

**ВИДОВОЙ СОСТАВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СЕПТОРИОЗОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР  
И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ-ЭФФЕКТОРОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ *PARASTAGONOSPORA* SPP.  
НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ РФ**

© 2024 г. Ю. В. Зеленева<sup>1</sup>, доктор биологических наук, И. Б. Аблова<sup>2</sup>, доктор сельскохозяйственных наук,  
член-корреспондент РАН, Л. М. Мохова<sup>2</sup>, кандидат сельскохозяйственных наук

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3  
E-mail: zelenewa@mail.ru

<sup>2</sup>Национальный центр зерна им. П. П. Лукьяненко,  
350012, Краснодар, Центральная усадьба  
E-mail: ablova@mail.ru

Исследования проводили с целью уточнения видового состава возбудителей септориоза пшеницы и характеристики популяций *Parastagonospora nodorum* и *P. pseudonodorum* на наличие генов-эффекторов *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* и *Tox267* для создания искусственных инфекционных фонов и выявления источников и доноров устойчивости к листовым пятнистостям. Работу выполняли в условиях Краснодарского края и Ленинградской области. Материалом для исследования служили собранные в 2023 г. образцы пораженных растений. Доминировал вид *Zymoseptoria tritici*, обнаруженный на всех растительных образцах (встречаемость 100 %). *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* отмечали реже. В Ленинградской области встречаемость *P. nodorum* составила 80 %, *P. pseudonodorum* – 60 %, в Краснодарском крае – 11,76 и 35,29 % соответственно. В работе впервые использовали пару праймеров *SnTox2DONRF/SnTox2DONRS* для тестирования российских популяций *Parastagonospora* spp. на наличие гена *Tox267*. Молекулярный скрининг выявил гены *ToxA* и *Tox1* у *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, а также гены *Tox3* и *Tox267* только у *P. nodorum*. Среди изученных 28 изолятов *P. nodorum* наличие гена *ToxA* обнаружено у 29 % (8 изолятов из Краснодарского края). Ген *Tox1* отмечен у 32 % (5 изолятов из Ленинградской области и 4 из Краснодарского края). Ген *Tox3* идентифицирован у 64 % (8 изолятов из Краснодарского края и 10 из Ленинградской области). Ген *Tox267* удалось обнаружить только в генотипе 8 изолятов из Краснодарского края, что составило 29 % от изученных. Среди 87 изолятов *P. pseudonodorum* в генотипе 5 % идентифицирован ген *ToxA* (4 изолята из Краснодарского края) и 23 % *Tox1* (17 изолятов из Ленинградской области и 3 из Краснодарского края).

**SPECIES COMPOSITION OF SEPTORIA BLOTCH OF CEREAL CROPS AND IDENTIFICATION  
OF EFFECTOR GENES IN POPULATIONS OF *PARASTAGONOSPORA* SPP. ON THE TERRITORY  
OF KRASNODAR AND LENINGRAD REGIONS OF THE RUSSIAN FEDERATION**

Yu. V. Zeleneva<sup>1</sup>, I. B. Ablova<sup>2</sup>, L. M. Mokhova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection,  
196608, Sankt-Peterburg, Pushkin, sh. Podbel'skogo, 3  
E-mail: zelenewa@mail.ru

<sup>2</sup>National Center of Grain named after P. P. Lukyanenko,  
350012, Krasnodar, Tsentral'naya usad'ba  
E-mail: ablova@mail.ru

The studies were conducted in Krasnodar and Leningrad Oblast s in order to clarify the species composition of wheat septoriosi s pathogens and further characterize the populations of *Parastagonospora nodorum* and *P. pseudonodorum* for the presence of effector genes *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* and *Tox267* using associated molecular markers to create artificial infection backgrounds to identify sources and donors of leaf spot resistance. The material for the study was represented by samples of affected plants collected in 2023. In the Leningrad Oblast and Krasnodar Krai the species of *Zymoseptoria tritici* demonstrated predominance. It was detected on all of the examined plant samples (100 % occurrence). *P. nodorum* and *P. pseudonodorum* were noticed less frequently in the Leningrad Oblast, the occurrence of *P. nodorum* was 80 %, while *P. pseudonodorum* – 60 %. In Krasnodar Krai, the occurrence of *P. pseudonodorum* comprised 35.29 %, while *P. nodorum* – 11.76 %. In the present study the primer pair *SnTox2DONRF/SnTox2DONRS* was applied for the first time to test Russian populations of *Parastagonospora* spp. for the presence of the *Tox267* gene. Molecular screening revealed the *ToxA* and *Tox1* genes in *P. nodorum* and *P. pseudonodorum*, while the *Tox3* and *Tox267* genes were identified only in *P. nodorum*. Of the 28 *P. nodorum* isolates studied, the presence of the *ToxA* gene was found in 29 % (8 isolates from the Krasnodar Krai). The *Tox1* gene was noted in 32 % (5 isolates from the Leningrad Oblast and 4 from the Krasnodar Krai). The *Tox3* gene was identified in 64 % of 28 (8 isolates from the Krasnodar Krai and 10 from the Leningrad Oblast). The *Tox267* gene was found only in the genotype of 8 isolates from the Krasnodar Krai, which amounted to 29 % of those studied. The study also included 87 isolates of *P. pseudonodorum*. Of these, 5 % had *ToxA* in the genotype (4 isolates from the Krasnodar Krai) and 23 % *Tox1* (17 isolates from Leningrad Oblast; 3 from the Krasnodar Krai).

**Ключевые слова:** *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*, *Tox1*, *Tox267*, *Tox3*, *ToxA*, *Z. tritici*, молекулярно-генетический анализ, ПЦР, пшеница, тритикале, фитопатогенные грибы.

**Keywords:** *P. nodorum*, *P. pseudonodorum*, *Tox1*, *Tox267*, *Tox3*, *ToxA*, *Z. tritici*, molecular genetic analysis, PCR, wheat, triticale, phytopathogenic fungi.

Потери урожая сельскохозяйственных культур, вызванные микозными инфекциями, представляют серьезную угрозу для продовольственной безопасности [1]. Септориозы – распространенные во многих странах заболевания зерновых культур, вызываемые грибами отдела *Ascomycota*, класса *Ascomycetes*, подкласса *Dothideomycetidae*.

озы – распространенные во многих странах заболевания зерновых культур, вызываемые грибами отдела *Ascomycota*, класса *Ascomycetes*, подкласса *Dothideomycetidae*.

В последние годы в регионах России в патогенном комплексе пшеницы доминирует *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvl. & Crous. Этот возбудитель, относящийся к семейству *Mycosphaerellaceae*, который также известен как *Septoria tritici* blotch (STB), вызывает септориоз листьев пшеницы, тритикале, ячменя и ржи. Преобладание *Z. tritici* может быть связано с различными факторами, включая изменение климатических условий, агротехники и сортового состава пшеницы [2, 3]. *Z. tritici* – опасный возбудитель болезни пшеницы во всех странах – производителях зерна [4, 5]. Даже при применении фунгицидов наблюдается снижение урожайности культуры на уровне 5...10 % [6].

Кроме того, на территории Российской Федерации циркулируют два вида рода *Parastagonospora*: *P. nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous и *P. pseudonodorum* (ранее известный как *P. avenae* f. sp. *triticea*) [7, 8]. Эти возбудители септориоза листьев и колоса зерновых культур [9] относятся к семейству *Phaeosphaeriaceae*.

Подобно *Z. tritici*, *P. nodorum* может паразитировать не только на пшенице, но и на других растениях. *P. pseudonodorum* обычно обнаруживают к концу вегетационного периода на листьях, стеблях и колосках пшеницы и тритикале. Все три патогена – *Z. tritici*, *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* – представляют серьезную угрозу для зерновых культур по всему миру и могут привести к значительным потерям урожая до 30...40 % [10].

*P. nodorum* и *P. pseudonodorum* – грибы, известные своей способностью производить некротрофные эффекторы (necrotrophic effectors – NEs), включая хозяин-специфичные токсины (host selective toxins – HSTs). Они играют важную роль в патогенности грибов [11, 12]. При взаимодействии с растением эти эффекторы и токсины способны вызывать некротические реакции и подавлять иммунную систему, что способствует развитию болезни.

На сегодняшний день идентифицировано девять взаимодействий токсинов *P. nodorum* с генами пшеницы: SnToxA – *Tsn1* [13], SnTox1 – *Snn1* [14], SnTox2 – *Snn2* [15], SnTox3 – *Snn3-B1* [16], SnTox3 – *Snn3-D1* [17], SnTox4 – *Snn4* [18], SnTox5 – *Snn5* [19], SnTox6 – *Snn6* [20] и SnTox7 – *Snn7* [21]. Изначально считавшиеся разными эффекторами SnTox2, SnTox6 и SnTox7 на самом деле оказались одним и тем же белком, который обозначили как SnTox267 [22]. Показано, что некротрофные эффекторы присутствуют и у *P. pseudonodorum* [23].

Защита сельскохозяйственных культур от септориозных пятнистостей осуществляется главным образом с использованием генетической устойчивости хозяина и путем применения фунгицидов [4, 5]. Однако проблема септориозных пятнистостей остается актуальной из-за способности популяций грибов противостоять мерам контроля, включая развитие устойчивости к фунгицидам, преодоление устойчивости хозяина и адаптацию к изменениям климата [6].

Цель исследований – уточнение видового состава возбудителей септориоза пшеницы на территории Краснодарского края и Ленинградской области, а также характеристика популяций *Parastagonospora nodorum* и *P. pseudonodorum* на наличие генов-эффекторов *Tox1*, *Tox3*, *ToxA* и *Tox267* с использованием связанных с ними молекулярных маркеров для составления селекционных программ и защитных мероприятий сельскохозяйственных растений.

**Методика.** Образцы пораженных растений были собраны в 2023 г. на территории Краснодарского края и Ленинградской области на полях по диагонали через равные расстояния. Они представляли собой листья пшеницы и тритикале с явными симптомами септориоза.

Табл. 1. Происхождение инфекционного материала

| Название инфекционного образца | Происхождение инфекционного образца/ растение-хозяин, координаты размещения поля                                                                                         |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 78-23                          | Ленинградская область, Приозерский район / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Галина, 60°39'50.7", 30°5'3.81"                                     |
| 79-23                          | Ленинградская область, Гатчинский район / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Галина, 59°27'42.44", 30°12'6.21"                                    |
| 80-23                          | Ленинградская область, Гатчинский район / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Галина, 59°29'56.43", 30°22'4.65"                                    |
| 81-23                          | Ленинградская область, Гатчинский район / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Московская 56, 59°25'26.29", 30°1'58.05"                             |
| 82-23                          | г. Санкт-Петербург, Пушкинский район / озимая тритикале ( <i>×Triticosecale</i> Wittm. ex A. Camus) сорт Тихон, 59°44'36.37", 30°29'54.78"                               |
| 83-23                          | Краснодарский край, Павловский район / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Гром, 45°58'42.74", 39°37'33.27"                                        |
| 84-23                          | Краснодарский край, Павловский район / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Юка, 45°58'42.74", 39°37'33.27"                                         |
| 85-23                          | Краснодарский край, Кореновский район / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Гром, 45°26'49.61", 39°29'36.46"                                       |
| 86-23                          | Краснодарский край, станица Ленинградская / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Безостая 100, 46°19'5.55", 39°25'45.88"                            |
| 87-23                          | Краснодарский край, станица Ленинградская / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Москвич, 46°19'5.55", 39°25'45.88"                                 |
| 88-23                          | Краснодарский край, станица Ленинградская / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Гомер, 46°19'5.55", 39°25'45.88"                                   |
| 89-23                          | Краснодарский край, станица Ленинградская / озимая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) сорт Еланчик, 46°19'5.55", 39°25'45.88"                                 |
| 90-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар Центральная усадьба КНИИСХ / озимая тритикале ( <i>×Triticosecale</i> Wittm. ex A. Camus) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74" |
| 91-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / озимая твердая пшеница ( <i>Triticum durum</i> Desf.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                   |
| 92-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / яровая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                    |
| 93-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / яровая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                    |
| 94-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / яровая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                    |
| 95-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / яровая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                    |
| 96-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / яровая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                    |
| 97-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / яровая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                    |
| 98-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / яровая мягкая пшеница ( <i>Triticum aestivum</i> L.) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                    |
| 99-23                          | Краснодарский край, г. Краснодар / пшеница полоникум ( <i>Triticum polonicum</i> ) селекционная линия, 45°3'33.23", 38°54'35.74"                                         |

В 2023 г. для Ленинградской области были характерны экстремально жаркие погодные условия и недостаточное количество осадков, которые отмечали в течение всего вегетационного сезона зерновых культур (с 3 декады мая до 1 декады августа). Это привело к слабому развитию

Табл. 2. Список праймеров для ПЦР

| Локус  | Праймер       | Последовательность 5'-3'   | Литературный источник | Размер ампликона, п.н. |
|--------|---------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|
| Tox1   | SnTox1cF      | ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT     | [20]                  | 500                    |
|        | SnTox1cR      | TGTGGCAGCTAACTAGCAC        |                       |                        |
| Tox3   | SnTox3cF      | CTCGAACCACGTGGACCCGGA      | [27]                  | 600                    |
|        | SnTox3cR      | CTCCCTCGTGGGATTGCCCATATG   |                       |                        |
| ToxA   | TA51F         | GCGTTCTATCCTCGTACTTC       | [27]                  | 573                    |
|        | TA52R         | GCATTCTCCAATTTTCACG        |                       |                        |
| Tox267 | SnTox2_DONR_F | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG | [22]                  | 2000                   |
|        | SnTox2_DON_RS | GCTCATAATCCTAGTAAGGGATG    |                       |                        |
|        |               | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG |                       |                        |
|        |               | GGTCTTAGATACCGTGCCATGAGA   |                       |                        |

не только септориозных пятнистостей, но и всего патогенного комплекса, а также к замедленному физиологическому развитию самих зерновых культур.

В Краснодарском крае с февраля по июнь количество осадков превосходило среднегодовую норму на 23...58 %. Наблюдали затяжные дожди, часто ливневого характера, что существенно обострило фитосанитарную обстановку в посевах пшеницы и тритикале по пятнистостям листьев. Массовое распространение и высокая вредоносность септориоза были обусловлены оптимальным температурным режимом на фоне избытка осадков.

Материал собирали в фазе молочно-восковой спелости растений в соответствии со шкалой Задовса (75...85). Листья с типичными признаками септориоза гербаризовали (табл. 1).

После сбора, образцы листьев отправляли в лабораторию для определения видового состава возбудителей септориозных пятнистостей [24]. Грибы выделяли в чистую культуру на картофельно-глюкозный агар (КГА) и описывали их морфологические и культуральные свойства [25].

Определение видового состава возбудителей септориозных пятнистостей проводили в лабораторных условиях. Результаты диагностики видовой принадлежности возбудителя болезни к виду *P. nodorum* или *P. pseudonodorum* подтверждали методом секвенирования с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология», ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии». Всего проанализировано 115 моноконидиальных изолятов рода *Parastagonospora*.

Геномную ДНК грибов выделяли из чистой культуры моноконидиальных изолятов, полученной на картофельно-глюкозном агаре, стандартным СТАВ-методом [26]. Амплификацию геномной ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси (2 мкл геномной ДНК (25 нг), 1 мкл каждого праймера (10 пМ/мкл, «Евроген», Россия), 0,5 мкл смеси dNTPs mix (10 мМ, водный раствор dCTP, dGTP, dTTP и dATP, TransGen, Китай), 0,55 мкл MgCl<sub>2</sub> (100 мМ), 0,5 мкл BioTaq ДНК полимеразы (5U, 5 ед/мкл, «Диалат Лтд.», Россия), 2,5 мкл 10×ПЦР-буфера, 17 мкл ddH<sub>2</sub>O).

Амплифицированные фрагменты разделяли методом электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле, в ТВЕ буфере (pH 8,2), гель окрашивали бромистым этидием. Для оценки размера фрагментов использовали два маркера молекулярного веса: Gene Ruler 100bp (Thermo Fisher Scientific) и Step Long (Биолабмикс).

Скрининг изолятов рода *Parastagonospora* на наличие генов-эффекторов *ToxA*, *Tox1*, *Tox3*, *Tox267* (табл. 2) осуществляли методом полимеразной цепной реакции. Всего проанализировано 115 проб ДНК.

**Результаты и обсуждение.** Вид *Z. tritici* обнаружен на всех изученных образцах, его присутствие в составе патогенного комплекса септориозных пятнистостей

составило 100 %. Доминирование *Z. tritici* может быть обусловлено теплой погодой в мае и апреле, которая способствует распространению патогена. Более прохладные дни в этот период, напротив, стимулируют развитие *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* [28].

*P. nodorum* и *P. pseudonodorum* встречались реже, чем *Z. tritici*. В среднем в Ленинградской области *P. nodorum* занимал второе место в патогенном комплексе септориозных пятнистостей зерновых культур. Его встречаемость составила 80 %. *P. pseudonodorum* был обнаружен в 60 % случаев.

На инфекционных образцах из Краснодарского края *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* регистрировали значительно реже, чем на растительном материале из Ленинградской области. Второе место после *Z. tritici* занимал *P. pseudonodorum*, частота встречаемости которого составила 35,29 %. У *P. nodorum* величина этого показателя находилась на уровне 11,76 %.

Изоляты *Z. tritici* на КГА в начальной стадии развития характеризовались колониями розового или желтого цвета, внешне напоминающими бактериальные. Позже колонии становились мицелиальными, дрожжеподобными или смешанными, с различной окраской. Преобладали дрожжеподобные колонии с морфотипами I(b) – черные гофрированные или I(c) – черные гофрированные с розовой каймой. Колонии *Z. tritici* имели небольшие размеры (около 15 мм), характеризовались высокой спорующей активностью (>50 млн спор/см<sup>2</sup>).

Табл. 3. Изоляты *Parastagonospora* spp. с идентифицированными генами-эффекторами

| Регистрационный номер                        | Число изолятов | Происхождение         | ToxA | Tox1 | Tox3 | Tox267 |
|----------------------------------------------|----------------|-----------------------|------|------|------|--------|
| <b><i>Parastagonospora nodorum</i></b>       |                |                       |      |      |      |        |
| 79-23-1...10- <i>P.n.</i>                    | 10             | Ленинградская область | -    | -    | +    | -      |
| 82-23-1...5- <i>P.n.</i>                     | 10             | Краснодарский край    | -    | +    | -    | -      |
| 82-23-6...10- <i>P.n.</i>                    |                |                       | -    | -    | -    | -      |
| 86-23-1- <i>P.n.</i>                         | 8              |                       | +    | -    | +    | +      |
| 86-23-2- <i>P.n.</i>                         |                |                       | -    | +    | -    | -      |
| 86-23-3...5- <i>P.n.</i>                     |                |                       | -    | -    | -    | -      |
| 86-23-6...8- <i>P.n.</i>                     |                |                       | -    | +    | -    | -      |
| Vcero                                        | 28             |                       | 8    | 9    | 18   | 8      |
| <b><i>Parastagonospora pseudonodorum</i></b> |                |                       |      |      |      |        |
| 78-23-1...12- <i>P.ps.</i>                   | 12             | Ленинградская область | -    | +    | -    | -      |
| 79-23-1- <i>P.ps.</i>                        | 6              | Краснодарский край    | -    | -    | -    | -      |
| 79-23-2...6- <i>P.ps.</i>                    |                |                       | -    | +    | -    | -      |
| 90-23-1- <i>P.ps.</i>                        | 15             |                       | -    | -    | -    | -      |
| 90-23-2- <i>P.ps.</i>                        |                |                       | -    | +    | -    | -      |
| 90-23-3- <i>P.ps.</i>                        |                |                       | -    | -    | -    | -      |
| 90-23-4...5- <i>P.ps.</i>                    |                |                       | -    | +    | -    | -      |
| 90-23-6...15- <i>P.ps.</i>                   |                |                       | -    | -    | -    | -      |
| 93-23-1...24- <i>P.ps.</i>                   | 24             |                       | -    | -    | -    | -      |
| 94-23-1...9- <i>P.ps.</i>                    | 9              |                       | -    | -    | -    | -      |
| 95-23-1- <i>P.ps.</i>                        | 6              |                       | +    | -    | -    | -      |
| 95-23-2...3- <i>P.ps.</i>                    |                |                       | -    | -    | -    | -      |
| 95-23-4...6- <i>P.ps.</i>                    |                |                       | +    | -    | -    | -      |
| 96-23-1...9- <i>P.ps.</i>                    | 9              |                       | -    | -    | -    | -      |
| 97-23-1...6- <i>P.ps.</i>                    | 6              |                       | -    | -    | -    | -      |
| Vcero                                        | 87             |                       | 4    | 20   | 0    | 0      |

+ – наличие гена, – – отсутствие гена.

Колонии *P. nodorum* отличались хорошо развитым бархатистым мицелием и большим количеством пикнид. Они имели светло-бурую центральную часть и темные края, что характеризует их как колонии смешанного типа.

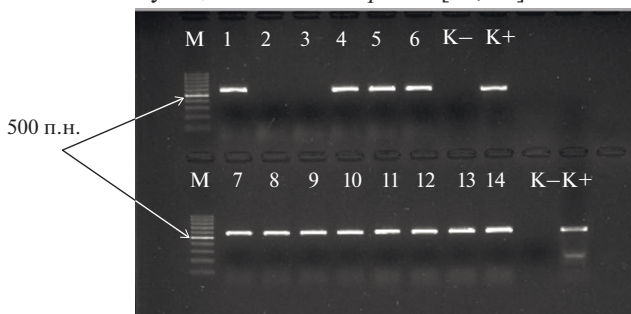
Изоляты *P. pseudonodorum* из Ленинградской области образовывали однородные колонии серого или оливкового цвета с фенотипом д(5). Мицелий в центре колоний скудный и плотный, а количество пикнид значительно.

Колонии *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* характеризовались высокой споруляционной активностью ( $>10$  млн спор/см<sup>2</sup>). Их размер на КГА достигал 80...90 мм в диаметре.

Молекулярный скрининг изучаемого материала (115 ДНК-проб, полученных от 28 моноконидиальных изолятов вида *P. nodorum*, 87 *P. pseudonodorum*) позволил выявить как единичные гены, кодирующие NEs, так и их сочетания в одном генотипе (табл. 3, рис. 1...4).

Ген *ToxA* обнаружен у моноконидиальных изолятов из Краснодарского края *P. nodorum* (86-23-1...8-*P.n.*), выделенных из листьев озимой мягкой пшеницы сорта Безостая 100 и *P. pseudonodorum* (95-23-1-*P.ps.*, 95-24-4...6-*P.ps.*) из инфекционного материала яровой мягкой пшеницы (см. рис. 1).

Ранее при анализе популяций из Тамбовской, Саратовской, Ленинградской областей и Краснодарского края было установлено, что ген *ToxA* преимущественно присутствует в геноме *P. nodorum*, реже – *P. pseudonodorum* [7, 29, 30]. Ген *ToxA* также широко распространен в российских популяциях *P. tritici-repentis* [30, 31].

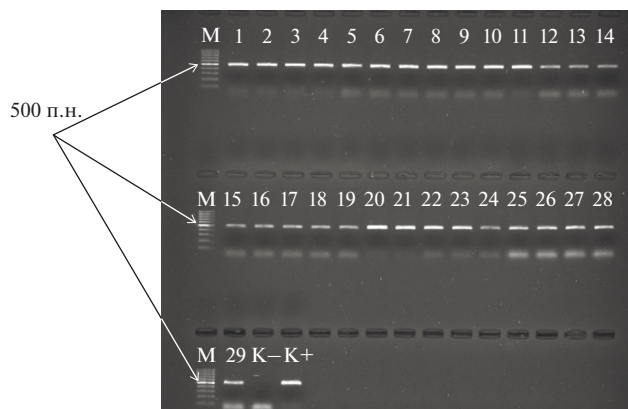


**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов амплификации, полученная с использованием праймеров TA51 F/TA52 R, специфичных для гена *ToxA* в изолятах *Parastagonospora* spp. из краснодарской популяции. Размер ампликона 573 п.н. М – ДНК маркер Gene Ruler 100bp (Thermo Fisher Scientific). Номера индексов соответствуют следующим изолятам: 1...6 – 95-23-1...6-*P.ps.*; 7...14 – 86-23-1...8-*P.n.*; K+ – 29-21-*P.n.*; K- – 26-21-*P.n.*

В результате молекулярного скрининга ген *Tox1* (наличие бэнда длиной 500 п.н. на электрофореграмме) был выявлен среди изолятов, выделенных из двух образцов озимой мягкой пшеницы в Ленинградской области (78-23, 79-23), одного сорта - в Краснодарском крае (86-23), двух образцов озимой тритикале (82-23 в Ленинградской области и 90-23 в Краснодарском крае) (см. рис. 2). Наличие гена выявлено у изолятов *P. nodorum* (82-23-1...5-*P.n.*), выделенных из образцов озимой тритикале в Пушкинском районе С.-Петербурга и изолятов (86-23-2-*P.n.*, 86-23-6...8-*P.n.*) с озимой мягкой пшеницы сорта Безостая 100 из Краснодарского края. Наличие гена *Tox1* отмечено у моноконидиальных изолятов *P. pseudonodorum*, выделенных из инфицированного материала озимой мягкой пшеницы сорта Галина (78-23-1...12-*P.ps.*) из Приозерского района Ленинградской области и с этого же сорта пшеницы (79-23-2...6-*P.ps.*) из Гатчинского района Ленинградской

области, а также из образцов озимой тритикале из Краснодарского края (90-23-2-*P.ps.*, 90-23-4...5-*P.ps.*).

Ген *Tox1* также обнаруживался с достаточно высокой частотой в популяциях *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* из Тамбовской и Саратовской областей, что подтверждено предыдущими исследованиями [7, 29, 30]. Ген *Tox1* играет важную роль в патогенности возбудителей и влияет на развитие симптомов болезни у растений [14, 32].

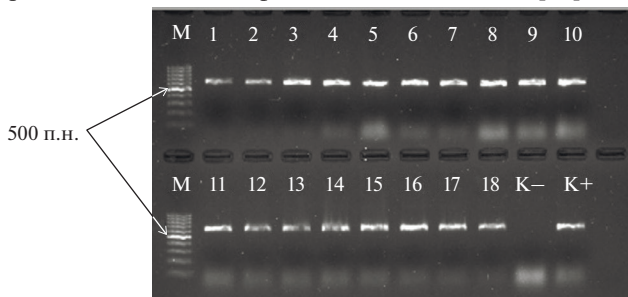


**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации, полученная с помощью праймеров SnTox1cF/SnTox1cR, специфичных для гена *Tox1*, в изолятах *Parastagonospora* spp. из краснодарской и ленинградской популяций. Размер ампликона 500 п.н. М – ДНК маркер Gene Ruler 100bp (Thermo Fisher Scientific). Номера индексов соответствуют следующим изолятам: 1...12 – 78-23-1...12-*P.ps.*; 13...17 – 79-23-2...6-*P.ps.*; 18...22 – 82-23-1...5-*P.n.*; 23 – 90-23-2-*P.ps.*; 24...25 – 90-23-4...5-*P.ps.*; 26 – 86-23-2-*P.n.*; 27...29 – 86-23-6...8-*P.n.*; K+ – 32-21-*P.n.*; K- – 29-21-*P.n.*

Ген *Tox3* (наличие бэнда длиной 600 п.н. на электрофореграмме) выявлен среди изолятов *P. nodorum*, выделенных из сорта озимой мягкой пшеницы Галина из Гатчинского района Ленинградской области (79-23-1...10-*P.n.*), а также из озимой мягкой пшеницы Безостая 100 из Краснодарского края (86-23-1...8-*P.n.*) (см. рис. 3).

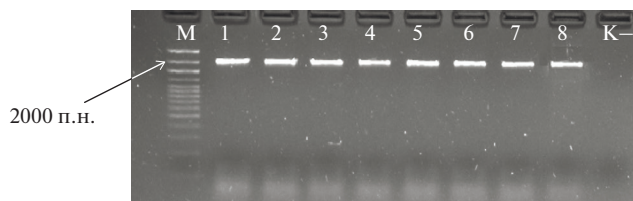
Ранее было показано, что ген *Tox3* присутствует в популяциях *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* на территории России [29, 30, 33]. Однако в 18 изолятах *P. pseudonodorum* из Ленинградской области и 69 из Краснодарского края он не выявлен (табл. 3).

В нашей работе впервые использованы праймеры SnTox2\_DONR\_F/SnTox2\_DON\_RS, которые были разработаны для идентификации гена *SnTox267* [22]. Ха-



**Рис. 3.** Электрофореграмма продуктов амплификации, полученная с помощью праймеров SnTox3cF/SnTox3cR, специфичных для гена *Tox3* в изолятах *Parastagonospora nodorum* из краснодарской и ленинградской популяций. Размер ампликона 600 п.н. М – ДНК маркер Gene Ruler 100bp (Thermo Fisher Scientific). Номера индексов соответствуют следующим изолятам: 1...10 – 79-23-1...10-*P.n.*, 11...18 – 86-23-1...8-*P.n.* K+ – 29-21-*P.n.*; K- – 26-21-*P.n.*

рактерные продукты амплификации размером 2000 п. н. отмечены у восьми изолятов (86-23-1...8-*P.n.*), выделенных из озимой мягкой пшеницы сорта Безостая 100 из Краснодарского края (см. рис. 4). У других образцов наблюдали стабильный отрицательный результат. В литературе отмечают, что этот ген имеет широкую представленность в европейских популяциях *P. nodorum* [22].



**Рис. 4.** Электрофореграмма продуктов амплификации, полученная с помощью праймеров SnTox2 DONR F/ SnTox2 DON RS, специфичных для гена Tox267 в изолятах *Parastagonospora nodorum* из краснодарской популяции. Размер ампликона 2000 п. н. М – ДНК маркер Step Long (Биолабмикс). Номера индексов соответствуют следующим изолятам: 1...8 – 86-23-1...8-*P.n.*

Изучение видового состава возбудителей септориозов зерновых культур – ключевой этап для разработки научно обоснованных селекционных программ. Анализ фитопатогенного комплекса и выявление экономически важных и потенциально опасных видов необходимо проводить ежегодно. Это позволяет прогнозировать возможные потери урожая, а также разрабатывать эффективные стратегии борьбы с инфекционными заболеваниями растений.

В системах «*P. nodorum* (*P. pseudonodorum*) – пшеница» наблюдают взаимодействие продуктов генов вирулентности патогена (*SnTox*) и генов восприимчивости растения-хозяина (*Snn*) [34]. Доминирование восприимчивости выявлено не только для системы «*P. nodorum* (*P. pseudonodorum*) – пшеница», но и для таких патогенов, как *Cochliobolus heterostrophus*, *Cochliobolus victoriae* и *Periconia circinata* [35]. В связи с изложенным необходимо изучать динамику распространения генов *SnTox* в популяциях *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, а также оценивать селекционный материал на наличие генов устойчивости к некротрофным эффекторам. Эта информация может быть использована при селекции устойчивых сортов пшеницы и других культур, способных сопротивляться NEs и снижать риск развития септориозов.

Необходимо расширять изучение токсинов, образуемых грибами *Parastagonospora*, что поможет определить их роль в патогенности и адаптации к ним культурных растений.

**Выводы.** В условиях 2023 г. на территории Ленинградской области и Краснодарского края среди возбудителей септориозов на всех исследованных образцах был обнаружен *Z. tritici*. Реже идентифицировали *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*. На растительном материале из Ленинградской области их встречаемость среди возбудителей септориозов составляла соответственно 80 % и 60 % случаев, из Краснодарского края – 11,76 % и 35,29 %.

Путем молекулярного скрининга в генотипах изученных изолятов *P. nodorum* и *P. pseudonodorum* выявлены гены *ToxA* и *Tox1*; только у изолятов *P. nodorum* – *Tox3* и *Tox267*. Эти результаты подтверждают наличие токсинов у грибов, а также их значимость при взаимодействии с растениями-хозяевами.

Штаммы *P. nodorum* и *P. pseudonodorum*, охарактеризованные по наличию генов-эффекторов, будут использованы при создании искусственных инфекционных фонов для выявления источников и доноров устойчивости к септориозным пятнистостям.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-76-30005. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов

#### Литература.

1. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens / H. N. Fones, D. P. Bebber, T. M. Chaloner, et al. // *Nat Food*. 2020. Vol. 1. P. 332–342. doi: 10.1038/s43016-020-0075-0.
2. Plotnikova L., Sagendykova A., Pozherukova V. The Use of Genetic Material of Tall Wheatgrass to Protect Common Wheat from Septoria Blotch in Western Siberia // *Agriculture*. 2023. Vol. 13. No. 1. Article 203. URL: <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/1/203> (дата обращения: 12.03.2024). doi: 10.3390/agriculture13010203.
3. Характеристика перспективных сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.), допущенных к возделыванию в Нижневолжском регионе, по устойчивости к возбудителям пиренофорозной и темно-бурой пятнистости / Э. А. Конькова, С. В. Ляцева, Ю. В. Зеленева и др. // *Сельскохозяйственная биология*. 2023. № 58 (5). С. 852–863. doi: 10.15389/agrobiology.2023.5.852rus.
4. Petit-Houdonot Y., Lebrun M. H., Scalliet G. Understanding plant-pathogen interactions in Septoria tritici blotch infection of cereals // *Achieving durable disease resistance in cereals*. London, UK: Burleigh Dodds Science Publishing, 2021. P. 263–302. doi: 10.19103/AS.2021.0092.10.
5. Temporal Changes in Sensitivity of Zymoseptoria tritici Field Populations to Different Fungicidal Modes of Action / T. Birr, M. Hasler, J.-A. Verreet, et al. // *Agriculture*. 2021. Vol. 11. No. 3. Article 269. URL: <https://www.mdpi.com/2077-0472/11/3/269> (дата обращения: 12.03.2024). doi: 10.3390/agriculture11030269.
6. Fones H., Gurr S. The impact of Septoria tritici blotch disease on wheat: An EU perspective // *Fungal Genet Biol*. 2015. Vol. 79. P. 3–7. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.004.
7. 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. № 56 (6). С. 441–447. doi: 10.31857/S0026364822060113.
8. Hyperspectral Non-Imaging Measurements and Perceptron Neural Network for Pre-Harvesting Assessment of Damage Degree Caused by Septoria/Stagonospora Blotch Diseases of Wheat / S. V. Zhelezova, E. V. Pakholkova, V. E. Veller, et al. // *Agronomy*. 2023. Vol. 13. No. 4. Article 1045. URL: <https://www.mdpi.com/2073-4395/13/4/1045> (дата обращения: 12.03.2024). doi: 10.3390/agronomy13041045.
9. 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.
10. Understanding yield loss and pathogen biology to improve disease management: Septoria nodorum blotch –

- a case study in wheat / A. Ficke, C. Cowger, G. Bergstrom, et al. // *Plant Disease*. 2018. Vol. 102. No. 4. P. 696–707. doi: 10.1094/PDIS-09-17-1375-FE.
11. Genetics of resistance to *Septoria nodorum* blotch in wheat / A. R. P. Haugrud, Z. Zhang, T. L. Friesen, et al. // *Theoretical and Applied Genetics*. 2022. Vol. 135. No. 11. P. 3685–3707. doi: 10.1007/s00122-022-04036-9.
12. The Necrotrophic Pathogen *Parastagonospora nodorum* Is a Master Manipulator of Wheat Defense / G. K. Kariyawasam, A. C. Nelson, S. J. Williams, et al. // *Mol Plant Microbe Interact*. 2023. Vol. 36. No. 12. P. 764–773. doi: 10.1094/MPMI-05-23-0067-IRW.
13. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens / J. D. Faris, Z. Zhang, H. Lu, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2010. Vol. 107. No. 30. P. 13544–13549. doi: 10.1073/pnas.1004090107.
14. The hijacking of a receptor kinase-driven pathway by a wheat fungal pathogen leads to disease / G. Shi, Z. Zhang, T. L. Friesen, et al. // *Science Advances*. 2016. Vol. 2. No. 10. Article e1600822. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1600822> (дата обращения: 12.03.2024). doi: 10.1126/sciadv.1600822.
15. Friesen T. L., Meinhardt S. W., Faris J. D. The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner // *The Plant Journal*. 2007. Vol. 51. No. 4. P. 681–692. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03166.x.
16. Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene / T. L. Friesen, Z. Zhang, P. S. Solomon, et al. // *Plant physiology*. 2008. Vol. 146. No. 2. P. 682–693. doi: 10.1104/pp.107.108761.
17. A protein kinase-major sperm protein gene hijacked by a necrotrophic fungal pathogen triggers disease susceptibility in wheat / Z. Zhang, K. L. D. Running, S. Seneviratne, et al. // *The Plant Journal*. 2021. Vol. 106. No. 3. P. 720–732. doi: 10.1111/tjp.15194.
18. Identification and characterization of a novel host-toxin interaction in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem / N. S. Abeysekara, T. L. Friesen, B. Keller, et al. // *Theoretical and Applied Genetics*. 2009. Vol. 120. No. 1. P. 117–126. doi: 10.1007/s00122-009-1163-6.
19. SnTox5-Snn5: a novel *Stagonospora nodorum* effector-wheat gene interaction and its relationship with the SnToxA-Tsn1 and SnTox3-Snn3-B1 interactions / T. L. Friesen, C. Chu, S. S. Xu, et al. // *Molecular Plant Pathology*. 2012. Vol. 13. No. 9. P. 1101–1109. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00819.x.
20. Identification and characterization of the SnTox6-Snn6 interaction in the *Parastagonospora nodorum*-wheat pathosystem / Y. Gao, J. D. Faris, Z. Liu, et al. // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2015. Vol. 28. No. 5. P. 615–625. doi: 10.1094/MPMI-12-14-0396-R.
21. The wheat Snn7 gene confers susceptibility on recognition of the *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector SnTox7 / G. Shi, T. L. Friesen, J. Saini, et al. // *The Plant Genome-US*. 2015. Vol. 8. No. 2. URL: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3835/plantgenome2015.02.0007> (дата обращения: 12.03.2024). doi: 10.3835/plantgenome2015.02.0007.
22. A triple threat: the *Parastagonospora nodorum* SnTox267 effector exploits three distinct host genetic factors to cause disease in wheat / J. K. Richards, G. K. Kariyawasam, S. Seneviratne, et al. // *New Phytologist*. 2022. Vol. 233. No. 1. P. 427–442. doi: 10.1111/nph.17601.
23. Friesen T. L., Faris J. D. Characterization of effector-target interactions in necrotrophic pathosystems reveals trends and variation in host manipulation // *Annual Review of Phytopathology*. 2021. Vol. 59. P. 77–98. doi: 10.1146/annurev-phyto-120320-012807.
24. Методы оценки устойчивости селекционного материала и сортов пшеницы к септориозу: метод. указ. / Г. В. Пыжикова, А. А. Санина, Л. М. Супрун и др. М.: ВНИИ фитопатологии, 1989. 43 с.
25. Коломиец Т. М., Пахолкова Е. В., Дубовая Л. П. Отбор исходного материала для создания сортов пшеницы с длительной устойчивостью к септориозу (рекомендации). М.: Печатный город, 2017. 56 с.
26. Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. Vol. 12. No. 1. P. 13–15.
27. 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.
28. Zeleneva I. V., Sudnikova V. P., Afanasenko O. S. Influence of Agroclimatic Conditions, Life Form, and Host Species on the Species Complex of Wheat *Septoria* Pathogens // *Biology Bulletin*. 2021. Vol. 48. No. 10. P. 1806–1812. doi: 10.1134/S1062359021100277.
29. Зеленева Ю. В., Конькова Э. А. Устойчивость сортов мягкой пшеницы, возделываемых на территории Саратовской области, к возбудителям септориозных пятнистостей // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023. № 27 (6). С. 582–590. doi: 10.18699/VJGB-23-70.
30. Kovalenko N. M., Zeleneva Yu. V., Sudnikova V. P. Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis*, *Parastagonospora nodorum*, and *Parastagonospora pseudonodorum* in the Tambov Oblast for the Presence of Effector Genes // *Russian Agricultural Sciences*. 2023. Vol. 49. No. 3. P. 285–291. doi: 10.3103/S1068367423030114.
31. 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. № 49 (5). С. 325–329.
32. SnTox1, a *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector, is a dual-function protein that facilitates infection while protecting from wheat-produced chitinases / Z. Liu, Y. Gao, Y. M. Kim, et al. // *New Phytologist*. 2016. Vol. 211. No. 3. P. 1052–1064. doi: 10.1111/nph.13959.
33. Молекулярная идентификация, гены-эффекторы и вирулентность изолятов гриба *Parastagonospora nodorum* из Алтайского края (Россия) / Ю. В. Зеленева, Ф. Б. Ганнибал, И. А. Казарцев и др. // *Микология и фитопатология*. 2023. № 57(5). С. 362–371. doi: 10.31857/S0026364823050124.
34. The discovery of the virulence gene ToxA in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana* / M. C. McDonald, D. Ahren, S. Simpfendorfer, et al. // *Molecular Plant Pathology*. 2018. Vol. 19. No. 2. P. 432–439. doi: 10.1111/mpp.12535.
35. ToxA-Tsn1 interaction for spot blotch susceptibility in Indian wheat: an example of inverse gene-for-gene relationship / S. Navathe, P. S. Yadav, R. Chand, et al. // *Plant Disease*. 2020. Vol. 104. No. 1. P. 71–81. doi: 10.1094/PDIS-05-19-1066-RE.

Поступила в редакцию 14.03.2024  
После доработки 13.05.2024  
Принята к публикации 28.05.2024