

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 632.4.01/.08

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ГЕНЫ-ЭФФЕКТОРЫ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ ГРИБА *PARASTAGONOSPORA NODORUM* ИЗ АЛТАЙСКОГО КРАЯ (РОССИЯ)

© 2023 г. Ю. В. Зеленева^{1,*}, Ф. Б. Ганнибал^{1,**}, И. А. Казарцев^{1,***}, В. П. Судникова^{2,****}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия

²Среднерусский филиал Федерального научного центра им. И.В. Мичурина, 392553 Тамбов, Россия

*e-mail: zelenewa@mail.ru

**e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru

***e-mail: kazartsev@inbox.ru

****e-mail: sudnikova47@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 31.05.2023 г.

Септориозы – вредоносные болезни пшеницы, распространенные во всех зернопроизводящих странах и вызываемые грибами преимущественно из родов *Parastagonospora* и *Zymoseptoria*. Цель данной работы состояла в подтверждении видовой принадлежности алтайских изолятов *Parastagonospora nodorum*, полученных с сортов озимой и яровой пшеницы, ярового овса и тритикале, путем анализа нуклеотидных последовательностей двух филогенетически информативных локусов ДНК ITS и *tub2*, а также в определении генов-эффекторов *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* и изучении вирулентных свойств полученных изолятов. Для первичной идентификации возбудителей септориозной пятнистости использовали микроскопический анализ пикнид и конидий, взятых из фрагментов пораженной ткани растений. Септориоз на изученных образцах вызывал вид *P. nodorum*. Колонии гриба на картофельно-глюкозном агаре имели хорошо развитый бархатистый мицелий светло-бурого цвета, по периферии они были темными (смешанный тип) с большим количеством пикнид и конидий. Секвенирование восьми моноконидиальных изолятов, полученных из разных инфекционных образцов, показало, что все они имели 100%-е сходство по обоим локусам ITS и *tub2*. Последовательности обоих локусов имели наибольшую степень гомологии с *P. nodorum*. В результате поиска трех генов-эффекторов с помощью ПЦР в генотипе всех 80 моноконидиальных изолятов *P. nodorum*, полученных с сортов озимой и яровой пшеницы, ярового овса и тритикале, был выявлен только ген *Tox3*. Гены *ToxA* и *Tox1* у изученных изолятов обнаружены не были. Вирулентность изолятов *P. nodorum* определяли в лабораторных условиях, используя метод оценки на изолированных листьях пшеницы. Четыре изолята, полученных с яровой пшеницы, и один изолят с озимой пшеницы были охарактеризованы как вирулентные. При заражении сортов яровой и озимой пшеницы смесью двух изолятов, полученных с овса, отмечено проявление авирулентных свойств. Изолят, выделенный с тритикале, проявил авирулентность на сортах озимой и вирулентность на сортах яровой пшеницы.

Ключевые слова: вирулентность, гены-эффекторы, молекулярная диагностика, селективный токсин хохляина, септориоз, филогенетическое дерево, *Parastagonospora nodorum*

DOI: 10.31857/S0026364823050124, **EDN:** EYWBIS

ВВЕДЕНИЕ

Parastagonospora nodorum (Berk.) Quaedvl., Verkley et Crous – фитопатогенный гриб, являющийся серьезной проблемой для производителей пшеницы во всем мире (Croll et al., 2021). Этот вид вызывает септориоз листа и колоса пшеницы, режю, тритикале, ячменя и некоторых диких злаков (Richards et al., 2022). Фитопатоген является одним из наиболее вредоносных во всех зернопроизводящих странах (Phan et al., 2018). Первые сильные поражения пшеницы септориозом, вызван-

ные *P. nodorum*, отмечались в США и Канаде в 1920-х и 1940-х годах (Shipton et al., 1971). С тех пор септориоз, вызываемый этим видом, признан одним из основных заболеваний пшеницы в Северной Америке, Европе, Австралии и других частях мира, вызывая потери урожая до 30% (Solomon et al., 2006).

В годы эпифитотий септориоза листьев и колоса в разных регионах России потери урожая пшеницы могут превышать 40% (Sanin et al., 2018). Первые симптомы септориоза на сортах озимой

Таблица 1. Происхождение моноконидиальных изолятов *Parastagonospora nodorum* полученных из образцов из Алтайского края в 2022 г.

Номер образца	Номера изолятов	Происхождение образца	Растение-хозяин
1	110-22-1 (30)	Смоленский р-н, ООО “Житница”	яровая мягкая пшеница КВС Буран
2	112-22-1 (30)	Зональный р-н, агрофирма “НИВА”	озимая мягкая пшеница Скипетр
3	113-22-1 (30)	Смоленский р-н, ООО “Житница”	яровой овес
4	116-22-1 (30)	Зональный р-н, агрофирма “НИВА”	яровой овес Сибирский геркулес
5	117-22-1 (30)	Смоленский р-н, ООО “Агро-Сибирь”	яровая мягкая пшеница КВС Буран
6	118-22-1 (30)	Целинный р-н	яровая мягкая пшеница КВС Буран
7	122-22-1 (30)	“ ”	тритикале
8	123-22-1 (30)	Каменский р-н, ООО “Приозерье”	яровая мягкая пшеница КВС Аквилон

пшеницы в Алтайском крае отмечаются в начале июня в фазу начала колошения (51 по шкале Цадокс) (Manylova et al., 2018).

Септориоз листьев и колоса — одно из наиболее экономически значимых заболеваний пшеницы в Сибирском регионе (Тогорова et al., 2020). Исследования, проведенные Е.Ю. Тороповой с коллегами в 2016–2018 гг., показали, что в Западной Сибири *P. nodorum* доминирует в патогенном комплексе септориозных пятнистостей пшеницы (35% по показателю развития болезни и 90% по распространенности). Видовой состав возбудителей септориоза региона был представлен видами *Parastagonospora nodorum*, *P. avenae* f. sp. *triticae* и *Zymoseptoria tritici* (*Septoria tritici*). Из числа этих видов в Новосибирской обл. *P. nodorum* встречался чаще всего. В Тюменской обл. доминирование *P. nodorum* не было таким безусловным. В Алтайском крае преобладал *P. nodorum*, а виды *P. avenae* f. sp. *triticae* и *Zymoseptoria tritici* встречались также повсеместно, но значительно реже (Тогорова et al., 2020). При этом находки *Parastagonospora avenae* f. sp. *triticae* — таксона с неясным статусом, вероятно, корректнее относить к недавно описанному виду *P. pseudonodorum* (Croll et al., 2021).

Виды *P. nodorum*, *P. pseudonodorum* и *Pyrenophora tritici-repentis* известны своей способностью синтезировать некротрофные эффекторы (necrotrophic effectors — NEs), в том числе специфичные к хозяину токсины (host selective toxins — HSTs), которые могут функционировать как факторы патогенности (Ciuffetti et al., 1997). Для пшеницы описаны гены, обуславливающие устойчивость к данным токсинам. Охарактеризовано в общей сложности девять генетических взаимодействий в патосистеме “пшеница — гриб-продуцент специфичного токсина”: *Tsn1* — SnToxA; *Snn1* — SnTox1; *Snn2* — SnTox267; *Snn3-B1* — SnTox3; *Snn3-D1* — SnTox3; *Snn4* — SnTox4; *Snn5* — SnTox5; *Snn6* — SnTox267; *Snn7* — SnTox267 (Richards et al., 2022).

К настоящему времени отсекуены три гена растения-хозяина: *Tsn1* (Faris et al., 2011),

Snn1 (Shi et al., 2016) и *Snn3-D1* (Zhang et al., 2021), а также пять генов, кодирующих белки-эффекторы у гриба: *ToxA* (Friesen et al., 2006), *Tox3* (Liu et al., 2009), *Tox1* (Liu et al., 2012), *Tox5* (Kariyawasam et al., 2022) и *Tox267* (Richards et al., 2022).

Цель данной работы состояла в подтверждении видовой принадлежности алтайских изолятов *Parastagonospora nodorum* путем анализа нуклеотидных последовательностей двух филогенетически информативных локусов ДНК ITS и *tub2*, а также в определении генов-эффекторов *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* и изучении вирулентных свойств полученных изолятов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы пораженных листьев пшеницы, тритикале и овса собирали в 2022 г. на территории Алтайского края. Метеоусловия года способствовали развитию септориозных инфекций. Степень поражения инфекционного материала, отобранного для анализа, варьировала от 30 до 40%. Для сбора образцов пораженных растений проводили обследование посевов в р-нах, указанных в табл. 1. Все образцы были собраны в фазу созревания, в стадию молочно-восковой спелости растений (75–85 по шкале Задокса). Собирали листья с типичными внешними признаками септориоза и гербаризировали.

Всего было собрано восемь инфекционных образцов, под которыми понимали группу листьев с хорошо выраженными симптомами септориоза, собранных на одном поле по его диагонали через равные расстояния в одно время. В дальнейшем образцы анализировали в лабораторных условиях для установления видового состава возбудителей септориозных пятнистостей (табл. 1).

Для предварительного анализа септориозных пятнистостей использовали микроскопический анализ грибов, присутствующих на фрагментах ткани растений с симптомами септориоза (Pyzhikova et al., 1989). Это позволило предположить на-

Таблица 2. Список праймеров для ПЦР

Локус	Праймер	Последовательность 5'–3'	Авторы	Размер ампликона, п.н.
<i>Tox1</i>	<i>SnTox1cF</i> <i>SnTox1cR</i>	ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT TGTGGCAGCTAACTAGCACA	Gao et al. (2015)	500
<i>Tox3</i>	<i>SnTox3cF</i> <i>SnTox3cR</i>	CTCGAACCACGTGGACCCGGA CTCCCCTCGTGGGATTGCCCATATG		600
<i>ToxA</i>	<i>TA51F</i> <i>TA52R</i>	GCGTTCTATCCTCGTACTTC GCATTCTCCAATTTTCACG	Andrie et al. (2007)	573
ITS	<i>ITS5</i> <i>ITS4</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)	605
<i>tub2</i>	<i>T1</i> <i>T22</i>	AACATGCGTGAGATTGTAAGT TCTGGATGTTGTTGGGAATCC	O'Donnell, Cigelnik (1997)	1300

личие во всех образцах *Parastagonospora nodorum* и отсутствие других возбудителей септориозов. Для подтверждения этого предположения с 30 листьев каждого инфекционного образца отбирали по одной пикниде для дальнейшего посева и получения моноконидиальных изолятов на картофельно-глюкозном агаре (КГА). Всего было получено по 30 моноконидиальных изолятов из каждого образца. Описание культурально-морфологических признаков проводили на 20-й день. При описании регистрировали морфотип колоний, а также интенсивность споруляции (Pyzhikova et al., 1989).

Геномную ДНК выделяли стандартным СТАВ/хлороформ-методом из колоний моноконидиальных изолятов, полученных на КГА (Doyle, Doyle, 1990). Реакционная смесь для амплификации геномной ДНК финальным объемом 25 мкл содержала: 2.5 мкл 10× ПЦР – буфер (Биолабмикс), 0.5 мкл смеси dNTP (10 мМ), 0.5 мкл каждого праймера (25 мкМ), 0.15 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл, Диалат), 1 мкл геномной ДНК и 19.85 мкл dH₂O. Амплифицированные фрагменты разделяли методом электрофореза в 1.5%-м агарозном геле, в 1× TBE буфере (pH 8.2), гель окрашивали бромистым этидием. Для оценки размера фрагментов использовали ДНК-маркер Step100 plus (Биолабмикс).

Подтверждение результатов предварительной идентификации осуществляли при помощи секвенирования ДНК 8 изолятов (по одному из каждого инфекционного образца). Для секвенирования использовали два филогенетически информативных локуса ДНК – внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1–5.8S–ITS2, праймеры *ITS5/ITS4*) и фрагмент гена β-тубулина (*tub2*, праймеры *T1/T22*) (White et al., 1990, O'Donnell, Cigelnik, 1997) (табл. 2). Секвенирование по методу Сэнгера (1977) осуществляли на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems – Hitachi, Япония) в соответствии с протоколами произво-

дителя с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, США).

Филогенетические деревья были построены методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Надежность топологии построенных дендрограмм оценивали с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностями. В качестве референсов были использованы полученные из базы данных GenBank нуклеотидные последовательности разных видов *Parastagonospora*.

Скрининг изолятов *P. nodorum* на наличие генов-эффекторов: *ToxA*, *Tox1* и *Tox3* был проведен при помощи ПЦР. Для этого анализировали по 10 моноконидиальных изолятов из каждого образца.

ПЦР-скрининг на присутствие генов *SnTox1* и *SnTox3* проводили по методике Gao et al. (2015) с использованием пар праймеров *SnTox1cF/SnTox1cR* и *SnTox3cF/SnTox3cR*, соответственно. *ToxA* детектировали с помощью ПЦР с праймерами *TA51F/TA52R* (Andrie et al., 2007) (табл. 2).

Вирулентность изолятов *P. nodorum* определяли в лабораторных условиях, используя метод оценки на изолированных листьях пшеницы, согласно разработанным ранее методикам (Pyzhikova, Karaseva, 1985; Kolomiets et al., 2017). Испытания проводили в трехкратной повторности. Оценку типов реакции сортов на заражение проводили по четырехбалльной шкале (Pyzhikova, Karaseva, 1985): 0 – симптомов нет; 1 – мелкие темные точечные некрозы (1–2 мм); 2 – темно-бурые разрастающиеся, четко ограниченные пятна без хлороза; ткань листа остается зеленой; 3 – светло-бурые или бурые разрастающиеся пятна, окруженные хлорозом; 4 – светло-бурые, быстро разрастающиеся пятна без четкой ограниченности (наблюдается образование пикнид). Изоляты, поразившие растения на (0–2 балла) относили к авирулентным, на 3–4 балла – к вирулентным.

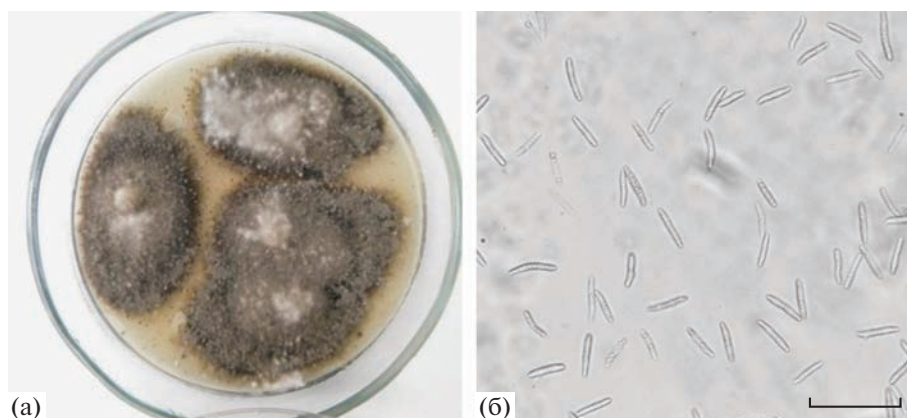


Рис. 1. Колонии *Parastagonospora nodorum* (а) и пикноспоры (б), полученные на картофельно-глюкозном агаре (20-е сут роста). Масштаб — 50 мкм.

В изучение вирулентных свойств были включены восемь моноконидиальных изолятов. Параллельно закладывали четыре эксперимента. Первый — сорта пшеницы заражали инокулюмом, включающим смесь пикноспор изолятов 110-22-Р.п., 117-22-Р.п., 118-22-Р.п., 123-22-Р.п., полученных с яровой пшеницы. Во втором эксперименте задействовали инокулюм, включающий споры изолята 112-22-Р.п. с озимой пшеницы; в третьем — споры изолятов 113-22-Р.п., 116-22-Р.п., полученные с овса. Четвертый эксперимент включал инфекционный материал изолята, выделенного с тритикале — 122-22-Р.п. (табл. 1). Проявление некротических пятен на листьях отмечали на 7 сутки после инокуляции. Основной учет проводили на 12 день. Инокулировали 19 сортов озимой мягкой и 12 — яровой пшеницы (табл. 3).

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 12. Различия между реакцией сортов пшеницы на заражение инфекционным материалом в четырех экспериментальных группах оценивали с помощью критерия Краскела—Уоллиса, результаты Медианного теста использовали для установления различий между вирулентными свойствами групп изолятов. Попарное (множественное) сравнение групп изолятов для установления различий между их способностью проявлять вирулентные свойства при заражении озимых и яровых сортов пшеницы, проводили с использованием критерия Ньюмена — Кеулса (Trukhacheva, 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Колонии всех изученных изолятов алтайской субпопуляции были идентичны по культурально-морфологическим свойствам и имели хорошо развитый бархатистый мицелий с большим количеством пикнид. Все колонии имели середину светло-бурого цвета, по периферии — темные (смешанный тип) (рис. 1). Колонии характеризо-

вались высокой споруляционной активностью (>10 млн спор/см²). Их размер на КГА достигал 80–90 мм в диам.

Анализ результатов секвенирования показал, что последовательности как ITS, так и *tub2* восьми моноконидиальных изолятов из разных образцов идентичны. Сравнение полученной последовательности ITS с референсными данными продемонстрировало ее идентичность с изолятами CBS 259.49 (KF251185, репрезентативный штамм) и CBS 146873 (SRR11074999, штамм, выделенный из неотипа *P. nodorum*).

Сравнение полученной в данной работе последовательности *tub2* с базой данных GenBank показало 100%-е сходство с последовательностью AY786335 изолята S-80-301 *P. nodorum*, выделенного из тритикале в 1980 году в США (Malkus et al., 2005). Сходство с другим наиболее близким изолятом Sn48-1 (AY786331) *P. nodorum* составляло уже 99.92%. Сходство со штаммом CBS 146873 *P. nodorum* составило 99.24%.

Меньшая представленность *tub2* *Parastagonospora* spp. в базе данных GenBank не позволяет провести полноценный филогенетический анализ по двум локусам с использованием одних тех же референсных штаммов. Однако в работе Zhao et al. (2021) было показано, что разрешающей способности ITS вполне достаточно для разделения членов *Parastagonospora* sp. на отдельные виды.

Таким образом, применение мультилокусного секвенирования таксономически информативных локусов ДНК — внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) и фрагмента гена β-тубулина, позволило подтвердить принадлежность изолятов виду *P. nodorum*. Морфология пикнид, конидий, характер роста колоний грибов на КГА, также соответствовали *P. nodorum* (Kolomiets et al., 2017). При использовании только микроскопии для идентификации *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* можно допустить ошибку, так как виды формиру-

Таблица 3. Анализ вирулентности алтайской субпопуляции *Parastagonospora nodorum*

Название сорта пшеницы	Инокулюм 1	Инокулюм 2	Инокулюм 3	Инокулюм 4
	Название изолятов/растение-хозяин			
	110-22-1, 117-22-1, 118-22-1, 123-22-1/яровая пшеница	112-22-1/озимая пшеница	113-22-1, 116-22-1/овес	122-22-1/тритикале
Озимые сорта пшеницы				
Безенчукская 380	2.8 ± 0.4*	3.6 ± 0.5	1.8 ± 1.1	2.2 ± 0.4
Бирюза	2.6 ± 0.5	3.8 ± 0.4	1.2 ± 0.4	2 ± 0
Звонница	2.8 ± 0.8	2.6 ± 0.5	1.2 ± 0.4	2 ± 0
Изюминка	3 ± 0	3 ± 0	1.8 ± 0.4	2.4 ± 0.5
Инна	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.5	1.6 ± 0.9	3 ± 0
Косовица	2.6 ± 0.5	3 ± 0	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.4
Лагуна	2.6 ± 0.5	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	2.4 ± 0.5
Латыневка	2 ± 0	2.6 ± 0.5	1.6 ± 0.9	2.4 ± 0.5
Липецкая звезда	2.2 ± 0.4	2 ± 0	1 ± 0	1.4 ± 0.9
Льговская 167	2.6 ± 0.5	2.8 ± 0.4	2.2 ± 0.4	3 ± 0
Мироновская 100	2.4 ± 0.5	3 ± 0	1 ± 0	2.4 ± 0.5
Мироновская 808	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4
Московская 39	3.6 ± 0.5	3 ± 0.7	2.4 ± 0.5	3.4 ± 0.5
Московская 40	2.2 ± 0.4	3 ± 0	1.6 ± 0.5	3 ± 0
Престиж	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	2.4 ± 0.5	2.8 ± 0.4
Синтетик	1.4 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1 ± 0	1.6 ± 0.5
Дон 93	1.4 ± 0.5	1 ± 0	1.4 ± 0.5	2 ± 0
Скипетр	1.4 ± 0.5	2.4 ± 0.5	1 ± 0	2.2 ± 0.4
Льговская 4	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	3 ± 0
Среднее значение	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.8	1.6 ± 0.6	2.2 ± 0.6
Яровые сорта пшеницы				
Белянка	3 ± 0	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.4	2 ± 0
Безенчукская 182	3 ± 0.0	2.6 ± 0.5	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5
Воронежская 7	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.4 ± 0.5	2.6 ± 0.5
Воронежская 14	2.6 ± 0.5	3.2 ± 0.4	2 ± 0	3 ± 0
Жница	2.6 ± 0.5	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	2.8 ± 0.4
Кинельская 6	1.2 ± 0.4	1.8 ± 0.8	2 ± 0	2 ± 0
Лебедушка	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.5
Мульти 6 R	2.6 ± 0.5	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.4	2.4 ± 0.5
Тулайкоская 5	3 ± 0	3 ± 0	2.2 ± 0.8	2.6 ± 0.5
Фаворит	3 ± 0	3.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	3 ± 0
Удача	3 ± 0	3.4 ± 0.9	2.4 ± 0.5	2.8 ± 0.4
Курская 2038	3 ± 0	3.2 ± 0.4	2.6 ± 0.5	3 ± 0
Среднее значение	2.8 ± 0.7	2.8 ± 0.5	2.2 ± 0.4	2.7 ± 0.5

Примечание. Изоляты, поражающие пшеницу на 3–4 балла, классифицировали как вирулентные, на 0–2 балла как авирулентные. *Среднее значение ± стандартное отклонение, n = 30.

ют на пораженной ткани листа похожие пикниды 40–250 мкм диам., их пикноспоры могут быть тоже одинакового размера. У *P. nodorum* споры цилиндрические, прямые или слегка изогнутые, с 1–3 перегородками, размером 12–35 × 2–4 мкм. Ко-

нидии *P. pseudonodorum* цилиндрические, прямые, с 3–4 перегородками, 26–42 × 2.8–3.5 мкм. Виды формируют похожие колонии при росте на питательных средах (Kolomiets et al., 2017). Поэтому, учитывая наш многолетний опыт работы с гри-

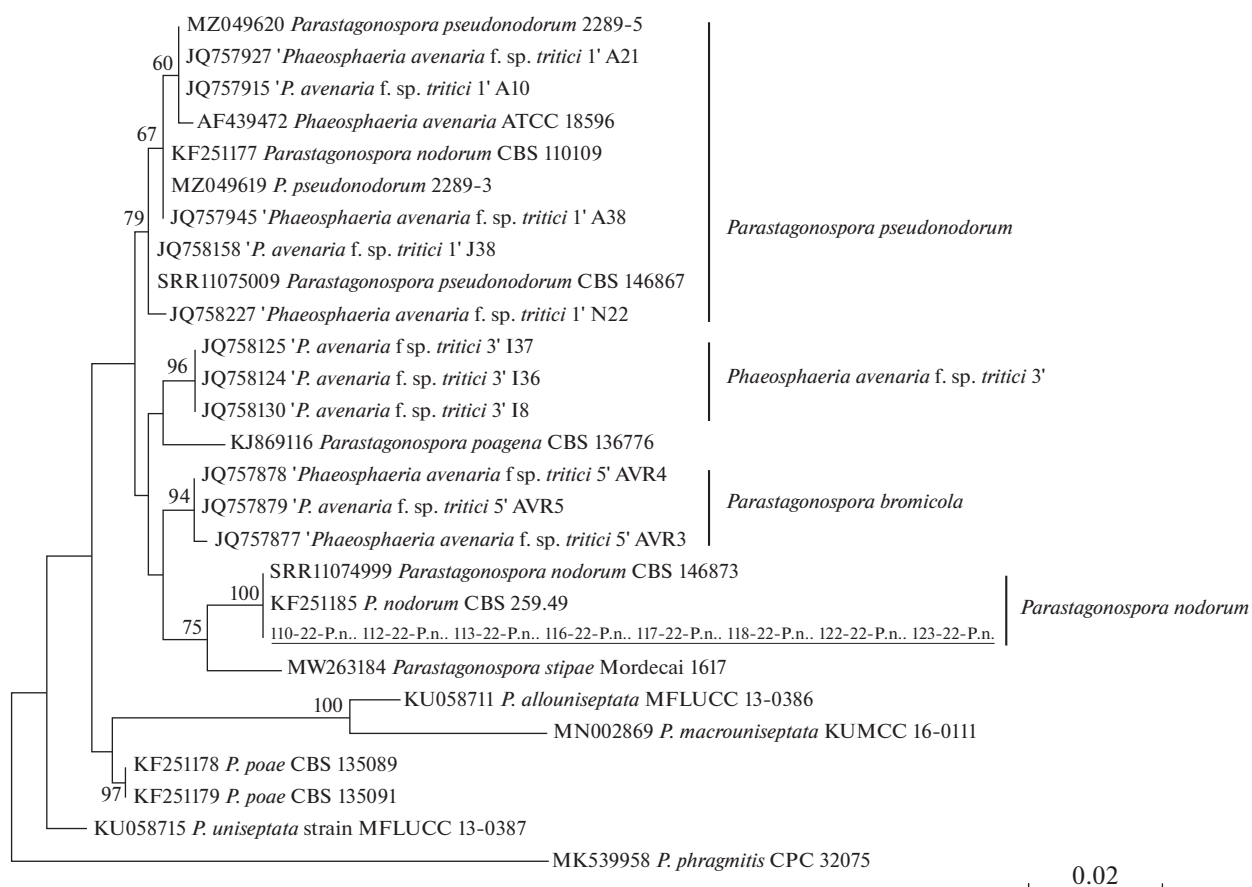


Рис. 2. Филогенетическое дерево для штаммов *Parastagonospora nodorum* и близких видов, реконструированное методом максимального правдоподобия (ML) по нуклеотидным последовательностям локуса ITS. Последовательности, полученные в данной работе, обозначены подчеркиванием. Для изученных изолятов приведены значения бутстреп-поддержки, превышающие 50%. В качестве внешней группы использован вид *Parastagonospora phragmitis*. Таксоны названы в соответствии с Zhao et al. (2021). Масштаб – 0.020 ожидаемых замен на сайт.

бом, считаем, что идентификацию *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* необходимо подтверждать методами молекулярной диагностики.

В результате поиска генов *ToxA*, *Tox1* и *Tox3* с помощью ПЦР в генотипе изолятов *P. nodorum* был выявлен только ген *Tox3* (рисунок 3). В исследовании включали ДНК каждого монокониди-



Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК изолятов *Parastagonospora nodorum* из Алтайского края с праймерами, специфичными к гену *Tox3* (размер ампликона 600 п.н.). М – маркер Step100 plus (Биолабмикс). Номера индексов, присвоенные образцам, соответствуют индексам, расшифрованным в табл. 1.

альных изолятов, полученных с восемью инфекционными образцами, представленными в табл. 2. Всего проанализировано 80 проб.

Гены *ToxA* и *Tox1* у изученных изолятов обнаружены не были. При использовании пар праймеров *SnTox1cF/SnTox1cR* и *TA51F/TA52R* получен четкий ПЦР-продукт соответствующего размера только у образцов, использованных в качестве положительного контроля.

Ранее нами было показано, что гены, кодирующие *SnToxA*, *SnTox1* и *SnTox3* присутствуют в популяциях *P. nodorum* Ленинградской, Тамбовской, Саратовской областей (Zeleneva et al., 2022; Kovalenko et al., 2023). Так как данный возбудитель способен переноситься на большие расстояния, можно ожидать появление генов *ToxA* и *Tox1* в генофонде популяции *P. nodorum* на территории Алтайского края. При этом отмечают, что помимо трех хорошо известных у этого гриба существуют и другие некротрофные эффекторы (Richards et al., 2022).

Для анализа вирулентных свойств 8 изолятов *P. nodorum* были сгруппированы в четыре типа

Таблица 4. Дисперсионный анализ показателей вирулентности изолятов *Parastagonospora nodorum*, полученных с озимой и яровой пшеницы, овса, тритикале

Сравниваемые группы	Сумма рангов	Среднее значение ранга
Критерий Краскела – Уоллиса: $H(df = 3, n = 76) = 19.81$, рассчитанный при заражении сортов озимой пшеницы		
Инокулюм 1	839.0	44.16
Инокулюм 2	964.0	50.74
Инокулюм 3	423.0*	22.26*
Инокулюм 4	700.0	36.84
Критерий Краскела – Уоллиса: $H(df = 3, n = 48) = 10.29$, рассчитанный при заражении сортов яровой пшеницы		
Инокулюм 1	333.5	27.79
Инокулюм 2	343.5	28.63
Инокулюм 3	179.0**	14.92**
Инокулюм 4	320.0	26.67

Примечание. *Отмечены разности, значимые на уровне $p < 0.0002$; **отмечены разности, значимые на уровне $p < 0.016$.

инокулюма, в зависимости от растения-хозяина, с которого они были выделены. Результаты представлены в таблице 3.

Первый инокулюм, включающий изоляты 110-22-1, 117-22-1, 118-22-1, 123-22-1, выделенные из сортов яровой пшеницы и второй – изолят 112-22-1, полученный с озимой пшеницы, заражали листья растений в среднем на 3 балла и были отнесены к вирулентным.

Изолят 122-22-1, выделенный из тритикале, провоцировал симптомы заражения сортов озимой пшеницы на 2 балла, демонстрируя авирулентность в отношении этой культуры. Сорта же яровой пшеницы поражаются на 3 балла, что характеризует данный изолят как вирулентный к данной культуре.

Изоляты 113-22-1 и 116-22-1, составляющие инокулюм 3 (табл. 3), были авирулентны к озимым и яровым сортам пшеницы.

На основании критерия Краскела–Уоллиса (Trukhacheva, 2017) можно предположить, что наибольшим отличием по вирулентным свойствам обладал инокулюм, составленный из изолятов 113-22-Р.п., 116-22-Р.п., полученных с овса (табл. 4). Такое предположение подтверждает анализ диаграмм размаха (медианный тест). На диаграммах видно, что наибольшие отличия от остальных наблюдаются при заражении сортов пшеницы инокулюмом в третьем эксперименте (рис. 4).

Для попарного сравнения результатов четырех экспериментов с применением разного инокулюма мы использовали критерий Ньюмена–Кеулса (табл. 5). Согласно этому критерию инокулюм, включающий конидии изолятов 113-22-Р.п.-1, 116-22-Р.п.-1, полученные с овса, по вирулентным свойствам имел статистически значимые различия с другими тремя группами, включающими изоляты с тритикале, яровой и озимой пшеницы.

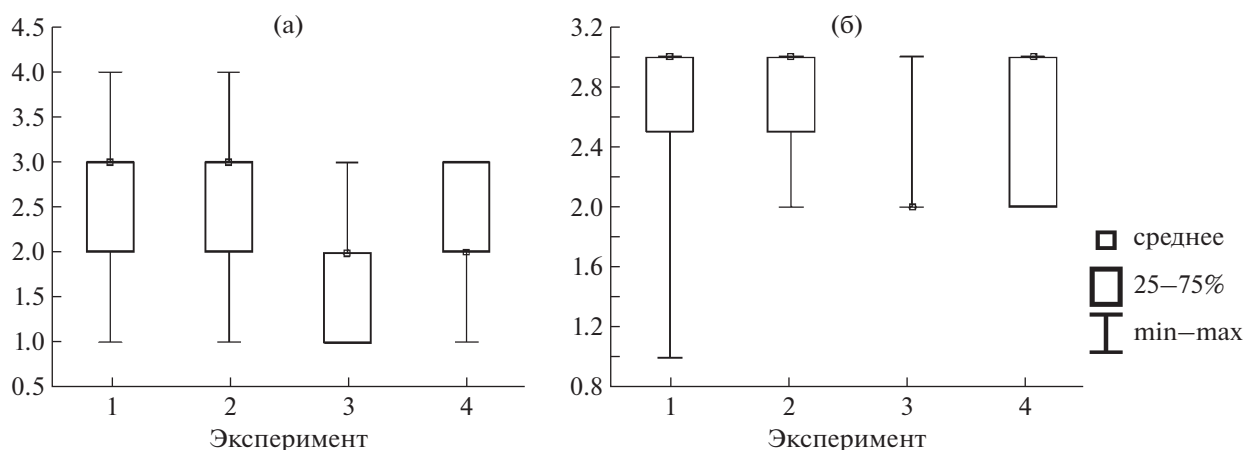


Рис. 4. Медианный тест для установления различий между вирулентными свойствами групп изолятов 1) 110-22-1, 117-22-1, 118-22-Р.п.-1, 123-22-Р.п.-1 (хозяин – яровая пшеница); 2) 112-22-Р.п.-1 (озимая пшеница); 3) 113-22-Р.п.-1, 116-22-Р.п.-1 (овес); 4) 122-22-Р.п.-1 (тритикале): а – озимая пшеница; б – яровая пшеница. Ось абсцисс показывает номер инокулюма, ось ординат – оценку типов реакции сортов на заражение по четырехбалльной шкале.

Таблица 5. Дисперсионный анализ показателей вирулентности изолятов *Parastagonospora nodorum*, полученных с озимой и яровой пшеницы, овса и тритикале

Результаты испытаний на 19 сортах озимой пшеницы*				
Группы	Инокулюм 1 М = 2.67	Инокулюм 2 М = 2.74	Инокулюм 3 М = 1.63	Инокулюм 4 М = 2.21
Инокулюм 1**	—	0.27	0.002	0.27
Инокулюм 2***	0.27	—	0.0002	0.07
Инокулюм 3****	0.002	0.0002	—	0.02
Инокулюм 4*****	0.27	0.07	0.02	—
Результаты испытаний на 12 сортах яровой пшеницы				
Группы	Инокулюм 1 М = 2.75	Инокулюм 2 М = 2.75	Инокулюм 3 М = 2.17	Инокулюм 4 М = 2.67
Инокулюм 1	—	0.91	0.02	1.00
Инокулюм 2	0.91	—	0.03	0.69
Инокулюм 3	0.02	0.03	—	0.04
Инокулюм 4	1.00	0.69	0.04	—

Примечание. *Критерий Ньюмена — Кеулса, отмечены различия, значимые на уровне $p < 0.05$; **110-22-1, 117-22-1, 118-22-1, 123-22-1 — хозяин — яровая пшеница; ***112-22-1 — озимая пшеница; ****113-22-1, 116-22-1 — овес; *****122-22-1 — тритикале; М — средний балл вирулентности в группе (0–2 — авирулентные; 3–4 — вирулентные).

Различия между другими группами выявлены не были.

Таким образом, при заражении сортов яровой и озимой пшеницы изолятами 113-22-1 и 116-22-1, полученными с овса, отмечено проявление авирулентных свойств. Поражение сортов пшеницы не превышало 2 балла. Изолят 122-22-1, выделенный с тритикале, проявил авирулентность при заражении сортов озимой и вирулентность, при заражении сортов яровой пшеницы. Четыре изолята, полученные с яровой пшеницы (110-22-1, 117-22-1, 118-22-1, 123-22-1) и один с озимой (112-22-1), охарактеризованы как вирулентные.

В литературе отмечается, что белки SnToxA, SnTox1 и SnTox3 считаются основными эффекторами патогена *P. nodorum* (Haugrud et al., 2022). При этом говорится, что в патосистеме *P. nodorum* — пшеница каждое взаимодействие SnTox—Snn способствует развитию заболевания. Устойчивость к SNB наследуется количественно, и она комплексная (John et al., 2022). Генотип выделенных нами в чистую культуру изолятов *P. nodorum* алтайской субпопуляции в 100% случаев характеризовался присутствием гена *Tox3* и отсутствием генов *ToxA* и *Tox1*. При проведении секвенирования по методу Сэнгера с использованием двух филогенетически информативных локусов ДНК — внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS1–5.8S–ITS2) и фрагмента гена β -тубулина (*tub2*) было показано, что с разных видов-хозяев был получен один гаплотип гриба. Однако, при изучении вирулентных свойств, было установлено, что инокулюм, включающий изоляты 113-22-1, 116-22-1, полученные с овса, обладает авирулентными свойствами. Он до-

стоверно отличается по способности заражать сорта яровой и озимой пшеницы по сравнению с инокулями, включающими изоляты с яровой, озимой пшеницы и тритикале, они были охарактеризованы как вирулентные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для правильной идентификации видовой принадлежности возбудителей септориоза грибами рода *Parastagonospora* целесообразно традиционные исследования морфологии гриба дополнять каким-либо молекулярным анализом. По всей видимости, для достоверного разделения видов *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* достаточно секвенирования одного участка рДНК (ITS1–5.8S–ITS2).

Анализ инфекционных образцов с типичными симптомами септориоза, полученных с яровой и озимой мягкой пшеницы, ярового овса и тритикале из четырех районов Алтайского края, показал, что возбудителем являлся вид *P. nodorum*. Полученные изоляты содержали в геноме ген *Tox3* и не имели генов *ToxA* и *Tox1*. Изоляты гриба, выделенные с яровой и озимой мягкой пшеницы и тритикале обладают вирулентными свойствами, изоляты с ярового овса — авирулентны при заражении сортов озимой и яровой пшеницы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-76-30005. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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
- Ciuffetti L.M., Tuori R.P., Gaventa J.M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant Cell*. 1997. V. 9 (2). P. 135–144.
https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.135
- Croll D., Crous P.W., Pereira D. et al. Genome-scale phylogenies reveal relationships among *Parastagonospora* species infecting domesticated and wild grasses. *Persoonia*. 2021. V. 46. P. 116–128.
https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.04
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990. V. 12. P. 13–15.
- Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B. et al. Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector *SnToxA* among isolates is correlated with levels of disease in wheat. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011. V. 24 (12). P. 1419–1426.
https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0094
- 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 (8). P. 953–956.
https://doi.org/10.1038/ng1839
- Gao Y., Faris J.D., Liu Z. et al. Identification and characterization of the *SnTox6-Snn6* interaction in the *Parastagonospora nodorum* – wheat pathosystem. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2015. V. 28 (5). P. 615–625.
https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0396-P
- Haugrud A.R.P., Zhang Z., Friesen T.L. et al. Genetics of resistance to *Septoria nodorum* blotch in wheat. *Theor. Appl. Genet*. 2022. V. 135. P. 3685–3707.
https://doi.org/10.1007/s00122-022-04036-9
- John E., Jacques S., Phan H.T.T. et al. Variability in an effector gene promoter of a necrotrophic fungal pathogen dictates epistasis and effector-triggered susceptibility in wheat. *PLoS Pathog*. 2022. V. 18. e1010149.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010149
- Kariyawasam G.K., Richards J.K., Wyatt N.A. et al. The *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector *SnTox5* targets the wheat gene *Snn5* and facilitates entry into the leaf mesophyll. *New Phytol*. 2022. V. 233 (1). P. 409–426.
https://doi.org/10.1111/nph.17602
- Kolomiets T.M., Pakholkova E.V., Dubovaya L.P. Selection of the initial material for the creation of wheat cultivars with long-term resistance to *Septoria blotch*. *Pechatnyy gorod*, Moscow, 2017. 56 p. (in Russ.).
- Kovalenko N.M., Zeleneva Yu.V., Sudnikova V.P. Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum* and *Parastagonospora pseudonodorum* populations in the Tambov region territory based on the presence of effector genes. *Russian Agricultural Sciences*. 2023. V. 2. P. 20–25. (in Russ.).
https://doi.org/10.31857/S2500262723020114
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol*. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
- Liu Z., Faris J.D., Oliver R.P. et al. *SnTox3* acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the *Snn3* gene. *PLOS Pathog*. 2009. V. 5 (9). e1000581.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000581
- Liu Z., Zhang Z., Faris J.D. et al. The cysteine rich necrotrophic effector *SnTox1* produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1*. *PLOS Pathog*. 2012. V. 8 (1). e1002467.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002467
- Malkus A., Reszka E., Chang C.J. et al. Sequence diversity of beta-tubulin (*tubA*) gene in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005. V. 249 (1). P. 49–56.
https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.049
- Manylova O.V., Chernyshkov V.N., Kartashov M.I. Efficiency of biofungicides against root rot and *Septoria blotch* of winter wheat in forest-steppe conditions of the Altai Ob region. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2018. V. 5 (163). P. 54–58 (in Russ.).
- O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol*. 1997. V. 7 (1). P. 103–116.
https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376
- Phan H.T.T., Rybak K., Bertazzoni S. et al. Novel sources of resistance to *Septoria nodorum* blotch in the Vavilov wheat collection identified by genome-wide association studies. *Theor. Appl. Genet*. 2018. V. 131. P. 1223–1238.
https://doi.org/10.1007/s00122-018-3073-y
- Pyzhikova G.V., Karaseva E.V. Methods of studying *Septoria* pathogens on isolated wheat leaves. *Selskokhozyaystvennaya biologiya*. 1985. V. 12. P. 112–114 (in Russ.).
- Pyzhikova G.V., Sanina A.A., Suprun L.M. et al. Methods of assessing the resistance of breeding material and wheat cultivars to *Septoria blotch*: guidelines. Moscow. 1989. 43 p. (in Russ.).
- Richards J.K., Kariyawasam G.K., Seneviratne S. et al. A triple threat: the *Parastagonospora nodorum* *SnTox267* effector exploits three distinct host genetic factors to cause disease in wheat. *New Phytol*. 2022. V. 233 (1). P. 427–442.
https://doi.org/10.1111/nph.17601
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74 (12). P. 5463–5467.
https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463
- Sanin S.S., Ibragimov T.Z., Strizhekozina Yu.A. Method for calculating wheat yield losses from diseases. *Zaschita i karantin rasteniy*. 2018. V. 1. P. 11–15 (in Russ.).
- Shi G., Zhang Z., Friesen T.L. et al. The hijacking of a receptor kinase-driven pathway by a wheat fungal pathogen leads to disease. *Sci Adv*. 2016. V. 2 (10). e1600822.
https://doi.org/10.1126/sciadv.1600822
- Shipton W., Boyd W., Rosielle A. et al. The common *Septoria* diseases of wheat. *Bot. Rev*. 1971. V. 37. P. 231–262.
- Solomon P.S., Lowe R.G., Tan K.C. et al. *Stagonospora nodorum*: cause of *Stagonospora nodorum* blotch of wheat. *Mol. Plant Pathol*. 2006. V. 7 (3). P. 147–156.
https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00326.x
- Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Piskarev V.V. *Septoria blotch* epidemic process on spring wheat varieties. Vavilov J.

- Genetics and Breeding 2020. V. 24 (2). P. 139–148.
https://doi.org/10.18699/VJ20.609
- Trukhacheva N.V. Medical statistics: Textbook. Feniks, Rostov-on-Don, 2017 (in Russ.).
- White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis (ed.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 1990. P. 315–322.
- Zeleneva Yu.V., Ablova I.B., Sudnikova V.P. et al. Species composition of wheat *Septoria* pathogens in the European part of Russia and identifying *SnToxA*, *SnTox1* and *SnTox3* effector genes. Mikologiya i fitopatologiya. 2022. V. 56 (6). P. 441–447. https://doi.org/ (in Russ.).
https://doi.org/10.31857/S0026364822060113
- Zhang Z., Running K.L.D., Seneviratne S. et al. A protein kinase – major sperm protein gene hijacked by a necrotrophic fungal pathogen triggers disease susceptibility in wheat. Plant J. 2021. V. 106 (3). P. 720–732.
https://doi.org/10.1111/tpj.15194
- Zhao P., Crous P.W., Hou L.W. et al. Fungi of quarantine concern for China I: *Dothideomycetes*. Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 2021. V. 47 (1). P. 45–105.
https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.47.02
- Зеленева Ю.В., Аблова И.Б., Судникова В.П. и др. (Zeleneva et al.) Видовой состав возбудителей септориозов пшеницы в европейской части России и идентификация генов-эффекторов *SnToxA*, *SnTox1* и *SnTox3* // Микология и фитопатология. 2022. Т. 56. № 6. С. 441–447.
- Коваленко Н.М., Зеленева Ю.В., Судникова В.П. (Kovalenko et al.) Характеристика популяций *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum* и *Parastagonospora pseudonodorum* на территории Тамбовской области по наличию генов-эффекторов // Российская сельскохозяйственная наука. 2023. Т. 2. С. 20–25.
- Коломиец Т.М., Пахолкова Е.В., Дубовая Л.П. (Kolomiets et al.) Отбор исходного материала для создания сортов пшеницы с длительной устойчивостью к септориозу. М.: Печатный город. 2017. 56 с.
- Манылова О.В., Чернышков В.Н., Карташов М.И. (Manylova et al.) Эффективность биофунгицидов против корневых гнилей и септориоза озимой пшеницы в условиях лесостепи Алтайского Приобья. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2018. Т. 5. № 163. С. 54–58.
- Пыжикова Г.В., Карасева Е.В. (Pyzhikova, Karaseva) Методика изучения возбудителей септориоза на изолированных листьях пшеницы // Сельскохозяйственная биология. 1985. Т. 12. С. 112–114.
- Пыжикова Г.В., Санина А.А., Супрун Л.М. и др. (Pyzhikova et al.) Методы оценки устойчивости селекционного материала и сортов пшеницы к септориозу: метод. указ. М.: ВНИИФ, 1989. 43 с.
- Санин С.С., Ибрагимов Т.З., Стрижекозин Ю.А. (Sanin et al.) Метод расчета потерь урожая пшеницы от болезней. Защита и карантин растений. 2018. № 1. С. 11–15.
- Трухачева Н.В. (Trukhacheva) Медицинская статистика: учеб. пособие. Ростов-на-Дону: Феникс, 2017. 324 с.

Molecular Identification, Effector genes and Virulence of Isolates of *Parastagonospora nodorum* from Altai Krai (Russia)

Yu. V. Zeleneva^{a, #}, Ph. B. Gannibal^{a, ##}, I. A. Kazartsev^{a, ###}, and V. P. Sudnikova^{b, ####}

^aAll-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

^bMiddle-Russian Affiliate of the Federal Research Center named after I.V. Michurin, Tambov, Russia

[#]e-mail: zelenewa@mail.ru

^{##}e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru

^{###}e-mail: kazartsev@inbox.ru

^{####}e-mail: sudnikova47@mail.ru

Septoria blotches represent some of the most harmful wheat diseases that encompass all grain-producing countries worldwide. They are caused mainly by fungi of the genera *Parastagonospora* and *Zymoseptoria*. The aims of the research were to analyze the nucleotide sequences of two phylogenetically informative DNA loci, ITS and *tub2*, of *Parastagonospora nodorum* isolates from the Altai Krai, to detect the presence of *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* effector genes and to study the virulence of the isolates. Microscopic analysis of fragments of affected plant tissue was used for primary identification of the Septoria blotch. The causative agent from the studied plant samples was identified as *P. nodorum*. Fungal colonies cultivated on potato-glucose agar displayed a well-developed light brown velvety mycelium with dark periphery (mixed type) and numerous pycnidia exhibiting high sporulation capacity. Microbiological diagnostics were complemented by molecular genetic studies. Sequencing of ITS and *tub2* loci isolates revealed complete genetic identity of all eight studied monoconidial isolates obtained from different samples. PCR-based detection of tree *Tox*-genes demonstrated that the only *Tox3* was present in the genotypes of 80 tested *P. nodorum* monoconidial isolates. The *ToxA* and *Tox1* genes were not found in the studied isolates. The virulence of *P. nodorum* isolates was evaluated in laboratory conditions using an isolated wheat leaves assay. Mixture of four isolates from spring wheat and one isolate from winter wheat, were characterized as virulent. When spring and winter wheat cultivars were infected with two isolates obtained from oats, pathogenic but avirulent properties were detected. The isolate from triticale was avirulent to winter wheat cultivars and virulent to spring wheat cultivars.

Keywords: effector genes, host-selective toxin, molecular diagnostics, *Parastagonospora nodorum*, phylogenetic tree, septorioses, virulence