Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):978-986
DOI 10.18699/VJ18.440

Идентификация генотипов-носителей устойчивости к токсинам пиренофороза Ptr ToxA и Ptr ToxB *Pyrenophora tritici-repentis* в коллекции мягкой пшеницы

А.М. Кохметова[1] ✉, С. Али[2], З. Сапахова[1], М.Н. Атишова[1]

[1] Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан
[2] Отдел агрономии, садоводства и растениводства, Университет Южной Дакоты, Брукингс, Южная Дакота, США

Pyrenophora tritici-repentis (Ptr) является возбудителем пиренофороза, одной из болезней пшеницы, которая лимитирует урожай и быстро прогрессирует в странах, возделывающих пшеницу, включая Казахстан. Целью исследования была идентификация генотипов пшеницы, устойчивых к Ptr, расе 1 и расе 5, и их хозяин-селективным эффекторам (токсинам) Ptr ToxA и Ptr ToxB *P. tritici-repentis* (tan spot). Охарактеризована коллекция мягкой пшеницы (41 образец, в том числе 38 экспериментальных и 3 контрольных) с использованием молекулярных маркеров *Xfcp623* и *XBE444541*, диагностических для генов *Tsn1* и *Tsc2*, контролирующих чувствительность к токсинам гриба. Совпадение аллеля маркера *XBE444541* с устойчивостью растения к расе 5 составило 92.11 %, а к токсину Ptr ToxB – 97.37 %. Результаты генотипирования с использованием маркера *Xfcp623* подтвердили ожидаемую реакцию на Ptr ToxA; наличие/отсутствие маркера *Xfcp623* полностью (100 %) совпадало с чувствительностью/устойчивостью к расе 1 и Ptr ToxA. Это свидетельствует о надежности диагностического маркера *Xfcp623* для идентификации генотипов пшеницы с устойчивостью к грибу и нечувствительностью к токсину Ptr ToxA. Изучение реакции генотипов пшеницы на инокуляцию гриба и инфильтрацию токсинов показало, что 30 из 38 проанализированных генотипов (или 78 %) проявили устойчивость к расе 1 и расе 5, а также нечувствительность к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Наибольший интерес представляют восемь генотипов пшеницы, которые показали устойчивость/нечувствительность как к двум расам, так и к двум токсинам. Результаты фенотипирования подтверждены с помощью молекулярных маркеров. Чувствительность к Ptr ToxB не всегда коррелировала с восприимчивостью к расе 5 и зависела от генетического фона хозяина, т. е. от конкретного генотипа пшеницы. Полученные результаты представляют интерес для повышения эффективности селекции на основе элиминации генотипов с доминантными аллелями *Tsn1* и *Tsc2*, чувствительными к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Идентифицированные генотипы необходимо использовать в селекции на устойчивость пшеницы к пиренофорозу.

Ключевые слова: пшеница; *Pyrenophora tritici-repentis*; пиренофороз; *Tsn1*; *Tsc2*; ToxA; ToxB, ПЦР.

Identification of genotypes-carriers of resistance to tan spot Ptr ToxA and Ptr ToxB of *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat collection

A.M. Kokhmetova[1] ✉, Sh. Ali[2], Z. Sapakhova[1], M.N. Atishova[1]

[1] Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan
[2] Agronomy, Horticulture, and Plant Science Department, South Dakota State University, Brookings, SD 57006, USA

Pyrenophora tritici-repentis (Ptr) is the causative agent of tan spot, one of the yield limiting diseases of wheat, rapidly increasing in wheat growing countries including Kazakhstan. The aim of this study was the identification of wheat genotypes with resistance to Ptr race 1 and race 5 and their host-selective effectors (toxins) Ptr ToxA and Ptr ToxB. A common wheat collection of 41 accessions (38 experimental and 3 controls) was characterized using the molecular markers *Xfcp623* and *XBE444541*, diagnostic for the *Tsn1* and *Tsc2* genes conferring sensitivity to fungal toxins. The coincidence of the marker *XBE444541* with resistance to race 5 was 92.11 %, and with Ptr ToxB, 97.37 %. Genotyping results using the marker *Xfcp623* confirmed the expected response to Ptr ToxA; the presence/absence of the marker *Xfcp623* completely (100 %) coincided with sensitivity/resistance to race 1 and Ptr ToxA. This demonstrates the reliability of the diagnostic marker *Xfcp623* for identifying wheat genotypes with resistance to the fungus and insensitivity to Ptr ToxA. The study of the reaction of wheat germplasm to the fungal inoculation and toxin infiltration showed that out of 38 genotypes analyzed 30 (78 %) exhibited resistance to both race 1 and race 5, and insensitivity to toxins Ptr ToxA and ToxB. Of most significant interest are eight wheat genotypes that showed resistance/insensitivity both to the two races and two toxins. The results of phenotyping were reconfirmed by the molecular markers used in this study. Sensitivity to Ptr ToxB is not always correlated with susceptibility to race 5 and is dependent on the host's genetic background of the wheat genotype, i. e. on a specific wheat genotype. The results of the study are of interest for increasing the efficiency of breeding based on the elimination of the genotypes with the dominant alleles *Tsn1* and *Tsc2*

Received September 3, 2018
Revised October 5, 2018
Accepted October 8, 2018
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: gen_kalma@mail.ru

sensitive to the toxins Ptr ToxA and ToxB. The genotypes identified will be used in wheat breeding for resistance to tan spot.

Key words: wheat; *Pyrenophora tritici-repentis*; tan spot; *Tsn1*; *Tsc2*; ToxA; ToxB; PCR.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кохметова А.М., Али С., Сапахова З., Атишова М.Н. Идентификация генотипов-носителей устойчивости к токсинам пиренофороза Ptr ToxA и Ptr ToxB *Pyrenophora tritici-repentis* в коллекции мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kokhmetova A.M., Ali Sh., Sapakhova Z., Atishova M.N. Identification of genotypes-carriers of resistance to tan spot Ptr ToxA and Ptr ToxB of *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat collection. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440 (in Russian)

Увеличение производства пшеницы и изменения в практике ее возделывания включают переход от традиционной обработки почвы к минимальной, с сохранением стерни на ее поверхности, и негативно влияют на фитопатологическую ситуацию. Монокультура и возделывание сортов пшеницы с недостаточным уровнем устойчивости к болезням способствуют накоплению инфекционного потенциала и развитию болезней листовых пятнистостей (БЛП) до масштабов эпидемии. Источниками инфекции являются инфицированные семена, растительные остатки посева предыдущего года, пораженные растения и дикорастущие злаки, восприимчивые к БЛП. Повышение температуры и проявление засухи из-за изменения климата приводят к быстрому старению листьев, что увеличивает распространение БЛП и угрожает глобальному производству пшеницы. В условиях, благоприятных для развития пиренофороза, потери урожая могут превышать 50 % (Rees et al., 1988). Вредоносность болезни заключается в уменьшении ассимиляционной поверхности, возрастании транспирации, уменьшении накопления органического вещества, поражении всех надземных органов растений, а также в потере качества зерна из-за формирования мелкого и невыполненного зерна.

Пиренофороз – одно из самых опасных и вредоносных заболеваний мягкой и твердой пшеницы во многих сельскохозяйственных регионах, которое быстро прогрессирует как во всем мире, так и в Казахстане. Эпифитотия этой болезни была ранее обнаружена в Бельгии (Maraite et al., 1992), Англии (Cook, Yarham, 1989), Румынии (Dumitras, Bontea, 1981), Польше, Венгрии, Латвии и Чехии (Šarová et al., 2003). На территории СНГ патоген встречается в России, Молдове, Украине, Белоруссии, Центральной Азии и Казахстане (Поспехов, 1989; Султанова, 2007).

В настоящее время отмечается нарастающее распространение и увеличение вредоносности пиренофороза пшеницы в Казахстане. В 1986 г. в северном регионе Казахстана пиренофороз на яровой пшенице развивался до уровня эпифитотии, с охватом 50–63 % площадей. Последующие эпифитотии с распространением до 40–50 % отмечались в 1993–1994 гг. В предгорной зоне Южного и Юго-Восточного Казахстана эпифитотийное развитие болезней листовых пятнистостей на озимой пшенице наблюдали четыре раза: в 1993, 2002 и 2003 гг. В период 2000–2005 гг. в этом регионе трижды происходило эпифитотийное развитие желтой ржавчины совместно с желтой пятнистостью листьев и септориозом. Установлено, что среди коммерческих и перспективных казахстанских сортов озимой пшеницы отсутствуют образцы, устойчивые к пиренофорозу (Койшибаев, 2002). В Восточном Казахстане заболевание отмечается ежегодно с пораженностью от 10–25 до 50–75 %. С увеличением доли озимой пшеницы в структуре посевов и ее возделыванием в монокультуре поражаемость болезнями листовых пятнистостей в Алматинской области повысилась до 75 % (Койшибаев, 2002).

Каждое совместное взаимодействие между базовой расой и соответствующей ей дифференцирующей линией происходит через посредника – хозяин-специфичный токсин (host selective toxins – HST). К настоящему времени известны четыре HST *Pyrenophora tritici-repentis*, каждый из которых имеет свою характеристику: токсин Ptr ToxA индуцирует некроз; токсины Ptr ToxB и Ptr ToxC – хлорозы; токсин Ptr ToxD индуцирует некроз и хлороз одновременно (Ballance et al., 1989; Ali et al., 2010). Идентифицированы изоляты *P. tritici-repentis*, производящие все возможные комбинации токсинов Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC, которые соответственно ранжированы как расы от 1-й до 8-й (Lamari, Bernier, 1989; Strelkov, Lamari, 2003).

Токсин Ptr ToxA – продукт одиночного гена, отвечает за развитие некрозов в тканях чувствительных образцов пшеницы, является рибосомально-синтезируемым белком с молекулярной массой 13.2 кДа, длиной 117 аминокислотных остатков (Tuori et al., 1995). Ptr ToxA вызывает некроз, контролируется доминантным геном *Tsn1* и способен синтезироваться в расах 1, 2, 7 и 8 (Strelkov, Lamari, 2003). Второй HST, токсин Ptr ToxB, синтезируется в расах 5 (Orolaza et al., 1995), 6, 7 и 8 (Martinez et al., 2001). Это низкомолекулярный водорастворимый, относительно термостабильный хозяин-специфичный белок (6.61 кДа) длиной в 63–64 аминокислотных остатка, представленный множественными копиями в геноме изолятов *P. tritici-repentis*. Ptr ToxB вызывает хлороз и контролируется доминантным геном *Tsc2* (Friesen, Faris, 2004). Третий токсин, Ptr ToxC, также вызывает хлорозы, синтезируется расами 3, 6 и 8 (Lamari, Bernier, 1991). Некротрофные эффекторы (NE) рассматриваются как факторы вирулентности, и было выдвинуто предположение, что чувствительность к NE приводит к восприимчивости к болезням (Anderson et al., 1999).

Расовый состав *P. tritici-repentis* был изучен ранее в Казахстане (Lamari et al., 2005; Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006). Анализ вирулентности *P. tritici-repentis*, распространенного в странах, расположенных по направлению Великого шелкового пути, показал широкое разнообразие патогена в Азербайджане и Сирии, где обна-

ружено по шесть и восемь рас соответственно, в то время как в Казахстане, Кыргызстане и Узбекистане выявлено только по две расы (Lamari et al., 2005). В Северном Казахстане наиболее распространенной оказалась раса 1. К ней относятся 87 % изолятов *P. tritici-repentis* из Центральной Азии и Казахстана, и только 7, 5 и 1 % были идентифицированы как расы 2, 3 и 4 соответственно (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006). В результате сравнительного изучения расового состава *P. tritici-repentis* в России идентифицированы расы 1, 2, 4 и 8, а в Казахстане обнаружены расы 1, 3, 4, 6 и 8. На территории Северного Кавказа России доминировали расы 1 и 2, в Казахстане – расы 1 и 8 (Кохметова и др., 2016). Е.И. Гультяева с соавт. (2018) обнаружили высокое генетическое сходство омской популяции с североказахстанской и челябинской, что говорит о единой эпидемиологической зоне и возможности генного потока между изученными популяциями. Это следует учитывать при размещении в данных регионах генетически устойчивых сортов пшеницы.

Молекулярные исследования генов, контролирующих реакцию на хозяин-специфичные токсины *P. tritici-repentis*, позволили разработать молекулярные диагностики отдельных токсинов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Михайлова и др., 2012). Первые праймеры для генов устойчивости к токсинам ToxB и toxB предложены в статье (Martinez et al., 2004). В 2007 г. была разработана множественная (мультиплексная) ПЦР, позволяющая одновременно выявлять аллели генов *ToxA*, *ToxB* и *toxB* при наличии внутреннего контроля – гена «домашнего хозяйства» *CHS-1*, контролирующего хитинсинтетазу (Andrie et al., 2007). Исследование по позиционному клонированию *Tsn1* с использованием маркирующей популяции тетраплоидной пшеницы привело к созданию SSR-маркеров *Xfcp1* и *Xfcp2*, расположенных в интервале 0.8 cM от гена *Tsn1* (Lu, Faris, 2006; цит. по: Михайлова и др., 2012). В последующем были получены другие SSR-маркеры: *Xfcp620* и *Xfcp394*, локализованные в интервале 0.07 cM от гена *Tsn1*, а также *Xfcp623*, локализованный в длинном плече хромосомы 5B в интроне 5, в позиции 4901…5280 локуса *Tsn1*, тесно сцепленный с геном устойчивости к болезни (Zhang et al., 2009; Faris et al., 2010). Для идентификации носителей гена устойчивости к токсину Ptr ToxB (ген *Tsc2*) использовался STS-маркер *XBE444541*, локализованный в коротком плече хромосомы 2B, который сцеплен с геном устойчивости к пиренофорозу пшеницы на расстоянии 0.6 cM (Abeysekara et al., 2010). Наличие эффективных молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами устойчивости к токсинам, позволяет проводить молекулярный скрининг селекционного материала пшеницы.

Целью исследования была идентификация генотипов-носителей устойчивости к *P. tritici-repentis* с использованием рас и токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB, а также молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Tsn1* и *Tsc2*, контролирующими чувствительность к токсинам гриба.

Материалы и методы

Исследования проводили на коллекции из 41 образца мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, включающей перспективные линии и сорта казахстанской и зарубежной селекции, в том числе 17 казахстанских, 4 российских, 17 образцов из CIMMYT и ICARDA, 1 сорт из Египета и 2 линии из Канады (см. таблицу). Сорт Salamouni использован в качестве невосприимчивого контроля для рас 1 и 5 пиренофороза и токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB; сорт Glenlea – в качестве восприимчивого контроля для расы 1 и токсина Ptr ToxA (Faris et al., 2010); линия 6B662 – в качестве восприимчивого контроля для расы 5 и токсина Ptr ToxB (Singh et al., 2010).

Изоляты рас Ptr 1 и 5 были предоставлены Dr. S. Ali (Университет Южной Дакоты, США) и использовались для оценки устойчивости коллекции образцов пшеницы к *P. tritici-repentis*. Размножение культуры гриба *P. tritici-repentis* выполняли по методике Л.А. Михайловой и др. (2012). Токсин Ptr ToxA индуцирует образование некрозов у растений сорта пшеницы Glenlea, а токсины Ptr ToxB и Ptr ToxC индуцируют образование хлорозов у растений линии 6B662.

Изучение устойчивости образцов пшеницы к *P. tritici-repentis* проводили в теплице при температуре 21 °C с 16-часовым фотопериодом. Растения пшеницы выращивали до фазы двух листьев в 25 мл пластиковых вазонах, заполненных песком, на гидропонике с применением питательного раствора Кнопа. Листья растений, взятых в качестве контроля, вместо токсинов инфильтровали 25 мкл стерильной дистиллированной воды (Чесноков и др., 1960). В каждый вазон помещали по пять растений каждого сорта. Опыт проводили в трехкратной повторности. Растения заражали определенной расой возбудителя болезни (водно-конидиальной суспензией спор) путем опрыскивания из пульверизатора. Концентрация спор в суспензии составляла 3 000–5 000 спор/мл. Влажный период в течение 18 ч поддерживали с помощью полиэтиленовых изоляторов. Учет степени развития заболевания проводили на 7–8-е сутки по шкале Lamari, Bernier (1989), согласно которой сорта с проявлением некротической реакции 1–2 балла относили к устойчивым (R) образцам, а с типом реакции некроза 3–5 баллов – к восприимчивым (S). На линии 6B662 оценивали наличие или отсутствие хлороза по той же шкале.

Инфильтрацию токсинами проводили на проростках пшеницы на стадии двух листочков (Lamari et al., 2003; Xu et al., 2004). Условия выращивания растений описаны выше. Второй лист (три растения из каждого образца) подвергали инфильтрации 25 мкл очищенных токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB (предоставлены Dr. S. Ali, Университет Южной Дакоты, США) с использованием шприца на 1 мл. Четыре листа каждого сорта/линии обрабатывали дважды культуральным фильтратом каждого из тестируемых токсинов. Затем инфильтрированные растения помещали в ростовую камеру при температуре 21 °C с 16-часовым фотопериодом. Растения оценивали через 4 дня после инфильтрации. Листья растений, взятых в качестве контроля, вместо токсинов инфильтровали 25 мкл стерильной дистиллированной воды. По присутствию/отсутствию симптомов некроза для ToxA или хлороза для ToxB на инфильтрованной стороне листа оценивали образцы как чувствительные или нечувствительные к HST.

Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществляли из листьев 5-дневных проростков пше-

The allelic states of the *Tsn1* and *Tsc2* genes in wheat accessions and their responses to infection with *P. tritici-repentis*

Accession	Origin	Allelic state of molecular markers		Response to isolates of Ptr races and HST toxins			
		Xfcp623, *Tsn1*	*XBE444541*, *Tsc2*	Race 1	ToxA	Race 5	ToxB
Alikhan	Kazakhstan	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Astana	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Dostyk	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
Derbes	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Kazakhstanskaya 25	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Kazakhstanskaya rannespelaya	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Keremet	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Kokbiday	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Konditerskaya	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Lazzat	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Lutescens 90	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
428g/MK-122A	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Albidum 31	Russia	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Omskaya 28	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Omskaya 35	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Omskaya 36	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Chum/8/jup/bjy	CIMMYT	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
SOMO/SORO/ACTS5	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
DOMOJNJA	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
CORYDON	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
BR14/CEP847-1	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
BR14/CEP847-2	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
BR17/CNT8//BR17/PF80 1004	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
F3.71/TRM/VORONA/3/OC14	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
NANJTNG82149 KAUZ	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
ECHA/LI115	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
TRAP#1/BOW	»	*tsn1*	*tsc2*	2	I	2	I
CROC 1AE	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
EFED/LE2150	»	*tsn1*	*tsc2*	1	I	2	I
Bunyodkor	CIMMYT-ICARDA-IWWIP	*tsn1*	*tsc2*	2	I	1	I
Aray	Kazakhstan	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	3	I
Koksu	»	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	2	S
Ramin	»	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	3	S
428/Umanka-17	»	*Tsn1*	*Tsc2*	3	S	4	S
428/Umanka-18	»	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	4	S
KR11-20	CIMMYT-ICARDA-WWIP	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	2	S
ZM23524	CIMMYT	*Tsn1*	*Tsc2*	3	S	1	S

End of the table

Accession	Origin	Allelic state of molecular markers		Response to isolates of Ptr races and HST toxins			
		Xfcp623, *Tsn1*	*XBE444541*, *Tsc2*	Race 1	ToxA	Race 5	ToxB
JAS58/JAS55//ALD/3/MRNG/4/ALD	CIMMYT	*Tsn1*	*Tsc2*	4	S	3	S
Salamouni	Египет	*tsn1*	*tsc2*	1	I	1	I
Glenlea	Канада	*Tsn1*	No data	5	S	No data	No data
6B662	»	No data	*Tsc2*	No data	No data	4	S

Notes: *Xfcp623* is the SSR marker to the *Tsn1* locus sensitive to Ptr ToxA, amplifies a 380 bp DNA fragment; *XBE444541*, the STS marker to the *Tsc2* locus, amplifies a 340 bp DNA fragment in wheat samples sensitive to ToxB and 505 bp in insensitive; Salamouni, the insensitive control for races 1 and 5, toxins Ptr ToxA, and Ptr ToxB, carrier of the recessive genes *tsn1* and *tsc2*; Glenlea, the susceptible control for race 1 and Ptr ToxA, carrier of the dominant *Tsn1* gene; 6B662, susceptible control for race 5 and Ptr ToxB, carrier of the dominant *Tsc2* gene. Numerals 1–5 are lesion scores based on the Lamari and Bernier (1989) scale; 1–2 indicates resistance, and 3–5, susceptibility. The reaction to HST toxin infiltration: I, insensitivity; S, susceptibility.

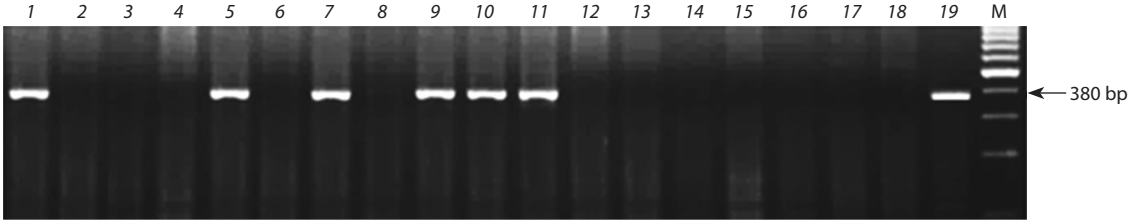
ницы с помощью CTAB-метода (Riede, Anderson, 1996). Качество выделенных проб ДНК проверяли в 1 % агарозном геле. Вторичный контроль на чистоту и качество выполняли на спектрофотометре SmartSpecTMPlus (Bio-RAD). После количественной оценки концентрация ДНК была нормализована до 30 нг/мкл для последующей ПЦР. Количество ДНК соответствовало протоколу ПЦР для идентификации соответствующего гена устойчивости. Для идентификации носителей генов устойчивости использовали метод ПЦР с праймерами, фланкирующими диагностические маркеры генов, и пробами ДНК коллекции из 41 образца мягкой пшеницы. Генотипы с аллелем гена *Tsn1*, чувствительного к токсину Ptr ToxA, выявляли с помощью SSR-маркера *Xfcp623* (Zhang et al., 2009), носители аллеля гена *Tsc2*, чувствительного к токсину Ptr ToxB, – с использованием STS-маркера *XBE444541* (Abeysekara et al., 2010). Маркер имеет два аллеля: 380 п. н. (доминантный аллель гена *Tsn1*, сцепленный с чувствительностью) и нуль-аллель (рецессивный аллель гена *tsn1*, сцепленный с устойчивостью к токсину Ptr ToxA) (Zhang et al., 2009). Сиквенс праймеров маркера *Xfcp623* (5′–3′): F – CTATTCGTAATCGTGCCTTCCG; R – CCTTCTCTCTCACCGCTATCTCATC (Faris et al., 2010). *XBE444541* – STS-маркер к локусу *Tsc2*, чувствительному к Ptr ToxB. Маркер имеет два аллеля: 340 п. н. (доминантный аллель гена *Tsc2*, сцепленный с чувствительностью к токсину Ptr ToxA) и 505 п. н. (рецессивный аллель гена *tsc2*, сцепленный с устойчивостью к токсину Ptr ToxB). Сиквенс праймеров маркера *XBE444541* (5′–3′): F – TGGACCAGTATGAGA; R – TTCTGGAGGATGTTGAGCAC (Abeysekara et al., 2010).

Объем реакционной смеси для ПЦР с маркерами *Xfcp623* и *XBE444541* составлял 25 мкл и содержал 2.5 мкл геномной ДНК (30 нг), 1 мкл каждого праймера (1 pM/мкл) (Sigma-Aldrich), 2.5 мкл смеси dNTP (2.5 мМ, водный раствор dCTP, dGTP, dTTP и dATP) (ЗАО «Силекс», Россия), 2.5 мкл $MgCl_2$ (25 мМ), 0.2 мкл Taq-полимеразы (5U, 5 ед/мкл) (ЗАО «Силекс», Россия), 2.5 мкл 10X ПЦР-буфера, 12.8 мкл ddH_2O. ПЦР-амплификацию с маркерами проводили на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Режим ПЦР-амплификации с *Xfcp623*: начальная денатурация при 94 °C в течение 3 мин; 45 циклов: 94 °C в течение 1 мин, отжиг при 60 °C в течение 1 мин, 72 °C в течение 2 мин; финальная элонгация при 72 °C в течение 10 мин. ПЦР с маркером *XBE444541* выполняли при следующем режиме: начальная денатурация при 94 °C в течение 5 мин; 45 циклов: 94 °C в течение 30 с, отжиг при 58 °C в течение 30 с, 72 °C в течение 2 мин; финальная элонгация при 72 °C в течение 7 мин. Для разделения амплифицированных фрагментов проводили электрофорез в 2 % агарозном геле в TBE-буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA, pH 8) (Chen et al., 1998) с добавлением этидиум бромида и в присутствии маркера размеров фрагментов Gene-RulerTM, 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Визуализацию гелей осуществляли в гельдокументирующей системе Mega Bio-Print 1100/26M (Vilber Lourmat).

Результаты

Поиск генотипов-носителей аллелей генов устойчивости к пиренофорозу *P. tritici-repentis* был осуществлен в результате молекулярного анализа и скрининга коллекции образцов пшеницы, основанного на реакции к изолятам расы 1 и расы 5 гриба и к хозяин-специфичным токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Реакции генотипов пшеницы на изоляты рас и токсины Ptr ToxA и Ptr ToxB представлены в таблице.

В целом частота устойчивых к расе 1 и расе 5 образцов в коллекции пшеницы была достаточно высокой и составила 79 %. Наибольший интерес представляют восемь образцов пшеницы: Kokbiday, 428g/MK-122A, Lutescens 90, Lazzat, Omskaya 28, Omskaya 36, SOMO/SORA/ACTS5, BR14/CEP847-1 и BR14/CEP847-2, которые показали высокую устойчивость (1 балл) как к двум расам (1 и 5), так и к двум токсинам (Ptr ToxA и Ptr ToxB), а также подтвердили невосприимчивость HST к токсинам при молекулярном скрининге (см. таблицу). Умеренная степень устойчивости к расам и токсинам *P. tritici-repentis* отмечена у 21 образца пшеницы. Наиболее устойчивые к пиренофорозу образцы представлены в линиях из CIMMYT (36.8 % образцов) и Казахстана (31.6 %). Восприимчивость практически ко всем изученным расам и токсинам обнаружена у восьми образцов пшеницы, включая пять казахстанских образцов и три зарубежные линии. Изоляты расы 5 не всегда вызывали хлороз у генотипов пшеницы, для которых выявлено наличие аллеля гена *Tsc2*, чувствительного к токсину



DNA amplification products of wheat accessions with primers to the diagnostic marker *Xfcp623* linked to the *Tsn1* gene, controlling sensitivity to Ptr ToxA. Resolved in 2 % agarose gel.

1, 428/Umanka-17; *2*, 428g/MK-122A; *3*, Kokbiday; *4*, Lazzat; *5*, 428/Umanka-18; *6*, Omskaya 28; *7*, KR11-20; *8*, Omskaya 36; *9*, JAS58/JAS55//ALD/3/MRNG/4/ALD; *10*, Koksu; *11*, ZM23524; *12*, SOMO/SORO/ACTS5; *13*, BR14/CEP847; *14*, Astana; *15*, Kazakhstanskaya 25; *16*, Kazakhstanskaya Rannespelaya; *17*, Keremet; *18*, Salamouni; *19*, Glenlea; M, molecular weight marker (Gene-RulerTM; 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Lithuania)).

Ptr ToxB. Так, устойчивая реакция к расе 5 обнаружена у линий ZM23524 и KR11-20. У этих генотипов отмечена устойчивая реакция на изолят расы 5 при наличии аллеля гена чувствительности *Tsc2*, обнаруженного в результате ПЦР, и реакция хлороза на токсин Ptr ToxB. При инфильтрации растений сорта пшеницы Aray токсином Ptr ToxB и заражении изолятом расы 5 наблюдали нечувствительность к токсину и восприимчивость к изоляту гриба.

Генотипирование образцов пшеницы с использованием молекулярных маркеров было направлено на идентификацию носителей генов, контролирующих чувствительность и устойчивость к токсинам HST Ptr ToxA и Ptr ToxB. Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п. н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину Ptr ToxA у восьми образцов пшеницы и контроля Glenlea, носителя гена *Tsn1* (см. таблицу, рисунок). Выделенные восемь образцов пшеницы были чувствительны к расе 1 и токсину Ptr ToxA. Нуль-аллель маркера *Xfcp623* оказался сцепленным с нечувствительностью к токсину в 30 образцах пшеницы и в контроле Salamouni. Степень сцепления маркера *Xfcp623* с фенотипированием по устойчивости к расе 1 и Ptr ToxA составила 100 %. По результатам скрининга образцов пшеницы, основанного на реакции к изоляту расы 1 и инфильтрату HST Ptr ToxA, все 30 образцов проявили нечувствительность к расе 1 и токсину Ptr ToxA. На рисунке представлен пример электрофореграммы с данными ПЦР, отражающей наличие/отсутствие в исследуемых образцах локуса *Tsn1*, чувствительного к Ptr ToxA.

Маркер *XBE444541* амплифицировал фрагмент 340 п. н., сцепленный с аллелем гена *Tsc2*, контролирующим чувствительность к токсину в восьми образцах пшеницы и в контроле 6B662 (см. таблицу). Пять из этих восьми образцов были чувствительны к расе 5; семь из восьми образцов показали также чувствительность к токсину Ptr ToxB. В случаях амплификации фрагмента длиной 505 п. н., маркер *XBE444541* указывал на сцепление с нечувствительностью (устойчивостью) к токсину у 30 образцов пшеницы и в контроле Salamouni. Все отмеченные образцы проявили нечувствительность к расе 5 и токсину Ptr ToxB при скрининге генотипов с помощью изолята расы 5 и инфильтрата HST Ptr ToxB. Степень сцепления маркера *XBE444541* с нечувствительностью к расе 5 составила 92 %, а к Ptr ToxB – 97 %.

Частота встречаемости аллеля маркера *Xfcp623*, сцепленного с геном *tsn1*, а также аллеля маркера *XBE444541*, сцепленного с геном *tsc2*, контролирующих нечувствительность к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB соответственно, составила в обоих случаях 79 % (30 образцов). Встречаемость аллелей маркеров, сцепленных с доминантными аллелями генов *Tsn1* и *Tsc2*, контролирующих чувствительностью к Ptr токсинам, составила 21 % (8 образцов).

SSR-маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент размером 380 п. н., сцепленный с доминантным аллелем *Tsn1* и определяющий чувствительность к Ptr ToxA у шести образцов: 428/Umanka-17, 428/Umanka-18, KR11-20, JAS58/JAS55//ALD/3/MRNG/4/ALD, Koksu, ZM23524 и у контроля Glenlea. Другой аллель, обнаруженный с помощью маркера *Xfcp623* у остальных образцов пшеницы, представлял собой нуль-аллель, характерный для нечувствительных к ToxA генотипов и указывающий на рецессивное состояние аллеля *tsn1*.

Обсуждение

Несмотря на то что пиренофороз – чрезвычайно важное заболевание пшеницы, в научной литературе по-прежнему недостаточно информации об устойчивости к болезни и преобладающим расам *P. tritici-repentis* среди сортов пшеницы, возделываемых в Казахстане. Предложенное исследование является одним из первых в этом регионе и включает комплексный скрининг с использованием рас и очищенных токсинов, а также молекулярный анализ на присутствие известных генов, контролирующих устойчивость к болезни. В последнее время проведены исследования, направленные на оценку устойчивости гермоплазмы пшеницы к пиренофорозу (Chu et al., 2008; Singh et al., 2010, 2016; Kokhmetova et al., 2017; Dinglasan et al., 2018). Известно, что *Tsn1* и *Tsc2* вместе с другими генами играют большую роль в патогенезе; выявлены аддитивные эффекты, которые показали эффективность аккумуляции аллелей генов устойчивости для селекции на устойчивость к пиренофорозу (Kollers et al., 2014). Некротрофные эффекторы (NE) *P. tritici-repentis* ToxA и ToxB вызывают развитие пятнистости листьев при распознавании доминантными аллелями генов *Tsn1* и *Tsc2* (Virdi et al., 2016). В ряде работ показаны статистически значимые взаимосвязи между чувствительностью к NE

и восприимчивостью к *P. tritici-repentis* (Lamari, Bernier, 1989; Friesen, Faris, 2004; Abeysekara et al., 2010). В нашем исследовании NE *P. tritici-repentis* ToxA и ToxB использованы как факторы вирулентности для скрининга гермоплазмы пшеницы с NE-содержащими культурами, чтобы предсказывать их реакцию на пиренофороз.

Настоящее исследование обусловлено необходимостью расширения генетического полиморфизма с привлечением разнородных источников устойчивости, которые могут применяться в селекции устойчивых к *P. tritici-repentis* сортов пшеницы. Эту задачу удалось решить на основе использования ПЦР, изолятов рас и токсинов Ptr ToxA и Ptr ToxB. С помощью молекулярных маркеров *Xfcp623* и *XBE4444541*, диагностических для генов *Tsn1* и *Tsc2*, связанных с чувствительностью к Ptr ToxA и Ptr ToxB, была охарактеризована коллекция из 41 образца мягкой пшеницы. Результаты генотипирования гермоплазмы пшеницы с использованием молекулярного маркера *XBE444541* соответствовали фенотипическим реакциям к расе 5 со степенью сцепления 92.11 %, а к Ptr ToxB – со степенью сцепления 97.37 %. Результаты генотипирования с использованием молекулярного маркера *Xfcp623* соответствовали фенотипическим реакциям нечувствительности или чувствительности к токсину ToxA со 100 % степенью сцепления. Это позволяет сделать заключение об адекватности и надежности диагностического маркера *Xfcp623* для идентификации носителей устойчивости к токсину ToxA пиренофороза. Эффективность маркера *Xfcp623* обусловлена его локализацией внутри гена *Tsn1*, в интроне 5 этого локуса, в позиции 4901…5280 (Faris et al., 2010). В базе данных Komugi (Wheat Genetic Resources DataBase) ген *Tsn1*, зарегистрированный как ген чувствительности к HST ToxA, характеризуется наличием 8 экзонов и S/TPK-NBS-LRR структурой. Указывается, что для функционирования гена *Tsn1* необходимы все три домена, при этом белок TSN1 не взаимодействует напрямую с ToxA.

Изучение реакции гермоплазмы пшеницы на инокуляцию и инфильтрацию позволило выявить более 78 % образцов, устойчивых одновременно как к расам 1 и 5, так и к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Полученные данные совпадают с более ранними результатами изучения коллекции пшеницы, где нечувствительная реакция к Ptr ToxA наблюдалась у большинства (64.5 %) изученных генотипов пшеницы (Kokhmetova et al., 2017). С практической точки зрения, наибольший интерес представляют восемь образцов пшеницы, продемонстрировших самую высокую устойчивость одновременно к двум расам (1 и 5) и двум токсинам (Ptr ToxA и Ptr ToxB), а также подтвердивших невосприимчивость к HST при молекулярном скрининге. Однако изолят расы 5 не всегда вызывал хлороз у генотипов пшеницы, для которых предполагалось наличие доминантного аллеля гена *Tsc2*, чувствительного к токсину Ptr ToxB. Так, устойчивая реакция к расе 5 вместо ожидаемой восприимчивой обнаружена у линий пшеницы ZM23524 и KR11-20. При инфильтрации токсином Ptr ToxB у сорта пшеницы Aray также вместо ожидаемой восприимчивой реакции наблюдалась нечувствительность к Ptr ToxB. Это согласуется с результатами ряда исследований, посвященных взаимодействию *Tsn1*–Ptr ToxA, где показано, что чувствительность к NE не всегда определяет чувствительность к *P. tritici-repentis*, а влияние взаимодействия *Tsn1*–Ptr ToxA в развитии болезни зависит от генетического фона хозяина, т. е. от конкретного генотипа пшеницы (Chu et al., 2008; Faris et al., 2012; Kariyawasam et al., 2016). В статье (Мироненко, Коваленко, 2018) на примере взаимодействия аллелей гена *Tsn1* и гена-эффектора *P. tritici-repentis* ToxA в конкретных парах генетически охарактеризованных образцов пшеницы и изолятов патогена показано, что один и тот же признак «образование некроза на листьях» в сочетаниях различных генотипов сорт–изолят имеет разную генетическую природу. Эффекты взаимодействия *Tsn1*–ToxA на пиренофороз у мягкой пшеницы могут варьировать от незначительных до очень значительных в зависимости от генетического фона хозяина (Virdi et al., 2016). Авторы последней работы предположили, что некоторые генотипы пшеницы обладают факторами, которые приводят к изменению уровней экспрессии гена ToxA через эпистаз или каким-то образом ингибируют распознавание токсина ToxA геном *Tsn1* в растениях, зараженных спорами гриба.

Для успешной селекции на иммунитет большое значение имеет международное сотрудничество с CIMMYT. Согласно нашим исследованиям, сорта, устойчивые к пиренофорозу, следует создавать с использованием разнообразных источников гермоплазмы. В качестве доноров устойчивости необходимо привлекать к гибридизации образцы из коллекции CIMMYT, России и Казахстана. Полученные нами результаты создают возможность для перехода селекционного процесса в Казахстане на новый научный уровень за счет комплексного применения молекулярно-генетических и фитопатологических методов. Данные генотипирования и скрининга с использованием некротрофных эффекторов представляют интерес для повышения эффективности селекции на основе элиминации из селекционного материала носителей доминантных аллелей генов *Tsn1* и *Tsc2*, чувствительных к агрессивным токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB. Носители идентифицированных рецессивных аллелей *tsn1* и *tsc2* генов устойчивости к токсинам Ptr ToxA и Ptr ToxB *P. tritici-repentis* необходимо использовать в селекционных программах по повышению устойчивости к пиренофорозу пшеницы.

Acknowledgements

This study was supported by the Kazakhstan Ministry of Education and Science, project AP05132540.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Гультяева Е.И., Коваленко Н.М., Шаманин В.П., Тюнин В.А., Шрейдер Е.Р., Шайдаюк Е.Л., Моргунов А.И. Структура популяций листовых патогенов яровой пшеницы в западноазиатских регионах России и Северном Казахстане в 2017 г. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372.

[Gultyaeva E.I., Kovalenko N.M., Shamanin V.P., Tyunin V.A., Shreyder E.R., Shaydayuk E.L., Morgunov A.I. Population structure of leaf pathogens of common spring wheat in the West Asian regions

of Russia and Northern Kazakhstan in 2017. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372. (in Russian)]

Койшибаев М.К. Болезни растений. Алматы, 2002.
[Koyshibaev M.K. Diseases of Plants. Almaty, 2002. (in Russian)]

Кохметова А.М., Кремнева О.Ю., Кейшилов Ж.С., Султанова Н.Ж. Расовый состав и вирулентность изолятов *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и Северо-Кавказском регионе России. Eurasian J. Appl. Biotechnol. 2016;3:57-66.
[Kokhmetova A.M., Kremneva O.Yu., Keyshilov Zh.S., Sultanova N.Zh. Race range and virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates in the Republic of Kazakhstan and the North Caucasus region of Russia. Eurasian J. Appl. Biotechnol. 2016;3:57-66. (in Russian)]

Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Особенности взаимодействия генов *Tsn1* и *ToxA* в патосистеме *Triticum aestivum – Pyrenophora tritici-repentis.* Вестн. защиты растений. 2018;2(96):12-16.
[Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Interaction of the *Tsn1* and *ToxA* genes in the *Triticum aestivum – Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. Vestnik Zaschity Rasteniy = Plant Protection News. 2018; 2(96):12-16. (in Russian)]

Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб., 2012.
[Mihaylova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Tan Spot of Wheat. Guidelines for the study of populations of the tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* and resistance of varieties. St. Petersburg, 2012. (in Russian)]

Поспехов Г.В. Особенности роста и плодоношения гриба *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. в культуре. Микология и фитопатология.
[Pospekhov G.V. Features of the growth and fruiting of the cultured fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. Mikologia i Fitopatologia = Mycology and Phytopathology.1989;23(2):117-121. (in Russian)]

Султанова Н.Ж. Биологические особенности возбудителя желтой пятнистости листьев озимой пшеницы на юго-востоке Казахстана. Вестн. с.-х. науки Казахстана.
[Sultanova N.Zh. Biological features of the causative agent of tan spot of winter wheat leaves in southeastern Kazakhstan. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana = Bulletin of Agricultural Sciences of Kazakhstan. 2007;3:4-6. (in Russian)]

Чесноков В.А., Базырина Е.Н., Бушуева Т.М., Ильинская Н.Л. Выращивание растений без почвы. Л., 1960.
[Chesnokov V.A., Bazyrina E.N., Bushueva T.M., Il'inskaja N.L. Growing of Plants without Soil. Leningrad, 1960. (in Russian)]

Abeysekara N.S., Friesen T.L., Liu Z., McClean P.E., Faris J.D. Marker development and saturation mapping of the tan spot Ptr ToxB sensitivity locus *Tsc2* in hexaploid wheat. Plant Genome. 2010;3:179-189. DOI 10.3835/plantgenome2010.07.0017.

Ali S., Gurung S., Adhikar T.B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. Plant Dis. 2010;94:229-235. DOI 10.1094/pdis-94-2-0229.

Anderson J.A., Effertz R.J., Faris J.D., Francl L.J., Meinhardt S.W., Gill B.S. Genetic analysis of sensitivity to a *Pyrenophora tritici-repentis* necrosis-inducing toxin in durum and common wheat. Phytopathology. 1999;89:293-297.

Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti I.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. Phytopathology. 2007;97:694-701.

Ballance G.M., Lamari L., Bernier C.C. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989;35:203-213.

Chen X., Line R., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis. Theor. Appl. Genet. 1998;97:345-355.

Chu C.G., Friesen T.L., Faris J.D., Xu S.S. Evaluation of seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in tetraploid wheat. Crop Sci. 2008;48:1107-1116. DOI 10.2135/cropsci2007.09.0516.

Cook R.J., Yarham D.J. Occurrence of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* on wheat in England and Wales in 1987. Plant Pathol. 1989;38(1):101-102. DOI 10.1111/j.1365-3059.1989.tb01434.x.

Dinglasan E.G., Godwin I.D., Phan H.T.T., Tan K.-C., Platz G.J., Hickey L.T. Vavilov wheat accessions provide useful sources of resistance to tan spot (syn. yellow spot) of wheat. Plant Pathol. 2018; 67(5):1076-1087. DOI 10.1111/ppa.12822.

Dumitras L., Bontea V. Data noi privinol parasitul foliar al griulu *Helminthosporium repentis* Diedicke. Studii si Cercetari de Biologie Vegetala. 1981;33:169-172.

Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:13544-13549. DOI 10.1073/pnas.1004090107.

Faris J.D., Zhang Z., Rasmussen J.B., Friesen T.L. Tan spot susceptibility governed by the *Tsn1* locus and race nonspecific resistance quantitative trait loci in a population derived from the wheat lines Salamouni and Katepwa. Mol. Breed. 2012;30:1669-1678. DOI 10.1007/s11032-012-9750-7.

Friesen T.L., Faris J.D. Molecular mapping of resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat. Theor. Appl. Genet. 2004;109:464-471. DOI 10.1007/s00122-004-1678-9.

Kariyawasam G.K., Carter A.H., Rasmussen J.B., Faris J.D., Xu S.S., Mergoum M., Liu Z. Genetic relationships between race-nonspecific and race specific interactions in the wheat-*Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. Theor. Appl. Genet. 2016;129:897-908. DOI 10.1007/s00122-016-2670-x.

Kokhmetova A., Kremneva O., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot. J. Plant Pathol. 2017;99(1):161-167. DOI 10.4454/jpp.v99i1.3812.

Kollers S., Rodemann B., Ling J., Korzun V., Ebmeyer E., Argillier O., Hinze M., Plieske J., Kulosa D., Gana M.W., Roder M.S. Genome-wide association mapping of tan spot resistance (*Pyrenophora tritici-repentis*) in European winter wheat. Mol. Breed. 2014;34(2):363-371. DOI 10.1007/s11032-014-0039-x.

Lamari L., Bernier C.C. Evalution of wheat lines and cultivars to tan spot [*Perynophora tritici-repentis*] based on lesion type. Can. J. Plant Sci. 1989;11(1):49-56.

Lamari L., Bernier C.C. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. Phytopathology. 1991;81:1092-1095.

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; 27:383-388. DOI 10.1080/07060661.2012.695750.

Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A., Orabi J., Smith R.B. 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. Phytopathology. 2003;93(4):391-396. DOI 10.1094/phyto.2003.93.4.391.

Lu H.J., Faris J.D. Macro- and microcolinearity between the genomic region of wheat chromosome 5B containing the *Tsn1* gene and the rice genome. Funct. Integr. Genomics. 2006;6(2):90-103. DOI 10.1007/s10142-005-0020-1.

Maraite H., Berny J.F., Goffi A. Epidemiology of tan spot in Belgium. Proc. of the 2nd Int. Tan Spot Workshop. Fargo, North Dakota State Univ., 1992;73-79.

Maraite H., Mercado-Vergnes D., Renard M.-E., Zhanarbekova A., Duveiller E. Relevance of pathogen diversity in management of leaf spot and leaf blight diseases on wheat in Central Asia. Agromeridian. 2006;2:105-114.

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;17:467-474. DOI 10.1094/MPMI.2004.17. 5.467.

Martinez J.P., Ottum S.A., Ali S., Francl L.J., Ciuffetti L.M. Characterization of the *ToxB* gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant Microbe Interact. 2001;14:675-677. DOI 10.1094/mpmi.2001. 14.5.675.

Orolaza N.P., Lamari L., Ballance G.M. Evidence of a hostspecific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. Phytopathology. 1995;85:1282-1287.

Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis*. Aust. J. Agric. Res. 1988;39:141-151.

Riede C.R., Anderson J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. Crop Sci. 1996;36(4):905-909.

Šarová J., Hanzalová A., Bartoš P. Incidence of wheat leaf spot pathogens in the Czech Republic. Cereal Res. Commun. 2003;31:145-151.

Singh P.K., Crossa J., Duveiller E., Singh R.P., Djurle A. Association mapping for resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in CIMMYTs historical bread wheat set. Euphytica. 2016;207(3):515-525. DOI 10.1007/s10681-015-1528-7.

Singh P.K., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Elias E.M. Genetics of wheat – *Pyrenophora tritici-repentis* interactions. Euphytica. 2010; 171:1-13. DOI 10.1007/s10681-009-0074-6.

Strelkov S.E., Lamari L. Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. Can. J. Plant Pathol. 2003;25:339-349. DOI 10.1080/07060660309507089.

Tuori R.P., Wolpert T.J., Ciuffetti L.M. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant Microbe Interact. 1995;8:41-48.

Virdi S.K., Liu Z., Overlander M.E., Zhang Z., Xu S.S., Friesen T.L., Faris J.D. 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 (Bethesda). 2016;6(12):4139-4150. DOI 10.1534/G3.116.036525.

Xu S.S., Friesen T.L., Mujeeb-Kazi A. Seedling resistance to tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch in synthetic hexaploid wheats. Crop Sci. 2004;44:2238-2245.

Zhanarbekova A.B., Koishibayev M., Maraite H., Duveiller E., Mercado D.M., Sliamova N.D. The distribution of tan spot on wheat and race structure of *Drechslera tritici-repentis* in Kazakhstan and neighboring countries of CIS. Proc. Int. Sci. Conf. "Modern Problems of Plant Protection and Quarantine". Almaty, 2005;371-376.

Zhang Z., Friesen T.L., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification, and validation of markers for marker assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. Mol. Breed. 2009;23:35-49. DOI 10.1007/s11032-008-9211-5.

ORCID ID

A.M. Kokhmetova orcid.org/0000-0002-0186-7832

Z. Sapakhova orcid.org/0000-0002-8007-5066

M. Atishova orcid.org/0000-0002-2270-571X