

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

## Влияние хозяин-специфичного токсина SnTOX3 патогена *Stagonospora nodorum* на сигнальный путь этилена и редокс-статус растений мягкой яровой пшеницы

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

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

 e-mail: veselova75@rambler.ru

Важнейший фактор вирулентности возбудителя септориоза пшеницы *Stagonospora nodorum* Berk. – многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба (SnTox), взаимодействующие с продуктами генов восприимчивости хозяина (*Snn*). Взаимодействия SnTox-Snn осуществляются по типу ген-на-ген и ведут к развитию болезни. В настоящей работе изучено взаимодействие SnTox3-Snn3, результатом которого является развитие инфекции на листьях с образованием обширных зон поражения. Предположительно, механизм действия SnTox3 связан с регуляцией редокс-метаболизма и влиянием на синтез этилена у растений пшеницы, однако молекулярные механизмы до конца не раскрыты. Для характеристики взаимодействия SnTox3-Snn3 в работе были использованы изоляты *S. nodorum*, различающиеся по экспрессии гена *SnTox*: SnБ (Tox3<sup>+</sup>) и Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>), и два сорта мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), контрастные по устойчивости к возбудителю септориоза и различающиеся по аллельному составу локуса восприимчивости *Snn3-B1*: Казахстанская 10 (восприимчивая) и Омская 35 (устойчивая). Проведена сравнительная оценка характера транскрипционной активности генов биосинтеза (*TaACS1*, *TaACO*) и сигнального пути этилена (*TaEIL1*, *TaERF1*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и оценен редокс-статус растений пшеницы, инфицированных различными изолятами *S. nodorum* с помощью спектрофотометрических методов. Показано, что индукция биосинтеза и сигнального пути этилена происходила в результате взаимодействия по типу ген-на-ген *Snn3-B1*-SnTox3. Результаты оценки редокс-статуса растений показали, что этилен подавлял накопление пероксида водорода в чувствительных к SnTox3 генотипах за счет регуляции работы различных ферментов про-/антиоксидантной системы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях. Таким образом, полученные результаты предполагают, что НЭ SnTox3 влиял на биосинтез и сигнальный путь этилена с целью регуляции редокс-метаболизма инфицированных растений пшеницы для успешной колонизации хозяина на начальных этапах инфицирования, что впоследствии приводило к обширным зонам поражения за счет быстрого размножения патогена. Ключевые слова: *Stagonospora nodorum*; *Triticum aestivum*; полимеразная цепная реакция; полимеразная цепная реакция в реальном времени; некротрофный эффектор; этилен; редокс-метаболизм; взаимодействие ген-на-ген; неспецифическая устойчивость.

**Для цитирования:** Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Румянцев С.Д., Максимов И.В. Влияние хозяин-специфичного токсина SnTOX3 патогена *Stagonospora nodorum* на сигнальный путь этилена и редокс-статус растений мягкой яровой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):856-864. DOI 10.18699/VJ19.559

## Effect of the host-specific toxin SnTOX3 from *Stagonospora nodorum* on ethylene signaling pathway regulation and redox-state in common wheat

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

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

 e-mail: veselova75@rambler.ru

The fungus *Stagonospora nodorum* is the causative agent of Septoria nodorum blotch (SNB) of wheat. The most important factors of *Stagonospora nodorum* virulence include numerous fungal necrotrophic effectors (NEs) encoded by *SnTox* genes. They interact with the matching products of host susceptibility genes (*Snn*). SnTox-Snn interactions are mirror images of classical gene-for-gene interactions and lead to the development of disease. We have studied the SnTox3-Snn3 interaction, resulting in the development of infection on leaves and formation of extensive lesions. The mechanism of SnTox3 action is likely to be linked to the regulation of redox metabolism and the influence on ethylene synthesis in the wheat plants, although the molecular mechanisms are not fully unveiled. To characterize the SnTox3-Snn3 interaction, we used *S. nodorum* isolates differing in the expression of the NEs genes *SnTox3* (SnB

(Tox3<sup>+</sup>, Sn4VD (Tox3<sup>-</sup>)) and two soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, contrasting in resistance to the SNB agent and differing in the allelic composition of the susceptibility locus *Snn3-B1*: Kazakhstanskaya 10 (susceptible) and Omskaya 35 (resistant). We carried out a comparative assessment of the transcriptional activity patterns of genes responsible for ethylene biosynthesis (*TaACS1*, *TaACO*) and signaling pathway (*TaEIL1*, *TaERF1*) by real-time PCR and estimated the redox state of wheat plants infected with different isolates of *S. nodorum* by spectrometry. The induction of ethylene biosynthesis and signaling has been shown to result from gene-for-gene interaction between *Snn3-B1* and SnTox3. The results of plant redox status estimation showed that ethylene inhibited accumulation of hydrogen peroxide in SnTox3-sensitive genotypes by regulating the operation of various pro-/antioxidant enzymes at the transcriptional and posttranslational levels. Our results suggest that NE SnTox3 influences ethylene biosynthesis and signaling, thereby regulating redox metabolism in infected wheat plants as necessary for successful host colonization at the initial phases of infection, which ultimately leads to extensive lesions due to fast pathogen reproduction. Key words: *Stagonospora nodorum*; *Triticum aestivum*; polymerase chain reaction; real-time polymerase chain reaction; necrotrophic effectors; ethylene; redox-metabolism; gene-for-gene interaction; nonspecific resistance.

**For citation:** Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Rummyantsev S.D., Maksimov I.V. Effect of the host-specific toxin SnTOX3 from *Stagonospora nodorum* on ethylene signaling pathway regulation and redox-state in common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(7):856-864. DOI 10.18699/VJ19.559 (in Russian)

## Введение

Главная сельскохозяйственная культура – пшеница – в последние десятилетия стала подвергаться поражению возбудителями различного рода листовых пятнистостей, среди которых одно из первых мест занимают возбудители септориоза. *Stagonospora nodorum* Berk., возбудитель септориоза пшеницы, наносит значительный ущерб растениям и приводит к потерям урожая, которые могут достигать 30 % (Bertucci et al., 2014). Исследования септориоза интенсивно ведутся последние три десятилетия, но до сих пор нет четкого понимания механизмов, лежащих в основе устойчивости/восприимчивости пшеницы к инфекции, с одной стороны, и вирулентности патогена, с другой (Fraaije et al., 2002; Bertucci et al., 2014; Winterberg et al., 2014; Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

Недавно было показано, что важнейший фактор вирулентности *S. nodorum* – многочисленные некротрофные эффекторы (НЭ) гриба или токсины, специфические для хозяев (host-specific toxins) (Phan et al., 2016; McDonald, Solomon, 2018). Взаимодействие в патосистеме пшеница–*S. nodorum* осуществляется по типу ген-на-ген (McDonald, Solomon, 2018). Эти взаимоотношения выражаются в том, что продукты генов вирулентности патогена (=хозяин-специфичные токсины) (SnTox) при взаимодействии с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*) вызывают совместимость, т.е. развитие болезни (Phan et al., 2016). Эффект каждого взаимодействия SnTox-*Snn* является неполным и дополняется другими взаимодействиями. В настоящее время описано восемь взаимодействий SnTox-*Snn*, при этом у патогена клонировано только три гена, кодирующих НЭ (SnToxA, SnTox1, SnTox3), а у пшеницы клонировано только два гена восприимчивости (*Tsn1*, *Snn1*) (Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

Генетика взаимоотношений пшеницы и *S. nodorum* очень сложная, расо-специфичная устойчивость объясняет только около 40 % фенотипических проявлений (Shi et al., 2016). Кроме того, относительно недавно, в последние четыре года, было показано, что некоторые из охарактеризованных взаимодействий SnTox-*Snn*, вызывающие восприимчивость, направлены на манипулирование неспецифическими путями защиты растения, связан-

ными с редокс-метаболизмом, вторичным метаболизмом и защитными белками (Winterberg et al., 2014; Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

Взаимодействие *Snn3-B1*-SnTox3 играет значительную роль в развитии септориоза (Shi et al., 2016; McDonald, Solomon, 2018). Предполагается, что в результате этого взаимодействия развивается инфекция на листьях с образованием обширных зон поражения, что связано с влиянием SnTox3 на генерацию активных форм кислорода (АФК), к сожалению, механизм действия эффектора неизвестен (Winterberg et al., 2014). Однако недавно было показано, что SnTox3 индуцирует накопление метионина и синтез этилена у растений пшеницы уже через 24 ч после инфицирования (Winterberg et al., 2014).

Известно, что одна из наиболее ранних ответных реакций растений на внедрение патогена – локальная генерация АФК, играющая важную роль в развитии системной устойчивости (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 (Barna et al., 2012). Среди них этилен, роль которого при биотическом стрессе неоднозначна и зависит от типа патогена и вида растения (Vleesschaever et al., 2010; Barna et al., 2012). Ранее нами была показана отрицательная роль этилена в развитии устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum* (Веселова и др., 2016). К сожалению, механизмы воздействия фитогормонов, в том числе и этилена, на процессы генерации АФК при биотическом стрессе изучены недостаточно (Barna et al., 2012).

Целью нашей работы была сравнительная оценка характера транскрипционной активности генов биосинтеза и сигнального пути этилена и редокс-статуса растений пшеницы, инфицированных изолятами *S. nodorum*, отличающимися по экспрессии НЭ SnTox3.

## Материалы и методы

Объектом исследования служили два сорта мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., контрастные по устойчиво-

сти к *S. nodorum* Berk.: Казахская 10 (Каз10) (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый), а также два изолята гриба *S. nodorum*: Sn4ВД (Республика Беларусь) и SnБ (Республика Башкортостан). Грибы культивировали на картофельно-глюкозном агаре. Растения выращивали на водной культуре (10 % раствор питательной среды Хогланда–Арнона) в климатостате КС-200 СПУ (Россия) с условиями культивирования: температура 20/24 °С (ночь/день), 16 ч светопериод, интенсивность света 146 Вт/м<sup>2</sup> ФАР (лампы Osram L 36W/77) в течение 7 сут. Проростковую устойчивость сортов оценивали методом газончиков, как описано ранее (Веселова и др., 2016). Устойчивость/восприимчивость сорта определяли по площади поражения листа через семь дней после инокуляции изолятами *S. nodorum*. Развитие симптомов септориоза на листьях пшеницы фиксировали посредством фотоаппарата SP-800UZ Image Stabilization (Olympus, Индонезия), площадь зоны поражения измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html) и выражали в процентах от общей площади листа. Кроме того, оценку степени поражения проводили по международной шкале, которая также предусматривает учет степени пораженности различных органов растений: RR (0–5 %) – сорта с очень высокой и высокой устойчивостью; R (до 10–15 %) – устойчивые сорта; M (до 25 %) – слабовосприимчивые сорта; S (до 40–65 %) – восприимчивые сорта; SS (до 90–100 %) – сорта с очень высокой и высокой восприимчивостью.

Выделение ДНК из проростков пшеницы и семидневной культуры гриба выполняли с помощью фенольного детергентного метода (Маниатис и др., 1984). Идентификацию гена *SnTox3* (FJ823644) у изолятов *S. nodorum* осуществляли посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными праймерами (5'→3'): F–CGAGCTGATATCCCGTTTGA; R–GGGACAGTGACAATAGGTAAGG (Winterberg et al., 2014), в качестве внутреннего контроля на присутствие грибной ДНК были праймеры на ген «домашнего хозяйства» тубулин (S56922) (Fraaije et al., 2002). Экспрессию гена *SnTox3* у разных изолятов *S. nodorum* во время инокуляции растений пшеницы анализировали с теми же праймерами методом полуколичественной ПЦР. Тотальную РНК из инфицированных изолятами *S. nodorum* растений пшеницы восприимчивого сорта Каз10 и устойчивого сорта Ом35, зафиксированных в жидком азоте, выделяли с использованием реагента Trizol, согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия). Для получения кДНК на основе РНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика (Синтол, Россия). На основе кДНК осуществляли ПЦР в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-Терцик (ДНК-Технология, Россия).

Аллельное состояние локуса *Snn3-B1* определяли в сортах методом ПЦР с праймерами к микросателлитным маркерам *Xcfd20* и *Xgwm234* (Bertucci et al., 2014). Состав праймеров *Xcfd20* (5'→3'): F–TGATGGGAAGGTAATGGGAG; R–ATCCAGTTCTCGTCCAAAGC; состав праймеров *Xgwm234* (5'→3'): F–GAGTCCTGATGTGAAGCTGTTG; R–СТСАТТGGGGTGTGTACGTG (Bertucci et al., 2014). Продукты ПЦР во всех случаях разделяли в 7 % ПААГ,

окрашенном бромистым этидием, с использованием маркерной ДНК Gene Ruler DNA Ladder (Fermentas). Гели фотографировали с помощью документирующей системы GelDoc XR (Bio-Rad).

Для выявления влияния *SnTox3* на биосинтез и сигнальный путь этилена часть проростков пшеницы за 24 ч до инокуляции различными изолятами *S. nodorum* обрабатывали 1.5 мМ раствором этефона – ЭТ, 2-хлорэтилфосфоновой кислотой, химическим предшественником этилена (Sigma, Германия) (Веселова и др., 2016), а часть – 50 мкМ раствором аминоксиквинил глицина – ингибитора синтеза этилена (АВГ) (Sigma). После обработки сосуды закрывали и помещали в темноту. Содержание перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и активности ферментов пероксидазы (ПО), оксалатоксидазы (ОО) и каталазы (КАТ) через 24 и 72 ч после инфицирования изолятами *S. nodorum* измеряли, как описано ранее (Веселова и др., 2018).

Выделение тотальной РНК из контрольных и опытных листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, через 24 ч после инфицирования *S. nodorum* проводили с помощью реагента Trizol, согласно протоколу фирмы-поставщика (Sigma, Германия). Экспрессию генов оксидоредуктаз и генов биосинтеза и сигнального пути этилена анализировали методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad, США) с применением интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Для нормирования результатов экспрессии исследуемых генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессирующегося белка ингибитора РНКаз (RNase L inhibitor-like) *RLI* (AY059462) (Gimenez et al., 2011). Изменения в экспрессии интересующего гена определяли по вычислению уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения iCycler iQ5 Real-Time Detection System Software (BioRad, США). ПЦР в режиме реального времени проводили с помощью праймеров к генам, кодирующим НАДФН-оксидазу (*TaRboh*, AY561153) (Giovannini et al., 2006), супероксиддисмутазу (СОД) (*TaSod*, JX398977.1) (Giovannini et al., 2006), анионную пероксидазу (*TaPrx*, TC151917) (Максимов и др., 2014), аминокicloпропанкарбоксилатсинтазу (АЦК-синтазу – *TaACS1*, U35779) (Subramaniam et al., 1996), аминокicloпропанкарбоксилатоксидазу (АЦК-оксидазу – *TaACO*, KF900072) состав праймеров (5'→3'): F–TGTCATCGCCTCCTTCTA; R–CGAACA CGAACCTTGGGTAT; транскрипционный фактор этиленового сигнального пути EIN3-LIKE1 (ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 (EIL1) – *TaEIL1*, KU030837, ортолог гена арабидопсиса *AtEIN3*) (Liu et al., 2016) и транскрипционный фактор первичного ответа на этилен ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 – *TaERF1*, EF583940) (Dong et al., 2010).

Все эксперименты повторяли три раза и выполняли в трех биологических и трех аналитических повторностях (общее  $n = 9$ ). Средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам, приведены на рис. 1–3 и в табл. 1–3. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента при доверительном уровне  $p \leq 0.05$ .

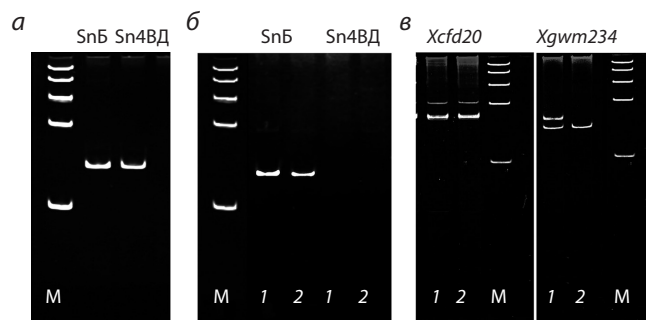
## Результаты

**Ген *SnTox3* и локус восприимчивости *Snn3-B1*.** Два изолята *S. nodorum* тестировали на наличие/отсутствие гена *SnTox3* методом ПЦР. Ген *SnTox3* обнаружен у обоих изолятов, SnБ и Sn4ВД (рис. 1, а).

Анализ транскрипционной активности этого гена НЭ показал отсутствие экспрессии у авирулентного изолята Sn4ВД и накопление транскриптов гена *SnTox3* после инокуляции как восприимчивого сорта Каз10, так и устойчивого сорта Ом35 вирулентным изолятом SnБ (см. рис. 1, б). Проведена ПЦР-диагностика аллельного состояния локуса *Snn3-B1* у двух сортов мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.): Каз10 и Ом35. Для этого были использованы специфичные праймеры к двум микросателлитным маркерам, *Xcfd20* и *Xgwm234*, фланкирующим локус *Snn3-B1* (Bertucci et al., 2014; Shi et al., 2016). Нуль-аллель у этих сортов не обнаружен. Однако сорта различались по аллельному составу *Snn3-B1* локуса (см. рис. 1, в). Так, маркер *Xcfd20* был представлен двумя аллелями у обоих сортов, а маркер *Xgwm234* у устойчивого сорта Ом35 – одним аллелем, а у восприимчивого сорта Каз10 – двумя аллелями (см. рис. 1, в).

**Комбинации сорт/изолят.** Ранее было показано, что из нескольких сортов мягкой яровой пшеницы наибольшую устойчивость к гемибитрофному грибу *S. nodorum* имела пшеница сорта Омская 35, а наименьшую – пшеница сорта Казахстанская 10 (Веселова и др., 2016). Эти работы выполнены с применением изолята SnБ. Были изучены следующие комбинации сорт/изолят: Каз10/SnБ (S/Tox3<sup>+</sup>), Каз10/Sn4ВД (S/Tox3<sup>-</sup>), Ом35/SnБ (I/Tox3<sup>+</sup>), Ом35/Sn4ВД (I/Tox3<sup>-</sup>), где S – чувствительный к Tox3 сорт, I – нечувствительный к Tox3 сорт, Tox3<sup>+</sup> – изолят, экспрессирующий ген токсина, Tox3<sup>-</sup> – изолят, не экспрессирующий ген токсина.

В комбинации сорт/изолят S/Tox3<sup>+</sup> (Каз10/SnБ) проявлялась полная реакция совместимости, инфицирование патогеном приводило к образованию больших зон поражения, до 80 % от общей площади листа (табл. 3). В остальных комбинациях сорт/изолят (Ом35/SnБ, Каз10/Sn4ВД, Ом35/Sn4ВД) была реакция устойчивости (см. табл. 1). Предварительная обработка ЭТ растений, как чувствительных к Tox3 (Каз10), так и не чувствительных к Tox3 (Ом35), увеличивала их восприимчивость только



**Рис. 1.** Идентификация гена *SnTox3* у двух изолятов *S. nodorum*: SnБ и Sn4ВД (а); анализ транскрипционной активности гена *SnTox3* при инфицировании двух сортов мягкой яровой пшеницы (б), идентификация аллелей локуса *Snn3-B1* у этих сортов с помощью праймеров к SSR-маркерам (*Xcfd20* и *Xgwm234*) методом ПЦР (в).

1 – Казахстанская 10; 2 – Омская 35. М – ДНК-маркеры, 100–1000 п.н.

к изоляту SnБ (Tox3<sup>+</sup>) и не влияла на восприимчивость к изоляту Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>) (см. табл. 1). Предварительная обработка растений, не чувствительных к Tox3 (Ом35), АВГ, не воздействовала на их реакцию устойчивости, независимо от изолята, которым инокулировали растения: SnБ (Tox3<sup>+</sup>) или Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>) (см. табл. 1). Обработка чувствительных к Tox3 (Каз10) растений ингибитором синтеза этилена АВГ увеличивала их устойчивость к изоляту SnБ и не изменяла устойчивость к изоляту Sn4ВД (см. табл. 1).

**Биосинтез и сигнальный путь этилена в инфицированных растениях.** Анализ транскрипционной активности генов биосинтеза (АЦК-синтазы – *TaACS* и АЦК-оксидазы – *TaACO*) и сигнального пути этилена (*TaEIL1*, *TaERF1*) показал повышение содержания мРНК этих генов в реакции совместимости, развивавшейся у восприимчивых растений (Каз10/SnБ) и растений, обработанных ЭТ (Каз10/SnБ+ЭТ, Ом35/SnБ+ЭТ) (табл. 2). У чувствительных к Tox3 растений (Каз10) содержание транскриптов генов биосинтеза этилена и гена транскрипционного фактора первичного ответа на этилен *TaERF1* повышалось примерно в 3–4 раза, а содержание транскриптов гена главного регуляторного фактора этиленового сигнального пути *TaEIL1* – в 14–18 раз через 24 ч после инфицирования

**Таблица 1.** Реакция на инокуляцию изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3<sup>+</sup>) и Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>) двух сортов пшеницы с различным аллельным состоянием локуса *Snn3-B1*

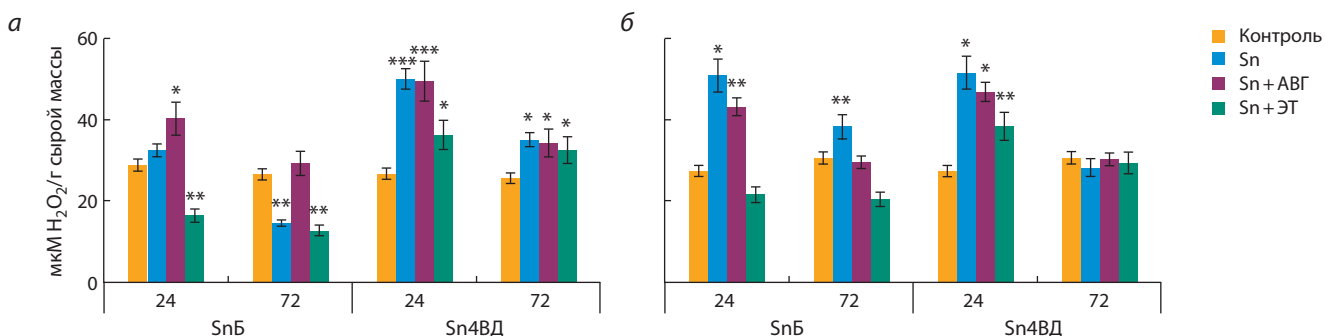
Казахстанская 10			Омская 35		
Сорт/изолят	Зона поражения, %	Группа*	Сорт/изолят	Зона поражения, %	Группа*
Каз10/SnБ	80.0 ± 3.0	SS	Ом35/SnБ	10.9 ± 2.5	R
Каз10/SnБ+ЭТ**	94.9 ± 2.3	SS	Ом35/SnБ+ЭТ	57.2 ± 2.6	S
Каз10/SnБ+АВГ**	18.6 ± 2.2	M	Ом35/SnБ+АВГ	9.1 ± 1.9	R
Каз10/Sn4ВД	8.4 ± 2.2	R	Ом35/Sn4ВД	1.6 ± 0.5	RR
Каз10/Sn4ВД+ЭТ	8.1 ± 1.8	R	Ом35/Sn4ВД+ЭТ	1.9 ± 1.1	RR
Каз10/Sn4ВД+АВГ	6.5 ± 2.6	R	Ом35/Sn4ВД+АВГ	1.6 ± 0.5	RR

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

\*\* За 24 ч до инокуляции *S. nodorum* растения пшеницы были обработаны или этефоном (ЭТ), или ингибитором синтеза этилена (АВГ).

**Таблица 2.** Результаты транскрипционного анализа генов биосинтеза и сигнального пути этилена у двух контрастных по устойчивости сортов пшеницы, Казахстанская 10 и Омская 35, через 24 ч после инфицирования изолятами *S. nodorum*

Вариант обработки	Ген			
	<i>TaACS</i>	<i>TaACO</i>	<i>TaEIL1</i>	<i>TaERF1</i>
Казахстанская 10				
Каз10	100	100	100	100
Каз10/SnБ	311 ± 60	237 ± 30	1400 ± 200	356 ± 70
Каз10/SnБ+АВГ	143 ± 23	77 ± 3	389 ± 0	100 ± 20
Каз10/SnБ+ЭТ	350 ± 34	223 ± 10	1810 ± 270	450 ± 34
Каз10/Sn4ВД	128 ± 28	110 ± 10	322 ± 10	102 ± 10
Каз10/Sn4ВД+АВГ	117 ± 9	63 ± 15	390 ± 60	146 ± 10
Каз10/Sn4ВД+ЭТ	121 ± 10	65 ± 6	375 ± 20	107 ± 7
Омская 35				
Ом35	100	100	100	100
Ом35/SnБ	86 ± 10	47 ± 10	77 ± 6	92 ± 10
Ом35/SnБ+ЭТ	169 ± 8	190 ± 15	325 ± 54	262 ± 35
Ом35/SnБ+АВГ	102 ± 20	54 ± 10	115 ± 20	178 ± 40
Ом35/Sn4ВД	97 ± 10	143 ± 10	133 ± 20	54 ± 2
Ом35/Sn4ВД+ЭТ	125 ± 6	95 ± 7	156 ± 10	199 ± 2
Ом35/Sn4ВД+АВГ	108 ± 20	206 ± 20	129 ± 20	134 ± 5



**Рис. 2.** Содержание перекиси водорода в листьях двух сортов, Казахстанская 10 (а) и Омская 35 (б), через 24 и 72 ч после инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3<sup>+</sup>) и Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>).

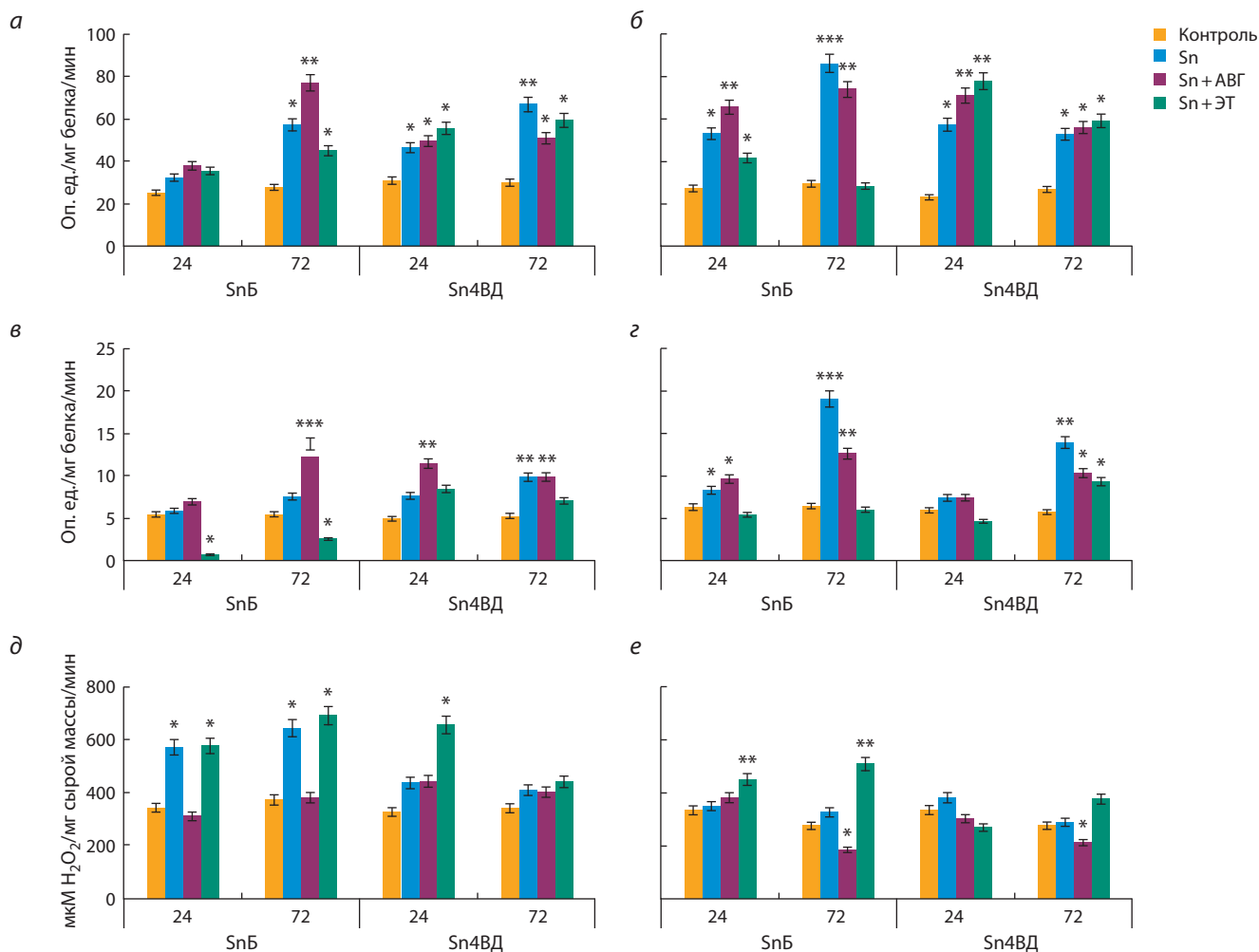
Контроль – неинфицированные растения; Sn – инфицирование изолятами *S. nodorum*; Sn + АВГ – инфицирование + обработка АВГ; Sn + ЭТ – инфицирование + обработка ЭТ. Звездочки показывают статистически достоверные отличия от контрольной группы, разное количество звездочек – статистически достоверные различия между вариантами при  $p \leq 0.05$ .

(см. табл. 2). Однако у нечувствительных к Tox3 растений в комбинации сорт/изолят Ом35/SnБ+ЭТ накопление мРНК генов биосинтеза и сигнального пути этилена было ниже, чем в остальных комбинациях сорт/изолят, приводивших к реакции совместимости (см. табл. 2).

При развитии реакции несовместимости у нечувствительных к Tox3 растений в комбинациях сорт/изолят Ом35/SnБ, Ом35/Sn4ВД, независимо от обработок ЭТ и АВГ, обнаружено подавление или отсутствие накопления транскриптов генов биосинтеза и сигнального пути этилена (см. табл. 2). У чувствительных к Tox3 растений при развитии реакции несовместимости как при инокуляции изолятом Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>) (Каз10/Sn4ВД, Каз10/Sn4ВД+АВГ, Каз10/Sn4ВД+ЭТ), так и при инокуляции изолятом SnБ (Tox3<sup>+</sup>) (Каз10/SnБ+АВГ) обнаружено

отсутствие накопления мРНК генов *ACS*, *ACO*, *ERF1* и небольшое накопление мРНК гена *TaEIL1* по сравнению с контрольными растениями (см. табл. 2).

**Редокс-статус инфицированных растений.** С целью определения роли SnTox3 в регуляции редокс-метаболизма растения-хозяина с помощью влияния на биосинтез и сигнальный путь этилена при подавлении защитных реакций в инфицированных растениях были изучены компоненты про-/антиоксидантной системы. Реакция совместимости как у восприимчивых растений (Каз10/SnБ), так и у растений, обработанных ЭТ (Каз10/SnБ+ЭТ, Ом35/SnБ+ЭТ), характеризовалась снижением содержания  $H_2O_2$  (рис. 2, а, б) за счет повышения активности каталазы (КАТ) (рис. 3, д, е), снижения активности ПО (см. рис. 3, а, б) и ОО (см. рис. 3, в, з) и отсутствия на-



**Рис. 3.** Активность пероксидазы (а, б); оксалатоксидазы (в, г) и каталазы (д, е) в листьях двух сортов, Казахстанская 10 (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е), через 24 и 72 ч после инокуляции изолятами *S. nodorum* SnБ (Tox3<sup>+</sup>) и Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>).

Обозначения см. на рис. 2.

**Таблица 3.** Результаты транскрипционного анализа генов оксидоредуктаз у двух контрастных по устойчивости сортов пшеницы, Казахстанская 10 и Омская 35, через 24 ч после инфицирования изолятами *S. nodorum*

Вариант обработки*	Изолят патогена					
	SnБ (Tox3 <sup>+</sup> )			Sn4ВД (Tox3 <sup>-</sup> )		
	Ген					
	<i>TaRboh</i>	<i>TaSod</i>	<i>TaPrx</i>	<i>TaRboh</i>	<i>TaSod</i>	<i>TaPrx</i>
Казахстанская 10						
Контроль	100	100	100	100	100	100
Sn	78 ± 3	88 ± 10	71 ± 3	160 ± 21	144 ± 8	223 ± 20
Sn+ABГ	111 ± 20	169 ± 20	163 ± 30	145 ± 40	110 ± 3	210 ± 50
Sn+ЭТ	15 ± 1	81 ± 7	104 ± 20	152 ± 37	114 ± 2	251 ± 50
Омская 35						
Контроль	100	100	100	100	100	100
Sn	126 ± 10	264 ± 20	365 ± 26	160 ± 20	196 ± 9	264 ± 20
Sn+ABГ	136 ± 20	242 ± 40	311 ± 31	129 ± 10	178 ± 18	170 ± 20
Sn+ЭТ	83 ± 10	118 ± 9	136 ± 15	132 ± 30	159 ± 10	181 ± 34

\* Обозначения вариантов обработок см. на рис. 2.

копления транскриптов генов, кодирующих оксидоредуктазы НАДФН-оксидазу (*TaRbohF*), СОД (*TaSod*) и ПО (*TaPrx*) (табл. 3). Однако у нечувствительных к Tox3 растений в комбинации сорт/изолят Ом35/SnБ+ЭТ реакция подавления окислительного взрыва была выражена слабее, чем в остальных комбинациях, приводивших к совместимости (см. рис. 2, 3, табл. 3).

Для реакции несовместимости в комбинациях сорт/изолят Ом35/SnБ, Ом35/Sn4ВД, Каз10/Sn4ВД, а также растений, обработанных АВГ, во всех комбинациях было характерно повышение генерации  $H_2O_2$  (см. рис. 2, а, б) за счет снижения или отсутствия повышения активности КАТ, а также резкого увеличения активности ПО и ОО (см. рис. 3) и накопления транскриптов генов *TaRbohF*, *TaSod* и *TaPrx* на раннем этапе инфицирования (24 ч) (см. табл. 3), что приводило к развитию СВЧ-реакции и остановке роста патогена (см. табл. 1). Обработка ЭТ не влияла на характер ответной реакции как чувствительных, так и нечувствительных к Tox3 растений, инокулированных изолятом Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>) (см. рис. 2, 3, табл. 3).

## Обсуждение

В настоящее время установлено, что грибок *S. nodorum* продуцирует восемь НЭ, отвечающих за вирулентность изолятов патогена (Phan et al., 2016; Shi et al., 2016). Токсины SnToxA, SnTox1, SnTox3 считаются основными НЭ, в большей степени определяющими вирулентность штаммов и изолятов патогена, что было показано в работах с мутантными штаммами *S. nodorum* и различными линиями пшеницы, чувствительными и не чувствительными к данным эффекторам (Phan et al., 2016; Shi et al., 2016).

В нашей работе у вирулентного изолята SnБ выявлена высокая транскрипционная активность гена *SnTox3* (см. рис. 1, б). У авирулентного изолята Sn4ВД обнаружено отсутствие экспрессии этого гена (см. рис. 1, б), что указывает на инактивацию НЭ SnTox3 у данного изолята (Tan, Oliver, 2017). Изучено два контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сорта мягкой яровой пшеницы, отличавшихся аллельным составом *Snn3-B1* локуса (см. рис. 1, в), что может свидетельствовать об их чувствительности и нечувствительности к НЭ SnTox3 (Shi et al., 2016). В работе G. Shi с коллегами (2016) две линии пшеницы, BG220 и Sumai3, несущие различные аллели локуса *Snn3-B1*, показали различную степень чувствительности к НЭ SnTox3). Несмотря на то, что у сорта Ом35 нуль-аллель к *Snn3-B1* не был обнаружен, сорт был нечувствителен или слабочувствителен к SnTox3. Это может говорить о наличии большой делеции в локусе между маркерами *Xcfd20* и *Xgwm234*, что совпадает с литературными данными (Shi et al., 2016). Так, из 17 мутантов Sumai3, не чувствительных к SnTox3, только у 5 был обнаружен нуль-аллель *Snn3-B1*: у двух линий по трем микросателлитным маркерам: *Xgwm234*, *Xmag705* и *Xcfd306*, у трех линий по одному – *Xcfd306* (Shi et al., 2016). Таким образом, при использовании двух изолятов, *S. nodorum* SnБ (Tox3<sup>+</sup>) и Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>), и двух сортов мягкой яровой пшеницы с разными генотипами были подобраны четыре различные комбинации сорт/изолят для изучения роли SnTox3 в развитии инфекции.

С одной стороны, основной функцией НЭ SnTox3 считается образование зон поражения на листьях чувствительных генотипов пшеницы с помощью «захвата» неспецифических сигнальных путей защиты хозяина и манипулирования ими для своего роста и развития (Winterberg et al., 2014). С другой стороны, показано, что SnTox3 увеличивает синтез этилена в инфицированных растениях (Winterberg et al., 2014).

Для выявления роли SnTox3 в регуляции биосинтеза и сигнального пути этилена часть растений пшеницы двух сортов – Каз10 и Ом35 – была обработана химическим предшественником этилена ЭТ и ингибитором биосинтеза этилена АВГ. Наши результаты показали, что увеличение восприимчивости растений пшеницы к *S. nodorum* после обработки ЭТ и повышение устойчивости после обработки АВГ зависели от генотипа изолята патогена SnБ (Tox3<sup>+</sup>) или Sn4ВД (Tox3<sup>-</sup>) (см. табл. 1). Это предполагает, что НЭ SnTox3, действуя как фактор вирулентности, влиял на защитную систему растений посредством регуляции биосинтеза и сигнального пути этилена. Синтез этилена некоторыми патогенами тесно связан с их вирулентностью (Ma K.-W., Ma W., 2016). Например, эффектор патогенной бактерии *Xanthomonas euvesicatoria* XopD манипулирует этиленовым сигнальным путем, влияя на транскрипционный фактор ERF4 (Ma K.-W., Ma W., 2016), а некротрофный грибок *Cochliobolus miyabeanus* индуцирует сигнальный путь этилена в рисе, продуцируя и секретируя этилен как эффектор для ускорения инфекционного процесса (Shen et al., 2018).

Анализ транскрипционной активности генов биосинтеза и сигнального пути этилена в нашей работе также показал зависимость активации генов этого пути в инфицированных растениях от генотипа изолята патогена и чувствительности генотипа пшеницы к НЭ SnTox3 (см. табл. 2). Эти результаты предполагают, что индукция биосинтеза и сигнального пути этилена происходит в результате взаимодействия по типу ген-на-ген *Snn3-B1*-SnTox3.

Интересно, что у нечувствительных к SnTox3 растений в комбинации сорт/изолят Ом35/SnБ+ЭТ обработка ЭТ увеличивала чувствительность растений к этому НЭ (см. табл. 3). Такая реакция могла быть результатом мутации в генах, регулируемых взаимодействием *Snn3-B1*-SnTox3 (Shi et al., 2016). Однако активация генов биосинтеза и сигнального пути этилена в комбинации Ом35/SnБ+ЭТ была слабее, чем при совместимом взаимодействии чувствительных к SnTox3 растений (Каз10/SnБ, Каз10/SnБ+ЭТ) (см. табл. 2). Это предполагает, что у устойчивых растений имеется механизм активного подавления биосинтеза и сигнального пути этилена для индукции защитных реакций, которые ингибируют этилен. Например, этилен ингибировал биосинтез салициловой кислоты (СК) и подавлял экспрессию маркерных генов СК-сигнального пути, *PR-1* и *PR-2*, в растениях арабидопсиса, инфицированных *Pseudomonas syringae* (Chen et al., 2009), так же, как в растениях пшеницы, инфицированных *S. nodorum* (Веселова и др., 2016). А кремний блокировал продукцию этилена патогеном *C. miyabeanus*, что приводило к повышению устойчивости растений риса (Shen et al., 2018). Таким образом, полученные результаты доказывают влияние SnTox3 на биосинтез и сигнальный путь этилена

при взаимодействии по типу ген-на-ген *Snn3-B1-SnTox3* с целью подавления защитных реакций и успешной колонизации растений пшеницы.

Ранее были сообщения, что этилен обеспечивал благоприятные условия для проникновения и развития *S. nodorum* в тканях растений пшеницы на начальном этапе инфицирования за счет регуляции редокс-метаболизма и снижения генерации  $H_2O_2$  (Веселова и др., 2016, 2018). Напротив, накопление АФК в растениях пшеницы на начальной стадии инфицирования патогеном *S. nodorum* определяло устойчивость сорта, индуцируя экспрессию генов защитных белков (Веселова и др., 2016, 2018). Изменение редокс-статуса инфицированных растений пшеницы в наших экспериментах полностью зависело от активации или ингибирования биосинтеза и сигнального пути этилена, причем это влияние было обусловлено взаимодействием ген-на-ген *Snn3-B1-SnTox3* (см. рис. 2, 3). Наши результаты показали, что этилен подавлял накопление  $H_2O_2$  в чувствительных к SnTox3 растениях за счет повышения активности КАТ, снижения активности ПО и ОО и уменьшения содержания транскриптов генов, кодирующих оксидоредуктазы, НАДФН-оксидазу и СОД, что совпадает с данными литературы (Golemic et al., 2014; Ma et al., 2017) и результатами, полученными нами ранее (Веселова и др., 2018).

Показано, что НЭ SnTox3 регулирует гены, связанные с редокс-метаболизмом, и принимает участие в образовании некрозов (Winterberg et al., 2014), однако вопрос о механизмах влияния SnTox3 на генерацию АФК остается открытым для изучения. Из литературы известно, что специфические эффекторы патогенов могут индуцировать СВЧ-реакцию в клетках растений, а также подавлять окислительный взрыв растений различными способами во время инфекционного процесса (Jwa, Hwang, 2017). Например, два цитоплазматических эффектора *Phytophthora sojae* взаимодействуют с каталазами для регуляции концентрации  $H_2O_2$ . Эффектор *U. maydis* Pep1 связывается с пероксидазой кукурузы POX12 *in vivo* и подавляет ранние иммунные ответы кукурузы (Hemetsberger et al., 2012).

## Заключение

Результаты нашей работы предполагают, что эффектор патогена SnTox3 влияет на биосинтез и сигнальный путь этилена с целью регуляции редокс-метаболизма инфицированных растений пшеницы для успешной колонизации хозяина на начальных этапах инфицирования, что впоследствии приводит к обширным зонам поражения за счет быстрого размножения патогена.

## Список литературы / References

Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В. Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum*. Физиол. раст. 2016;63(5):649-660.  
[Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Roles of ethylene and cytokinins in development of defense responses in *Triticum aestivum* plants infected with *Septoria nodorum*. Russ. J. Plant Physiol. 2016;63(5):609-619. DOI 10.1134/S1021443716050150.]  
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;10(4):387-399.  
[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. Biomika = Biomics. 2018;10(4):387-399. DOI 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-50. (in Russian)]  
Максимов И.В., Валеев А.Ш., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф. Влияние хитоолигосахаридов различной степени ацетилирования на активность патоген-индуцируемой анионной пероксидазы пшеницы. Прикл. биохимия и микробиология. 2014;50(1):95-100.  
[Maksimov I.V., Valeev A.Sh., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F. Effect of chitoooligosaccharides with different degrees of acetylation on the activity of wheat pathogen-inducible anionic peroxidase. Appl. Biochem. Microbiol. 2014;50(1):82-87. DOI 10.1134/S0003683813060124.]  
Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., 1984.  
[Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. (Russ. ed.: Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh. Molekulyarnoe Klonirovanie. Moscow, 1984.)]  
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;59:37-43. DOI 10.1016/j.plaphy.2012.01.014.  
Bertucci M., Brown-Guedira G., Murphy J.P., Cowger C. Genes conferring sensitivity to *Stagonospora nodorum* necrotrophic effectors in *Stagonospora nodorum* blotch-susceptible U.S. wheat cultivars. Plant Dis. 2014;98(6):746-753. DOI 10.1094/PDIS-08-13-0820-RE.  
Chen H., Xue L., Chintamanani S., Germain H., Lin H., Cui H., Cai R., Zuo J., Tang X., Li X., Guo H., Zhou J.M. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. Plant Cell. 2009;21:2527-2540. DOI 10.1105/tpc.108.065193.  
Dong N., Liu X., Lu Y., Du L., Xu H., Liu H., Xin Z., Zhang Z. Overexpression of *TaPIE1*, a pathogen-induced ERF gene of wheat, confers host-enhanced resistance to fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Funct. Integr. Genomics. 2010;10(2):215-226. DOI 10.1007/s10142-009-0157-4.  
Fraaije B.A., Lovell D.J., Baldwin S. Septoria epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics of identify mechanisms of disease escape. Plant Protect. Sci. 2002;38(2):421-424.  
Gimenez M.J., Piston F., Atienza S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. Planta. 2011;233:163-173. DOI 10.1007/s00425-010-1290-y.  
Giovannini M.P., Puthoff D.P., Nemacheck J.A., Mittapalli O., Saltzman K.D., Ohm H.W., Shukle R.H., Williams C.E. Gene-for-gene defense of wheat against the Hessian fly lacks a classical oxidative burst. Mol. Plant-Microbe Interact. 2006;19(9):1023-1033. DOI 10.1094/MPMI-19-1023.  
Golemic E., Tokarz K., Wielanek M., Niewiadomska E. A dissection of the effects of ethylene,  $H_2O_2$  and high irradiance on anti-oxidants and several genes associated with stress and senescence in tobacco leaves. J. Plant Physiol. 2014;171:269-275. DOI 10.1016/j.jplph.2013.08.007.  
Hemetsberger C., Herrberger C., Zechmann B., Hillmer M., Doehlemann G. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. PLoS Pathog. 2012;8(5):e1002684. DOI 10.1371/journal.ppat.1002684.  
Jwa N.-S., Hwang B.K. Convergent evolution of pathogen effectors toward reactive oxygen species signaling networks in plants. Front. Plant Sci. 2017;8:1687. DOI 10.3389/fpls.2017.01687.



- Liu J., Zhang T., Jia J., Sun J. The wheat mediator subunit TaMED25 interacts with the transcription factor TaEIL1 to negatively regulate disease resistance against powdery mildew. *Plant Physiol.* 2016; 170(3):1799-1816. DOI 10.1104/pp.15.01784.
- Liu Y., Shen Q., Naqvi N.I. Fungal effectors at the crossroads of phytohormone signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;46:1-6. DOI 10.1016/j.mib.2018.01.006.
- Ma K.-W., Ma W. Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Mol. Biol.* 2016;91:713-725. DOI 10.1007/s11103-016-0452-0.
- 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.* 2017;7:e.2029. DOI 10.3389/fpls.2016.02029.
- McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;46:14-18. DOI 10.1016/j.mib.2018.01.019.
- Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease. *Plant J.* 2016;87:343-354. DOI 10.1111/tpl.13203.
- Shen Q., Liu Y., Naqvi N.I. Fungal effectors at the crossroads of phytohormone signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;46:1-6. DOI 10.1016/j.mib.2018.01.006.
- Shi G., Zhang Z., Friesen T.L., Bansal U., Cloutier S., Wicker T., Rasmussen J.B., Faris J.D. Marker development, saturation mapping, and high-resolution mapping of the *Septoria nodorum* blotch susceptibility gene *Snn3-B1* in wheat. *Mol. Genet. Genomics.* 2016;291:107-119. DOI 10.1007/s00438-015-1091-x.
- Subramaniam K., Abbo S., Ueng P.P. Isolation of two differentially expressed wheat ACC synthase cDNAs and the characterization of one of their genes with root-predominant expression. *Plant Mol. Biol.* 1996;31(5):1009-1020. DOI 10.1007/BF00040719.
- Tan K.-C., Oliver R.P. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2017;13(4):e1006241. DOI 10.1371/journal.ppat.1006241.
- Vleesschaever D.D., Yinong Y., Casiana V.C., Monica H. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiol.* 2010;152:2036-2052. DOI 10.1094/MPMI-10-13-0313-IA.
- 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 defence response in susceptible wheat leaves. *BMC Plant Biol.* 2014;14:215. DOI 10.1186/s12870-014-0215-5.

---

#### ORCID ID

S.V. Veselova [orcid.org/0000-0002-1219-2383](https://orcid.org/0000-0002-1219-2383)  
G.F. Burkhanova [orcid.org/0000-0003-2346-3502](https://orcid.org/0000-0003-2346-3502)  
S.D. Romyantsev [orcid.org/0000-0002-5331-448X](https://orcid.org/0000-0002-5331-448X)  
I.V. Maksimov [orcid.org/0000-0002-5707-3265](https://orcid.org/0000-0002-5707-3265)

**Благодарности.** Работа выполнена по теме госзадания, № АААА-А16-116020350027-7, а также при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00978 с использованием оборудования ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии, Региональный центр коллективного пользования «Агидель») и уникальной научной установки «КОДИНК».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.06.2019. После доработки 08.07.2019. Принята к публикации 22.07.2019.