



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА РОСТ КОЛОНИЙ И СТЕПЕНЬ СПОРУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ ПАТОГЕНА *STAGONOSPORA NODORUM*

Нужная Т.В.^{1,2}, Сорокань А.В.², Веселова С.В.^{2*}, Максимов И.В.²

¹ Уфимский институт биологии Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

*E-mail: veselova75@rambler.ru

В настоящее время фитогормоны цитокинины (ЦК) и абсцизовая кислота (АБК) рассматриваются как важные регуляторы взаимодействия между патогенами и растениями. Тем не менее, сведения о роли этих фитогормонов в патогенезе противоречивы, а информация о роли ЦК и АБК в регуляции процессов роста и развития грибов весьма ограничена. В данной работе было изучено влияния ЦК и АБК на рост колоний и степень споруляции различных изолятов патогена *Stagonospora nodorum* SnБ, Sn9МН-3А и Sn4ВД. Подбор концентраций фитогормонов осуществлялся с использованием изолята *S. nodorum* SnБ и было показано, что концентрация как ЦК, так и АБК 0.1 мкМ оказывала наибольшее влияние на споруляцию гриба и меньше всего ингибировала радиальный рост мицелия. Добавление в среду культивирования ЦК или АБК ингибировало рост мицелия, но увеличивало споруляцию агрессивных изолятов *S. nodorum* SnБ и Sn9МН-3А. Причем степень влияния АБК на споруляцию этих изолятов отличалась. Авирулентный изолят Sn4ВД в присутствии фитогормонов ЦК и АБК увеличивал свой радиальный рост, но не начинал спороносить. Таким образом, эффект ЦК и АБК на рост колоний и степень споруляции патогена *S. nodorum* может быть противоположным и зависеть, как от концентрации фитогормонов, так и от генотипа штамма патогена.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum* ♦ цитокинины ♦ абсцизовая кислота ♦ развитие грибов ♦ споруляция

INFLUENCE OF PHYTOHORMONES ON THE COLONIES GROWTH AND THE DEGREE OF SPORULATION OF DIFFERENT *STAGONOSPORA NODORUM* ISOLATES

Nuzhnaya T.V.^{1,2}, Sorokan A.V.², Veselova S.V.^{2*}, Maksimov I.V.²

¹ Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

*E-mail: veselova75@rambler.ru

Currently, the phytohormones cytokinins (CK) and abscisic acid (ABA) are considered as important regulators of the interaction between pathogens and plants. However, data on the role of these phytohormones in pathogenesis are contradictory, and information on the role of CK and ABA in the regulation of fungal growth and development is very limited. In this work, we studied the effects of CK and ABA on the growth of colonies and the degree of sporulation of various isolates of the pathogen *Stagonospora nodorum* SnB, Sn9MH-3A, and Sn4VD. The choice of phytohormone concentrations was carried out using the *S. nodorum* SnB isolate, and it was shown that the concentration of both CK and ABA, 0.1 μM, had the greatest effect on the sporulation of the fungus and inhibited the radial growth of the mycelium least of all. The addition of CK or ABA to the cultivation medium inhibited the growth of mycelium, but increased the sporulation of aggressive isolates of *S. nodorum* SnB and Sn9MH-3A. Moreover, the degree of influence of ABA on the sporulation of these isolates differed. The avirulent Sn4VD isolate increased its radial growth in the presence of the phytohormones CK and ABA, but did not begin to sporulate. Thus, the effect of CK and ABA on the growth of colonies and the degree of sporulation of the pathogen *S. nodorum* may be opposite and depend both on the concentration of phytohormones and on the genotype of the pathogen strain.

Keywords: *Stagonospora nodorum* ♦ cytokinins ♦ abscisic acid ♦ fungal development ♦ sporulation

Поступила в редакцию: 20.12.2022

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-1-1-13](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-1-1-13)

EDN: [EBQFWS](https://www.edn.ru/EBQFWS)



ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенные грибы – возбудители болезней сельскохозяйственных культур являются хорошими продуцентами биоактивных низкомолекулярных соединений, известных как вторичные метаболиты (ВМ), которые играют важную роль в развитии и размножении

грибов, поглощении минеральных элементов, защите от стрессовых факторов окружающей среды, а также могут определять вирулентность грибов при заражении растений [Chooi et al., 2014]. ВМ приводящие к повреждению или гибели растений, также известны как фитотоксины. Некоторые из этих фитотоксинов специфичны для хозяина, в то время как другие действуют против широкого круга растений-хозяев и способы их действия разнообразны. В последнее время из широкого спектра ВМ грибов большой интерес ученых привлекают гормоны, подобные структуре гормонам растений [Chanclud, Morel, 2016; Anand et al., 2022b; Chen et al., 2023].

Фитогормоны оказывают значительное влияние на рост, развитие, размножение и метаболизм растений [Robert-Seilaniantz et al., 2011; Fahad et al., 2015; Kazan, Lyons 2014; Shigenaga et al., 2017; Gilroy, Breen, 2022]. Кроме того, фитогормоны ауксины, цитокинины (ЦК), гиббереллины, этилен, абсцизовая кислота (АБК), жасмоновая и салициловая кислоты, индуцируют и координируют сигнальные пути, участвующие в различных реакциях растений на биотические и абиотические стрессовые факторы окружающей среды [Robert-Seilaniantz et al., 2011; Shigenaga et al., 2017; Gilroy, Breen, 2022]. Однако большинство классических фитогормонов также продуцируются патогенными и симбиотическими грибами [Chanclud, Morel, 2016]. На сегодняшний день считается, что гормоны, синтезируемые грибами, имеют два вектора действия. Первый вектор направлен на регуляцию взаимодействий с растениями и другими организмами. В этом случае гормоны играют роль эффекторов и могут определять степень вирулентности гриба. Как эффекторы гормоны регулируют проникновение гриба в растение и поглощение питательных веществ мицелием гриба [Chanclud, Morel, 2016]. Второй вектор направлен на регуляцию процессов роста и развития самих грибов, а также их адаптацию к условиям окружающей среды [Chanclud, Morel, 2016]. К сожалению, участие гормональных соединений, полученных из микроорганизмов, в развитии грибов и во взаимодействиях растений и грибов практически не изучено.

В настоящее время ЦК и АБК отводят важную роль в регуляции взаимодействия между патогенами и растениями [Robert-Seilaniantz et al., 2011; Kazan, Lyons 2014; Shigenaga et al., 2017; Gilroy, Breen, 2022]. Тем не менее, сведения о роли этих фитогормонов в патогенезе противоречивы, а информация о роли ЦК и АБК в регуляции процессов роста и развития грибов весьма ограничена [Chanclud, Morel, 2016; Anand et al., 2022b].

Цитокинины (ЦК) – большая группа фитогормонов, представляющая собой относительно простые производные аденина или аденозина, модифицированные по атому азота в 6-м положении шестичленного гетероцикла [Романов, 2009]. ЦК представлены множеством изоформ и выполняют в растениях многообразные функции [Романов, 2009]. Они регулируют рост и развитие растений, прорастание семян, апикальное доминирование, дифференцировку сосудов, биогенез хлоропластов, рост и ветвление корней, побегов и соцветий, старение листьев и взаимодействие растений с патогенами [Sakakibara, 2006; Романов, 2009; Choi et al., 2011; Anand et al., 2022b]. О функциях ЦК в грибах известно немного, но недавние работы показали, что ЦК могут влиять на развитие грибов [Gupta et al., 2021; Anand et al., 2022a]. В некоторых исследованиях было показано влияние ЦК на рост и развитие грибов и на поглощение питательных веществ [Chanclud, Morel, 2016]. Также, ЦК способствовали ветвлению эктомикоризного мицелия *in vitro* [Barker, Tagu, 2000], влияли дозозависимым образом на вязкость мембраны грибов и, следовательно, влияли на транспорт ионов и воды, а также ЦК оптимизировали рост мицелия некоторых грибов при действии тяжелых металлов или окислительного стресса [Gogala, 1991; Chanclud, Morel, 2016].

Некоторые биотрофные паразитические грибы, секретирующие ЦК могли манипулировать передачей сигналов ЦК в растениях, чтобы регулировать клеточный цикл хозяина и распределение питательных веществ [Gupta et al., 2021]. Однако другие исследования показали, что высокие уровни ЦК повышали устойчивость растений к бактериальным и грибковым патогенам, а экзогенное применение ЦК снижало заражение растений мучнистой росой, головневыми грибами и вирусами [Babosha, 2009; Grosskinski et al., 2011; Gupta et al., 2021]. Также в недавней работе было показано, что ЦК сильно ингибировали рост *Botrytis cinerea*, ослабляя клеточный цикл и снижая организацию цитоскелета [Gupta et al., 2021]. Таким образом, прямое воздействие ЦК на фитопатогены представляет большой интерес, а имеющиеся данные весьма противоречивы, поэтому этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Абсцизовая кислота (АБК) является важным сесквитерпеновым соединением и известна как растительный гормон, регулирующий стрессоустойчивость растений. Однако биосинтез АБК обнаружен в филогенетически широком диапазоне организмов [Hartung, 2010], от цианобактерий, грибов и губок до клетки человека [Gill, Patranabis, 2021]. В растениях АБК контролирует многочисленные физиологические процессы и наиболее известна своей регулирующей ролью в устойчивости к абиотическим стрессам, таким как засуха и засоление [Gilroy, Breen, 2022]. АБК также регулирует прорастание семян, вегетативный рост и состояние покоя почек, развитие и созревание плодов [Gilroy, Breen, 2022]. Однако, в отличие от растений, о биосинтезе и передаче сигналов АБК в других организмах известно мало. Так недавние исследования показали, что АБК может непосредственно влиять на рост и развитие грибов, увеличивать прорастание спор и образование апрессориев [Spence et al., 2015; Chen et al., 2023]. Кроме того, было высказано предположение, что АБК в грибах может контролировать поток воды и минеральных солей из почвы или из других структур грибов в гифы [Herrera-Medina et al., 2007]. Так в недавней работе анализ транскриптома, проведенный с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-seq) у мутантного штамма *Botrytis cinerea* ТВС-А, продуцирующего избыточное количество АБК, показал заметные транскрипционные изменения в углеводном обмене и транспорте сахара [Ding et al., 2016]. Недавно была показана роль грибной АБК в вирулентности патогена [Spence et al., 2015]. Интересно, что АБК также существует как коммуникативный сигнал между разными видами [Lievens et al., 2017]. Имеются сообщения о важной роли АБК в установлении совместимых мутуалистических взаимодействий с растениями у микоризных грибов и ризосферных бактерий [Herrera-Medina et al., 2007; Salomon et al., 2014; Lievens et al., 2017]. По этим причинам очень важно понимать механизм действия АБК в нерастительных организмах. Будет очень интересно выяснить биологическое значение АБК как «универсальной сигнальной молекулы» [Chen et al., 2023].

У одной из важнейших продовольственных культур - пшеницы (*Triticum aestivum* L.) - возбудители грибковых болезней представляют наибольшую угрозу, ежегодно приводя к значительным потерям урожая [Chooi et al., 2014]. Среди наиболее важных грибковых болезней пшеницы можно назвать желтую пятнистость, вызываемую *Pyrenophora tritici-repentis*, септориоз листьев и колоса, вызываемый *Stagonospora nodorum* или *Zymoseptoria tritici*, желтую ржавчину пшеницы, вызываемую *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* и фузариоз, вызываемый *Fusarium graminearum* [Chooi et al., 2014].

Stagonospora nodorum Berk. относится к порядку Pleosporales класса Dothideomycetes (телеоморфа *Phaeosphaeria nodorum*, *Parastagonospora nodorum*) и является одним

из наиболее вредоносных некротрофных патогенов пшеницы, может заражать все надземные части растений, включая колосья пшеницы, что приводит к серьезным потерям урожая [Downie et al. 2021]. Несмотря на важность *S. nodorum* среди болезней пшеницы, спектр ВМ этого гриба изучен плохо. Известно, что *S. nodorum* продуцирует белковые некротрофные эффекторы (НЭ) в качестве основных факторов патогенности, каждый из которых взаимодействует со специфическим геном восприимчивости пшеницы, такое взаимодействие названо доминирующей восприимчивостью и осуществляется по типу ген-на-ген в зеркальном отражении [Haugrud et al, 2022]. Кроме белковых ВМ *Stagonospora nodorum* продуцирует низкомолекулярные ВМ септорины, меллеины и микофеноловые кислоты [Chooi et al., 2014]. Ничего не известно о синтезе и секреции *S. nodorum* гормонов. Ранее нами было показано, что ЦК и салициловая кислота играют важную роль в индукции защитных реакций растений пшеницы к *S. nodorum*, а эффектор патогена индуцирует сигнальный путь этилена в растениях для установления совместимых взаимодействий [Veselova et al., 2021a].

В связи с этим, целью наших исследований было изучение влияния ЦК и АБК на рост колоний и степень споруляции различных изолятов патогена *Stagonospora nodorum* SnБ, Sn9МН-3А и Sn4ВД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Объектами исследования служили изоляты гриба *S. nodorum*: Sn4ВД, SnБ и Sn9МН-3А (из коллекции Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия).

Условия проведения экспериментов. Все изоляты *S. nodorum* содержали при 4°C на зернах ячменя. Исследования проводили в асептических условиях. Для получения препарата спор гриба споро-мицелиальную массу зерен ячменя замачивали в стерильной дистиллированной воде, затем суспензию спор наносили на поверхность картофельно-глюкозного агара и выдерживали в термостате при 18°C в течение 14 суток. Из полученных колоний для дальнейших экспериментов использовали участки мицелия (или мицелия со спорами) 5x5 мм, которые переносили на среды с добавлением гормонов и без таковых.

Обработка фитогормонами. В среду культивирования (КГА) перед автоклавированием (2540ML, Tuttnauer, Израиль) добавляли зеатин (Merck KGaA, Sigma-Aldrich, Германия) или абсцизовую кислоту (Merck KGaA, Sigma-Aldrich, Германия) в разных конечных концентрациях от 10^{-9} до 10^{-7} М (от 0.001 до 0.1 мкМ). Затем изоляты *S. nodorum* культивировали на средах в течение 14 суток при 18°C.

Ростовые характеристики и спорообразование. Измерение диаметра колоний и площади мицелия проводили на 5, 7 и 14 сутки роста. Интенсивность споруляции оценивали визуально и путем прямого подсчета на 14 сутки. Для подсчета спор поверхность колоний заливали 5 мл дистиллированной воды и инкубировали в течение 10 минут, споры в аликвотах подсчитывали с использованием камеры Фукса-Розенталя [Нетрусов и др., 2005]. Об интенсивности споруляции судили по количеству спор в 1 см² колонии. Изображения получали при помощи сканера Scanjet G4050 (HP, США) или фотоаппарата SP-800UZ Image Stabilization (Olympus, Индонезия).

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты повторяли 3 раза в трех биологических повторах. На гистограммах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Достоверность

различий между вариантами опыта оценивали с помощью теста Дункана при доверительном уровне $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были использованы три изолята *S. nodorum* SnБ, Sn9МН-3А и Sn4ВД, отличающиеся вирулентностью по отношению к растению-хозяину. Ранее нами было показано, что изолят SnБ содержал в геноме гены двух НЭ – SnToxA и SnTox3 и был вирулентным по отношению к генотипам пшениц, несущим соответствующие гены восприимчивости комплементарные данным эффекторам [Veselova et al., 2021b]. Изолят *S. nodorum* Sn9МН-3А также содержал в геноме гены двух НЭ – SnToxA и SnTox3, но был более агрессивным, чем изолят SnБ. Изолят *S. nodorum* Sn4ВД содержал в геноме гены трех НЭ – SnTox1, SnToxA и SnTox3, но был авирулентным, слабо заражал восприимчивые генотипы пшениц [Veselova et al., 2021b].

Мы сравнили радиальный рост, морфологию и спорообразование изолятов *S. nodorum* SnБ, Sn9МН-3А и Sn4ВД, культивируемых на КГА (рис. 1А).

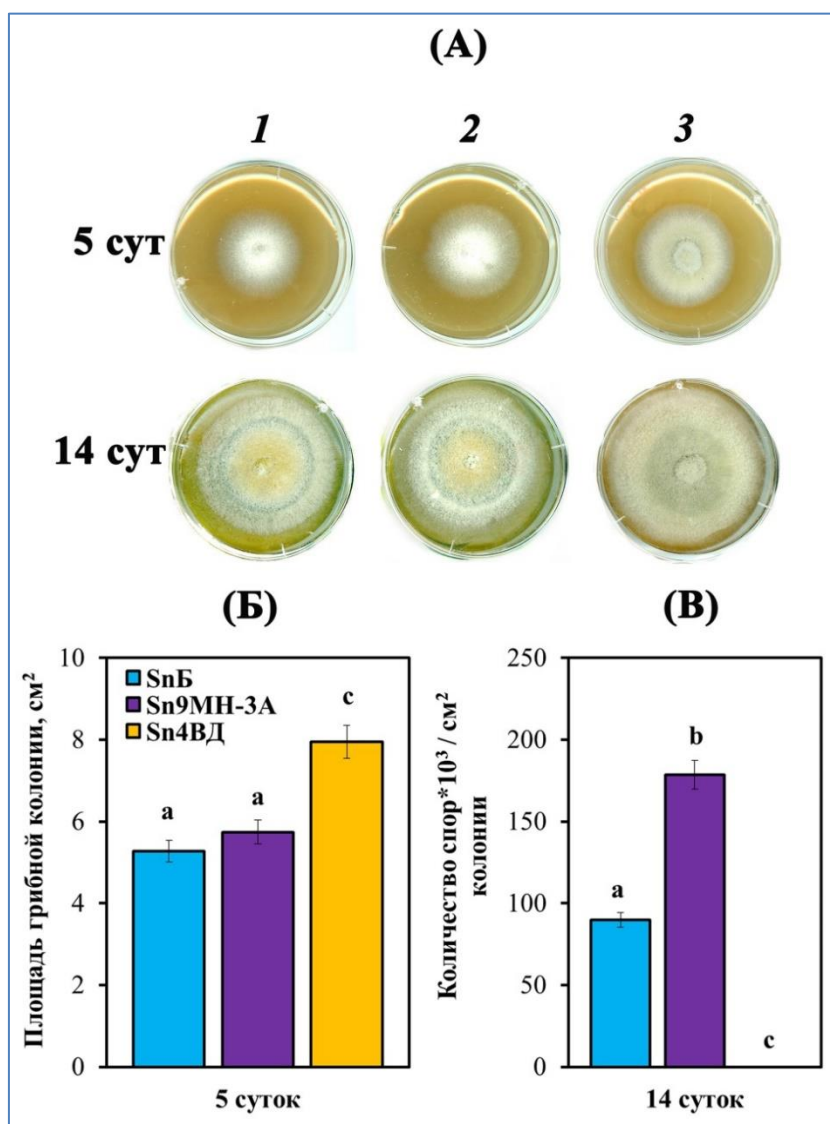


Рис. 1. Морфология (А), площадь колоний на 5-е сутки роста (Б) и спорообразование на 14-е сутки роста (В) изолятов *S. nodorum* SnБ (1), Sn9МН-3А (2) и Sn4ВД (3), культивируемых на КГА. Латинские буквы на гистограммах показывают статистически достоверные различия между вариантами по критерию Дункана ($p \leq 0,05$).

У изолята SnБ спороношение начиналось на 3-и сутки культивирования. Изолят Sn9МН-3А начинал спороносить на 2-е сутки культивирования раньше, чем изолят SnБ. Изолят Sn4ВД отличался от других изолятов очень толстым мицелиальным слоем без спор. Площадь мицелия у изолята Sn4ВД на 5-е сутки культивирования составила 8 см², при этом площадь мицелия двух других вирулентных изолятов SnБ и Sn9МН-3А была примерно одинаковой и на 28 – 34% меньше, чем у авирулентного изолята Sn4ВД (рис. 1Б). Споры были обнаружены только у двух вирулентных изолятов SnБ и Sn9МН-3А (рис. 1В). При культивировании этих изолятов в одинаковых условиях количество спор у изолята Sn9МН-3А было в 2 раза больше, чем у изолята SnБ (рис. 1В).

Известно, что фитогормоны могут влиять на рост и развитие грибов [Chanclud, Morel, 2016; Anand et al., 2022b]. Для изучения влияния ЦК и АБК на рост и спорообразование гриба *S. nodorum* было использовано несколько концентраций фитогормонов 0,1, 0,01 и 0,001 мкМ, которые добавляли в среду культивирования изолята SnБ (рис. 2А).

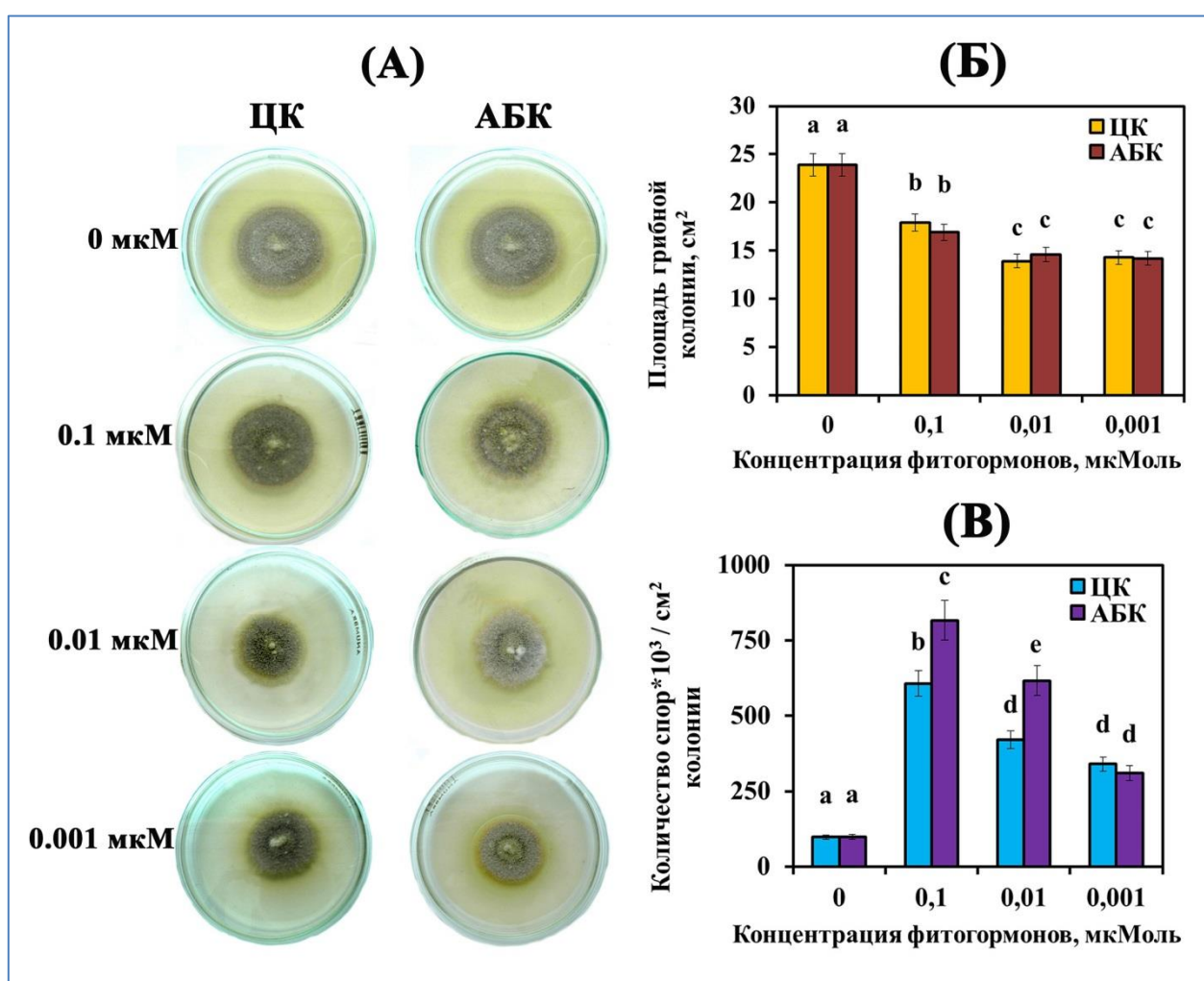


Рис. 2. Влияние различных концентраций фитогормонов АБК и ЦК (от 0,001 до 0,1 мкМ) на морфологию (А), радиальный рост мицелия (Б) и споруляцию (В) изолята *S. nodorum* SnБ, культивируемого на КГА в течение 7 суток (А) и 14 суток (Б, В). 0 мкМ – среда КГА без добавления фитогормонов.

Наши результаты показали, что фитогормоны ЦК и АБК не влияли на внешний вид мицелия (рис. 2А). Однако фитогормоны влияли на рост грибной колонии, уменьшая площадь мицелия в равной степени (рис. 2Б). Низкие концентрации фитогормонов 0,001 и 0,01 мкМ как ЦК, так и АБК снижали площадь мицелия на 39 – 42% по сравнению

с контролем (рис. 2Б). Более высокая концентрация ЦК и АБК 0.1 мкМ влияла на рост в меньшей степени, снижая площадь мицелия всего на 25 и 29%, соответственно (рис. 2Б).

Недавно было проведено исследование по изучению прямого влияния различных концентраций ЦК (зеатина) и их аналогов (6-бензиламинопурина (6-БАП), кинетина, аденина и нециклического тидиазурона – ЦК бактериального происхождения (TDZ)) на рост различных патогенов томата [Gupta et al., 2021]. Были выбраны три гриба с различным образом жизни и способами заражения: *Botrytis cinerea*, некротрофный спорообразующий аскомицет, вызывающий серую гниль; *Sclerotium rolfsii*, почвенный некротрофный базидиомицет, который не образует спор и вызывает южную склероциальную гниль; и *Fusarium oxysporum*, почвенный гембиотрофный аскомицет, вызывающий фузариозное увядание специфичным для хозяина образом [Gupta et al., 2021]. Все использованные ЦК и их аналоги ингибировали рост грибов, выращиваемых на чашках с картофельно-декстрозным агаром. Так *in vitro* 6-БАП в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 100 мкМ ингибировал рост *B. cinerea* от 20 до 60%, ингибирование роста *S. rolfsii* в том же диапазоне концентраций было относительно сходным с ингибированием роста *B. cinerea* от 25 до 43% [Gupta et al., 2021]. Наименьший эффект 6-БАП оказывал на рост *F. oxysporum*, независимо от концентраций 6-БАП рост гриба тормозился на 20% [Gupta et al., 2021].

Данных по влиянию экзогенной АБК на рост мицелия грибов нет. Однако есть данные по мутанту *B. cinerea* со сверхпродукцией АБК (ТВС-А) и дефициту по синтезу АБК мутанту (Δ Vcfrp1) [Ding et al., 2016; Chen et al., 2023]. Гиперпродуцирующий АБК мутант *B. cinerea* ТВС-А (2 г/л) фенотипически отличался от родительского штамма *B. cinerea* ТВС-6 более быстрым ростом, меньшим спорообразованием и меньшей пигментацией мицелия [Ding et al., 2016]. Другими словами штамм ТВС-6, который продуцировал АБК в 1000 раз меньше мутантного штамма (2 мкг/мл) медленнее рос, лучше спороносил и вырабатывал больше меланина, чем мутант *B. cinerea* ТВС-А [Ding et al., 2016]. У дефицитного по синтезу АБК мутанту *B. cinerea* Δ Vcfrp1 было обнаружено снижение радиального роста и снижение экспрессии ключевых синтетических генов меланина по сравнению с материнским штаммом *B. cinerea* ТВ-31 (с продуктивностью АБК 0.55 г/л), который также является мутантным сверхпродуцирующим АБК штаммом, полученным от природного штамма ТВС-6 [Chen et al., 2023]. Делая вывод на основе этих данных, можно однозначно сказать только, что АБК необходима для нормального роста грибов, но ее действие будет дозозависимым.

Уменьшение роста мицелия грибной колонии было компенсировано увеличением споробразования при добавлении в среду культивирования, как ЦК, так и АБК (рис. 2В). АБК увеличивала споруляцию гриба в большей степени, чем ЦК, особенно в более высоких концентрациях 0.1 и 0.01 мкМ (рис. 2В). Наибольшее влияние на споруляцию гриба оказывала концентрация фитогормонов 0.1 мкМ (рис. 2В). При добавлении в среду культивирования 0.1 мкМ ЦК споруляция изолята SnБ увеличивалась в 6 раз, а при добавлении такой же концентрации АБК споруляция повышалась в 8 раз (рис. 2В). С уменьшением концентрации фитогормонов – уменьшалось их влияние на споруляцию гриба, однако даже в самой низкой концентрации 0.001 мкМ фитогормоны повышали спорообразование в 3 – 3.5 раза (рис. 2В).

Бесполое спорообразование у мицелиальных грибов типа Аскомицеты (*Ascomycota*), к которым относится патоген *S. nodorum*, включает регуляцию экспрессии генов, специализированную клеточную дифференцировку и реакцию на факторы окружающей среды. Весь процесс споруляции регулируется множеством генетических элементов, которые направляют экспрессию генов, необходимых для правильного вегетативного роста

и созревания спор [Park, Yu, 2012]. Наиболее подробная и глубокая характеристика механизма бесполого спорообразования у аскомицетов была получена на модельном сапрофитном грибе *Aspergillus nidulans* [Park, Yu, 2012]. О регуляции споруляции *S. nodorum* известно мало. Так было показано, что для споруляции *S. nodorum* необходим маннитол [Solomon et al., 2006], трегалоза [Lowe et al., 2009], а также были получены сведения о регуляции процесса спорообразования специфическим грибным транскрипционным фактором SnStuA [IpCho et al., 2010].

Информация о прямом влиянии ЦК и АБК на споруляцию аскомицетов ограничена, этот вопрос практически не изучен. В основном сообщается о влиянии ЦК на поступление питательных веществ в гифы гриба или на вирулентность патогена, что косвенно указывает на роль ЦК в спорообразовании [Anand-Gupta 2022a]. Еще в 1960-х гг. сообщалось о влиянии ЦК на размножение у аскомицетов [Lee, 1961]. Также сообщалось, что у шляпочного гриба пилолистника тигрового *Lentinus tigrinus* (тип Basidiomycota) высокие количества ЦК наблюдались в шляпках во время образования базидиоспор [Anand-Gupta 2022a]. Однако есть одна работа, в которой сообщается, что при добавлении в среду культивирования *B. cinerea* 0.1 мкМоль ЦК (6-БАП) спорообразование уменьшалось на 50% по сравнению с контролем [Gupta et al., 2021]. Прямому влиянию АБК на споруляцию аскомицетов посвящена одна работа, в которой показано, что экзогенная АБК увеличивала прорастание спор и образование апрессориев у некротрофного гриба *Magnaporthe oryzae* [Spence et al., 2015]. В другой работе показано, что в присутствии АБК бактерия *Pseudomonas syringae* DC3000 размножалась более быстро и с более высоким титром [de Torres-Zabala et al., 2007]. Таким образом, данные литературы недостаточны и противоречивы, поэтому необходимо дальнейшее изучение этого вопроса.

В дальнейшем исследовании с другими изолятами *S. nodorum* мы использовали концентрацию фитогормонов ЦК и АБК 0.1 мкМ, так как она оказала наибольшее влияние на споруляцию гриба и меньше всего ингибировала радиальный рост мицелия (рис. 2). Изоляты *S. nodorum* SnБ и Sn9МН-3А показали примерно одинаковую скорость роста (рис. 1Б). Влияние ЦК и АБК на радиальный рост этих изолятов было также примерно одинаковым. Оба фитогормона в одинаковой степени ингибировали рост мицелия этих изолятов (рис. 3). В отличие от агрессивных изолятов SnБ и Sn9МН-3А, авирулентный изолят Sn4ВД в присутствии фитогормонов ЦК и АБК увеличивал свой радиальный рост (рис. 3). Обработка ЦК увеличивала площадь мицелия изолята Sn4ВД на 50% по сравнению с необработанным контролем (рис. 3Б). А обработка АБК увеличивала площадь мицелия изолята Sn4ВД на 38% по сравнению с необработанным контролем (рис. 3Б).

Несмотря на то, что в недавней работе была продемонстрирована роль ЦК в прямом ингибировании роста грибковых фитопатогенов [Gupta et al., 2021], скорее всего ЦК могут играть двойную роль в развитии грибов, при этом приоритет роли определяется доступностью сахара [Anand et al., 2022a]. Было показано, что в богатой сахаром среде ЦК сильно ингибировали рост *B. cinerea* и нарушали регуляцию организации цитоскелета. Этот эффект уменьшался по мере снижения доступности сахара [Anand et al., 2022a]. При низкой доступности сахара ЦК способствовали увеличению использования сахара, повышению гликолиза, что приводило к увеличению потребления энергии у *B. cinerea* и способствовало стимуляции роста грибного мицелия как *in vitro*, так и *in planta* [Anand et al., 2022a]. На бедной сахаром среде ЦК значительно усиливали экспрессию переносчиков сахара в грибе [Anand et al., 2022a]. Таким образом, эффект ЦК на развитие грибов, вероятно, зависит от энергетического статуса самих грибов.

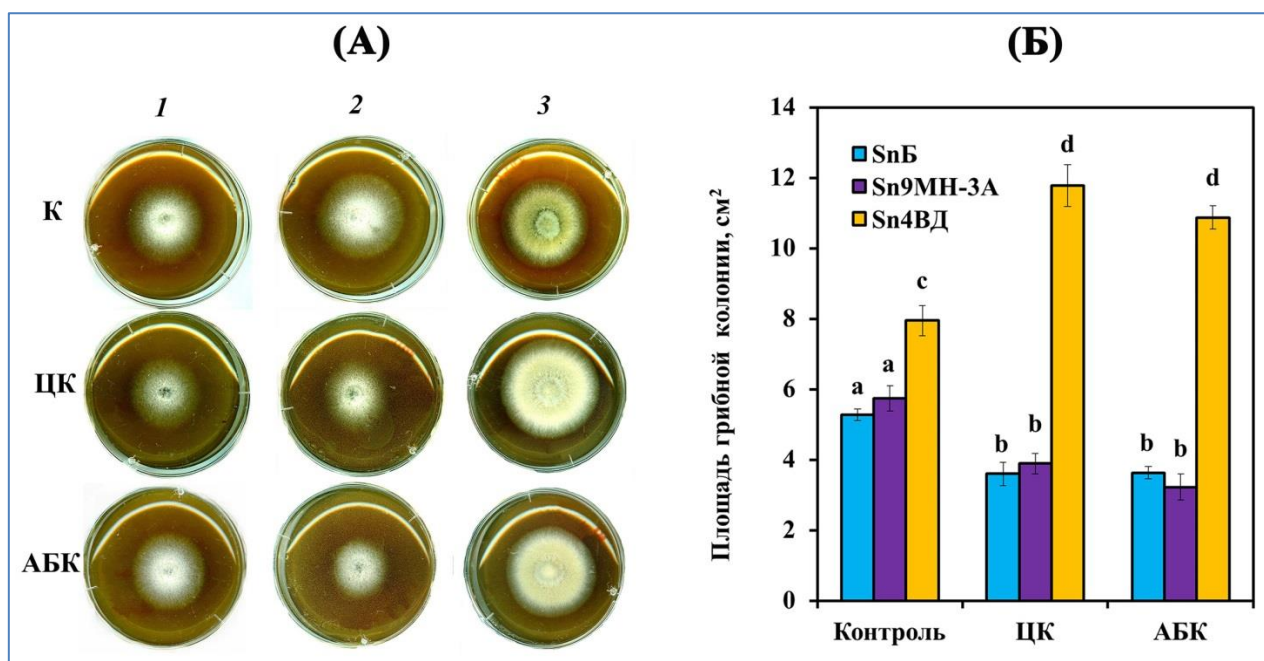


Рис. 3. Влияние АБК и ЦК в концентрации 0.1 мкМ на морфологию (А) и радиальный рост мицелия (Б) изолятов *S. nodorum* SnБ (1), Sn9МН-3А (2) и Sn4ВД (3), культивируемых на КГА в течение 5 суток. К – контроль, среда КГА без добавления фитогормонов. Латинские буквы на гистограммах показывают статистически достоверные различия между вариантами по критерию Дункана ($p \leq 0,05$).

Для АБК были обнаружены сходные с ЦК механизмы влияния на рост. [Ding et al., 2016]. Чем больше штамм *B. cinerea* продуцировал АБК, тем он быстрее рос и набирал биомассу, такой эффект АБК связывают с активацией в углеводном обмене и транспорте сахара [Ding et al., 2016]. Моносахариды и дисахариды, такие как глюкоза, галактоза, ксилоза, сахароза, лактоза и мальтоза, являются питательными веществами, которые могут транспортироваться переносчиками сахара или пермеазами в клетки грибов [Ding et al., 2016]. Сравнительный транскриптомный анализ показал, что значительное количество генов, кодирующих транспортеры сахаров и гликозидгидролаз (GH), были активизированы у гиперпродуцирующего АБК мутанта *B. cinerea* ТВС-А по сравнению с его родительским штаммом *B. cinerea* ТВС-6, особенно во время поздней экспоненциальной и стационарной фаз процесса ферментации [Ding et al., 2016]. В другой работе было показано, что дефицитный по синтезу АБК мутант *B. cinerea* ΔVcfrp1 набирал биомассу меньше на 57%, чем его родительский штамм ТВ-31, и при этом не мог расти на среде КГА с добавлением сахарозы, но рос на среде с добавлением глюкозы, мальтозы или лактозы [Chen et al., 2023]. Таким образом, оба фитогормона ЦК и АБК играют важную роль в росте и развитии грибов посредством регуляции углеводного обмена.

В дальнейшем нами было изучено влияние фитогормонов на споруляцию разных изолятов *S. nodorum* (рис. 4). Добавление в среду культивирования АБК оказывало более существенное влияние по сравнению с ЦК на споруляцию изолята SnБ (рис. 4А,Б). Другую реакцию мы наблюдали у изолята Sn9МН-3А (рис. 4В,Г). Добавление в среду культивирования ЦК увеличивало споруляцию изолята Sn9МН-3А в 6 раз, также как у изолята SnБ (рис. 4Б,Г). Добавление в среду культивирования АБК увеличивало споруляцию изолята Sn9МН-3А всего в 4 раза (рис. 4Г). Такое влияние АБК на споруляцию было в 2 раза слабее, чем для изолята SnБ (рис. 4Б). Добавление фитогормонов в среду культивирования авирулентного изолята Sn4ВД не индуцировало споруляции (рис. 4Д,Е).

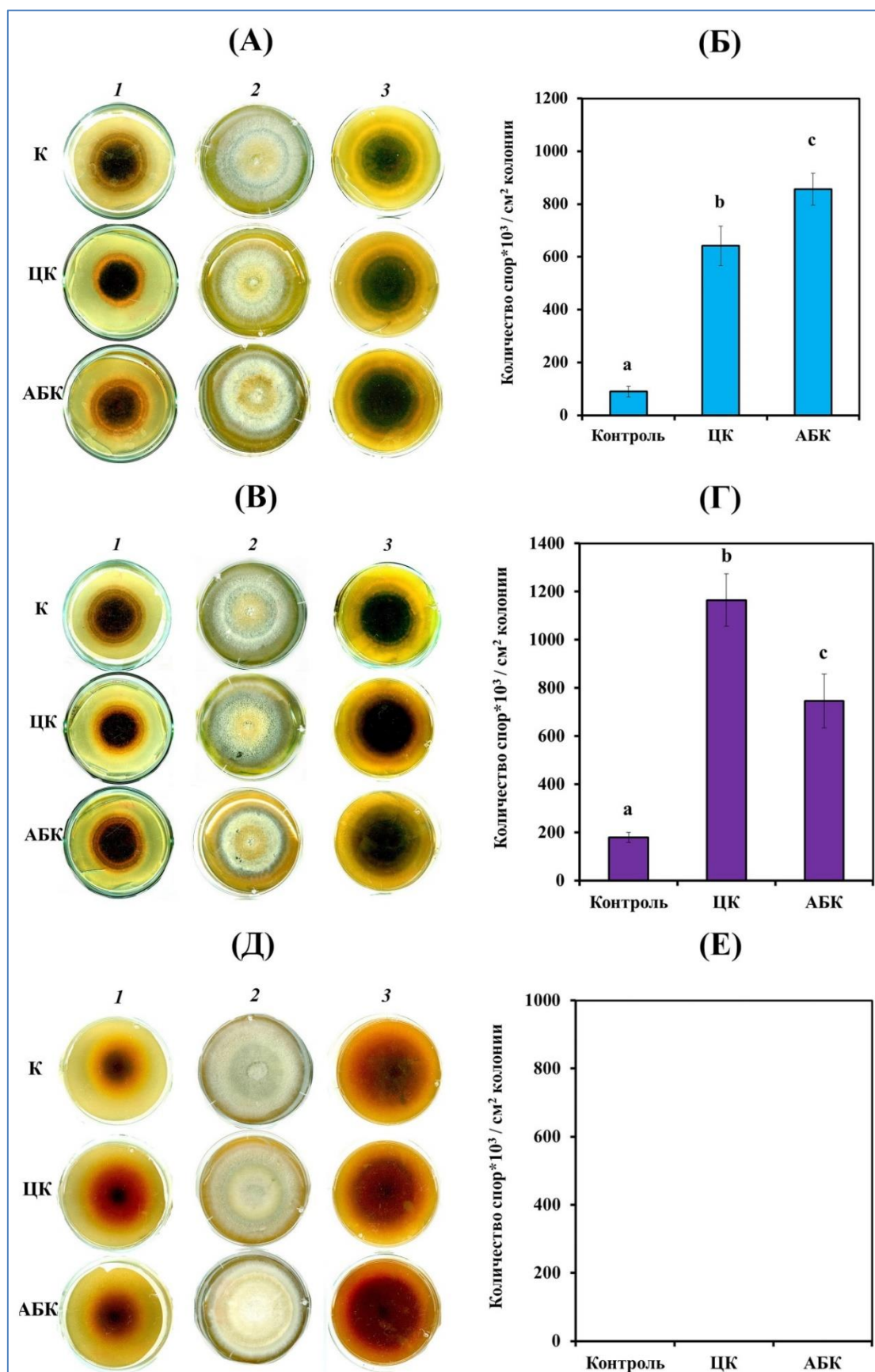


Рис. 4. Влияние АБК и ЦК в концентрации 0.1 мкМ на морфологию (А, В, Д) в течение 5 суток (1) и 14 суток (2, 3) культивирования на среде КГА и на споруляцию через 14 суток роста (Б, Г, Е) изолятов *S. nodorum* SnБ (А, Б), Sn9МН-3А (В, Г) и Sn4ВД (Д, Е). Цифры 1,3 - вид снизу, споруляция, 2 - вид сверху, морфология мицелия. Латинские буквы на гистограммах показывают статистически достоверные различия между вариантами по критерию Дункана ($p \leq 0,05$).

S. nodorum – грибковый патоген, возбудитель пятнистости листьев и колосковых чешуек пшеницы – является полициклическим патогеном. Болезнь обычно начинается с прорастания половых аскоспор на проростках пшеницы в начале вегетационного периода. Последующие поражения производят бесполое пикнидиоспоры, размещенные в пикнидах. Инфекционный цикл продолжается путем расселения пикнидиоспор с одного листа на другой, при этом пикнидиоспоры прикрепляются к ткани пшеницы и колонизируют ее, а затем снова образуют споры в течение 2-3 недель. Таким образом, для повреждающей инфекции необходимо несколько циклов заражения. Следовательно, бесполое спороношение этого полициклического заболевания имеет решающее значение для патогена, вызывающего потерю урожая [IpCho et al., 2010]. Предыдущие исследования *S. nodorum* выявили несколько генов и метаболических путей, участвующих в бесполом спороношении [Solomon et al., 2006; Lowe et al., 2009]. Дефекты спорообразования имели мутанты гриба, которые не могли перерабатывать или синтезировать определенные углеводы или не имели регуляторных элементов углеводного обмена, таких как SnStuA [Solomon et al., 2006; Lowe et al., 2009; IpCho et al., 2010]. Также в некоторых работах было показано, что фитогормоны ЦК и АБК играют важную роль в регуляции углеводного обмена у аскомицетов [Ding et al., 2016; Anand et al., 2022a; Chen et al., 2023]. Таким образом, неоспорима роль этих фитогормонов в регуляции процесса споруляции у грибковых патогенов. Однако этот вопрос требует дальнейшего глубокого изучения.

Таким образом, наши результаты выявили регуляторную роль ЦК и АБК в процессах роста, развития и бесполого размножения грибкового патогена *S. nodorum*. В данной работе показано, что влияние фитогормонов на эти процессы может быть противоположным и зависеть, как от концентрации фитогормонов, так и от генотипа штамма патогена. Мы предполагаем, что влияние фитогормонов на рост и споруляцию патогена *S. nodorum* осуществляется посредством регуляции углеводного обмена.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта МК-2293.2022.1.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др.; под ред. А.И. Нетрусова. М.: Изд. Центр «Академия». 2005. 608 с.
2. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 295–319.
3. Anand G., Gupta R., Bar M. Cytokinin Regulates Energy Utilization in *Botrytis cinerea* // Cytokinin and Botrytis Energy Status. 2022(a). V. 10 (4). DOI: [10.1128/spectrum.00280-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.00280-22)
4. Anand G., Gupta R., Marash I., Leibman-Markus M., Bar M. Cytokinin production and sensing in fungi // Microbiological Research. 2022(b). V. 262. 127103. DOI: [10.1016/j.micres.2022.127103](https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127103)
5. Babosha A.V. Regulation of resistance and susceptibility in wheat powdery mildew pathosystem with exogenous cytokinins // J Plant Physiol. 2009. V. 166. P. 1892–1903. DOI: [10.1016/j.jplph.2009.05.014](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.014)
6. Barker S., Tagu D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses // J. Plant Growth Regul. 2000. V. 19. P. 144–154. DOI: [10.1007/s003440000021](https://doi.org/10.1007/s003440000021)
7. Chanclud E., Morel J.-B. Plant hormones: a fungal point of view // Molecular plant pathology. 2016. V. 17(8). P. 1289–1297. DOI: [10.1111/mpp.12393](https://doi.org/10.1111/mpp.12393)

8. Chen D., Shu D., Wei Z., Luo D., Yang J., Li Z., Tan H. Combined transcriptome and proteome analysis of Bcfrp1 involved in regulating the biosynthesis of abscisic acid and growth in *Botrytis cinerea* TB-31 // *Front. Microbiol.* 2023. 13:1085000. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1085000](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1085000)
9. Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C.-M., Hwang I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16. P. 388–394. DOI: [10.1016/j.tplants.2011.03.003](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.003)
10. Chooi Y.-H., Muria-Gonzalez M.J., Solomon P.S. A genome-wide survey of the secondary metabolite biosynthesis genes in the wheat pathogen *Parastagonospora nodorum*. *Mycology.* 2014. V. 5 (3). P. 192–206. DOI: [10.1080/21501203.2014.928386](https://doi.org/10.1080/21501203.2014.928386)
11. Ding Z., Zhang Z., Zhong J., Luo D., Zhou J., Yang J., Xiao L., Shu D., Tan H. Comparative transcriptome analysis between an evolved abscisic acid-overproducing mutant *Botrytis cinerea* TBC-A and its ancestral strain *Botrytis cinerea* TBC-6 // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. 37487. DOI: [10.1038/srep37487](https://doi.org/10.1038/srep37487)
12. Downie R.C., Lin M., Corci B., Ficke A., Lillemo M., Oliver R.P., Phan H.T.T., Tan K.-C., Cockram J. Septoria nodorum blotch of wheat: Disease management and resistance breeding in the face of shifting disease dynamics and a changing environment // *Phytopathology.* 2021. V. 111. P. 906-920. DOI: [10.1094/PHYTO-07-20-0280-RVW](https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0280-RVW)
13. Fahad S., Nie L., Chen Y., Wu C., Xiong D., Saud S., Hongyan L., Cui K., Huang J. // *Crop Plant Horm. Environ. Stress.* 2015. P. 371–400. DOI: [10.1007/978-3-319-09132-7_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7_10)
14. Gill A., Patranabis S. Phytohormones as potential anticancer agents // *Int. J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* 2021. V. 8. P. 37–43. DOI: [10.31033/ijrasb.8.3.7](https://doi.org/10.31033/ijrasb.8.3.7)
15. Gilroy E., Breen S. Interplay between phytohormone signalling pathways in plant defence – other than salicylic acid and jasmonic acid // *Essays in Biochemistry.* 2022. V. 66. P. 657–671. DOI: [10.1042/EBC20210089](https://doi.org/10.1042/EBC20210089)
16. Gogala, N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi // *Experientia.* 1991. V. 47. P. 331–340. DOI: [10.1007/BF01972074](https://doi.org/10.1007/BF01972074)
17. Grosskinsky D.K., Naseem M., Abdelmohsen U.R., Plickert N., Engelke T., Griebel T., Zeier J., Novak O., Strnad M., Pfeifhofer H., van der Graaff E., Simon U., Roitsch T. Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 815–830. DOI: [10.1104/pp.111.182931](https://doi.org/10.1104/pp.111.182931)
18. Gupta R., Anand G., Pizarro L., Laor Bar-Yosef D., Kovetz N., Sela N., Yehuda T., Gazit E., Bar M. Cytokinin inhibits fungal development and virulence by targeting the cytoskeleton and cellular trafficking // *mBio.* 2021. V. 12. e03068–20. DOI: [10.1128/mBio.03068-20](https://doi.org/10.1128/mBio.03068-20)
19. Hartung W. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen // *Funct. Plant Biol.* 2010. V. 37. P. 806–812. DOI: [10.1071/FP10058](https://doi.org/10.1071/FP10058)
20. Haugrud A.R.P., Zhang Z., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of resistance to Septoria nodorum blotch in wheat // *Theoretical and Applied Genetics.* 2022. V. 135. P. 3685–3707. DOI: [10.1007/s00122-022-04036-9](https://doi.org/10.1007/s00122-022-04036-9)
21. Herrera-Medina M.J., Steinkellner S., Vierheilig H., Ocampo Bote J.A., García Garrido J.M. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza // *New Phytol.* 2007. V. 175. P. 554–564. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2007.02107.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02107.x)
22. IpCho S.V.S., Tan K.-C., Koh G., Gummer J., Oliver R.P., Trengove R.D., Solomon P.S. The Transcription Factor StuA Regulates Central Carbon Metabolism, Mycotoxin Production, and Effector Gene Expression in the Wheat Pathogen *Stagonospora nodorum* // *Eukaryotic cell.* 2010. V. 9. (7). P. 1100–1108. DOI: [10.1128/EC.00064-10](https://doi.org/10.1128/EC.00064-10)

23. Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors // *The Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 2285–2309. DOI: [10.1105/tpc.114.125419](https://doi.org/10.1105/tpc.114.125419)
24. Lee B.O. Effect of kinetin on the fertility of some strains of *Neurospora crassa* // *Nature*. 1961. V. 192. 288-288. DOI: [10.1038/192288a0](https://doi.org/10.1038/192288a0)
25. Lievens L, Pollier J, Goossens A, Beyaert R, Staal J. Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8. 587. DOI: [10.3389/fpls.2017.00587](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00587)
26. Lowe R.G.T., Lord M., Rybak K., Trengove R.D., Oliver R.P., Solomon P.S. Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum* // *Fungal Genet. Biol*. 2009. V. 46. P. 381–389. DOI: [10.1016/j.fgb.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.002)
27. Park H.-S., Yu J.-H. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi // *Curr Opin Microbiol*. 2012. V. 15(6). P. 669-77. DOI: [10.1016/j.mib.2012.09.006](https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.006)
28. Robert-Seilaniantz A., Grant M. Jones J.D.G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate–salicylate antagonism // *Annu. Rev. Phytopathol*. 2011. V. 49. P. 317–343. DOI: [10.1146/annurev-phyto-073009-114447](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447)
29. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2006. V. 57. P. 431–449. DOI: [10.1146/annurev](https://doi.org/10.1146/annurev)
30. Salomon M.V., Bottini R., de Souza Filho G.A., Cohen A. C., Moreno D., Gil M., Piccoli P. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defenserelated terpenes in in vitro cultured grapevine // *Physiol. Plant*. 2014. V. 151. P. 359–374. DOI: [10.1111/ppl.12117](https://doi.org/10.1111/ppl.12117)
31. Shigenaga A.M., Berens M.L., Tsuda K. Argueso C.T. Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity // *Curr. Opin. Plant Biol*. 2017. V. 38. P. 164–172. DOI: [10.1016/j.pbi.2017.04.021](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.021)
32. Solomon P.S., Waters O.D.C., Jorgens C.I., Lowe R.G.T., Rechberger J., Trengove R.D., Oliver R.P. Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch) // *Biochem. J*. 2006. V. 399. P. 231–239. DOI: [10.1042/BJ20060891](https://doi.org/10.1042/BJ20060891)
33. Spence C.A., Lakshmanan V., Donofrio N., Bais H.P. Crucial roles of abscisic acid biogenesis in virulence of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* // *Front. Plant Sci*. 2015. V. 6. 1082. DOI: [10.3389/fpls.2015.01082](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01082)
34. de Torres-Zabala M., Truman W., Bennett M.H., Lafforgue G., Mansfield J.W., Egea P.R., Bogre L., Grant M. *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease // *The EMBO Journal*. 2007. V. 26. P. 1434–1443. DOI: [10.1038/sj.emboj.7601575](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601575)
35. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rummyantsev S.D., Khusnutdinova E.K., Maksimov I.V. Ethylene-cytokinin interaction determines early defense response of wheat against *Stagonospora nodorum* Berk. *Biomolecules*. 2021(a). V. 11. 174. DOI: [10.3390/biom11020174](https://doi.org/10.3390/biom11020174)
36. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Burkhanova G.F., Rummyantsev S.D., Maksimov I.V. Reactive oxygen species in host plant are required for an early defense response against attack of *Stagonospora nodorum* Berk. necrotrophic effectors SnTox // *Plants*. 2021(b). V. 10. 1586. DOI: [10.3390/plants10081586](https://doi.org/10.3390/plants10081586)

Цитировать как

Нужная Т.В., Сорокань А.В., Веселова С.В., Максимов И.В. Влияние фитогормонов на рост колоний и степень споруляции различных изолятов патогена *Stagonospora nodorum* // *Экобиотех*, 2023. Том 6, № 1 С. 1-13 DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-1-1-13](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-1-1-13), EDN: EBOQFWS

Cited as

Nuzhnaya T.V., Sorokan A.V., Veselova S.V., Maksimov I.V. Influence of phytohormones on the colonies growth and the degree of sporulation of different *Stagonospora nodorum* isolates. *Ékobioteh*. 2023. V. 6(1). P. 1-13 DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-1-1-13](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-1-1-13), EDN: EBOQFWS (In Rus.)