

## РОЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С РАСТЕНИЯМИ

© 2016 г. Т. А. ВАЛУЕВА, Б. Ц. ЗАЙЧИК,  
Н. Н. КУДРЯВЦЕВА

*Институт биохимии им. А.Н.Баха,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные  
основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Протеолитические ферменты патогенных микро-  
организмов. III. Механизм взаимодействия патогена с расте-  
нием-хозяином. IV. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Как растения, так и патогены в процессе совместной эволюции сфор-  
мировали свои стратегии, позволяющие им выжить и победить в  
совместной борьбе за существование. Поскольку большинство путей,  
используемых либо растением, либо патогенным организмом осно-  
ваны на синтезе и активации белков, в частности защитных белков  
(PR), участвующих в ответе растений на действие патогена [101, 32],  
исследования их протеомов вносят решающий вклад в понимание  
этих путей.

Так, показано, что после заражения грибом *Rhizoctonia solani* расте-  
ний риса (*Oryza sativa* L.) увеличивалось относительное содержание  
белков его листовой пластинки, которые участвовали в энер-  
гетическом обмене, фотосинтезе, защитных реакциях и обладали  
антиоксидантной активностью, при этом одновременно происходил  
процесс разворачивания молекул некоторых белков, а также их  
деградация [54]. При изучении отношений растения-хозяина и

---

*Принятые сокращения:* PR белки – защитные белки растений; Avr белки –  
авирулентные белки патогена; R гены – гены резистентности растения-хозяина;  
TTSS – система секреции третьего типа; SAR – приобретенный системный  
защитный ответ растения; HR – гиперчувствительный ответ растения, АФК –  
активные формы кислорода; CBD – целлюлозосвязывающий домен хитиназы  
растений.

*Адрес для корреспонденции:* valueva@inbi.ras.ru

патогена необходимо выяснить синтез каких растительных белков активируется в ответ на внедрение патогена, происходит ли эта активация в результате новых транскрипций/трансляций или пост-трансляционных изменений предварительно сформированных неактивных продуктов, и зависит ли она от природы патосистемы, а также, какие биоагенты влияют на защитные реакции растения.

Стенка растительной клетки представляет собой внешнюю поверхность между растением и абиотическим или биотическим окружением и обеспечивает основной защитный барьер против патогенных микроорганизмов, которые стремятся колонизировать новое растение-хозяин. Клеточная стенка растения и ее апопластическое окружение можно рассматривать как молекулярное поле битвы, на котором происходит взаимодействие между секретируемыми растительными и патогенными протеомами или секретами (коэволюция), необходимыми для нападения и защиты, как растения, так и патогена. После проникновения в растение фитопатогены образуют и секретируют избыток эффекторов, что способствует процессу успешного инфицирования. В число таких эффекторов входят и экстрацеллюлярные протеиназы, которые разрушают растительные протеиназы и их ингибиторы, формирующие защитный механизм растения, или идентифицируются как протеиназы и ингибиторы патогена, что приводит к индукции защитных реакций растения [24, 42].

Образование как протеиназ и их ингибиторов у растений, так и протеиназ фитопатогенов привело к коэволюционной диверсификации и адаптации патогена к определенному растению-хозяину. С одной стороны, успешное заражение предполагает наличие у фитопатогена механизмов, обеспечивающих его проникновение и колонизацию растения [42]. С другой – и растения обладают определенной защитной системой, позволяющей идентифицировать патоген и обезопасить себя от его действия.

Рассмотрены различные формы участия протеолитических ферментов в патогенезе. Показано, что фитопатогенные микроорганизмы продуцируют специфические эффекторы, обладающие протеолитической активностью и способные действовать на белки внутри растительной клетки.

## 1. ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Растительная клетка секретирует широкий спектр экспрессируемых как конститутивно, так и индуцибельно белков и пептидов, связанных с защитой растения [100]. Точно также, фитопатогены в процессе инфицирования секретируют наборы пептидов и белков, которые могут быть, как связаны со стенкой гифы, так и проникать в апопласт растений [80]. Эти белки относят к эффекторам, которые изменяют структуру клетки растения-хозяина или влияют на функции патогена. Среди них обычно присутствуют ферменты патогена, разрушающие структуру растительной стенки [41, 102] и супрессоры экстрацеллюлярных растительных защитных соединений [7, 41, 85]. В зависимости от характера взаимодействия растения-хозяина и патогена в случае устойчивых организмов специфические секретируемые белки, которые называются авирулентными (Avr) белками, взаимодействуют с продуктами соответствующего гена резистентности хозяина (R). В то же время эти белки способствуют развитию заболевания у растений, в которых гены резистентности отсутствуют. Показано, что в процессе инфицирования различные белки секретируются в растительный апопласт, что, по-видимому, связано с фазами патогенеза – биотрофной или некротрофной [54].

Грам-отрицательные бактерии развили систему секреции третьего типа (TTSS, *type three secretion system*) для переноса вирулентных белков, в том числе протеолитических ферментов, через плазматическую мембрану непосредственно в цитозоль растения-хозяина [8, 37]. К числу грамотрицательных бактерий, обладающих системой TTSS, относятся многие патогены растений, представители родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* и *Pantoea*. Распознавание сигнала опасности осуществляется клеткой растения в местах контакта с микроорганизмом. Определенные носители сигнала из инфицированных клеток могут запускать приобретенный системный защитный ответ (SAR, *systemic acquired response*) в здоровых неинфицированных тканях растения, что позволяет всему растению подготовиться к отражению атаки. SAR проявляется через изменение потока ионов, в том числе кальция, через мембрану и гормонального статуса, а также оксидативный выброс, фосфорилирование белков, гиперчувствительный ответ (HR, *hypersensitive response*), сопровождающийся некрозом в месте инфекции, предотвращающим распространение патогена, накопление белков, имеющих отношение к патогенезу, и антимикробных соеди-

нений – фитоалексинов [7, 8, 45]. Хотя большинство Avr белков эукариотических фитопатогенов являются апопластическими [82], было показано, что, как и для бактериальных фитопатогенов, некоторые Avr белки грибов и оомицетов транслоцируются в клетки растений [14, 19, 81]. Эти данные подтверждают сложность взаимодействия секретомов патогенов и их растений-хозяев.

Было установлено, что в основе действия белков-эффекторов лежит наличие у ряда из них ферментативной, в том числе, протеолитической активности [46]. Известные в настоящее время белки-эффекторы, обладающие свойствами протеиназ, представлены в таблице. Все они могут быть разделены на четыре семейства родственных белков. Представители семейств YopJ и XopD принадлежат к CE клану цистеиновых протеиназ, а представители семейств YopT и AvrRpt2 – к клану CA.

Авирулентный белок AvrPphB бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* с молекулярной массой 35 кДа подвергается автоактивации в бактериальной клетке с образованием двух фрагментов 7 и 28 кДа. После переноса в растительную клетку фрагмент 28 кДа ацилируется остатком жирной кислоты и в такой форме переносится на цитоплазматическую мембрану. Белок AvrPphB вызывает гиперчувствительный ответ у растений *Arabidopsis*, экспрессирующих белок RPS5 [39]. По своей пространственной структуре и расположению остатков Cys98, His212 и Asp227, образующих триаду активного центра протеиназы, AvrPphB напоминает папаин [105]. Мутанты, у которых были заменены остатки Cys, His или Asp, входящие в состав активного центра, утрачивали в равной степени, как биологическую активность, так и способность к автоактивации [86, 87]. Взаимодействие AvrPphB с RPS5 не носит прямого характера. Необходимо присутствие третьего компонента, белка PBS1, который и является истинным субстратом протеиназы. Белок PBS1, обладающий свойствами серин/треонин киназы, расщепляется на два фрагмента, затем подвергается автофосфорилированию и действует как триггер, активирующий передачу сигнала с участием RPS5 [39, 87]. Высказывается предположение, что все три белка, участвующие в процессе, остаются связанными с плазматической мембраной [65].

Эффекторный белок AvrRpt2, обнаруженный у *P. syringae* pv. *tomato*, принадлежит к другому семейству и пока не имеет аналогов (таблица). Белок AvrRpt2 индуцирует гиперчувствительный ответ у устойчивых растений *Arabidopsis*, экспрессирующих белок RPS2. Напротив, у растений, у которых данный белок отсутствует, эффектор AvrRpt2 способствует развитию заболевания [106].

Таблица. Бактериальные белки-эффекторы, обладающие свойствами цистеиновых протеиназ

| Семейство TTSS | Эффектор                     | Микро-организм                       | Протеиназа семейство | Субстрат                      | Ссылка   |
|----------------|------------------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------|
| YopJ           | AvrXv4, AvrBsT, AvrRxv, XopJ | <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> | C55                  | Конъюгаты SUMO-белок          | [78]     |
|                | PopP1, PopP2, PopP3          | <i>Ralstonia solanacearum</i>        | C55                  | Белок RRS1 <i>Arabidopsis</i> | [26]     |
|                | AvrPpi G1                    | <i>Ps. syringae pv. pisi</i>         | C55                  |                               | [15]     |
|                | HopPma D                     | <i>Ps. syringae pv. maculicola</i>   |                      |                               | [37]     |
|                | ORF B                        | <i>Ervinia pyrifoliae</i>            |                      |                               | [40]     |
|                | Y410                         | <i>Rhizobium sp. NGR234</i>          |                      |                               | [40]     |
| XopD           | XopD                         | <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> | C48                  | Конъюгаты SUMO-белок          | [39]     |
|                | PsvA                         | <i>Ps. syringae pv. Eriobotryae</i>  |                      |                               | [40]     |
| YopT           | AvrPph B                     | <i>Ps. syringae pv. phaseolicola</i> | C58                  | Белок PBS1 <i>Arabidopsis</i> | [86, 87] |
|                | AvrPpi C2                    | <i>Ps. syringae pv. pisi</i>         |                      |                               | [15]     |
|                | HopPto C, HopPto N           | <i>Ps. syringae pv. tomato</i>       | C72                  |                               | [56, 78] |
|                | BLR 2140, BLR 2058           | <i>Bradyrhizobium japonicum</i>      |                      |                               | [36, 48] |
|                | Y4z C                        | <i>Rhizobium sp. NGR234</i>          |                      |                               | [45]     |
| AvrRpt 2       | AvrRpt 2                     | <i>Ps. syringae pv. tomato</i>       | C70                  |                               | [16]     |

Белок-эффектор с молекулярной массой 28 кДа подвергается протеолитическому расщеплению внутри растительной клетки по связи Gly71–Gly72 с образованием двух фрагментов 21 и 7 кДа. С-Концевой фрагмент с молекулярной массой 21 кДа действует как триггер защитного ответа [64]. Несмотря на то, что процессинг AvrRpt2 носит автокаталитический характер, необходимо присутствие некоего дополнительного фактора, содержащегося в экстрактах из животных и растительных тканей [44]. Строение молекулы эффектора AvrRpt2 и расположение аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра, обнаруживают определенное сходство со стафопаином, цистеиновой протеиназой из *Staphylococcus aureus* [15]. В качестве субстрата AvrRpt2 в клетках *Arabidopsis* был идентифицирован белок RIN4 [16, 58]. Протеолиз RIN4 служит сигналом для гиперчувствительного ответа, в котором принимает участие также белок RPS2. В то же время очищенный эффектор AvrRpt2 не действует на белок RIN4 *in vitro*. Для взаимодействия необходимо присутствие эукариотического кофактора, по-видимому, идентичного тому, который задействован в процессинге самого эффектора [15]. Была установлена природа этого фактора. Им оказался белок циклофилин [23].

Различные представители бактерий рода *Yersinia* являются патогенами животных и растений и образуют эффекторы, известные как Yop (*Yersinia outer proteins*). При введении в клетку хозяина, растения или животного, они препятствуют развитию иммунного ответа. Некоторые из эффекторов, принадлежащих к семейству белков YopJ, такие, как AvrBsT и AvrXv4 из *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, обладают значительным сходством с протеиназой ULP1 из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [74, 84]. Фермент ULP1 контролирует у дрожжей процесс взаимодействия SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) с различными белками. Протеиназы этого типа содержат в каталитическом центре триаду His/Glu/Cys или His/Asp/Cys и относятся к клану СЕ цистеиновых протеиназ [74]. Модификация остатков, расположенных в активном центре фермента, приводит к утрате способности вызывать гиперчувствительный ответ у растений [39, 74, 84].

Экспрессия эффекторов *X. campestris*, XopD и AvrXv4, в листьях *Nicotiana glauca* (L.) приводит к снижению содержания конъюгатов SUMO с белками. На этом основании было сделано заключение, что эффекторы обладают *in vivo* изопептидазной активностью [39, 84]. Дальнейшее подтверждение было получено с очищенным белком XopD. Было показано, что эффектор действует *in vitro* как изопептидаза, расщепляя связь между карбоксильной группой

N-концевого остатка SUMO и ε-аминной группой остатка Lys в белке-субстрате. Кроме того, он может действовать как пептидаза, способная превращать предшественник SUMO в активную форму, содержащую N-концевую последовательность Gly-Gly [39, 69]. Действие ХорD отличается высокой специфичностью, и его активность проявляется исключительно по отношению к формам SUMO растительного происхождения [39].

Модификация белков SUMO играет важную роль в регуляции различных биологических процессов у растений. При этом по имеющимся данным подвергающиеся модификации белки сосредоточены, главным образом, в ядре [51]. В связи с этим представляет интерес то обстоятельство, что поступающие в растительную клетку эффекторы ХорD и PopP2 также локализуются в ядрах [26, 39]. Можно предположить, что наличие у фитопатогенных микроорганизмов протеиназ, способных имитировать действие собственных ферментов растений, дает им важные преимущества. В свою очередь, у растений могут существовать механизмы, позволяющие нейтрализовать активность SUMO-протеиназ бактерий. У *Arabidopsis* продукт гена резистентности, белок RRS1, обеспечивает устойчивость по отношению к штаммам *Ralstonia solanacearum*, экспрессирующим эффектор PopP2 [25]. При этом белок RRS1 вступает в непосредственное взаимодействие с бактериальной протеиназой [26].

Продукты генов авирулентности, обладающие протеолитической активностью, обнаружены также у фитопатогенных грибов. Важнейший патоген риса, гриб *Magnaporthe grisea*, продуцирует белок Avr-Pita, являющийся металлопротеиназой, принадлежащей к семейству цинк-содержащих протеиназ M35 [73]. Зрелая форма фермента может вызывать реакцию гиперчувствительности у растений риса. Было установлено, что Avr-Pita вступает в непосредственное взаимодействие с лейцин-богатым доменом продукта гена резистентности, белка Pi-ta [43]. Мутантная форма протеиназы Avr-Pita, у которой остаток Glu в активном центре заменен на остаток Asp, утрачивает способность взаимодействовать с белком Pi-ta и соответственно теряет биологическую активность [17]. Полученные данные указывают на то, что продукт гена резистентности, белок Pi-ta, является субстратом протеиназы. Это первый описанный в литературе случай прямого взаимодействия между продуктами как генов авирулентности, так и резистентности [106].

Для внедрения в клетки растения-хозяина продуктов генов авирулентности, обладающих протеолитической активностью, необходимо наличие инвазивных эффекторов, которые представляют собой

белки, несущие RxLR или другие консервативные мотивы. Эти эффекторы вводят факторы вирулентности в клетки растения, что, в свою очередь, приводит к экспрессии инфекции [31, 32]. Эффекторы с лизин-содержащими мотивами (LysM) участвуют в защите хитинного слоя клеточной стенки гриба, что позволяет сохранить ее целостность, и являются защитными [49, 90, 91]. Эти два типа эффекторов, как полагают, широко распространены среди грибов, особенно биотрофов. Было показано, что положительная селекция С-концевых аминокислотных остатков этих эффекторов, вносит вклад в их эволюцию и разнообразие [103]. Это согласуется с предположением, что N-концевой домен участвует в их секреции, в то время как С-концевой домен – в подавлении защитного ответа растительной клетки. Таким образом, посттрансляционная модификация белков непосредственно внутри растительной клетки может служить важным средством воздействия фитопатогенных микроорганизмов на защитные системы растений.

Существуют, по-видимому, эволюционные стратегии сосуществования патосистем, которые позволяют патогенам адаптироваться к возможностям, возникающим при их трофическом взаимодействии с растением-хозяином. Благодаря этому большинство биотрофов смогли приспособиться к таким механизмам защиты растений, в которых участвуют детоксифицирующие фитоалексины и другие метаболиты, связанные с защитой клетки, тогда как для гемибiotрофов и некротрофов характерно усиление своих защитных мер по борьбе с ответной реакцией растения-хозяина [32]. Например, такие некротрофные грибы, как *Sclerotinia sclerotiorum*, подавляют сигнальный каскад активных форм кислорода (АФК) растения-хозяина *in planta*, используя каталазу, супероксиддисмутазу, маннит или щавелевую кислоту, что приводит к локальному усилению гиперчувствительной реакции и/или предотвращению сигнальной трансдукции в удаленных здоровых участках [32]. В то же время гриб *Botrytis cinerea* вынуждает свое растение-хозяина продуцировать АФК, которые разрушают ткани, тем самым, обеспечивая их более легкую колонизацию. При действии гриба *Fusarium oxysporum* на *Arabidopsis thaliana* (L.) секретируется жасмонат, который способствует развитию инфицирования [94]. Такое использование сигнальных путей было показано и при поражении растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) фитопатогенным грибом *Verticillium dahliae* и томата (*S. lycopersicum* L.) грибом *B. cinerea* [32–34].

Таким образом, патогены, адаптированные к определенным семействам растений, приобрели способность преодолевать их иммунитет

к микробным заражениям, секретируя молекулы эффекторов, которые подавляют или уменьшают иммунный ответ. Так, для защиты от действия апопластической хитиназы растений гриб *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*) секретирует в межклеточное пространство листьев томата хитин-связывающий белок CfAvr4 [98]. Функциональные гомологи CfAvr4 были обнаружены и у других аскомицетов [27, 60, 91]. В тех случаях, когда в геноме фитопатогенов отсутствуют гомологи гена *CfAvr4*, они секретируют протеиназы, расщепляющие целлюлозо-связывающий домен (CBD, *cellulose binding domain*) хитиназы. Так, показано, что *F. solani* f. sp. *phaseoli* модифицирует хитиназу растительной клетки, что облегчает колонизацию растения-хозяина [52], а *F. solani* f. sp. *eumartii* секретирует с этой целью субтилизиноподобную протеиназу, которая модифицирует хитиназу и  $\beta$ -1,3-глюканазы [72].

Было показано, что патогены кукурузы *F. verticillioides*, *Bipolaris zeicola* и *Stenocarpella maydis* секретируют два типа протеиназ, которые изменяют структуру CBD в молекуле хитиназы кукурузы [66, 67]. Обнаружено, что металлопротеаза *F. verticillioides* расщепляет CBD между остатками Gly и Cys, в то время как полиглицингидролаза, присутствующая у многих грибов, принадлежащих к семейству *Pleosporineae*, расщепляет полиглициновый линкер в шарнирной области хитиназы [67, 68].

Патогены томата *B. cinerea*, *V. dahliae* и *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* секретируют протеиназы, которые модифицируют CBD хитиназы растения [42]. Расщепление и удаление CBD из хитиназы томата при инфицировании *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* осуществлялось только при синергическом действии сериновой протеиназы, FoSep1, и металлопротеиназы, FoMep1 (ортолог фунгализина гриба *F. verticillioides*) [42]. Удаление CBD из хитиназ растения этими двумя ферментами приводило к уменьшению их хитиназной и противопатогенной активности. Кроме того, мутанты *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, не содержащие, как FoSep1, так и FoMep1, обладали пониженной вирулентностью по отношению к растениям томатов. Таким образом, секретируемые протеиназы грибов являются важными факторами вирулентности, тогда как хитиназа – важным компонентом базальной защиты растений [42].

При этом секреция протеиназ и их ингибиторов патогенами, по-видимому, играет более важную роль в процессе коэволюции патогенов и их растений-хозяев [38]. Приведенные данные позволяют понять причину, по которой избыточная экспрессия растительной хитиназы в трансгенных растениях не приводила к получению

сортов томатов, устойчивых к действию патогенов. В связи с этим избыточная экспрессия хитиназы гетерологичным геном, для которого отсутствовал этап совместной эволюции, может стать более перспективным подходом при получении сортов, устойчивых к действию патогенных микроорганизмов.

Гены фитопатогенов кодируют протеиназы, принадлежащие к различным подсемействам, и их количество зависит от природы патогена. Как правило, гембиотрофы и сапротрофы содержат большее число секретируемых протеиназ, чем биотрофы [71]. Однако у биотрофного гриба *C. fulvum* количество секретируемых протеиназ было сопоставимо с филогенетически близким гембиотрофом *Dothistroma septosporum* [27], что, по-видимому, обусловлено их адаптацией к различным семействам растений [99]. Считают, что протеиназы и их ингибиторы играли важную роль в адаптации двух видов *Phytophthora*, *P. infestans* и *P. mirabilis*, к соответствующим растениям-хозяевам [28]. Это служит примером того, как диверсификация и адаптация комплекса протеиназа-ингибитор может происходить на молекулярном уровне и подтверждает гипотезу о роли протеиназ и их ингибиторов в «гонке вооружений» между растением и его патогеном. Направленное удаление одного или даже двух генов протеиназ не влияло на вирулентность растительных патогенных грибов *Glomerella cingulata* и *B. cinerea* [79].

## II. МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПАТОГЕНА С РАСТЕНИЕМ-ХОЗЯИНОМ

Физиологические и молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействия некротрофных фитопатогенных грибов и соответствующих им растений-хозяев, в значительной степени остаются мало изученными. Известны три стадии развития патогенного процесса. Первая включает образование апрессорий – специализированных структур, с помощью которых мицелий прикрепляется к растению. На второй (биотрофной) происходит формирование колоний на клетках растения-хозяина, и на третьей (некротрофной) – деградация его клеточных стенок [13, 55]. На стадии апрессорий и затем на некротрофной подщелачивается pH окружающих тканей за счет секреции аммония. Известно, что при этом активируется процесс запрограммированной гибели клетки. Предполагают, что этот процесс оптимизирует условия для дальнейшей колонизации растения-хозяина, сопровождающейся индукцией патогенных факторов [11, 12]. Так, секретируемый фермент, пектат-лиаза (PelB), разрушающий

клеточную стенку растения, контролируется фактором транскрипции *pacC*, который подвергается протеолитической активации при щелочных значениях pH окружающей среды [61, 62]. Показано, что метаболическая активность ферментов, разрушающих клеточную стенку, значительно повышается в процессе протеолиза [11, 12].

Переход от стадии апрессорий к биотрофной сопровождается транскрипцией генов, кодирующих секретируемые протеиназы, в частности, сериновые (субтилизино- и трипсиноподобные). Поскольку эти ферменты работают вне клетки, их активность так же, как и механизмы, которые контролируют их синтез и секрецию, находятся под влиянием ряда факторов окружающей среды [57]. Было показано, что в процессе роста культуры аскомицетов значение pH среды культивирования изменялось от нейтральных до слабо щелочных и достигало постоянной величины, когда активность экзопроотеиназ была максимальной [4]. Повышение pH среды, обусловленное образованием аммония, индуцирует экспрессию генов патогенности гриба, включая гены, кодирующие протеолитические ферменты [6]. В процессе инфицирования патоген, по-видимому, оказывается в условиях окислительного стресса, который формирует растение-хозяин, и для успешной колонизации ему необходимо наличие активной системы детоксикации. Оказалось, что pH среды при поражении спелых плодов авокадо патогенными грибами *Colletotrichum gloeosporioides* повышался вследствие секреции грибом высоких концентраций аммония [50, 63]. Предполагается, что некоторое количество аммония могло образовываться в процессе восстановления нитрата, поскольку мутанты гриба (*nit*), не содержащие нитратредуктазу, не были способны аккумулировать аммоний, и их вирулентность была значительно снижена [9, 50]. При повышении pH, обусловленном накоплением аммония, индуцируется экспрессия генов, кодирующих протеолитические ферменты, которые обладают pH-оптимумом при высоких значениях [50]. Было показано, что направленная делеция основного регулятора азота (AREA) и транспортера аммония (AMET) влияла на аккумуляцию аммония и вирулентность патогена *C. coccodes* [9, 10, 88]. При снижении содержания азота растение-хозяин становится более подверженным инфицированию [47]. Так, было показано, что в условиях азотного голодания растения индуцируется экспрессия генов патогенности, в частности протеолитических ферментов, грибов *Magnaporthe grisea*, *C. gloeosporioides* и *Cladosporium fulvum*, что приводит к накоплению ионов аммония [29, 50, 76, 89, 92, 93].

Непатогенный штамм *C. lindemuthianum*, не способный к колонизации клеток растения и переходу к некротрофной стадии, образовывался в результате мутации генов *AreA*, которые относятся к генам, отвечающим за катаболитную репрессию азота [75]. Оказалось, что *nit* мутанты *C. coccodes* секретируют меньшее количество аммония и обладают пониженной скоростью инфицирования растений томатов [9], а *nit* мутанты *C. gloeosporioides*, поражающие плоды авокадо и отличающиеся неспособностью к накоплению аммония, – значительно меньшей вирулентностью [50].

Можно предположить, что, с одной стороны, изменение pH среды является адаптивным механизмом, облегчающим усвоение патогеном белковых питательных веществ, а с другой – физиологическим сигналом, который вызывает синтез и секрецию протеиназ, являющихся одним из факторов вирулентности [50, 72].

Было показано, что при поражении патогеном *C. gloeosporioides* плодов авокадо инфекционные нити от аппрессорий проникали в эпидермальные клетки его экзокарпа, но оставались в состоянии покоя до созревания плодов. Во время стадии покоя отсутствовала секреция и синтез сериновых протеиназ как факторов патогенности гриба, которые стимулировались подщелачиванием среды, а незрелые плоды индуцировали синтез противопатогенных соединений. В свою очередь, накопление аммония в распадающейся ткани плода обеспечивало преобразование биотрофной стадии покоя в некротрофную [50].

Протеиназы играют важную роль в физиологии и метаболизме грибов, которые являются гетеротрофными организмами, использующими органические и неорганические вещества в качестве источника углерода и азота. Сапротрофные и патогенные грибы секретируют протеолитические ферменты, однако, динамика их секреции и действия могут отличаться у этих двух групп [2, 95, 96]. Среди протеиназ бактериального и грибного происхождения, преобладают сериновые протеиназы, которые относятся к двум основным подсемействам: субтилизино- и трипсиноподобным. В активном центре ферментов обоих подсемейств присутствует одна и та же каталитическая триада (Asp–His–Ser), которая, как полагают, сформировалась в процессе конвергентной эволюции [18, 104]. Участие экстрацеллюлярных микробных протеиназ в патогенезе может носить различный характер: от разрушения структурных белков клеточной стенки и защитных белков растений до процессинга собственных экстрацеллюлярных белков микроорганизмов, существенных для развития заболевания. На

важную роль протеиназ в патогенезе указывает наблюдавшаяся в ряде случаев прямая зависимость между интенсивностью заболевания у растений и активностью экстрацеллюлярных сериновых протеиназ микроорганизмов [3, 5, 21]. Это согласуется с данными о том, что белковые ингибиторы протеиназ, содержащиеся в растениях, не только подавляют активность ферментов, секретируемых микроорганизмами, но и оказывают угнетающее действие на их рост и развитие [6].

Субтилизиноподобные протеиназы патогенных грибов способны нарушать физиологическую целостность клетки растения-хозяина, обеспечивая проникновение в нее патогена и ее колонизацию, разрушая как белки клеточной оболочки, так и защитные растительные белки [72]. В связи с этим их можно рассматривать как фактор вирулентности фитопатогенов [22]. Так, было показано, что протеиназы семейства субтилизинов секретиrowались при инфицировании масличного рапса (*Brassica napus* L.) грибом *Pyrenopeziza brassicae*, а в сортах риса, устойчивых к заражению этим патогеном, наблюдался синтез ингибиторов сериновых протеиназ [22]. Степень деградации запасных белков зерновок растений пшеницы (*Triticum*), пораженных грибом *F. culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc., также зависела от уровня активности секретируемой щелочной протеиназы [21]. Направленная делеция гена *Spm1*, кодирующего субтилизиноподобную протеиназу, значительно снижала патогенность гриба *Conidiobolus coronatus* [70]. Было показано, что степень конидиального разряда *C. coronatus* зависела от уровня активности щелочной сериновой протеиназы. Для споруляции *A. fumigatus* были необходимы субтилизиноподобные протеиназы (АПН 2), оказывающие влияние на вирулентность этого вида грибов [70].

### III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку протеиназы патогенов не только способствуют проникновению гриба в ткани растения-хозяина, но и активно воздействуют на защитные барьеры растений, они являются обязательным компонентом процесса патогенеза [30]. Корреляция между активностью сериновых протеиназ и патогенностью грибов позволяет говорить о том, что эти ферменты могут служить маркером фитопатогенности [22, 30].

Показано, что субтилизиноподобные протеиназы обнаруживаются в культуральной жидкости как сапротрофных, так фитопатогенных грибов на 4–5 сут роста, тогда как трипсиноподобные протеиназы фитопатогенов – на 7 [1, 4, 95]. Можно предположить, что субтили-

зиноподобные ферменты, обладая широкой специфичностью действия, первыми расщепляют белки клеточной стенки растения-хозяина и обеспечивают доступность для действия трипсиноподобных протеиназ. Этим обусловлено более позднее появление последних в среде культивирования, что, по-видимому, указывает на их специфическую роль в фитопатогенезе.

Обнаружено, что сапротрофные виды *Trichoderma harzianum*, *Penicillium terlikowskii* и *P. chrysogenum* характеризуются высокой активностью секретируемых субтилизиноподобных протеиназ и отсутствием секреции трипсиноподобных, в то время как фитопатогенные виды *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *Ulocladium botrytis*, наряду с субтилизиноподобными протеиназами, секретируют и трипсиноподобные [1]. Высокий уровень трипсиноподобной активности внеклеточных протеиназ, по-видимому, обуславливает и высокую патогенность штаммов мицелиальных грибов [3]. Таким образом, образование и секреция трипсиноподобных протеиназ является специфической особенностью фитопатогенов, а субтилизиноподобных ферментов – сапротрофных и энтомопатогенных грибов.

Анализ механизма взаимодействия систем растение–хозяин–патоген, включая защитный ответ патогена, позволит создать более эффективные способы борьбы с заболеваниями, вызываемыми грибами и оомицетами, которые приводят к значительным потерям урожая.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дунаевский Я.Е., Грубань Т.Н., Белякова Г.А., Белозерский М.А. (2006) Внеклеточные протеиназы мицелиальных грибов как возможные маркеры фитопатогенеза, *Микробиология*, **75**, 747–751.
2. Дунаевский Я.Е., Матвеева А.Р., Фатхуллина Г.Н., Белякова Г.А., Белозерский М.А. (2008) Внеклеточные протеиназы мицелиальных грибов как участники процесса патогенеза, *Биоорганическая химия*, **34**, 317–321.
3. Кокаева Л.Ю., Кудрявцева Н.Н., Побединская М.А., Зайчик Б.Т., Еланский С.Н. (2015) Вирулентность штаммов *Alternaria alternata* к сортам картофеля и томата, *Защита картофеля*, № 1, 14–18.
4. Кудрявцева Н.Н., Гвоздева Е.Л., Софьин А.В., Валуева Т.А. (2010) Влияние среды культивирования гриба *Rhizoctonia solani* на секрецию протеолитических ферментов, *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **46**, 355–362.
5. Кудрявцева Н.Н., Софьин А.В., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Иевлева Е.В., Валуева Т.А. (2013) Секреция протеолитических ферментов тремя фитопатогенными микроорганизмами, *Прикл. Биох. Микробиол.*, **49**, 513–521.
6. Мосолов В.В., Валуева Т.А. (2006) Участие протеолитических ферментов во взаимодействии растений с фитопатогенными микроорганизмами, *Биохимия*, **71**, 1034–1042.

7. Abramovitch, R.B., Martin, G.B. (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 356–364.
8. Alfano, J.R., Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**, 385–414.
9. Alkan, N., Fluhr, R., Sherman, A., Prusky, D. (2008) Role of Ammonia Secretion and pH Modulation on Pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on Tomato Fruit, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1058–1066.
10. Alkan, N., Davydov, O., Sagi, M., Fluhr, R., Prusky, D. (2009) Ammonium secretion by *Colletotrichum coccodes* activates host NADPH oxidase activity enhancing host cell death and fungal virulence in tomato fruits, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 1484–1491.
11. Alkan, N., Espeso, E. A., Prusky, D. (2013) Virulence Regulation of Phytopathogenic Fungi by pH, *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1012–1025.
12. Alkan, N., Meng, X., Friedlander, G., Reuveni, E., Sukno, S., Sherman, A., Thon, M., Fluhr, R., Prusky, D. (2013) Global aspects of pacC regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**, 1345–1358.
13. Alkan, N., Friedlander, G., Ment, D., Prusky, D., Fluhr, R. (2015) Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies, *New Phytol.*, **205**, 801–815.
14. Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Pritchard, L., Bos, J.I. B., Venter, E., Avrova, A.O., Rehmany, A.P., Böhme, U., Brooks, K., Cherevach, I., Hamlin, N., White, B., Fraser, A., Lord, A., Quail, M.A., Churcher, C., Hall, N., Berriman, M., Huang, S., Kamoun, S., Beynon, J.L., Birch, P.R. (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7766–7771.
15. Arnold, D.L., Jackson, R.W., Fillingham, A.J., Gross, S.C., Taylor, J.D., Mansfield, J.W., Vivian, A. (2001) Highly conserved sequences flank avirulence genes: isolation of novel avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *psii*, *J. Microbiol.*, **147**, 1171–1182.
16. Axtell, M.J., Chisholm, S., Dahlbeck, D., Staskawicz, B.J. (2003) Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein *AvrRpt2* is a cysteine protease, *Mol. Microbiol.*, **49**, 1537–1546.
17. Axtell, M.J., Staskawicz, B.J. (2003) Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the *AvrRpt2*-directed elimination of *RIN4*, *Cell*, **112**, 369–377.
18. Bryan, G.T., Wu, K.-S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P. McAdams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R., Valent, B. (2000) tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*, *Plant Cell*, **12**, 2033–2045.
19. Bryant, M.K., Schardl, C.L., Hesse, U., Scott, B. (2009) Evolution of a subtilisin-like protease gene family in the grass endophytic fungus *Epicloa festucae*, *BMC Evol. Biol.*, **9**, 168.
20. Catanzariti, A.-M., Dodds, P.N., Ellis, J.G. (2007) Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens, *FEMS Microbiol. Lett.*, **269**, 181–188.
21. Chand, R., Kumar, M., Kushwaha, C., Shah, K., Joshi, A.K. (2014) Role of

- Melanin in Release of Extracellular Enzymes and Selection of Aggressive Isolates of *Bipolaris sorokiniana* in Barley, *Curr. Microbiol.*, **69**, 202–211.
22. Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun, S.Ch., Sathiyabama, M.J. (2016) Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity, *J. Gen. Plant Pathol.*, **82**, 33–239.
  23. Coake, G., Falick, A., Staskawicz, B.J. (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin, *Science*, **308**, 548–550.
  24. Cook, D.E., Mesarich, C.H., Thomma Bart, P.H.J. (2015) Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion, *Annu. Rev. Phytopatol.*, **53**, 541–563.
  25. Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsh, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., Marco, Y. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2404–2409.
  26. Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounloham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y. (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8024–8029.
  27. de Wit P.J.I., van der Burg, A., Ökmen, B., Stergiopoulos, I., Abd-Elsalam, K.A., Aerts, A.L., Bahkali, A.H., Beenen, H.G., Chettri, P., Cox, M.P., Datema, E., de Vries, R.P., Dhillon, B., Ganley, A.R., Griffiths, S.A., Guo, Y., Hamelin, R.C., Henrissat, B., Kabir, M.S., Jashni, M.K., Kema, G., Klaubauf, S., Lapidus, A., Levasseur, A., Lindquist, E., Mehrabi, R., Ohm, R.A., Owen, T.J., Salamov, A., Schwelm, A., Schijlen, E., Sun, H., van den Burg, H.A., van Ham, R.C., Zhang, S., Goodwin, S.B., Grigoriev, I.V., Collemare, J., Bradshaw, R.E. (2012) The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry, *PLoS Genet.*, **8**, e1003088.
  28. Dong, S., Stam, R., Cano, L.M., Song, J., Sklenar, J., Yoshida, K., Bozkurt, T.O., Oliva, R., Liu, Z., Tian, M., Win, J., Banfield, M.J., Jones, A.M., van der Hoorn, R.A., Kamoun, S. (2014) Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen, *Science*, **343**, 552–555.
  29. Donofrio, N.M., Oh, Y., Lundy, R., Pan, H., Brown, D.E., Jeong, J.S., Coughlan, S., Mitchell, T.K., Dean, R.A. (2006) Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, *Fungal Genet. Biol.*, **43**, 605–617.
  30. Dubovenko, A.G., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Oppert, B., Lord, J.C., Elpidina, E.N. (2010) Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity, *Fungal Biol.*, **114**, 151–159.
  31. El Hadrami A., El Hadrami I., Daayf F. (2009) Suppression of induced plant defense responses by fungal and oomycete pathogens. Ch. 10. In: K. Bouarab, N. Brisson and F. Daayf Eds. *Molecular-Plant Microbe Interactions*. CABI, pp. 231–268.
  32. El Hadrami, A., El-Bebany, A.F., Yao, Z., Adam, L.R., El Hadrami, I., Daayf, F. (2012) Plants versus fungi and oomycetes: pathogenesis, defense and counter-defense in the proteomics era, *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 7237–7259.
  33. El Oirdi, M. Bouarab, K. (2007) Plant signalling components EDS1

- and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*, *New Phytol.*, **175**, 131–139.
34. El Oirdi, M., Abd El Rahman, T., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M., Daayf, F., Vojnov, A., Bouarab, K. (2011) *Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato, *Plant Cell*, **23**, 2405–2421.
  35. Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes, *Nature*, **387**, 394–401.
  36. Gottfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R., Hennecke, H.J. (2001) Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome, *Bacteriol.*, **183**, 1405–1412.
  37. Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G., Greenberg, J.T. (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*, *Science*, **295**, 1722–1726.
  38. Hörger, A.C., van der Hoorn, R.A.L. (2013) The structural basis of specific protease-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23**, 842–850.
  39. Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., Mudgett, M.B. (2003) Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta, *Mol. Microbiol.*, **50**, 377–389.
  40. Hotson, A., Mudgett, M.B. (2004) Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity, *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **7**, 384–390.
  41. Huitema, E., Bos, J.I., Tian, M., Win, J., Waugh, M.E., Kamoun, S. (2004) Linking sequence to phenotype in Phytophthora-plant interactions, *Trends Microbiol.*, **12**, 193–200.
  42. Jashni, M. K., Mehrabi, R., Collemare, J., Mesarich, C.H., de Wit, P.J.G.M. (2015) The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions, *Front. Plant Sci.*, **6**, 584.
  43. Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance, *EMBO J.*, **19**, 4004–4014.
  44. Jin, P., Wood, M.D., Wu, Y., Xie, Z., Katagiri, F. (2003) Cleavage of the *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 requires a host factor(s) common among eukaryotes and is important for AvrRpt2 localization in the host cell, *Plant Physiol.*, **133**, 1072–1082.
  45. Joo, H.S., Chang, C.S. (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties, *Process Biochem.*, **40**, 1263–1270.
  46. Innes, R. (2003) New effects of type III effectors, *Mol. Microbiol.*, **50**, 363–365.
  47. Inguagiato, J.C., Murphy, J.A., Clarke, B.B. (2008) Anthracnose severity on annual bluegrass influenced by nitrogen fertilization, growth regulators, and verticutting, *Crop Sci.*, **48**, 1595–1607.
  48. Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium*

- japonicum USDA110, *DNA Res.*, **9**, 189–197.
49. Knogge, W., Scheel, D. (2006) LysM receptors recognize friend and foe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10829–10830.
  50. Kramer-Haimovich, H., Servi, E., Katan, T., Rollins, J., Okon, Y., Prusky, D. (2006) Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelB activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1034–1039.
  51. Kurepa J., Walker J.M., Smalle J., Gosink M.M., Davis S.J., Durham, T.L., Sung, D.Y., Vierstra, R.D. (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress, *J. Biol. Chem.*, **278**, 6862–6872.
  52. Lange J., Mohr U., Wiemken A., Boller T., Vögeli-Lange R. (1996) Proteolytic processing of class IV chitinase in the compatible interaction of bean roots with *Fusarium solani*, *Plant Physiol.*, **111**, 1135–1144.
  53. Lee, Y.H., Dean, R.A. (1993) cAMP Regulates Infection Structure Formation in the Plant Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea*, *Plant Cell*, **5**, 693–700.
  54. Lee, S.-J., Kelley, B.S., Damasceno, C.M.B., St John Bonnie, Kim, B.-S., Kim, B.-D., Rose, J.K.C. (2006) A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **19**, 1368–1377.
  55. Lee, S.-J., Rose, J.K.C. (2010) Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins, *Plant Signal. Behav.*, **5**, 769–772.
  56. Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P.A., Schneider, A.R., Collmer, A. (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions, *Mol. Microbiol.*, **54**, 353–365.
  57. Maccheroni, W.Jr., Araújo, W.L., Azevedo, J.L. (2004) Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*, *Scientia Agricola*, **61**, 298–302.
  58. Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Dangl, J.L. (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance, *Cell*, **112**, 379–389.
  59. Ment, D., Alkan, N., Luria, N., Bi, F.-C., Reuveni, E., Fluhr, R., Prusky, D. (2015) A Role of AREB in the Regulation of PACC-Dependent Acid-Expressed-Genes and Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **28**, 154–166.
  60. Mesarich, C.H., Stergiopoulos, I., Beenen, H.G., Cordovez, V., Guo, Y., Karimi Jashni, M., Bradshaw, R.E., de Wit, P.J. (2016) A conserved proline residue in Dothideomycete Avr4 effector proteins is required to trigger a Cf-4-dependent hypersensitive response, *Mol. Plant Pathol.*, **17**, 84–95.
  61. Miyara, I., Shafran, H., Haimovich, H.K., Rollins, J., Sherman, A., Prusky, D. (2008) Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits, *Mol. Plant Pathol.*, **9**, 281–291.
  62. Miyara, I., Shafran, H., Davidzon, M., Sherman, A., Prusky, D. (2010) pH Regulation of ammonia secretion

- by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressorium formation and pathogenicity, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **23**, 304–316.
63. Miyara, I., Shnaiderman, C., Meng, X., Vargas, W.A., Diaz-Minguez, J.M., Sherman, A., Thon, M., Prusky, D. (2012) Role of nitrogen-metabolism genes expressed during pathogenicity of the alkalizing *Colletotrichum gloeosporioides* and their differential expression in acidifying pathogens, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **25**, 1251–1263.
  64. Mudgett, M.B., Staskawicz, B.J. (1999) Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis, *Mol. Microbiol.*, **32**, 927–941.
  65. Mudgett, M.B. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56**, 509–531.
  66. Naumann, T.A. (2011) Modification of recombinant maize ChitA chitinase by fungal chitinase-modifying proteins, *Mol. Plant Pathol.*, **12**, 365–372.
  67. Naumann, T.A., Wicklow, D.T., Price, N.P.J. (2014) Polyglycine hydrolases secreted by Pleosporineae fungi that target the linker region of plant class IV chitinases, *Biochem. J.*, **460**, 187–198.
  68. Naumann, T.A., Naldrett, M.J., Ward, T.J., Price, N.P.J. (2015) Polyglycine hydrolases: Fungal  $\beta$ -lactamase-like endoproteases that cleave polyglycine regions within plant class IV chitinases, *Protein Sci.*, **24**, 1147–1157.
  69. Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U. (2002) Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island, *J. Bacteriol.*, **184**, 1340–1348.
  70. Oh, Y., Donofrio, N., Pan, H., Coughlan, S., Brown, D., Meng, S., Mitchell, T., Dean, R.A. (2008) Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, *Genome Biol.*, **9**, R85.
  71. Ohm, R.A., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C.L., Horwitz, B.A., Barry, K.W., Condon, B.J., Copeland, A.C., Dhillon, B., Glaser, F., Hesse, C.N., Kosti, L., LaButti, K., Lindquist, E.A., Lucas, S., Salamov, A.A., Bradshaw, R.E., Ciuffetti, L., Hamelin, R.C., Kema, G.H., Lawrence, C., Scott, J.A., Spatafora, J.W., Turgeon, B.G., de Wit, P.J., Zhong, S., Goodwin, S.B., Grigoriev, I.V. (2012) Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi, *PLoS Pathog.*, **8**, e1003037.
  72. Olivieri, F., Zanetti, E.M., Oliva, C.R., Covarrubias, A.A., Casalongué, C.A. Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins, (2002) *Eur. J. Plant Pathol.*, **108**, 63–72.
  73. Orbach, M.J., Farrall, L., Sveigard, J.A., Chumley, F.G., Valent, B. (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta, *Plant Cell*, **12**, 2019–2032.
  74. Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M.B., Bao, Z.Q., Palmer, L.E., Bliska, J.B., Mangel, W.F., Staskawicz, B., Dixon, J.E. (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease, *Science*, **290**, 1594–1597.
  75. Pellier, A-L., Lauge, R., Veneault-Fourrey, C., Langin, T. (2003) CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle, *Mol. Microbiol.*, **48**, 639–655.

76. Perez-Garcia, A., Snoeijers, S.S., Joosten, M.H.A.J., Goosen, T., De Wit, P.J.G.M. (2001) Expression of the avirulence gene Avr9 of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by the global nitrogen response factor NRF1, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 316–325.
77. Pérez-García, A., Romero, D., Fernández-Ortuño, D., López-Ruiz, F., de Vicente, A., Torés, J.A. (2009) The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits, *Mol. Plant Pathol.*, **10**, 153–160.
78. Petnicki-Owieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A., Alfano, J.R. (2002) Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7652–7657.
79. Plummer, K.M., Clark, S.J., Ellis, L.M., Loganathan, A., Al-Samarrai, T.H., Rikkerink, E.H.A., Sullivan, P.A., Templeton, M.D., Farley, P.C. (2004) Analysis of a secreted aspartic peptidase disruption mutant of *Glomerella cingulata*, *Eur. J. Plant Pathol.*, **110**, 265–274.
80. Rast, D.M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G.O. (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi, *Phytochem.*, **64**, 339–366.
81. Rehmany, A.P., Gordon, A., Rose, L.E., Allen, R.L., Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Kamoun, S., Tyler, B.M., Birch, P.R.J., Beynon, J.L. (2005) Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines, *Plant Cell*, **17**, 1839–1850.
82. Rep, M. (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization, *FEMS Microbiol. Lett.*, **253**, 19–27.
83. Rep, M., Van Der Does, H.C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J. (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato, *Mol. Microbiol.*, **53**, 1373–1383.
84. Roden J., Eardley L., Hotson A., Cao Y., Mudgett M.B. (2004) Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **17**, 633–643.
85. Rose, J.K.C., Ham, K.S., Darvill, A.G., Albersheim, P. (2002) Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens, *Plant Cell*, **14**, 1329–1345.
86. Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., Dixon, J.E. (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis, *Cell*, **109**, 575–588.
87. Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoute-myer, M., Dixon, J.E., Innes, R.W. (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector, *Science*, **301**, 1230–1233.
88. Shnaiderman, C., Miyara, I., Kobiler, I., Sherman, A., Prusky, D. (2013) Differential activation of ammonium transporters during the accumulation of ammonia by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressoria formation and pathogenicity, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **26**, 345–355.
89. Stephenson, S.-A., Hatfield, J., Rusu, A.G., Maclean, D.J., Manners, J.M. (2000) CgDN3: an essential pathogenicity gene of *colletotrichum*

- gloeosporioides necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13**, 929–941.
90. Stergiopoulos, I., de Wit, P.J.G.M. (2009) Fungal Effector Proteins, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **47**, 233–263.
  91. Stergiopoulos, I., van den Burg, H.A., Ökmen, B., Beenen, H.G., van Liere, S., Kema, G.H.J., de Wit, P.J. (2010) Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7610–7615.
  92. Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Hamer, J.E. (1993) Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, *Plant Cell*, **5**, 1575–1590.
  93. Talbot, N.J., Foster, A.J. (2001) Genetics and genomics of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: Developing an experimental model for understanding fungal diseases of cereals, *Adv. Bot. Res.*, **34**, 263–287.
  94. Thatcher, L.F., Manners, J.M., Kazan, K. (2009) *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*, *Plant J.*, **58**, 927–939.
  95. Valueva, T.A., Kudryavtseva, N.N., Gvozdeva, E.L., Sof'in, A.V., Il'ina, N.A., Pobedinskaya, M.A., Elansky, S.N. (2013) Serine Proteinases Secreted by Two Isolates of the Fungus *Alternaria solani*, *J. Basic. App. Sci.*, **9**, 105–115.
  96. Valueva, T.A., Kudryavtseva, N.N., Sof'in, A.V., Revina, T.A., Gvozdeva, E.L., Ievleva, E.V. (2011) Comparative Analyses of Exoproteinases Produced by Three Phytopathogenic Microorganisms, *J. Pathog.* **2011**, 947218.
  97. Valueva T.A., Kudryavtseva N.N., Sof'in A.V., Zaitchik B.T., Pobedinskaya M.A., Kokaeva L.Y., Elansky S.N. (2015) Serine Exoproteinases Secreted by the Pathogenic Fungi of *Alternaria* Genus, *J. Plant Pathol. Microb.*, **6**, 272–279.
  98. van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H., Vervoort, J., de Wit, P.J. (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **19**, 1420–1430.
  99. van der Burgt, A., Karimi, J.M., Bahkali, A.H., de Wit, P.J. (2014) Pseudogenization in pathogenic fungi with different host plants and lifestyles might reflect their evolutionary past, *Molecular Plant Pathology*, **15**, 133–144.
  100. van der Hoorn, R.A., Jones, J.D. (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 400–407.
  101. van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**, 135–162.
  102. Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C. (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance, *Trends Plant Sci.*, **9**, 203–209.
  103. Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K.V., Cano, L.M., Chaparro-Garcia, A., Ammar, R., Staskawicz, B.J., Kamoun, S. (2007) Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes, *Plant Cell*, **19**, 2349–2369.
  104. Yike, I. (2011) Fungal proteases and their pathophysiological effects, *Mycopathol.*, **171**, 299–323.

- 
105. Zhu, M., Shao, F., Innes, R.W., Dixon, J.E., Xu, Z. (2004) The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB: a papain-like fold with a distinct substrate-binding site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 302–307.
106. Xia, Y. (2004) Proteases in pathogenesis and plant defence, *Cell Microbiol.*, **6**, 905–913.