

НОВЫЙ ИНСЕРЦИОННЫЙ ЭЛЕМЕНТ В ГЕНЕ *ToxA* ГРИБА *Pyrenophora tritici-repentis*

© 2024 г. Н. В. Мироненко¹ *, А. С. Орина¹, Н. М. Коваленко¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия
*e-mail: nina2601mir@mail.ru

Поступила в редакцию 06.03.2024 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 08.04.2024 г.

Аскомицетный гриб *Pyrenophora tritici-repentis* является возбудителем желтой пятнистости листьев пшеницы. Среди некротрофных эффекторов, которые продуцирует гриб, наиболее изучен некрот-индуцирующий белковый токсин Ptr ToxA, кодируемый геном *ToxA*. Ранее нами были выявлены десять штаммов *P. tritici-repentis* из Казахстана и России с геном *ToxA*, амплифицированный фрагмент которого со специфичными для *ToxA* праймерами оказался большего размера, чем ожидалось. Секвенирование последовательности этого фрагмента у трех штаммов гриба выявило присутствие инсерционного элемента PtrHr2 размером 170 пн, локализованного в экзоне 2 гена *ToxA*. Последовательность PtrHr2 включает три пары взаимно комплементарных участков длиной 16, 8 и 6 пн, формирующих вторичную структуру типа «шпильки». Установлена неспособность штаммов *P. tritici-repentis*, обладающих инсерцией в гене *ToxA*, вызывать некроз на листьях сорта Glenlea, дифференцирующего наличие Ptr ToxA в штаммах патогена, что свидетельствует о нарушении экспрессии мутантного гена *ToxA*. Тем не менее мутантный ген *ToxA*, содержащий PtrHr2, сохраняется в 45% конидиального потомства гриба. Гомологичные инсерционному элементу PtrHr2 последовательности встречаются в некодирующих частях гена *ToxB* и его гомологов у штаммов *P. tritici-repentis*, а также в геномах грибов других видов, что свидетельствует о его транспозонной природе.

Ключевые слова: желтая пятнистость, фитотоксин, некротрофный эффектор, инсерционный элемент PtrHr2, ген *ToxA*.

DOI: 10.31857/S0016675824090043 EDN: AEQRLC

Pyrenophora tritici-repentis (Died.) Drechsler — аскомицетный гемибиотрофный фитопатогенный гриб, является возбудителем желтой пятнистости листьев пшеницы. Болезнь вызывает существенные потери урожая пшеницы во всем мире, которые при благоприятных для патогена условиях могут составлять 18–49 % [1, 2].

Гриб *P. tritici-repentis* продуцирует три известных хозяин-специфичных некротрофных эффектора: Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC, которые кодируются генами *ToxA*, *ToxB* и *ToxC* соответственно и индуцируют симптомы некроза или хлороза на сортах пшеницы с соответствующими генами восприимчивости *Tsn1*, *Tsc2* и *Tsc1* [3, 4].

Известно, что ген *ToxA* попал в геном гриба *P. tritici-repentis* путем горизонтального переноса от другого патогена, обитающего на листьях пшеницы, — *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous [5]. Появление *ToxA* в геноме *P. tritici-repentis* считается одной из основных причин

увеличения экономической значимости желтой пятнистости листьев пшеницы [6].

В штаммах *Parastagonospora nodorum* описано 15 гаплотипов (H1 — H15) гена *ToxA*, отличающихся одиночными заменами в 25 нуклеотидных сайтах [7]. Эти гаплотипы кодируют различные изоформы белка, которые различаются по активности в отношении растения, а также влияют на интенсивность спороношения гриба [4]. В то же время в штаммах *Pyrenophora tritici-repentis* ген *ToxA* отличается консервативностью [5, 8], обнаружены только три его гаплотипа (H14 — H16), которые в результате более тщательного анализа были отнесены к одному гаплотипу *ToxA1*, согласно последней предложенной номенклатуре гаплотипов гена *ToxA* [9]. Второй гаплотип гена *ToxA* обнаружен в японских изолятах *P. tritici-repentis* [10] и обозначен *ToxA24* [9].

Гаплотипы *ToxA* различаются наличием мутаций типа SNP, которые могут влиять на структуру транслируемого белка. Другим механизмом изменчивости гена можно считать структурные

изменения в гене, обусловленные появлением инсерций или делеций. Поскольку ген *ToxA* кодирует один из основных известных факторов патогенности *P. tritici-repentis*, необходимо постоянное наблюдение за его изменениями, которые могут влиять на вирулентность гриба. Ранее нами были обнаружены отдельные штаммы *P. tritici-repentis*, у которых увеличен размер амплифицированного фрагмента со специфичными для последовательности *ToxA* праймерами за счет предполагаемой инсерции [11].

Цель исследования — провести анализ структуры мутантных генов *ToxA* у штаммов *P. tritici-repentis* и оценить влияние предполагаемого инсерционного элемента на патогенные свойства гриба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллекция штаммов

В качестве объектов исследования были выбраны десять моноконидиальных штаммов *P. tritici-repentis*, выделенных из листьев пшеницы с симптомами желтой пятнистости и имеющих ген *ToxA* с предполагаемой инсерцией. Среди них пять штаммов были из северо-казахстанской популяции 2022 г. (Каз22-С), один — из северо-казахстанской популяции 2020 года (Каз20-С) и четыре — из татарстанской популяции 2022 года (Тат22) [12].

Экстракция ДНК, ПЦР и электрофорез

Культуры гриба выращивали на среде V4, разработанной на основе смеси соков четырех овощей, при 22 °С в течение 7–10 сут [13]. Выделение геномной ДНК из мицелия грибов проводили СТАВ-методом [14].

Для детекции гена *ToxA* амплифицировали ДНК каждого штамма с праймерами TA51F/TA52R (TA51F 5'-GCGTTCTATCCTCGTACTTC-3'; TA52R 5'-GCATTCTCCAATTTTCACG-3') [15] с ожидаемым размером продукта 573 пн. Наличие специфического фрагмента и его размер определяли путем электрофореза продуктов амплификации в 1.7%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Продукты амплификации гена *ToxA* (около 800 пн), превышающие ожидаемый размер, элюировали из геля и очищали с помощью метода, основанного на сорбции ДНК на тонкодисперсной двуокиси кремния [16].

Определение и анализ нуклеотидной последовательности *ToxA*

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена *ToxA* трех штаммов *P. tritici-repentis* Каз20-С-12, Каз22-С-А-53 и Каз22-С-А-64

проводили методом Сэнгера в фирме Beagle (Санкт-Петербург, Россия). Процедуры выравнивания и ручного редактирования нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI Advance 10 (Thermo Fisher Scientific). Полученные нуклеотидные последовательности были размещены в базе данных GenBank NCBI (OR072645–OR072647) и проверены на сходство с ранее депонированными с помощью инструмента BLAST. Визуализацию выравнивания полученных и референсных последовательностей проводили в программе Jalview 2.11.3.0 [17].

Вторичная структура инсерционного элемента гена *ToxA* была рассчитана с использованием программы RNAstructure 6.0 [18], предсказывающей структуру с максимальной свободной энергией, и визуализирована с помощью программы StructureEditor 6.0.

Анализ патогенности анализируемых штаммов

Расовую принадлежность десяти штаммов *P. tritici-repentis*, несущих ген *ToxA* с инсерционным элементом, определяли путем инокуляции пшеницы сорта Glenlea, линий 6B365 и 6B662, дифференцирующих образование некротрофных эффекторов Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC соответственно [19, 20]. Отрезки листьев от 5–10 растений каждого дифференциатора в возрасте семи дней помещали в кювету на поверхность фильтровальной бумаги, увлажненной 0.004%-ным раствором бензимидазола, и опрыскивали суспензией конидий каждого штамма *P. tritici-repentis* с концентрацией 3000–5000 конидий/мл по 200–300 мкл суспензии на каждый образец. Кюветы инкубировали при температуре 22 °С и освещенности 1500 Лм, фотопериод составлял 12 ч. Оценку вирулентности проводили на 5–6-е сут по наличию или отсутствию некрозов и хлорозов на инокулированных листьях [13, 21].

Анализ митотической стабильности гена *ToxA*

Для штамма *P. tritici-repentis* Каз20-С-12, несущего *ToxA*, при пересеве отдельных конидий с помощью стерильной иглы были получены 22 моноконидиальных субклона. Выделение геномной ДНК из мицелия и детекцию гена *ToxA* в геноме субклонов проводили как описано выше. В качестве параллельного контроля проводили амплификацию гена *CHS1*, присутствующего во всех штаммах *P. tritici-repentis*, с помощью праймеров CHS-79F и CHS-354R (CHS-79F 5'-TGCGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG-3' и CHS-354R 5'-TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG-3') по протоколам авторов [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *ToxA*

Продукты амплификации гена *ToxA* с размером более 800 пн у трех штаммов *P. tritici-repentis* (Каз20-С-12, Каз22-С-А-53 и Каз22-С-А-64) (рис. 1) были вырезаны из агарозного геля, очищены и секвенированы. Полученные нуклеотидные последовательности оказались идентичны. Их сравнение с референсными последовательностями гена *ToxA* штаммов *P. tritici-repentis* AB42 (MN062700), EW13061-2-1 (MH017415), EW4-4 (MH017417), NZ1 (MH017419) и SN001C (MH017418) выявило области 100%-ного сходства на участках 741–803 и 974–1468 пн. Между сходными участками гена анализируемых штаммов находится инсерционный элемент размером 170 пн (рис. 2). Также обнаружен мотив из восьми нуклеотидов CCGGTTAC, который расположен перед инсерцией и идентичен последовательностям анализируемых и референсных штаммов *P. tritici-repentis*, однако он также присутствует в конце инсерционного элемента PtrHr2.

Внутри инсерционного элемента выявлены три пары взаимно комплементарных участков длиной 16, 8 и 6 пн, которые формируют вторичную

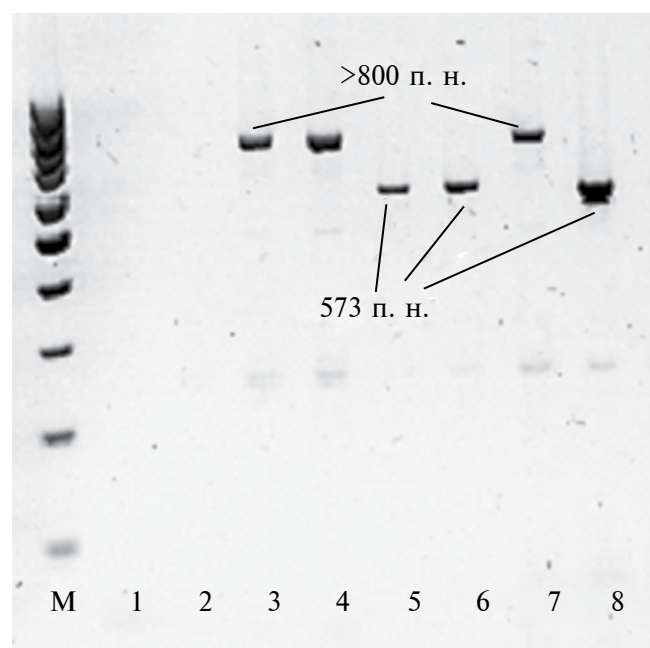


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации фрагмента гена *ToxA* штаммов *P. tritici-repentis* со специфичными праймерами. М – маркер длин фрагментов GeneRuler 100 bp; 1, 2 – негативный контроль; 3 – штамм Каз20-С-12; 4 – Каз22-С-А-53, 7 – Каз22-С-А-64, 5, 6 и 8 – штаммы *P. tritici-repentis* из популяции Каз22-С.

структуру инсерционного элемента в виде «шпильки» (рис. 3).

Вирулентность штаммов *P. tritici-repentis*, несущих ген *ToxA* с инсерционным элементом

Анализ расовой принадлежности штаммов *P. tritici-repentis* с помощью инокуляции отрезков листьев пшеницы сортов-дифференциаторов выявил среди анализируемых десяти штаммов гриба представителей двух рас, не образующих эффектор Ptr ToxA. Четыре штамма из Татарстана, а также Каз20-12 и Каз22-С-А-64 были отнесены к авирулентной расе 4, еще четыре штамма из Казахстана, включая Каз22-С-А-53, – к расе 5, поражающей линию, дифференцирующую штаммы гриба с геном *ToxB*.

Митотическая стабильность гена *ToxA* с инсерционным элементом

Среди 22 моноконидиальных субклонов штамма *P. tritici-repentis* Каз20-С-12, несущего ген *ToxA* с инсерционным элементом PtrHr2, у десяти субклонов (45%) в результате ПЦР амплифицировался продукт ~800 пн, подтверждающий присутствие гена. У остальных субклонов продукт амплификации отсутствовал при наличии положительной реакции ПЦР со специфичными праймерами для гена *CHS1*.

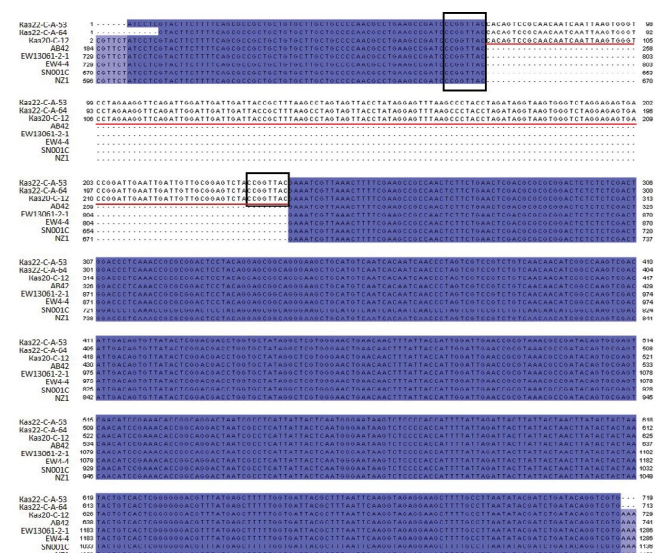


Рис. 2. Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *ToxA* изученных и референсных штаммов *P. tritici-repentis*. Красным выделен инсерционный элемент PtrHr2 размером 170 пн, черным выделен повторяющийся мотив из 8 пн.

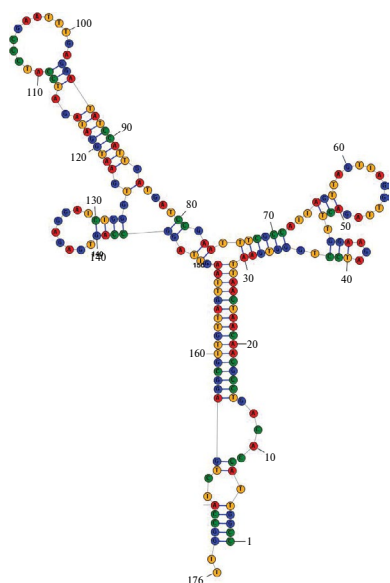


Рис. 3. Вторичная структура инсерционного элемента PtrHp2 в гене *ToxA* гриба *P. tritici-repentis*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мониторинг расового состава популяций *P. tritici-repentis* и присутствия специфичных генов-эффекторов в геноме отдельных штаммов гриба позволяет получать фундаментальные знания о микроэволюции популяций и молекулярно-генетических аспектах взаимоотношений в системе растение-хозяин — патоген [22].

Ранее нами при анализе популяций *P. tritici-repentis* были выявлены десять штаммов, у которых при проведении специфичной ПЦР гена *ToxA* получены продукты амплификации большего размера, чем ожидаемый [12]. Штаммы *P. tritici-repentis* с подобной аномалией гена *ToxA* были отмечены в популяции гриба из Казахстана, выделенной в 2017 г. [11], а также другими исследователями для единичных штаммов *P. tritici-repentis* из России, Казахстана [23], Дании, Германии и Новой Зеландии [24]. Данные находки представляют особый интерес, поскольку свидетельствуют о наличии инсерции в амплифицируемом фрагменте гена *ToxA*, которая может влиять на функциональность гена.

В настоящем исследовании последовательности амплифицированных фрагментов гена *ToxA* у трех штаммов *P. tritici-repentis* из Казахстана оказались идентичны и в сравнении с последовательностью гена дикого типа включали инсерционный элемент длиной 170 пн, обозначенный PtrHp2, по аналогии с обнаруженным ранее в гене *ToxA* инсерционным элементом PtrHp1 [24]. Последовательность PtrHp2 не имеет гомологии с элементом PtrHp1 длиной 165 пн [24]. Кроме того, PtrHp2 расположен в районе экзона 2 гена *ToxA*, в отличие от

PtrHp1, который находится в области 3'UTR *ToxA* экзона 3 [24]. Интересно, что сайты инсерций оказались одинаковыми как для штаммов с элементом PtrHp1, так и для всех проанализированных нами штаммов с элементом PtrHp2, что свидетельствует об уникальности событий инсерции в гене *ToxA* после его горизонтального переноса в геном *P. tritici-repentis*. С другой стороны, оба элемента PtrHp1 и PtrHp2 имеют сходство в наличии взаимно комплементарных участков и вторичной структуре в виде «шпильки». Известно, что инсерции, образующие «шпильки», могут быть включены в механизмы сайленсинга генов, в которых они находятся [25].

Поиск гомологичных инсерционному элементу PtrHp2 последовательностей выявил 100%-ный идентичный участок 170 пн в некодирующей области гена *ToxB* (OP418007) штамма *P. tritici-repentis* SC29-1 из Канады [10]. Также выявлена полная идентичность инсерционного элемента PtrHp2 и фрагментов в некодирующей области генов *ToxB1* (AY425480) и *ToxB2* (AY425481) штамма *P. tritici-repentis* DW7 из США [26]. Гены *ToxB1* и *ToxB2* являются гомологами мульткопийного гена *ToxB*, контролирующего продукцию хлороз-индуцирующего белка-эффектора Ptr ToxB [26]. Локусы *ToxB1*, *ToxB2* и *ToxB3* имеют признаки укороченного ретротранспозона, т. е. содержат инвертированные повторы длиной 36 пн, фланкированные прямыми повторами длиной 6 пн [26]. Выявленная гомология всей последовательности инсерционного элемента с участками генов *ToxB1* и *ToxB2* позволяет предполагать, что механизм возникновения данной инсерции связан с укороченными ретротранспозонами, которые ассоциированы с локусами *ToxB* и могут стать причиной амплификации или делеции гена путем неравного кроссинговера с подобными последовательностями, расположенными в другом месте генома [26].

В геноме трех штаммов гриба *Pyrenophora teres* f. *maculata* из США, Новой Зеландии и Дании [27] на хромосоме 3 обнаружен фрагмент размером 159–165 пн, имеющий 94–100% сходства с последовательностью инсерционного элемента PtrHp2. Факты совпадения последовательности PtrHp2 в гене *ToxA* *P. tritici-repentis* с фрагментами генов у других видов грибов также свидетельствуют о его транспозонной природе.

Показано, что в процессе горизонтального переноса ген *ToxA* находился внутри транспозона ToxhAT размером 14 тпн, который, в свою очередь, расположен на участке генома размером 140–250 тпн, богатого транспозонами [28], а именно внутри транспозона “Starship”, имеющего размер 143 тпн [29]. Новый класс транспозабельных элементов, называемых Starships, относится к группе гигантских мобильных элементов размером более 50 тпн, которые участвуют в горизонтальных переносах

генов и играют особую роль в эволюции грибов [30, 31].

Шесть анализированных штаммов *P. tritici-repentis*, несущих ген *ToxA* с инсерционным элементом PtrHp2, были отнесены к авирулентной расе 4, которая не продуцирует ни один из известных эффекторов, и четыре штамма — к расе 5, которая продуцирует только Ptr ToxB. Данные результаты свидетельствуют о нарушении экспрессии гена *ToxA* в исследуемых штаммах гриба, что выражается в отсутствии симптомов некроза на листьях пшеницы сорта Glenlea, восприимчивого к эффектору Ptr ToxA.

Анализ конидиального потомства анализируемого штамма Каз20-С-12 с геном *ToxA*, содержащим PtrHp2, показал, что более 55% конидий не имеют искомого гена. Ранее нами была продемонстрирована гетерокариотичная природа штаммов *P. tritici-repentis* с использованием в качестве маркеров генов-эффекторов *ToxA* и *ToxB* [32]. Поскольку исходный штамм Каз20-С-12, по всей видимости, является гетерокариотом, то ядра, несущие ген *ToxA*, имеют одинаковые шансы с ядрами, утратившими этот ген, формировать новые конидии.

Таким образом, выявлены редкие события инсерции элемента PtrHp2, имеющего, по-видимому, транспозонную природу и способного формировать структуру шпильки с инвертированными повторами в гене *ToxA*. При этом элемент PtrHp2, открытый нами, локализован в кодирующей области *ToxA* и, по-видимому, нарушает работу гена, т. е. выполняет регуляторную или иную функцию. В то же время он не влияет на жизнеспособность изолятов, его несущих, и сохраняется при бесполом размножении. Для понимания возможной биологической роли инсерционных элементов в гене *ToxA* *P. tritici-repentis* необходимо проведение дополнительных исследований.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. Yield losses in wheat from yellow spot: Comparison of estimates derived from single tillers and plots // Aust. J. Agric. Res. 1982. V. 33. P. 899–908.
<https://doi.org/10.1071/AR9820899>
2. Bhathal J., Loughman R., Speijers J. Yield reduction in wheat in relation to leaf disease from yellow (tan) spot and *Septoria nodorum* blotch // Eur. J. Plant Pathol. 2003. V. 109. P. 435–443.
<https://doi.org/10.1023/A:1024277420773>
3. Adhikari T.B., Bai J., Meinhardt S.W. et al. Tsn1-mediated host responses to *ToxA* from *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant Microbe Interact. 2009. V. 22. № 9. P. 1056–1068.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1056>
4. Tan K.C., Ferguson-Hunt M., Rybak K. et al. Quantitative variation in effector activity of *ToxA* isoforms from *Stagonospora nodorum* and *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant Microbe Interact. 2012. V. 25. P. 515–522.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-10-11-0273>
5. Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z. et al. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 953–956.
<https://doi.org/10.1038/ng1839>
6. Faris J.D., Liu Z., Xu S.S. Genetics of tan spot resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 2197–2217.
<https://doi.org/10.1007/s00122-013-2157-y>
7. Stukenbrock E.H., McDonald B.A. Geographical variation and positive diversifying selection in the host specific toxin Sn ToxA // Mol. Plant Pathol. 2007. V. 8. P. 321–332.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00396.x>
8. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Михайлова Л.А. Частота гена *ToxA* в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49. № 5. С. 325–329.
9. Aboukhaddour R., Hafez M., McDonald M. et al. A revised nomenclature for *ToxA* haplotypes across multiple fungal species // Phytopathology. 2023. V. 113. № 7. P. 1180–1184.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-23-0017-SC>
10. Hafez M., Despins T., Nakajima K., Aboukhaddour R. Identification of a novel *ToxA* haplotype of *Pyrenophora tritici-repentis* from Japan // Phytopathology. 2022. V. 112. P. 1597–1602.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-22-0001-SC>
11. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования *ToxA* и *ToxB* // Вестн. защиты растений. 2019. № 1. С. 24–29.
[https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-24-29](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29)
12. Мироненко Н.В., Ордина А.С., Коваленко Н.М., Зубко Н.Г. Расовый состав и изменчивость гена *ToxA* в географически отдаленных популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* // Микология и фитопатология. 2024. Т. 58. № 3. С. 246–253.
<https://doi.org/10.31857/S0026364824030064>
13. Михайлова Л.А., Гуляева Е.И., Кокорина Н.М. Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora*

- tritici-repentis* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. № 1. С. 63–67.
14. Murray H.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 4321–4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
 15. Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification // Phytopathology. 2007. V. 97. P. 694–701. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0694>
 16. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. P. 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
 17. Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A. et al. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
 18. Reuter J.S., Mathews D.H. RNAstructure: Software for RNA secondary structure prediction and analysis // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
 19. Lamari L., Gilbert J., Tekauz A. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada // Can. J. Plant Pathol. 1998. V. 20. P. 396–400. <https://doi.org/10.1080/07060669809500410>
 20. Lamari L., Strelkov S.E. The wheat – *Pyrenophora tritici-repentis* interaction: Progress towards an understanding of tan spot disease // Can. J. Plant Pathol. 2010. V. 32. P. 4–10. <https://doi.org/10.1080/07060661003594117>
 21. Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и Северо-Западе России: расовый состав и динамика вирулентности // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. Вып. 6. С. 393–400.
 22. Афанасенко О.С., Новожилов К.В. Проблемы рационального использования генетических ресурсов устойчивости растений к болезням // Экол. генетика. 2009. Т. 7. № 2. С. 38–42. <https://doi.org/10.17816/ecogen7238-43>
 23. Lepoint P., Renard M.E., Legreve A. et al. Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis* // Phytopathology. 2010. V. 100. P. 474–483. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-5-0474>
 24. Moolhuijzen P.M., See P.T., Oliver R.P., Moffat C.S. Genomic distribution of a novel *Pyrenophora tritici-repentis* *ToxA* insertion element // PLoS One. 2018. V. 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206586>
 25. Chang S.S., Zhang Z., Liu Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions // Annu. Rev. Microbiol. 2012. V. 66. P. 305–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150138>
 26. Martinez J.P., Oesch N.W., Ciuffetti L.M. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, *ToxB*, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant-Microbe Interact. 2004. V. 17. P. 467–474. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.5.467>
 27. Wyatt N.A., Friesen T.L. Four reference quality genome assemblies of *Pyrenophora teres* f. *maculata*: A resource for studying the barley spot form net blotch interaction // Mol. Plant Microbe Interact. 2021. V. 34. P. 135–139. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0228-A>
 28. McDonald M.C., Taranto A.P., Hill E. et al. Transposon-mediated horizontal transfer of the host-specific virulence protein *ToxA* between three fungal wheat pathogens // mBio. 2019. V. 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01515-19>
 29. Gourlie R., McDonald M., Hafez M. et al. The pangenome of the wheat pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* reveals novel transposons associated with necrotrophic effectors *ToxA* and *ToxB* // BMC Biol. 2022. V. 20. Art. 239. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01433-w>
 30. Gluck-Thaler E., Vogan A.A., Branco S. Giant mobile elements: Agents of multivariate phenotypic evolution in fungi // Cur. Biol. 2022. V. 32. № 5. P. R234–R236. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.020>
 31. Urquhart A.S., Vogan A.A., Gardiner D.M., Idnurm A. *Starships* are active eukaryotic transposable elements mobilized by a new family of tyrosine recombinases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2023. V. 120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214521120>
 32. Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М. Генетический полиморфизм ядер штаммов *Pyrenophora tritici-repentis* по генам-эффекторам *ToxA* и *ToxB* // Генетика. 2021. Т. 57. № 5. С. 528–535. <https://doi.org/10.31857/S0016675821040093> (Mironenko N.V., Orina A.S., Kovalenko N.M. Nuclear genetic polymorphism in *Pyrenophora tritici-repentis* strains for *ToxA* and *ToxB* effector genes // Rus. J. Genetics. 2021. V. 57. P. 533–539. <https://doi.org/10.1134/S1022795421040098>)

Novel *ToxA* Insertion Element in *Pyrenophora tritici-repentis***N. V. Mironenko*, A. S. Orina, N. M. Kovalenko***All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia***e-mail: nina2601mir@mail.ru*

Pyrenophora tritici-repentis is the causative agent of tan spot in wheat. Among the necrotrophic effectors produced by the fungus, the most studied is the necrosis-inducing protein toxin Ptr ToxA, encoded by the *ToxA* gene. Previously, we identified 10 strains of *P. tritici-repentis* from Kazakhstan and Russia, the amplified fragment of which with *ToxA*-specific primers turned out to be larger than expected. Sequencing of these fragments of three *P. tritici-repentis* strains revealed the presence of a 170 bp insertion element PtrHp2 located in exon 2 of the *ToxA* gene. The PtrHp2 sequence includes three pairs of mutually complementary regions of 16, 8 and 6 bp in length, forming a hairpin-type secondary structure. The inability of *P. tritici-repentis* strains possessing PtrHp2 in the *ToxA* gene to cause necrosis on the leaves of cv. Glenlea, which differentiates the presence of Ptr ToxA in the pathogen has been established. This fact indicates a violation of the expression of the mutant *ToxA* gene. However, the mutant *ToxA* gene with PtrHp2 is retained in 45% of the fungal mitotic progeny. The fragments homologous to the PtrHp2 are found in non-coding parts of *ToxB* gene and its homologues in *P. tritici-repentis* strains, as well as in the genomes of other fungi. This observation indicates the transposon nature of PtrHp2.

Keywords: tan spot, phytotoxin, necrotrophic effector, insertion element PtrHp2, gene *ToxA*.