

ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНА *toxb2* В ШТАММАХ *Pyrenophora tritici-repentis* ИЗ РОССИИ И КАЗАХСТАНА

© 2025 г. Н. В. Мироненко¹*, А. В. Орина¹, Н. М. Коваленко¹

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

*e-mail: nina2601mir@mail.ru

Поступила в редакцию 05.09.2024 г.

После доработки 30.09.2024 г.

Принята к публикации 03.10.2024 г.

Для 18 штаммов аскомицетного гриба *Pyrenophora tritici-repentis* — возбудителя желтой пятнистости пшеницы — была определена расовая принадлежность и идентифицированы *toxb*-гены. Анализируемые штаммы были отнесены преимущественно к расе 4, непатогенной для мягкой пшеницы. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена *toxb* одного штамма *P. tritici-repentis* из Казахстана и пяти штаммов гриба из Татарстана с референсными последовательностями генов *ToxB1*, *toxb2*, *ToxB4*, *toxb12* и *toxb14* позволило точно идентифицировать исследуемые гены как *toxb2*. Это первое обнаружение гена *toxb2* в популяциях *P. tritici-repentis* из России и Казахстана. Также были продемонстрированы различия между последовательностями *ToxB1* и *toxb2* в области ORF: 27 нуклеотидных замен и одна делеция 3 пн у *ToxB1*. В нетранслируемой 5'UTR-области всех полученных последовательностей *toxb2*, как и в последовательностях *ToxB1*, между ТАТА-боксом и интроном выявлено присутствие четырех микросателлитов размером 25 пн. У исследуемых штаммов в 5'UTR-области *toxb2* перед интроном обнаружена инсерция 167 пн, такая же, как у референсной последовательности гена *toxb2* штамма *P. tritici-repentis* SD20, которая отсутствует во всех известных последовательностях *ToxB1*, и, вероятно, влияет на функциональность гена. Накопление информации о структуре гена *toxb2* имеет значение для понимания эволюции *ToxB/toxb*-генов гриба *P. tritici-repentis*.

Ключевые слова: *Pyrenophora tritici-repentis*, *toxb2*, *ToxB1*, некодирующая область гена, микросателлиты, инсерция.

DOI: 10.31857/S0016675825020098 **EDN:** UVAHML

Pyrenophora tritici-repentis (Died.) Drechsler — аскомицетный гриб, возбудитель желтой пятнистости пшеницы. На сегодняшний день известны три некротрофных эффектора гриба *P. tritici-repentis* (NE), которые считают факторами вирулентности: некроз-индуцирующий токсин Ptr ToxA и два хлороз-индуцирующих токсина — Ptr ToxB и Ptr ToxC [1, 2]. Первые два токсина имеют белковую природу и кодируются генами *ToxA* и *ToxB*, тогда как структура хлороз-индуцирующего токсина Ptr ToxC остается неизвестной и идентификация гена (ов), кодирующего этот эффектор, до сих пор продолжается [3]. По способности изолятов *P. tritici-repentis* вызывать симптомы некроза или хлороза на листьях сортов/линий пшеницы (Glenlea, 6B662, 6B365), дифференцирующих присутствие трех известных NE гриба, различают восемь рас патогена, среди которых ген *ToxA* встречается в расах 1, 2, 7 и 8, а ген *ToxB* — в расах 5, 6, 7

и 8, тогда как раса 4 включает непатогенные штаммы гриба, не имеющие ни одного из известных NE [1].

Гены *ToxA* и *ToxB* известны более 20 лет, изучен их аллельный полиморфизм, распространение в популяциях патогена [2, 4, 5]. Ген *ToxA* изучался более интенсивно благодаря его высокой встречаемости в изолятах патогена, обитающих на пшенице в Северной Америке и Австралии [4]. В отличие от гена *ToxA*, для *ToxB* характерна многокопийность, его гомологи — аллельные варианты встречаются в разных хромосомах генома *P. tritici-repentis* [6, 7]. Среди них наиболее известен ген *toxb*, который имеет сходство 87% с *ToxB*, экспрессируется в мицелии и конидиях гриба, однако не кодирует NE и встречается в непатогенных штаммах *P. tritici-repentis* расы 4 [7–9]. Согласно новой номенклатуре, выявлено 20 гаплотипов генов *ToxB/toxb*, из них

структура гена изучена у девяти гаплотипов у гриба *P. tritici-repentis*, шести — у *P. bromi*, трех — у *P. seminiperda*, двух — у *P. teres* [5].

Штаммы *P. tritici-repentis*, которые имеют *ToxA* в геноме, распространены по всему миру [1]. В то же время распространение штаммов гриба, несущих ген *ToxB*, ограничено отдельными регионами: США [10], Канада [8], Сирия и Азербайджан [11], а также Алжир [12], Марокко [13], Тунис [14], Австралия и Новая Зеландия [15]. В других регионах мира *ToxB* либо полностью отсутствует в штаммах *P. tritici-repentis*, либо встречается крайне редко. В то же время гомолог гена *ToxB* — ген *toxb* выявляли в штаммах *P. tritici-repentis* рас 3 и 4 из США [16, 17].

Несмотря на отсутствие гена *ToxB* в российских популяциях *P. tritici-repentis*, сохраняется актуальность мониторинга его наличия/отсутствия в популяциях патогена из-за потенциальной возможности заноса штаммов с этим геном из других стран, что неизбежно приведет к повышению вредоносности желтой пятнистости пшеницы в России. С другой стороны, в последнее время возрос интерес к штаммам *P. tritici-repentis* расы 4, которые непатогенны для мягкой пшеницы, однако способны поражать сорта твердой пшеницы и при этом обладают геном *toxb* [16]. К сожалению, данные о роли *toxb* в вирулентности изолятов расы 4 к твердой пшенице отсутствуют.

Ранее исследование 179 штаммов *P. tritici-repentis* из Казахстана и России с использованием системы геноспецифичных праймеров [18] показало отсутствие гена *ToxB* в популяциях из этих стран, однако у 18 штаммов был идентифицирован ген *toxb* [19]. Оказалось, что ДНК этих штаммов также амплифицировалась с другими праймерами, специфичными для *ToxB* [7]. При этом продукт амплификации оказался значительно больше ожидаемого, что поставило под сомнение правильность идентификации гена. Таким образом, цель настоящего исследования — корректная идентификация гена *ToxB* в российских и казахстанских штаммах *P. tritici-repentis*.

Материалом исследования служили 18 моноконидиальных штаммов *P. tritici-repentis* из Казахстана (семь штаммов — Костанайская обл., 2022; один — Алматинская обл., 2020) и из России (десять штаммов — Татарстан, 2022). Культуры грибов выращивали на среде V4, приготовленной на основе смеси соков четырех овощей [20], при 22°C в течение 7–10 сут. Расовую принадлежность штаммов определяли по их способности индуцировать некрозы и хлорозы на листьях пшеницы сорта Glenlea и линий 6В662 и 6В365, согласно разработанной ранее методике [6].

Выделение ДНК из мицелия грибов проводили стандартным СТАВ-методом. Амплификацию

фрагмента гена *toxb* с ДНК грибов проводили с помощью ПЦР с праймерами TB10/TB12 по протоколу авторов [7]. Наличие специфичного фрагмента и оценку его размера проводили в 1.7%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Фрагменты, размер которых оказался более 646 пн, вырезали из геля, а затем элюировали и очищали. Секвенирование нуклеотидной последовательности фрагмента гена *toxb* штамма Kaz20-10 *P. tritici-repentis* из Казахстана и пяти штаммов Tat1-Tat5 из России проводили методом Сэнгера (ООО “Бигль”, Санкт-Петербург). Полученные нуклеотидные последовательности были размещены в базе данных GenBank NCBI (PP764852–PP764857) и проверены на сходство с ранее депонированными.

В результате фитопатологического теста из 18 исследуемых штаммов *P. tritici-repentis* 11 были отнесены к непатогенной расе 4, четыре — к расе 5, продуцирующей эффектор Ptr ToxB, еще два — к расе 2, продуцирующей эффектор Ptr ToxA, но не Ptr ToxB.

ДНК этих штаммов амплифицировалась с праймерами, специфичными для *ToxB*, но продукт амплификации имел значительно больший размер — около 1200 пн вместо ожидаемого 646 пн. Нуклеотидные последовательности этих фрагментов всех шести штаммов *P. tritici-repentis* оказались идентичными как в кодирующей, так и в регуляторной области гена. Их выравнивание с референсными последовательностями генов *ToxB1*, *toxb2*, *ToxB4*, *toxb12* и *toxb14* разных штаммов *P. tritici-repentis* [5] выявило существенные различия между гомологами. Последовательности исследуемых генов оказались на 100% идентичны в кодирующей области (ORF, 267 пн) последовательностям гена *toxb2* шести штаммов гриба из двух регионов США (AY083456, MN864562–MN864566). В то же время последовательности фрагмента гена *ToxB1* у 11 штаммов *P. tritici-repentis* из Алжира, Греции, Туниса и США (AF483831, AY242115, AY242133, AY2421160, OP418011, AY007692, AY425480, MZ130646–MZ130648) в кодирующей области имели сходство с последовательностями *toxb2* и исследуемых генов только на 88.7%.

Различия между последовательностями ORF генов *ToxB1* и *toxb2* были обусловлены 27 нуклеотидными заменами и одной делецией 3 пн у *ToxB1* (рис. 1). Отличие кодирующей области генов *toxb4* (OP418014) и *toxb12* (OP418008) от последовательности *toxb2* оказалось еще существеннее — 29 и 33 однонуклеотидные замены соответственно. Можно с уверенностью заключить, что в рамках сконструированной сети гаплотипов *ToxB/toxb*, отражающей их эволюционные отношения в пределах четырех видов *Pyrenophora* [5], секвенированные нами гены идентифицированы как *toxb2*.

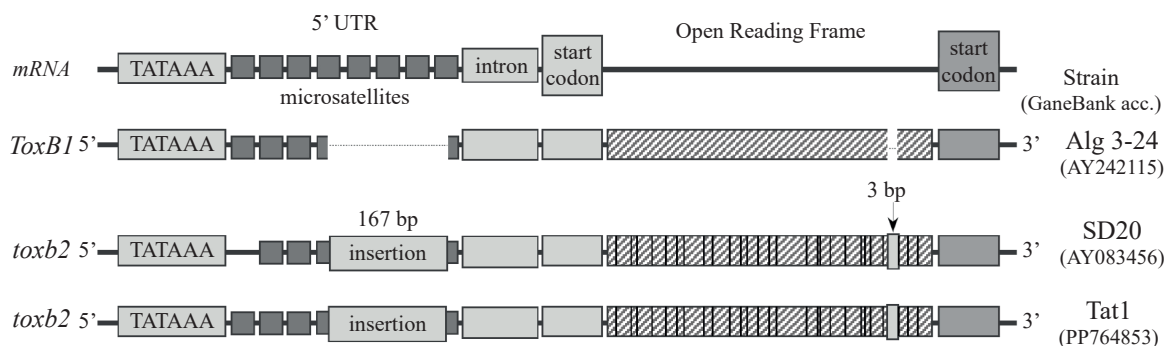


Рис. 1. Структура генов *ToxB1* и *tox2* у штаммов *P. tritici-repentis*.

Благодаря большому размеру секвенированных продуктов амплификации было проанализировано сходство не только рамок считывания, но и фланкирующих нетранслируемых областей (5'UTR). В идентифицированных нами генах *tox2*, также как в референсной последовательности *tox2* штамма SD20 расы 4 (AY083456), в области 5'UTR присутствует консервативная последовательность корового промотора, ТАТА-бокс (5'TATAA-3'), который также есть в последовательностях *ToxB1* [5]. В области 5'UTR всех полученных последовательностей *tox2*, как и в последовательностях *ToxB1*, выявлено присутствие четырех микросателлитов размером 25 пн, тогда как в последовательности *tox2* штамма SD20 обнаружены только три микросателлита [5]. В области между микросателлитами и интроном, расположенным непосредственно перед старт-кодonom *tox2* исследуемых штаммов и штамма SD20, обнаружена массивная инсерция 167 пн, которая отсутствует во всех известных последовательностях *ToxB1*. К сожалению, из-за недостатка информации о генах *tox2* у гриба *P. tritici-repentis*, их коротких последовательностей, депонированных в базы данных и равных по длине рамке считывания, а также малого количества изолятов, у которых идентифицирован данный ген, оценить полиморфизм этой области в гене *tox2* у наших и других изолятов не представляется возможным.

Однако проведенное сравнение нуклеотидных последовательностей идентифицированных генов *tox2* с референсными последовательностями *ToxB1* позволяет предположить, что неспособность штаммов с геном *tox2* индуцировать хлороз листьев мягкой пшеницы обусловлена не только различиями в ORF, но и в регуляторных участках гена. Известно, что штаммы *P. tritici-repentis* расы 4 с геном *tox2*, непатогенные для мягкой пшеницы, поражают сорта твердой пшеницы, а тетраплоидный вид *Triticum durum* является предком гексаплоидной мягкой пшеницы *T. aestivum* [16]. Это наблюдение дает основание гипотезе об эволюционно наиболее древнем происхождении гена *tox2* среди

гомологов и последующем появлении *ToxB1* и других *ToxB/tox2* генов с участием мобильных генетических элементов.

В результате сравнительного анализа геномов штаммов разных рас *P. tritici-repentis* было обнаружено, что перестройки в структурной организации хромосом гриба происходят с участием транспозонов, относящихся к новому классу больших мобильных элементов — *Starship* [21], часто ассоциированных с генами эффекторов [22]. Известно, что *ToxA* в составе транспозона *ToxhAT* был перенесен из генома *Parastagonospora nodorum* в *Pyrenophora tritici-repentis* [23], который, как выяснилось позже, был встроен в гигантский транспозон *Starship* [21], получивший название "Horison" [22]. Ген *ToxB* в виде кластера из трех копий входит в состав мобильного элемента размером 294 тпн с терминальными инвертированными повторами (TIRS), который относят к транспозонам типа *Starship*, получивший название "Icagus". В одном изоляте D308 внутри такого же транспозона выявлен неактивный гомолог *tox2* [22].

Примечательно, что штаммы *P. tritici-repentis* с геном *tox2* обнаружены только в тех популяциях, в которых нами были выявлены штаммы гриба с мутантным геном *ToxA*, несущим инсерцию 170 пн [19]. Инсерционный элемент *PtrHp2* имеет транспозонную природу и кроме мутантных генов *ToxA* был также обнаружен в референсных последовательностях генов *ToxB* других грибов [24], но отсутствовал в генах *tox2* исследуемых штаммов *P. tritici-repentis*. Четыре анализируемых штамма гриба из Татарстана характеризовались одновременным присутствием в геноме *tox2* и *ToxA* с инсерционным элементом *PtrHp2*. Данные наблюдения можно объяснить существованием неизвестных нам факторов, действующих в пределах отдельных популяций, повышающих транспозонную активность в геноме штаммов *P. tritici-repentis*. Полученные нами данные о структуре гена *tox2* вносят вклад в развитие представлений об эволюции генов-эффекторов фитопатогенных грибов.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lamari L., Strelkov S., Yahyaoui A. et al. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat // *Phytopathol.* 2003. V. 93. P. 391–396. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.391>
2. Ciuffetti L.M., Manning V.A., Pandelova I. et al. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction // *New Phytologist.* 2010. V. 187. № 4. P. 911–919. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03362.x>
3. 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* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2022. V. 35. P. 336–348. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-21-0299-R>
4. Aboukhaddour R., Hafez M., McDonald M. et al. A revised nomenclature for *ToxA* haplotypes across multiple fungal species // *Phytopathol.* 2023. V. 113. № 7. P. 1180–1184. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-23-0017-SC>
5. Hafez M., Gourlie R., McDonald M. et al. Evolution of the *ToxB* gene in *Pyrenophora tritici-repentis* and related species // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2024. V. 37. P. 327–337. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-23-0114-FI>
6. Strelkov S.E., Lamari L. Host-parasite interaction in tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* of wheat // *Can. J. Plant Pathol.* 2003. V. 25. P. 339–349. <https://doi.org/10.1080/07060660309507089>
7. 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>
8. Strelkov S.E., Kowatsch R.F., Ballance G.M., Lamari L. Characterization of the *ToxB* gene from North African and Canadian isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2006. V. 67. P. 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2005.12.004>
9. 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 Pathol.* 2008. V. 57. P. 623–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01821.x>
10. Ali S., Franc 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>
11. Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A. et al. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road // *Can. J. Plant Pathol.* 2005. V. 27. P. 383–388. <https://doi.org/10.1080/07060660509507236>
12. Benslimane H., Lamari L., Benbelkacem A. et al. Distribution of races of *Pyrenophora tritici-repentis* in Algeria and identification of a new virulence type // *Phytopathol. Mediterr.* 2011. V. 50. P. 203–211. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8746
13. Gamba F.M., Bassi F.M., Finckh M.R. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* in Morocco // *Phytopathol. Mediterr.* 2017. V. 56. P. 119–126. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18830
14. Kamel S., Cherif M., Hafez M. et al. *Pyrenophora tritici-repentis* in Tunisia: Race structure and effector genes // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01562>
15. 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 Path.* 2010. V. 39. P. 63–68. <https://doi.org/10.1071/AP09056>
16. Guo J., Shi G., Kalil A. et al. *Pyrenophora tritici-repentis* race 4 isolates cause disease on tetraploid wheat // *Phytopathol.* 2020. V. 110. P. 1781–1790. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-20-0179-r>
17. Wei B., Moscou M.J., Sato K. et al. Identification of a locus conferring dominant susceptibility to *Pyrenophora tritici-repentis* in barley // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00158>
18. Andrieu 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>
19. Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М., Зубко Н.Г. Расовый состав и изменчивость гена *ToxA* в географически отдаленных популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* // *Микол. и фитопатол.* 2024. Т. 58. № 3. С. 246–253. <https://doi.org/10.31857/S0026364824030064>
20. Михайлова Л.А., Гуляева Е.И., Кокорина Н.М. Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis* // *Микол. и фитопатол.* 2002. Т. 36. № 1. С. 63–67.
21. Gluck-Thaler E., Ralston T., Konkel Z. et al. Giant *Starship* elements mobilize accessory genes in fungal genomes // *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 39. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac109>

22. Gurlie R., McDonald M., Hafez M. et al. The pangenome of the wheat pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* reveals novel transposons associated with necrotrophic effectors *ToxA* and *ToxB* // BMC Biol. 2022. V. 20. Art. 239.
<https://doi.org/10.1186/s12915-022-01433-w>
23. McDonald M.C., Taranto A.P., Hill E. et al. Transposon-mediated horizontal transfer of the host-specific virulence protein *ToxA* between three fungal wheat pathogens // mBio. 2019. V. 10.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01515-19>
24. Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М. Новый инсерционный элемент в гене *ToxA* гриба *Pyrenophora tritici-repentis* // Генетика. 2024. Т. 60. № 9. С. 000.

First Detection of *toxb2* Gene in *Pyrenophora tritici-repentis* Strains from Russia and Kazakhstan

N. V. Mironenko¹ *, A. S. Orina¹, N. M. Kovalenko¹

¹All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia

*e-mail: nina260lmir@mail.ru

For 18 *Pyrenophora tritici-repentis* strains the pathogenic micromycete causing tan spot of wheat, the race was determined and the *ToxB/toxb* genes were identified. The analyzed strains belonged predominantly to race 4, nonpathogenic for bread wheat. Alignment of the sequences of *ToxB/toxb* gene of one *P. tritici-repentis* strain from Kazakhstan and five strains from Tatarstan with the reference sequences of the *ToxB1*, *toxb2*, *ToxB4*, *toxb12*, and *toxb14* genes allowed to accurately identify the genes analyzed in this study as *toxb2*. This is the first report of *toxb2* gene in *P. tritici-repentis* populations from Russia and Kazakhstan. Also, the differences between the *ToxB1* and *toxb2* sequences were demonstrated: 27 nucleotide substitutions and one 3 bp deletion were found in the ORF region in *ToxB1*. In the 5' UTR region of all obtained *toxb2* sequences, as well as in reference *ToxB1* sequences, the presence of four microsatellites (25 bp each) was detected between the TATA-box and the intron. In the *toxb2* sequences of reference *P. tritici-repentis* strain SD20 and analyzed strains a 167 bp insertion was found in the 5' UTR region before the intron. This insertion is not found in any known *ToxB1* sequence and likely affects the functionality of *toxb2* gene. Novel information on the structure of *toxb2* gene has implications for understanding the evolution of *ToxB/toxb* genes of *P. tritici-repentis*.

Keywords: *Pyrenophora tritici-repentis*, *toxb2*, *ToxB1*, untranslated region of gene, microsatellites, insertion.