



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## ЭТИЛЕН И МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА ИНФИЦИРОВАННЫХ *STAGONOSPORA NODORUM* РАСТЕНИЙ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

Веселова С.В., Бурханова Г.Ф.

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа  
E-mail: [veselova75@rambler.ru](mailto:veselova75@rambler.ru)

Изучена роль этилена, компонентов MAPK сигнальной системы и транскрипционных факторов семейства WRKY в регуляции редокс-статуса инфицированных возбудителем септориоза (*Stagonospora nodorum* Berk.) листьях контрастных по устойчивости к патогену сортов мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). У растений устойчивого сорта было обнаружено два пика генерации перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – через 15 мин и 6 ч после инфицирования, которые отсутствовали у восприимчивого сорта. Этилен подавлял накопление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, регулируя транскрипцию генов, кодирующих изоформы НАДФН-оксидазы *TaRbohD* и *TaRbohF*, и ингибировал индукцию защитного сигнала связанного с окислительным взрывом. Отсутствие окислительного взрыва и подавление экспрессии *TaRbohF* у восприимчивого сорта и растений, обработанных этефоном (химическим предшественником этилена), сопровождалось активацией МРК3/МРК6, накоплением мРНК генов биосинтеза этилена *TaACS1*, *TaACO* и первичного ответа на этилен *TaEIL1*, *TaPIE1* (*TaERF1*) и значительным повышением уровня транскриптов гена *TaWRKY53b* после инфицирования *S. nodorum*. Окислительный взрыв у устойчивого сорта и растений, обработанных 1-метилциклопропеном (ингибитором рецепции этилена) при инфицировании *S. nodorum* был связан с активацией МРК6 и МРК7 и накоплением транскриптов гена *TaWRKY13*, что приводило к подавлению биосинтеза и сигнального пути этилена.

**Ключевые слова:** *Stagonospora nodorum* Berk., *Triticum aestivum* L., активные формы кислорода, этилен, митоген-активируемые протеинкиназы, транскрипционные факторы

## ETHYLENE AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES IN REGULATION OF REDOX-STATUS IN COMMON WHEAT INFECTED WITH *STAGONOSPORA NODORUM*

Veselova S.V., Burkhanova G.F.

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

The roles of ethylene, components of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades and WRKY transcription factors in regulation of redox-status in infected by the causal agent of leaf blotch (*Stagonospora nodorum* Berk.) leaves of common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars contrasting in the resistance to the pathogen were studied. Two peaks of the generation of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on the 15 minutes and 6 hours after infection in plants of a resistant variety were detected. These peaks were not found in susceptible variety. Ethylene suppressed the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulating expression of genes *TaRbohD* and *TaRbohF* encoding isozymes of NADPH-oxidase, and inhibited induction of defense signal associated with oxidative burst. Oxidative burst default and suppression of the expression *TaRbohF* gene in susceptible variety and ethephone(chemical precursor of ethylene)-treated plants infected by *S. nodorum* were accompanied by accumulation of mRNA of MPK3/MPK6 genes, ethylene biosynthesis genes *TaACS1*, *TaACO* and genes of primary response on ethylene *TaEIL1*, *TaPIE1* (*TaERF1*) and significant increase of expression of *TaWRKY53b* gene. Oxidative burst infected by *S. nodorum* plants of resistant variety and plants treated with 1-methylcyclopropene (ethylene reception inhibitor) was associated with accumulation of transcripts of MPK6, MPK7 and *TaWRKY13* genes. These factors led to suppression of biosynthesis and signaling pathway of ethylene.

**Keywords:** 5 *Stagonospora nodorum* Berk., *Triticum aestivum* L., reactive oxygen species, ethylene, mitogen-activated protein kinases, transcription factors

Поступила в редакцию: 24.12.2018

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что усиленное образование активных форм кислорода (АФК) в апопласте является универсальной реакцией растительных клеток на биотические стрессовые факторы [Креславский и др., 2012; Podgórska et al., 2017]. При этом генерированные АФК выполняют две функции: сигнальную и прямую биоцидную. С одной стороны, показано, что быстрое накопление АФК и развитие программируемой гибели клеток (PDC) способно подавлять развитие патогенов [Barna et al., 2012]. С другой стороны, в последнее время, АФК все чаще рассматривают как важнейшие сигнальные молекулы, вовлеченные в передачу внутриклеточных сигналов, в том числе гормональных, регулирующих экспрессию генов и активность защитных систем [Podgórska et al., 2017]. Молекула перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) является незаряженной и относительно долгоживущей, может преодолевать значительные расстояния и проникать через мембраны, поэтому является наиболее подходящим кандидатом на роль вторичного мессенджера. Передача окислительного сигнала в клетках многих эукариот осуществляется кальциевой, липоксигеназной, НАДФН-оксидазной, а также МАРК (митоген-активируемые протеинкиназы) сигнальными системами [Liu, He, 2016]. Однако вопрос о сенсорах  $H_2O_2$  в клетке остается открытым, а основная роль в передаче сигнала об окислительном взрыве в клетке отводится различным редокс-чувствительным белкам, способным обратимо окисляться и восстанавливаться при изменении редокс-статуса клетки. К ним можно отнести редокс-чувствительные ферменты, сигнальные белки – МАРК, фосфотазы и транскрипционные факторы (ТФ) [Liu, He, 2016]. Транскрипционный контроль является одним из главных механизмов, регулирующих экспрессию генов. Белковые ТФ являются звеньями в передаче сигнала в любых сигнальных и гормональных системах растений. Так наиболее чувствительными к АФК из всех генов ТФ арабидопсиса оказались члены мультигенных семейств WRKY и ERF [Adachi et al., 2015; Yao et al., 2017]. Однако до сих пор только у небольшого числа редокс-чувствительных ТФ была исследована функциональная роль в сигнализации окислительного взрыва [Adachi et al., 2015].

Недавние исследования показали, что генерация АФК в растениях при патогенезе находится под строгим контролем фитогормонов, участвующих в формировании защитных реакций при стрессе [Barna et al., 2012]. Среди них этилен, роль которого при биотическом стрессе неоднозначна. Выдвигаются предположения, что этилен выступает в качестве положительного или отрицательного индуктора устойчивости в зависимости от типа патогена и является регулятором взаимодействия салицилат (СК)- и жасмонат (ЖАК)-зависимых защитных реакций [Broekgaarden et al., 2015]. 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].

МАРК сигнальная система присутствует во всех эукариотических клетках и регулирует ответ клетки на внешние раздражители. Активация МАРК каскада показана во многих растениях при атаке патогенами [Jalmi, Sinha, 2015; Liu, He, 2017]. Митоген-активируемые протеинкиназы являются лучшими кандидатами на осуществление связи и выполнение регуляции между многочисленными сигнальными путями у растений. Обсуждается участие МАРК каскадов в регуляции редокс-метаболизма клетки [Liu, He, 2017]. Предполагается, что регуляция экспрессии генов НАДФН-оксидазы МАРК каскадом

может быть общим механизмом во всех растениях [Liu, He, 2016]. Имеются данные, указывающие на участие MAPK модулей в передаче гормональных сигналов [Новикова и др., 2009], в том числе этиленового [Hahn, Harter, 2009]. Однако большинство полных MAPK модулей, а также ТФ, являющихся субстратами для MAPK, остаются в основном неизвестными [Asai et., 2002; Zhang et al., 2016; Liu, He, 2017].

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение роли этилена и митоген-активируемых протеинкиназ в регуляции генерации АФК в растениях пшеницы, инфицированных грибом *S. nodorum*.

## 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/м<sup>2</sup> ФАР (лампы Osram L 36W/77). После 6 сут роста часть проростков, помещенных в отдельные сосуды, обрабатывали раствором ингибитора рецепции этилена (1-метилциклопропеном - 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<sup>5</sup> спор/мл) из коллекции лаборатории и переносили в климатостат КС-200 СПУ.

**Таблица 1. Исследованные гены мягкой яровой пшеницы**

Обозначение гена в пшенице	Номер гена пшеницы в базе данных	Ортологи генов в арабидопсисе и рисе
<i>Ta MPK3 (TaMPAK1)</i>	AF079318	<i>At MPK3</i>
<i>Ta MPK7</i>	HQ650111	<i>At MPK20, Os MPK7</i>
<i>Ta MPK6</i>	AY173962	<i>At MPK6</i>
<i>Ta WRKY13</i>	EF397614	<i>At WRKY70, Os WRKY13</i>
<i>Ta WRKY53b</i>	EF368364	<i>At WRKY33, OsWRKY53</i>
<i>TaACO</i>	KF 900072	<i>At ACO</i>
<i>TaACSI</i>	U35779	<i>At ACS</i>
<i>TaEIL1</i>	KU030837	<i>At EIN3, OsEIL1</i>
<i>TaPIE1</i>	EF583940	<i>At ERF1</i>
<i>TaRbohF</i>	AY561153	<i>AtRbohF</i>
<i>TaRbohD</i>	AK335454	<i>AtRbohD</i>

Для измерения генерации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> растительный материал (1 : 5 вес/об.) через 15 мин и 6 ч после инфицирования гомогенизировали в 0.05 М растворе Na-фосфатного буфера (ФБ), рН 6.2 и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Супернатанты отделяли центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин (5415K Eppendorf, США). Концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в супернатанте определяли с использованием ксиленол оранжевого в присутствии Fe<sup>2+</sup> по методу [Bindschedler et al., 2001]. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на

спектрофотометре EnSpire Multimode Plate Readers (Perkin Elmer, США) при длине световой волны 560 нм. Концентрацию  $H_2O_2$  определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

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 15 мин, 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». Используемые в работе гены приведены в таблице 1.

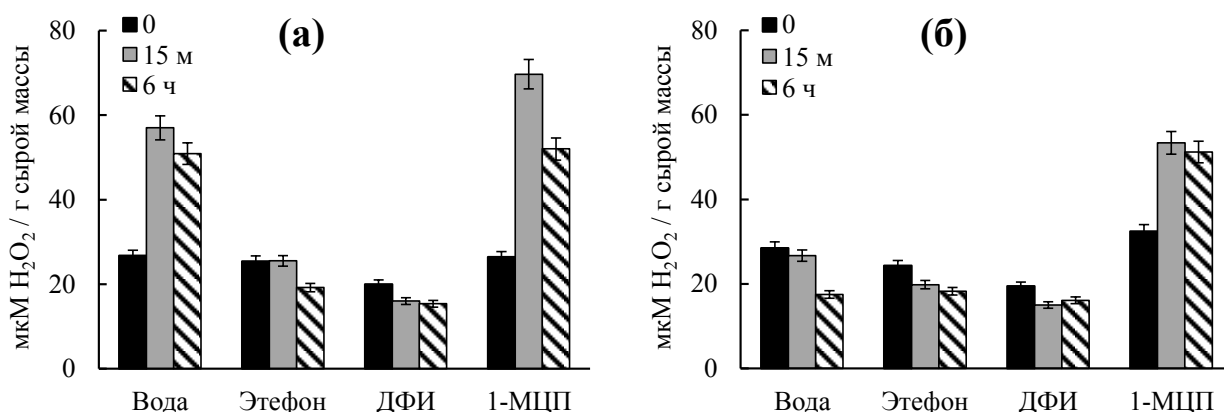
Все эксперименты повторяли 3 раза и проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях (общее  $n = 9$ ). На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патогенный грибок *S. nodorum* – возбудитель септориоза пшеницы, изученный в данной работе, является гемибiotрофом, т.е. сочетает в своем жизненном цикле биотрофную и некротрофную фазы развития. Ранее нами было установлено, что генерация АФК в растениях на начальной биотрофной стадии инфицирования патогеном (до 3-х суток) определяет устойчивость сорта [Veselova et al., 2014; 2016]. Именно интенсивное накопление  $H_2O_2$  у устойчивого сорта в первые сутки инфицирования индуцировало экспрессию защитных генов, повышение активности пероксидазы, приводившее к интенсивной лигнификации клеточных стенок и остановке роста патогена [Veselova et al., 2014; 2016]. Кроме того, нами были обнаружены «пики» генерации  $H_2O_2$  через 6 и 24 ч после инфицирования устойчивых растений и установлен значительный вклад НАДФН-оксидазы и частичный вклад пероксидазы в генерацию АФК в растениях пшеницы на биотрофной стадии развития патогена [Веселова и др., 2018]. При этом нами было показано отрицательное влияние этилена на развитие защитных реакций растений пшеницы инфицированных *S. nodorum*, связанное с его регуляторной ролью компонентов про-/антиоксидантной системы [Veselova et al., 2014; 2016; Веселова и др., 2018a]. Также, недавно было установлено, что хозяин-специфичный токсин *S. nodorum* SnTox3 усиливает синтез этилена в инфицированных растениях [Winterberg et al., 2014]. Изолят *S. nodorum* использованный в данной работе экспрессировал ген, кодирующий данный токсин [Веселова и др., 2017].

В данной работе были изучены первые минуты и часы инфекционного процесса у контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сортов мягкой яровой пшеницы – Омская 35 (Ом35) и Жница. У устойчивого сорта Ом35 было обнаружено два пика генерации  $H_2O_2$  –

через 15 мин и 6 ч после инфицирования, которые отсутствовали у восприимчивого сорта (рис. 1). Обработка растений ЭТ или ингибитором НАДФН-оксидазы ДФИ подавляла генерацию  $H_2O_2$  в листьях как через 15 мин, так и через 6 ч после инфицирования *S. nodorum* у обоих сортов (рис. 1), что впоследствии приводило к развитию восприимчивости [Veselova et al., 2016]. Наши данные согласуются с результатами, полученными на восприимчивых к мучнистой росе линиях ячменя, в которых было обнаружено накопление этилена и снижение содержания  $H_2O_2$  [Varna et al., 2012]. Данные ингибиторного анализа доказывают значительный вклад НАДФН-оксидазы в генерацию  $H_2O_2$  в инфицированных растениях пшеницы. Обработка как восприимчивых, так и устойчивых растений ингибитором рецепции этилена 1-МЦП, индуцировала генерацию  $H_2O_2$  в листьях через 15 мин и 6 ч после инфицирования (рис. 1), что впоследствии приводило к развитию устойчивости [Veselova et al., 2016]. Таким образом, этилен, подавляя накопление  $H_2O_2$  через 15 мин и 6 ч инфицирования, ингибировал индукцию защитного сигнала связанного с окислительным взрывом.

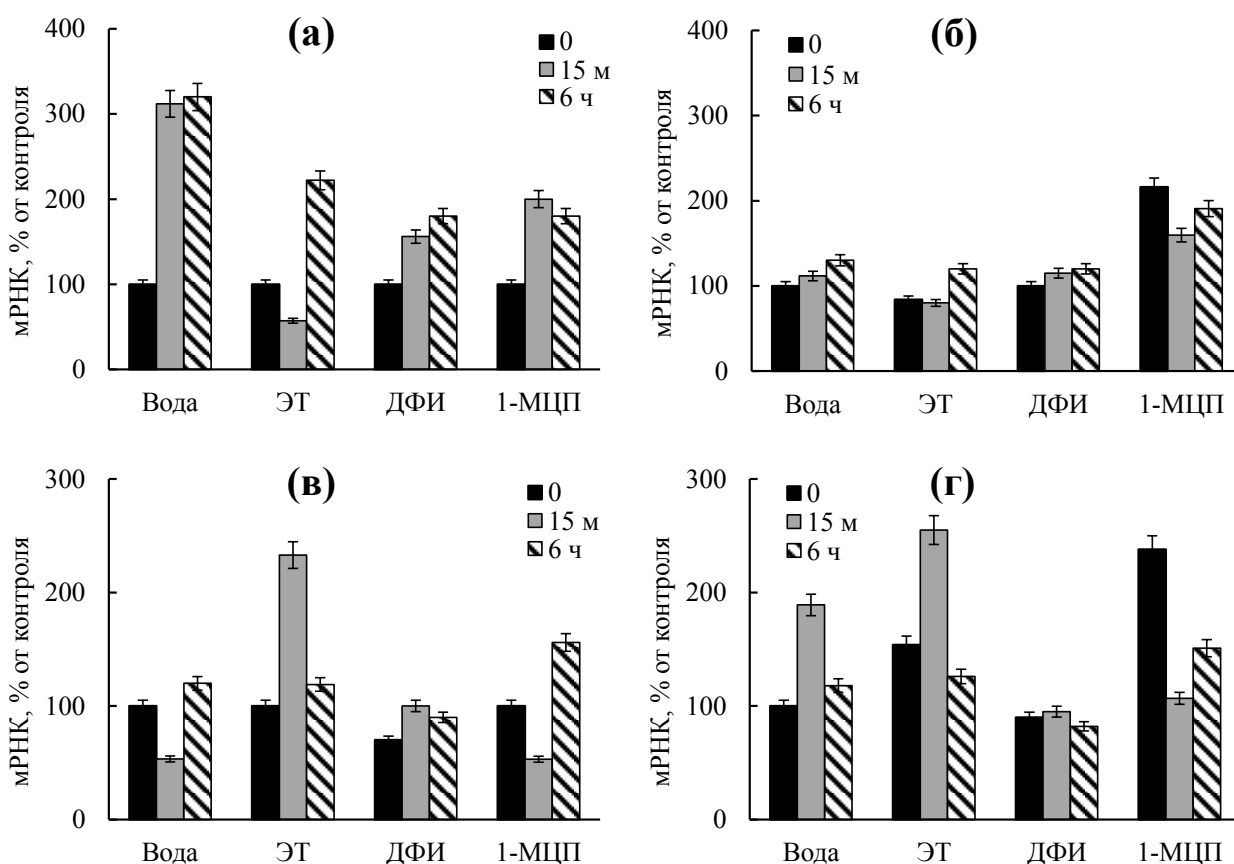


**Рис. 1. Влияние этилена и ингибитора НАДФН-оксидазы дифенилен иодониума (ДФИ) на содержание перекиси водорода в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы (а) Омская 35 (устойчивого) и (б) Жница (восприимчивого) через 15 мин и 6 ч после инфицирования *S. nodorum*.**

Известно, что генерация и утилизация АФК контролируется ферментами про-/антиоксидантной системы. 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 в перекись водорода ( $H_2O_2$ ) [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 растений восприимчивого сорта обработанных ингибитором НАДФН-оксидазы ДФИ и инфицированных *S. nodorum* содержания мРНК генов, кодирующих две изоформы НАДФН-оксидазы, не повышалось, в отличие от растений устойчивого сорта, у которых обнаруженное накопление транскриптов данных генов было несколько ниже, чем в инфицированных необработанных ДФИ растениях (рис. 2). Это говорит об участии редокс-

сигнала в регуляции экспрессии генов *TaRbohD* и *TaRbohF* в инфицированных *S. nodorum* растениях пшеницы. У устойчивого сорта и растений, обработанных 1-МЦП, через 15 мин инфицирования было обнаружено накопление транскриптов гена *TaRbohD* и снижение содержания транскриптов гена *TaRbohF* (рис. 2), что совпадало с первым повышением концентрации  $H_2O_2$  через 15 мин (рис. 1). Через 6 ч после инфицирования у таких растений содержание мРНК гена *TaRbohD* оставалось высоким, а концентрация мРНК гена *TaRbohF* несколько повышалась (рис. 2). У восприимчивого сорта и растений, обработанных ЭТ, был обнаружен противоположный результат - через 15 мин инфицирования накапливались транскрипты гена *TaRbohF* и снижалось содержание мРНК гена *TaRbohD*, через 6 ч инфицирования было обнаружено небольшое накопление транскриптов гена *TaRbohD* и постепенное снижение мРНК гена *TaRbohF* (рис. 2). При этом ранее мы наблюдали существенное накопление транскриптов гена *TaRbohF* у устойчивых растений и значительное снижение таковых у восприимчивых и обработанных ЭТ растений через 24 ч после инфицирования [Веселова и др., 2018a].



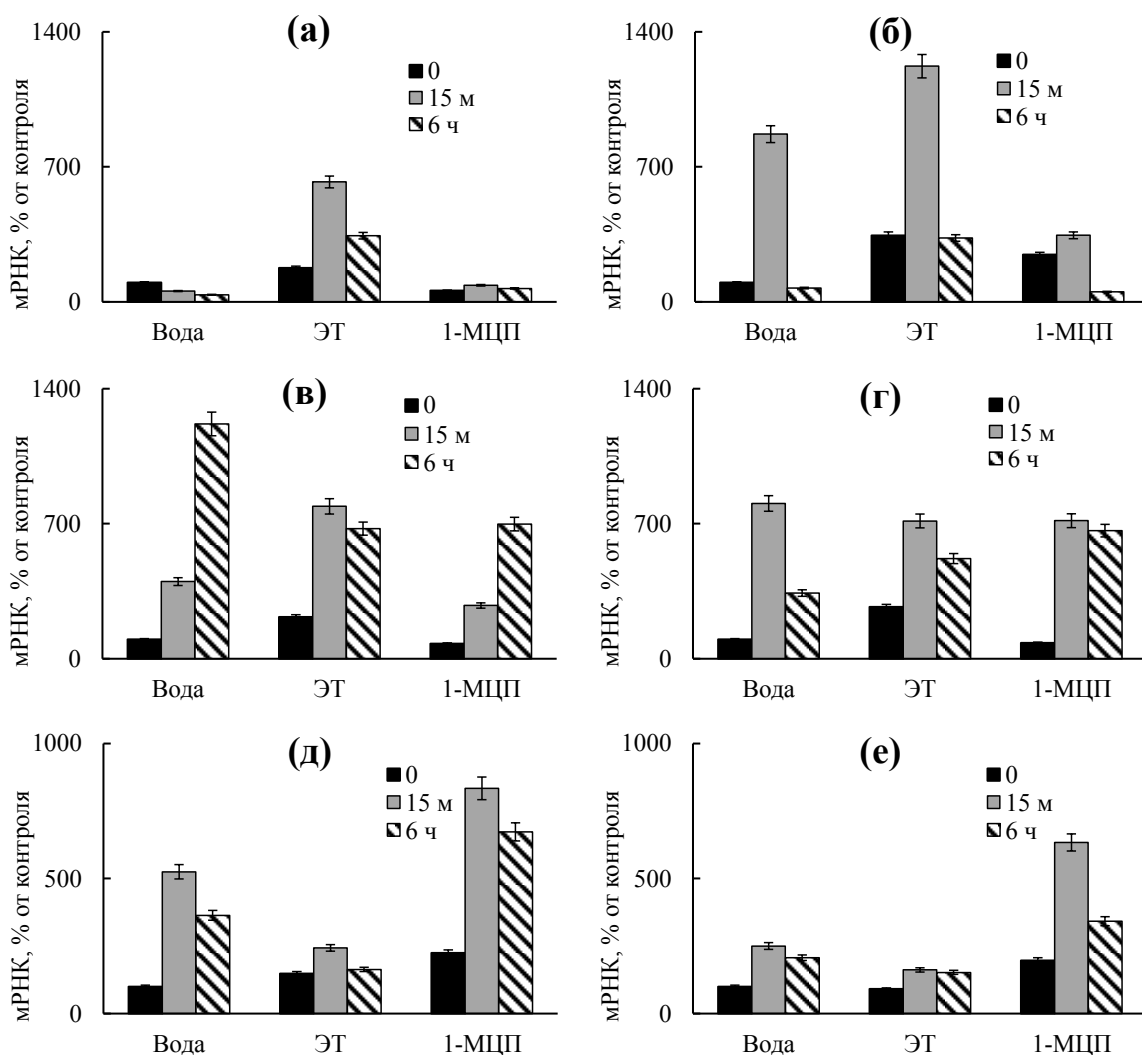
**Рис. 2.** Влияние этилена и ингибитора НАДФН-оксидазы дифенилен иодониума (ДФИ) на содержание мРНК генов *TaRbohD* (а, б) и *TaRbohF* (в, г), кодирующих НАДФН-оксидазу в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы (а, в) Омская 35 (устойчивого) и (б, г) Жница (восприимчивого) через 15 мин и 6 ч после инфицирования *S. nodorum*.

Роль этилена в регуляции работы НАДФН-оксидазы изучается, однако данные весьма противоречивы, что может быть связано как с различными функциями изоформ фермента, так и с множественностью функций этилена [Mersmann et al., 2010; Zermiani et al., 2015]. Основываясь на полученных результатах, с одной стороны, можно предположить, что

восприимчивость растений к патогену *S. nodorum* опосредованная хозяин-специфичным токсином SnTox3 или этиленом была связана с более ранним подавлением накопления транскриптов гена *TaRbohD*, а затем длительным снижением содержания транскриптов гена *TaRbohF*. Это совпадает с данными, полученными на яблоках, подвергнутых воздействию низких температур, у которых этилен ингибировал активность генов НАДФН-оксидаз *RBOHC* и *RBOHF*, что приводило к снижению содержания АФК в апопласте [Zermiani et al., 2015]. Однако, с другой стороны, характер изменения накопления транскриптов генов *TaRbohD* и *TaRbohF* (рис. 2) и генерации  $H_2O_2$  (рис. 1) при ингибировании НАДФН-оксидазы с помощью ДФИ или обработке растений ЭТ, говорит о том, что для развития восприимчивости растений пшеницы к *S. nodorum*, опосредованной этиленом, необходима небольшая активация НАДФН-оксидазы изоформы *RbohD* после 6 ч инфицирования. Это совпадает с данными о влиянии бактериального флагеллина из *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 на индукцию гена *AtRbohD* через 1 сут после инфицирования, посредством активации этиленового сигнального пути, что было доказано с применением этилен-нечувствительных мутантов арабидопсиса [Mersmann et al., 2010]. Кроме того, было показано, что *RbohD*-зависимая продукция АФК может подавлять салицилат-опосредованную смерть клеток в местах проникновения патогена, способствуя тем самым распространению инфекции [Torres et al., 2005]. Устойчивость растений пшеницы к *S. nodorum* была связана с ранней активацией *TaRbohD* и поздней активацией *TaRbohF*. Такое различие в индукции и подавлении экспрессии генов *TaRbohD* и *TaRbohF* в наших экспериментах могло быть связано с тем, что эти изоформы НАДФН-оксидазы имеют пространственную и временную специфику функций при генерации АФК во время растительно-микробного взаимодействия [Chaouch et al., 2012]. Было показано, что *RbohD* отвечает в большей степени за раннюю генерацию АФК в апопласте, а от *RbohF* зависит развитие более позднего сигнала, связанного с внутриклеточным окислительным взрывом, накоплением салициловой кислоты и смертью клеток, ограничением зон поражения и перестройкой метаболизма клетки [Chaouch et al., 2012].

Как продукция АФК, так и этиленовый сигнальный путь могут регулироваться МАРК-каскадом [Hahn, Harter, 2009; Liu, He, 2017]. В нашей работе была изучена транскрипционная активность трех МАРК – МРК3, МРК6, МРК7 (рис. 3). У устойчивого сорта и растений, обработанных 1-МЦП, через 15 мин и 6 ч инфицирования было обнаружено накопление транскриптов генов *TaMPK6* и *TaMPK7*, при этом через 15 мин более интенсивное накопление мРНК наблюдали у гена *TaMPK7*, а через 6 ч – у гена *TaMPK6* по сравнению с неинфицированным контролем (рис.3). Активация транскрипции гена МАРК риса *OsMPK7* ортолога МАРК пшеницы *TaMPK7* была также обнаружена на ранней стадии инфицирования растений патогеном *Magnaporthe grisea* [Reyna, Yang, 2006]. У восприимчивого сорта и растений, обработанных ЭТ, через 15 мин инфицирования было обнаружено накопление транскриптов генов *TaMPK3* и *TaMPK6*, которое слегка снижалось к 6 ч инфицирования (рис. 3). Стоит отметить, что накопление транскриптов гена *TaMPK6*, выявленное как у восприимчивых, так и у устойчивых растений было различным (рис. 3). Через 15 мин инфицирования транскрипты гена *TaMPK6* интенсивнее накапливались у восприимчивых и обработанных ЭТ растений, а через 6 ч инфицирования – у устойчивых и

обработанных 1-МЦП, причем повышение уровня транскриптов данного гена через 6 ч инфицирования у устойчивых растений было примерно в 2 раза выше, чем у восприимчивых (рис. 3). Также как в растениях пшеницы инфицированных *Mycosphaerella graminicola* содержание ТаМРК6 у устойчивых растений при несовместимом взаимодействии было выше, чем у восприимчивых растений [Rudd et al., 2008]. У многих двудольных растений МРК3 и МРК6 активируются одновременно, часто через один и тот же модуль МКК в ответ на сигналы патогенов [Asai et al., 2002; Zhang et al., 2016]. Однако было предположено, что у однодольных за активацию этих МАРК отвечают разные МКК модули [Rudd et al., 2008]. Так при совместимом взаимодействии (ген-на-ген) растений пшеницы и некротрофного патогена *Mycosphaerella graminicola* развитие восприимчивости было связано с активацией МРК3, которая приводила к образованию некрозов в растении и развитию болезни [Rudd et al., 2008]. Также как МАРК риса OsМРК5 ортолог МАРК арабидопсиса AtМРК3 и пшеницы ТаМРК3 индуцировала образование очага поражения, способствуя развитию болезни, в растениях риса инфицированных *Magnaporthe grisea* [Reyna, Yang, 2006].



**Рис. 3.** Влияние этилена на содержание мРНК генов, кодирующих митоген-активируемые протеинкиназы МРК3 (а, б), МРК6 (в, г), МРК7 (д, е) в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы (а, в, д) Омская 35 (устойчивого) и (б, г, е) Жница (восприимчивого) через 15 мин и 6 ч после инфицирования *S. nodorum*.



Кроме того МРК6/МРК7 положительно влияли на генерацию АФК и увеличение транскриптов генов НАДФН-оксидазы у устойчивого сорта и растений обработанных 1-МЦП, что следует из наших результатов (рис. 1, рис. 2, рис. 3). Напротив, активация МРК3/МРК6 сопровождалась отсутствием окислительного взрыва и подавлением экспрессии *TaRbohF* у восприимчивого сорта и обработанных ЭТ растений (рис. 1, рис. 2, рис. 3). Известно, что через МАРК-каскад может осуществляться передача редокс-сигнала [Liu, He, 2016; 2017]. Показано, что МРК3 и МРК6 могут регулировать продукцию АФК с помощью специфических ТФ как позитивно, так и негативно, что зависит от активируемого МКК модуля, вида стрессового фактора и вида растения [Jalmi et al., 2015; Liu, He, 2016].

Вопрос об участии МАРК-каскада либо в трансдукции этиленового сигнала, либо в регуляции его биосинтеза остается открытым [Hahn, Harter, 2009]. С одной стороны, показано, что модуль МКК9-МРК3/6 стабилизирует белок EIN3 – ключевой регулятор транскрипции генов первичного ответа на этилен [Hahn, Harter, 2009]. С другой стороны, показано, что МРК3 и МРК6 стабилизируют АЦК-синтазы ACS2 и ACS6 путем фосфорилирования специфических сайтов С-терминального домена, защищая, таким образом, фермент от протеасомной деградации. Кроме стабилизации главных ферментов биосинтеза этилена, МРК3 и МРК6 также индуцируют транскрипцию их генов *ACS2* и *ACS6* путем активации ТФ WRKY33 [Землянская и др., 2015].

**Таблица 2. Содержание мРНК генов биосинтеза и сигнального пути этилена в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы Омская 35 и Жница через 15 мин и 24 ч после инфицирования *S. nodorum* под влиянием этефона и 1-метилциклопропена.**

Время после инфицирования	15 мин		24 часа	
Вариант обработки / Обозначение гена	<i>TaEIL1</i>	<i>TaPIE1</i>	<i>TaACS1</i>	<i>TaACO</i>
	Омская 35			
Контроль	100	100	100	100
<i>S. nodorum</i>	92±12	100±9	96±8	66±10
Этефон	180±23	200±21	100±11	130±11
Этефон + <i>S. nodorum</i>	<b>325±45</b>	<b>262±35</b>	<b>169±24</b>	<b>190±15</b>
1-МЦП	102±15	105±8	110±20	67±8
1-МЦП + <i>S. nodorum</i>	82±13	110±10	57±12	57±10
	Жница			
Контроль	100	100	100	100
<i>S. nodorum</i>	171±13	156±9	155±17	146±20
Этефон	140±16	130±16	180±21	130±17
Этефон + <i>S. nodorum</i>	<b>181±27</b>	<b>223±29</b>	<b>220±34</b>	<b>223±31</b>
1-МЦП	90±14	80±13	120±8	110±17
1-МЦП + <i>S. nodorum</i>	67±6	35±8	127±7	113±16

В нашей работе было изучено накопление транскриптов генов этиленового сигнала - *TaEIL1* и *TaPIE1*, ортологов генов арабидопсиса *AtEIN3* (главного регуляторного фактора этиленового сигнала) и *AtERF1* (ТФ первичного ответа на этилен, регулирующего экспрессию генов ТФ второго порядка), соответственно, а также генов биосинтеза этилена АЦК-синтазы (*TaACS1*) и АЦК-оксидазы (*TaACO*) (табл. 1, табл. 2). У устойчивого сорта и

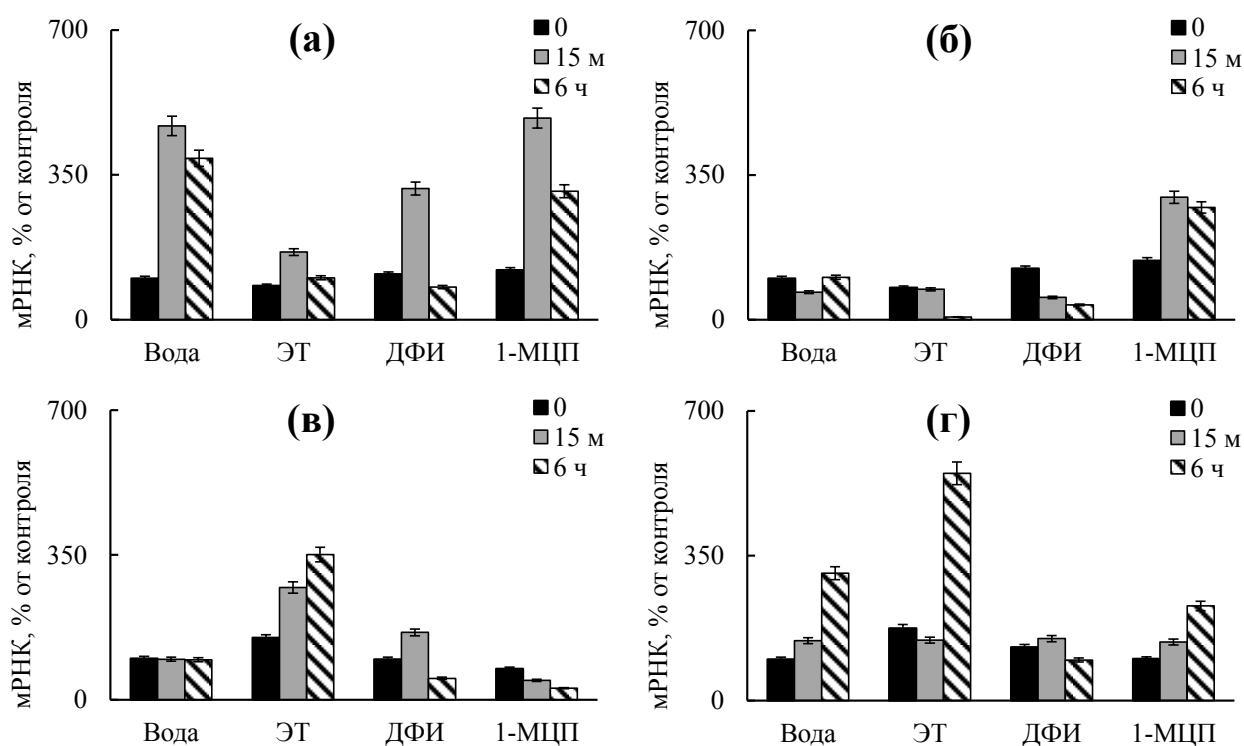
растений, обработанных 1-МЦП и инфицированных *S. nodorum*, не обнаружено повышения уровня транскриптов ни генов этиленового сигнального пути, ни генов биосинтеза этилена (табл. 2), что может говорить об отсутствии активации, как сигнального пути, так и биосинтеза данного фитогормона. У восприимчивого сорта и растений, обработанных ЭТ и инфицированных *S. nodorum*, напротив, обнаружено накопление мРНК как генов этиленового сигнального пути, так и генов биосинтеза этилена (табл. 2), что может говорить об активации как сигналинга, так и биосинтеза. Таким образом, при развитии у растений восприимчивости к *S. nodorum*, опосредованной хозяин-специфичным токсином SnTox3 или этиленом, активировались МАРК МРК3 и МРК6, которые индуцировали как биосинтез, так и сигнальный путь этилена.

В настоящее время, молекулярные механизмы, лежащие в основе МАРК-каскадов, еще не расшифрованы, в основном из-за отсутствия знаний о том, как МАРК передает сигнал [Zhang et al., 2016]. Для расшифровки передачи сигнала МАРК, осуществляемого на основе фосфорилирования, широко изучаются субстраты МАРК. Субстратами для МАРК могут служить ТФ, ферменты, репрессоры. Одна и та же МАРК может взаимодействовать с разными субстратами с противоположным эффектом – положительным или отрицательным и регулировать различные физиологические процессы [Zhang et al., 2016]. МРК3 и МРК6 регулируют многочисленные биологические процессы совместно и имеют много общих субстратов, двойные мутанты по *mpk3/mpk6* проявляют летальный фенотип, что отражает большую значимость этих МАРК в жизни растений [Zhang et al., 2016]. Однако МРК6 может действовать отдельно от МРК3. Так субстратом для МРК3/МРК6 могут быть ТФ семейства WRKY, например, в растениях арабидопсиса МРК3 и МРК6 фосфорилировали WRKY33 [Zhang et al., 2016]. Также МРК3/МРК6 стабилизируют ферменты биосинтеза этилена АЦК-синтазы (ACS2, ACS6). Отдельная роль для МРК6 была описана при взаимодействии с фактором первичного ответа на этилен ERF104 [Bethke et al., 2009]. А для пшеничной TaMPK3 (TaMAPK1) было показано, что ее субстратом является положительный регулятор ответа на этилен TaPIE1 (TaERF1) [Xu et al., 2007]. В нашей работе повышение транскрипции гена *TaMPK3* сопровождалось накоплением мРНК гена *TaPIE1* (*TaERF1*) (рис. 3, табл. 2).

Известно, что ТФ семейств WRKY и ERF являются одними из ключевых регуляторов патоген-индуцируемых защитных механизмов клеток растений и принимают участие в гормональных сигнальных путях и гормональных взаимодействиях [Adachi et al., 2015; Yao et al., 2017]. В данной работе изучено два представителя семейства ТФ WRKY – *TaWRKY13* и *TaWRKY53b*, ортологи генов арабидопсиса *AtWRKY70* и *AtWRKY33*, соответственно [Agarwal et al., 2011, Zeng et al., 2006]. Известно, что *AtWRKY70* является положительным регулятором СК сигнального пути и усиливает устойчивость растений к биотрофному грибному патогену *Erysiphe cichoracerum*, но снижает резистентность к некротрофу *Alternaria brassicicola* [Agarwal et al., 2011]. Ортологами ТФ *TaWRKY53b* являются *OsWRKY53* и *AtWRKY33* [Van Eck et al. 2014]. *AtWRKY33* играет важную роль в устойчивости растений к некротрофам, является положительным регулятором этиленового сигнального пути и подавляет СК сигнальный путь защитного ответа при инфицировании арабидопсиса *P. syringae* [Zheng et al., 2006]. *OsWRKY53* отвечает за устойчивость риса к

*Magnaporthe oryzae*, тогда как *TaWRKY53* повышает устойчивость растений пшеницы к инфицированию тлями [Van Eck et al. 2014]. В связи с этим привлекает внимание тот факт, что ранее нами была показана отрицательная роль этилена в устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*, проявляющаяся в антагонистическом воздействии на формирование СК-зависимых защитных реакций [Veselova et al., 2016].

У устойчивого сорта и растений, обработанных 1-МЦП, обнаружено накопление транскриптов гена *TaWRKY13* как через 15 мин, так и через 6 ч инфицирования *S. nodorum* (рис. 4), что позволяет предполагать активацию СК-сигнального пути защиты у таких растений. Ранее нами была предположена отрицательная роль гена *TaWRKY53b* в развитии защитных реакций в растениях пшеницы инфицированных *S. nodorum* [Веселова и др., 2018], что подтверждается результатами, полученными в данной работе (рис. 4). У восприимчивого сорта и растений, обработанных ЭТ, обнаружено значительное накопление мРНК гена *TaWRKY53b* через 6 ч после инфицирования *S. nodorum* (рис. 4).



**Рис. 4.** Влияние этилена и ингибитора НАДФН-оксидазы дифенилен иодониума (ДФИ) на содержание мРНК генов транскрипционных факторов *TaWRKY13* (а, б) и *TaWRKY53b* (в, г) в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы (а, в) Омская 35 и (б, г) Жница через 15 мин и 6 ч после инфицирования *S. nodorum*.

Кроме того, показано, что из всех генов ТФ арабидопсиса члены мультигенного семейства WRKY наиболее чувствительны к АФК. Однако до сих пор у большого числа редокс-чувствительных ТФ не исследована функциональная роль в сигнализации окислительного взрыва [Adachi et al., 2015; Yao et al., 2017]. Обработка растений ингибитором НАДФН-оксидазы ДФИ не снижала накопление транскриптов генов *TaWRKY13* и *TaWRKY53b* через 15 мин инфицирования и, напротив, ингибировала транскрипцию данных генов через 6 ч после инфицирования, как у восприимчивого, так и у

устойчивого сорта (рис. 4). На основании этих результатов можно предположить, что данные ТФ реагировали как на элиситоры и эффекторы патогена, так и были редокс-чувствительными, что допускает их участие в регуляции работы НАДФН-оксидазы.

В настоящее время рассматривают такой путь сигнала: перекись водорода, генерированная в апопласте с помощью фермента НАДФН-оксидазы, проникает в цитоплазму по специализированным каналам аквапоринам и запускает MAPK каскад, что приводит к активации ТФ в ядре и запуску транскрипции генов чувствительных к данным ТФ [Shariguzov et al. 2012]. Известно, что НАДФН-оксидаза активируется элиситорами патогенов и регулируется кальций зависимой протеин киназой (CDPK) на посттрансляционном уровне в первые минуты и часы инфицирования [Adachi, Yoshioka, 2015]. Однако при иммунном ответе растений долговременная регуляция НАДФН-оксидазы на транскрипционном уровне имеет большое значение [Adachi, Yoshioka, 201; Liu, He, 2016]. В настоящее время предполагают, что такая регуляция возможна через MAP-киназный каскад и активацию ТФ [Liu, He, 2016].

Основываясь на наших результатах можно предположить сигнальный путь, приводящий к развитию устойчивости или восприимчивости у растений пшеницы к *S. nodorum*. Восприимчивость растений пшеницы к *S. nodorum* опосредованная хозяин-специфичным токсином SnTox3 была связана с запуском биосинтеза и сигнального пути этилена, активируемого MAPK МРК3/МРК6 посредством стабилизации фермента биосинтеза этилена АЦК-синтазы и индукции гена первичного ответа на этилен *TaERF1*, гены первичного ответа сигнального пути этилена, в свою очередь, стимулировали ТФ *TaWRKY53b*, регулирующий экспрессию генов НАДФН-оксидазы, предположительно активируя ген *TaRbohD* и ингибируя ген *TaRbohF*, что способствовало предотвращению окислительного взрыва и развитию зон поражения. Устойчивость растений пшеницы к *S. nodorum* развивалась по СК-зависимому пути: элиситоры патогена индуцировали MAPK МРК6 и МРК7, которые возможно активировали ТФ *TaWRKY13*, стимулирующий, в свою очередь, транскрипцию гена НАДФН-оксидазы *TaRbohF*, что способствовало развитию окислительного взрыва и остановке роста патогена.

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”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Влияние эффектора Tox3 фитопатогенного гриба *Septoria nodorum* на про-/антиоксидантный статус растений пшеницы // Материалы II Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 26 июня - 1 июля 2017 г.) / ред. И.В. Максимов и др. Уфа : ООО «Первая типография». 2017. С. 87-92.
2. 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.
3. 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. 2018а. Т. 10. № 4. С. 387-399. DOI: [10.31301/2221-6197.bmcs.2018-50](https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-50)
  4. Землянская Е.В., Омелянчук Н.А., Ермаков А.А., Миронова В.В. Механизмы регуляции передачи этиленового сигнала у растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. DOI: [10.18699/VJ15.105](https://doi.org/10.18699/VJ15.105)
  5. Креславский В. Д., Лось Д. А., Аллахвердиев С. И., Кузнецов Вл. В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 2. С. 163 – 178.
  6. Новикова Г.В., Степанченко Н.С., Носов А.В., Мошков И.Е. В начале пути: восприятие АБК и передача ее сигнала у растений // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 6. С. 806-823.
  7. Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Ishihama N., Yoshioka M., Katou Y., Yaeno T., Shirasu K., Yoshioka H. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana* // Plant Cell. 2015. V. 27. № 9. P. 2645-2663. DOI: [10.1105/tpc.15.00213](https://doi.org/10.1105/tpc.15.00213)
  8. Adachi, H., Yoshioka, H. Kinase-mediated orchestration of NADPH oxidase in plant immunity // Brief. Funct. Genomics. 2015. V. 14. № 4. P. 253–259. DOI: [10.1093/bfpg/elv004](https://doi.org/10.1093/bfpg/elv004)
  9. Agarwal P., Reddy M.P., Chikara J. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants // Mol. Biol. Rep. 2011. V. 38. № 6. P. 3883–3896. DOI: [10.1007/s11033-010-0504-5](https://doi.org/10.1007/s11033-010-0504-5)
  10. Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.-L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity // Nature. 2002. V. 415. № 6875. P. 977-983. DOI: [10.1038/415977a](https://doi.org/10.1038/415977a)
  11. 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](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.014)
  12. Bethke G, Unthan T, Uhrig JF, Poschl Y, Gust AA, Scheel D, Lee J. Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. V. 106. № 19. P. 8067–8072. DOI: [10.1073/pnas.0810206106](https://doi.org/10.1073/pnas.0810206106)
  13. 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<sup>2+</sup> // New Phytol. 2001. V. 151. № 1. P. 185–194. DOI: [10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x)
  14. Broekgaarden C., Caarls L., Vos I.A., Pieterse C.M.J., van Wees S.C.M. Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense // Plant Physiol. 2015. V. 169. P. 2371–2379. DOI: [10.1104/pp.15.01020](https://doi.org/10.1104/pp.15.01020)
  15. Chaouch S., Queval G., Noctor G. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intra-cellular oxidative stress and

- pathogenesis responses in *Arabidopsis* // The Plant Journal. 2012. V. 69. № 4. P. 613–627. DOI: [10.1111/j.1365-3113X.2011.04816.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04816.x)
16. Hahn A., Harter K. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Ethylene: Signaling, Biosynthesis, or Both? // Plant Physiology. 2009. V. 149. P. 1207–1210. DOI: [10.1104/pp.108.132241](https://doi.org/10.1104/pp.108.132241)
  17. Jalmi S.K., Sinha A.K. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences // Front. Plant Sci. 2015. 6:769. DOI: [10.3389/fpls.2015.00769](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00769)
  18. 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](https://doi.org/10.1105/tpc.16.00947)
  19. Liu Y., He C. Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD // Plant Cell. Rep. 2016. V. 35. № 5. P. 995–1007. DOI: [10.1007/s00299-016-1950-x](https://doi.org/10.1007/s00299-016-1950-x)
  20. Liu Y., He Ch. A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants // Redox Biology. 2017. V. 11. P. 192–204. DOI: [10.1016/j.redox.2016.12.009](https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.009)
  21. 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](https://doi.org/10.1104/pp.110.154567)
  22. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // Trends in Plant Science. 2011. V. 16. № 6. P. 300-309. DOI: [10.1016/j.tplants.2011.03.007](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007)
  23. Podgorska A., Burian M., 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](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01353)
  24. Reyna N.S., Yang Y. Molecular Analysis of the Rice MAP Kinase Gene Family in Relation to *Magnaporthe grisea* Infection // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2006. V. 19. № 5. P. 530–540. DOI: [10.1094/MPMI-19-0530](https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0530)
  25. Rudd J.J., Keon J., Hammond-Kosack K.E. The Wheat Mitogen-Activated Protein Kinases TaMPK3 and TaMPK6 Are Differentially Regulated at Multiple Levels during Compatible Disease Interactions with *Mycosphaerella graminicola* // Plant Physiology. 2008. V. 147. № 2. P. 802–815. DOI: [10.1104/pp.108.119511](https://doi.org/10.1104/pp.108.119511)
  26. Shapiguzov A., Vainonen J.P., Wrzaczek M., Kangasjärvi J. ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through // Front Plant Sci. 2012. V. 3 P. 292. DOI: [10.3389/fpls.2012.00292](https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00292)
  27. Torres M.A., Jones J.D.G. and Dangl J.L. Pathogen-induced, NADPHoxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of celldeath in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Genet. 2005. V. 37. P. 1130–1134. DOI: [10.1038/ng1639](https://doi.org/10.1038/ng1639)
  28. Van Eck L., Davidson R. M., Wu S., Zhao B. Y., Botha A.-M., Leach J. E., Lapitan N. L. V. The transcriptional network of WRKY53 in cereals links oxidative responses to biotic and abiotic stress inputs // Funct. Integr. Genomics. 2014. V. 14. P. № 2. 351–362. DOI: [10.1007/s10142-014-0374-3](https://doi.org/10.1007/s10142-014-0374-3)
  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](https://doi.org/10.1134/S1021443716050150)
30. 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](https://doi.org/10.1134/S0003683814050111)
31. 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](https://doi.org/10.1186/s12870-014-0215-5)
32. Xu Zh.-Sh., Xia L.-Q., Chen M., Cheng X.-G., Zhang R.-Y., Li L.-Ch., Zhao Y.-X., Lu Y., Ni Zh.-Y., Liu L., Qiu Zh.-G., Ma Y.-Z. Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance // Plant. Mol. Biol. 2007. V. 65. № 6. P. 719–732. DOI: [10.1007/s11103-007-9237-9](https://doi.org/10.1007/s11103-007-9237-9)
33. Yao Y., He R.J., Xie Q.L., Zhao X.H., Deng X.M., He J.B., Song L., He J., Marchant A., Chen X.Y., Wu A.M. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in *Arabidopsis* // New Phytologist. 2017. V. 213. № 4. P. 1667–1681. DOI: [10.1111/nph.14278](https://doi.org/10.1111/nph.14278)
34. 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](https://doi.org/10.1093/jxb/erv422)
35. Zhang T., Chen S., Harmon A.C. Protein–protein interactions in plant mitogen-activated protein kinase cascades // Journal of Experimental Botany. 2016. V. 67. № 3. P. 607–618. DOI: [10.1093/jxb/erv508](https://doi.org/10.1093/jxb/erv508)
36. Zheng Z., Qamar S.A., Chen Z., Mengiste T. Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens // Plant J. 2006. V. 48. № 4. P. 592–605. DOI: [10.1111/j.1365-3113X.2006.02901.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02901.x)