



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



УЧАСТИЕ ЦИТОКИНИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-МЕТАБОЛИЗМА ИНФИЦИРОВАННЫХ *STAGONOSPORA NODORUM* РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

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

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

Цитокинины – большая группа фитогормонов, играющая важную роль не только в регуляции процессов роста и развития, но и при ответе растений на стрессовые факторы, как абиотической, так и биотической природы. Важной функцией цитокининов при воздействии стрессовых факторов является регуляция редокс-метаболизма растения. Однако исследования роли цитокининов в регуляции редокс-метаболизма растений при патогенезе единичны. В данной работе изучено влияние цитокининов на генерацию перекиси водорода, активность пероксидазы, оксалаксоксидазы и каталазы, а также индукцию накопления транскриптов генов оксидоредуктаз в растениях мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух контрастных по устойчивости сортов, инфицированных грибом *Stagonospora nodorum*. Показано, что *транс*-зеатин индуцировал быстрое и интенсивное накопление перекиси водорода у растений за счет индукции транскрипции генов *TaRbohF*, *TaSod*, *TaPrx*, кодирующих НАДФН-оксидазу, супероксид дисуптазу и анионную пероксидазу, соответственно, а также за счет повышения активности пероксидаз, оксалаксоксидазы и снижения активности каталазы. Ингибиторный анализ подтвердил решающее значение НАДФН-оксидазы и пероксидазы в генерации активных форм кислорода в растениях пшеницы на начальной стадии инфицирования патогеном *S. nodorum*. Таким образом, повышенное содержание зеатина в растениях пшеницы необходимо для запуска НАДФН- и пероксидазо-зависимой генерации активных форм кислорода в первые минуты и часы инфицирования, чтобы в дальнейшем активировать защитные механизмы растения против патогена *S. nodorum*.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, активные формы кислорода, пероксидаза, цитокинины

ROLE OF CYTOKININS IN THE REGULATION OF REDOX METABOLISM OF WHEAT PLANTS INFECTED WITH *STAGONOSPORA NODORUM*

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

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

Cytokinins are large group of phytohormones that plays an important role not only in the regulation of growth and development, but also when plants respond to abiotic and biotic stresses. An important function of cytokinins under stressful conditions is regulation of plant redox metabolism. However, investigation of cytokinins role in the regulation of plant redox metabolism during pathogenesis are poor. In this work, we studied the effect of cytokinins on the generation of hydrogen peroxide, the activity of peroxidase, oxalate oxidase and catalase, as well as the induction of enzymes genes transcripts accumulation with infection in two varieties of soft spring wheat plants (*Triticum aestivum* L.), contrasting in resistance to the causal agents of *Septoria nodorum* blotch. It has been shown that *trans*-zeatin induced fast and intense accumulation of hydrogen peroxide in plants by inducing transcription of the *TaRbohF*, *TaSod*, *TaPrx* genes encoding NADPH oxidase, superoxide dismutase, and anionic peroxidase, respectively, as well as by increasing activity of peroxidases, oxalate oxidase and by reducing catalase activity. Inhibitor analysis confirmed the crucial importance of NADPH oxidase and peroxidase in the generation of reactive oxygen species in wheat plants at the initial stage of infection with the pathogen *S. nodorum*. Thus, an increased content of zeatin in wheat plants is necessary to start NADPH- and peroxidase-dependent generation of reactive oxygen species in the first minutes and hours of infection, to further activate the plant's defense mechanisms against *S. nodorum*.

Keywords: *Stagonospora nodorum*, *Triticum aestivum*, reactive oxygen species, peroxidase, cytokinins

Поступила в редакцию: 26.04.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-187-197](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-187-197)

ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины (ЦК) – большая группа фитогормонов, представленная множеством изоформ и выполняющая в растениях многообразные функции [Романов, 2009]. Действие ЦК на растение в основном связано с регуляцией процессов роста и развития. Однако, как показывают последние данные, ЦК играют важную роль при ответе растений на стрессовые факторы, как абиотической, так и биотической природы [O'Brien et al., 2013; Arnaud et al., 2017]. Кроме того, в настоящее время растет число доказательств о роли ЦК в регуляции защитных ответов растений против патогенов [Choi et al., 2010; Choi et al., 2011; Arnaud et al., 2017]. Ранее цитокинины – в системе растение-патоген рассматривались только как гормоны, продуцируемые патогенами и необходимые для колонизации растений. На сегодняшний день показано участие ЦК в формировании устойчивости растений через регуляцию салицилат (СК)-зависимых защитных реакций, индукции экспрессии ряда генов защитных белков, синтеза фитоалексинов и процессов лигнификации [O'Brien et al., 2013; Choi et al., 2010; Choi et al., 2011]. Вместе с тем, роль ЦК в патогенезе остается неоднозначной и зависит от типа патогена и вида растения.

Важной функцией ЦК как в процессах роста и развития, так и при воздействии стрессовых факторов является регуляция редокс-метаболизма растения [Kunikowska et al. 2013]. Один из важнейших эффектов ЦК – это стимуляция деления клеток, что на организменном уровне приводит к активации роста и задержке старения, при этом ЦК оказывают антиоксидантное действие на растение [Романов, 2009]. Интересно, что в высоких концентрациях ЦК вызывают ингибирование роста, контролируют запрограммированную гибель клеток (ЗГК) в программе развития и старения [Kunikowska et al. 2013], а также повышают продукцию активных форм кислорода (АФК) во время ответа растений на стрессовые факторы различной природы [Wang et al., 2015; Arnaud et al., 2017].

Известно, что АФК играют центральную роль в иммунитете растений [Podgórska et al., 2017]. Растения реагируют на атаку патогенов окислительным взрывом - интенсивной генерацией АФК, который происходит в апопласте с участием локализованной на плазмаллеме НАДФН-оксидазы и свободно-растворимых или связанных с клеточной стенкой пероксидаз (ПО) [Podgórska et al., 2017]. Кроме того, в процессе генерации АФК в патогенезе принимают участие супероксид дисмутаза (СОД) и оксалатоксидаза (ОО) [Barna et al., 2012]. 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].

Роль ЦК в регуляции программируемой смерти клеток и продукции АФК в процессах роста и развития (рост кончика корня, формирование сосудов и др.) обсуждается [Carimi et al., 2003; Kunikowska et al., 2013]. Однако исследования роли ЦК в регуляции редокс-метаболизма растений при патогенезе единичны. Так в работе Arnaud et al., 2017 было показано, что в растениях арабидопсиса инфицированного *Pseudomonas syringae* pv *tomato* обработка *транс*-зеатином индуцировала закрытие устьиц и накопление АФК в устьичных клетках через активацию цитокининового сигнального пути в СК-зависимой манере. Кроме того, было показано, что положительный регулятор цитокининового ответа типа-В *ARR2*

напрямую активировал экспрессию апопластных пероксидаз *PRX33* и *PRX34*, которые требуются для СК-индуцированной продукции АФК [Arnaud et al., 2017]. На трансгенных линиях табака с суперпродукцией ЦК, пораженных вирусом или патогенной бактерией, показано влияние этих фитогормонов на ферменты про-/антиоксидантной системы, такие как ПО, СОД и каталаза (КАТ), приводившее к повышению устойчивости растений, но, к сожалению, остается неясным как при этом менялось содержание АФК в растениях [Pogány et al., 2004; Varna et al., 2008].

В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение влияния ЦК на генерацию H_2O_2 , активность пероксидазы, оксалатоксидазы и каталазы, а также индукцию накопления транскриптов генов оксидоредуктаз в растениях пшеницы, инфицированных грибом *Stagonospora nodorum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 7-суточные проростки мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сортов Жница (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый). Растения выращивали на водной культуре как описано ранее [Веселова и др., 2016]. Первые листья семисуточных проростков срезали и помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). Часть листьев перед инфицированием инкубировали в растворах *транс*-зеатина (2,5 мкМ) (Sigma) или ингибитора НАДФН-оксидазы – дифенилен иодониума (ДФИ) (10 мкМ) (Sigma), или ингибитора активности пероксидазы – азида натрия (1 мМ) (Sigma). Через 24 ч на листья наносили 5 мкл суспензии пикноспор агрессивного штамма гриба *S. nodorum* (10^5 спор/мл) как описано ранее [Веселова и др., 2016].

Биохимические параметры. Измерение содержания перекиси водорода (H_2O_2) через 0,25, 6, 24 и 72 ч после инфицирования и активности ферментов ПО, ОО и КАТ через 24 и 72 ч после инфицирования патогеном *S. nodorum* проводили, как описано ранее [Веселова и др., 2018].

Транскрипционная активность генов. Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента Trizol согласно протоколу фирмы-поставщика (“Sigma”, Германия) из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте через 24 ч после инокуляции патогеном. Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия). Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты про-/антиоксидантной системы, проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе “iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System” (“Bio-Rad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). В работе использовали праймеры к генам, кодирующим НАДФН-оксидазу (*TaRbohF*, AY561153), анионную изопероксидазу (*TaPrx*, AK333699), супероксид дисмутазу (*TaSod*, JX398977). Изменения в транскрипционной активности генов определяли относительно референсных генов белка подобного ингибитору РНКазы-L пшеницы (RNase L inhibitor-like protein) (*TaRLI(a)*, AY059462) и фактора АДФ-рибозилирования (*TaARF*, AB050957) с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США).

Статическая обработка. Все эксперименты повторяли 3 раза и проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях (общее n = 9), кроме опытов по анализу

площади поражения, где эксперименты включали в себя не менее 30 биологических повторов (общее $n = 90$). На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Защитные реакции в растении могут развиваться только в том случае, если растение своевременно распознает патоген и активирует соответствующие иммунные механизмы с участием сигнальных систем и фитогормонов. Показано, что инфицирование различными патогенами сопровождается изменениями в гормональном балансе растений [Almagro et al., 2009; Barna et al., 2012; O'Brien et al., 2013]. Ранее нами было установлено, что, устойчивость сорта мягкой яровой пшеницы *T. aestivum* к патогену *S. nodorum* определялась как интенсивной генерацией АФК, так и повышением содержания активных форм ЦК в листьях растений на начальной стадии инфицирования патогеном (до 3-х суток) [Веселова и др., 2016; 2020].

В данной работе для изучения влияния ЦК на регуляцию редокс-метаболизма инфицированных растений отрезанные первые листья проростков контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сортов мягкой яровой пшеницы: Жница (восприимчивый) и Ом35 (устойчивый), обрабатывали *транс*-зеатином, ДФИ или азидом натрия. Инфицирование восприимчивого сорта Жница спорами *S. nodorum* приводило к развитию больших зон поражения с некрозами, хлорозами и пикнидами, занимавшими до 73% от общей площади листа, тогда как на листьях устойчивого сорта Ом35 зоны поражения, в основном некротического характера, занимали около 15% от общей площади листа (табл. 1).

Таблица 1. Влияние обработки *транс*-зеатином, дифенилен иодониумом (ДФИ) и азидом натрия на степень поражения листьев двух сортов пшеницы Омская 35 и Жница через 7 суток после инфицирования *S. nodorum*

Вариант обработки	Сорт Омская 35		Сорт Жница	
	Площадь, мм ²	% от общей площади листа	Площадь, мм ²	% от общей площади листа
Вода	17,5 ± 1,9	15,3 ± 1,7	83,0 ± 4,0	73,0 ± 2,7
<i>Транс</i> -зеатин, 2,5 мкМ	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2
Азид натрия, 1 мМ	65,0 ± 2,8	56,8 ± 3,9	88,0 ± 4,2	77,4 ± 3,1
ДФИ, 10 мкМ	93,4 ± 6,8	81,7 ± 4,8	106,5 ± 7,2	93,7 ± 5,9

Предварительная обработка *транс*-зеатином растений как восприимчивого, так и устойчивого сорта увеличивала их резистентность к патогену: зоны поражения у восприимчивого сорта сокращались до 3,1%, а у устойчивого – до 2,5% от общей площади листа (табл. 1). Ингибирование НАДФН-оксидазы с помощью ДФИ и ингибирование ПО с помощью азидата натрия увеличивало восприимчивость к патогену растений обоих сортов, в большей степени сорта Жница (табл. 1). При этом обработка ДФИ приводила к более интенсивному развитию зон поражения, чем обработка азидом натрия у обоих сортов (табл. 1), что говорит о решающей роли этих ферментов в развитии защитных реакций растений пшеницы против *S. nodorum*.

Одной из самых быстро определяемых реакций на проникновение патогена в растение является изменение содержания АФК, в частности H₂O₂ [Podgórska et al., 2017]. При

инокуляции устойчивого сорта Ом35 патогеном *S. nodorum* обнаружено три пика генерации H_2O_2 – через 15 мин, 6 и 24 ч после инфицирования (рис. 1а). Возникновение пиков генерации АФК является характерной ответной реакцией биологической системы на стрессовый фактор и формирует «АФК волну», необходимую для запуска каскада последующих реакций и образования долгосрочного сигнала [Mittler et al. 2011]. Восприимчивый сорт Жница отличало отсутствие повышения генерации H_2O_2 в течение 72 ч после инфицирования (рис. 1б). Однако обработка *транс*-зеатином растений восприимчивого сорта меняла характер генерации H_2O_2 у них на сходный с устойчивым сортом с тремя пиками – через 15 мин, 6 и 24 ч после инфицирования (рис. 1б), а на характер генерации H_2O_2 растений устойчивого сорта практически не влияла, усиливая ее через 24 ч после инфицирования (рис. 1а). Такое положительное влияние *транс*-зеатина на генерацию АФК в растениях не является сюрпризом, так как роль разных форм экзогенных ЦК (кинетина, 6-бензиламинопурина, *транс*-зеатина) в индукции генерации АФК при регуляции процессов роста и развития, а также ответов на воздействие стрессовых факторов показана на различных видах растений и культурах клеток [Mlejnek et al., 2003; Kunikowska et al., 2013; Arnaud et al., 2017].

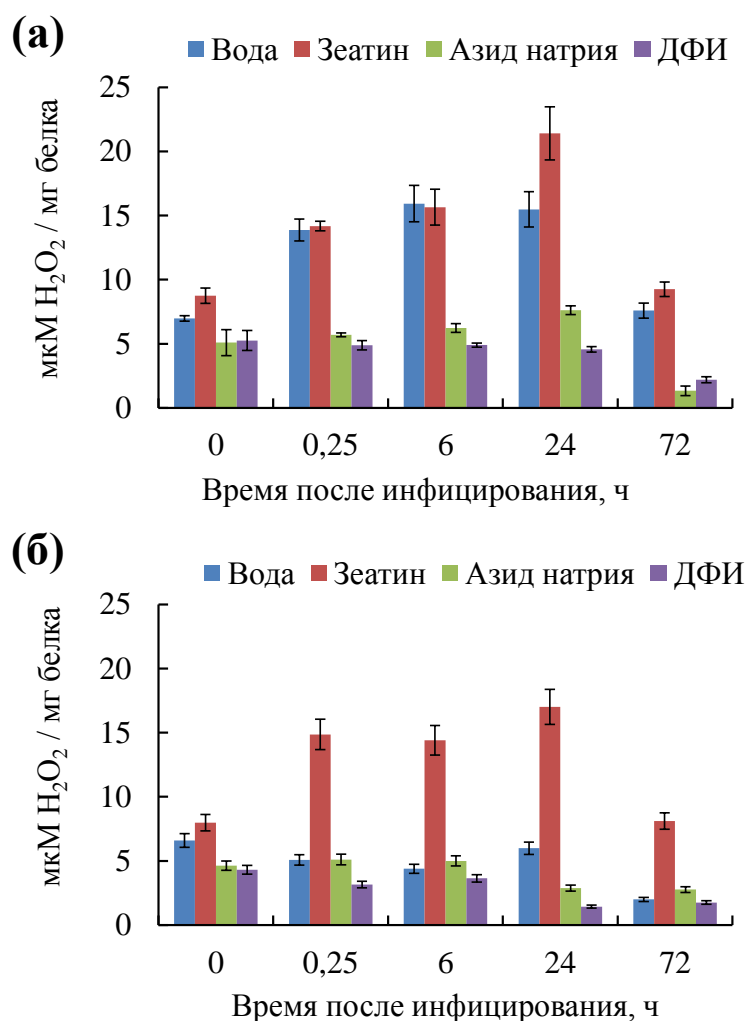


Рис. 1. Изменение содержания H_2O_2 под влиянием обработки *транс*-зеатином, азидом натрия и дифенилен иодониумом (ДФИ) в растениях пшеницы контрастных по устойчивости сортов Ом35 (а) и Жница (б), инфицированных патогеном *S. nodorum*.

Применение ингибиторов НАДФН-оксидазы – ДФИ и ПО – азида натрия приводило к подавлению пиков генерации H_2O_2 у устойчивого сорта и критическому уменьшению содержания H_2O_2 у восприимчивого сорта (рис. 1), что говорит о вкладе этих двух ферментов в генерацию АФК на ранней стадии инфицирования растений *S. nodorum*. Это согласуется с современными данными об участии как НАДФН-оксидазы, так и апопластных пероксидаз в индуцированной продукции АФК в растениях при патогенезе [Arnaud et al., 2017; Podgórska et al., 2017].

Для выявления роли ЦК в регуляции активности ферментов про-/антиоксидантной системы на транскрипционном и пост трансляционном уровнях, мы изучили транскрипционную активность генов оксидоредуктаз (*TaRbohF*, *TaSod*, *TaPrx*) и активность белковых продуктов ПО, ОО и КАТ под воздействием обработки *транс*-зеатином, азидом натрия и ДФИ.

Таблица 2. Относительное содержание мРНК генов в процентах от неинфицированного контроля, кодирующих ферменты про-/антиоксидантной системы: изоформу НАДФН-оксидазы (*TaRbohF*), супероксид дисмутазу (*TaSod*), анионную пероксидазу (*TaPrx*) под влиянием обработки *транс*-зеатином, азидом натрия и дифенилен иодониумом (ДФИ) в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы Омская 35 и Жница через 24 часа после инфицирования патогеном *S. nodorum*

Вариант обработки	Обозначение гена		
	<i>TaRbohF</i>	<i>TaSod</i>	<i>TaPrx</i>
	Сорт Омская 35		
Контроль	100	100	100
<i>S. nodorum</i>	495 ± 35	287 ± 23	419 ± 39
<i>транс</i> -Зеатин	100 ± 9	130 ± 12	170 ± 16
<i>S. nodorum</i> + <i>транс</i> -Зеатин	540 ± 48	543 ± 51	921 ± 81
Азид натрия	100 ± 11	100 ± 11	100 ± 14
<i>S. nodorum</i> + Азид натрия	500 ± 48	95 ± 9	123 ± 12
ДФИ	70 ± 6	80 ± 7	70 ± 8
<i>S. nodorum</i> + ДФИ	185 ± 14	10 ± 2	22 ± 2
	Сорт Жница		
Контроль	100	100	100
<i>S. nodorum</i>	51 ± 3	85 ± 7	129 ± 10
<i>транс</i> -зеатин	138 ± 10	120 ± 11	190 ± 11
<i>S. nodorum</i> + <i>транс</i> -зеатин	580 ± 40	161 ± 12	365 ± 25
Азид натрия	154 ± 14	80 ± 5	90 ± 7
<i>S. nodorum</i> + Азид натрия	140 ± 8	80 ± 6	80 ± 4
ДФИ	90 ± 6	90 ± 8	70 ± 3
<i>S. nodorum</i> + ДФИ	150 ± 12	90 ± 5	29 ± 2

В наших экспериментах через 24 ч после инфицирования у устойчивого сорта Ом35 вместе с накоплением транскриптов гена *TaRbohF*, кодирующего НАДФН-оксидазу, было обнаружено накопление транскриптов генов *TaPrx* и *TaSod* (табл. 2), что совпадало с повышением генерации H_2O_2 у данного сорта (рис. 1а). Напротив, у восприимчивого сорта Жница было обнаружено уменьшение содержания транскриптов генов, кодирующих

ферменты, генерирующие АФК – *TaRbohF*, *TaSod*, и отсутствие значительного повышения содержания мРНК гена *TaPrx*, (табл. 2), что совпадало с низким содержанием H_2O_2 у этого сорта (рис. 1б). Таким образом, наши результаты свидетельствуют не только о роли НАДФН-оксидазы и ПО, но и о роли СОД в генерации АФК в растениях пшеницы, инфицированных *S. nodorum*. Интересно что, обработка растений ингибитором НАДФН-оксидазы ДФИ практически полностью подавляла транскрипционную активность генов *TaPrx* и *TaSod* в инфицированных растениях пшеницы, что приводило к критическому снижению содержания H_2O_2 в таких растениях (рис. 1), тогда как обработка азидом натрия оказывала гораздо меньшее влияние на накопление транскриптов данных генов при инфицировании (табл. 2). Это говорит о зависимости регуляции транскрипции генов *TaPrx* и *TaSod* от активности НАДФН-оксидазы. Из наших результатов следует, что НАДФН-оксидаза может участвовать в регуляции работы других про-/антиоксидантных ферментов, таких как ПО и СОД, что согласуется с высказанными ранее предположениями о взаимодействии между ПО и НАДФН-оксидазой [Liu, He, 2016].

Обработка *транс*-зеатином не изменяла характер накопления транскриптов изученных генов у устойчивого сорта Ом35, усиливая накопление мРНК некоторых из них – *TaSod* и особенно *TaPrx* (табл. 2). Обработка растений восприимчивого сорта Жница *транс*-зеатином значительно повышала экспрессию изученных генов, кодирующих оксидоредуктазы – НАДФН-оксидазу, СОД и ПО, что совпадало с пиками генерации H_2O_2 (табл. 2). Наши данные согласуются с результатами, полученными на трансгенных растениях Арабидопсиса с суперпродукцией ЦК *AtIPT8-OE*, у которых под воздействием засоления на фоне повышенной продукции АФК обнаружили более высокий уровень транскрипции генов, кодирующих изоформы НАДФН-оксидазы *AtRbohF*, *AtRbohD*, *AtRbohJ*, некоторые пероксидазы *AtPrx* и супероксид дисмутазу *AtSod1*, по сравнению с диким типом Col [Wang et al., 2015]. Кроме того, на мутантных линиях Арабидопсиса с усиленным сигналингом ЦК (*AtARR2-OE*) обнаружено, что при инфицировании растений бактерией *Pseudomonas syringae* pv *tomato* обработка *транс*-зеатином в 6 раз увеличивала экспрессию генов, кодирующих ПО *PRX33* и *PRX34*, требующихся для продукции АФК [Arnaud et al., 2017].

Как известно ПО принимают участие как в процессах генерации АФК в апопласте, так и в процессах утилизации излишних количеств H_2O_2 с образованием полимеров лигнина, что приводит к уплотнению клеточной стенки [Podgórska et al., 2017]. Ранее нами было показано, что высокая активность ПО на фоне повышенного содержания H_2O_2 приводила к интенсивной лигнификации клеточных стенок растений пшеницы, инфицированных *S. nodorum*, повышая тем самым их устойчивость к патогену через ограничение его роста [Веселова и др., 2014]. Другой патоген-индуцируемый фермент ОО катализирует окисление солей щавелевой кислоты (ЩК) с образованием CO_2 и H_2O_2 [Dong et al., 2008], тем самым нейтрализует ЩК, которая 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]. Показано, что низкие концентрации АФК способствуют росту патогенов, поэтому грибы используют различные механизмы детоксикации, связанные, в том числе, с активацией каталазы – антиоксидантного фермента, активирующего реакцию дисмутации двух молекул H_2O_2 в H_2O и O_2 [Mittler et al., 2011; Podgórska et al., 2017]. Ранее

мы показали, что агрессивные штаммы *S. nodorum* характеризовались высокой активностью КАТ [Максимов и др., 2013].

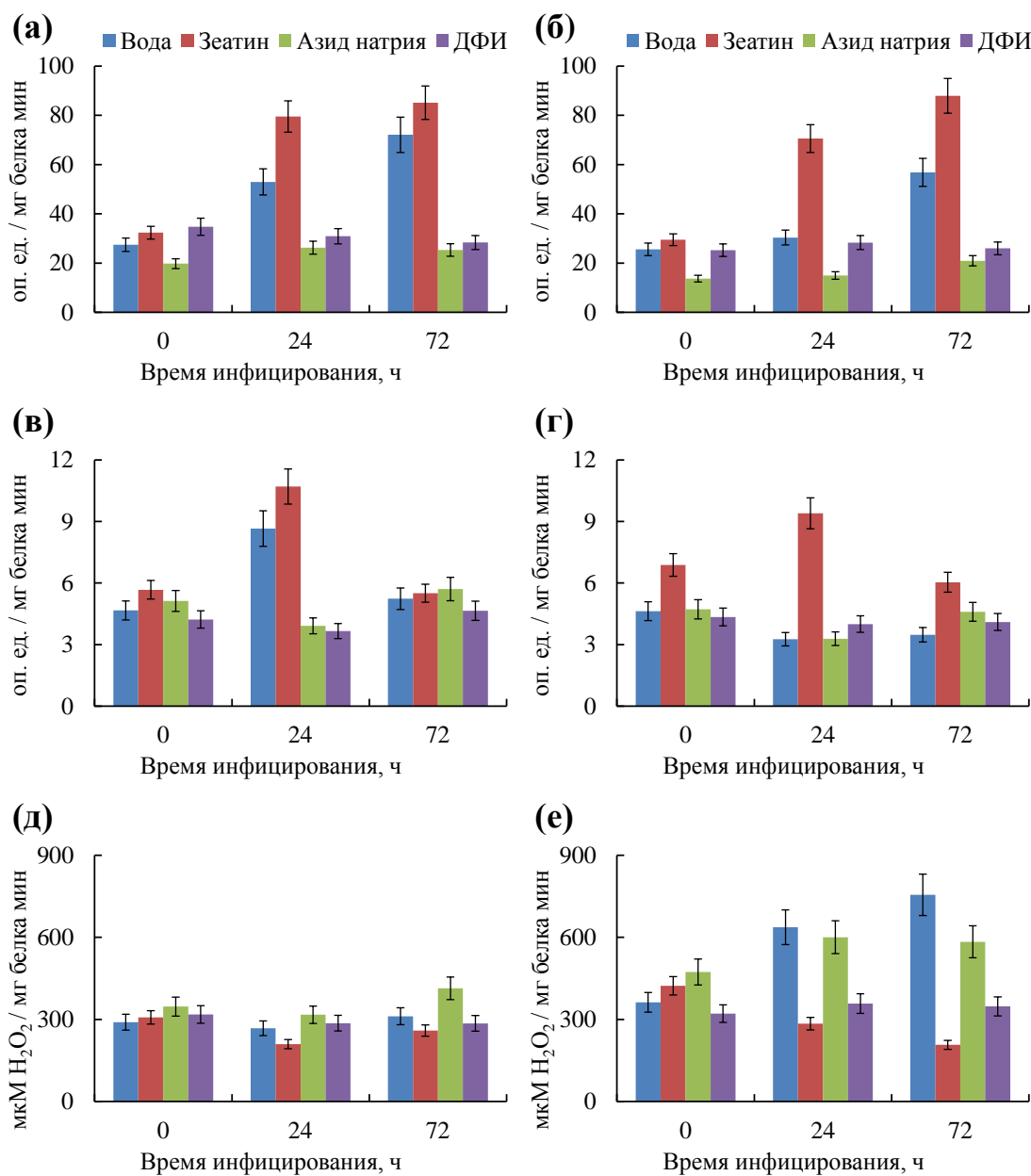


Рис. 2. Изменение активности пероксидазы (а, б), оксалакисады (в, г) и каталазы (д, е) под влиянием обработки *транс*-зеатином, азидом натрия и дифенилен иодониумом (ДФИ) в листьях контрастных по устойчивости сортов пшеницы Омская 35 (а, в, д) и Жница (б, г, е) после инфицирования патогеном *S. nodorum*.

Анализ активности основных ферментов про-/антиоксидантной системы показал, что инфицированные *S. nodorum* листья устойчивого сорта Ом35 отличались высокой активностью свободных ПО в течение 3-х суток инфицирования (рис. 2а), повышенной активностью ОО через 24 ч после инфицирования (рис. 2в) и низкой – на уровне контроля – активностью КАТ (рис. 2д), что приводило к повышенному содержанию H₂O₂ в таких растениях (рис. 1а). Напротив, в листьях восприимчивого сорта Жница в первые сутки инфицирования не было обнаружено значительного повышения активности ПО, а затем активность фермента повышалась, но в гораздо меньшей степени, чем у устойчивого сорта Ом35 (рис. 2б), активность ОО снижалась (рис. 2г), а активность КАТ повышалась в течение

72 ч после инфицирования (рис. 2е), что приводило к снижению содержания H_2O_2 в данных растениях (рис. 1б).

Ингибиторный анализ показал, что обработка азидом натрия или ДФИ приводила к уменьшению активности ПО и ОО в инфицированных *S. nodorum* листьях обоих сортов по сравнению с необработанными инфицированными растениями (рис. 2). Активность КАТ во время инфицирования снижалась только при обработке растений обоих сортов ингибитором НАДФН-оксидазы ДФИ, но не ингибитором активности ПО – азидом натрия (рис. 2д, е). Такие результаты говорят о зависимости регуляции активности ПО, ОО и КАТ от НАДФН-оксидазы, являющейся основным ферментом, генерирующим АФК в апопласте, и необходимой для распространения «АФК волны» и запуска каскада последующих защитных реакций, что было доказано с применением каталазы и ингибитора НАДФН-оксидазы [Mittler et al., 2011; Podgórska et al., 2017].

Обработка *транс*-зеатином не изменяла характер активности ферментов у устойчивого сорта при инфицировании *S. nodorum*, усиливая активность ПО и ОО (рис. 2а, в), что приводило к повышенной генерации H_2O_2 у таких растений (рис. 1а). Обработка *транс*-зеатином растений восприимчивого сорта Жница приводила к повышению активности ПО и ОО и снижению активности КАТ во время развития инфекции, что совпадало с пиками генерации H_2O_2 (рис. 1б, рис. 2б, г, е). Роль ЦК в регуляции работы ферментов про-/антиоксидантной системы при воздействии стрессовых факторов различной природы, в том числе биотических, изучена недостаточно, данные встречающиеся в литературе немногочисленны и разрознены, но в некоторых работах показано, что ЦК повышали активность ПО, участвующих в генерации АФК при патогенезе [Arnaud et al., 2017] и несколько снижали активность КАТ при засолении [Wang et al., 2015]. Таким образом, наши результаты совпадают с данными литературы, а положительное влияние ЦК на активность ОО при патогенезе нами установлено впервые.

Таким образом, быстрое и интенсивное накопление АФК в наших экспериментах в листьях пшеницы устойчивого сорта Ом35 и растениях, обработанных *транс*-зеатином, как восприимчивого, так и устойчивого сортов, могло происходить за счет индукции транскрипции генов *TaRbohF*, *TaSod*, *TaPrx*, кодирующих НАДФН-оксидазу, супероксид дисмутазу и анионную пероксидазу, повышения активности свободно-растворимых ПО, ОО и снижения активности КАТ (табл. 2, рис. 2.), что приводило к ограничению роста патогена (табл. 1). При этом ЦК положительно влияли как на транскрипцию генов оксидоредуктаз *TaRbohF*, *TaSod*, *TaPrx*, так и на активность белковых продуктов ферментов ПО и ОО. Ингибиторный анализ подтвердил решающее значение НАДФН-оксидазы и пероксидазы в генерации АФК в растениях пшеницы на начальной стадии инфицирования патогеном *S. nodorum*. Таким образом, повышенное содержание зеатина в растениях пшеницы необходимо для запуска НАДФН- и пероксидазо-зависимой генерации АФК в первые минуты и часы инфицирования, чтобы в дальнейшем, скорее всего, активировать защитные механизмы растения против патогена *S. nodorum*.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. <https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-1-3-66-74>
2. Веселова С. В., Бурханова Г. Ф., Нужная Т. В., Максимов И. В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum* // Физиология растений. 2016. Т. 63 (5). С. 649–660. <https://doi.org/10.1134/s1021443716050150>
3. Веселова С.В., Нужная Т.В., Бурханова Г.Ф., Румянцев С.Д., Максимов И.В. Влияние этилена на содержание активных форм цитокининов в листьях пшеницы, инфицированных различными по вирулентности штаммами гриба *Stagonospora nodorum* Berk. // Экобиотех. 2020. Т. 3 (1). С. 91–101. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-91-101>
4. Веселова С.В., Нужная Т.В., Максимов И.В. Влияние 1-метилциклопропена на компоненты про-/антиоксидантной системы растений пшеницы и развитие защитных реакций при грибном патогенезе // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50 (5). С. 517–525. <https://doi.org/10.7868/S0555109914050134>
5. Максимов И.В., Яруллина Л.Г., Бурханова Г.Ф., Заикина Е.А. Связь агрессивности возбудителя септориоза пшеницы *Septoria nodorum* Berk. с активностью каталазы // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. Т. 5. С. 558–564. <https://doi.org/10.7868/S0002332913050093>
6. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56. (2). С. 295–319.
7. 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern277>
8. Arnaud D., Lee S., Takebayashi Y., Choi D., Choi J., Sakakibara H., Hwanga I. Cytokinin-mediated regulation of reactive oxygen species homeostasis modulates stomatal immunity in Arabidopsis // The Plant Cell. 2017. V. 29. P. 543–559. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00583>
9. 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.014>
10. Barna B., Smigocki A.C., Baker J.C. Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced HR symptoms and increases antioxidative enzyme levels in nicotiana // Phytopathol. 2008. V. 98. P. 1242–1247. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-11-1242>
11. O'Brien J.A., Benková E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses // Front Plant Sci. 2013. V. 4. P. 451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00451>
12. Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schavio F. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants // Planta. 2003. V. 216. P. 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0862-x>

13. Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C.M., Hwang I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 7. P. 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.003>
14. Choi J., Huh S.U., Kojima M., Sakakibara H., Paek K.H., Hwang I. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis* // *Dev. Cell.* 2010. V. 19. P. 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.011>
15. 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. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0740-2>
16. Kunikowska A., Byczkowska A., Doniak M., Kazmierczak A. Cytokinins re'sume': their signaling and role in programmed cell death in plants // *Plant Cell Rep.* 2013. V. 32. P. 771–780. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1436-z>
17. Liu Y., He C. Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 995–1007. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1950-x>
18. 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* June. 2011. V. 16 (6). P. 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
19. Mlejnek, P., Doležel, P., and Procházka, S. Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells // *Plant Cell Environ.* 2003. V. 26. P. 1723–1735. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01090.x>
20. 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. 1353. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01353>
21. Pogány M., Koehl J., Heiser I., Elstner E.F., Barna B. Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to *Tobacco necrosis virus* and confers tolerance to oxidative stress // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004. V. 65. P. 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.10.006>
22. Wang Y., Shen W., Chan Z., Wu Y. Endogenous cytokinin overproduction modulates ROS homeostasis and decreases salt stress resistance in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. 1004. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01004>
23. 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. <https://doi.org/10.1134/S0003683811050176>