

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИЙ *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum* И *Parastagonospora pseudonodorum* НА ТЕРРИТОРИИ ТАМБОВСКОЙ ОБЛАСТИ ПО НАЛИЧИЮ ГЕНОВ-ЭФФЕКТОРОВ*

Н.М. Коваленко¹, кандидат биологических наук, Ю.В. Зеленева¹, доктор биологических наук, В.П. Судникова², кандидат сельскохозяйственных наук

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3
E-mail: info@vizr.spb.ru

²Среднерусский филиал Федерального научного центра им. И. В. Мичурина,
392553, Тамбовская обл., Тамбовский р-н., пос. Новая Жизнь, ул. Молодежная, 1
E-mail: tmbsnifs@mail.ru

Исследования проводили с целью характеристики популяций *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum* и *Parastagonospora pseudonodorum* на территории Тамбовской области на наличие генов-эффекторов *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* и *ToxB* с использованием связанных с ними молекулярных маркеров. Инфекционные образцы отобраны в 2022 г. с листьев яровой и озимой пшеницы, выращенной на участке, расположенном в северо-восточной части Центрально-Черноземного региона. Предшественник – чистый пар. Виды *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* отмечены на сортах яровой пшеницы в конце вегетации растений. Гриб *P. tritici-repentis* порастил сорта как озимой, так и яровой пшеницы. С использованием молекулярных маркеров, проведена идентификация генов, кодирующих NEs у 68 изолятов гриба *P. tritici-repentis* с 19 сортов озимой пшеницы, 100 изолятов вида *P. nodorum* с 10 сортов яровой пшеницы и 70 изолятов *P. pseudonodorum* с 7 сортов яровой пшеницы. Среди изученных изолятов *P. nodorum* отмечены как единичные гены *Tox1*, *Tox3* и *ToxA*, так и сочетания по два гена в одном генотипе. В генотипе изолятов *P. pseudonodorum* не отмечено присутствие гена *ToxA*. Выявлены изоляты грибов, генотипы которых несут *Tox1* и/или *Tox3*. Ген *ToxB* в изученной популяции *P. tritici-repentis* не выявлен, тогда как *ToxA* был широко представлен. Встречаемость в популяции *P. nodorum* генов *ToxA* составила 30 %, *Tox1* – 20 %, *Tox3* – 30 %; в популяции *P. pseudonodorum* отмечали *Tox1* – 57,1 % и *Tox3* – 30 %; в популяции *P. tritici-repentis* был представлен *ToxA* – 76,5 %. Штаммы *P. tritici-repentis*, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, охарактеризованные по наличию генов-эффекторов, будут использованы при создании искусственных инфекционных фонов для выявления источников и доноров устойчивости к листовым пятнистостям.

CHARACTERIZATION OF *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum* AND *Parastagonospora pseudonodorum* POPULATIONS BASED ON THE PRESENCE OF EFFECTOR GENES IN THE TAMBOV OBLAST TERRITORY

N.M. Kovalenko¹, Yu.V. Zeleneva¹, V.P. Sudnikova²

¹All-Russian Institute of Plant Protection,
196608, Sankt-Peterburg, Pushkin, sh. Podbel'skogo, 3
E-mail: info@vizr.spb.ru

²Central Russian branch of Michurin Federal Scientific Center,
392553, Tambovskaya obl., Tambovskii r-n, pos. Novaya Zhizn', ul. Molodezhnaya, 1
E-mail: tmbsnifs@mail.ru

The aim of the research is to characterise the populations of *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum* and *Parastagonospora pseudonodorum* in the territory of the Tambov region based on the presence/absence of the *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* and *ToxB* effector genes using their associated molecular markers. Infectious samples were obtained in 2022 from the leaves of spring and winter wheat. The infectious site is located in the northeastern part of the Central Black Soil region. The predecessor is represented by the pure steam. The species of *P. nodorum* and *P. pseudonodorum* were observed on spring wheat cultivars in the end of their vegetation period. The fungus of *P. tritici-repentis* affected the cultivars of both winter and spring wheat. Using molecular markers, the genes encoding NEs were identified in 68 *P. tritici-repentis* isolates obtained from 19 winter wheat cultivars, 100 *P. nodorum* isolates, taken from 10 spring wheat cultivars, and 70 *P. pseudonodorum* isolates, provided by 7 spring wheat cultivars. Among the *P. nodorum* isolates studied, there were both single genes *Tox1*, *Tox3*, and *ToxA*, as well as combinations of two genes in one genotype. The presence of the *ToxA* gene was not found in the genotype of *P. pseudonodorum* isolates. Fungal isolates with genotypes carrying *Tox1* and/or *Tox3* have been identified. The *ToxB* gene was not found in the examined population of *P. tritici-repentis*, while *ToxA* was widely represented. The occurrence of genes in the *P. nodorum* population was as follows: *ToxA*, 30%; *Tox1*, 20%; *Tox3*, 30%; in the population of *P. pseudonodorum* it was: *Tox1* - 57.1%, *Tox3* – 30 %; in the population of *P. tritici-repentis* the ratio was represented by the following figures: *ToxA* - 76.5%. *P. tritici-repentis*, *P. nodorum*, and *P. pseudonodorum* strains, characterized by the presence of effector genes, will be used to create artificial infectious backgrounds to identify sources and donors of leaf spot resistance.

Ключевые слова: вирулентность, гены-эффекторы, пиренофороз, ПЦР-диагностика, пшеница, пятнистости, септориоз, фитопатогенные грибы.

Key words: virulence, effector genes, pyrenophorosis, PCR-diagnostics, wheat, spots, septoriasis, phytopathogenic fungi.

Результаты ежегодного мониторинга болезней пшеницы свидетельствуют, что в последние годы на территории Тамбовской области, как и во многих

регионах России, все большее распространение получают септориозные и пиренофорозные пятнистости [1].

Виды *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl.,

* работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-76-30005.

Verkley & Crous и *Parastagonospora pseudonodorum* (синоним *P. avenae* f. sp. triticea) [2] вызывают септориоз листа и колоса пшеницы. По нашим наблюдениям, они образуют некротические пятна с пикнидами на листьях, побегах и колосе, как правило, начиная с фазы колошения (51 по шкале Цадокс) [3]. *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* считают одними из наиболее вредоносных фитопатогенов во всех зернопроизводящих странах [4]. *P. nodorum* имеет широкий круг хозяев. Кроме пшеницы, он поражает рожь, тритикале, ячмень, дикие злаки. Вид *P. pseudonodorum* поражает только пшеницу.

Гриб *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler вызывает желтую пятнистость пшеницы. Это одна из наиболее вредоносных болезней культуры, которая встречается во всех районах возделывания пшеницы по всему миру [5, 6, 7]. Первичные симптомы заболевания отмечают весной на озимой пшенице в виде мелких желто-коричневых пятен, которые увеличиваются, принимая линзообразную форму [8]. Помимо пшеницы, гриб может поражать множество других злаков, таких как рожь, ячмень и пырей ползучий [9, 10].

Грибы *P. tritici-repentis*, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* известны своей способностью синтезировать некротрофные эффекторы (necrotrophic effectors – NEs), в том числе специфичные к хозяину токсины (host selective toxins – HSTs), которые функционируют как факторы патогенности [11]. У вида *P. tritici-repentis* описаны три некротрофных эффектора – *Ptr ToxA*, *Ptr ToxB* и *Ptr ToxC*. При этом ученые отмечают, что NEs существует больше [12, 13, 14]. *Ptr ToxA* и *Ptr ToxB* – белки, *Ptr ToxC* – низкомолекулярное соединение небелковой природы [13]. *Ptr ToxA* вызывает некроз, *Ptr ToxB* и *Ptr ToxC* – хлороз [11, 12]. *Ptr ToxA* кодирует одна единственная копия гена *ToxA*, тогда как *Ptr ToxB* – многокопийный ген *ToxB* [15]. *Ptr* также имеет гомолог *Ptr ToxB*, кодируемый геном *toxh*, который не вызывает никаких симптомов у пшеницы, несмотря на 81 % сходства с *Ptr ToxB* [16, 17].

У вида *P. nodorum* идентифицировано восемь генов, кодирующих NEs, комплементарных девяти генам чувствительности пшеницы (*Snn*) – *SnToxA/Tsn1*, *SnTox1/Snn1*, *SnTox2/Snn2*, *SnTox3/Snn3-B1/Snn3-D1*, *SnTox4/Snn4*, *SnTox5/Snn5*, *SnTox6/Snn6* и *SnTox7/Snn7* [18]. Изначально предполагали, что *SnTox2*, *SnTox6* и *SnTox7* – три разных NEs, нацеленных на три отдельных гена чувствительности хозяина. Richards с коллегами [19] показали, что на самом деле они кодируют один и тот же ген, который обозначили как *Tox267*. Этот ген нацелен на три отдельных гена чувствительности хозяина – *Snn2*, *Snn6* и *Snn7*. На сегодняшний день клонированы четыре некротрофных эффекторных гена *P. nodorum* – *ToxA*, *Tox1*, *Tox3* и *Tox267*. Показано, что они также характерны и для вида *P. pseudonodorum* [20].

Знание разнообразия *Ptr* может помочь улучшить идентификацию патогенов и возможность борьбы с ними, а также создавать новые сорта пшеницы, которые будут обладать устойчивостью к местной популяции возбудителей болезней [21].

Цель исследований – охарактеризовать популяции *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum* и *Parastagonospora pseudonodorum* на территории Тамбовской области на наличие у них генов-эффекторов *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* и *ToxB* с использованием связанных с ними молекулярных маркеров.

Методика. Материалом для исследования служили монокониальные изоляты *P. tritici-repentis*, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* (табл. 1), выделенные в 2022 г. из пораженных листьев пшеницы, собранных на территории Тамбовской области (инфекционный участок

Табл. 1. Происхождение изолятов
P. tritici-repentis, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*

Сорт (озимая пшеница)	Число изолятов	Сорт (яровая пшеница)	Число изолятов	Регистрационный номер
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>		<i>Parastagonospora nodorum</i>		
Безенчукская 380	2	Валентина	10	175-22-Р.п.
Бирюза	4	Воевода	10	185-22-Р.п.
Звонница	6	Курская 2038	10	137-22-Р.п.
Изюминка	4	Л 400	10	156-22-Р.п.
Инна	4	Л 503	10	157-22-Р.п.
Косовица	4	Пирамида	10	149-22-Р.п.
Лагуна	4	Саратовская 29	10	145-22-Р.п.
Латыновка	2	Союз 1	10	148-22-Р.п.
Липецкая звезда	4	Тулайковская 100	10	150-22-Р.п.
Льговская 167	2	Фаворит	10	161-22-Р.п.
Льговская 4	4	Итого	100	-
Мироновская 100	4	<i>Parastagonospora pseudonodorum</i>		
Мироновская 808	6	Краснокутка 10	10	136-22-Р.п.
Московская 39	2	Кинельская 6	10	134-22-Р.п.
Московская 40	2	Тулайковская 100	10	150-22-Р.п.
Престиж	4	Фаворит	10	161-22-Р.п.
Проза	2	Экада 109	10	163-22-Р.п.
Синтетик	4	Воевода	10	185-22-Р.п.
Спартак	4	Гранни	10	186-22-Р.п.
Итого	68	Итого	70	-

Среднерусского филиала Федерального научного центра им. И. В. Мичурина).

Инфекционный участок расположен в северо-восточной части Центрально-Черноземного региона. Почва опытного участка, на котором собирали инфекционный материал, характеризовалась следующими показателями: содержание в пахотном слое (0...30 см) подвижного фосфора – 22,0 мг/100 г почвы, подвижного калия – 10,9 мг/100 г почвы (по Чирикову, ГОСТ 26204–91), реакция почвенного раствора (рН_{сол.}) – 5,5 ед. (ГОСТ 26483–85), гидролитическая кислотность – 3,9 мг-экв./100 г почвы (по Каппену, ГОСТ 26212–91), сумма поглощенных оснований – 57,2 ммоль/100 г почвы (ГОСТ 26483–85).

Учетная площадь делянки 10 м², повторность четырехкратная. Посев проводили сеялкой СФК, норма высева 5 млн всхожих семян на 1 га. Агротехника выращивания культуры общепринятая в Тамбовской области. Предшественник – чистый пар.

Погодные условия 2022 г. были неблагоприятными для возделывания сельскохозяйственных растений и развития на них фитопатогенов микозной этиологии (табл. 2). В начале вегетационного периода за май выпало 34,4 мм осадков, и при умеренных температурах воздуха гидротермический коэффициент (ГТК) находился на достаточно высоком уровне – 1,41. В июне количество осадков (23,4 мм) и ГТК (0,40) были низкими. В июле выпало 98,2 мм осадков, что значительно выше нормы, а гидротермический коэффициент составил 1,54. Это способствовало росту и развитию сельскохозяйственных растений. В августе осадков выпало мало – 22,0 мм,

Табл. 2. Метеорологические условия 2022 г. (Тамбовская метеостанция)

Фактор погоды	Декада	Месяц				
		апрель	май	июнь	июль	август
Среднесуточная температура воздуха по декадам, °C	I	6,2	8,7	17,9	21,4	22,5
	II	10,9	11,2	19,5	20,2	22,0
	III	11,0	12,2	20,6	20,1	25,5
Средняя температура за месяц, °C	-	9,3	10,7	19,4	20,5	22,6
Сумма осадков по декадам, мм	I	32,6	5,0	11,3	1,3	0,0
	II	10,3	18,9	7,1	49,8	22,0
	III	8,0	10,5	5,0	47,1	0,0
Сумма осадков за месяц, мм	-	50,9	34,4	23,4	98,2	22,0
Гидротермический коэффициент (ГТК) за месяц	-	-	1,41	0,40	1,54	0,31

произошло повышенные температуры воздуха – максимальную температуру воздуха больше или равную 30 °C отмечали 17 дней. Величина гидротермического коэффициента за этот – 0,31 свидетельствует о засушливых условиях. Урожайность изучаемых культур в 2022 г. оказалась ниже уровня 2020 г., но выше 2021 г. [1].

Погодные факторы оказали влияние и на развитие возбудителей болезней. Так, характерные некротические пятна с пикнидами *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* были зарегистрированы только на сортах яровой пшеницы в конце вегетации растений, что позволило в условиях лаборатории выделить грибок в чистую культуру [22]. Результаты лабораторной диагностики видов грибов были подтверждены методом секвенирования с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ».

Гриб *P. tritici-repentis* отмечали на сортах озимой и яровой пшеницы. При этом озимая пшеница в условиях года поражалась сильнее яровой, поэтому в анализ были включены изоляты с сортов этой разновидности. Выделение и размножение культуры гриба *P. tritici-repentis* выполняли по методике Л. А. Михайловой с соавторами [8].

Изоляты выращивали в чашках Петри на питательной среде в течение 7...10 дней в термостате при 21...22 °C. Геномную ДНК грибов выделяли из чистой культуры моноконидиальных изолятов стандартным методом СТАВ/хлороформ [23]. Амплификацию геномной ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси (67 мМ Трис-HCl pH 8,8; 3 мМ MgCl₂; по 200 мкМ каждого dNTP; 10 рМ/мл праймера; 25 (от 2 до 50) нг геномной ДНК и 0,5 ед. Таq-полимеразы). Амплифицированные фрагменты разделяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле, в 1×TBE буфере (pH 8,2), гель окрашивали бромистым этидием. Для оценки размера фрагментов использовали ДНК маркер Step 100 plus (Биолабмикс).

Скрининг изолятов *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* на присутствие генов *Tox1* и *Tox3* проводили по

методике Gao et al. [24] с использованием ПЦР с парами праймеров *SnTox1-cF/SnTox1-cR* и *SnTox3-cF/SnTox3-cR* соответственно (табл. 3). Условия ПЦР: 94 °C в течение 4 мин., затем 30 циклов – 94 °C в течение 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 3 мин.; последний этап элонгации – 72 °C в течение 10 мин.

ToxA у изолятов трёх видов детектировали с методом ПЦР с использованием праймеров для связывания ORF *ToxA TA51F* и *TA52R* [25]. Условия ПЦР: 94 °C в течение 3 мин., затем 30 циклов – 94 °C в течение 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; последний этап удлинения – 72 °C в течение 7 мин.

Идентификацию гена *ToxB* проводили с помощью ПЦР с двумя парами геноспецифических праймеров: *TB10/TB12* [16, 26] и *TB57/TB6* [15, 16]. Условия ПЦР (*TB10/TB12*): 95 °C в течение 2 мин., затем 35 циклов – 95 °C в течение 15 с, 57 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин.; последний этап – 72 °C в течение 10 мин. Условия ПЦР (*TB57/TB6*): 94 °C в течение 3 мин.; затем 30 циклов – 94 °C в течение 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; последний этап – 72 °C в течение 7 мин.

В качестве положительного контроля для редко встречаемого у изолятов гриба гена *ToxB* использовали изоляты греческого происхождения из коллекции лаборатории иммунитета растений к болезням Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений, которые стабильно дают четкие продукты амплификации с праймерами на ген *ToxB* [27].

Результаты и обсуждение. В результате молекулярного скрининга у изучаемого материала (238 ДНК-проб, полученных от 100 моноконидиальных изолятов вида *P. nodorum*, 70 – *P. pseudonodorum*, 68 – *P. tritici-repentis*) были выявлены как единичные гены, кодирующие *NEs*, так и их сочетания в одном генотипе.

Ген *Tox1* выявлен среди изолятов с 6 сортов яровой пшеницы. Его наличие отмечено у изолятов *P. nodorum* с сортообразцов Курская 2038 (номер изолята 137-22-Р.н.) и Тулайковская 100 (150-22-Р.н.),

Табл. 3. Список праймеров, использованных для выявления маркеров генов *Tox1*, *Tox3*, *ToxA*, *ToxB*

Название праймера	Последовательность 5'-3'	Ссылка на литературный источник	Размер диагностического фрагмента, п.н.
<i>SnTox1-c</i>	F: ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT R: TGTGGCAGCTAACTAGCACA	[24]	500
<i>SnTox3-c</i>	F: CTCGAACCACGTGGACCCGGA R: CTCCTCCCTCGTGGGATTGCCCATATG		600
<i>TA51/52</i>	F: GCGTTCTATCCTCGTACTTC R: GCATTCTCCAATTTTCACG	[25]	573
<i>TB10/TB12</i>	F: TATGCGACCCCTAACCTAGCC R: GCCAGATAAAAAACCCCTATACC	[16, 26]	646
<i>TB57/TB6</i>	F: GAGACTGCTATGCTACTTGCTG R: ACGTCTCCACTTTGCACACTCTC	[15, 16]	243

а также моноконидиальных изолятов *P. pseudonodorum*, выделенных с инфекционного материала сортов яровой пшеницы Краснокутка 10 (136-22-Р.п.), Кинельская 6 (134-22-Р.п.), Тулайковская 100 (150-22-Р.п.) и Экада 109 (163-22-Р.п.) (рис. 1).

Наличие гена *Tox3* отмечено среди изолятов вида

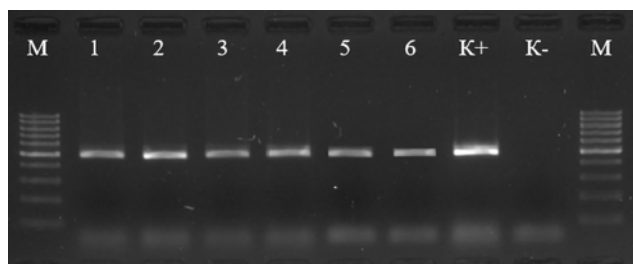


Рис. 1. Продукты амплификации с праймерами *SnTox1-cF/SnTox1-cR*, специфичными для гена *Tox1*, номера изолятов: 1) 137-22-Р.п.; 2) 150-22-Р.п.; 3) 136-22-Р.п.; 4) 134-22-Р.п.; 5) 150-22-Р.п.; 6) 163-22-Р.п.; М – ДНК маркер *Step100 plus*; К+ изолят 32-21-Р.п.; К- изолят 29-21-Р.п. Размер диагностического фрагмента 500 п.н.

P. nodorum, полученных из растительных образцов сортов Курская 2038 (137-22-Р.п.), Союз 1 (148-22-Р.п.) и Воевода (185-22-Р.п.), а также *P. pseudonodorum* с сортов Экада 109 (163-22-Р.п.) и Воевода (185-22-Р.п.) (рис. 2).

Ген *ToxA* присутствует в геноме *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*, а также *P. tritici-repentis*. Вследствие разницы в количестве полиморфизмов по *ToxA* среди изолятов *P. nodorum* и *P. tritici-repentis* (13 и 3 гаплотипа соответственно), было сделано предположение, что *P. nodorum* служит донором гена *ToxA* для *P. tritici-repentis* [25]. В нашем исследовании он был выявлен среди изолятов *P. nodorum* с трех сортов яровой пшеницы: Союз 1 (148-22-Р.п.), Пирамида (149-22-Р.п.) и Воевода (185-22-Р.п.) (см. рис. 2, 3). В генотипе изолятов *P. pseudonodorum* в 2022 г. ген *ToxA* не выявлен, в 2021 г. он был выявлен в генотипе изолятов вида *P. pseudonodorum* из листьев сорта яровой мягкой пшеницы Воронежская 20 (101-21-Р.п.) [3].

В результате молекулярного скрининга ген *ToxA* выявлен среди изолятов вида *P. tritici-repentis*, полученных из листьев 18 сортов озимой мягкой пшеницы, находящихся в испытании (рис. 3). Два изолята гриба с сорта Московская 40 не несли в своем генотипе ген *ToxA* (рис. 4).

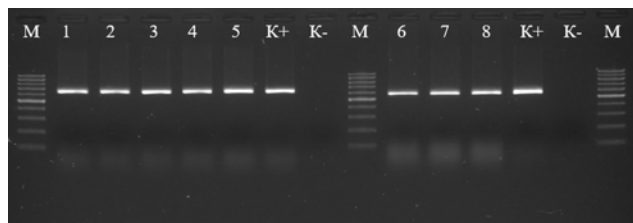


Рис. 2. Продукты амплификации ПЦР с праймерами *SnTox3-cF/SnTox3-cR*, специфичными для гена *Tox3*, номера изолятов: 1) 137-22-Р.п.; 2) 148-22-Р.п.; 3) 185-22-Р.п.; 4) 163-22-Р.п.; 5) 185-22-Р.п.; М – ДНК маркер *Step100 plus*; К+ изолят 32-21-Р.п.; К- изолят 2-21-Р.п.-1. Размер диагностического фрагмента – 600 п.н. Продукты амплификации с праймерами *TA51 F/TA52 R*, специфичными для гена *ToxA*, номера изолятов: 6) 148-22-Р.п.; 7) 149-22-Р.п.; 8) 185-22-Р.п. К+ изолят 29-21-Р.п.; К- изолят 26-21-Р.п. Размер диагностического фрагмента – 573 п.н.

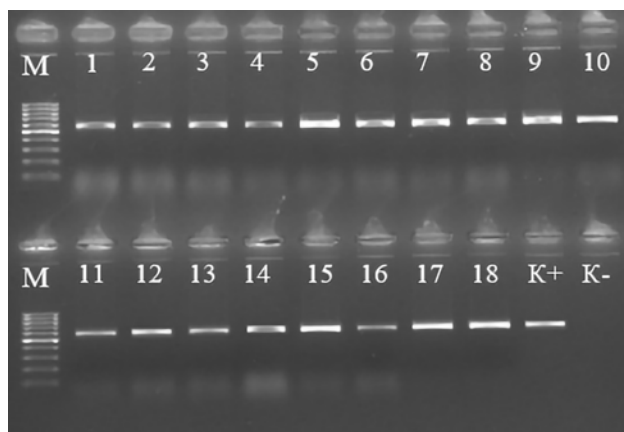


Рис. 3. Продукты амплификации с праймерами *TA51 F/TA52 R*, специфичными для гена *ToxA* в изолятах тамбовской популяции *P. tritici-repentis*, пробы соответствуют изолятам, полученным со следующих сортов озимой мягкой пшеницы: 1) Безенчукская 380, 2) Бирюза, 3) Изюминка, 4) Лагуна, 5) Льговская 4, 6) Мироновская 808, 7) Московская 39, 8) Спартак, 9) Звонница, 10) Косовица, 11) Липецкая Звезда, 12) Мироновская 100, 13) Латышевская, 14) Льговская 167, 15) Престиж, 16) Прога 2, 17) Синтетик, 18) Инна; М – ДНК маркер *Step100 plus*; К+ изолят 29-21-Р.п.; К- изолят 26-21-Р.п. Размер диагностического фрагмента: 573 п.н.

Таким образом, в 2022 г. среди изученных изолятов встречаемость гена *ToxA*, кодирующего *NEs*, в Тамбовской популяции вида *P. nodorum* составила 30 %, *Tox1* – 20 %, *Tox3* – 30 %; гена *Tox1* в популяции *P. pseudonodorum* – 57,1 %, *Tox3* – 30 %; гена *ToxA* в популяции *P. tritici-repentis* – 76,5 % (рис. 5).

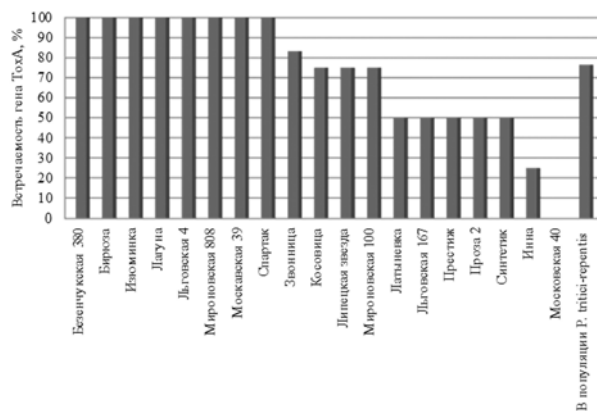


Рис. 4. Встречаемость гена *ToxA* в изолятах тамбовской популяции *P. tritici-repentis*, в % (всего проанализировано 68 моноконидиальных изолятов).

Ген *ToxB* не обнаружен в изученной популяции *P. tritici-repentis*. При этом при использовании пар праймеров ТВ10/ТВ12 и ТВ57/ТВ6 получены четкие продукты амплификации соответствующих размеров у положительных контролей греческого происхождения. Такие результаты согласуются с публикациями ряда авторов, которые сообщают об отсутствии гена *ToxB* и широкой представленности гена *ToxA* в генотипах изолятов *P. tritici-repentis* из российских популяций. Так, ген *ToxB* не был обнаружен в коллекции изолятов *P. tritici-repentis* из южных, северных и западносибирских регионов РФ, Финляндии и Казахстана, сформированной в 2017–2018 гг. [27, 28, 29]. Отсутствие или

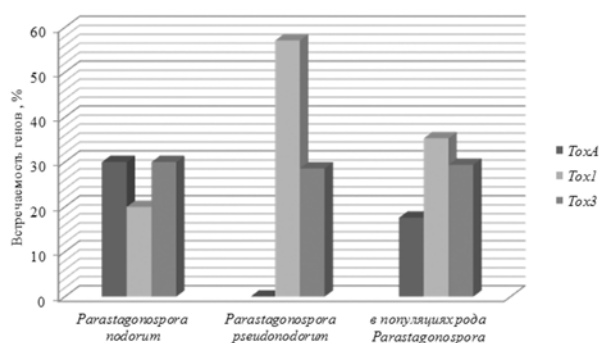


Рис. 5. Встречаемость генов ToxA, Tox1 Tox3 в генотипах изолятов тамбовских популяций *Parastagonospora* spp, %.

редкая встречаемость изолятов, продуцирующих этот токсин, была отмечена и в других странах [30, 31]. Представленность гена *ToxA* у изученных образцов популяций *P. tritici-repentis* варьирует. Так, в российской северокавказской и казахстанской юго-восточной популяциях частота изолятов с геном *ToxA* составляла 100 %, а в других варьировала от 5,5 % (западносибирская омская популяция) до 66 % (финская популяция) [28].

Выводы. В результате идентификации генов, кодирующих NEs, у грибов *P. tritici-repentis*, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, проведенной в 2022 г. на территории Тамбовской области ЦЧР, установлено, что генотипы изолятов гриба *P. nodorum*, находившихся в изучении, содержат гены *ToxA* (частота встречаемости 30 %), *Tox1* (20 %) и *Tox3* (30 %), *P. pseudonodorum* – *Tox1* (57,1 %) и *Tox3* (30 %); генотипы изолятов гриба *P. tritici-repentis* характеризуются наличием гена *ToxA* (76,5 %) и отсутствием – *Tox B*.

Результаты проведенных исследований будут полезны при составлении селекционных программ и проведении защитных мероприятий сельскохозяйственных растений.

Литература.

- Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в Тамбовской области в 2021 году и прогноз развития вредных организмов в 2022 году / сост. Н. П. Совижков, О. И. Илларионова, М. В. Савенкова и др. Тамбов: ООО «Издательский дом «Тамбов», 2022. 134 с.
- Genome-scale phylogenies reveal relationships among *Parastagonospora* species infecting domesticated and wild grasses / D. Croll, P. W. Crous, D. Pereira et al. // *Persoonia*. 2021. Vol. 46. P. 116–128. doi: 10.3767/persoonia.2021.46.04.
- Видовой состав возбудителей септориозов пшеницы в европейской части России и идентификация генов-эффекторов *SnToxA*, *SnTox1* и *SnTox3* / Ю. В. Зеленева, И. Б. Аблова, В. П. Судникова и др. // *Микология и фитопатология*. 2022. Т. 56. № 6. С. 441–447. doi: 10.31857/S0026364822060113.
- Novel sources of resistance to *Septoria nodorum* blotch in the Vavilov wheat collection identified by genome-wide association studies / H. T. T. Phan, K. Rybak, S. Bertazzoni et al. // *Theor Appl Genet*. 2018. Vol. 131, P. 1223–1238. doi: 10.1007/s00122-018-3073-y.
- Pyrenophora tritici-repentis*: a plant pathogenic fungus with global impact. In: *Genomics of plant-associated fungi: monocot pathogens* / Ciuffetti L. M., Manning V. A., Pandelova I. et al. / Dean RA, Lichens-Park A, Kole C (eds). Berlin: Springer, 2014. P. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-44053-7_1 (дата обращения: 03.03.2023). doi: 10.1007/978-3-662-44053-7_1.
- Impact of crop rotation and soil tillage on the severity of winter wheat leaf blotches / B. Bankina, G. Bimsteine, I. Arhipova et al. // *Rural Sustain Res*. 2021. Vol. 45. No. 340. P. 21–27. doi: [org/10.2478/plua-2021-0004](https://doi.org/10.2478/plua-2021-0004).
- Ким Ю. С., Волкова Г. В. Желтая пятнистость листьев пшеницы: распространение, вредоносность, расовый состав (обзор) // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2020. № 2 (50). С. 105–116. doi: 10.18286/1816-4501-2020-2-105-116.
- Михайлова Л. А., Мироненко Н. В., Коваленко Н. М. Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов., СПб: ВИЗР, 2012. 64 с.
- Vistas of tan spot research / E. D. de Wolf, R. J. Effertz, S. Ali, et al. // *Can J Plant Pathol*. 1998. Vol. 20. No. 4. P. 349–370. doi: 10.1080/07060669809500404.
- Ali S., Franc L. J. Population race structure of *Pyrenophora tritici-repentis*. Prevalent on wheat and noncereal grasses in the great plains // *Plant Dis*. 2003. Vol. 87. No. 4. P. 418–422. doi: 10.1094/pdis.2003.87.4.418.
- 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. Vol. 9. No. 2. P. 135–144. doi: 10.1105/tpc.9.2.135.
- Strelkov S. E., Lamari L., Ballance G. M. Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis* // *Mol Plant-Microbe Interact*. 1999. Vol. 12. No. 8. P. 728–732. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.8.728.
- Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat / R. J. Effertz, S. W. Meinhardt, J. Anderson, et al. // *Phytopathology*. 2002. Vol. 92. No. 5. P. 527–533. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.5.527.
- Phenotypic and genotypical characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* races in Brazil / V. V. Bertagnolli, J. R. Ferreira, Z. Liu, et al. // *Eur J Plant Pathol*. 2019. Vol. 154. No. 4. P. 995–1007. doi: 10.1016/j.fgb.2017.10.004.
- Characterization of the ToxB gene from *Pyrenophora tritici-repentis* / J. P. Martinez, S. A. Ottum, S. Ali, et al. // *Mol Plant-Microbe Interact*. 2001. Vol. 14. No. 5. P. 675–677. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.5.675.
- 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. Vol. 17. P. 467–474. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.5.467.
- Kim Y. M., Strelkov S. Heterologous expression and activity of Ptr ToxB from virulent and avirulent isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* // *Can J Plant Pathol*. 2007. Vol. 29. No. 3. P. 232–242. doi: 10.1080/07060660709507465.
- Duba A., Goriewa-Duba K., Wachowska U. A review of the interactions between wheat and wheat pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp. and *Parastagonospora nodorum* // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. Vol. 19. Article 1138. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/1138>. (дата обращения: 03.03.2023). doi: 10.3390/ijms19041138.
- A triple threat: the *Parastagonospora nodorum* SnTox267 effector exploits three distinct host genetic

- factors to cause disease in wheat / Richards J. K., Kariyawasam G. K., Seneviratne S., et al. // *New Phytol.* 2022. Vol. 233. No. 1. P. 427–442. doi: 10.1111/nph.17601.
20. Friesen T. L., Faris J. D. Characterization of Effector-Target Interactions in Necrotrophic Pathosystems Reveals Trends and Variation in Host Manipulation // *Annu Rev Phytopathol.* 2021. Vol. 59. P. 77–98. doi: 10.1146/annurev-phyto-120320-012807.
 21. Diversity in morphotypes and necrotrophic effectors (Nes) of *Pyrenophora tritici-repentis* strains in Latvia and Belarus / J. Kaņeps, I. Morocko-Bicevska, B. Bankina, et al. // *Cereal research communications.* 2022. Vol. 50. P. 1037–1043. doi: 10.1007/s42976-022-00255-4.
 22. Коломиец Т. М., Пахолкова Е. В., Дубовая Л. П. Отбор исходного материала для создания сортов пшеницы с длительной устойчивостью к септориозу. М.: Печатный город, 2017. 56 с.
 23. Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* 1990. Vol. 12. P. 13–15.
 24. Identification and characterization of the SnTox6-Snn6 interaction in the *Parastagonospora nodorum* – wheat pathosystem / Y. Gao, J. D. Faris, Z. Liu, et al. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015. Vol. 28. P. 615–625. doi: 10.1094/MPMI-12-14-0396-R.
 25. Andrie R. M., Pandelova I., Ciuffetti L. M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification // *Phytopathology.* 2007. Vol. 97. P. 694–701. doi: 10.1094/PHYTO-97-6-0694.
 26. Ubiquity of ToxA and absence of ToxB in Australian populations of *Pyrenophora tritici-repentis* / E. A. Antoni, K. Rybak, M. P. Tucker et al. // *Australasian Plant Pathology.* 2010. P. 39. P. 63–68. doi: 10.1071/AP09056.
 27. 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. doi: 10.31857/S0016675821040093.
 28. Частота гена ToxA в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России / Н. В. Мироненко, О. А. Баранова, Н. М. Коваленко и др. // *Микология и фитопатология.* 2015. Т. 49. № 5. С. 325–329.
 29. Мироненко Н. В., Коваленко Н. М., Баранова О. А. Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования ToxA и ToxB // *Вестник защиты растений.* 2019. № 1 (99).

Поступила в редакцию 23.01.2023

После доработки 16.02.2023

Принята к публикации 09.03.2023