____ ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ ₌ Болезней растений

УДК 632.488 : 579.25

РОЛЬ ПОЛОВОГО ПРОЦЕССА В СОХРАНЕНИИ ЧУЖЕРОДНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ ГЕНА *ТОХ*А В ГЕНОМЕ *РУRENOPHORA TRITICI-REPENTIS*

© 2019 г. Н. В. Мироненко*, О. А. Баранова, Н. М. Коваленко

Всероссийский НИИ защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия * E-mail: nina2601mir@mail.ru Поступила в редакцию 18.05.2018 г.

После доработки 02.10.2018 г. Принята к публикации 21.12.2018 г.

Одним из основных факторов патогенности возбудителя желтой пятнистости пшеницы гомоталличного аскомицета Pvrenophora tritici-repentis является токсин Ptr ToxA. индуширующий некроз у восприимчивых сортов. Продукция данного эффектора детерминирована геном ToxA, который привнесен в геном гриба в результате горизонтального переноса. Считают, что чужеродная транслокация вызвала резкое возрастание патогенных свойств гриба и обусловила его широкое распространение по всему миру. Мы показали, что частота изолятов, имеющих ТохА (ТохА⁺) существенно ниже в популяциях северных регионов, чем в южных. Для объяснения данного явления мы предположили, что механизмом, ограничивающим распространение изолятов ТохА⁺ на север может быть мейотический дрейф гена ТохА в результате скрещиваний спонтанных мутантов по локусу типа спаривания или аномалии мейоза у гомоталличных изолятов. Материалом исследования служили 4 популяции P. tritici-repentis 2017 года. Популяция *P. tritici-repentis* из регионов Северного Кавказа на 100% состояла из изолятов ToxA⁺, тогда как в популяциях северо-запада РФ, северного Казахстана и Южного Уральского округа таких изолятов было в 2-4 раза меньше. Проанализирована структура МАТ-локуса у 57 изолятов *P. tritici-repentis* из северо-западной и северо-казахстанской популяций. Показано, что все проанализированные изоляты имеют две идиоморфы MAT1-1 и MAT1-2 и являются гомоталличными. Все 57 изолятов были самофертильны. 74 аскоспоровых потомка трех *ToxA*⁺ изолятов сохранили ген *ToxA* и были однородны по двум SSR локусам (SSR12, SSR15). По локусу SSR06 был выявлен полиморфизм у аскоспоровых потомков одного изолята В6: 37% аскоспоровых изолятов оказались гибридными и имели 2 аллеля. Для объяснения гибридной природы мейотического потомства гомоталличного изолята В6 необходимы дополнительные исследования. Сделан вывод, что чужеродный ген ТохА сохраняется у аскоспоровых потомков гомоталличных изолятов *P. tritici-repentis*. Механизм, препятствующий распространению гена в северных популяциях, очевидно, связан с ограниченной ролью полового процесса в жизненном цикле патогена в условиях более низких температур и высокой конкурентоспособности местных изолятов.

Ключевые слова: аскоспоры, гибридные аскоспоры, гомоталличные изоляты, пшеница, *Pyrenophora trit-ici-repentis*, MAT-локус, SSR-маркеры, *Tox*A ген

DOI: 10.1134/S0026364819020077

Возбудитель желтой пятнистости листьев пшеницы гомоталличный аскомицет Pvrenophora triti*ci-repentis* (Died.) Drechsler [анаморфа – Drechslera tritici-repentis (Died.) Shoemaker] является хорошей моделью для исследований микроэволюционных процессов в природных популяциях патогена. Основными факторами патогенности Pyrenophora tritici-repentis яляются токсины некроза и хлороза. Два из них – Ptr ToxA и Ptr ToxB – белковой природы и кодируются генами ToxA и ToxB (Ciuffetti et al., 2010; Lamari, Strelkov, 2010; один – частично охарактеризованный токсин небелковой природы Ptr ToxC (Effertz et al., 2002). На микроэволюционные процессы фитопатогенных грибов влияют их взаимоотношения с растением-хозяином. Патосистема P. tritici-repentis – пшеница работает по

принципу инверсной системы "ген-на-ген": каждый индивидуальный токсин узнается продуктом одного локуса восприимчивого хозяина, что выражается в восприимчивости растения и проявлении болезни (Strelkov, Lamari, 2003). Уникальность данной патосистемы в том, что ген ТохА, детерминирующий основной фактор патогенности – токсин Ptr *ToxA*, привнесен в геном патогена путем горизонтального переноса из другого патогена пшеницы гриба Stagonospora nodorum (Friesen et al., 2006) и не является, таким образом, "собственным" геном гриба. На примере гриба Pyrenophora tritici-repentis можно понять, каким образом чужеродная транслокация сохраняется в геноме-реципиенте, а несушие ее изоляты успешно размножаются как бесполым, так и половым путем.

Регион	Географическое происхождение	Всего изолятов	Количество <i>Тох</i> А ⁺ изолятов
Северный Казахстан	Северо-Казахстанская область: п. Кириловка, п. Подгор- ное, п. Корнеевка	25	11
Уральский федеральный округ	Челябинская область: Чебаркульский район, Челябинский НИИСХ	17	4
Северо-запад России	Новгородская обл.: Батецкий ГСУ	32	11
Северный Кавказ	Краснодарский край: Новопокровский, Каневский, Егор- лыкский, Ейский и Тимошевский р-ны	38	38

Таблица 1. Происхождение изолятов Pyrenophora tritici-repentis

Патоген преимущественно распространен в южных регионах. При расширении ареала популяций *P. tritici-repentis* на север наблюдается значительное уменьшение частоты изолятов с геном *ToxA* (*ToxA*⁺) (Mironenko et al., 2015, 2016). Мы связали это наблюдение с наличием в "северных" популяциях патогена факторов, препятствующих сохранению чужеродного генетического детерминанта – *ToxA*.

По нашим сведениям, в научной литературе отсутствуют работы по изучению влияния половой стадии гриба P. tritici-repentis на сохранение в популяции изолятов, несущих ТохА (ТохА⁺). Хотя условия получения зрелых псевдотециев P. triticirepentis хорошо известны (Friesen et al., 2003; Benslimane, 2014), генетические исследования гриба очень ограничены (Hunger, Brown, 1987; McCallum et al., 1994). Очевидно, это связано с гомоталличной природой гриба. Существует гипотеза, что вид *P. tritici-repentis* эволюционировал от гетеро- к гомоталлизму (Lepoint et al., 2010). Косвенно об этом также свидетельствуют эксперименты по инактивации генов МАТ1-1 и МАТ1-2 у гомоталличных изолятов P. tritici-repentis методом нокаута генов (gene knockout), в результате чего были получены мутанты разного типа спаривания, способные скрещиваться и давать фертильное аскоспоровое потомство (Ameen et al., 2017). Мы предположили, что в природных популяциях P. tritici-repentis могут встречаться подобные мутанты. Обнаружение изолятов с одной функциональной идиоморфой: МАТ1-1 или МАТ1-2, позволило бы проверить гипотезу мейотического дрейфа гена ТохА как механизма, ограничивающего распространение этого гена в популяциях патогена.

Цель работы — оценить роль полового процесса в сохранении изолятов с интрогрессированным геном *ToxA* в популяциях *P. tritici-repentis* путем тестирования гипотезы мейотического дрейфа гена *ToxA* в результате возможных скрещиваний между изолятами *P. tritici-repentis* или аномалий мейоза при самооплодотворении гомоталличных изолятов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллекция моноконидиальных изолятов была выделена из листьев пшеницы с симптомами желтой пятнистости, собранных в четырех регионах $P\Phi$ в 2017 г. (табл. 1). Вид гриба идентифицировали по морфологическим признакам конидий (т.н. "змеиной головке", и методом ПЦР с видоспецифичными праймерами (Antoni et al., 2010). Выделение и выращивание гриба проводили по известной методике (Mikhailova et al., 2002). Потенциальную способность изолятов гриба продуцировать экзотоксины определяли фитопатологическим методом инокуляции сорта пшеницы Glenlea (Ptr *Tox*A), и линий пшеницы 6B365 и 6B662 (Ptr *Tox*C и Ptr *Tox*B, соответственно) (Lamari et al., 2005).

Для получения псевдотециев с аскоспорами использовали известный метод, основанный на инокуляции автоклавированных отрезков листьев кукурузы агаровыми блоками 5–7-дневной культуры моноконидиальных изолятов *P. tritici-repentis* (Friesen et al., 2003). Аскоспоры "выстреливали" на агаровую поверхность крышки чашки Петри после кратковременного нагревания псевдотециев. После прорастания аскоспор их переносили на свежую питательную среду.

ДНК изолятов грибов выделяли известным методом (Murray, Thompson, 1980). Анализ структуры МАТ-локуса *P. tritici-repentis* проводили с помощью ПЦР с праймерами на обе идиоморфы *MAT1-1* и *MAT1-2* (табл. 2). В качестве "гена домашнего хозяйства" использовали ген хитинсинтазы (*CHS1*). Для верификации отрицательных результатов амплификации больших диагностических фрагментов (размером 900–12000 п.н.) проводили дополнительные ПЦР на короткие фрагменты, включающие один из двух сайтов праймирования для большого фрагмента.

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Источник
PLP1	CACTGCCCACTCACCTTGTGC	Lepoint et al. (2010)
PLP2	CAGAACAAAGGCAGGACTGTGAGC	
PLP3	CAGACAAGGCGCTCTCGGTTGAAG	
PLP4	ATGCGCTCAGCAAGGAAGGTCG	
PLP5	AACTCGGAACGCTGAGCCTAATGG	
PLP6	TTGACGCCACAGACGGAACAGG	
PLP7	GCTTTACTACAACTTTCCTCTACC	
PLP8	CTGGAAGTGCTGGACGAGAAGATC	
PLP10	GTACGGGCCAGCATGACGTGC	
PtrUniqueF2	GGACTTTGGCTTTCTATTGTGC	Antoni et al. (2010)
PtrUniqueR2	CTTGGTGAATGGTGAAGATGG	
PtrSSR-06	F: TGCATTTGTGGTGCAAGATC	Gurung et al. (2013)
	R: AGAAGCCTTGGCCATTTTCA	
PtrSSR-12	F: AAGAGGTGTCGACTAGCGTTT	
	R: GGCTTAATTTTAAGCGCGTG	
PtrSSR-15	F: CGCCAACATAGTTGCGAATT	
	R: TCCGCCTCTGTAGGTGTTAAA	
TA51	F: GCGTTCTATCCTCGTACTTC	Andrie et al. (2007)
TA52	R: GCATTCTCCAATTTTCACG	
CHS-79F	F: TGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	
CHS-354R	R: TGGAAGAACCATCTGTGAG AGTTG	

Идентификацию гена *Tox*A в конидиальных и аскоспоровых изолятах проводили методом ПЦР с известными праймерами на сам ген (Andrie et al., 2007). Праймеры на микросателлитные последовательности и условия ПЦР приведены в оригинальной работе (Gurung et al., 2013) (табл. 2). Авторы праймеров (Gurung et al., 2013) анализировали продукты амплификации SSR локусов в агарозном и полиакриламидном гелях. В нашей работе мы также использовали этот подход.

Для амплификации использовали термоциклер С1000TM Thermal Cycler (BIO-RAD). Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1.7%-х агарозных гелях и в 6%-м ПААГ, окрашенных бромистым этидием, при напряжении 100 V в течение 3 ч в 0.5× ТБЕ-буфере. Приблизительный размер продукта амплификации определяли путем сравнения со стандартом молекулярной массы – GeneRulerTM 50 п.н. DNA Ladder фирмы Fermentas.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ структуры МАТ-локуса. Для поиска природных мутантов по МАТ-локусу изоляты *P. tritici-repentis* были проанализированы на целост-

МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ том 53 № 2 2019

ность обеих идиоморф с помощью 9 сайтов праймирования МАТ локуса, представленных на рис. 1.

По результатам амплификации идиоморф *MAT1-1* и *MAT1-2* мы предполагали судить о гомоили гетероталличной природе изолята. Два продукта амплификации – с праймерами PLP1 + + PLP4 (размер примерно 1200 п.н.) и PLP3 + + PLP6 (размер примерно 900 п.н.) свидетельствовали о наличии идиоморфы *MAT1-1*, один продукт с праймерами PLP7 + PLP10 (размер примерно 1200 п.н.) – о наличии идиоморфы *MAT1-2*. На наличие обеих идиоморф методом ПЦР были тестированы изоляты казахстанской и батецкой популяций патогена (всего 57 изолятов). В ряде случаев наблюдали отсутствие продукта амплификации той или другой идиоморфы при наличии продукта амплификации "гена домашнего хозяй-



Рис. 1. Структура МАТ-локуса *Ругепорhora tritici-repentis* (рисунок модифицирован по Lepoint et al., 2010).

Идиоморфы	Комбинация праймеров	Размер продукта амплификации (п.н.)
MAT1-1	PLP1 + PLP4	1200
	PLP3 + PLP6	900
	PLP1 + PLP2	250
	PLP3 + PLP4	100
	PLP5 + PLP6	280
MAT1-2	PLP7 + PLP10	1200
	PLP7 + PLP8	280

Таблица 3. Диагностические ПЦР на идиоморфы Pyrenophora tritici-repentis

ства". Для проверки данного факта, т.е. доказательства отсутствия всей идиоморфы или ее части проводили дополнительные амплификации коротких участков МАТ-локуса с праймерами, используемыми для амплификации больших фрагментов идиоморф (табл. 3). Например, на рис. 2 приведен пример амплификации с праймерами PLP3 + PLP6 и PLP1 + PLP4 на идиоморфу *MAT1-1* для четырех изолятов гриба. У изолята № 1 отсутствует продукт амплификации с праймерами PLP1 + PLP4. Контрольные амплификации коротких участков идиоморф (PLP1 + PLP2, PLP3 + + PLP4 и PLP5 + PLP6) подтвердили целостность МАТ-локуса и отсутствие мутаций в виде делеций или вставок в идиоморфе МАТ1-1 первого изолята. На рис. 2 представлены только результаты амплификации с праймерами PLP1 + PLP2. Для идиоморфы *МАТ1-2* возможность контрольной амплификации имеется только для сайта PLP7 (рис. 3).

В результате амплификации идиоморф *MAT1-1* и *MAT1-2* и контрольных амплификаций у 57 тестируемых изолятов не было найдено ни одного случая нарушения структуры MAT-локуса.



Рис. 2. ПЦР-анализ целостности идиоморфы *MAT1-1 Pyrenophora tritici-repentis.* Изоляты 1–4. М – маркеры молекулярных весов 1 кб и 100 п.н.

Идентификация гена *ToxA* в популяциях *P. triticirepentis* 2017 г. Все 112 изолятов из 4 популяций 2017 г. сбора были тестированы на наличие *ToxA* методом ПЦР (табл. 1). В южной популяции (Краснодарский край) 100% изолятов содержали ген. В "северных" популяциях – из Северного Казахстана, Уральского федерального округа и северо-запада РФ встречаемость *ToxA*⁺ изолятов была значительно ниже и составляла от 24 до 44%.

Половая стадия *P. tritici-repentis* в лабораторных условиях. Мы индуцировали половую стадию у изолятов P. tritici-repentis из северо-западной популяции. Все изоляты оказались самофертильными. Псевдотеции гриба были полностью зрелыми на 30-40-й день с момента постановки скрещивания (рис. 4) и содержали большое количество асков с аскоспорами (рис. 5). Аски содержали в основном по 8 аскоспор. Для анализа аскоспорового потомства были выбраны 3 ТохА⁺-изолята – В6, В8 и В11. Из псевдотециев, образованных каждым изолятом, были выделены случайные аскоспоры: для изолята В6-19 аскоспоровых потомков, В8-25 и В11 – 30. Всего выделено 74 аскоспоровых изолята. Отмечалась морфологическая гетерогенность моноаскоспоровых изолятов - потомков одного самофертильного изолята (рис. 6).

Генотипирование аскоспорового потомства изолятов *P. tritici-repentis*. Аскоспоровое потомство трех изолятов *P. tritici-repentis* (В6, В8 и В11) было проверено на наличие гена *ToxA*. Все 74 аскоспоровых изолята содержали ген *ToxA* (рис. 7). Для генотипирования аскоспоровых изолятов использовали метод ПЦР с праймерами на микросателлитные локусы, расположенные на разных хромосомах гриба (Gurung et al., 2013). Сперва родительские



Рис. 3. ПЦР-анализ целостности идиоморфы *MAT1-2 Pyrenophora tritici-repentis.* Изоляты 1–4. М – маркеры молекулярных весов 1 кб и 100 п.н.



Рис. 4. Псевдотеции *Ругепорнога tritici-repentis* на отрезке листа кукурузы.

моноконидиальные изоляты B6, B8 и B11 были оценены по 9 SSR-локусам (результаты по 5 SSRлокусам представлены на рис. 8). Изоляты B8 и B11 оказались идентичными по всем 9 локусам, тогда как изолят B6 отличался полиморфизмом по всем изученным локусам.

Генетическая однородность аскоспорового потомства была проанализирована по трем локусам: SSR6, SSR12 и SSR15. Аскоспоровое потомство каждого изолята оказалось однородным по локусам SSR12 и SSR15 и не отличалось от родительского изолята. Амплификация SSR06-локуса выявила одну аллель размером 350 п.н. у аскоспоровых изолятов — потомков В8 и В11 и две аллели размером 500 и 350 п.н. у аскоспоровых изолятов потомков В6. Причем, у семи (№№ 2, 3, 9, 12, 14, 16, 19 на рис. 9) из 19 аскоспоровых потомков изо-



Рис. 5. Аск с 8 аскоспорами от самофертильного изолята *Pyrenophora tritici-repentis* B11.

лята B6 обнаружены оба аллеля, один изолят (№ 14) имел аллель 350 п.н. (рис. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанные в последнее время методы сравнительного анализа геномов фитопатогенных видов грибов позволили выявить большое количество случаев горизонтального переноса генов (ГПГ) (Slot, Rokas, 2011; Gardiner et al., 2012; Coelho et al., 2013; Boto et al., 2015). Предложена гипотеза о роли горизонтального переноса дополнительных хромосом, несущих генетические детер-



Рис. 6. Морфологическая гетерогенность аскоспоровых изолятов (*a* и *б*) — потомков изолята *Pyrenophora tritici-repentis* B11. На каждой половинке чашки Петри представлены три субклона от одного аскоспорового изолята.



Рис. 7. Молекулярная диагностика гена *Тох*А в аскоспоровых изолятах — потомках изолята B11. Размер продукта амплификации — 573 п.н. Последняя дорожка — негативный контроль без ДНК. Боковые дорожки — маркеры молекулярных весов 100 п.н.

минанты патогенности и вирулентности, между грибами как механизма образования новых рас фитопатогенных грибов в природе (Akagi et al., 2009). Считается, что именно в результате ГПГ ToxA ранее малозаметный патоген пшеницы P. tritici-repentis в 1940-х гг. стал активно поражать сорта пшеницы и вызывать эпифитотии. Одним из факторов сохранения и распространения изолятов *Tox*A⁺ в популяции является их отбор на сортах с геном восприимчивости Tsn1 (Mironenko et al., 2017). Нами также показано, что ген *Tsn1* преимущественно встречается в озимых сортах пшеницы, выращиваемых в южных районах РФ. Данное обстоятельство означает, что, возможно, особенности жизненного цикла гриба на озимых и яровых сортах пшеницы, доминирующих в производственных посевах пшеницы в северных регионах РФ, влияют на сохранение и распространение в популяциях патогена изолятов ТохА⁺. Жизненный цикл патогена включает половую стадию, которая завершается после перезимовки на остатках соломы в поле образованием плодовых тел – псевдотециев. Аскоспоры P. tritici-repentis являются первичным инокулюмом при весеннем заражении всходов пшеницы (Pfender, Wootke, 1987). Можно предположить, что половая стадия преимущественно наблюдается на озимых сортах и приводит к сохранению гена ТохА. Например, в Краснодарском крае, где популяция патогена на 100% состоит из ТохА⁺ изолятов и вырашивают в основном озимые сорта пшеницы, весной легко обнаружить зрелые псевдотеции P. tritici-repentis (Кремнева О.Ю., личное сообщение).

В настоящее время показано, что две идиоморфы МАТ1-1 и МАТ1-2 тандемно расположены в локусе типа спаривания (МАТ) каждого изолята P. tritici-repentis (Lepoint et al., 2010). В данной работе структура МАТ-локуса 57 изолятов P. triticirepentis была изучена с помощью семи ПЦР, даюших перекрываюшиеся пролукты амплификации. Мы не обнаружили полиморфизма МАТ-локуса у изученных изолятов, что свидетельствует об отсутствии природных мутантов со вставкой/делецией в генах МАТ1-1 и МАТ1-2 в изученной выборке изолятов, которые могли бы стать кандидатами для направленных скрещиваний в качестве гетероталличных изолятов. Таким образом, оказалось невозможным проверить гипотезу мейотического дрейфа гена ТохА. Для изучения продуктов мейоза гомоталличных ТохА⁺ изолятов индуцировали половую стадию у моноконидиальных изолятов P. tritici-repentis B6, B8 и B11 и выделили 74 аскоспоровых изолята. Все аскоспоровое потомство трех ТохА⁺ изолятов сохранило ген ТохА. Генотипирование аскоспоровых изолятов по трем SSRлокусам показало, что все потомство изолятов В6, В8 и В11 однородно по локусам SSR12 и SSR15, как и следовало ожидать, исходя из гомоталличной природы гриба. По третьему локусу (SSR06) картина оказалась более сложной: аскоспоровое потомство изолятов В8 и В11 было однородным и имело аллель размером 350 п.н., тогда как аскоспоровые изоляты В6 имели две разные аллели. Данный результат можно объяснить наличием в мицелии моноконидиального изолята B6 P. triticirepentis по крайней мере двух типов генетически различных гаплоидных ядер, которые в результате полового процесса продуцировали аскоспоровое потомство с аллелью 500 п.н., 350 п.н. и гибридное (или гетерокариотичное) с обеими аллелями. Очевидно, ядра с аллелью 350 п.н. в родительском изоляте присутствовали в минорном количестве, т.к. они не выявлены в исходном родительском изоляте В6. Можно предположить, что генетически различные ядра, каждое из которых имеет две тандемно расположенных идиоморфы МАТ1-1 и МАТ1-2, способны к переключению типа спари-



Рис. 8. Полиморфизм трех изолятов *Pyrenophora tritici-repentis* по 5 микросателлитным локусам. Сверху даны обозначения SSR-локусов, снизу – изоляты гриба: *1* – B6, *2* – B8, *3* – B11. Боковые дорожки – маркеры молекулярных весов 100 п.н.



18

19

20

21

22

M

Рис. 9. Продукты амплификации SSR6-локуса аскоспорового потомства изолятов B6 и B11 *Pyrenophora tritici-repentis*: 1– 19 – аскоспоровое потомство изолята *P. tritici-repentis* B6, 20–22 – аскоспоровое потомство изолята B11. М – маркеры молекулярных весов 50 п.н. Стрелки указывают на размер продуктов амплификации в п.н.

17

вания, слиянию и последующему мейозу с образованием гибридного полового потомства, которое маркировано присутствием сразу двух аллелей SSR06 локуса. Для доказательства этой гипотезы требуются дополнительные исследования. Дополнительным аргументом в пользу выдвинутой гипотезы служит выявленная морфологическая гетерогенность не только аскоспоровых изолятов, но и их митотического потомства (рис. 6).

M

M

12

13

14

15

16

Половая стадия важна для грибов, поскольку она продуцирует споры, способные к переживанию неблагоприятных условий. С другой стороны, очевидно, что в результате мейоза с большой долей вероятности может разрушиться благоприятная для гриба комбинация генов. Это особенно важно для фитопатогенных грибов, характеризующихся высоким уровнем нестабильности генома (Mironenko, 2019), и для которых особую роль при заражении растения-хозяина играет половое потомство. В отличие от других примеров горизонтального переноса генов между грибами, указывающих на основную роль дополнительных или несущественных (dispensable) для выживания гриба хромосом в горизонтальном переносе отдельных чужеродных генов или целых кластеров генов (Akagi et al., 2009; Richards et al., 2011; Ma et al., 2013), у P. tritici-repentis ген ToxA локализован в одной из основных хромосом гриба в единственной копии (Aboukhaddour et al., 2009). Дополнительные хромосомы как гомо-, так и гетероталличных видов грибов дуплицируются или теряются в процессе мейоза (Garmaroodi, Taga, 2015), но могут сохраниться в процессе парасексуальной рекомбинации (Schoustra et al., 2007). Что касается основных хромосом, то транслокации в них с большей вероятностью могут сохраниться у самофертильных изолятов гомоталличных видов. Гомоталличный способ размножения *P. tritici-repentis*, на наш взгляд, - единственно возможный путь сохранения чужеродного гена *Tox*A в основной хромосоме в процессе мейоза и образования аскоспорового потомства с этим геном. Механизм, препятствующий распространению гена в северных популяциях, очевидно, связан с ограниченной ролью полового процесса в жизненном цикле патогена в условиях более низких температур и высокой конкурентоспособности местных изолятов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-04-00128а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aboukhaddour R., Cloutier S., Balance G.M., Lamari L. Genome characterization of Pyrenophora tritici-repentis isolates reveals high plasticity and independent chromosomal location of ToxA and ToxB. Molec. Plant Pathol. 2009. V. 10 (2). P. 201–212. https:// doi.org/doi:10.1111/J.1364-3703.2008.00520.X.
- Akagi Y., Akamatsu H., Otani H., Kodama M. Horizontal chromosome transfer: a mechanism for the evolution and differentiation of a plant pathogenic fungus. Eukaryot. Cell 2009. V. 8. P. 1732–1738. https:// doi.org/doi:10.1128/EC.00135-09.
- Ameen G., Kariyawasam G., Shi G., Friesen T.L., Faris J.D., Ali S., Rasmussen J.B., Liu Z. Molecular manipulation of the mating-type system and development of a new approach for characterizing pathogen virulence in Pyrenophora tritici-repentis. Fungal Genet. Biol. 2017. V. 109. P. 16–25. https://doi.org/doi:10.1016/j.fgb.2017.10.004.
- Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. 2007. Phytopathology. V. 97. P. 694-670. https://doi.org/doi: doi 10.1094/PHYTO-97-6-0694.
- Antoni E.A., Rybak K., Tucker M.P. et al. Ubiquity of ToxA and absence of ToxB in Australian populations of Pyrenophora tritici-repentis. Austral. Plant. Pathol. 2010. V. 39. P. 63–68. www.publish.csiro.au/journals/app.

- Benslimane H. Simple method to produce in vitro Pyrenophora tritici-repentis teleomorph. Plant Pathol. 2014. V. 30 (4). P. 437– 439. https://doi.org/doi:10.5423/PPJ.NT.06.2014.0049.
- *Boto L*. Horizontal gene transfer in evolution. In: John Wiley and Sons, Ltd.: Chichester, 2015. https://doi.org/doi: . doi 10.1002/9780470015902.a0022835.pub2
- Ciuffetti L.M., Manning V.A., Pandelova I., Betts M.F., Martinez J.P. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the Pyrenophora triticirepentis – wheat interaction. New Phytol. 2010. V. 187. P. 911–919. https://doi.org/doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03362.x
- Coelho M.A., Goncalves C., Sampaio J.P., Goncalves P. Extensive intra-kingdom horizontal gene transfer converging on a fungal fructose transporter gene. PLoS Genet. 2013. V. 9(6): e1003587. doi: 10.1371/journal.pgen. 1003587
- Effertz R.J., Meinhardt S.W., Anderson J.A., Jordahl J.G., Francl L.J. Identification of a chlorosis-inducing toxin from Pyrenophora tritici-repentis and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat. Phytopathology. 2002. V. 92. P. 527–533. doi: 10.1094/PHY-TO.2002.92.5.527
- Friesen T.L., Ali S., Stack R.W., Francl L.J., Rasmussen J.B. Rapid and efficient production of the Pyrenophora tritici-repentis teleomorph. Can. J. Bot. 2003. V. 81 (8). P. 890–895. https://doi.org/10.1139/b03-082
- Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., Mc-Donald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. Nature Genetics. 2006. V. 38 (8). P. 953–956. https:// doi.org/10.1038/ng1839
- Gardiner D.M., McDonald M.C., Covarelli L. et al. Comparative pathogenomics reveals horizontally acquired novel virulence genes in fungi infecting cereal hosts. PLoS Pathogens. 2012. V. 8(9): e1002952. https:// doi.org/doi:10.1371/journal.ppat.1002952.
- *Garmaroodi Y.S., Taha M.* Meiotic inheritance of a fungal supernumerary chromosome and its effect on sexual fertility in *Nectria haematococca*. Fungal Biol. 2015. V. 119 (10). P. 929–939. https://doi.org/doi:10.1016/j.funbio.2015.07.004
- Gurung S., Short D.P.G., Adhikari T.B. Global population structure and migration patterns suggest significant population differentiation among isolates of Pyrenophora tritici-repentis. Fungal Genet. Biol. 2013. V. 52. P. 32–41. https://doi.org/doi: 10.1016/j.fgb.2013.01.003
- Hunger R.M., Brown D.A. Colony color, growth, sporulation, fungicide sensitivity, and pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis*. Plant Dis. 1987. V. 71. P. 907–910. https://doi.org/doi:10.1094/PD-71-0907
- 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/doi:10.1080/07060661003594117.
- Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A., Amedov M., Saidov M., Djunusova M., Koichibayev M. 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

- *Lepoint P., Renard M.E., Legreve A. et al.* Genetic diversity of the mating type and toxin production genes in *Pyrenophora tritici-repentis.* Phytopathology. 2010. V. 100 (5). P. 474–483. https://doi.org/doi: 10.1094/PHYTO-100-5-0474
- Ma L.-J., Geiser D.M., Proctor R.H., Rooney A.P., O'Donnell K., Trail F., Gardiner D.M., Manners J.M., Kazan K. Fusarium pathogenomics. Annu. Rev. Microbiol. 2013. V. 67.
 P. 399–416. https://doi.org/doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
- *McCallum B.D., Bernier C.C., Lamari L.* Generation and utilization of chemical-resistant mutants in *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. Can. J. Bot. 1994. V. 72. P. 100–105. https://doi.org/doi:10.1139/b94-014.
- Mikhailova L.A., Gultyaeva E.I., Kokorina N.M. Laboratory methods of cultivation of wheat tan spot causal agent *Pyrenophora tritici-repentis*. Mikologiya i fitopatologiya. 2002. V. 36 (1). P. 63–67 (in Russ.).
- Mironenko N.V. Genome plasticity of phytopathogenic fungi. Mikologiya i fitopatologiya. 2019. (in press, in Russ.).
- Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Afanasenko O.S., Mikhailova L.A. Selective influence of wheat cultivars with Tsn1 gene on the formation of tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* population. Plant Prot. News. 2017. V. 3 (93). P. 23–27 (in Russ.).
- Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Mikhailova L.A. Frequency of ToxA gene in North Caucasian and North-West Russian populations of Pyrenophora triticirepentis. Mikologiya i fitopatologiya. 2015. V. 49 (5). P. 25–329 (in Russ.).
- Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Mikhailova L.A., Rosseva L.P. Genetic structure of the Russian populations of Pyrenophora tritici-repentis, determined by using microsatellite markers. Russian Journal of Genetics. 2016. V. 52 (8). P. 771–779. https:// doi.org/doi:10.1134/S1022795416080093.
- Murray H.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 4321–4325.
- Pfender W.F., Wootke S.L. Production of pseudothecia and ascospores by Pyrenophora tritici-repentis in response to macronutrient concentrations. Phytopathology. 1987. V. 77. P. 1213–1216.
- *Richards T.A., Leonard G., Soanes D.M., Talbot N.J.* Gene transfer into the fungi. Fungal Biol. Rev. 2011. V. 25 (2). P. 98–110. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.04.003
- Schoustra S.E., Debets A.J.M., Slakhorst M., Hoekstra R.F. Mitotic recombination accelerates adaptation in the fungus Aspergillus nidulans. PLoS Genet. 2007. V. 3(4): e68. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030068
- Slot J.C., Rokas A. Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi. Current Biol. 2011. V. 21 (2). P. 134–139. https:// doi.org/doi: 10.1016/j.cub.2010.12.020
- Strelkov S.E., Lamari L. Host-parasite interactions in tan spot Pyrenophora tritici-repentis of wheat. Can. J. Plant Pathol. 2003. V. 25 (4). P. 339–349. https:// doi.org/10.1080/07060660309507089

МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ том 53 № 2 2019

- Мироненко Н.В. (Mironenko) Пластичность генома фитопатогенных грибов // Микология и фитопатология. 2019 (в печати).
- Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Афанасенко О.С., Михайлова Л.А. (Mironenko et al.) Селективное влияние сортов пшеницы с геном Tsn1 на формирование популяции возбудителя желтой пятнистости Pyrenophora tritici-repentis // Вестник защиты растений. 2017. № 3 (93). С. 23–27.
- Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М. Михайлова Л.А. (Mironenko et al.) Частота гена ТохА в популяциях Pyrenophora tritici-repentis на Северном Кавказе и северо-западе России // Микология и фитопатология. 2015. Т. 49. Вып. 5. С. 325–329.
- Михайлова Л.А., Гультяева Е.И., Кокорина Н.М. (Mikhailova et al.) Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. Вып. 1. С. 63–67.

The Role of the Sexual Process in Preserving the Alien Translocation of the *ToxA* Gene in the Genome of *Pyrenophora tritici-repentis*

N. V. Mironenko[#], O. A. Baranova, and N. M. Kovalenko

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia [#]E-mail: nina2601mir@mail.ru

One of the main pathogenicity factors for the causal agent of the tan spot (homotallic ascomycete Pyrenophora tritici-repentis) is the toxin Ptr ToxA, inducing necrosis on susceptible varieties. The products of this effector are determined by the ToxA gene, which was introduced into the fungal genome as a result of horizontal gene transfer. It is believed that the alien translocation caused a sharp increase of the pathogenic properties of the fungus and caused its wide spread throughout the world. However, the frequency of $ToxA^+$ isolates in populations of the northern regions is significantly lower than in the southern ones. To explain this phenomenon, we hypothesized that the mechanism limiting the northward distribution of ToxA⁺ isolates may be a meiotic drift of the ToxA gene as a result of crosses of spontaneous mutants on a mating-type locus or meiotic anomaly in homotallic isolates. The material of the study was *P. tritici-repentis* 4 populations collected in 2017. The population of *P. tritici-repentis* in 2017 from the North Caucasus consisted of 100% ToxA⁺ isolates, while in the populations of the northwest of Russia, northern Kazakhstan and the Southern Urals District, such isolates were 2-4 times less. The structure of the MAT locus in 57 P. tritici-repentis isolates from the north-western and north-Kazakhstan populations was analyzed. It is shown that all analyzed isolates have two idiomorphs MAT1-1 and MAT1-2 and are homotallic. All isolates were self-fertile. 74 ascospore offsprings of three $ToxA^+$ isolates retained the ToxA gene and were homogeneous at two SSR loci (SSR12, SSR15). Polymorphism at the SSR06 locus was detected in ascospore's offsprings of B6 isolate: 37% of ascospore isolates were hybrid and had 2 alleles. To explain the appearance of hybrid ascospores in the meiotic progeny of the homotallic B6 isolate, additional studies are needed. It was concluded that the alien ToxA gene is retained in the ascospore offsprings of *P. tritici-repentis* homotallic isolates. The mechanism that prevents the spread of the gene in northern populations is obviously related to the limited role of the sexual process in the life cycle of the pathogen under lower-temperature conditions and high competitiveness of local P. tritici-repentis isolates.

Key words: ascospores, homotallic isolates, hybrid ascospores, MAT locus, Pyrenophora tritici-repentis, SSR markers, ToxA gene, wheat