

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ЦИТОКИНИНОВ НА ДИНАМИКУ РАЗВИТИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЮ ИНФЕКЦИОННЫХ СТРУКТУР ВОЗБУДИТЕЛЯ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ПШЕНИЦЫ

© А. В. Бабоша, А. С. Рябченко, Т. В. Аветисян

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, Москва;
электронный адрес: phimmunitet@yandex.ru

Методами световой и электронной сканирующей микроскопии исследовали развитие и дифференциацию инфекционных структур возбудителя мучнистой росы пшеницы *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* March. под действием экзогенного зеатина. Впервые показано, что размеры гало, выявляемого при цитохимической окраске вокруг места внедрения патогена, могут изменяться под действием физиологически активных веществ, в частности фитогормонов цитокининового типа. Обработка зеатином оказывала влияние на прорастание конидий и рост патогена в эктофитной стадии. Концентрационная кривая действия зеатина для числа зрелых колоний патогена (6 сут после инфицирования) была представлена многофазной кривой с двумя максимумами (1 и 3 мкМ) и минимумом (1.5 мкМ). Сходные кривые были получены для числа нормальных аппрессориев и диаметра большого гало, что, вероятно, свидетельствует о существовании факторов, оказывающих влияние на оба параметра, а также и на конечное число колоний патогена. Полученные данные свидетельствуют о том, что происхождение многофазной кривой доза—эффект влияния цитокининов на развитие возбудителя мучнистой росы связано с факторами, действующими на ранних этапах патогенеза.

Ключевые слова: экзогенные цитокинины, мучнистая роса, иммунитет, патосистема, облигатный паразитизм, гало.

Принятые сокращения: А — аппрессорий, ГМ — гифа мицелия, ИА — изросший аппрессорий, К — конидия, РТ — ростковая трубка.

Возбудитель мучнистой росы пшеницы *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* March. относится к облигатным патогенам, развитие которого происходит только при взаимодействии с живыми клетками растения-хозяина. О характере взаимодействия растения и патогена можно судить уже на начальных этапах развития патосистемы, наблюдая процессы прорастания конидий с использованием сканирующей электронной микроскопии. Как правило, количество нормально сформированных инфекционных структур мучнисто-росяного патогена положительно коррелирует с числом видимых колоний патогена, т. е. с уровнем восприимчивости растения-хозяина (Сереежкина и др., 1996, 1999). При этом на листьях устойчивых растений ячменя и флокса заметны нарушения дифференциации инфекционных структур мучнисто-росяного грибка (Мишина и др., 1988, 2002; Сереежкина и др., 1996).

Одним из основных факторов совместимости при облигатном паразитизме является воздействие патогена на регуляторные системы растения-хозяина, в краткосрочной перспективе не приводящее к гибели или заметному нарушению жизнедеятельности клеток растения, однако позволяющее использовать питательные вещества растения-хозяина для прохождения жизненного цикла патогена. Регуляция самых разных процессов в растительном организме, в том числе и его устойчивости к стрессам,

происходит при участии фитогормонов цитокининового типа. Локальное накопление цитокининов способствует образованию так называемых зеленых островков, зоны листовой ткани с измененным метаболизмом, обеспечивающим приток питательных веществ к растущим тканям патогена (Walters et al., 2008). Роли цитокининов при биотрофном патогенезе посвящен ряд обзорных работ (Ashby, 2000; Walters, McRoberts, 2006), однако проблема далека от разрешения.

Повышение содержания цитокининов отмечено при инфицировании ржавчинными (Попова, Тютюрев, 1988; Музыкантов и др., 1991; Фурсова и др., 1991), мучнисто-росяными (Талиева и др., 2001), головневыми грибами (Максимов и др., 2002), а также вирусами (Sziraki, Gaborjany, 1974). Конидии и мицелий многих патогенов, в том числе и мучнисто-росяных — *Erysiphe cichoracearum* (Талиева и др., 1991), также способны в больших количествах накапливать цитокининовые вещества и могут выделять их в окружающую среду, изменяя цитокининовый обмен растения-хозяина. В ряде патосистем дополнительные фитогормоны синтезируются клетками патогена (Greene, 1980). Таким образом, использование экзогенных цитокининов в определенной степени может моделировать процессы, происходящие при инфицировании. При этом изменение восприимчивости растения-хозяина может служить одним из критериев участия фитогормонов в

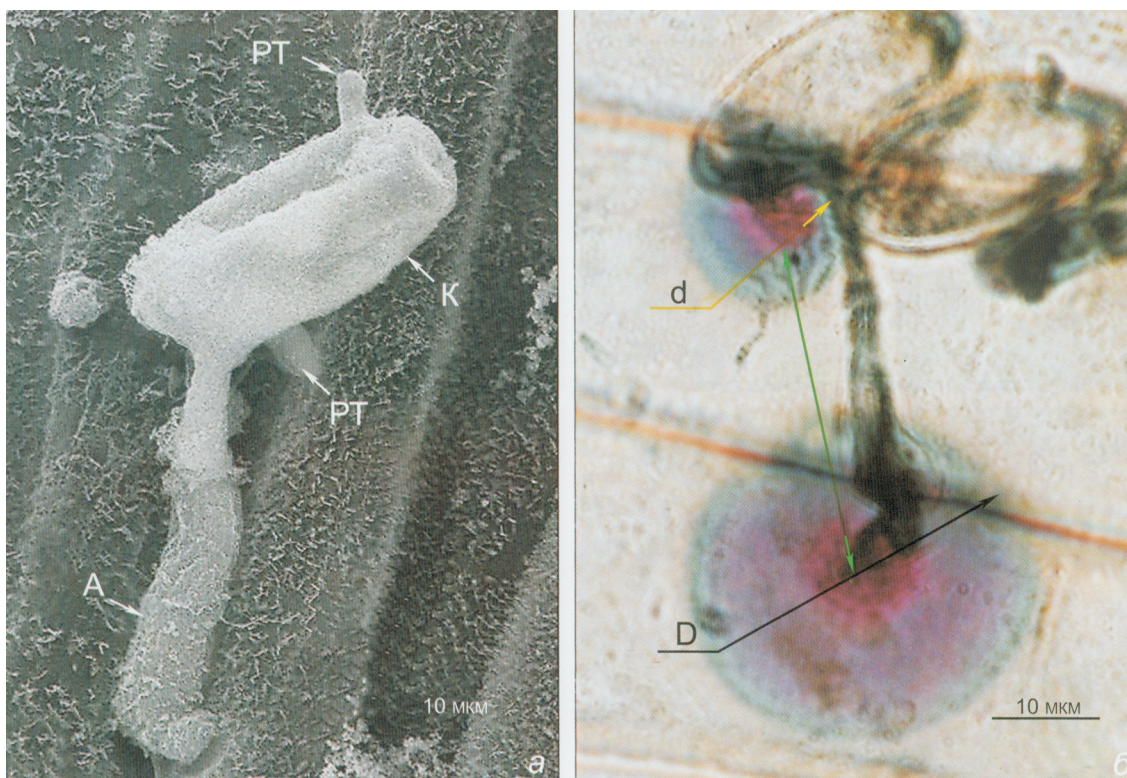


Рис. 1. Проросшая конидия возбудителя мучнистой росы через 24 ч после инокуляции.

а — сканирующая электронная микроскопия: А — аппрессорий, К — конидия, РТ — ростковая трубка. *б* — световая микроскопия, окраска на общие белки, выявление большого и малого гало и определение их размеров: черная стрелка — большое гало (D), желтая стрелка — малое гало (d), зеленая стрелка — расстояние между большим и малым гало.

регуляции патогенеза (Kettner, Dörffling, 1995). Однако данные о направленности иммуномодулирующей активности экзогенных цитокининов противоречивы. В различных патосистемах с участием грибных патогенов обработка цитокининами способствовала как повышению устойчивости, так и увеличению восприимчивости растения-хозяина (Dekker, 1963; Cole et al., 1970; Edwards, 1983; Левин, 1984; Эйдельмант и др., 1985; Vizarova, 1987; Ларина и др., 1991; Clarke et al., 1988). Нами показано, что эта особенность иммуномодуляции цитокининами не связана напрямую со спецификой патогена или растения, поскольку разнонаправленные влияния цитокининов на устойчивость растения наблюдали в одной и той же патосистеме (Бабоша, 2004).

Целью данной работы явилось изучение влияния экзогенных цитокининов на развитие и дифференциацию инфекционных структур возбудителя мучнистой росы пшеницы.

Материал и методика

Объектами исследования служили восприимчивые к мучнистой росе сорта мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Хакасская и Заря, а также дисомнодополненная пшенично-эгилопсная линия 56/99¹ (из коллекции «Арсенал» НИИСХ ЦРНЗ). Растения выращивали при 20—22 °С с 16-часовым фотопериодом на растворе Кнопа в рулонах фильтровальной бумаги. При заражении использовали популяцию возбудителя мучнистой росы *Erysiphe graminis* f. s. *tritici* March., поддерживаемую на вос-

приимчивой пшенице. Отделенные первые или вторые листья 10—12-суточных проростков после инокуляции патогена инкубировали в чашках Петри на дистиллированной воде с добавлением 0.25—4.50 мкМ зеатина адаксиальной стороной вверх. В опытах с интактными листьями инфицированные проростки помещали в раствор Кнопа, содержащий исследуемые концентрации фитогормона.

Активность цитоплазматических реакций (гало) выявляли на 1-е и 3-и сут после инфицирования окраской на общие белки отрезков эпидермиса, снятого с абаксиальной стороны листа (1%-ный амидочерный в 7%-ной уксусной кислоте). Цифровые фотографии получали с использованием светового микроскопа Zeiss AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Германия), размеры и расстояния между гало определяли при помощи программы Image J (рис. 1, б). Растительный материал, предназначенный для исследования методом сканирующей электронной микроскопии, фиксировали в 4%-ном растворе глутаральдегида и 2%-ном растворе четырехоксида осмия и затем обезвоживали в серии спиртов и ацетоне, высушивали при критической точке и проводили Au-напыление (Мишина и др., 2001). Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа LEO-1430 VP (Carl Zeiss, Германия). Подсчитывали количество микроколоний, проросших (с нормальными и аномальными аппрессориями) и непроросших конидий патогена в 20—40 случайно выбранных полях зрения микроскопа по 0.6 мм² каждое через 1—3 и 6 сут с момента инокуляции. Примеры конидий с нормальными (*а*, *б*) и аномальными (изросшими) (*в*, *г*) аппрессориями приведены на рис. 2.

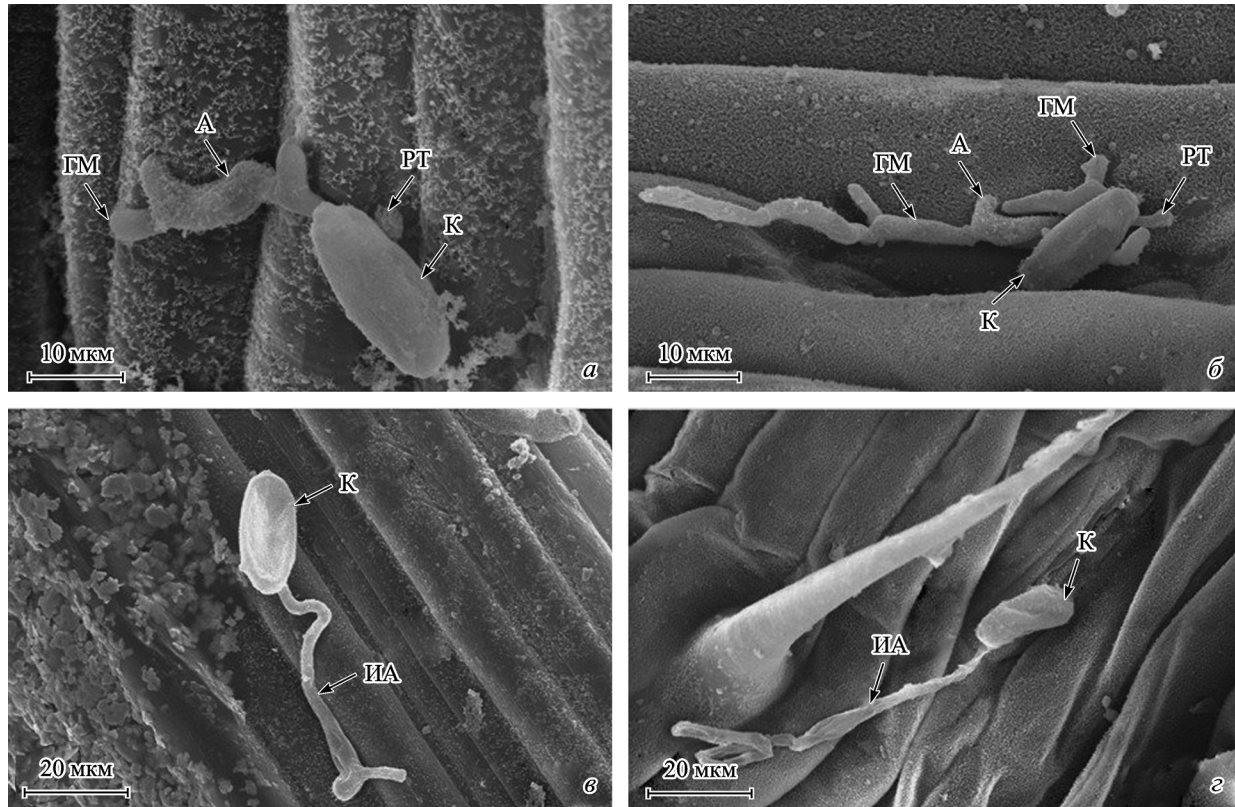


Рис. 2. Проросшие конидии патогена с нормальными (а, б) и аномальными, изросшими (в, з) аппрессориями.

а — 24 ч после инфицирования, заметны растущие гифы; б — 48 ч после инфицирования, образование микроколонии; в, з — 48 ч после инфицирования. А — аппрессорий, ГМ — гифа мицелия, ИА — изросший аппрессорий, К — конидия, РТ — ростковая трубка.

На 5—6-е сут после инфицирования число видимых колоний (пустул) мучнистой росы учитывали с применением бинокулярной лупы на абаксиальной и адаксиальной поверхностях 1-го настоящего листа на участке длиной 7.5 см. Для каждого варианта вычисляли среднюю поверхностную плотность колоний на 10—15 листьях (20—30 листьев в контроле).

В работе использованы краситель амидочерный, глутаральдегид и четырехокись осмия (Serva, Германия), зеатин (Sigma, США; Serva, Германия). Этиловый спирт и ацетон отечественного производства.

Вероятность ошибки (P) для различий с контролем рассчитывали с использованием t -теста (критерий Стьюдента). На графиках и в таблицах приведены средние и их ошибки. Значения, достоверно отличающиеся от контроля ($P = 0.05$), на графиках отмечены более крупным незаполненным маркером.

Результаты

Исследование восприимчивости проростков пшеницы к возбудителю мучнистой росы под действием экзогенного фитогормона зеатина показало, что в условиях одинаковой инфекционной дозы число колоний патогена зависит от концентрации фитогормона (рис. 3). Кривая зависимости «доза—эффект» имеет 3 четко выделяющиеся области: 2 максимума (при концентрациях зеатина 0.5 и 4.5 мкМ) с достоверным патогенстимулирующим эффектом и достаточно широкий минимум, представленный

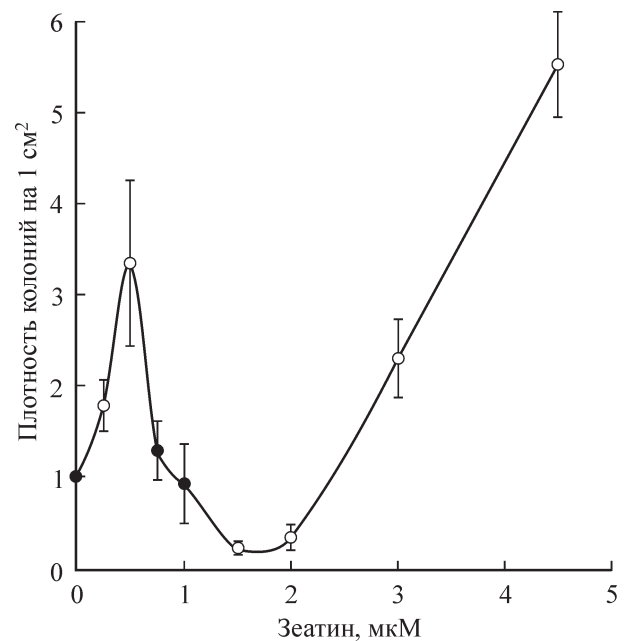


Рис. 3. Зависимость плотности колоний возбудителя мучнистой росы от концентрации экзогенного зеатина (сорт Заря, интактные 1-е настоящие листья, 6 сут после инфицирования, зеатин добавлен к раствору Кнопка при инкубации инфицированных проростков пшеницы).

Значения, достоверно отличающиеся от контроля ($P = 0.05$), отмечены незаполненным маркером.

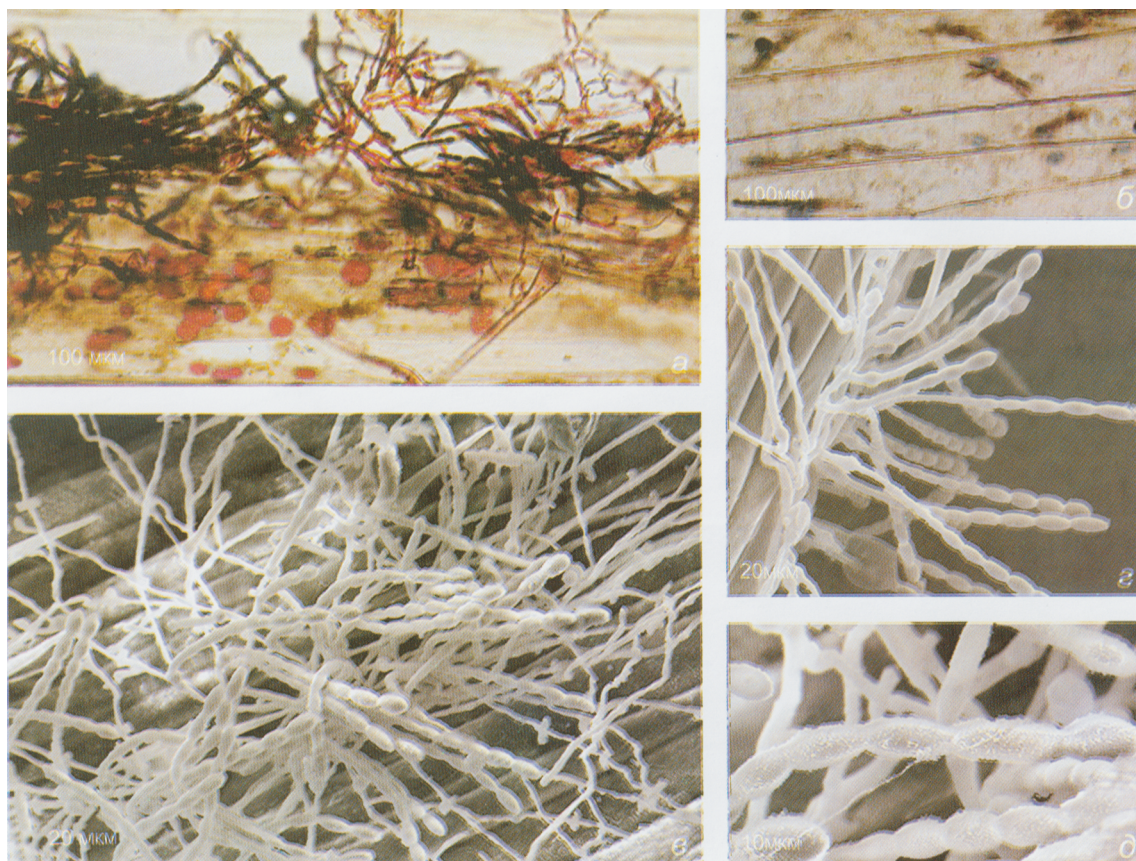


Рис. 4. Развитие возбудителя мучнистой росы пшеницы на листьях пшеницы на 5—6-е сут после инфицирования.

a — гифы мицелия и вторичные гало; *b* — вторичные гаустории (световая микроскопия, окраска на общие белки); *в—д* — зрелая колония, видны гифы мицелия и конидиеносцы (сканирующая электронная микроскопия).

концентрациями 1.5 и 2.0 мкМ, также достоверно отличающийся от контроля. Наличие на данной кривой по крайней мере 3 экстремальных точек не является случайным. Примерно из 60 концентрационных кривых, полученных нами ранее в разных условиях и для разных химических форм цитокининов, почти две трети имели в разной степени выраженные два максимума восприимчивости и минимум между ними. В пяти случаях на кривых был представлен только минимум, а общая направленность иммуномодуляции цитокининами была в сторону увеличения устойчивости. Отсутствие правого или левого максимума в остальных случаях можно объяснить изменением чувствительности патосистемы к цитокининам и как следствие — непопаданием одного из максимумов в исследованный диапазон концентраций. Представленные на рис. 3 данные получены с использованием сорта Заря, однако аналогичные концентрационные кривые ранее нами получены и с использованием относительно более восприимчивого сорта пшеницы Родина и менее восприимчивой пшенично-эгилопсной линии 56/99³ (данные не представлены). Нами построена математическая модель процесса, способная воспроизводить разнообразие форм экспериментальных кривых при изменении параметров, характеризующих цитокининовый обмен (Бабоша, 2007). В связи с этим представляется интерес определить, на каких этапах патогенеза возникает подобного рода многофазность в действии экзогенных цитокининов.

Конидии возбудителя мучнистой росы, попадая на поверхность листа растения, прорастают первичной рост-

ковой трубкой и затем аппрессорием (рис. 1), вступая в контакт с эпидермальными клетками хозяина растения по крайней мере в двух точках (Сережкина и др., 1996). К концу 1-х сут внутри клетки эпидермиса растения-хозяина, как правило, образуется гаустория, служащая для поглощения питательных веществ и транспорта их в растущие гифы эктофитного мицелия. Гаустории образуются также в результате контакта с эпидермисом гифальных лопастей (рис. 4, *b*). Рост гиф мицелия заметен уже через 2 сут после инфицирования (рис. 4, *з, д*), а через 3 сут при совместимом взаимодействии растения и патогена можно наблюдать достаточно развитые микроколонии (рис. 4, *в*). На 5—7-е сут колонии патогена заметны невооруженным глазом.

В месте контакта клеток листьев злаков и мучнисто-росяного патогена при цитохимической окраске на общие белки можно наблюдать образование специфических концентрических структур — гало (рис. 1, 5). Малое гало (диаметром 5—10 мкм) образуется в месте контакта с эпидермисом растительной клетки первичной ростковой трубки, большое гало (15—50 мкм) — лопасти аппрессория. Одиночные вторичные гало возникают в местах контакта с эпидермисом гиф мицелия. Гало заметны через 24—72 ч после инокуляции, к моменту образования гаусторий интенсивность окрашивания зоны гало уменьшается, и на более поздних этапах можно наблюдать только вторичные гало (рис. 4, *a*), а гало, индуцированные инфекционными структурами прорастающих конидий, не выявляются.

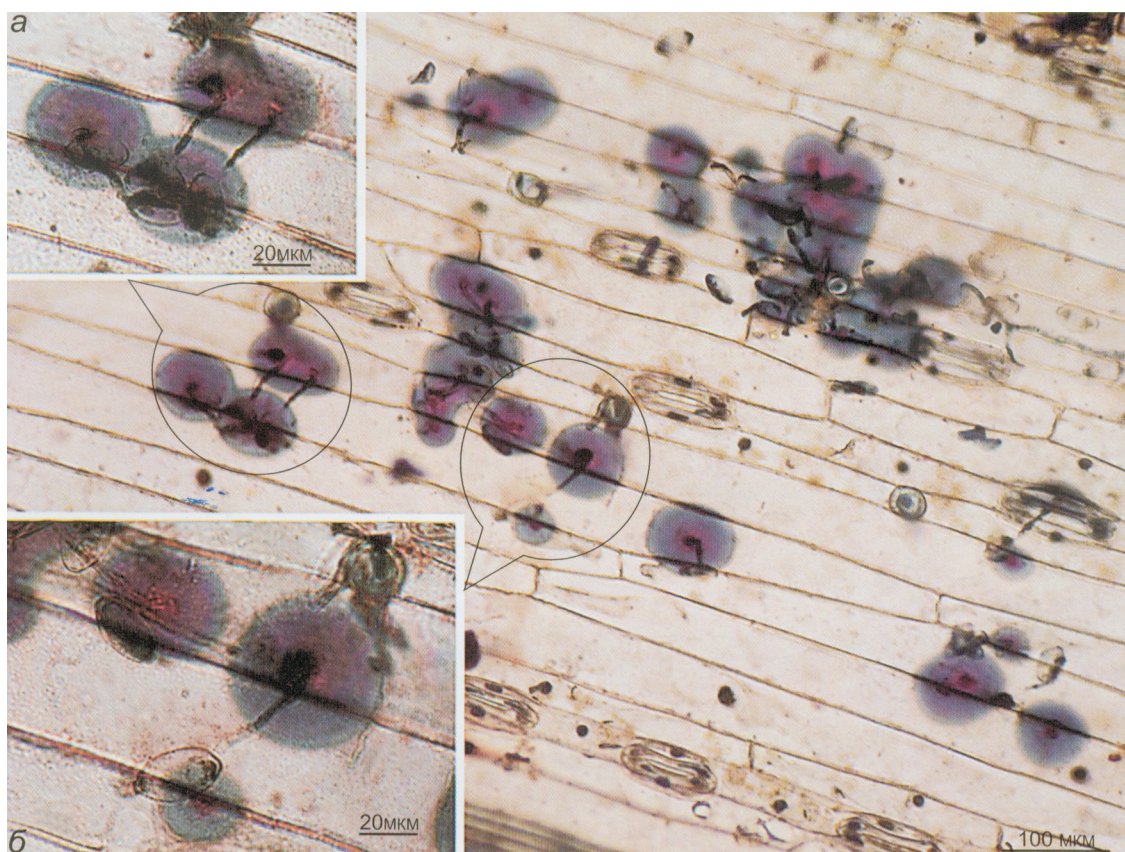


Рис. 5. Развитие гало в местах контакта с эпидермисом растения-хозяина первичной ростковой трубки и аппрессория возбудителя мучнистой росы пшеницы (линия 56/99¹, 72 ч после инфицирования).

Выделенные зоны даны крупным планом на врезках а и б.

Достоверное увеличение диаметра большого гало наблюдали при различных способах обработки листьев пшеницы зеатином (табл. 1). Вакуумная инфильтрация сама по себе приводила к существенному увеличению диаметра большого гало как в опыте, так и в контроле. Однако характер действия зеатина сохранялся и в данном случае. Аналогичные тенденции наблюдали и в случае малого гало. Можно предположить, что механическое воздействие вакуумной инфильтрации приводило к возникновению раневого стресса, что и являлось непосредственной причиной изменения цитоплазматической реак-

ции растений на инфицирование. Вакуумная инфильтрация приводила также к увеличению расстояния между большим и малым гало. При этом зеатин такого эффекта не оказывал. Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что увеличение диаметра гало при действии зеатина имеет место и в случае вторичного гало, индуцированного инфекционными выростами растущих гиф мицелия. При обработке достаточно высокой концентрацией зеатин-рибозиды наблюдали ту же тенденцию, однако данная химическая форма цитокининов обладала заметно меньшей активностью по сравнению с зеатином.

Т а б л и ц а 1

Влияние зеатина на образование гало в клетках эпидермиса при инфицировании возбудителем мучнистой росы (сорт Хакасская, отделенные листья, 20 ч после инфицирования)

Обработка	Вариант	Большое гало, мкм	Малое гало, мкм	Расстояние между гало, мкм
Погружение ^а	Контроль	17.9 ± 0.9	7.3 ± 0.4	19.4 ± 5.3
	Зеатин	24.3 ± 0.8 ^б	8.1 ± 0.4	18.2 ± 2.3
Вакуумная инфильтрация	Контроль	22.8 ± 1.4 ^в	7.5 ± 0.7	25.9 ± 6.0
	Зеатин	32.8 ± 3.1 ^б	8.9 ± 0.7	28.4 ± 5.3

^а Отделенные листья обрабатывали водным раствором зеатина (3 мкМ) путем погружения на 1 ч или вакуумной инфильтрацией (3 раза с понижением давления до 0.4 кг/см²) и затем инфицировали. ^б Достоверно различие с соответствующим контрольным вариантом без обработки зеатином. ^в Достоверны различия между вариантами обработки вакуумной инфильтрацией и погружением.

Таблица 2

Влияние цитокининов на размеры вторичных гало в клетках эпидермиса отделенных листьев пшеницы (сорт Заря) при инфицировании (9 сут) возбудителем мучнистой росы

Обработка ^а	Концентрация, мкМ	Гало, мкм
Контроль	0	28.8 ± 1.6
Зеатин	4.5	35.1 ± 5.1
	1.0	35.6 ± 2.3 ^б
Зеатин-рибозид	4.5	32.6 ± 3.6
	1.0	28.7 ± 2.1

^а 2-недельные проростки пшеницы помещали на растворы цитокининов непосредственно после инокуляции патогена и выращивали до появления видимых колоний. Перед приготовлением препаратов эпидермиса первые листья срезали и помещали во влажную камеру на 72 ч.
^б Достоверно различие с контрольным вариантом без обработки зеатином.

В опыте с отделенными листьями пшенично-эгилопной линии 56/99^и исследовали зависимость размера большого гало, наблюдаемого через 24 ч после инфицирования, от действия различных концентраций зеатина (рис. 6). На размеры гало одинаковое влияние оказывали 2 диапазона концентраций зеатина, т. е. форма кривой «доза—эффект» соответствовала зависимости с 2 максимумами, наблюдавшейся нами при определении плотности конидий на листьях пшеницы (рис. 3). Положение на оси концентрации всех 3 экстремальных точек на кривых на рис. 3 и 6 было близким или совпадало, однако в точке минимума при 1.5 мкМ зеатина ингибирования диаметра гало не отмечено. Среднее расстояние между большим и малым гало в данном опыте составляло 44 мкм, обработка зеатином не оказывала существенного влияния на данный параметр (данные не представлены).

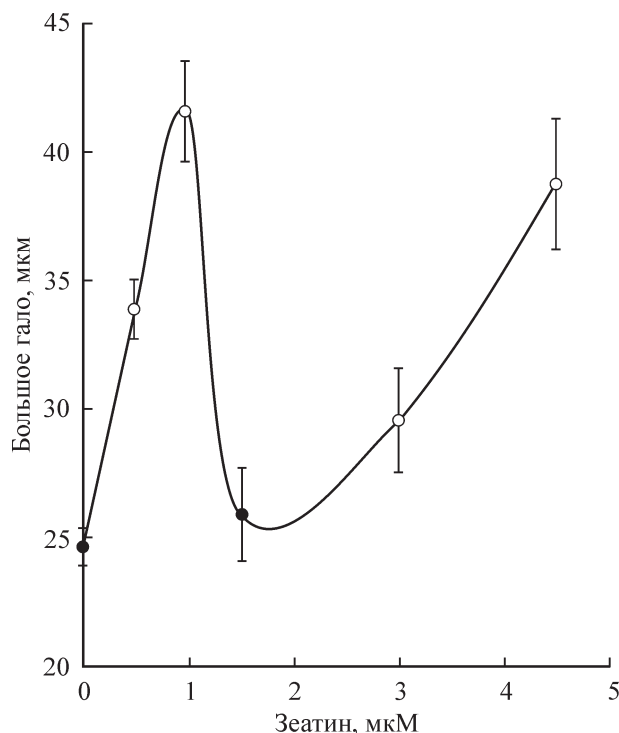


Рис. 6. Изменение размеров большого гало под действием экзогенного зеатина (линия 56/99^и, отделенные листья, 24 ч после инфицирования).

Значения, достоверно отличающиеся от контроля ($P = 0.05$), отмечены незаполненным маркером.

Исследование прорастания возбудителя мучнистой росы с использованием сканирующей электронной микроскопии показало (рис. 7, а, б), что влияние зеатина на образование апрессориальных структур также сильно зависело от его концентрации. Количество нормальных апрессориев, образующихся на листьях сорта Хакасская

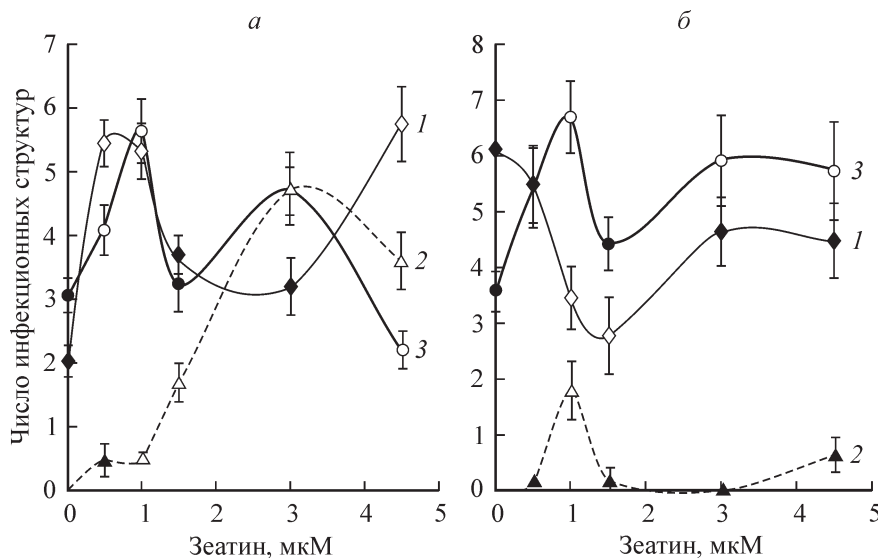


Рис. 7. Влияние концентрации экзогенного зеатина на характер прорастания конидий возбудителя мучнистой росы на отделенных листьях пшеницы.

а — линия 56/99^и, б — сорт Хакасская. 1 — нормальные апрессории через 1 сут после инфицирования, 2 — аномальные апрессории через 1 сут после инфицирования, 3 — колонии патогена через 6 сут после инфицирования. Число инфекционных структур определялось на площади 1 мм² по данным сканирующей электронной микроскопии при увел. 300×. Значения, достоверно отличающиеся от контроля ($P = 0.05$), на графиках отмечены незаполненным маркером.

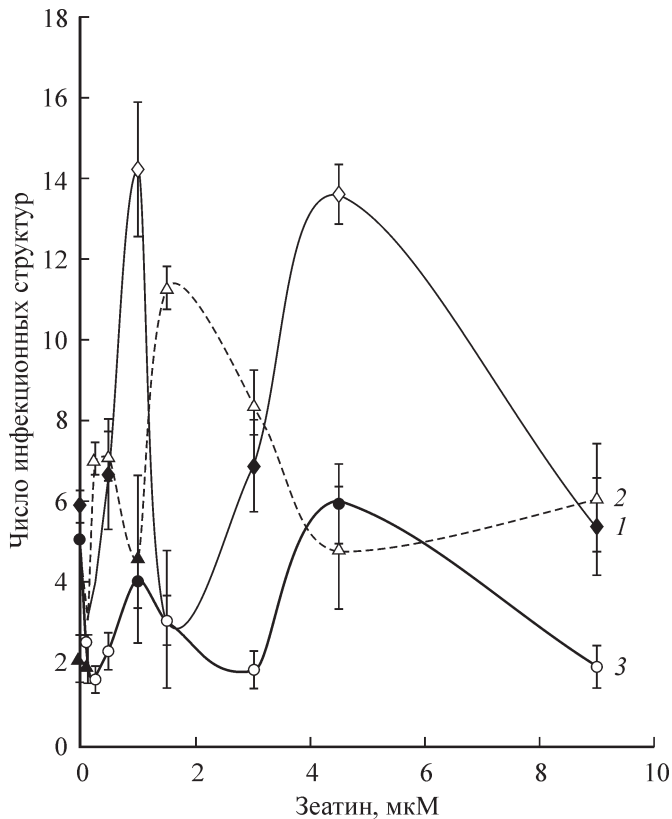


Рис. 8. Влияние концентрации экзогенного зеатина на характер прорастания конидий возбудителя мучнистой росы через 48 ч после инфицирования (линия 56/99ⁱ, отделенные листья).

1 — нормальные аптессории, 2 — аномальные аптессории, 3 — колонии патогена. Число инфекционных структур определялось на площади 1 мм² по данным сканирующей электронной микроскопии при увел. 300×. Значения, достоверно отличающиеся от контроля ($P = 0.05$), на графиках отмечены незаполненным маркером.

через 24 ч после инфицирования, было максимальным в контроле и уменьшалось при обработке цитокинином. При этом концентрационная кривая имела явно выраженный минимум, поскольку концентрации 1.0 и 1.5 мкМ оказывали особенно сильное влияние на данный показатель. Зеатин в концентрации 1 мкМ стимулировал образование удлиненных (аномальных) аптессориев (рис. 2, в, з). На листьях линии 56/99ⁱ, обработанных зеатином, также наблюдали повышение числа аномальных аптессориев. По сравнению с данными, полученными при использовании сорта Хакасская, положение максимума было сдвинуто в сторону более высоких концентраций. Зеатин в концентрациях 0.5—1.0 и 4.5 мкМ стимулировал образование нормальных аптессориев спустя 24 ч после инфицирования (рис. 2, а, б). Через 48 ч (рис. 8) кривая «доза—эффект» также имела 2 пика при низких и высоких концентрациях с резким спадом стимулирующей активности при 1.5 мкМ для дифференциации нормальных аптессориев, при 1.5 мкМ зеатина наблюдали повышенное количество аномальных аптессориев. Во всех 3 опытах кривые, описывающие влияние концентрации зеатина на образование колоний (или микроколоний), достаточно точно соответствовали кривым зависимости от концентрации дифференциации нормальных аптессориев. Интересно отметить, что непараллельность друг другу участков этих кривых (для левого пика количества колоний на листьях сорта Хакасская и правого

пика для линии 56/99ⁱ) отмечали в случаях, когда наблюдаемое через 24 ч число нормальных аптессориев было существенно меньше окончательного числа колоний, наблюдаемых на 6-е сут после инфицирования. По-видимому, несовпадение полученных в данном опыте кривых для числа нормальных аптессориев и числа колоний было вызвано развитием дополнительных колоний из более поздно прорастающих конидий, не учтенных через 24 ч после инфицирования. В отличие от данных 2 других опытов (рис. 7, а, б), где на кривой представлено число колоний, окончательно установившееся в процессе патогенеза (6 сут), число колоний на кривой, полученной через 48 ч (рис. 8), отражает только наиболее быстро развивающиеся колонии. Очевидно, что в последующие сроки число колоний должно увеличиваться за счет как более поздно прорастающих конидий, так и части проросших конидий, не учтенных через 48 ч и не представленных на соответствующей кривой на рис. 8. Корреляция средних значений плотности колоний и нормальных аптессориев может свидетельствовать об образовании колоний именно из числа нормальных аптессориев. Таким образом, инфекционные структуры, ранее названные нормальными, по-видимому, действительно соответствуют своему названию и дают начало колониям патогена в отличие от аномальных удлиненных аптессориев.

Обсуждение

Наиболее ранним видимым проявлением взаимодействия патогена и растения в патосистеме растения пшеницы—возбудитель мучнистой росы является прорастание конидий с образованием аптессория. Показано, что высокие концентрации экзогенных цитокининов стимулируют процесс прорастания конидий, однако способны ингибировать дальнейший рост возбудителя мучнистой росы ячменя (Vizarova, 1985; Liu, Bushnell, 1986), вызывают аномалии в морфологии ростковых трубок и аптессориев — их «израстание» (Мишина и др., 1988, 2002). При обработке цитокининами апексы длинных ростковых трубок часто имели отрицательный таксис. Данные морфологические изменения соответствовали характеру развития инфекционных структур на поверхности листьев устойчивых генотипов злаков и флокса (Мишина и др., 1988; Рашаль и др., 1992), что, возможно, свидетельствует об определенной общности биохимических процессов. Во многом сходные изменения в процессе формирования аптессориев другого высокоспециализированного облигатного патогена *Puccinia graminis* наблюдали при обработке иммуностимуляторами (Ямалеев и др., 1990). По характеру развития патогена, его морфологической изменчивости на эктофитной стадии можно судить о состоянии патосистемы на ранних этапах ее развития и о возникающих в это время ответных реакциях (в том числе и защитных) растения-хозяина. Доля нормально сформированных инфекционных структур мучнисто-росяного патогена коррелирует со степенью восприимчивости растения (Сережкина и др., 1999).

В данной работе впервые изучены концентрационные кривые влияния зеатина на некоторые параметры развития возбудителя мучнистой росы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзогенный цитокинин оказывает влияние на прорастание конидий и рост патогена в эктофитной стадии. Характер этого влияния в наших опытах зависел от особенностей растения-хозяина. Так,

на сорте Хакасская добавление зеатина в целом ингибировало дифференциацию нормальных аппрессориев и стимулировало их аномальный рост. На листьях пшенично-эгилопсной линии 56/99ⁱ зеатин вызывал стимуляцию обоих типов развития, однако оптимальные концентрации для аномального развития были заметно выше. Полученные нами данные подтверждают стимуляцию под действием высоких концентраций цитокининов аномалий в морфологии ростковых трубок и аппрессориев. Вместе с тем концентрационная зависимость данного процесса имеет довольно сложный характер, ее форма зависит от особенностей цитокининового обмена у разных генотипов растения.

В обоих опытах с линией 56/99ⁱ максимумы числа колоний коррелировали с максимумами числа аппрессориев. При этом количество аппрессориев в зонах максимумов существенно превышало контрольный уровень. Применение зеатина индуцировало прорастание дополнительного числа конидий и затем дополнительное по сравнению с контролем число колоний. Наоборот, концентрациям зеатина в зоне минимума на кривой числа колоний (рис. 7, 8) в большей или меньшей степени соответствовало снижение по сравнению с контролем числа нормальных аппрессориев. Обработка зеатином способствовала также увеличению числа аномальных аппрессориев, однако, как правило, пики стимуляции нормального и аномального прорастания не совпадали. Число колоний коррелирует положительно с числом нормальных аппрессориев и отрицательно с числом аномальных аппрессориев. Эта закономерность особенно хорошо была заметна через 48 ч после инфицирования (рис. 8). Зависимость конечного результата патогенеза, т. е. числа нормально развитых спороносящих колоний (обычно через 6 сут после инфицирования), от концентрации зеатина также имеет сходство с аналогичной зависимостью для числа нормальных аппрессориев через 24 и 48 ч после инфицирования. Вероятно, некоторые различия этих кривых можно объяснить вкладом более поздно прорастающих конидий. Как известно, в патосистеме мучнистая роса—восприимчивые растения ячменя максимальное число (60 %) успешных проникновений патогена в клетку растения достигалось уже через 36 ч взаимодействия (Opalski et al., 2005). По-видимому, при определенных условиях прорастание конидий, характер дифференциации инфекционных структур патогена являются лимитирующим этапом и оказывают решающее влияние на последующее проникновение в клетку, образование гаустории и определяют характер конечной зависимости доза—эффект от концентрации цитокининов для числа колоний. Появление сложной кривой может быть связано с наличием нескольких зависимых от цитокининов процессов с различными диапазонами оптимальных концентраций. Причиной возрастания числа колоний под действием цитокининов в точках максимума, вероятно, является их положительное влияние на число нормальных аппрессориев, а снижение в точке минимума до уровня контроля или иногда ниже — на возрастание доли аномальных аппрессориеподобных структур, не способных к образованию колоний.

Особенностью патогенеза мучнисто-росяных грибов злаков является образование гало — специфических концентрических структур в месте контакта на поверхности эпидермальной клетки, достаточно рано относительно момента инфицирования (24—72 ч) выявляемых при цитохимической окраске. Окрашивание зоны гало происходит при использовании кислых, но не основных красите-

лей (Мишина и др., 2001). Возможной мишенью данной группы красителей являются основные белки клеточной стенки и плазмалеммы.

Существуют различные предположения о природе гало. Шервуд и Вэнс (1985) описывают гало как биохимически измененную часть клеточной стенки. В целлюлозном слое в области гало обнаружено повышенное содержание кремния (Zeyen, 1991). При использовании сканирующей электронной микроскопии гало иногда заметно в виде более светлого ореола на поверхности эпидермальной клетки вокруг места проникновения паразита (Мишина и др., 2001). С точки зрения Мишиной и соавторов (2001), гало представляет собой физиологически активную зону, локализованную на уровне плазмалеммы клетки растения. На ранних стадиях патогенеза в клетках эпидермиса ячменя обнаружена концентрическая реорганизация элементов цитоскелета вокруг сайта проникновения мучнисто-росяного патогена, по форме и размерам соответствующая гало, выявляемым красителями на белки, и пространственно совпадающая с зоной автофлуоресценции в клеточной стенке (Kobayashi et al., 1997; Opalski et al., 2005). Данную цитоскелетную структуру наблюдали преимущественно в случаях abortивной инфекции в клетках, устойчивых к проникновению патогена растений *mlo5*-генотипа (до 80 % от числа всех сайтов контракта с инфекционными структурами патогена). Однако даже в случае восприимчивого сорта от 30 до 56 % сайтов взаимодействия с патогеном показали наличие поляризованного актина (Opalski et al., 2005).

При окраске гало на общие белки с использованием амидочерного или сулема-бромфенолового синего могут быть выявлены различные цветовые оттенки (Мишина и др., 2001). В ряде опытов мы также наблюдали неравномерность окраски гало и наличие нескольких колец разного цвета (синих, пурпурно-красных, серых или различающихся насыщенностью одного цветового оттенка). Ранее было отмечено, что гало с выраженной кольцевой зональностью более характерны для патосистем с определенным уровнем несовместимости и протекающими защитными реакциями (Сережкина и др., 1999; Мишина и др., 2001). Было показано также, что площадь вторичных гало в зоне контакта гифальных лопастей, которые наблюдали в клетках, не содержащих гаустории, существенно больше площади гало в клетках с гаусториями (Сережкина и др., 1999). Эти данные могут свидетельствовать о том, что устойчивость отдельных клеток растения-хозяина к проникновению патогена, проявляющаяся как неспособность патогена к формированию питающей структуры, коррелирует с размерами гало. Сходные тенденции можно обнаружить во взаимосвязи между размерами первичного аппрессориального гало и показателями восприимчивости у разных гибридных линий, в том числе с числом нормально сформированных инфекционных структур мучнисто-росяного патогена (Сережкина и др., 1999). Мы предположили, что в размерах гало отражены процессы обмена информацией между растением и патогеном, определяющие конечный исход взаимодействия растения и патогена. В данной работе впервые показано, что размеры гало могут изменяться под действием физиологически активных веществ, в частности фитогормонов цитокининового типа. Как видно на рис. 6, зависимость величины диаметра гало в клетках эпидермиса линии 56/99ⁱ от концентрации зеатина через 24 ч после инфицирования близка к таковым для числа нормальных аппрессориев (48 ч) и колоний мучнисто-росяного патогена (6 сут после инфици-

цирования), а в области низких концентраций зеатина практически совпадает. Концентрационная кривая действия зеатина во всех 3 случаях представлена многофазной кривой с двумя максимумами. Таким образом, размеры первичного гало и характер прорастания конидий возбудителя мучнистой росы взаимосвязаны, что, вероятно, обусловлено существованием факторов, оказывающих влияние на оба параметра, а также и на конечное число колоний патогена. При этом происхождение многофазной кривой для зависимости числа видимых невооруженным взглядом колоний от концентрации цитокинина связано с действием факторов, действующих на ранних этапах патогенеза (24—48 ч после инфицирования).

Список литературы

- Бабоша А. В. 2004. Иммуномодулирующие свойства различных природных цитокининов в патосистеме пшеница—возбудитель мучнистой росы. Микол. фитопатол. 38 (6) : 84—89.
- Бабоша А. В. 2007. Нелинейная зависимость иммуномодулирующего действия цитокининов от их концентрации в патосистеме пшеница—возбудитель мучнистой росы. В кн.: Современная физиология растений: от молекул до экосистем: Матер. докл. междунар. конф. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН. 1 : 247—249.
- Ларина С. Ю., Музыкантов В. П., Рункова Л. В. 1991. Влияние физиологически активных веществ на развитие бурой ржавчины на некоторых сортах и изогенных линиях пшеницы. В кн.: Облигатный паразитизм: цитофизиологические аспекты. М.: Наука. 47—51.
- Левин И. М. 1984. Влияние фитогормонов на развитие бурой ржавчины у изолированных листьев пшеницы. Физиол. раст. 31 (2) : 356—361.
- Максимов И. В., Трошина Н. Б., Хайруллин Р. М., Сурина О. Б., Ганиев Р. М. 2002. Влияние твердой головки на рост проростков и каллусов пшеницы. Физиол. раст. 49 (5) : 767—772.
- Мишина Г. Н., Андреев Л. Н., Визарова Г., Талиева М. Н., Серезжкина Г. В. 1988. Изучение влияния экзогенных цитокининов на взаимоотношения растения и патогена при мучнистой росе. In: Patologica fiziologia rastlin (zborn. referatov) Br. UEVE, SAV. Bratislava. 177—180.
- Мишина Г. Н., Серезжкина Г. В., Аветисян Т. В., Рябченко А. С., Андреев Л. Н. 2001. Особенности формирования гало в процессе патогенеза как ответная реакция эпидермальных клеток злаков на проникновение возбудителей мучнистой росы. Известия РАН. Серия биол. 4 : 424—430.
- Мишина Г. Н., Серезжкина Г. В., Рашиль И. Д., Андреев Л. Н. 1988. Особенности развития *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* Marchal на листьях различных по устойчивости генотипов ячменя. Микол. фитопатол. 22 (4) : 292—295.
- Мишина Г. Н., Талиева М. Н., Бабоша А. В., Серезжкина Г. В., Андреев Л. Н. 2002. Влияние фитогормонов на развитие конидиального инокулюма возбудителей мучнистой росы флокса и ячменя. Изв. АН. Сер. биол. 1 : 74—81.
- Музыкантов В. П., Ларина С. Ю., Гусева Н. Н. 1991. Цитокинины в патогенезе стеблевой и бурой ржавчины пшеницы. В кн.: Облигатный паразитизм: цитофизиологические аспекты. М.: Наука. 41—47.
- Попова Э. В., Гютерев С. Л. 1988. Влияние ржавчинной инфекции и стимулятора роста бензимидазольной природы на цитокининовый обмен растений пшеницы. Бюл. ВНИИ защиты растений. 71 : 65—70.
- Рашиль И. Д., Мишина Г. Н., Серезжкина Г. В., Васильева В. В. 1992. Особенности взаимоотношения *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal. и различных по устойчивости генотипов ячменя. Латвияс Зинатню Академияс Вестис. 8 (541) : 62—65.
- Серезжкина Г. В., Андреев Л. Н., Аветисян Т. В., Батова С. Н., Полева Л. В. 1996. О роли первичных реакций во взаимоотношениях паразита и растения-хозяина при определении устойчивости пшенично-пырейных гибридов к *Erysiphe graminis tritici* на стадии проникновения. Изв. РАН. Сер. биол. 4 : 422—429.
- Серезжкина Г. В., Мишина Г. Н., Андреев Л. Н., Аветисян Т. В., Лапочкина И. Ф. 1999. Цитофизиологическая характеристика устойчивости к мучнистой росе *Aegilops speltoides* Tausch. и дисомнодополненных пшенично-эгилопсных линий (2n = 44) в стадии проростков. Изв. РАН. Сер. биол. 4 : 417—424.
- Талиева М. Н., Кондратьева В. В., Андреев Л. Н. 2001. Уровень эндогенных цитокининов, абсцизовой и салициловой кислот в листьях флокса метельчатого и шиловидного под влиянием заражения конидиями фитопатогенов. Изв. АН. Сер. биол. 4 : 431—434.
- Талиева М. Н., Филимонова М. В., Андреев Л. Н. 1991. Вещества с цитокининовой активностью возбудителя мучнистой росы флокса *Erysiphe cichoracearum* DC. f. *phlogis* Jacz. Изв. АН СССР. Сер. биол. 2 : 194—200.
- Фурсова М. С., Музыкантов В. П., Артеменко Е. Н., Плотникова Ю. М. 1991. Влияние *Uromyces caryophyllinus* (Shrank) Wint. на ультраструктуру и гормональный баланс клеток гвоздики ремонтантной. Микол. фитопатол. 25 (1) : 28—33.
- Шервуд Р. Т., Вэнс К. П. 1985. Первичные изменения в клетках эпидермиса при проникании паразита. В кн.: Инфекционные болезни растений. М.: Агропромиздат. 34—53.
- Эйдельмант Н. М., Демурина А. К., Есипова И. В., Крюкова Л. Н. 1985. О корреляции между соотношением различных компонентов изопреноидной рострегулирующей системы и устойчивостью растений пшеницы к желтой ржавчине. Узбекский биол. журн. 4 : 23—26.
- Ямалеев А. М., Серезжкина Г. В., Трошина Н. Б. 1990. Цитологическое исследование влияния иммуностимуляторов аминокислотного ряда на развитие гриба *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Микол. фитопатол. 24 (3) : 216—220.
- Ashby A. M. 2000. Biotrophy and the cytokinin conundrum. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57 : 147—158.
- Clarke S. F., Burritt D. J., Jameson P. E., Guy P. L. 1998. Influence of plant hormones on virus replication and pathogenesis-related proteins in *Phaseolus vulgaris* L. infected with white clover mosaic potyvirus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53 : 195—207.
- Cole J. S., Desiree L., Fernandes D. L. 1970. Changes in the resistance of tobacco leaf to *Erysiphe cichoracearum* DC. induced by topping, cytokinins and antibiotics. *Ann. Appl. Biol.* 66 : 239—243.
- Dekker J. 1963. Effect of kinetin on powdery mildew. *Nature.* 197 : 1027—1028.
- Edwards H. H. 1983. Effect of kinetin, abscisic acid, and cations on host—parasite relations of barley inoculated with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopathol. Z.* 107 : 22—30.
- Greene E. M. 1980. Cytokinin production by microorganisms. *Bot. Rev.* 46 : 25—74.
- Kettner J., Dörffling K. 1995. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Planta.* 196 : 627—634.
- Kobayashi Y., Kobayashi I., Funaki Y., Fujimoto S., Takemoto T., Kunoh H. 1997. Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* 11 : 525—537.
- Liu Z., Bushnell W. R. 1986. Effects of cytokinins on fungus development and host response in powdery mildew of barley. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29 : 41—52.
- Opalski K. S., Schultheiss H., Kogel K.-H., Hüchelhoven R. 2005. The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Plant J.* 41 : 291—303.
- Sziraki I., Gaborjanyi R. 1974. Effect of systemic infection by TMV on cytokinin level of tobacco leaves and stems. *Acta Phytopathol. Hung.* 9 : 195—199.

Vizarova G. 1985. Hypothetical role of free endogenous zeatin and its derivatives in the cereals resistance to obligate fungus parasites. Acta Univ. Agr. Brno. 33 : 175—180.

Vizarova G. 1987. Possible role of cytokinins in cereals with regard to the resistance to obligate fungus parasites. Biol. Plant (Praha). 29 : 230—233.

Walters D. R., McRoberts N. 2006. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? Trends in Plant Sci. 11 : 581—586.

Walters D. R., McRoberts N., Fitt B. D. L. 2008. Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. Biol. Rev. 83 : 79—102.

Zeyen R. J. 1991. Analytical electron microscopy in plant pathology: X-ray microanalysis and energy loss spectroscopy. In: Electron microscopy of plant pathogens. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg. 59—71.

Поступила 17 IX 2008

INFLUENCE OF EXOGENOUS CYTOKININS ON DYNAMICS OF DEVELOPMENT
AND DIFFERENTIATION OF INFECTION STRUCTURE OF THE CAUSAL ORGANISM
OF WHEAT POWDERY MILDEW

A. V. Babosha, A. S. Ryabchenko, T. V. Avetisyan

N. V. Tsitsin Main Botanical Garden RAS, Moscow;
e-mail: phimmunitet@yandex.ru

Using methods of light and electron scanning microscopy, development and infection structures differentiation of the causal organism of wheat powdery mildew, *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* March., was investigated under influence of exogenous zeatin. It has been shown for the first time that physiologically active materials, in particular, cytokinin type phytohormones affect on the dimensions of halo revealed at the site of pathogen penetration by cytochemical staining. Treatment with zeatin influenced conidia germination and pathogen growth at the ectophytic stage. Dose response dependence of zeatin for number of mature colonies of pathogen (6 days after an infection) has been presented by multiphase curve with two maxima (1 and 3 μM) and minimum (1.5 μM). Similar curves have been received for the number of normal appressoria and the diameters of the large halo that possibly shows the existence of factors affecting both parameters, and the final number of pathogen colonies, as well. The obtained data demonstrate that multiphase dose response curve for development of the causal organism of powdery mildew under effect of cytokinins is originated from the factors acting at early stages of pathogenesis.

Key words: exogenous cytokinins, powdery mildew, immunity, pathosystem, obligate parasitism, halo.