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 и общая высокая генерация H_2O_2 в листьях приводили к ингибированию роста мицелия патогена, что происходило за счет активации прооксидантных ферментов. Пероксидазы при этом выполняли различные функции на разных этапах инфекционного процесса. Таким образом, этиленовый сигнальный путь отрицательно влиял на генерацию АФК в инфицированных растениях пшеницы на биотрофной стадии развития патогена. Подавляя накопление H_2O_2 и снижая генерацию $O_2^{\cdot-}$ за счет регуляции работы различных ферментов про-/антиоксидантной системы на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, этилен обеспечивал тем самым благоприятные условия для развития *S. nodorum* и проникновения патогена в ткани пшеницы.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum* Berk.; активные формы кислорода; этилен; про-/антиоксидантная система.

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

**INFLUENCE OF ETHYLENE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES ON THE GROWTH OF
THE PATHOGEN *STAGONOSPORA NODORUM* BERK. IN WHEAT PLANT TISSUE**

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

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

Resume

It has long been established that plants respond to pathogen attacks with a transient burst of reactive oxygen species (ROS). So, ROS play a central role in plant immune responses. The pro- and antioxidant status of plants is controlled by phytohormones. One of these agents is ethylene. Ethylene acts differently under biotic stress depending on the type of pathogen and plant species. Previously, we have shown the negative role of ethylene in the defense response of wheat plants against *Stagonospora nodorum* Berk. The aim of this work was the investigation of ethylene role in regulation of ROS generation in leaves of bread spring wheat (*Triticum aestivum* L.) of cultivars contrast in the resistance to the pathogen, as well as the study of influence of ethylene and ROS on the growth of the pathogen. Histochemical analysis of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) showed that the treatment of plants with ethephone (a chemical precursor of ethylene) led to decrease of the accumulation of $O_2^{\cdot-}$ and almost complete inhibition of H_2O_2 generation at the sites of pathogen penetration and the decrease of content of H_2O_2 in the infected leaves. It promoted intensive proliferation of fungal infections hyphae and large plant damage. It was showed that low concentrations of ROS were inducers of morphogenesis of fungi and enhanced growth and development of the fungus. When plants were treated by ethephone, suppression of ROS generation was most likely due to decreased activity of oxalate oxidase, reduced expression of genes *TaRbohD* and *TaRbohF* encoding isoforms of NADPH-oxidase, and increased activity of catalase during infection. The inhibition of ethylene by 1-methylcyclopropene (1-MCP) resulted in the opposite outcome. Intensive local generation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 and high total content of H_2O_2 in the infected leaves treated with 1-MCP led to inhibition of the growth of the pathogen mycelium. The process was due to the activation of prooxidant enzymes. At the same time, peroxidases performed various functions at different stages of the infection process. Thus, the ethylene signaling pathway negatively affected the ROS generation in wheat plants infected with *S. nodorum* at the biotrophic stage of pathogen development. As a result of the ethylene influence on the enzymes of the pro- and antioxidant system, $O_2^{\cdot-}$ content was reduced, and H_2O_2 generation was suppressed. Thereby ethylene provided appropriate conditions for the development of the pathogen in the wheat tissues.

Keywords: *Stagonospora nodorum* Berk.; reactive oxygen species; ethylene; pro- and antioxidant system.

Citation: Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Rumyantsev S.D., Maksimov I.V. Influence of ethylene and reactive oxygen species on the growth of the pathogen *Stagonospora nodorum* Berk. in wheat plant tissue. *Biomics*. 2018. V. 10(4) P. 387-399. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-50 (In Russian)

Введение

Хорошо известно, что растения реагируют на атаку патогенов интенсивной генерацией активных форм кислорода (АФК) – окислительным взрывом, и показано, что АФК играют центральную роль в иммунитете растений [Qi et al., 2017; Podgórska et al., 2017]. В настоящее время считается, что основным местом синтеза АФК в растительно-микробном взаимодействии является апопласт, где локализованная на плазмаллеме НАДФН-оксидаза генерирует супероксид радикал ($O_2^{\cdot-}$), дисмутирующий затем спонтанно или с помощью супероксид дисмутазы (СОД) в перекись водорода (H_2O_2) [Podgórska et al., 2017]. Кроме того, имеются данные об участии в процессе генерации АФК в некоторых патосистемах ферментов пероксидазы (ПО) и оксалаксоксидазы (ОО) [Barna et al., 2012; Qi et al., 2017].

Следует отметить, что существуют сильные различия в отношении роли АФК и антиоксидантов в развитии устойчивости растений к некротрофным и биотрофным патогенам [Barna et al., 2012]. 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 [Barna et al., 2012]. Для проникновения и лучшего роста биотрофные патогены снижают концентрацию АФК у восприимчивых форм

растений, используя механизмы активации антиоксидантов. Так показано, что низкие концентрации АФК являются индукторами морфогенеза у грибов и способствуют их усиленному росту и развитию [Belozerskaya et al., 2006]. Таким образом, патогены способны регулировать уровень АФК в растениях и используют для этого про-/антиоксидантную систему и фитогормональные сигнальные пути [Barna et al., 2012; Kazan, Lyons, 2014].

В настоящее время механизмы регуляции синтеза апопластных АФК в иммунном ответе интенсивно изучаются, но до конца не раскрыты. Недавние исследования показали, что про-/антиоксидантный статус растений находится под строгим контролем фитогормонов, участвующих в формировании защитных реакций при стрессе [Almagro et al., 2009; Barna et al., 2012]. Среди них этилен, роль которого при биотическом стрессе неоднозначна и зависит от типа патогена и вида растения. Показано, что активация сигнального пути этилена в различных патосистемах может приводить как к увеличению устойчивости растений к патогенам [Kazan, Lyons, 2014], так и к развитию патогенных микроорганизмов в тканях растений [Vleesschauwer et al., 2010; Sewelam et al., 2013]. Некоторые патогены могут индуцировать выделение этилена, что способствует распространению инфекции в растении

[Vleesschauver et al., 2010]. Ранее нами была показана отрицательная роль этилена в развитии устойчивости растений пшеницы к *Stagonospora nodorum* [Veselova et al., 2016].

К сожалению, механизмы воздействия фитогормонов, в том числе и этилена, на процессы генерации АФК при биотическом стрессе изучены не достаточно [Mittler et al., 2011; Barna et al., 2012; Sewelam et al., 2013]. Хотя в некоторых случаях инфицирование сопровождалось параллельным накоплением этилена и H_2O_2 [Wi et al., 2012], остается невыясненным индуцировал ли этилен синтез H_2O_2 . С одной стороны, этилен принимал участие в механизмах формирования патоген-индуцированных некрозов в растительных тканях и способствовал последующей колонизации растения-хозяина при гемиботрофной инфекции [Chen et al., 2009; Vleesschauver et al., 2010; Wi et al., 2012]. С другой стороны, наблюдали одновременное накопление этилена и повышение активности каталазы (КАТ) у восприимчивых к мучнистой росе форм ячменя [Barna et al., 2012]. У трансгенных растений с нарушенным синтезом или рецепцией этилена было обнаружено снижение активности КАТ [Barna et al., 2012; Sewelam et al., 2013] и повышение генерации $O_2^{\cdot-}$ в стрессовых условиях [Abozeid et al., 2017], а мутантная линия культуры клеток арабидопсиса нечувствительная к этилену генерировала значительно больше H_2O_2 , чем дикая линия [Novikova et al., 2017]. Также было показано, что под воздействием низких температур этилен уменьшал накопление АФК в апопласте за счет ингибирования транскрипции генов НАДФН-оксидазы и активации транскрипции генов, вовлеченных в аскорбат-глутатионовый цикл [Zermiani et al., 2015].

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение роли этилена в регуляции генерации АФК в растениях пшеницы, инфицированных грибом *S. nodorum*, а также исследование влияния этилена и АФК на развитие и рост патогена.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 7-и суточные проростки мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) контрастных по устойчивости к *S. nodorum* Berk. сортов: Жница (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый). Растения выращивались на 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 агрессивного штамма гриба *S. nodorum* (10^5 спор/мл) из коллекции лаборатории и переносили в климатостат КС-200 СПУ.

Для измерения генерации H_2O_2 и активности ферментов (ПО и КАТ) растительный материал (1 : 5 вес/об.) через 6 и 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 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 H_2O_2 в супернатанте определяли с использованием ксиленол оранжевого в присутствии Fe^{2+} при 560 нм по методу [Bindschedler et al., 2001]. Активность ПО определяли микрометодом в 96-луночных планшетах (Costar, США) по окислению (о-)фенилендиамина (ОФД) в присутствии H_2O_2 при 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, США) [Veselova et al., 2014]. Активность фермента выражали в оптических ед./мг белка в мин. Содержание белка определяли по методу Бредфорд. Активность КАТ определяли микрометодом, основанном на способности H_2O_2 образовывать с солями молибдата стойкий окрашенный комплекс [Veselova et al., 2014]. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader. Активность КАТ рассчитывали с использованием калибровочной кривой и выражали в мкМ H_2O_2 /(г сырой массы в мин). Активность ОО определяли микрометодом по окислению ОФД в присутствии щавелевой кислоты (Реахим, Россия) и коммерческой ПО хрена (ДиазМ, Россия) при 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader [Veselova et al., 2014].

Локальную генерацию $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в инфицированных тканях листьев определяли путем витального окрашивания нитросиним тетразолием и 3,3-диаминобензидином, соответственно. Для этого отрезки листьев через 6 и 24 ч после инокуляции *S. nodorum* инкубировали в вакууме в течение 60 мин при 20°C, затем листья фиксировали в 96%-ном этаноле и переносили в 50%-ный раствор глицерина. Для визуализации мицелия *S. nodorum* отрезки листьев через 24 ч после инокуляции патогеном фиксировали в 96%-ном этаноле, а затем окрашивали 1.0%-ным раствором анилинового синего в 1%-ной молочной кислоте, в результате структуры гриба окрашивались в сине-фиолетовый цвет. Для регистрации накопления $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 и развития мицелия патогена использовали цифровой микроскоп BZ8100E (Keyence, Япония).

Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных растений пшеницы проводили с использованием реагента «Trizol» согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия) из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 6 и 24 часа после инфицирования *S. nodorum*. Анализ

экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе «iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System» (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. Изменения в экспрессии интересующего гена определяли по вычислению уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения «iCycler iQ5 Real-Time Detection System software».

Все эксперименты повторяли 3 раза и проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях (общее $n = 9$). На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам.

Результаты и обсуждение

Изученный в данной работе грибок *S. nodorum* – возбудитель септориоза пшеницы, является гемибiotрофом, т.е. сочетает в своем жизненном цикле биотрофную и некротрофную фазы развития. В наших экспериментах была изучена ранняя – биотрофная фаза развития патогена, заканчивающаяся примерно к третьим суткам паразитирования. В начальный период инфицирования патоген растет и развивается в межклетниках листьев пшеницы без видимых симптомов [Troshina et al., 2007]. Переход к некротрофной фазе развития характеризуется появлением некрозов и хлорозов на листьях пшеницы.

Ранее нами было показано отрицательное влияние этилена на устойчивость растений пшеницы к *S. nodorum* [Veselova et al., 2014; 2016]. Обработка растений ЭТ усиливала развитие патогена в листьях как восприимчивого, так и устойчивого сортов – хлорозы с развивающимися пикнидами занимали до 95 и 84% от общей площади листа, соответственно, у каждого сорта [Veselova et al., 2016]. У обработанных 1-МЦП инфицированных *S. nodorum* растений обоих сортов были обнаружены минимальные зоны поражения с небольшими некрозами, занимавшими около 2% от общей площади листа [Veselova et al., 2016].

В данной работе растения устойчивого сорта Ом35, инфицированные возбудителем септориоза *S. nodorum*, характеризовались более интенсивной генерацией H_2O_2 , чем растения восприимчивого сорта Жница (рис. 1). Кроме того, при инфицировании устойчивого сорта было обнаружено два пика генерации H_2O_2 – через 6 и 24 ч после инфицирования, которые отсутствовали у восприимчивого сорта (рис. 1) [Veselova et al., 2018]. Обработка растений ЭТ подавляла генерацию H_2O_2 в листьях как через 6 ч, так и через 24 ч после инфицирования *S. nodorum* у обоих сортов (рис. 1). Обработка восприимчивых растений 1-МЦП, напротив, индуцировала генерацию H_2O_2 в листьях через 6 ч и 24 ч после инфицирования (рис. 1).

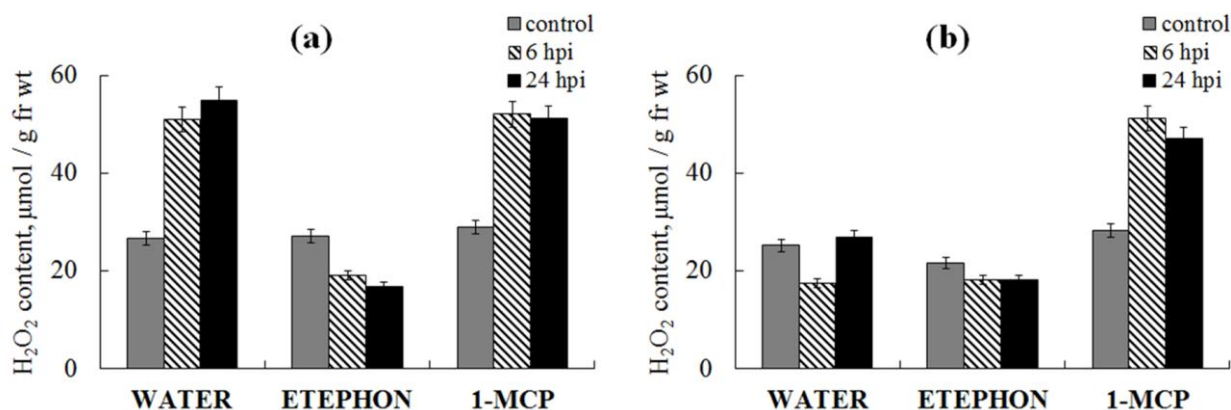


Рис. 1. Влияние этилена на содержание перекиси водорода в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы (а) Омская 35 (устойчивого) и (б) Жница (восприимчивого) через 6 и 24 ч после инфицирования *S. nodorum*.

Fig. 1. Effect of ethylene on the H_2O_2 content in infected wheat leaves of cultivars contrast in the disease resistant (a) Omskaya 35 (resistance) and (b) Zhnitsa (susceptible) 6 h and 24 h after inoculation with *S. nodorum*.

Во многих биологических системах окислительный взрыв часто носит характер «волны» с двумя или более пиками [Mittler et al., 2011]. Первый пик (ранний) возникает в течение минут и часов, а второй (долгосрочный) – в течение суток после начала действия стимула [Mittler et al., 2011]. Современные исследования показали, что первый (ранний) пик продукции АФК может запускать каскад последующих реакций и формировать долгосрочный АФК сигнал или «АФК волну» [Mittler et al., 2011].

Как известно, при патогенезе H_2O_2 выполняет две функции – сигнальную (активирует сигнальные системы растений) и биоцидную (напрямую препятствует росту патогена в тканях) [Mittler et al., 2011]. Наши результаты предполагают, что подавление генерации H_2O_2 и распространения «АФК волны» в инфицированных растениях обработанных ЭТ, могло быть связано как с сигнальной, так и с биоцидной функцией H_2O_2 .

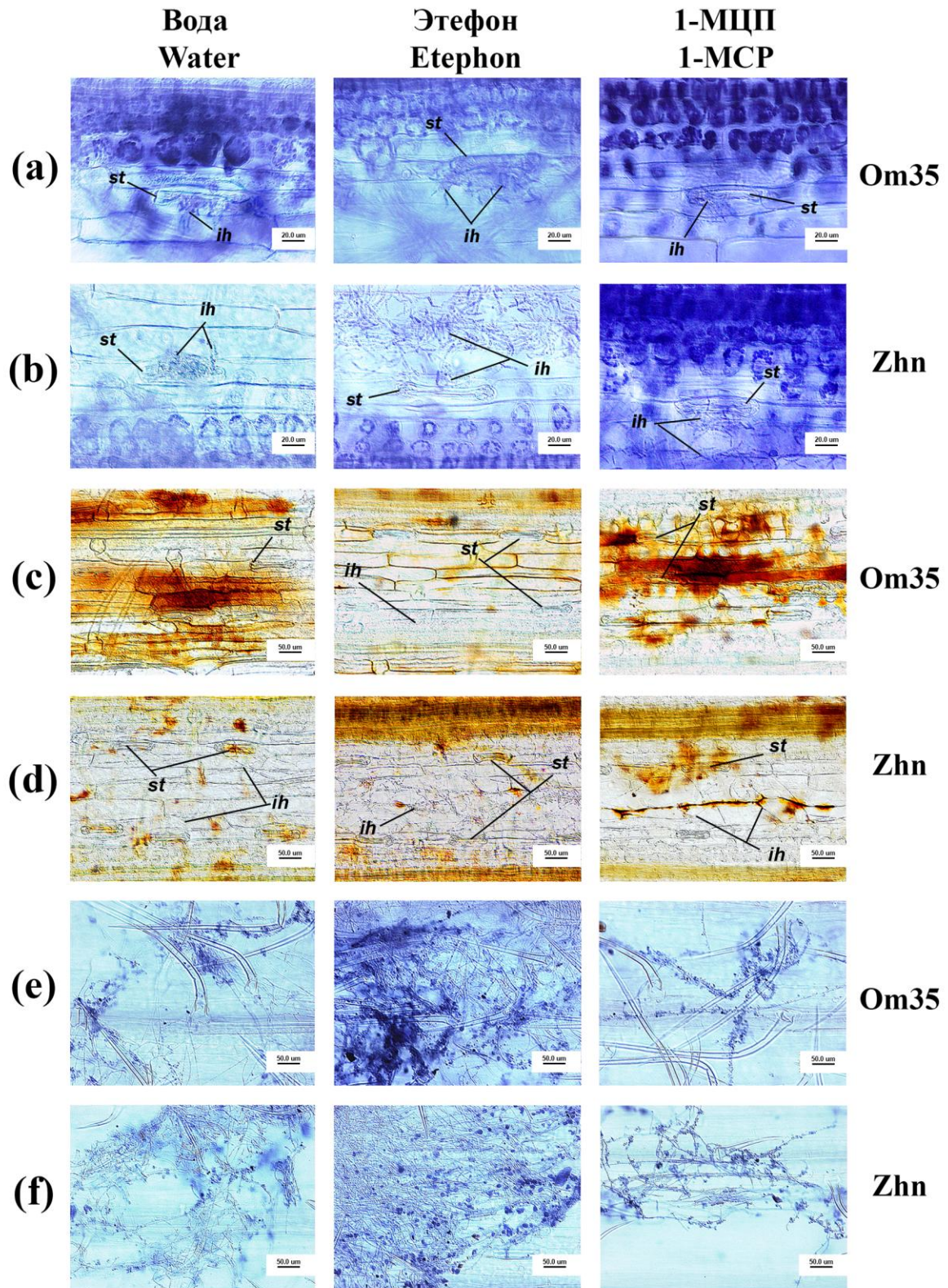


Рис. 2. Влияние этилена на локальную генерацию O_2^- (a, b) через 6 ч инфицирования *S. nodorum*, локальную генерацию H_2O_2 (c, d) и рост мицелия (e, f) через 24 ч инфицирования *S. nodorum* в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы) Омская 35 (Om35) и Жница (Zhn). Обозначения: *ih* – инфекционные гифы, *st* – устьица.

Fig. 2. Effect of ethylene on local O_2^- generation (a, b) 6 h after inoculation with *S. nodorum*, local H_2O_2 generation (c, d) and growth of pathogen mycelium (e, f) 24 h after inoculation with *S. nodorum* in infected wheat leaves of cultivars contrast in the disease resistant Omskaya 35 (Om35) and Zhnitsa (Zhn). Legend: *ih* - infections hyphae, *st* – stomata.

Гистохимический анализ, показал, что уже через 6 ч после инфицирования мицелий гриба активно проникал в лист через устьица, а через 24 ч рост мицелия на поверхности листьев восприимчивого сорта Жница и листьев растений обработанных ЭТ достигал своего максимума (рис. 2). При этом на листьях устойчивого сорта Ом35 и листьях растений обработанных 1-МЦП мицелий *S. nodorum* развивался слабо (рис. 2). Через 6 ч после инфицирования устойчивые и обработанные 1-МЦП растения реагировали на проникновение мицелия повышенной генерацией $O_2^{\sim}$ в клетках мезофилла под устьищем (рис. 2е, ф). У восприимчивых и обработанных ЭТ растений наблюдали низкую генерацию $O_2^{\sim}$ в этот же период инфицирования (рис. 2а, б). Успешное проникновение мицелия через 6 часов инфицирования на фоне низкой локальной генерации $O_2^{\sim}$ приводившее впоследствии к интенсивному развитию мицелия на поверхности листьев у восприимчивых и обработанных ЭТ растений, сопровождалось отсутствием генерации H_2O_2 в местах проникновения гриба через 24 ч после инфицирования (рис. 2с, д). У устойчивых и обработанных 1-МЦП растений через 24 ч после инфицирования было обнаружено торможение развития мицелия и значительная локальная генерация H_2O_2 в местах проникновения гриба, выполняющая прямую биоцидную функцию (рис. 2).

Таким образом, интенсивная локальная генерация $O_2^{\sim}$ и H_2O_2 приводила к ингибированию роста мицелия *S. nodorum* и затруднению его проникновения в ткани листа устойчивого сорта (рис. 2). Такие растения характеризовались общей высокой генерацией H_2O_2 в листьях через 6 и 24 часа после инфицирования (рис. 1). Сходным образом у устойчивых растений пшеницы инфицированных возбудителем бурой ржавчины интенсивная генерация $O_2^{\sim}$ в замыкающих клетках устьиц и в мезофилле листа тормозила рост и развитие патогена [Plotnikova, 2009]. Обработка растений ЭТ приводила к интенсивному размножению мицелия гриба на фоне низкой локальной генерации $O_2^{\sim}$ и H_2O_2 в местах проникновения патогена (рис. 2), а также низкого общего содержания H_2O_2 в листьях через 6 и 24 часа после инфицирования *S. nodorum* (рис. 1). Так же как в растениях пшеницы и ячменя этилен усиливал рост и развитие *Fusarium graminearum* [Chen et al., 2009], а обработка растений арабидопсиса предшественником синтеза этилена, аминокислоты карбоновой кислотой (АЦК), уменьшала генерацию $O_2^{\sim}$ [Abozeid et al., 2017]. Напротив, в условиях ингибирования рецепции этилена с помощью 1-метилциклопропена (1-МЦП) наблюдали торможение развития мицелия, интенсивную локальную генерацию $O_2^{\sim}$ и H_2O_2 в местах проникновения гриба (рис. 2) и системное повышение содержания H_2O_2 в инфицированных листьях (рис. 1). Также как у трансгенных растений с нарушенным синтезом или рецепцией этилена было обнаружено торможение развития мицелия патогенов

[Chen et al., 2009; Vleeschauwer et al., 2010], а ингибирование рецепции этилена 1-МЦП приводило к накоплению H_2O_2 в апопласте [Zermiani et al., 2015].

Таким образом, в наших экспериментах обработка растений ЭТ способствовала росту мицелия *S. nodorum* в тканях растений пшеницы, а обработка 1-МЦП – ингибитором связывания этилена с его рецепторами, останавливала рост патогена. Наши данные предполагают, что влияние этилена на развитие мицелия патогена заключалось в регуляции генерации АФК в инфицированных растениях.

Генерация и утилизация АФК контролируется ферментами про-/антиоксидантной системы, а НАДФН-оксидаза плазмаллемы является основным ферментом, генерирующим АФК в апопласте [Qi et al., 2017; Podgórska et al., 2017]. Для формирования и распространения «АФК волны» необходима активация НАДФН-оксидазы, что было доказано с применением каталазы и ингибитора НАДФН-оксидазы [Mittler et al., 2011]. НАДФН-оксидаза генерирует $O_2^{\sim}$, далее совместно с супероксиддисмутазой, ПО, аминоксидазой и ОО продуцируется H_2O_2 [Podgórska et al., 2017].

В нашей работе исследована транскрипционная активность генов, кодирующих две изоформы НАДФН-оксидазы - *TaRbohD* и *TaRbohF*, которые играют важную роль в ответе растений на абиотические и биотические стрессовые факторы [Kimura et al., 2017]. У устойчивого сорта и растений, обработанных 1-МЦП, при инфицировании было обнаружено накопление транскриптов как гена *TaRbohD*, так и гена *TaRbohF* (рис. 3). Стоит отметить, что транскрипция гена *TaRbohD* активировалась в большей степени через 6 ч инфицирования, а транскрипция гена *TaRbohF* через 24 ч после инфицирования (рис. 3). У восприимчивого сорта и растений, обработанных ЭТ, обнаружено небольшое накопление транскриптов гена *TaRbohD* через 6 ч инфицирования и значительное снижение уровня мРНК гена *TaRbohF* через 24 ч инфицирования (рис. 3).

Роль этилена в регуляции работы НАДФН-оксидазы широко изучается как в процессах роста и развития, так и при воздействии стрессовых факторов различной природы [Mersmann et al., 2010; Zermiani et al., 2015]. Однако данные весьма противоречивы, так как этилен выполняет в растениях множество функций [Golemić et al., 2014]. Кроме того, влияние этилена на НАДФН-оксидазу может быть как прямым, так и опосредованным другими ферментами про-/антиоксидантной системы [Zermiani et al., 2015]. Наши результаты показали, что обработка растений ЭТ уменьшала транскрипционную активность гена *TaRbohF* через 24 часа после инфицирования, а обработка 1-МЦП, напротив, увеличивала ее (рис. 3). Это могло быть причиной, в первом случае, уменьшения содержания $O_2^{\sim}$ и H_2O_2 , а во втором случае – увеличения их содержания (рис. 1).

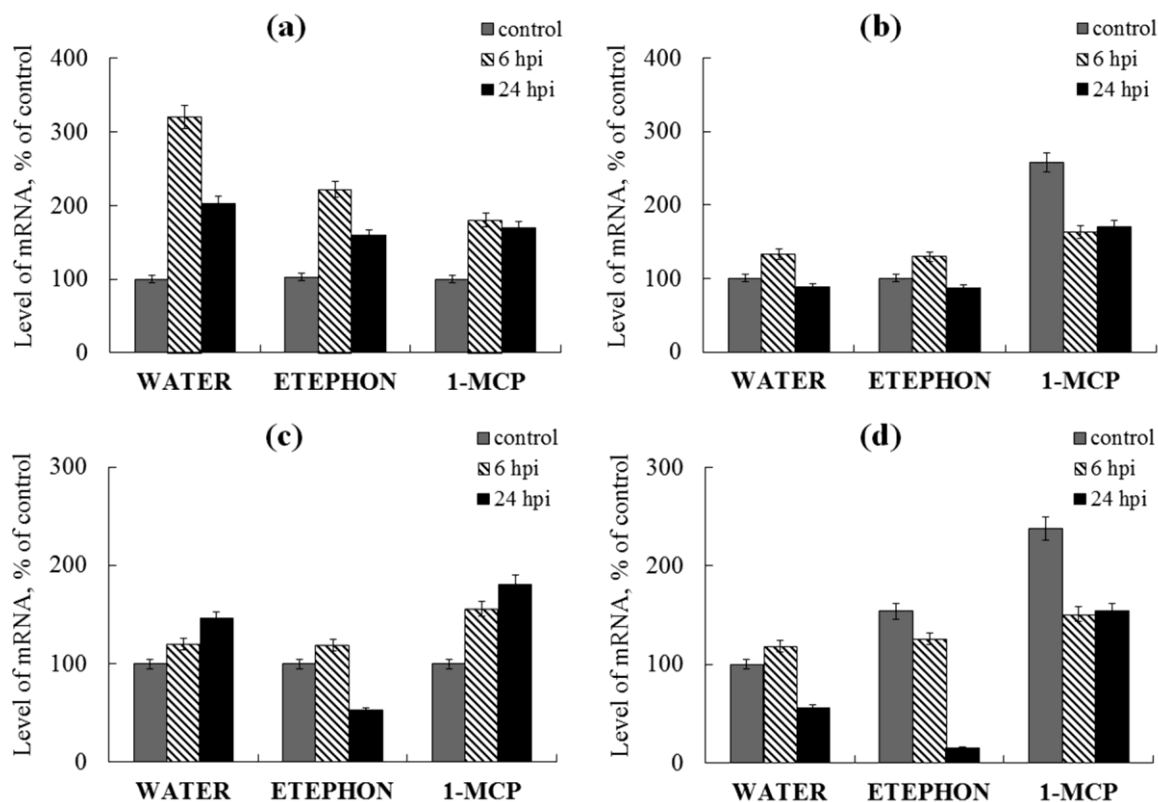


Рис. 3. Влияние этилена на содержание мРНК генов *TaRbohD* (a, b) и *TaRbohF* (c, d), кодирующих изоформы НАДФН-оксидазы в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы (a, c) Омская 35 (устойчивого) и (b, d) Жница (восприимчивого) через 6 и 24 ч после инфицирования *S. nodorum*.

Fig. 3. Effect of ethylene on contents of mRNAs of genes *TaRbohD* (a, b) and *TaRbohF* (c, d) encoding isoforms of NADPH-oxidase in infected wheat leaves of cultivars contrast in the disease resistant (a, c) Omskaya 35 (resistance) and (b, d) Zhnitsa (susceptible) 6 h and 24 h after inoculation after inoculation with *S. nodorum*.

Эти данные согласуются с результатами, полученными на яблоках, подвергнутых воздействию низких температур, у которых обработка 1-МЦП повышала транскрипционную активность генов НАДФН-оксидаз *RBOHC* и *RBOHF*, что приводило к накоплению АФК в апопласте [Zermiani et al., 2015]. Также из наших данных следует, что этилен способен активировать ген *TaRbohD* в первые часы инфицирования, что согласуется с результатами об индукции гена *AtRbohD* флагеллином на ранней стадии инфицирования через активацию этиленового сигнального пути, полученными из анализа этилен-нечувствительных мутантов арабидопсиса [Mersmann et al., 2010]. Такая небольшая активация транскрипции гена *TaRbohD* в первые часы инфицирования может объяснить низкие концентрации $O_2^{\cdot -}$ в местах проникновения патогена у восприимчивых и обработанных ЭТ растений (рис. 2, рис.3), что могло способствовать проникновению гифов гриба в ткани растения-хозяина в отличие от больших концентраций АФК, ограничивающих данный процесс [Barna et al., 2012].

Молекула $O_2^{\cdot -}$, генерированная НАДФН-оксидазой, преимущественно играет роль пускового звена в каскаде реакций образования других АФК. В

апопласте также генерируются гидроксильный радикал ($OH^{\cdot}$) и самая стабильная из всех молекул АФК – перекись водорода H_2O_2 с участием ферментов ОО и ПО [Mittler et al., 2011; Podgórska et al., 2017]. Также в апопласте происходит разрушение АФК с участием фермента каталазы [Podgórska et al., 2017].

Важную роль в формировании устойчивости растений к грибным патогенам отводят патоген-индуцируемому ферменту ОО, катализирующей окисление солей щавелевой кислоты (ЩК) с образованием CO_2 и H_2O_2 [Dong et al., 2008]. ЩК, являясь фактором патогенности ряда грибов, в том числе *S. nodorum*, закисляет апопласт, стимулирует активность грибных ферментов, деградирующих растительные лигнины, хелатирует ионы Ca^{2+} , участвует в подавлении окислительного взрыва [Yarullina et al., 2011]. Также показано, что ЩК активирует синтез этилена [Errakhi et al., 2008]. Однако влияние этилена на ОО при патогенезе не изучалось. В наших экспериментах активность ОО через 6 и 24 ч инфицирования *S. nodorum* повышалась примерно в 2 раза у растений устойчивого сорта и растений обработанных 1-МЦП (табл. 1). В тот же период инфицирования у восприимчивых и обработанных ЭТ растений активность данного

фермента либо снижалась, либо не повышалась (табл. 1). Таким образом, увеличение активности ОО наблюдали параллельно с повышением генерации H_2O_2 , а снижение активности данного фермента под влиянием ЭТ совпадало с ингибированием накопления H_2O_2 у инфицированных растений (рис. 1, табл. 1).

С одной стороны, именно благодаря ОО возможно локальное накопление H_2O_2 в зоне проникновения патогена, так как ранее была показана высокая специфичность ОО к хитину - компоненту клеточных стенок патогенов [Maksimov et al., 2005]. При этом в клетках, прилежащих к зоне инфицирования, формируется защитная область с

высокой концентрацией H_2O_2 и усиленным синтезом лигнина [Maksimov et al., 2009], что мешает проникновению патогена и росту мицелия (рис. 2). С другой стороны, подавление активности ОО в инфицированных *S. nodorum* листьях пшеницы может происходить под воздействием метаболитов агрессивных изолятов патогена [Maksimov et al., 2009]. Одним из таких метаболитов может оказаться хозяин-специфичный токсин *S. nodorum* SnTox3, предположительно активирующий синтез этилена в инфицированных растениях [Winterberg et al., 2014]. Таким образом, в наших экспериментах впервые установлено отрицательное влияние этилена на активность ОО в данной патосистеме.

Таблица 1.

Влияние этилена на активность оксалаатоксидазы и каталазы в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы Омская 35 и Жница после инфицирования *S. nodorum*

Table 1. Effect of ethylene on oxalate oxidase and catalase activity in infected wheat leaves of cultivars contrast in the disease resistant after inoculation with *S. nodorum*

Время после инфицирования, ч Time after inoculation, h		6	24	6	24
Активность фермента Enzymatic activity	Вариант (Variant)	Омская 35 Omskaya 35		Жница Zhznitsa	
Оксалаатоксидаза (оп. ед. / мг белка мин) Oxalate oxidase (OD / mg protein min)	Контроль (Control)	4,2±0,3	5,1±0,3	4,2±0,3	4,4±0,1
	<i>S. nodorum</i>	7,8±0,2	8,3±0,3	2,5±0,2	2,6±0,1
	Этефон (Etephon)	4,2±0,1	5,3±0,5	2,5±0,1	2,9±0,1
	Etephon+ <i>S. nodorum</i>	6,5±0,6	5,4±0,2	2,0±0,2	0,7±0,02
	1-МЦП (1-MCP)	4,3±0,4	4,6±0,5	3,5±0,5	3,6±0,2
	1-MCP+ <i>S. nodorum</i>	9,2±0,1	10,2±0,9	8,6±0,5	8,3±0,2
Каталаза (мкМ H_2O_2 / мг сырой массы мин) Catalase (μ M H_2O_2 / mg fr wt)	Контроль (Control)	323±23	345±61	263±17	299±18
	<i>S. nodorum</i>	209±13	341±45	270±21	495±15
	Этефон (Etephon)	290±20	289±26	303±29	271±10
	Etephon+ <i>S. nodorum</i>	337±19	433±35	361±12	474±12
	1-МЦП (1-MCP)	318±25	264±36	270±11	262±13
	1-MCP+ <i>S. nodorum</i>	197±22	220±8	239±17	215±9

Показано, что низкие концентрации АФК способствуют росту патогенов [Narasimhan et al., 2001]. Для снижения содержания АФК растения и грибы используют различные механизмы детоксикации, связанные, в том числе, с индукцией антиоксидантных ферментов. Установлено, что некоторые механизмы снижения концентрации H_2O_2 при патогенезе связаны с активацией каталазы [Mittler et al., 2011].

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 [Podgórska et al., 2017]. В наших экспериментах у устойчивого сорта и растений, обработанных 1-МЦП, активность КАТ уменьшалась как через 6, так и через 24 часа после инфицирования (табл. 1), что совпадало с пиками генерации H_2O_2 (рис. 1). У восприимчивого сорта и растений, обработанных ЭТ, через 6 ч после инфицирования активность КАТ практически не

изменялась, что объясняется отсутствием субстрата для данного фермента (табл. 1). Через 24 ч после инфицирования активность КАТ повышалась, что совпадало с низким содержанием H_2O_2 в таких растениях (табл. 1). Каталазы занимают особое место в растительно-микробном взаимодействии и способствуют усилению вирулентности грибных патогенов, в том числе *S. nodorum*, за счет снижения концентрации АФК в зоне инфицирования и подавления окислительного взрыва [Maksimov et al., 2013]. Так показано, что на стадии проникновения апрессорий гриба *Blumeria graminis* возбудителя мучнистой росы ячменя в ткани листа восприимчивого сорта активировалась экспрессия гена каталазы *CatB* [Zhang et al., 2004].

Роль этилена в регуляции работы КАТ изучена недостаточно, данные встречающиеся в литературе немногочисленны и разрознены, но в некоторых работах показано, что этилен способен активировать каталазу [Sewelam et al., 2013; Golemić et al., 2014; Ma et al., 2017]. Так обработка этефоном листьев

табака активировала транскрипцию двух генов каталазы [Golemiec et al., 2014]. Обработка этефоном плодов груши, подвергавшихся охлаждению при хранении, усиливала антиоксидантную защиту фруктов, повышая активность KAT [Ma et al., 2017]. Кроме того, показано, что транскрипционные факторы семейства ERF, вовлеченные в этиленовый сигнальный путь регулируют работу антиоксидантных ферментов, в том числе каталазы, повышая экспрессию ее генов [Sewelam et al., 2013]. У трансгенных растений с нарушенным синтезом или рецепцией этилена было показано снижение активности KAT [Barna et al., 2012; Sewelam et al., 2013]. Таким образом, наши результаты об активации KAT под влиянием ЭТ совпадают с данными литературы и говорят о направленном уменьшении окислительного взрыва на начальной стадии инфицирования в патосистеме пшеница - *S. nodoruma*, связанного с колонизацией растения.

Пероксидазы III класса являются самыми многочисленными ферментами растений, локализованными преимущественно в апопласте, клеточной стенке и вакуоли, индуцируются патогенами, относятся к защитным белкам PR-9 и занимают одну из ключевых позиций в защите растений от патогенов [Almagro et al., 2009]. Апопластные ПО формируют тройной цикл генерации-утилизации АФК: окислительный цикл, в котором генерируется $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 ; пероксидативный

цикл, в котором утилизируется H_2O_2 с образованием полимеров типа – лигнина и происходит уплотнение клеточной стенки; и гидроксильный цикл, где $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 являются источниками образования гидроксильного радикала ($OH^{\cdot}$) и происходит размягчение клеточной стенки [Podgórska et al., 2017].

Как у восприимчивого, так и у устойчивого сорта во всех вариантах обработки была обнаружена отрицательная корреляция активности ПО с генерацией H_2O_2 через 6 ч после инфицирования, и положительная корреляция через 24 ч после инфицирования (рис. 1, рис. 4). Через 6 ч после инфицирования мицелий гриба начинал активно проникать в лист и на фоне низкого содержания H_2O_2 повышалась активность ПО у восприимчивого сорта и растений, обработанных ЭТ (рис. 4). Предположительно, это могло быть связано с ростом грибных гиф и гидроксильным циклом ПО, который может активироваться в отсутствии H_2O_2 , но при наличии $O_2^{\cdot-}$ [Dunand et al., 2007]. Через 24 ч после инфицирования на фоне повышенного содержания H_2O_2 активность ПО возрастала у устойчивого сорта и растений, обработанных 1-МЦП (рис. 4). Это могло быть связано как с генерацией АФК, так и с детоксикацией больших количеств АФК и образованием лигнина на более поздних этапах инфицирования, что было показано нами ранее [Veselova et al., 2014; 2016].

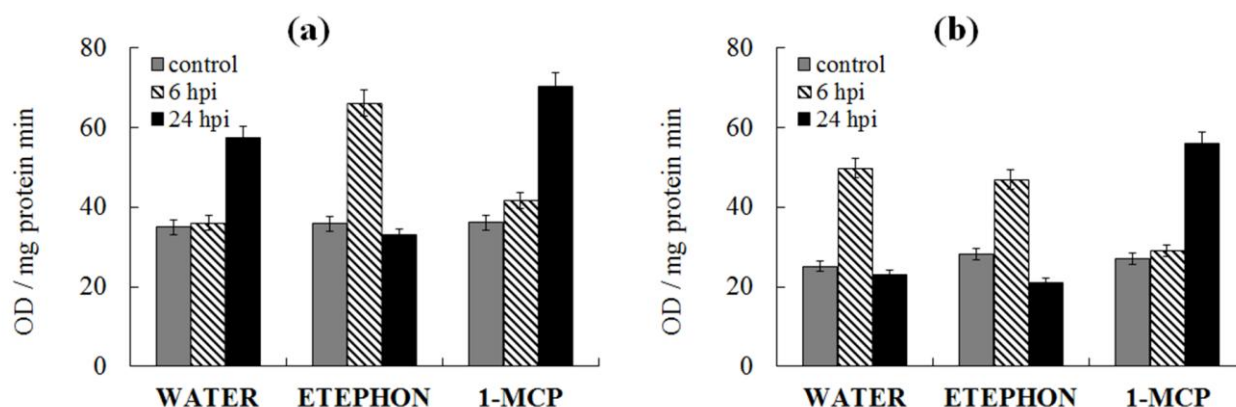


Рис. 4. Влияние этилена на активность пероксидазы в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы (а) Омская 35 (устойчивого) и (б) Жница (восприимчивого) через 6 и 24 ч после инфицирования *S. nodoruma*.

Fig. 4. Effect of ethylene on peroxidase activity in infected wheat leaves of cultivars contrast in the disease resistant (a) Omskaya 35 (resistance) and (b) Zhnitsa (susceptible) 6 h and 24 h after inoculation with *S. nodoruma*.

Ранее влияние этилена на активность ПО в процессе инфицирования растений не изучалось [Almagro et al., 2009]. В основном работы о взаимодействии этилена и ПО посвящены процессам роста и развития, созреванию плодов или действию абиотических стрессовых факторов [Golemiec et al., 2014; Ma et al., 2017]. Во многих работах показано, что этилен активировал ПО [Argandona et al., 2001; Almagro et al., 2009], но есть также работы, доказывающие ингибирующее влияние этилена на ПО при действии стрессового фактора [He et al., 2011,

Golemiec et al., 2014; Ma et al., 2017]. В наших экспериментах влияние этилена на ПО зависело от стадии инфекционного процесса и, скорее всего, от различных функций, выполняемых многочисленными изоформами данного фермента.

Таким образом, быстрое и интенсивное накопление АФК в наших экспериментах в листьях пшеницы устойчивого сорта и растениях обработанных 1-МЦП могло происходить за счет индукции транскрипции генов *TaRboh*s, кодирующих НАДФН-оксидазу, повышения активности ОО и

снижения активности КАТ (рис. 3, табл. 1), что приводило к ограничению роста патогена (рис. 2). У восприимчивых и обработанных ЭТ растений снижалась активность ОО, накопление мРНК генов *TaRboh*s и увеличивалась активность КАТ при инфицировании по сравнению с устойчивыми инфицированными растениями (рис. 3, табл. 1), что могло быть причиной низкого содержания АФК в таких растениях и приводило к росту грибных гифов и распространению инфекции (рис. 2). Пероксидазы при этом, предположительно, выполняли различные функции на разных этапах инфекционного процесса.

Таким образом, этиленовый сигнальный путь отрицательно влиял на генерацию АФК в инфицированных растениях пшеницы на биотрофной стадии развития патогена. Подавляя накопление H_2O_2 и снижая генерацию $O_2^{\sim}$ за счет регуляции работы различных ферментов про-/антиоксидантной системы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях, этилен обеспечивал тем самым благоприятные условия для развития *S. nodorum* и проникновения патогена в ткани пшеницы.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № АААА-А16-116020350027-7 (2016–2018), а также финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00978 с использованием оборудования ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

Литература

1. Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль НАДФН-оксидазного сигнального каскада в развитии устойчивости мягкой яровой пшеницы к возбудителю септориоза *Stagonospora nodorum* Blotch // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018. № 3 (1). С. 66–74. doi: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74
2. Abozeid A., Ying Z., Lin Y., Liu J., Zhang Z. and Tang Z. Ethylene Improves Root System Development under Cadmium Stress by Modulating Superoxide Anion Concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 253. doi: 10.3389/fpls.2017.00253
3. Almagro L., Gomez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcello A., Pedreno M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Botany*. 2009. V. 60. № 2. P. 377–390. doi: 10.1093/jxb/ern277
4. Argandona V.H., Chaman M., Cardemil L., Munoz O., Zúniga G.E., Corcuera L.J. Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley. *J. Chem. Ecol.* 2001. V. 27. P. 53–68. <https://doi.org/10.1023/A:1005615932694>
5. 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
6. Belozerskaya T.A., Gessler N.N. Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*. 2006. V. 75. № 4. P. 427–431. doi: 10.1134/s0026261706040102
7. Bindschedler L.V., Minibaeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. 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
8. Chen X., Steed A., Travella S., Keller B., Nicholson P. *Fusarium graminearum* exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. *New Phytol.* 2009. V. 182. № 4. P. 975–983. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02821.x
9. Dong X., Ji R., Guo X., Foster S.J., Chen H., Dong C., Liu Y., Hu Q., Liu S. Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Planta*. 2008. V. 228. P. 331–340. doi: 10.1007/s00425-008-0740-2
10. Dunand C., Crèvecoeur M., Penel C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*. 2007. V. 174. P. 332–341. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x
11. Errakhi R., Meimoun P., Lehner A., Vidal G., Briand J., Corbineau F., Rona J.-P., Bouteau F. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *Journal of Experimental Botany*. 2008. V. 59, № 11. P. 3121–3129. doi:10.1093/jxb/ern166
12. Golemieca E., Tokarza K., Wielanekb M., Niewiadomskaa E. A dissection of the effects of ethylene, H_2O_2 and high irradiance on antioxidants and several genes associated with stress and senescence in tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology*. 2014. V. 171. P. 269–275. doi: 10.1016/j.jplph.2013.08.007
13. He J., Yue X., Wang R., Zhang Y. Ethylene mediates UV-B-induced stomatal closure via peroxidase-dependent hydrogen peroxide synthesis in *Vicia faba* (L.). *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 2657–66. doi: 10.1093/jxb/erq431
14. 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
15. Kimura S., Waszczak C., Hunter K., Wrzaczek M. Bound by fate: The role of reactive oxygen species in receptor-like kinase signaling. *The Plant Cell*. 2017. V. 29. P. 638–654. doi: 10.1105/tpc.16.00947
16. Ma Y., Yang M., Wang J., Jiang C.-Zh., Wang Q. Application of exogenous ethylene inhibits postharvest peel browning of ‘Huangguan’ pear. *Front Plant Sci.* 2016. V. 7. e. 2029. doi: 10.3389/fpls.2016.02029
17. Maksimov I.V., Cherepanova E.A., Yarullina L.G., Akhmetova I.E. Isolation of chitin-specific wheat oxidoreductase. *Applied biochemistry and microbiology*. 2005. V. 41. № 6. P. 542–546. doi: 10.007/s10438-005-0098-1
18. Maksimov I.V., Valeev A.Sh., Cherepanova E.A., Yarullina L.G. Hydrogen peroxide production in wheat leaves infected with the fungus *Septoria nodorum* Berk. strains with different virulence. *Applied biochemistry and*

- microbiology. 2009. V. 45. № 4. P. 433-438. doi: 10.1134/s0003683809040152
19. 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
20. Mersmann S., Bourdais G., Rietz S., Robatzek S. Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol*. 2010. V. 154(1). P.391-400. doi: 10.1104/pp.110.154567
21. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*. 2011. V. 16. № 6. P. 300-309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007
22. Narasimhan M.L., Damsz B., Coca M.A., Ibeas J.I., Yun D.J., Pardo J.M., Hasegawa P.M., Bressan R.A. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell*. 2001. V. 8. № 4. P. 921-930. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00365-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00365-3)
23. Novikova G.V., Mur L.A.J., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Mironov K.S., Mamaeva A.S., Shilov E.S., Rakitin V.Y. and Hall M.A. Nitric oxide has a concentration-dependent effect on the cell cycle acting via EIN2 in *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Front. Physiol*. 2017. V. 8. P. 142. doi: 10.3389/fphys.2017.00142
24. Plotnikova L.Y. The involvement of reactive oxygen species in defense of wheat lines with the genes introgressed from agropyron species contributing the resistance against brown rust. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2009. V. 56. № 2. P. 181-189. doi: 10.1134/s102144370902006x
24. 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
26. Qi J., Wang J., Gong Z., Zhou J.M. Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*. 2017. V. 38. P.92-100. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.022
27. Sewelam N., Kazan K., Thomas-Hall S.R., Kidd B.N., Manners J.M., Schenk P.M. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*. 2013. V. 8. e70289. doi: 10.1371/journal.pone.0070289
28. Troshina N.B., Yarullina L.G., Valeev A.Sh., Maksimov I.V. Salicylic acid induced resistance to *Septoria nodorum* Berk. in wheat. *Biology Bulletin*. 2007. V. 34. № 5. P. 451-456. doi: 10.1134/s1062359007050056
29. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. The effect of 1-methylcyclopropene on the components of pro- and antioxidant systems of wheat and the development of defense reactions in fungal pathogenesis. *Applied biochemistry and microbiology*. 2014. V. 50. № 5. P. 516-523. doi: 10.1134/s0003683814050111
30. 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*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2016. V. 63. № 5. P. 609-619. doi: 10.1134/s1021443716050150
31. Vleesschauver D.D., Yinong Y., Casiana V.C., Monica H. Absciscic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiol*. 2010. V. 152. P. 2036-2052. doi: 10.1104/pp.109.152702
32. Wi S.J., Ji N.R., Park K.Y. Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic phytophthora parasitica in tobacco plants. *Physiol. Plant*. 2012. V. 159. № 1. P. 251-265. doi: 10.1104/pp.112.194654
33. Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., Solomon P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defense response in susceptible wheat leaves. *BMC Plant Biol*. 2014. V. 14. P. 215. doi: 10.1186/s12870-014-0215-5
34. Yarullina L.G., Troshina N.B., Cherepanova E.A., Zaikina E.A., Maksimov I.V. Salicylic and jacmonic acids in regulation of the proantioxidant state in wheat leaves infected by *Septoria nodorum*. *Applied biochemistry and microbiology*. 2011. V.47. № 5. P. 549-555. doi: 10.1134/S0003683811050176
35. Zermiani M., Zonin E., Nonis A., Begheldo M., Ceccato L., Vezzaro A., Baldan B., Trentin A., Masi A., Pegoraro M., Fadanelli L., Teale W., Palme K., Quintieri L., Ruperti B. Ethylene negatively regulates transcript abundance of ROP-GAP rheostat-encoding genes and affects apoplastic reactive oxygen species homeostasis in epicarps of cold stored apple fruits. *Journal of Experimental Botany*. 2015. Vol. 66. № 22. P. 7255-7270. doi:10.1093/jxb/erv422
36. Zhang, Z., Henderson, C., Gurr S.J. *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defense. *Mol. Plant Pathol*. 2004. V. 5. P. 537-547. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00251.x

References

1. Abozeid A., Ying Z., Lin Y., Liu J., Zhang Z. and Tang Z. Ethylene Improves Root System Development under Cadmium Stress by Modulating Superoxide Anion Concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8. P. 253. doi: 10.3389/fpls.2017.00253
2. Almagro L., Gomez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcello A., Pedreno M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Botany*. 2009. V. 60 (2). P. 377-390. doi: 10.1093/jxb/ern277
3. Argandona V.H., Chaman M., Cardemil L., Munoz O., Zúniga G.E., Corcuera L.J. Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley. *J. Chem. Ecol*. 2001. V.27. P. 53-68. <https://doi.org/10.1023/A:1005615932694>
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. Belozerskaya T.A., Gessler N.N. Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*. 2006. V. 75(4). P. 427–431. doi: 10.1134/s0026261706040102
6. Bindschedler L.V., Minibaeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺. *New Phytol.* 2001. V. 151(1). P. 185–194. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x
7. Chen X., Steed A., Travella S., Keller B., Nicholson P. *Fusarium graminearum* exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. *New Phytol.* 2009. V. 182(4). P. 975–983. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02821.x
8. Dong X., Ji R., Guo X., Foster S.J., Chen H., Dong C., Liu Y., Hu Q., Liu S. Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Planta*. 2008. V.228. P.331–340. doi: 10.1007/s00425-008-0740-2
9. Dunand C., Crèvecoeur M., Penel C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*. 2007. V. 174. P. 332–341. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x
10. Errakhi R., Meimoun P., Lehner A., Vidal G., Briand J., Corbineau F., Rona J.-P., Bouteau F. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *Journal of Experimental Botany*. 2008. V.59(11). P. 3121–3129. doi:10.1093/jxb/ern166
11. Golemieca E., Tokarza K., Wielanekb M., Niewiadomskaa E. A dissection of the effects of ethylene, H₂O₂ and high irradiance on antioxidants and several genes associated with stress and senescence in tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology*. 2014. V. 171. P. 269–275. doi: 10.1016/j.jplph.2013.08.007
12. He J., Yue X., Wang R., Zhang Y. Ethylene mediates UV-B-induced stomatal closure via peroxidase-dependent hydrogen peroxide synthesis in *Vicia faba* (L.). *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P.2657–66. doi: 10.1093/jxb/erq431
13. Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 2285–2309. doi.org/10.1105/tpc.114.125419
14. Kimura S., Waszczak C., Hunter K., Wrzaczek M. Bound by fate: The role of reactive oxygen species in receptor-like kinase signaling. *The Plant Cell*. 2017. V.29. P.638–654. doi: 10.1105/tpc.16.00947
15. Ma Y., Yang M., Wang J., Jiang C.-Zh., Wang Q. Application of exogenous ethylene inhibits postharvest peel browning of 'Huangguan' pear. *Front Plant Sci*. 2016. V.7. e. 2029. doi: 10.3389/fpls.2016.02029
16. Maksimov I.V., Cherepanova E.A., Yarullina L.G., Akhmetova I.E. Isolation of chitin-specific wheat oxidoreductase. *Applied biochemistry and microbiology*. 2005. V. 41(6). P. 542–546. doi: 10.007/s10438-005-0098-1
17. Maksimov I.V., Valeev A.Sh., Cherepanova E.A., Yarullina L.G. Hydrogen peroxide production in wheat leaves infected with the fungus *Septoria nodorum* Berk. strains with different virulence. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009. V. 45(4). P. 433–438. doi: 10.1134/s0003683809040152
18. 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
19. Mersmann S., Bourdais G., Rietz S., Robatzek S. Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol*. 2010. V. 154(1). P.391–400. doi: 10.1104/pp.110.154567
20. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16(6). P. 300–309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007
21. Narasimhan M.L., Damsz B., Coca M.A., Ibeas J.I., Yun D.J., Pardo J.M., Hasegawa P.M., Bressan R.A. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell*. 2001. V. 8(4). P. 921–930. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00365-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00365-3)
22. Novikova G.V., Mur L.A.J., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Mironov K.S., Mamaeva A.S., Shilov E.S., Rakitin V.Y. and Hall M.A. Nitric oxide has a concentration-dependent effect on the cell cycle acting via EIN2 in *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Front. Physiol*. 2017. V. 8. P. 142. doi: 10.3389/fphys.2017.00142
23. Plotnikova L.Y. The involvement of reactive oxygen species in defense of wheat lines with the genes introgressed from agropyron species contributing the resistance against brown rust. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2009. V. 56(2). P. 181–189. doi: 10.1134/s102144370902006x
24. 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
25. Qi J., Wang J., Gong Z., Zhou J.M. Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*. 2017. V. 38. P.92–100. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.022
26. Sewelam N., Kazan K., Thomas-Hall S.R., Kidd B.N., Manners J.M., Schenk P.M. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*. 2013. V. 8. e70289. doi 10.1371/journal.pone.0070289
27. Troshina N.B., Yarullina L.G., Valeev A.Sh., Maksimov I.V. Salicylic acid induced resistance to *Septoria nodorum* Berk. in wheat. *Biology Bulletin*. 2007. V. 34. № 5. P. 451–456. doi: 10.1134/s1062359007050056
28. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. The effect of 1-methylcyclopropene on the components of pro- and antioxidant systems of wheat and the development of defense reactions in fungal pathogenesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. V. 50(5). P. 516–523. doi: 10.1134/s0003683814050111

29. 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*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2016. V. 63(5). P. 609-619. doi: 10.1134/s1021443716050150
30. Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Effect of NADPH oxidases cascade on mechanisms regulating defense common wheat reactions under the disease *Stagonospora nodorum* Blotch. *Izvestija ufienskogo nauchnogo centra RAS*. 2018. No 3(1). S. 66-74. doi: 10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74 (In Russian)
31. Vleesschauver D.D., Yinong Y., Casiana V.C., Monica H. Absciscic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiol*. 2010. V. 152. P. 2036–2052. doi: 10.1104/pp.109.152702
32. Wi S.J., Ji N.R., Park K.Y. Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic phytophthora parasitica in tobacco plants. *Physiol. Plant*. 2012. V. 159(1). P. 251–265. doi: 10.1104/pp.112.194654
33. Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., Solomon P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 re-programs metabolism and elicits a strong defense response in susceptible wheat leaves. *BMC Plant Biol*. 2014. V. 14. P. 215. doi: 10.1186/s12870-014-0215-5
34. Yarullina L.G., Troshina N.B., Cherepanova E.A., Zaikina E.A., Maksimov I.V. Salicylic and jacmonic acids in regulation of the proantioxidant state in wheat leaves infected by *Septoria nodorum*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011. V.47(5). P. 549-555. doi: 10.1134/S0003683811050176
35. Zermiani M., Zonin E., Nonis A., Begheldo M., Ceccato L., Vezzaro A., Baldan B., Trentin A., Masi A., Pegoraro M., Fadanelli L., Teale W., Palme K., Quintieri L., Ruperti B. Ethylene negatively regulates transcript abundance of ROP-GAP rheostat-encoding genes and affects apoplastic reactive oxygen species homeostasis in epicarps of cold stored apple fruits. *Journal of Experimental Botany*. 2015. Vol. 66(22). P. 7255–7270. doi:10.1093/jxb/erv422
36. Zhang, Z., Henderson, C., Gurr S.J. *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defense. *Mol. Plant Pathol*. 2004. V. 5. P. 537–547. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00251.x