

УДК 575.174.015.3 : 632.4.01/.08

РАСОВЫЙ СОСТАВ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА *ToxA* В ГЕОГРАФИЧЕСКИ ОТДАЛЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS*© 2024 г. Н. В. Мироненко<sup>1,\*</sup>, А. С. Орина<sup>1,\*\*</sup>, Н. М. Коваленко<sup>1,\*\*\*</sup>, Н. Г. Зубко<sup>1,\*\*\*\*</sup><sup>1</sup> Всероссийский НИИ защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: nina2601mir@mail.ru

\*\*e-mail: orina-alex@yandex.ru

\*\*\*e-mail: nadyakov@mail.ru

\*\*\*\*e-mail: sacura0@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.07.2023 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Возбудитель желтой пятнистости пшеницы – аскомицет *Pyrenophora tritici-repentis* – продуцирует специфические некротрофные эффекторы Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC, индуцирующие некроз и хлороз на листьях восприимчивых сортов. По способности штаммов *P. tritici-repentis* продуцировать отдельные некротрофные эффекторы или их комбинации различают восемь рас патогена. Мониторинг расового состава популяций *P. tritici-repentis* необходим для оценки эволюционного потенциала возбудителя и разработки методологии создания сортов зерновых культур с длительной устойчивостью. Нами проанализированы 179 моноконидиальных штаммов *P. tritici-repentis* из популяций Казахстана и России в 2020–2022 гг. Выявлено повсеместное распространение рас 2 и 4, штаммы которых присутствовали в каждой изученной популяции *P. tritici-repentis* с частотой 2–36 и 7–82 % соответственно. Отмечено доминирование представителей авирулентной расы 4, доля которой составила 27% среди всех проанализированных штаммов *P. tritici-repentis*. Молекулярная идентификация генов *ToxA* и *ToxB*, а также *toxh* – гомолога гена *ToxB* – у 118 штаммов *P. tritici-repentis* из шести популяций выявила присутствие гена *ToxA* у 69% изученных штаммов гриба. Ген *ToxB* не был обнаружен ни у одного штамма *P. tritici-repentis*, тогда как ген *toxh* встречался спорадически и был выявлен в геноме 18 штаммов *P. tritici-repentis* (9%), большинство из которых были отнесены к авирулентной расе 4. При идентификации гена *ToxA* были выявлены десять штаммов *P. tritici-repentis*, у которых амплифицировался продукт размером ~800 п.н., значительно превышающий ожидаемый, что объясняется наличием инсерции в амплифицируемом участке гена *ToxA*. Такие гены были названы *ToxAL*. Все штаммы *P. tritici-repentis* с вариантом *ToxAL* были отнесены к расам 4 и 5, не образующим некротрофный эффектор Ptr ToxA. Структура гена *ToxAL* и его белкового продукта является предметом дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** желтая пятнистость, инсерция, раса 3, раса 4, раса 5, *ToxA*, *ToxB*, *toxh*.

**DOI:** 10.31857/S0026364824030064, **EDN:** vitnfb

## ВВЕДЕНИЕ

Желтая пятнистость листьев – экономически значимое заболевание мягкой и твердой пшеницы (Wegulo et al., 2009), возбудителем которого является аскомицет *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. Вирулентность штаммов этого гриба определяется их способностью синтезировать хозяинспецифические фитотоксины или, согласно новым представлениям, некротрофные эффекторы (NEs), которые при взаимодействии с соответствующими генами восприимчивости растения-хозяина индуцируют симптомы некроза или хлороза. К настоящему времени в геноме *P. tritici-repentis* идентифицированы три некротрофных эффектора – индуцирующие

некроз (Ptr ToxA) и хлороз (Ptr ToxB и Ptr ToxC) на листьях восприимчивых сортов, которые взаимодействуют с комплементарными им генами восприимчивости пшеницы *Tsn1*, *Tsc2* и *Tsc1* соответственно (Ciuffetti et al., 1997). По способности продуцировать один или несколько NEs и вызывать симптомы желтой пятнистости при инокуляции растений пшеницы трех дифференциаторов (сорт Glenlea, линии 6B365, 6B662) штаммы *P. tritici-repentis* классифицируют на восемь рас: три расы продуцируют по одному NE, три расы – по два, одна раса – все три NEs, и одна раса (раса 4) не продуцирует ни одного из известных NEs и считается авирулентной (Strelkov et al., 2003).

Для двух NE белковой природы Ptr ToxA и Ptr ToxB известны их генетические детерминанты – однокопийный ген *ToxA* и мульткопийный ген *ToxB*, – для которых разработаны системы молекулярной диагностики (Martinez et al., 2004; Andrie et al., 2007). Генетическая детерминация фитотоксина Ptr ToxC, который имеет небелковую природу, остается мало изученной (Shi et al., 2022). У авирулентных штаммов *P. tritici-repentis* расы 4, не продуцирующих известные NEs, был выявлен ген *toxh*, гомологичный гену *ToxB* (Martinez et al., 2004).

Мониторинг расового состава популяций *P. tritici-repentis* позволяет получать фундаментальные знания о микроэволюции популяций и молекулярно-генетических аспектах взаимоотношений в системе “растение – хозяин – патоген” (Afanasenko, Novozhilov, 2009).

Цель настоящего исследования – охарактеризовать популяции *P. tritici-repentis*, существующие на территориях Казахстана и РФ в период 2020–2022 гг., по расовому составу и генотипировать штаммы по генам-эффекторам *ToxA*, *ToxB* и *toxh*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стали восемь образцов популяций *P. tritici-repentis*, выделенных из листьев озимой пшеницы с симптомами желтой пятнистости: четыре образца из Казахстана – Алматинская (2020 и 2022 гг.), Костанайская (2021 г.), Северо-Казахстанская (2020 г.) области – и четыре образца из России – Краснодарский край, Ленинградская и Тамбовская области, Республика Татарстан (все 2022 г.). Всего было выделено 179 изолятов и из каждого изолята получен один моноконидиальный штамм *P. tritici-repentis*.

Культуры грибов выращивали на среде V4, приготовленной на основе смеси соков четырех овощей (Mikhailova et al., 2002) при 22 °C в течение 7–10 сут. Расовый состав популяций *P. tritici-repentis* определяли при инокуляции пшеницы сорта Glenlea, линий 6B365 и 6B662, дифференцирующих штаммы гриба по образованию некротрофных эффекторов Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC (Strelkov, Lamari, 2003). Отрезки листьев от 5–10 растений каждого дифференциатора в возрасте семи дней помещали

в кювету на поверхность фильтровальной бумаги, увлажненной 0.004%-м р-ром 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 °C и освещенности 1500 Лм, фотопериод составлял 12 ч. Оценку вирулентности проводили на 5–6-е сутки по наличию/отсутствию некрозов и хлорозов на инокулированных листьях (Mikhailova et al., 2002, 2014), расовую принадлежность определяли согласно разработанной Lamari, Strelkov (2010) методике (табл. 1).

Выделение геномной ДНК из мицелия грибов проводили методом СТАВ (Murray, Thompson, 1980). Амплификацию фрагментов генов *ToxA*, *ToxB* и *toxh* для ДНК каждого штамма *P. tritici-repentis*, включенного в исследование, проводили с помощью ПЦР с праймерами TA51/TA52, TB71/TB60 и TB71/TB58 по протоколам авторов (Andrie et al., 2007). Ожидаемые размеры продуктов амплификации составляли 573, 232 и 232 п.н. соответственно.

Известно, что праймеры TB71/TB60 дают продукты амплификации одинакового размера для обоих генов – *ToxB* и *toxh* – и для их верификации необходимо ставить дополнительную ПЦР с праймерами TB71/TB58, специфичными для гена *toxh*.

Статистический анализ данных проводили в программе Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Идентификация расового состава популяций *Pyrenophora tritici-repentis*

Анализ расового состава популяций *P. tritici-repentis* разного происхождения с помощью инокуляции отрезков листьев пшеницы сортов-дифференциаторов выявил среди изученных штаммов гриба представителей всех рас (табл. 2). Наиболее распространенными оказались расы 2 и 4, которые были выявлены в каждой изученной популяции *P. tritici-repentis* с частотой 2–36 и 7–82% соответственно. Каждая из рас 1, 3 и 8 была обнаружена в пяти популяциях с частотами 5–50%. Представители рас 5, 6 и 7 оказались

**Таблица 1.** Характеристика рас *Pyrenophora tritici-repentis* по способности заражать растения пшеницы сортов/линий-дифференциаторов по Lamari, Strelkov (2010)

| Сорт/линия пшеницы | Некротрофный эффектор | Раса <i>P. tritici-repentis</i> |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------|-----------------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
|                    |                       | 1                               | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Glenlea            | Ptr ToxA              | +                               | + | – | – | – | – | + | + |
| 6B662              | Ptr ToxB              | –                               | – | – | – | + | + | + | + |
| 6B365              | Ptr ToxC              | +                               | – | + | – | – | + | – | + |

наименее встречающимися, и были выявлены в трех популяциях каждая с частотой 6–36%.

Среди изученных популяций *P. tritici-repentis* казахстанского происхождения наиболее разнообразной оказалась Каз20-ЮВ, приуроченная к листьям пшеницы из Алматинской обл., в которой присутствовали восемь рас. Также в популяции Каз21-С из Костанайской обл. обнаружены представители шести рас. Две другие изученные популяции *P. tritici-repentis* из Казахстана были представлены пятью и тремя расами соответственно.

В России наиболее разнообразной по расовому составу оказалась популяция *P. tritici-repentis* Лен-22 из Ленинградской обл., в которой были обнаружены представители шести рас, в т.ч. редких рас 5, 6 и 7, не выявленных в других российских популяциях. В популяциях из Краснодарского края и Тамбовской обл. были выявлены пять рас, а их состав оказался идентичным. Популяция Тат-22 из Татарстана была представлена только штаммами двух рас *P. tritici-repentis*.

Среди всех изученных штаммов *P. tritici-repentis* чаще встречались представители расы 4 – их доля составила 27%. При этом штаммы этой расы существенно преобладали в двух популяциях из Северного Казахстана (43 и 57%) и популяции из Татарстана (82%). Доли штаммов, для которых в результате определения расового состава выявлено продуцирование некротрофных эффекторов Ptr ToxA (расы 1, 2, 7 и 8) и Ptr ToxC (расы 1, 3, 6, и 8), оказались сходными и составили 42 и 46% соответственно. В то же время доля штаммов *P. tritici-repentis*, образующих Ptr ToxB (расы 5, 6, 7 и 8), была существенно ниже – 25%.

#### Генотипирование штаммов *P. tritici-repentis* по наличию генов-эффекторов

Среди проанализированных 118 штаммов *P. tritici-repentis* из шести популяций присутствие в геноме гена *ToxA* было выявлено у 81 штамма (69%). В казахстанских популяциях из Алматинской обл. (Каз20-ЮВ и Каз22-ЮВ), а также в российской популяции из Краснодарского края (Кр-22) все проанализированные штаммы имели *ToxA*, тогда как в трех других популяциях Каз22-С, Каз20-С и Тат-22 доля штаммов *P. tritici-repentis* с *ToxA* составляла 27.3% (табл. 3).

Для 77 штаммов *P. tritici-repentis* (65% от числа изученных штаммов) наличие или отсутствие *ToxA* в геноме совпало со способностью заражать отрезки листьев пшеницы сорта Glenlea, который дифференцирует некротрофный эффектор Ptr Tox A. Напротив, 33 штамма *P. tritici-repentis* (28%),

у которых в геноме был выявлен ген *ToxA*, не вызывали некроз на листьях сорта Glenlea, что позволяет предположить, что они по каким-либо причинам не продуцируют Ptr Tox A. Восемь штаммов *P. tritici-repentis* (7%) при инокуляции вызывали симптомы некроза на листьях пшеницы сорта Glenlea, однако в их геноме не был обнаружен *Tox A*.

При проведении ПЦР с праймерами TA51/TA52, специфичными для гена *ToxA*, были выявлены еще десять штаммов *P. tritici-repentis* (8.5% от общего числа анализированных штаммов), с ДНК которых амплифицировался продукт размером ~800 п.н., значительно превышающий ожидаемый размер 573 п.н. (рис. 1). Увеличение размера продукта амплификации объясняется наличием инсерции в амплифицируемом фрагменте гена *Tox A*. Ген, несущий такую инсерцию, назвали *ToxAL* (*ToxA large*). Штаммы *P. tritici-repentis* с вариантом *ToxAL* были выявлены в популяциях из Костанайской и Северо-Казахстанской областей (Казахстан), а также в популяции из Татарстана (Россия). Все штаммы *P. tritici-repentis* с вариантом *ToxAL* были отнесены к расам 4 и 5, не продуцирующим некротрофный эффектор Ptr Tox A.

Среди изученных 118 штаммов *P. tritici-repentis* ни у одного не был выявлен ген *ToxB* (табл. 3). Для 86 штаммов *P. tritici-repentis* (73% от числа проанализированных штаммов) отсутствие *ToxB* в геноме совпало с неспособностью заражать отрезки листьев пшеницы линии 6V662, которая дифференцирует некротрофный эффектор Ptr Tox B. ген *ToxB* не был обнаружен в геноме оставшихся 32 штаммов (27%), хотя они вызывали хлороз на отрезках листьев линии 6V662.

Штаммы *P. tritici-repentis*, генотипированные по *ToxA* и *ToxB*, у которых фитопатологическая оценка вирулентности не совпала с молекулярной идентификацией генов эффекторов, отнесены к “нетипичным”.

Ген *toxb* был выявлен в геноме 18 штаммов *P. tritici-repentis* (15% от числа проанализированных штаммов), большинство из которых (12 шт.) были отнесены к авирулентной расе 4, тогда как четыре и два штамма были идентифицированы как представители рас 5 и 2 соответственно. В российской популяции из Татарстана 91% штаммов *P. tritici-repentis* имели ген *toxb*, одновременно в геноме четырех штаммов из этой популяции был также обнаружен мутантный ген *ToxAL*.

Таблица 2. Расовый состав популяций *Puccinia triticis-repentis* из Казахстана и России в 2020–2022 гг.

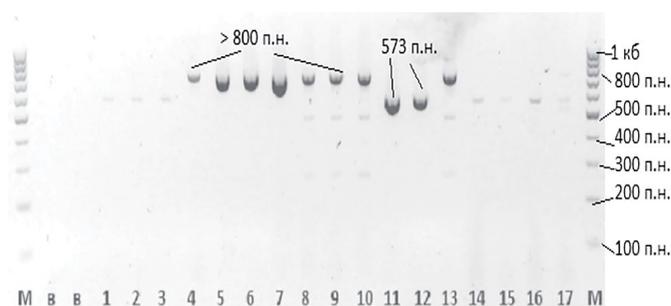
| Популяция     | Происхождение, год выделения                  | Всего штаммов | Количество штаммов <i>P. tritici-repentis</i> определенной расы в популяции, шт. (% от общего числа штаммов в популяции) |          |          |          |          |         |         |         |
|---------------|---|---------------|--|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
|               |   |               | 1  | 2        | 3        | 4        | 5        | 6       | 7       | 8       |
| Каз20-ЮВ*     | Казахстан, Алмагинская обл., 2020             | 31            | 2 (6%)   | 1 (4%)   | 7 (23%)  | 4 (13%)  | 2 (6%)   | 3 (10%) | 6 (19%) | 6 (19%) |
| Каз22-ЮВ      | Казахстан, Алмагинская обл., 2022             | 20            | 10 (50%)   | 4 (20%)  | 2 (10%)  | 3 (15%)  | 0        | 0       | 0       | 1 (5%)  |
| Каз22-С**     | Казахстан, Костанайская обл., 2021            | 39            | 3 (8%)   | 2 (5%)   | 5 (13%)  | 17 (43%) | 11 (28%) | 1 (3%)  | 0       | 0       |
| Каз20-С       | Казахстан, Северо-Казахстанская область, 2020 | 7             | 0  | 1 (14%)  | 0        | 4 (57%)  | 0        | 0       | 2 (29%) | 0       |
| Кр-22         | Россия, Краснодарский край, 2022              | 15            | 7 (46%)  | 5 (33%)  | 1 (7%)   | 1 (7%)   | 0        | 0       | 0       | 1 (7%)  |
| Лен-22        | Россия, Ленинградская обл., 2022              | 14            | 0  | 5 (36%)  | 0        | 1 (7%)   | 1 (7%)   | 1 (7%)  | 5 (36%) | 1 (7%)  |
| Тамб-22       | Россия, Тамбовская обл., 2022                 | 42            | 6 (14%)  | 1 (2%)   | 21 (50%) | 10 (24%) | 0        | 0       | 0       | 4 (10%) |
| Тат-22        | Россия, Татарстан, 2022                       | 11            | 0  | 2 (18%)  | 0        | 9 (82%)  | 0        | 0       | 0       | 0       |
| Всего штаммов |   | 179           | 28 (16%)   | 21 (12%) | 36 (20%) | 49 (27%) | 14 (8%)  | 5 (3%)  | 13 (7%) | 13 (7%) |

Примечание. \*Юго-восточный Казахстан; \*\*Северный Казахстан.

**Таблица 3.** Характеристика штаммов *P. tritici-repentis* по наличию генов-эффекторов

| Популяция     | Число проанализированных штаммов, шт. | Число штаммов, у которых обнаружен ген-эффектор, шт. |               |             |             |
|---------------|---------------------------------------|--|---------------|-------------|-------------|
|               |                                       | <i>ToxA</i>  | <i>ToxAL*</i> | <i>ToxB</i> | <i>toxh</i> |
| Каз20-ЮВ      | 31                                    | 31   | 0             | 0           | 1           |
| Каз22-ЮВ      | 20                                    | 20   | 0             | 0           | 0           |
| Каз22-С       | 37                                    | 15   | 5             | 0           | 7           |
| Каз20-С       | 7                                     | 2  | 1             | 0           | 0           |
| Кр-22         | 12                                    | 12   | 0             | 0           | 0           |
| Тат-22        | 11                                    | 1  | 4             | 0           | 10          |
| Всего штаммов | 118                                   | 81   | 10            | 0           | 18          |

Примечание. \**ToxAL* – вариант гена *ToxA*, несущий инсерцию (*ToxA large*).



**Рис. 1.** Идентификация гена *ToxA* в изолятах *P. tritici-repentis*. Обозначения: в – вода, 1–3 и 14–17 – штаммы *P. tritici-repentis* без *ToxA*; 4 – Каз-22С-А53; 5 – Каз-22С-А64; 6–9 – Тат-22-1–4; 10 – Каз-22С-Ф22; 11–13 – Каз-20С-23–25; 14–17 – Тат-22-1–4. М – маркер молекулярных весов 100 bp (GeneRuler DNA Ladder, Fermentas).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В 2020–2022 гг. была создана коллекция из 179 моноконидиальных штаммов *P. tritici-repentis* из географически отдаленных популяций Казахстана и России. Для всех штаммов была определена вирулентность к сорту Glenlea и линиям 6В365 и 6В662, дифференцирующим расы *P. tritici-repentis*. Наиболее распространенной оказалась авирулентная раса 4, доля которой составила 27% от всех анализированных штаммов. Также с высокой частотой встречались расы 1, 2 и 3–16, 12 и 20% соответственно. Тогда как расы 5, 6, 7 и 8 оказались минорными: их доля варьировала в диапазоне 3–8%.

За последние годы накопились данные об изменениях расового состава возбудителя желтой пятнистости (Mironenko et al., 2015; Moreno et al., 2015; See et al., 2018; Guo et al., 2020), которые обусловлены изменениями климатических условий, генотипами выращиваемых сортов пшеницы и другими причинами. Динамику встречаемости в российских популяциях *P. tritici-repentis* штаммов расы 4 можно проследить в ранее проведенных нами

исследованиях. В 2005 г. раса 4 не была найдена в популяциях из Краснодарского края (Mikhaylova et al., 2007), а к 2008 году ее встречаемость возросла до 13% (Mikhaylova et al., 2010). В северо-кавказской популяции в 2005 году было 3% штаммов, отнесенных к расе 4, причем все они были выделены из твердой пшеницы, выращенной в Дербенте (Mikhaylova et al., 2007). В 2011 г. авирулентная раса 4 встречалась в северо-западной и северокавказской популяциях с частотой 10–13%, а к 2013 году доля штаммов расы 4 в популяции из Северного Кавказа составляла 13%, а в северо-западной популяции – 18% (Mikhaylova et al., 2014, 2015). В данной работе нами выявлено увеличение частоты штаммов авирулентной расы 4 в современных популяциях *P. tritici-repentis* из Казахстана и России в среднем до 27%. Наиболее высокая встречаемость расы 4 отмечена в Северном Казахстане и Татарстане (43–82%), что, вероятно, объясняется сходными климатическими условиями.

Другими исследователями ранее отмечалась низкая частота встречаемости штаммов расы 4 на образцах мягкой пшеницы (Ali, Francl, 2003; Lamari et al., 1995; Kamel et al., 2019; Lamari, Bernier, 1989; Sarova et al., 2005). Показано, что твердая и мягкая пшеница значительно различаются по реакции на различные расы *P. tritici-repentis*, а штаммы расы 4 могут быть вирулентны по отношению к твердой пшенице (Gou et al., 2020). Способность штаммов расы 4 заражать образцы твердой пшеницы может быть обусловлена наличием специфичных факторов вирулентности патогена, что необходимо учитывать при селекции новых сортов этой культуры.

За период 2012–2014 гг. в популяциях *P. tritici-repentis*, выделенных из листьев пшеницы в Северной Дакоте, доля штаммов расы 4 составила 13–32% (Abdullah et al., 2017), тогда как из других дикорастущих видов злаков (алтайская дикорастущая рожь, ежовник обыкновенный, пырей, кострец гладкий

и вейник песчаный) штаммы *P. tritici-repentis* расы 4 выделялись с частотой 40–98% (Abdullah et al., 2017; Ali, Francl, 2003). Очевидно, что резервуаром сохранения изолятов расы 4 являются различные виды альтернативных растений-хозяев.

Хотя штаммы *P. tritici-repentis* расы 4 не продуцируют ни один из известных некротрофных эффекторов, они могут обладать геном *toxb*, который на 86% гомологичен гену *ToxB* и может экспрессироваться на низком уровне, что объясняет низкую вирулентность расы 4 и некоторых изолятов расы 5 (Amaike et al., 2008; Martinez et al., 2004). В данном исследовании ген *toxb* был обнаружен у 12 штаммов из 38, отнесенных к расе 4 по вызываемым ими симптомам на сортах-дифференциаторах и включенных в молекулярно-генетическое исследование, что составляет 32%. Остальные штаммы расы 4 имели гены *ToxA* (39%) или *ToxAL* (9%). Очевидно, у этих штаммов *P. tritici-repentis* расы 4 обнаруженные гены *ToxA* и *ToxAL* не экспрессировались.

Ген *ToxB* не был выявлен во всей анализируемой выборке изолятов, что подтвердило его редкую встречаемость во всем мире (Lamari et al., 1995; Ali et al., 1999; Martinez et al., 2001; Antoni et al., 2010; Mironenko et al., 2015).

Выявление нами продуктов амплификации гена *ToxA* размером 800 п.н. позволяет предположить наличие инсерции в данном гене. Впервые наличие инсерции в гене *ToxA* было описано в 2018 г. (Moolhuijzen et al., 2018). Вставка размером 166 п.н. была идентифицирована как повторяющийся элемент, представленный в количестве 100–150 копий на геном. Инсерционный элемент назвали PtrHp1 и определили его распространенность в популяциях патогена (Moolhuijzen et al., 2018). По нашим предварительным данным, обнаруженная нами инсерция в гене *ToxA* имеет сходный размер около 160 п.н. Детальное изучение мутантных генов *ToxAL*, включающее определение последовательности и локализацию инсерции, а также ее влияние на экспрессию гена, является предметом дальнейшего изучения. По результатам анализа вирулентности штаммов с геном *ToxAL* можно судить о потере его функциональности.

Изменение вирулентных свойств изолятов *P. tritici-repentis* и обнаружение новых рас обусловлено генетической изменчивостью патогена (Moolhuijzen et al., 2018; Kamel et al., 2019). В данном исследовании в популяциях *P. tritici-repentis* выявлены “нетипичные” штаммы, у которых молекулярная диагностика генов-эффекторов *ToxA* и *ToxB* не соответствовала идентифицированной фитопатологической расе. Доля таких штаммов составила 35% для

некротрофного эффектора Ptr *ToxA* и 27% — для Ptr *ToxB*. Ранее в популяциях *P. tritici-repentis* из юго-восточного Казахстана и Краснодарского края среди штаммов была выявлена 100% встречаемость гена *ToxA*, однако часть этих штаммов оказалась неспособной индуцировать некроз при инокуляции листьев пшеницы сорта Glenlea (Mironenko et al., 2019), что может быть следствием нарушения экспрессии гена *ToxA*, мутациями в его кодирующей части или наличием гомологов *ToxA* в геноме патогена (Benslimane, 2018). В то же время в популяциях Северо-Запада России и Северо-Казахстанской области Казахстана доля штаммов *P. tritici-repentis* с геном *ToxA* варьировала от 5.5 до 66%, но при этом доля штаммов, индуцирующих некроз на листьях пшеницы Glenlea, была существенно выше — от 34 до 82%. Этот факт свидетельствует о наличии в этих популяциях штаммов, продуцирующих некротрофные эффекторы, отличные от Ptr *ToxA* (Mironenko et al., 2019). Предположения о существовании дополнительного некротрофного эффектора(ов) в геноме *P. tritici-repentis* также выдвигались другими авторами (Guo et al., 2020; Moreno et al., 2015; Kamel et al., 2019).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами выявлено существенное увеличение частоты авирулентной расы 4 в современных популяциях *P. tritici-repentis* из Северного Казахстана и республики Татарстан до 43–82% по сравнению с предыдущими годами. Эти данные необходимо учитывать в селекционных программах по твердой пшенице, поскольку известно, что изоляты расы 4 вирулентны к твердой пшенице.

Штаммы *P. tritici-repentis* с вариантом гена *ToxA* (обозначен как *ToxAL*), получившие инсерцию в кодирующей области гена, были выявлены в казахстанских популяциях из Костанайской и Северо-Казахстанской обл., а также в российской популяции из Татарстана.

Выявленные особенности возбудителя желтой пятнистости пшеницы гриба *Pyrenophora tritici-repentis* — изменение расового состава популяций за счет появления новых ранее неизвестных эффекторов и мутационных изменений гена *ToxA*, характеризуют эволюционный потенциал патогена как очень высокий, что определяет необходимость проведения подобных исследований вирулентности и молекулярных детерминантов признаков вирулентности патогена на популяционном уровне.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abdullah S., Sehgal S.K., Ali S. Race diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* in South Dakota and response of predominant wheat cultivars to tan spot. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 409. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000409>
- Afanasenko O.S., Novozhilov K.V. Problems of rational use of genetic resources for plant disease resistance. *Ekologicheskaya genetika.* 2009. V 7(2). P. 38–42 (in Russ.).
- Ali S., Francl L.J., De Wolf E.D. First report of *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 from North America. *Plant Dis.* 1999. V. 83. P. 591. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.6.591A>
- Amaike S., Ozga J.A., Basu U. et al. Quantification of *ToxB* gene expression and formation of appressoria by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* differing in pathogenicity. *Plant Pathology.* 2008. V. 57. P. 623–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01821.x>
- Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathol.* 2007. V. 97. P. 694–701. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0694>
- Antoni E.A., Rybak K., Tucker M.P. et al. Ubiquity of *ToxA* and absence of *ToxB* in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Austral. Plant Pathol.* 2010. V. 39. P. 63–68. <https://doi.org/10.1071/AP09056>
- Benslimane H. Virulence phenotyping and molecular characterization of a new virulence type of *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of tan spot. *Plant Pathol.* 2018. V. 34(2). P. 139–142. <https://doi.org/10.5423/ppj.nt.07.2017.0150>
- Ciuffetti L.M., Tuuori R.P., Gaventa J.M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *The Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 135–144.
- Guo J., Shi G., Kalil A. et al. *Pyrenophora tritici-repentis* Race 4 Isolates cause disease on tetraploid wheat. *Phytopathology.* 2020. V. 110. P. 1781–1790. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-20-0179-r>
- Kamel S., Cherif M., Hafez M. et al. *Pyrenophora tritici-repentis* in Tunisia: race structure and effector genes. *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1562. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01562>
- Lamari L., Bernier C.C. Virulence of isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* on 11 wheat cultivars and cytology of the differential host reaction. *Can. J. Plant Pathol.* 1989. V. 11. P. 284–290.
- Lamari L., Sayoud R., Boulif M. et al. Identification of a new race in *Pyrenophora tritici-repentis*: implication for the current pathotype classification system. *Can. J. Plant Pathol.* 1995. V. 17. P. 312–318. <https://doi.org/10.1080/07060669509500668>
- 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(1). P. 4–10. <https://doi.org/10.1080/07060661003594117>
- 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>
- Martinez J.P., Ottum S.A., Ali S., Francl L.J., Ciuffetti L.M. Characterization of the *ToxB* gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001. V. 14. P. 675–677. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2001.14.5.675>
- Mikhaylova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Populations of *Pyrenophora tritici-repentis* in the North Caucasus and North-West Russia: the racial composition and dynamics of virulence. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2014. V. 8(6). P. 393–400 (in Russ.).
- Mikhaylova L.A., Gulyaeva E.I., Kokorina N.M. Laboratory methods for cultivating the wheat tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2002. V. 36(1). P. 63–67 (in Russ.).
- Mikhaylova L.A., Kovalenko N.M., Mironenko N.V. et al. Populations of *Pyrenophora tritici-repentis* on the territory of Russia. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2015. V. 49(4). P. 257–261 (in Russ.).
- Mikhaylova L.A., Ternyuk I.G., Mironenko N.V. Characteristic of *Pyrenophora tritici-repentis* populations by their virulence. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2010. V. 44(3). P. 263–272 (in Russ.).
- Mikhaylova L.A., Ternyuk I.G., Mironenko N.V. Structure of *Pyrenophora tritici-repentis* populations from European part of Russia by virulence. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2007. V. 41(3). P. 269–275 (in Russ.).
- Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M. et al. Frequency of *ToxA* gene in North Caucasian and North-West Russian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2015. V 49(5). P. 325–329 (in Russ.).
- Mironenko N.V., Kovalenko, N.M., Baranova O.A. Characteristics of the geographically distant populations of *Pyrenophora tritici-repentis* in terms of virulence and *ToxA* and *ToxB* toxin-forming genes. *Vestnik zashchity rasteniy.* 2019. V. 1. P. 24–29 (in Russ.). [http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-24-29](http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29)
- Moolhuijzen P.M., See P.T., Oliver R.P. et al. Genomic distribution of a novel *Pyrenophora tritici-repentis ToxA* insertion element. *PLOS One.* 2018. V. 13(10). Art. e0206586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206586>
- Moreno M.V., Stenglein S., Perelló A.E. Distribution of races and *Tox* genes in *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from wheat in Argentina. *Trop. Plant Pathol.* 2015. V. 40. P. 141–146. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0011-2>
- Murray H.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980. V. 8. P. 4321–4325.
- Šárová J., Hanzalová A., Bartoš P. Races of *Pyrenophora tritici-repentis* in the Czech Republic. *Acta Agrobotanica.* 2005. V. 58. P. 73–78. <https://doi.org/10.5586/aa.2005.011>

- See P.T., Marathamuthu K.A., Jagallo E.M. et al. Evaluating the importance of the tan spot *ToxA–Tsn1* interaction in Australian wheat varieties. *Plant Pathol.* 2018. V. 67. P. 1066–1075. <https://doi.org/10.1111/ppa.12835>
- Shi G., Kariyawasam G., Liu S. et al. A conserved hypothetical gene is required but not sufficient for *Ptr ToxC* production in *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 2022. V. 35(4). P. 336–348. <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-21-0299-R>.
- Strelkov S.E., Lamari L. Host-parasite interactions in tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* of wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 2003. V. 25(4). P. 339–349. <https://doi.org/10.1080/07060660309507089>.
- Wegulo S.N., Breathnach J.A., Baenziger P.S. Effect of growth stage on the relationship between tan spot and spot blotch severity and yield in winter wheat. *Crop Protection.* 2009. V. 28(8). P. 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.04.003>
- Афанасенко О.С., Новожилов К.В. (Afanasenko, Novozhilov) Проблемы рационального использования генетических ресурсов устойчивости растений к болезням // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 2. С. 38–42.
- Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. и др. (Mironenko et al.) 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.
- Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. (Mironenko et al.) Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования *ToxA* и *ToxB* // Вестник защиты растений. 2019. Т. 1. № 99. С. 24–29.
- Михайлова Л.А., Гульмяева Е.И., Кокорина Н.М. (Mikhaylova et al.) Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. № 1. С. 63–67.
- Михайлова Л.А., Тернюк И.Г., Мироненко Н.В. (Mikhaylova et al.) Структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis* из европейской части России по признаку вирулентности // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41. № 3. С. 269–275.
- Михайлова Л.А., Тернюк И.Г., Мироненко Н.В. (Mikhaylova et al.) Характеристика популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по признаку вирулентности // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. № 3. С. 263–272.
- Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. (Mikhaylova et al.) Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России: расовый состав и динамика вирулентности // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. № 6. С. 393–400.
- Михайлова Л.А., Коваленко Н.М., Мироненко Н.В. и др. (Mikhaylova et al.) Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на территории России // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49. № 4. С. 257–261.

## Racial Composition and Variability of the *ToxA* Gene in Geographically Distant Populations of *Pyrenophora tritici-repentis*

N. V. Mironenko<sup>a,#</sup>, A. S. Orina<sup>a,##</sup>, N. M. Kovalenko<sup>a,###</sup>, and N. G. Zubko<sup>a,####</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: nina2601mir@mail.ru

<sup>##</sup>e-mail: orina-alex@yandex.ru

<sup>###</sup>e-mail: nadyakov@mail.ru

<sup>####</sup>e-mail: sacura0@yandex.ru

*Pyrenophora tritici-repentis* causing the tan spot of wheat produces specific necrotrophic effectors *Ptr ToxA*, *Ptr ToxB* and *Ptr ToxC*, inducing necrosis and chlorosis on the leaves of susceptible varieties. Based on the ability of *P. tritici-repentis* strains to produce specific necrotrophic effectors or their combinations, the eight races of the pathogen are distinguished. Monitoring the race composition of *P. tritici-repentis* populations is necessary to assess the evolutionary potential of the pathogen and develop a methodology for breeding wheat cultivars with long-term resistance. We analyzed 179 monoconidial *P. tritici-repentis* strains from Kazakhstan and Russia populations in 2020–2022. The widespread distribution of races 2 and 4 was revealed, strains of which were present in each analyzed *P. tritici-repentis* population with a frequency of 2–36% and 7–82%, respectively. The dominance of avirulent race 4 was noted: the strains of this race accounted for 27% of all analyzed *P. tritici-repentis* strains. Molecular identification of the *ToxA* and *ToxB* genes, as well as *toxb*, a homolog of the *ToxB* gene, in 118 *P. tritici-repentis* strains from six populations revealed the presence of the *ToxA* gene in 69% of the analyzed strains. The *ToxB* gene was not detected in any strains, while the *toxb* gene was found sporadically and was identified in the genome of 18 *P. tritici-repentis* strains (9%), most of which were avirulent and belonged to race 4. In PCR with specific primers for *ToxA* gene of ten *P. tritici-repentis* strains a product of ≈ 800 bp was amplified, which turned out to be significantly larger than expected. This was explained by the presence of an insertion in the amplified region of the *ToxA* gene. All *P. tritici-repentis* strains with the *ToxA<sub>L</sub>* were assigned to races 4 and 5, which do not form the necrotrophic effector *Ptr ToxA*. The structure of the *ToxA<sub>L</sub>* gene and its protein product is the subject of further research.

**Keywords:** insertion, race 3, race 4, race 5, tan spot, *ToxA*, *ToxB*, *toxb*.