



**РОЛЬ ФИТОГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЭФФЕКТОРОВ
И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ ПАТОГЕНА
STAGONOSPORA NODORUM В КУЛЬТУРЕ**

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

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

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

e-mail: veselova75@rambler.ru

Резюме

Возбудитель септориоза пшеницы патогенный гриб *Stagonospora nodorum* Berk. является одним из наиболее вредоносных патогенов пшеницы. У возбудителя идентифицированы некротрофные эффекторы (НЭ), обеспечивающие вирулентность штаммов *S. nodorum* к растению-хозяину, в геноме которых присутствует соответствующий эффектору доминирующий ген восприимчивости. В настоящее время, изучение регуляции экспрессии генов, ответственных за вирулентность, становится все более актуальной задачей. Недавно была установлена роль различных транскрипционных факторов (ТФ) в регуляции экспрессии генов эффекторов у грибных патогенов. Однако появляются новые данные о влиянии гормонов на рост, развитие и вирулентность патогенных грибов. В связи с этим целью наших исследований было изучение влияния цитокининов (ЦК) и абсцизовой кислоты (АБК) на экспрессию генов НЭ *SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3*, и ТФ *SnStuA*, *SnPpf2* и *SnCon7* у различных изолятов патогена *S. nodorum* SnB, Sn4VD, Sn9MN-3A и Sn1SP, отличающихся вирулентностью. Наши результаты показали, что интенсивность экспрессии генов НЭ и ТФ была связана с агрессивностью изолята патогена, а экспрессия генов ТФ коррелировала с экспрессией генов НЭ. Наибольшая экспрессия генов НЭ была обнаружена у изолятов SnB и Sn1SP. Добавление в среду культивирования гормонов АБК или ЦК в основном положительно влияло на экспрессию генов НЭ и ТФ. Обработка АБК повышала экспрессию всех трех генов НЭ *SnToxA*, *SnTox3* и *SnTox1*. Обработка ЦК однозначно положительно влияла только на экспрессию гена *SnTox3*. Выдвигается предположение о косвенном влиянии гормонов на факторы вирулентности посредством регуляции процессов роста и метаболизма грибов.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum*, некротрофные эффекторы, транскрипционные факторы, цитокинины, абсцизовая кислота, развитие грибов, вирулентность.

Цитирование: Нужная Т.В., Сорокань А.В., Веселова С.В., Шеин М.Ю., Максимов И.В. Роль фитогормонов в регуляции экспрессии генов эффекторов и специфических факторов транскрипции патогена *Stagonospora nodorum* в культуре // *Biomics*. 2023. Т.15(2). С.60-72. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-9

© Авторы

**THE ROLE OF PHYTOHORMONES IN THE REGULATION OF EXPRESSION OF EFFECTOR GENES
AND SPECIFIC TRANSCRIPTION FACTORS OF *STAGONOSPORA NODORUM* IN CULTURE**

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

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

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

e-mail: veselova75@rambler.ru

Resume

The causative agent of wheat blotch the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum* Berk. is one of the most harmful wheat pathogens. Necrotrophic effectors (NE) have been identified in the pathogen, which ensure the virulence of *S. nodorum* strains to the host plant, in the genome of which the dominant susceptibility gene corresponding to the effector is present. Currently, the study of the regulation of the genes expression responsible for virulence is becoming an increasingly important objective. Recently, the role of various transcription factors (TFs) in the regulation of effector genes expression in the fungal pathogens has been established. However, new data are emerging on the effect of hormones on the growth, development, and virulence of pathogenic fungi. Therefore, the aim of our research was to study the effect of cytokinins (CK) and abscisic acid (ABA) on the expression of the NE *SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3*, and TF *SnStuA*, *SnPf2*, and *SnCon7* genes in various isolates of the pathogen *S. nodorum* SnB, Sn4VD, Sn9MN-3A, and Sn1SP, which differ in virulence. Our results showed that the intensity of NE and TF gene expression was associated with the aggressiveness of the pathogen isolate, and TF gene expression correlated with NE gene expression. The highest expression of NE genes was found in SnB and Sn1SP isolates. When the hormones ABA or CK were added to the cultivation medium, they mainly had a positive effect on the expression of the NE and TF genes. ABA treatment increased the expression of all three NE genes *SnToxA*, *SnTox3*, and *SnTox1*. Treatment with CK had a positive effect only on the expression of the *SnTox3* gene. Based on the results, an assumption was made about the indirect effect of hormones on virulence factors through the regulation of growth and metabolism of fungi.

Keywords: *Stagonospora nodorum*, necrotrophic effectors, transcription factors, cytokinins, abscisic acid, fungal development, virulence.

Citation: Nuzhnaya T.V., Sorokan A.V., Veselova S.V., Shein M.Yu., Maksimov I.V. The role of phytohormones in the regulation of expression of effector genes and specific transcription factors of *Stagonospora nodorum* in culture. *Biomics*. 2023. V.15(2). P. 60-72. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-9 (In Russian)

© The Authors

Введение

В последние три-четыре десятилетия на посевах пшеницы по всему миру стали прогрессировать возбудители различных видов пятнистостей. Возбудитель септориоза пшеницы патогенный гриб *Stagonospora nodorum* Berk. относится к порядку Pleosporales класса Dothideomycetes (телеоморфа *Phaeosphaeria nodorum*, *Parastagonospora nodorum*) и является одним из наиболее вредоносных патогенов пшеницы [Haugrud et al., 2022]. Патоген может заражать все надземные части растений, включая колосья пшеницы, вызывая их некротические и хлоротические поражения, что приводит к серьезным потерям урожая [Downie et al. 2021]. Патоген *S. nodorum* широко распространен в регионах выращивания пшеницы, включая Северную Америку, Австралию, Европу и Азию, где может нанести серьезный экономический ущерб [Haugrud et al., 2022].

Несмотря на то, что исследование септориоза интенсивно ведется последние 20 лет и у возбудителя идентифицированы некротрофные эффекторы (НЭ) [Liu et al., 2004; Friesen et al., 2008; Zhang et al., 2011; Phan et al., 2016; Richards et al., 2022], механизм устойчивости/восприимчивости пшеницы к

заболеванию до конца не раскрыт. Однако показано, что НЭ обеспечивают вирулентность штаммов *S. nodorum* к растению-хозяину, в геноме которых присутствует соответствующий эффектору доминирующий ген восприимчивости [Haugrud et al., 2022]. К настоящему времени у *S. nodorum* идентифицированы и в разной степени охарактеризованы восемь НЭ: SnToxA, SnTox1, SnTox2, SnTox3, SnTox4, SnTox5, SnTox6 и SnTox7 [Faris et al., 2010; Zhang et al. 2011; Liu et al., 2012; Richards et al. 2022; Kariyawasam et al. 2021]. Недавно эксперименты по клонированию генов показали, что НЭ SnTox2, SnTox6 и SnTox7 представляют собой один и тот же белок, и поэтому НЭ был переименован в SnTox267 [Richards et al., 2022]. Из всех НЭ SnToxA, SnTox1 и SnTox3 идентифицированы на геном и белковом уровнях и считаются самыми распространенными среди штаммов и изолятов патогена [Phan et al., 2016; John et al., 2022].

Несмотря на то, что у *S. nodorum* найдены основные факторы вирулентности – НЭ, во многих случаях их роль остается неясной. На сегодняшний день считается, что основной функцией НЭ у патогена *S. nodorum* является индукция гибели клеток хозяина с помощью манипулирования защитными сигнальными

путями растения, в том числе гормональными [MakDonald, Solomon, 2018; Veselova et al., 2021a]. В литературе есть много примеров, как патогены с помощью эффекторов манипулируют гормональными сигнальными системами растений, во-первых, подавляя биосинтез самого фитогормона, во-вторых, взаимодействуя с участниками данного сигналинга [Kazan, Lyons, 2014]. Однако механизмы, лежащие в основе этого процесса у патогена *S. nodorum*, в настоящее время только изучаются [MakDonald, Solomon, 2018; Veselova et al., 2021a]. А вопрос о роли фитогормонов в регуляции работы эффекторов патогена остается открытым.

Очевидно, что изучение механизмов регуляции экспрессии генов эффекторов, являющихся ключевыми детерминантами патогенности грибов, откроет возможности для разработки новых стратегий защиты растений. Однако экспрессия генов НЭ у патогена *S. nodorum* сложна, и знание о том, как гены НЭ регулируются, все еще практически отсутствует. Недавние успехи в секвенировании и аннотировании геномов грибов выявили повсеместное распространение множества консервативных регуляторных элементов – транскрипционных факторов (ТФ) из широкого круга семейств [John et al., 2021]. Становится все более очевидным, что ТФ играют существенную роль в регуляции экспрессии генов НЭ [John et al., 2021]. Несколько недавних исследований продемонстрировали роль различных ТФ в регуляции экспрессии генов эффекторов у грибных патогенов, в том числе у *S. nodorum* [John et al., 2021]. Так было показано, что ТФ SnPf2 положительно регулировал экспрессию генов НЭ *S. nodorum* *SnToxA* и *SnTox3* [Rybak et al., 2017], а ТФ SnStuA и SnCon7 регулировали экспрессию гена НЭ *SnTox3* [IpCho et al., 2010; Lin et al., 2018; John et al., 2021]. Кроме прямой регуляции экспрессии генов НЭ эти ТФ играют роль регуляторов многих процессов в организме патогена, таких как углеводный обмен, рост гиф, биосинтез ферментов и споруляция, также влияющих на вирулентность патогена [John et al., 2021]. Наряду с ТФ рост, развитие и вирулентность патогенов регулируют гормоны грибного происхождения, которые играют важную роль в жизни грибов [Chanclud, Morel, 2016]. Однако роль гормонов в регуляции вирулентности патогенов, экспрессии генов НЭ и ТФ практически не изучена.

В связи с этим целью наших исследований было изучение влияния цитокининов (ЦК) и абсцизовой кислоты (АБК) на экспрессию генов НЭ *SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3*, и ТФ *SnStuA*, *SnPf2* и *SnCon7* у различных изолятов патогена *S. nodorum* SnB, Sn4VD, Sn9MN-3A и Sn1SP.

Материалы и методы

Объектами исследования служили изоляты гриба *S. nodorum*: SnB, Sn4VD, Sn9MN-3A и Sn1SP (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 споромицелиальную массу зерен ячменя замачивали в стерильной дистиллированной воде, затем суспензию спор наносили на поверхность картофельно-глюкозного агара (КГА) 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 жидкие среды КГА с и без добавления фитогормонов.

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 конечной концентрации 10^{-7} Моль (0.1 мкМоль). Затем изоляты *S. nodorum* культивировали на средах в течение 14 суток при 18°C.

Анализ экспрессии генов. Суммарную РНК выделяли из мицелия четырех изолятов *S. nodorum* SnB, Sn4VD, Sn9MN-3A и Sn1SP через 2, 3, 4, 7 и 14 суток культивирования на жидкой среде КГА реагентом TRIzol™ (Sigma, Германия) согласно протоколу фирмы-поставщика.

Анализ экспрессии генов НЭ и ТФ (*SnToxA*, *SnTox1*, *SnTox3*, *SnStuA*, *SnPf2* и *SnCon7*) в различных изолятах *S. nodorum* проводили с помощью метода количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с применением интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Для нормирования результатов экспрессии исследуемых генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессирующегося тубулина *S. nodorum* (S56922). ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров, разработанных с помощью онлайн ресурса IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home>). Последовательности праймеров представлены в Таблице 1. Изменения в экспрессии интересующего гена определяли по вычислению уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения CFX Connect real-time PCR Detection System (BioRad, США) методом дельта-дельта Ct как описано ранее [Rumyantsev et al., 2023].

Таблица 1.

Последовательности праймеров, используемых для количественной ПЦР в режиме реального времени
Table 1 - Primer sequences used for real-time quantitative PCR

Ген Gene	Вид праймера Primer type	Нуклеотидная последовательность (5'→3') Nucleotide sequence (5'→3')	Номер гена/локуса Gene/locus number
<i>SnToxA</i>	Forward	AACGCCAATACAGTGCAGT	JX997419
	Reverse	GCTGCATTCTCCAATTTTCACG	
<i>SnTox1</i>	Forward	GTAATCCCGTACGTAATCTTCT	JX997402
	Reverse	CGCTTGTTTGCCGTTCTTAC	
<i>SnTox3</i>	Forward	CGAGCTGATATCCCGTTTGA	FJ823644
	Reverse	GGGACAGTGACAATAGGTAAGG	
<i>SnStuA</i>	Forward	ACCACCGTCTAGCAATCTTTAC	SNOG-14941
	Reverse	GGTATCCTTGGCTCGCATATT	
<i>SnPf2</i>	Forward	CATTCATCAGTCTCTGGAACCG	SNOG-00649
	Reverse	CGAATCTCGACGCCTTGGG	
<i>SnCon7</i>	Forward	CTCACGAGCTTTGACGACTT	SNOG-08362
	Reverse	CATGACCCATCCGTAAGAGAG	
<i>Snβ-tubulin</i>	Forward	ACACCAGGAACAACCTGCTAACAGC	S56922
	Reverse	TATGCGCGCGTGCTGCAAATTCGA	

Статистическая обработка результатов.

Все эксперименты повторяли 3 раза в трех биологических повторах. На графиках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам.

Результаты и обсуждение

Патоген *S. nodorum* использует НЭ в качестве факторов вирулентности на пшенице, несущей соответствующие доминантные гены восприимчивости [Haugrud et al., 2022]. Этот факт хорошо доказан с помощью мутантов *S. nodorum*, несущих делеции в генах эффекторов, у которых происходила потеря вирулентности [Rybak et al., 2017]. При этом различные штаммы и изоляты *S. nodorum* отличаются друг от друга по набору генов НЭ и по уровню патогенности. В нашей работе были использованы четыре изолята *S. nodorum* SnB, Sn4VD, Sn9MN-3A и Sn1SP отличающиеся вирулентностью по отношению к растению-хозяину. Ранее нами было показано, что изолят SnB 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* Sn9MN-3A также содержал в геноме гены двух НЭ – SnToxA и SnTox3, и был агрессивным. Изолят *S. nodorum* Sn4VD содержал в геноме гены трех НЭ – SnTox1, SnToxA и SnTox3, но был авирулентным, слабо заражал восприимчивые генотипы пшениц и не спороносил [Veselova et al., 2021b]. Изолят *S. nodorum* Sn1SP содержал в геноме ген

одного НЭ – SnTox1, и был вирулентным по отношению к генотипам пшениц несущим соответствующий ген восприимчивости [Нужная и др., 2022].

Ген эффектора *SnToxA* кодирует пептид размером 13,2 кДа, который приводит к коллапсу фотосинтеза и вызывает некрозы и хлорозы в тканях растений, несущих ген *Tsn1* [Faris et al., 2010]. Ген *SnTox1* кодирует цистеин-богатый пептид с хитин-связывающим мотивом размером 10,3 кДа. НЭ SnTox1 вызывает образование некрозов, за счет СВЧ-реакции, способствует проникновению мицелия в ткани листа хозяина на пшенице с геном *Snn1* локализованным на 1BS хромосоме [Liu et al., 2012]. Ген *SnTox3* кодирует пептид 17,5 кДа с 6 остатками цистеина, чувствительность пшеницы к этому НЭ определяется двумя генами *Snn3-B1* и *Snn3-D1*, локализованными на 5BS и 5DS хромосомах пшеницы, соответственно [Zhang et al., 2011]. SnTox3 влияет на процесс фотосинтеза, активирует фенилпропаноидный метаболизм и экспрессию ряда генов защитных белков, а также индуцирует накопление метионина и синтез этилена у растений [Winterberg et al., 2014].

Различный уровень патогенности среди штаммов и изолятов *S. nodorum* связывают с разным уровнем экспрессии генов НЭ [Faris et al., 2011; Phan et al., 2016; Rybak et al., 2017; Haugrud et al., 2019; John et al., 2022]. Для изучения экспрессии генов, кодирующих факторы вирулентности патогена, в культуре в нашей работе были выбраны четыре временные точки: 2 суток – рост мицелия до начала споруляции; 3 и 4 суток – начало споруляции; 7 суток – активная споруляция; 14 суток – продолжение роста и споруляции.

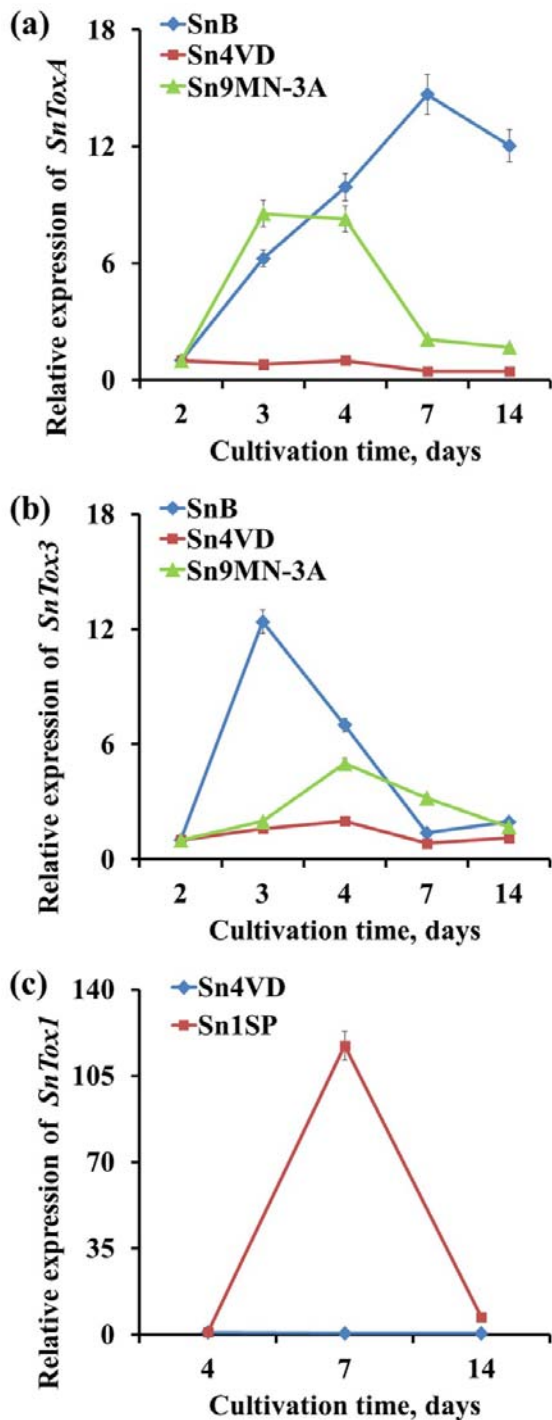


Рис. 1. Экспрессия генов некротрофных эффекторов *SnToxA* (a), *SnTox3* (b) и *SnTox1* (c) у четырех изолятов *S. nodorum* SnB, Sn9MN-3A, Sn4VD и Sn1SP в течение 14 суток роста колоний гриба.

Fig. 1. The expression of necrotrophic effector genes *SnToxA* (a), *SnTox3* (b), and *SnTox1* (c) in four isolates of *S. nodorum* SnB, Sn9MN-3A, Sn4VD, and Sn1SP during 14 days of fungal colonies growth.

Экспрессия гена *SnToxA* была изучена у трех изолятов патогена SnB, Sn4VD и Sn9MN-3A (рис. 1a). У двух агрессивных изолятов SnB и Sn9MN-3A было обнаружено увеличение экспрессии гена *SnToxA* на третьи и четвертые сутки культивирования, во время начала споруляции примерно в 6 – 10 раз по сравнению со вторыми сутками культивирования (до споруляции) (рис. 1a). Однако существенная разница в экспрессии гена *SnToxA* была обнаружена между двумя этими изолятами через семь суток культивирования, во время активной споруляции (рис. 1a). У изолята SnB транскрипция гена *SnToxA* увеличилась в 15 раз, а у изолята Sn9MN-3A было обнаружено снижение экспрессии этого гена всего лишь до двукратного увеличения от начального уровня вторых суток культивирования (рис. 1a). У авирулентного изолята Sn4VD экспрессия гена *SnToxA* не повышалась, а на 7 и 14 сутки культивирования даже снижалась, при этом изолят не спороносил (рис. 1a). Таким образом, у трех изолятов SnB, Sn4VD и Sn9MN-3A характер экспрессии гена *SnToxA* был различным, что возможно связано с разной вирулентностью изолятов.

Так в двух ранних работах сравнивали вирулентность разных штаммов *S. nodorum*, экспрессирующих ген НЭ *SnToxA* и сделали вывод о том, что более высокая экспрессия гена НЭ приводит к повышенным уровням заболеваемости пшеницы, однако не смогли определить причину дифференциальной экспрессии *SnToxA* у разных изолятов, но предположили, что это может быть связано с регуляторными генами [Friesen et al., 2006; Faris et al., 2011]. В более поздней работе было продемонстрировано, что присутствие генетических полиморфизмов в промоторной области (делеции и SNP) гена *SnToxA* объясняло дифференциальную экспрессию между двумя штаммами *S. nodorum* во время роста *in vitro*, что подтверждает предположение выдвинутое ранее [Rybak et al., 2017].

Экспрессия гена *SnTox3* была также изучена у трех изолятов SnB, Sn4VD и Sn9MN-3A (рис. 1b). У изолята SnB наблюдали наибольшее повышение экспрессии гена *SnTox3* среди трех изолятов на третьи сутки культивирования, во время начала споруляции, в 12 раз по сравнению с уровнем до споруляции (рис. 1b). Затем наблюдали постепенное снижение экспрессии, и к седьмым суткам культивирования экспрессия была на уровне как до споруляции (рис. 1b). У изолята Sn9MN-3A обнаружено повышение экспрессии гена *SnTox3* на четвертые и седьмые сутки культивирования во время споруляции в 3 – 5 раз, а затем снижение до начального уровня экспрессии (рис. 1b). У авирулентного изолята Sn4VD экспрессия гена *SnTox3* практически не изменялась, за исключением четвертых суток культивирования,

когда было обнаружено повышение экспрессии гена *SnTox3* в 2 раза, но при этом изолят не спороносил (рис. 1b). Таким образом, изученные изоляты SnB, Sn4VD и Sn9MN-3A отличались по характеру экспрессии второго гена НЭ *SnTox3*, что также может быть связано с разной вирулентностью изолятов.

В работах других исследователей у различных штаммов *S. nodorum*, отличающихся по степени вирулентности в отношении пшеницы с геном *Snn3* был обнаружен разный уровень экспрессии гена *SnTox3* [Phan et al., 2016]. Причем штамм SN15 с более низкой экспрессией был менее агрессивным, но при добавлении к нему фильтра, содержащего НЭ *SnTox3*, его вирулентность увеличивалась [Phan et al., 2016]. Дифференциальную экспрессию гена *SnTox3* между штаммами патогена авторы объяснили эпистатическим взаимодействием между разными НЭ [Phan et al., 2016].

Экспрессия гена *SnTox1* была изучена у двух изолятов Sn4VD и Sn1SP (рис. 1c). У авирулентного изолята Sn4VD обнаружено снижение экспрессии гена *SnTox1* во время культивирования *in vitro* (рис. 1c). У вирулентного изолята Sn1SP обнаружили повышение экспрессии гена *SnTox1* через семь суток культивирования в фазу активного спороношения в 117 раз по сравнению с 4-и сутками культивирования, которым соответствует начало спороношения (рис. 1c).

Экспрессия гена *SnTox1* также различается среди изолятов *S. nodorum* [John et al., 2022]. Так экспрессия *SnTox1* была намного выше в изолятах SN2000 и SN15, чем в изолятах SN4 и SN6, и это коррелировало с более сильным развитием заболевания, опосредованным взаимодействием *SnTox1*-*Snn1* [Liu et al., 2004; Liu et al., 2012; Haugrud et al., 2019]. Механизмы, лежащие в основе этой дифференциальной экспрессии, оставались до недавнего времени неизученными, однако между изолятами был выявлен полиморфизм промоторной области гена *SnTox1* [Haugrud et al., 2019]. И в недавней работе у изолята SN4 в промоторной области гена *SnTox1* выявили регуляторный элемент размером 401 п.н., расположенный на 267 п.н. выше стартового кодона, который способствовал репрессии транскрипции гена и снижал вирулентность изолята [John et al., 2022]. Точный механизм остается неясным, но можно заключить, что новый полиморфный регуляторный элемент PE401, вероятно, является мишенью для специфичных к последовательности белков-репрессоров [John et al., 2022].

В настоящее время в связи с появлением новых агрессивных рас патогенов, изучение регуляции экспрессии генов, ответственных за вирулентность, становится все более актуальной задачей. Недавно было установлено значение некоторых ТФ как регуляторных элементов,

нацеленных на ключевые пути вирулентности патогенов [John et al., 2021]. В нашей работе была изучена экспрессия трех таких генов ТФ *S. nodorum* *SnPf2*, *SnStuA* и *SnCon7* у трех изолятов SnB, Sn4VD и Sn9MN-3A (рис. 2).

Экспрессия гена *SnPf2* имела различный характер у всех трех изолятов (рис. 2a). У изолята SnB повышение экспрессии гена этого ТФ наблюдали в начале споруляции, затем экспрессия гена достигала двукратного пика на четвертые сутки культивирования, далее снижалась и на 14-е сутки культивирования была ниже начального уровня (2-е суток) (рис. 2a). У изолята Sn9MN-3A обнаружили индукцию повышения экспрессии гена *SnPf2* на четвертые сутки культивирования, далее экспрессия продолжала повышаться до 14-х суток, достигая 1.5 кратного превышения начального уровня (рис. 2a). У изолята Sn4VD после четырех суток культивирования наблюдали снижение экспрессии гена *SnPf2* на 70% по сравнению с начальным уровнем (рис. 2a). Таким образом, самая высокая экспрессия гена *SnPf2* во время культивирования была обнаружена у изолята SnB (рис. 2a), что может быть связано с высокой экспрессией генов *SnTox3* и *SnToxA* у этого изолята по сравнению с другими изолятами (рис. 1).

ТФ Pf2 обнаружен у *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium verticillioides*, *S. nodorum*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Zymoseptoria tritici* [John et al., 2021]. Функции ТФ Pf2 связывают с регуляцией вирулентности у грибковых фитопатогенов порядка Pleosporales [John et al., 2021].

Функциональный анализ показал, что *SnPf2* действует как положительный регулятор экспрессии *SnToxA* и *SnTox3*, но не *SnTox1* [Rybak et al., 2017]. Делеция гена *SnPf2* у *S. nodorum* приводила к подавлению экспрессии генов НЭ, *SnToxA* и *SnTox3*, что приводило к потере специфичной для хозяина вирулентности на пшенице [Rybak et al., 2017].

Самое большое повышение экспрессии гена ТФ *SnStuA* было обнаружено у изолята SnB через трое и четверо суток (начало споруляции) культивирования в 3 и 3.7 раза по сравнению со вторыми сутками (до споруляции), затем экспрессия несколько снижалась, но была выше начального уровня в 2 раза (рис. 2b). У изолята Sn9MN-3A повышение экспрессии гена *SnStuA* примерно в 3 раза наблюдали на четвертые и седьмые сутки культивирования, затем экспрессия снижалась (рис. 2b). У изолята Sn4VD с третьих суток культивирования наблюдали снижение экспрессии гена ниже начального уровня (рис. 2b). Таким образом, характер экспрессии гена ТФ *SnStuA* у изолятов SnB и Sn9MN-3A совпадал с характером экспрессии гена НЭ *SnTox3* (рис. 1). Однако у изолята SnB экспрессия гена *SnTox3* и гена *SnStuA* была гораздо выше, чем у изолята Sn9MN-3A (рис. 1, рис. 2).

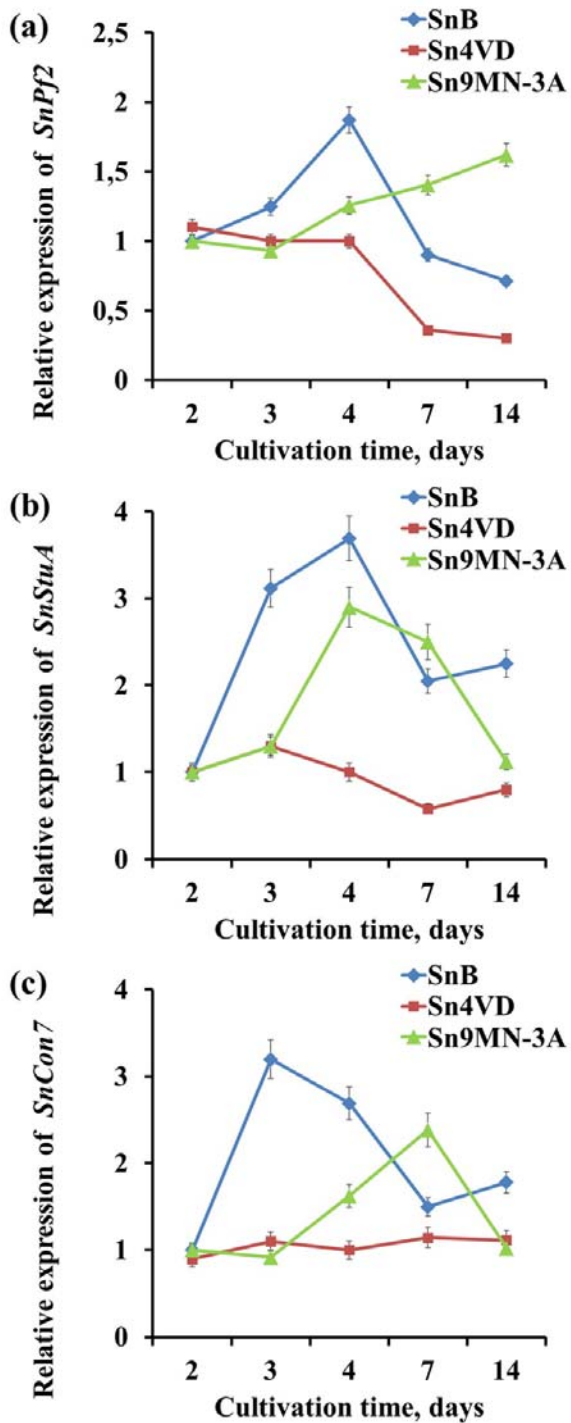


Рис. 2. Экспрессия генов факторов транскрипции *SnPf2* (a), *SnStuA* (b) и *SnCon7* (c) у трех изолятов *S. nodorum* SnB, Sn9MN-3A и Sn4VD в течение 14 суток роста колоний.

Fig. 2. The expression of transcription factors genes *SnPf2* (a), *SnStuA* (b), and *SnCon7* (c) in three isolates of *S. nodorum* SnB, Sn9MN-3A, and Sn4VD during 14 days of fungal colonies growth.

ТФ семейства bHLH подсемейства ASPES (Asm1/Phd1/Sok2/Efg1/StuA) StuA обнаружен у следующих патогенов: *Aspergillus fumigatus*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *Leptosphaeria maculans*, *M. oryzae*, *S. nodorum*, *Ustilago maydis*, *Verticillium dahliae*, *Z. tritici* [John et al., 2021]. ТФ StuA отвечает не только за выработку эффекторов и вирулентность, но также за споруляцию, образование склероций, меланизацию и половое размножение [John et al., 2021]. У *S. nodorum* была установлена роль SnStuA в развитии и вирулентности [IpCho et al., 2010]. Исследования экспрессии генов НЭ *S. nodorum* показали, что SnStuA является положительным регулятором *SnTox3*, но не требуется для экспрессии *SnToxA* [IpCho et al., 2010].

У изолята SnB максимальное повышение экспрессии гена ТФ *SnCon7* в 3.2 раза наблюдали через трое суток культивирования, затем экспрессия гена *SnCon7* снижалась почти до начального уровня к седьмым и 14-м суткам культивирования (рис. 2c). У изолята Sn9MN-3A на четвертые сутки культивирования обнаружили увеличение экспрессии гена *SnCon7*, которая достигала максимума на седьмые сутки культивирования, а затем снижалась до начального уровня (рис. 2c). У авирулентного изолята Sn4VD не обнаружено изменений в экспрессии гена *SnCon7* (рис. 2c). Таким образом, характер экспрессии гена ТФ *SnCon7* у изолятов SnB и Sn9MN-3A совпадал с характером экспрессии гена НЭ *SnTox3* (рис. 1).

Представитель семейства C2H2 ТФ Con7 был первоначально идентифицирован у *M. oryzae* [John et al., 2021]. С тех пор были охарактеризованы ортологи у других патогенов. Эти исследования продемонстрировали, что Con7 является важным фактором, контролирующим рост гиф и вторжение гриба в ткань хозяина [John et al., 2021]. Сайленсинг *SnCon7* у *S. nodorum* привел к снижению вирулентности изолята и подавлению экспрессии гена *SnTox3*, демонстрируя, что ТФ играет позитивную регулируемую роль в экспрессии этого гена [Lin et al., 2018]. Кроме того, было доказано, что *SnCon7* напрямую соединяется с промоторной областью гена *SnTox3* и является прямым его регулятором [Lin et al., 2018]. ТФ *SnCon7* также регулировал экспрессию двух других генов НЭ *SnTox1* и *SnToxA*, однако эта регуляция была косвенной [Lin et al., 2018].

Таким образом, наибольшая экспрессия генов НЭ была обнаружена у изолятов SnB (*SnToxA*, *SnTox3*) и Sn1SP (*SnTox1*) (рис.1), а наибольшая экспрессия генов ТФ обнаружена у изолята SnB (рис. 2). Изолят Sn9MN-3A обладал средней экспрессией, а изолят Sn4VD – самой низкой экспрессией изученных генов (рис. 1, рис. 2). Следовательно, интенсивность экспрессии генов НЭ и ТФ была взаимосвязана с агрессивностью изолята патогена. Кроме того, экспрессия генов ТФ коррелировала с экспрессией генов НЭ, что предполагает их регуляторную роль и совпадает с данными литературы [John et al., 2021].

Таблица 2.

Влияние АБК на экспрессию генов некротрофных эффекторов и генов факторов транскрипции *S. nodorum* в культуре
 Table 2 - Effect of ABA on the expression of the NE and TF genes of *S. nodorum* in culture

Относительная экспрессия генов НЭ и ТФ, % / Relative expression of NE and TF genes, %*					
Гены Genes	Изоляты <i>S. nodorum</i> Isolates of <i>S. nodorum</i>	Время роста колоний, сут. Colony growth time, days			
		2	4	7	14
<i>SnToxA</i>	SnB+ABA	233 ± 12	429 ± 31	170 ± 15	384 ± 19
	Sn4VD+ABA	110 ± 7	189 ± 15	461 ± 23	297 ± 12
	Sn9MN-3A+ABA	206 ± 11	14 ± 1	30 ± 4	170 ± 13
<i>SnTox3</i>	SnB+ABA	221 ± 13	398 ± 18	214 ± 15	670 ± 34
	Sn4VD+ABA	35 ± 4	43 ± 2	164 ± 12	70 ± 6
	Sn9MN-3A+ABA	132 ± 8	98 ± 7	28 ± 2	92 ± 9
<i>SnTox1</i>	Sn4VD+ABA	51 ± 6	88 ± 6	319 ± 15	92 ± 8
	Sn1SP+ABA	556 ± 25	1079 ± 34	40 ± 4	731 ± 32
<i>SnPpf2</i>	SnB+ABA	154 ± 14	63 ± 3	179 ± 12	391 ± 18
	Sn4VD+ABA	34 ± 3	62 ± 4	266 ± 18	338 ± 20
	Sn9MN-3A+ABA	65 ± 7	70 ± 5	77 ± 6	36 ± 4
<i>SnStuA</i>	SnB+ABA	143 ± 14	119 ± 9	102 ± 8	274 ± 17
	Sn4VD+ABA	60 ± 4	70 ± 5	163 ± 12	108 ± 9
	Sn9MN-3A+ABA	51 ± 3	89 ± 6	30 ± 2	76 ± 6
<i>SnCon7</i>	SnB+ABA	139 ± 14	44 ± 2	169 ± 12	221 ± 19
	Sn4VD+ABA	111 ± 12	69 ± 7	97 ± 8	112 ± 12
	Sn9MN-3A+ABA	34 ± 4	114 ± 10	45 ± 3	77 ± 6

Примечание: * - за 100% принято значение экспрессии гена без обработки гормоном в каждой временной точке (контроль).

Однако на роль регуляторов транскрипции генов вирулентности НЭ и ТФ претендуют гормоны, так как появляются новые данные об их роли в развитии грибов и вирулентности патогенов [Chanclud, Morel, 2016; Anand et al., 2022]. В настоящее время роль ЦК и АБК в регуляции процессов роста и развития грибов, а также в обеспечении их вирулентности активно изучается, но знания пока весьма ограничены [Anand et al., 2022; Chen et al., 2023]. Есть сообщения о влиянии этих гормонов на спорообразование, рост гиф гриба и углеводный обмен [Anand et al., 2022; Chen et al., 2023].

В нашей работе было изучено влияние фитогормонов на экспрессию генов НЭ и ТФ (табл. 2, табл. 3). Добавление АБК в среду культивирования грибов индуцировало сильное повышение экспрессии генов НЭ у двух агрессивных изолятов SnB (*SnToxA*, *SnTox3*) и Sn1SP (*SnTox1*) (табл. 2). У изолята SnB АБК повышала экспрессию генов *SnToxA* и *SnTox3* перманентно (табл. 2). Самое сильное повышение экспрессии *SnToxA* у изолята SnB под влиянием АБК в 4.3 раза относительно контроля наблюдали на четвертые сутки культивирования (табл. 2), в то время как в отсутствие АБК максимум экспрессии

наблюдали на седьмые сутки культивирования (рис. 1а), т.е. АБК ускоряла повышение экспрессии гена НЭ. Самое сильное повышение экспрессии *SnTox3* у изолята SnB под влиянием АБК в 6.7 раз относительно контроля наблюдали на 14-е сутки культивирования (табл. 2), когда в отсутствие гормона экспрессия этого гена уже снижалась (рис. 1б), т.е. АБК продлевала повышенную экспрессию гена НЭ. У изолята Sn1SP наблюдали транзитное повышение экспрессии гена *SnTox1* в 117 раз на седьмые сутки культивирования (рис. 1с). Однако добавление АБК в среду культивирования этого изолята индуцировало повышение экспрессии *SnTox1* на вторые, четвертые и 14-е сутки культивирования в 5.6, 11 и 7.3 раз, соответственно, по сравнению с их контролями (табл. 2), т.е. АБК способствовала постоянно высокой экспрессии гена *SnTox1* у изолята.

У менее агрессивного изолята Sn9MN-3A добавление АБК индуцировало повышение экспрессии гена *SnToxA* только в начале и в конце споруляции, а повышение экспрессии гена *SnTox3* наблюдали только до начала споруляции на вторые сутки культивирования (табл. 2). У авирулентного изолята Sn4VD добавление АБК индуцировало перманентное повышение экспрессии гена *SnToxA*, а

экспрессия генов *SnTox1* и *SnTox3* повышалась только на 7 сутки роста мицелия (табл. 2). Таким образом, добавление АБК в среду культивирования грибов индуцировало ускорение, продлеvalo и

способствовало перманентно высокому уровню экспрессии генов всех трех НЭ, что могло влиять на вирулентность изолята.

Таблица 3.

Влияние цитокининов (СК) на экспрессию генов некротрофных эффекторов и генов факторов транскрипции *S. nodorum* в культуре

Table 3 - Effect of cytokinins (СК) on the expression of the NE and TF genes of *S. nodorum* in culture

Относительная экспрессия генов НЭ, % / Relative expression of NE and TF genes, %*					
Гены Genes	Изолят <i>S. nodorum</i> Isolates of <i>S. nodorum</i>	Время роста колоний, сут / Colony growth time, days			
		2	4	7	14
<i>SnToxA</i>	SnB+СК	820 ± 45	25 ± 2	50 ± 4	154 ± 12
	Sn4VD+СК	120 ± 10	173 ± 13	425 ± 21	357 ± 17
	Sn9MN-3A+СК	148 ± 12	61 ± 5	181 ± 14	281 ± 13
<i>SnTox3</i>	SnB+СК	67 ± 7	337 ± 19	448 ± 21	291 ± 15
	Sn4VD+СК	47 ± 4	38 ± 3	213 ± 11	100 ± 9
	Sn9MN-3A+СК	57 ± 4	118 ± 10	99 ± 7	77 ± 6
<i>SnTox1</i>	Sn4VD+СК	72 ± 6	98 ± 8	258 ± 16	304 ± 16
	Sn1SP+СК	27 ± 2	562 ± 26	8 ± 0.5	465 ± 21
<i>SnPj2</i>	SnB+СК	158 ± 14	123 ± 9	114 ± 10	309 ± 12
	Sn4VD+СК	37 ± 3	111 ± 10	219 ± 16	318 ± 17
	Sn9MN-3A+СК	56 ± 4	55 ± 4	125 ± 8	75 ± 5
<i>SnStuA</i>	SnB+СК	46 ± 3	206 ± 16	139 ± 11	104 ± 8
	Sn4VD+СК	105 ± 8	194 ± 17	326 ± 19	113 ± 10
	Sn9MN-3A+СК	80 ± 7	53 ± 4	190 ± 13	160 ± 14
<i>SnCon7</i>	SnB+СК	180 ± 14	122 ± 9	169 ± 11	110 ± 9
	Sn4VD+СК	67 ± 5	141 ± 11	80 ± 9	91 ± 7
	Sn9MN-3A+СК	39 ± 3	63 ± 5	160 ± 6	122 ± 9

Примечание: * - за 100% принято значение экспрессии гена без обработки гормоном в каждой временной точке.

На экспрессию генов ТФ добавление АБК в среду культивирования влияло в меньшей степени, но общая тенденция с генами НЭ сохранялась (табл. 2). У менее агрессивных изолятов Sn4VD и Sn9MN-3A добавление АБК либо не влияло, либо слабо влияло на экспрессию генов ТФ (табл. 2). Наибольшее влияние АБК оказывала на экспрессию генов ТФ у изолята SnB, повышая их транскрипцию на седьмые и 14-е сутки культивирования, когда в отсутствии гормона экспрессия этих генов уже снижалась (рис. 2). Такое продление высокой экспрессии генов ТФ могло повлиять на многие процессы, регулируемые этими ТФ.

В отличие от АБК, добавление ЦК в среду культивирования гриба неоднозначно влияло на экспрессию генов НЭ и ТФ у агрессивных изолятов SnB (*SnToxA*, *SnTox3*) и Sn1SP (*SnTox1*) (табл. 3). У изолята SnB добавление ЦК в среду культивирования индуцировало повышение экспрессии гена *SnToxA* в 8.2 раза относительно контроля на вторые сутки культивирования до споруляции, а затем экспрессия этого гена снижалась (табл. 3). Влияние ЦК на экспрессию гена *SnTox3* у изолята SnB было сходным

с влиянием АБК, повышение экспрессии наблюдали в течение всей споруляции (табл. 2, табл. 3). У изолята Sn1SP добавление ЦК в среду культивирования индуцировало повышение экспрессии гена *SnTox1* через 4 и 14 суток роста мицелия в 5.6 и 4.7 раз, соответственно, и снижение экспрессии этого гена на седьмые сутки культивирования в 12.5 раз относительно контроля (табл. 3). На экспрессию генов НЭ у изолятов Sn4VD и Sn9MN-3A добавление ЦК влияло также как и добавление АБК (табл. 3). Экспрессия генов ТФ *SnPj2* и *SnCon7* при добавлении ЦК в среду культивирования повышалась у агрессивного изолята SnB и снижалась у менее агрессивных изолятов Sn4VD и Sn9MN-3A до начала споруляции через 2 суток роста мицелия (табл. 3). Экспрессия гена ТФ *SnStuA* при обработке ЦК наоборот снижалась у SnB и не изменялась у изолятов Sn4VD и Sn9MN-3A по сравнению с контролем до начала споруляции через 2 суток роста мицелия (табл. 3). При дальнейшем росте мицелия во время споруляции экспрессия генов этих ТФ при обработке ЦК была в основном выше контрольного уровня у всех трех изолятов (табл. 3). Основываясь на

результатах можно сделать предположение, что влияние ЦК зависело от стадии развития гриба, что совпадает с данными литературы [Anand et al., 2022], а также от степени вирулентности изолята.

Таким образом, добавление в среду культивирования гормонов АБК или ЦК в основном положительно влияло на экспрессию генов факторов вирулентности. Обработка АБК повышала экспрессию всех трех генов НЭ *SnToxA*, *SnTox3* и *SnTox1* (табл. 2). Обработка ЦК однозначно положительно влияла только на экспрессию гена *SnTox3* (табл. 3). Экспрессию генов ТФ *SnPf2*, *SnStuA* и *SnCon7* повышали оба гормона в большей степени у вирулентного изолята SnB (табл. 2, табл. 3).

Известно, что многие грибные ТФ влияют на процессы жизнедеятельности грибов, контролируя различные аспекты метаболизма, развития и стрессоустойчивости грибов, а их влияние на факторы вирулентности является специфической функцией [John et al., 2021]. Так ТФ SnPf2 регулирует углеводный обмен, устойчивость к абиотическим стрессовым факторам, инфекционный морфогенез и споруляцию [John et al., 2021]. ТФ StuA отвечает за рост гиф, споруляцию, углеводный обмен, гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и синтез аминокислот [PrCho et al., 2010]. ТФ SnCon7 регулирует у грибов конидиацию, а также является важным фактором, контролирующим рост гиф [John et al., 2021]. Недавние работы также показали, что ЦК и АБК играют важную роль в росте и развитии грибов посредством регуляции углеводного обмена [Ding et al., 2016; Anand et al., 2022]. 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, были активизированы у гиперпродуцирующего АБК мутанта *Botrytis cinerea* TBC-A по сравнению с его родительским штаммом *B. cinerea* TBC-6 [Ding et al., 2016]. А ЦК при низкой доступности сахара способствовали увеличению использования сахара, повышению гликолиза, что привело к увеличению потребления энергии у *B. cinerea* и способствовало стимуляции роста грибного мицелия как *in vitro*, так и *in planta* [Anand et al., 2022]. На бедной сахаром среде ЦК значительно усиливали экспрессию переносчиков сахара в грибе [Anand et al., 2022].

Таким образом, основываясь на наших результатах и данных литературы, можно предположить, что гормоны ЦК и АБК влияют на факторы вирулентности косвенно, посредством контроля процессов роста, метаболизма и работы ТФ.

В свою очередь ТФ контролируют те же процессы, что и гормоны, и в дополнение к этому напрямую регулируют работу генов НЭ. Вопрос гормональной регуляции работы грибных ТФ требует дальнейшего глубокого изучения, при котором стоит обратить внимание на регуляцию углеводного обмена, как ЦК и АБК, так и ТФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта МК-2293.2022.1.4. с использованием оборудования РЦКП “Агидель” и УНУ “КОДИНК” в рамках ГК №05.621.21.0033.

Литература

1. Нужная Т.В., Миннигалиева А.Ф., Веселова С.В., Максимов И.В. Влияние эффектора патогенного гриба *Stagonospora nodorum* (Berk.) SnTox1 на компоненты про-/антиоксидантной системы // *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2022. Т. 4(97). С. 105-111.
2. Anand G., Gupta R., Marash I., Leibman-Markus M., Bar M. Cytokinin production and sensing in fungi // *Microbiological Research*. 2022. V. 262. 127103. doi: 10.1016/j.micres.2022.127103
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu Z., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. V. 107. P. 13544–13549. doi: 10.1073/pnas.1004090107
8. Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B., Friesen T.L. Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector SnToxA among isolates is correlated with levels

- of disease in wheat // *MPMI*. 2011. V. 24(12). P. 1419–1426. doi: 10.1094/MPMI-04-11-0094
9. Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H., Meinhardt S.W., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 953-956. doi: 10.1038/ng1839
 10. Friesen T.L., Zhang Z., Solomon P.S., Oliver R.P., Faris J.D. Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. P. 682–693. doi: 10.1104/pp.107.108761
 11. Haugrud A.R.P., Zhang Z., Richards J., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of variable disease expression conferred by inverse gene-for-gene interactions in the wheat-*Parastagonospora nodorum* Pathosystem // *Plant Physiol.* 2019. V. 180. P. 420–434. doi: 10.1104/pp.19.00149
 12. 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
 13. 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
 14. John E., Singh K.B., Oliver R.P., Tan K.-C. Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi // *Mol Plant Pathol.* 2021. V. 22(7). P. 858-881. doi: 10.1111/mpp.13056
 15. John E., Jacques S., Phan H.T.T., Liu L., Pereira D., Croll D., Singh K.B., Oliver R.P., Tan K.-C. Variability in an effector gene promoter of a necrotrophic fungal pathogen dictates epistasis and effector-triggered susceptibility in wheat // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18(1). e1010149. doi: 10.1371/journal.ppat.1010149
 16. Jones D.A.B., John E., Rybak K., Phan H.T.T., Singh K.B., Lin S.-Y., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. A specific fungal transcription factor controls effector gene expression and orchestrates the establishment of the necrotrophic pathogen lifestyle on wheat // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. 15884. doi: 10.1038/s41598-019-52444-7
 17. Kariyawasam G.K., Richards J.K., Wyatt N.A., Running K., Xu S.S., Liu Z., Borowicz P., Faris J.D., Friesen T.L. The *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector SnTox5 targets the wheat gene *Snn5* and facilitates entry into the leaf mesophyll // *New Phytol.* 2022. V. 233. P. 409-426. doi: 10.1111/nph.17602
 18. Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors // *Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 2285–2309. doi: 10.1105/tpc.114.125419
 19. Lin S.-Y., Chooi Y.-H., Solomon P.S. The global regulator of pathogenesis PnCon7 positively regulates *Tox3* effector gene expression through direct interaction in the wheat pathogen *Parastagonospora nodorum* // *Molecular Microbiology*. 2018. V. 109(1). P. 78-90. doi: 10.1111/mmi.13968
 20. Liu Z.H., Friesen T.L., Rasmussen J.B., Ali S., Meinhardt S.W., Faris J.D. Quantitative trait loci analysis and mapping of seedling resistance to *Stagonospora nodorum* leaf blotch in wheat // *Phytopathology*. 2004. V. 94. P. 1061-1067. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.10.1061
 21. Liu Z., Zhang Z., Faris J.D., Oliver R.P., Syme R., McDonald M.C., McDonald B.A., Solomon P.S., Lu S., Shelver W.L., Xu S., Friesen T.L. The Cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1* // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8(1). e1002467. doi: 10.1371/journal.ppat.1002467
 22. McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors // *Cur Opin Microbiol.* 2018. V. 46. P. 14-18. doi: 10.1016/j.mib.2018.01.019
 23. Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease // *Plant J.* 2016. V. 87. P. 343-354. DOI: 10.1111/tpj.13203
 24. Richards J.K., Kariyawasam G.K., Seneviratne S., Wyatt N.A., Xu S.S., Liu Z., Faris J.D., Friesen T.L. A triple threat: the *Parastagonospora nodorum* SnTox267 effector exploits three distinct host genetic factors to cause disease in wheat // *New Phytologist*. 2022. V. 233. P. 427–442. doi: 10.1111/nph.17601
 25. Rybak K., SEE P.T., Phan H.T.T., Syme R.A., Moffat C.S., Oliver R.P., Tan K.-C. A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat // *Molecular Plant Pathology*. 2017. V. 18(3). P. 420–434. DOI: 10.1111/mpp.125
 26. Rummyantsev S.D., Alekseev V.Y., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Garafutdinov R.R., Maksimov I.V., Veselova S.V. Additive effect of the composition of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on systemic resistance of wheat against greenbug aphid *Schizaphis graminum* due to lipopeptides // *Life*. 2023. V. 13. 214. doi: 10.3390/life13010214
 27. 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*. 2021a. V. 11. 174. doi: 10.3390/biom11020174
28. 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*. 2021b. V. 10. 1586. doi: 10.3390/plants10081586
29. Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., Solomon P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 reprograms metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves // *BMC Plant Biol*. 2014. V. 14. 215. doi: 10.1186/s12870-014-0215-5
30. Zhang Z., Friesen T.L., Xu S.S., Shi G.J., Liu Z.H., Rasmussen J.B., Faris J. Two putatively homoeologous wheat genes mediate the recognition of SnTox3 to confer effector-triggered susceptibility to *Stagonospora nodorum* // *Plant J*. 2011. V. 65. P. 27–38. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04407.x
7. Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B., Friesen T.L. Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector SnToxA among isolates is correlated with levels of disease in wheat. *MPMI*. 2011. V. 24(12). P. 1419–1426. doi: 10.1094/MPMI-04-11-0094
8. Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H., Meinhardt S.W., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat. Genet*. 2006. V. 38. P. 953–956. doi: 10.1038/ng1839
9. Friesen T.L., Zhang Z., Solomon P.S., Oliver R.P., Faris J.D. Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene. *Plant Physiol*. 2008. V. 146. P. 682–693. doi: 10.1104/pp.107.108761
10. Haugrud A.R.P., Zhang Z., Richards J., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of variable disease expression conferred by inverse gene-for-gene interactions in the wheat-*Parastagonospora nodorum* Pathosystem. *Plant Physiol*. 2019. V. 180. P. 420–434. doi: 10.1104/pp.19.00149
11. 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
12. 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
13. John E., Singh K.B., Oliver R.P., Tan K.-C. Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol*. 2021. V. 22(7). P. 858–881. doi: 10.1111/mpp.13056
14. John E., Jacques S., Phan H.T.T., Liu L., Pereira D., Croll D., Singh K.B., Oliver R.P., Tan K.-C. Variability in an effector gene promoter of a necrotrophic fungal pathogen dictates epistasis and effector-triggered susceptibility in wheat. *PLoS Pathog*. 2022. V. 18(1). e1010149. doi: 10.1371/journal.ppat.1010149
15. Jones D.A.B., John E., Rybak K., Phan H.T.T., Singh K.B., Lin S.-Y., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. A specific fungal transcription factor controls effector gene expression and orchestrates the establishment of the necrotrophic pathogen lifestyle on wheat. *Scientific Reports*. 2019. V. 9. 15884. doi: 10.1038/s41598-019-52444-7
16. Kariyawasam G.K., Richards J.K., Wyatt N.A., Running K., Xu S.S., Liu Z., Borowicz P., Faris J.D., Friesen T.L. The *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector SnTox5 targets the wheat gene *Snn5* and facilitates entry into the leaf mesophyll. *New*

References

1. Anand G., Gupta R., Marash I., Leibman-Markus M., Bar M. Cytokinin production and sensing in fungi. *Microbiological Research*. 2022. V. 262. 127103. doi: 10.1016/j.micres.2022.127103
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu Z., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2010. V. 107. P. 13544–13549. doi: 10.1073/pnas.1004090107

- Phytol.* 2022. V. 233. P. 409-426. doi: 10.1111/nph.17602
17. Kazan K., Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 2285–2309. doi: 10.1105/tpc.114.125419
 18. Lin S.-Y., Chooi Y.-H., Solomon P.S. The global regulator of pathogenesis PnCon7 positively regulates *Tox3* effector gene expression through direct interaction in the wheat pathogen *Parastagonospora nodorum*. *Molecular Microbiology.* 2018. V. 109(1). P. 78-90. doi: 10.1111/mmi.13968
 19. Liu Z.H., Friesen T.L., Rasmussen J.B., Ali S., Meinhardt S.W., Faris J.D. Quantitative trait loci analysis and mapping of seedling resistance to *Stagonospora nodorum* leaf blotch in wheat. *Phytopathology.* 2004. V. 94. P. 1061-1067. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.10.1061
 20. Liu Z., Zhang Z., Faris J.D., Oliver R.P., Syme R., McDonald M.C., McDonald B.A., Solomon P.S., Lu S., Shelver W.L., Xu S., Friesen T.L. The Cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1* // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8(1). e1002467. doi: 10.1371/journal.ppat.1002467
 21. McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors. *Cur Opin Microbiol.* 2018. V. 46. P. 14-18. doi: 10.1016/j.mib.2018.01.019
 22. Nuzhnaya T.V., Minnigaliyeva A.F., Tyryshkin L.G., Veselova S.V., Maksimov I.V. Influence of *Stagonospora nodorum* (Berk.) effector SnTox1 on components of the wheat pro-/antioxidant system. *Proceedings of the Kuban State Agrarian University.* 2022. V. 4 (97). P. 105-111.
 23. Phan H.T.T., Rybak K., Furuki E., Breen S., Solomon P.S., Oliver R.P., Tan K.-C. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease. *Plant J.* 2016. V. 87. P. 343-354. DOI: 10.1111/tpj.13203
 24. Richards J.K., Kariyawasam G.K., Seneviratne S., Wyatt N.A., Xu S.S., Liu Z., Faris J.D., Friesen T.L. A triple threat: the *Parastagonospora nodorum* SnTox267 effector exploits three distinct host genetic factors to cause disease in wheat. *New Phytologist.* 2022. V. 233. P. 427–442. doi: 10.1111/nph.17601
 25. Rybak K., SEE P.T., Phan H.T.T., Syme R.A., Moffat C.S., Oliver R.P., Tan K.-C. A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat. *Molecular Plant Pathology.* 2017. V. 18(3). P. 420–434. DOI: 10.1111/mpp.125
 26. Rummyantsev S.D., Alekseev V.Y., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Garafutdinov R.R., Maksimov I.V., Veselova S.V. Additive effect of the composition of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on systemic resistance of wheat against greenbug aphid *Schizaphis graminum* due to lipopeptides. *Life.* 2023. V. 13. 214. doi: 10.3390/life13010214
 27. 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.* 2021a. V. 11. 174. doi: 10.3390/biom11020174
 28. 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.* 2021b. V. 10. 1586. doi: 10.3390/plants10081586
 29. Winterberg B., Du Fall L.A., Song X.M., Pascovici D., Care N., Molloy M., Ohms S., Solomon P.S. The necrotrophic effector protein SnTox3 reprograms metabolism and elicits a strong defence response in susceptible wheat leaves. *BMC Plant Biol.* 2014. V. 14. 215. doi: 10.1186/s12870-014-0215-5
 30. Zhang Z., Friesen T.L., Xu S.S., Shi G.J., Liu Z.H., Rasmussen J.B., Faris J. Two putatively homoeologous wheat genes mediate the recognition of SnTox3 to confer effector-triggered susceptibility to *Stagonospora nodorum*. *Plant J.* 2011. V. 65. P. 27–38. DOI:10.1111/j.1365-313X.2010.04407.x