

## МЕЖШТАММОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ *Pyrenophora tritici-repentis* ПО ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ToxA* И *PtrPf2* В КУЛЬТУРЕ

© 2020 г. Н. В. Мироненко<sup>1</sup>, \*, А. С. Орина<sup>1</sup>, Н. М. Коваленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия

\*e-mail: nina2601mir@mail.ru

Поступила в редакцию 20.04.2019 г.

После доработки 14.06.2019 г.

Принята к публикации 15.06.2019 г.

Впервые использованы признаки относительного уровня экспрессии гена эффектора *ToxA* и гена фактора транскрипции *PtrPf2 in vitro* для характеристики коллекции изолятов возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis* из географически отдаленных популяций. Показано, что две группы изолятов — из Казахстана (Алматинская обл.) и России (Краснодарский край) различаются по степени генетического разнообразия. Группа краснодарских изолятов более гетерогенна по уровню экспрессии обоих генов. Обнаружена положительная взаимосвязь между уровнями экспрессии обоих генов ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.001$ ) для краснодарских изолятов. Выявлены статистически значимые различия между группами изолятов по уровню экспрессии гена *PtrPf2* ( $p = 0.002$ ). Высокая вирулентность казахстанских изолятов по предварительным данным связана с высоким уровнем экспрессии гена фактора транскрипции *PtrPf2* в этих изолятах. Предполагается связь между уровнем экспрессии гена фактора транскрипции *PtrPf2 in vitro* и способностью изолятов индуцировать некроз на листьях восприимчивого сорта.

**Ключевые слова:** *Pyrenophora tritici-repentis*, чужеродная транслокация, эффектор, *ToxA*, фактор транскрипции, *PtrPf2*.

**DOI:** 10.31857/S0016675820040086

Желтая пятнистость листьев — вредоносное и широко распространенное заболевание пшеницы, вызываемое аскомицетным грибом *Pyrenophora tritici-repentis* Died. [анаморфа *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker]. История исследований патосистемы *Triticum aestivum* L. — *Pyrenophora tritici-repentis* началась с 80-х гг. прошлого столетия. Особое внимание было уделено генам *ToxA* и *ToxB*, кодирующим токсины белковой природы Ptr ToxA и Ptr ToxB, которые считаются основными факторами патогенности гриба [1, 2].

Ген *ToxA* находится в центре внимания ученых, изучающих молекулярные механизмы взаимоотношений патогена и растения-хозяина [3–8]. В частности, для селекционеров важны сведения о распространении изолятов с геном *ToxA* в популяциях патогена, обитающих на территориях выращивания пшеницы, поскольку маркеры гена восприимчивости *Tsn1* используются для маркер-ориентированной селекции [9–11].

Ген *ToxA* также представляет особый интерес как чужеродный генетический элемент, попавший в геном *P. tritici-repentis* путем горизонталь-

ного переноса от другого вида гемиботрофного патогена пшеницы — возбудителя септориоза пшеницы *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvl., Verkley & Crous [12]. Ранее нами было показано, что с расширением ареала *P. tritici-repentis* с юга (Краснодарский край, Дагестан, Южный Казахстан) на север (Северо-Западный регион России, Челябинская и Омская области, Северный Казахстан) в популяциях *P. tritici-repentis*, обитающих на мягкой пшенице, существенно снижается доля изолятов, несущих ген *ToxA* [13–15].

Взаимодействие генов *ToxA* и *ToxB* и комплементарных им генов восприимчивости *Tsn1* и *Tsc2* в патосистеме *Triticum aestivum* — *Pyrenophora tritici-repentis* происходит по типу ген-на-ген, но “в зеркальном отражении” [1, 4]. Однако в наших исследованиях мы столкнулись с многочисленными фактами несоответствия генотипа изолята патогена и ожидаемого фенотипического проявления реакции растения пшеницы на заражение этим изолятом. Так, 61% изолятов из краснодарской популяции 2017 г. имели ген *ToxA* (*ToxA*<sup>+</sup>), но не индуцировали некроз листьев у восприим-

чивых сортов пшеницы с доминантным аллелем *Tsn1* [13]. Отсутствие продукта гена *ToxA* у изолятов, несущих этот ген, может быть связано с мутационными повреждениями самого гена. Однако ген *ToxA* отличается большой стабильностью и его мутантные формы неизвестны в изолятах *P. tritici-repentis* [12, 14, 16–18]. Другой причиной может быть нарушение экспрессии гена на разных этапах реализации наследственной информации. Известно, что первый этап экспрессии генов – транскрипция – регулируется белками, так называемыми факторами транскрипции, которые в настоящее время активно изучаются у фитопатогенных грибов [19]. Недавно у *P. tritici-repentis* был обнаружен ген *PtrPf2*, который является ортологом гена *PnPf2* – регулятора экспрессии генов *SnToxA* и *SnTox3* в изолятах *Parastagonospora nodorum*. В опытах по инфильтрации восприимчивого сорта культуральными филтратами мутантов *P. tritici-repentis* с делецией *PtrPf2* было доказано, что ген *PtrPf2* регулирует синтез Ptr ToxA *in vitro*, т.е. является фактором транскрипции гена *ToxA* [7].

Цель настоящего исследования – определить “базовый” (видоспецифичный) уровень экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* у изолятов *P. tritici-repentis* из разных географических популяций и изучить внутри- и межпопуляционный полиморфизм уровня экспрессии этих генов *in vitro*.

Материалом исследования служили монокультуральные изоляты *P. tritici-repentis* ToxA<sup>+</sup>, отобранные из казахстанской (Алматинская обл.) и российской (Краснодарский край) популяций в количестве 10 и 12, соответственно. Вирулентность изолятов оценивали по их способности индуцировать некроз на листьях восприимчивого сорта пшеницы Glenlea, имеющего ген восприимчивости *Tsn1*, по 4-балльной шкале. Фитопатологический тест проводили в двух повторностях.

Для выделения РНК грибы выращивали на среде V-4 [20] в течение семи суток. Выделение РНК из грибных изолятов проводили с помощью RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Нидерланды). Матрицу кДНК синтезировали методом ОТ-ПЦР на основе 1–2 мкг тотальной РНК с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). Для оценки экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* *in vitro* у изолятов *P. tritici-repentis* проводили количественную ПЦР с использованием праймеров и протоколов амплификации, опубликованных ранее [7]. Относительный уровень экспрессии гена оценивали по соотношению количества мРНК гена-мишени и референтного гена актина (*Act1*) и рассчитывали по формуле  $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  [21]. Статистическую обработку результатов проводили с

помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и STATISTICA 10.0. Для характеристики генетического разнообразия использовали коэффициент вариации *V*, который рассчитывали как отношение стандартного отклонения к среднему, выраженное в процентах. Связь между количественными признаками оценивали с использованием линейного коэффициента корреляции Пирсона *r*. Определение достоверности различий между полученными данными проводили по *t*-критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

В популяции казахстанских изолятов уровень экспрессии гена *ToxA* варьировал в диапазоне 0.67–1.00, гена *PtrPf2* 0.92–1.23, при этом коэффициент вариации (*V*) этих признаков составил 14 и 10% соответственно. Российские изоляты отличались более высокой гетерогенностью демонстрируемого уровня экспрессии обоих генов: уровень экспрессии *ToxA* оказался в диапазоне 0.34–1.18, гена *PtrPf2* 0.32–0.81, а коэффициент вариации этих показателей составил 32 и 23% соответственно. Возможно, это объясняется условиями сбора растительного материала, а именно влиянием растения-хозяина. В Алматинской области листья пшеницы с симптомами желтой пятнистости были собраны с одного поля, засеянного генетически однородным сортом, тогда как в Краснодарском крае листья собирали с нескольких участков, на которых выращивали сорта пшеницы разного генотипа.

В среднем значения уровня экспрессии гена *ToxA* в казахстанской и российской популяциях оказались практически равны:  $0.78 \pm 0.11$  и  $0.82 \pm 0.02$ , тогда как уровень экспрессии *PtrPf2* был значительно выше в казахстанской популяции ( $1.06 \pm 0.03$ ) по сравнению с российской ( $0.67 \pm 0.01$ ) (рис. 1). У каждого из анализируемых 10 казахстанских изолятов уровень экспрессии *PtrPf2* оказался выше, чем *ToxA*, тогда как у российских изолятов наблюдалось противоположное соотношение: уровень экспрессии *PtrPf2* был ниже, чем *ToxA*. Для российских изолятов обнаружена статистически значимая корреляция значений уровня экспрессии обоих генов ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.001$ ), тогда как в группе казахстанских изолятов такая взаимосвязь не выявлена.

В двух фитопатологических тестах казахстанские изоляты *P. tritici-repentis* характеризовались более выраженным проявлением некроза на восприимчивом сорте (средняя 2.7), чем российские изоляты (средняя 1.9), что является фенотипическим проявлением экспрессии *ToxA*. Выраженная значительная вирулентность казахстанских изолятов, очевидно, связана с более высоким уровнем экспрессии *PtrPf2*, которая, видимо, определяет

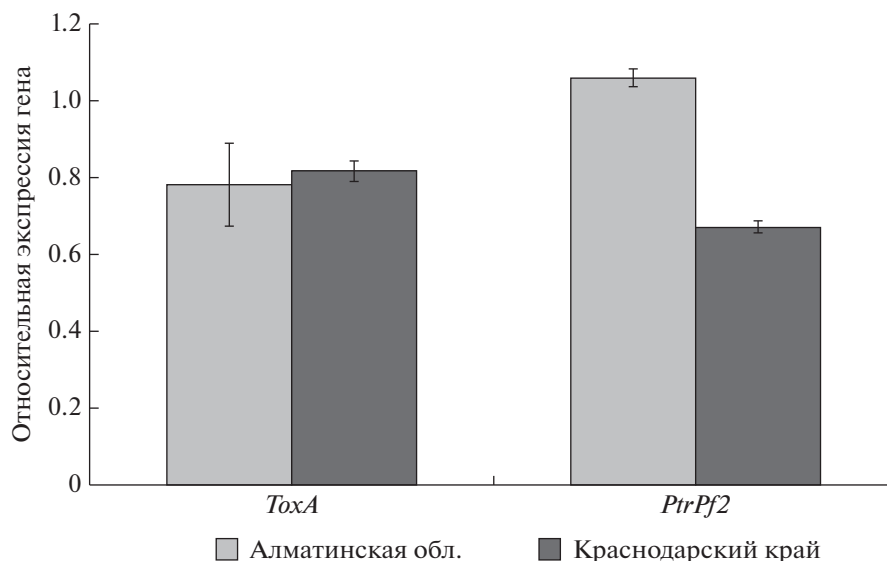


Рис. 1. Средние уровни экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis*.

фенотипическую экспрессию самого гена-эффектора. Для проверки этого вывода необходимы дополнительные исследования *in planta*.

Данные о связи конститутивной (= *in vitro*) экспрессии *ToxA* в изолятах *P. tritici-repentis* с их способностью индуцировать некроз на восприимчивых сортах, а также о механизмах регуляции экспрессии этого гена-эффектора крайне ограничены. Известно, что изоляты *P. tritici-repentis* *ToxA*<sup>+</sup> секретируют токсин Ptr *ToxA* *in vitro* [7, 22] и их культуральный фильтрат индуцирует некроз на листьях сортов пшеницы, имеющих в геноме доминантный аллель гена восприимчивости *Tsn1* [23]. Показано, что на восприимчивом сорте экспрессия “оригинального гена” *ToxA* у изолятов *Parastagonospora nodorum* была во много раз выше, чем экспрессия этого же гена, имеющего природу “чужеродной транслокации” у изолятов *P. tritici-repentis* [6]. Эти факты свидетельствуют о том, что чужеродный ген *ToxA* в *P. tritici-repentis* не может экспрессироваться в процессе заражения растения столь же эффективно, как “свой” ген-эффектор *SnToxA* в *P. nodorum*. Вопрос о влиянии экспрессии гена *ToxA* в изолятах *P. tritici-repentis* на проявление некротических симптомов на растении затронут в работе, посвященной анализу структуры гена *ToxA* и распространению в изолятах гриба нового генетического элемента PtrHr1 [8]. Уровень экспрессии гена *ToxA* был определен у трех европейских и двух австралийских изолятов *P. tritici-repentis*: показано существенное различие (в 400–1200 раз) между уровнями экспрессии *ToxA* *in vitro* в изолятах разного происхождения. Этот факт объясняется тем, что для сравнения с евро-

пейскими изолятами авторы взяли австралийский штамм М-4 — продуцент токсина Ptr *ToxA*. Слабое проявление некроза на восприимчивом сорте при заражении европейскими изолятами авторы связывают с низкой экспрессией *ToxA* [8], однако влияние *PtrPf2* на экспрессию гена-эффектора в этой работе не рассматривали. В настоящей работе разница уровня экспрессии *ToxA* *in vitro* у казахстанских и российских изолятов была не столь существенной — максимум в 3 раза, а более значительная вирулентность казахстанских изолятов по сравнению с российскими обусловлена, по предварительным данным, высокой экспрессией гена фактора транскрипции *PtrPf2*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00128\_а.

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. 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. P. 911–919. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03362.x>
2. Lamari L., Strelkov S.E. The wheat/*Pyrenophora tritici-repentis* interaction: progress towards an understanding

- of tan spot disease // Can. J. Plant Pathol. 2010. V. 32. P. 4–10.  
<https://doi.org/10.1080/07060661003594117>
3. Adhikari T.B., Bai J., Meinhardt S.W. et al. *Tsn1*-mediated host responses to *ToxA* from *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant-Microbe Interactions. 2009. V. 22. № 9. P. 1056–1068.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1056>
  4. 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>
  5. Manning V.A., Ciuffetti L.M. Necrotrophic effector epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction // PLoS One. 2015. V. 10. № 4. e0123548.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123548>
  6. Viridi S.K., Liu Z., Overlander M.E. New insights into the roles of host gene-necrotrophic effector interactions in governing susceptibility of durum wheat to tan spot and *Septoria nodorum* blotch // G3. 2016. V. 6. P. 4139–4150.  
<https://doi.org/10.1534/g3.116.036525/-/DC1>
  7. Rybak K., See P.T., Phan H.T. et al. A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and hosts specific virulence of two major *Pleosporales* fungal pathogens of wheat // Mol. Plant Pathol. 2017. V. 18. P. 420–434.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.12511>
  8. Moolhuijzen P.M., See P.T., Oliver R.P., Moffat C.S. Genomic distribution of a novel *Pyrenophora tritici-repentis* *ToxA* insertion element // PLoS One. 2018. V. 13. № 10. e0206586.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206586>
  9. Faris J.D., Zhang Z., Lu H.J. et al. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 13544–13549.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1004090107>
  10. Kokhmetova A., Kremneva J., Volkova G. et al. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot // J. Plant Pathol. 2017. V. 99. P. 161–167.  
<https://doi.org/10.4454/jpp.v99i1.3812>
  11. See P.T., Marathamuthu K.A., Iagallo E.M. et al. Evaluating the importance of the tan spot *ToxA*–*Tsn1* interaction in Australian wheat varieties // Plant Pathol. 2018. V. 67. P. 1066–1075.  
<https://doi.org/10.1111/ppa.12835>
  12. Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H. et al. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 953–956.  
<https://doi.org/10.1038/ng1839>
  13. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования *ToxA* и *ToxB* // Вестник защиты растений. 2019. № 1. С. 24–29.  
[https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-24-29](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29)
  14. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Михайлова Л.А. Частота гена *ToxA* в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49(5). С. 325–329.
  15. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. и др. Генетическая структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis*, существующих на территории России, по микросателлитным маркерам // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 885–894.
  16. Ali S., Gurung S., Adhikari T.B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas // Plant Dis. 2010. V. 94. P. 229–235.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0229>
  17. Leišova-Svobodova L., Hanzalova A., Kucer L. Expansion and variability of the *Ptr ToxA* gene in populations of *Pyrenophora tritici-repentis* and *Pyrenophora teres* // J. Plant Pathol. 2010. V. 92. P. 729–735.  
<https://doi.org/10.4454/jpp.v92i3.319>
  18. Aboukhaddour R., Turkington T.K., Strelkov S.E. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) in Alberta, Canada // Can. J. Plant Pathol. 2013. V. 35. P. 256–268.  
<https://doi.org/10.1080/07060661.2013.782470>
  19. Tan K.-C., Oliver R.P. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi // PLoS Pathogens. 2017. V. 13(4): e1006241.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006241>
  20. Михайлова Л.А., Гульяева Е.И., Кокорина Н.М. Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. № 1. С. 63–67.
  21. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
  22. Moffat C.S., See P.T., Oliver R.P. Generation of a *ToxA* knockout strain of the wheat tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant Pathol. 2014. V. 15. P. 918–926.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.12154>
  23. Liu Z., Friesen T.L., Ling H. et al. The *Tsn1*–*ToxA* interaction in the wheat – *Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat–tan spot system // Genome. 2006. V. 49. P. 1265–1273.  
<https://doi.org/10.1139/g06-088>

## Differences among *Pyrenophora tritici-repentis* Isolates in the Expression of *ToxA* and *PtrPf2* Genes in Culture (*in vitro*)

N. V. Mironenko<sup>a, \*</sup>, A. S. Orina<sup>a</sup>, and N. M. Kovalenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, 196608 Russia

\*e-mail: nina2601mir@mail.ru

For the first time the relative expression of the *ToxA* effector gene and the *PtrPf2* transcription factor gene were used for characterization of *P. tritici-repentis* isolates from geographically distant populations *in vitro*. It is shown that two groups of isolates from Kazakhstan (Almaty oblast) and from Russia (Krasnodar kray) differ in terms of genetic diversity. The group of Russian isolates is characterized by a greater diversity in the expression of both genes than Kazakhstan isolates. A positive correlation between the expression levels of both genes ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.001$ ) for Russian isolates was found. Statistically significant differences between groups of isolates in *PtrPf2* gene expression ( $p = 0.002$ ) were revealed. The higher virulence of Kazakhstan isolates compared with the Russian, according to preliminary data, coincides with their high expression of the transcription factor *PtrPf2*. A connection between the level of expression of the *PtrPf2* gene *in vitro* and the ability of isolates to induce necrosis on leaves of susceptible cultivar is assumed.

**Keywords:** *Pyrenophora tritici-repentis*, alien translocation, effector, *ToxA*, transcription factor, *PtrPf2*.