



Numer zadania: **10**

Tytuł zadania: Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum* i ich związek z patogenicznością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew.

Okres realizacji zadania: **2014 - 2020 r.**

Kierownik zadania: Edward Arseniuk, Prof. dr hab. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Radzików, 05-870 Błonie;
Tel. (22) 733 46 30; e.arseniuk@ihar.edu.pl

Wykonawcy zadania

Imię i nazwisko	Stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Jakub Walczewski	Mgr, asystent	IHAR PIB Radzików
Piotr Ochodzki	Dr, adiunkt	
Iga Grzeszczak	Mgr, inżynier	
Elżbieta Lisicka	Technik	

Cele badań:

- 1) Opracowanie procedury testowania materiałów roślinnych na obecność genów warunkujących odporność na białkowe efekторы *P. nodorum*.
- 2) Zbadanie zdolności poszczególnych efektorów białkowych (toksyn) do indukcji nekrozy na próbie krajowych odmian z KRO i linii hodowlanych pszenżyta i pszenicy.
- 3) Zbadanie związku korelacyjnego między obecnością genów niewrażliwości na efekторы, a odpornością fenotypową na *P. nodorum* w warunkach fitotronowych (siewki) oraz polowych (rośliny dorosłe).
- 4) Opracowanie procedury testowania izolatów *P. nodorum* pod względem zdolności do produkcji efektorów białkowych.
- 5) Identyfikacja źródeł odporności na *P. nodorum* niezwiązanych z odpornością na toksyny.

Zakładane cele zostały osiągnięte.

Materialy i metody:



Material patogena:

- 1) Izolacja DNA;
- 2) Analiza PCR efektorów białkowych;
- 3) Produkcja efektorów Tox1, Tox3, ToxA;
- 4) Oczyszczanie efektora Tox5;
- 5) Infiltracja roślin;
- 6) Produkcja inokulum *P. nodorum*;

Material roślinny:

- 1) Ocena fenotypowa odporności roślin badanych obiektów w stadium siewki;
- 2) Ocena fenotypowa odporności roślin badanych obiektów w stadium dorosłym w warunkach polowych;
- 3) Analiza statystyczna odporności badanych obiektów na *P. nodorum* oraz wrażliwości na efekторы białkowe patogena.



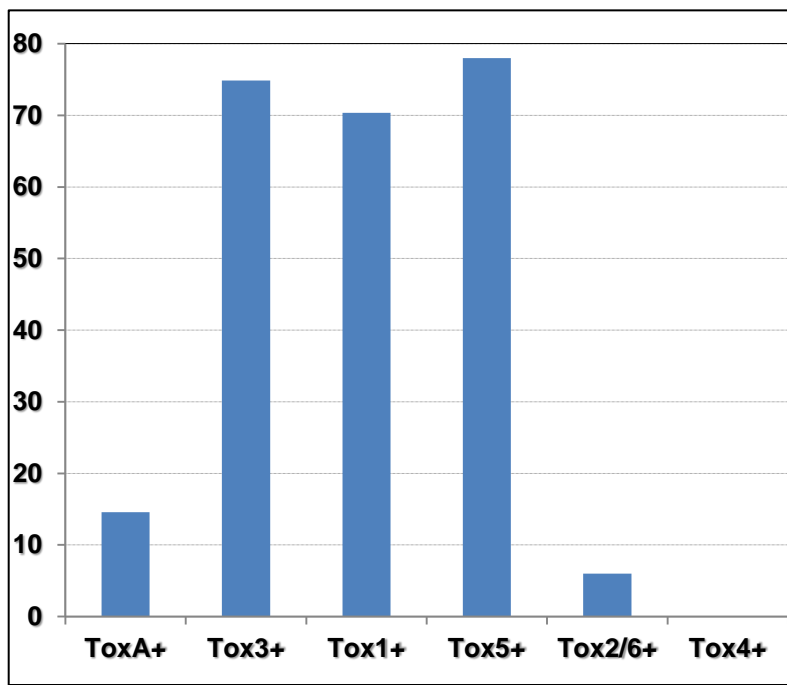
Nr zadania: 10

Wyniki:

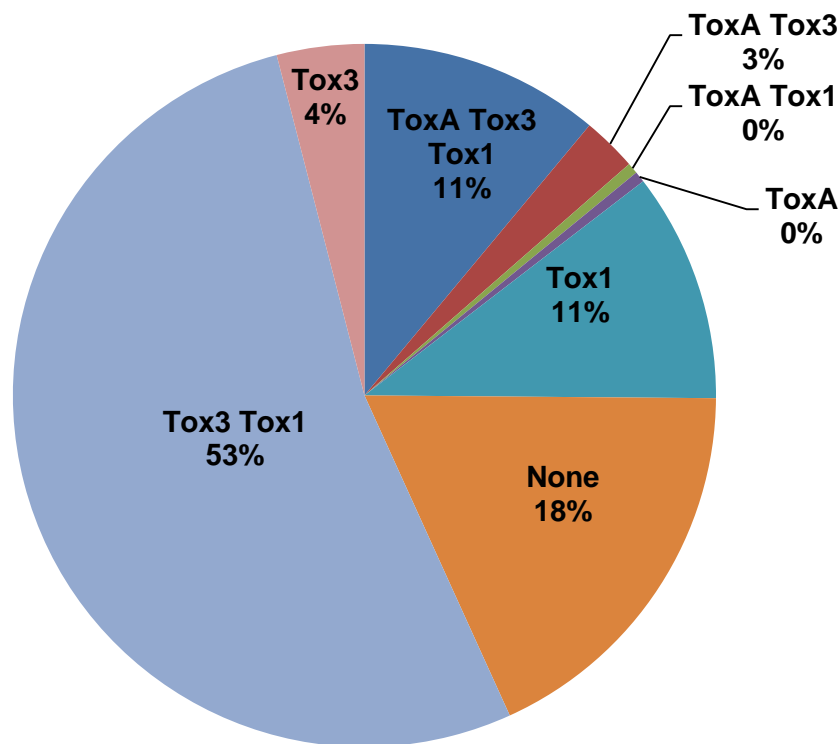
Analiza populacji *P. nodorum*:

Przy pomocy analizy PCR oraz testów biologicznych przetestowano w sumie 249 (199 i 50) izolatów *P. nodorum*.

Udział poszczególnych toksyn w populacji *P. nodorum*



Udział klas izolatów w populacji *P. nodorum*



Udział obiektów wrażliwych na efekторы białkowe w pulach genowych pszenicy

	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
Ogółem	10%	33%	13%	7%	44%
Program Hodowlany	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
Danko	6%	30%	12%	7%	48%
MHR	17%	24%	81%	8%	41%
PHR	7%	35%	10%	11%	45%
Smolice	11%	47%	15%	2%	37%
Strzelce	19%	22%	16%	7%	39%
Prefiks DW	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
AND	8%	43%	12%	7%	37%
C	12%	35%	6%	20%	35%
DC	0%	30%	11%	8%	59%
DD	5%	26%	18%	3%	44%
DL	7%	24%	13%	4%	54%
DM	10%	43%	5%	5%	33%
HRSM	0%	40%	20%	25%	60%
KBH	0%	50%	50%	25%	25%
KBP	6%	40%	15%	8%	40%
KOH	0%	100%	0%	25%	0%
MIB	0%	50%	17%	0%	33%
NAD	7%	27%	9%	14%	52%
POB	15%	32%	10%	10%	50%
SMH	12%	47%	15%	1%	35%
STH	23%	24%	17%	8%	39%
STHD	0%	11%	11%	0%	78%
Grupa	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
Odmiany	14%	31%	15%	5%	43%
DH	10%	15%	5%	5%	67%

Udział obiektów wrażliwych na efektory białkowe w pulach genowych pszenżyta

	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
Ogółem	4%	58%	38%	14%	16%
Program Hodowlany	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
Danko	5%	58%	40%	17%	18%
Strzelce	4%	61%	34%	15%	15%

Prefiks DW	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
BOH	6%	48%	24%	23%	19%
BOHD	0%	50%	50%	50%	0%
BOHT	0%	100%	42%	6%	0%
DANKO	5%	55%	33%	16%	20%
DAST	0%	88%	43%	0%	0%
DC	0%	44%	56%	56%	11%
DD	0%	0%	0%	0%	100%
DL	11%	70%	78%	10%	10%
DS.	17%	33%	50%	0%	33%
LM	B-D	100%	60%	25%	0%
MAH	3%	68%	42%	7%	11%
MAHD	0%	57%	50%	8%	29%

Grupa	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA	Niewrażliwe
Odmiiany	0%	59%	36%	11%	5%
DH	2%	57%	46%	9%	21%

Nr zadania: 10

Korelacja między niewrażliwością na efektory, a odpornością fenotypową.

Pszenica							
Korelacja między niewrażliwością na efektor, a odpornością siewek							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	-0,09	0,13	0,14	0,07	0,09	0,11	0,13
Tox3	0,18	0,41	0,54	0,79	0,65	0,58	0,47
Tox5	0,12	0,05	-0,09	0,11	0,12	0,11	-0,09
ToxA	0,18	0,03	-0,06	0,04	-0,02	-0,08	0,04

Korelacja między niewrażliwością na efektor, a odpornością polową							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	0,01	-0,07	0,00	0,03	0,12	0,12	0,18
Tox3	-0,08	0,20	0,20	0,32	0,12	0,19	0,22
Tox5	-0,22	-0,03	0,09	0,27	0,08	0,19	0,09
ToxA	-0,03	-0,07	0,02	0,11	0,10	0,06	-0,09

Pszenżyto							
Korelacja między niewrażliwością na efektor, a odpornością siewek							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	B-D	0,01	-0,13	-0,16	-0,08	-0,08	- 0,12
Tox3	-0,06	0,41	0,41	0,66	0,39	0,52	0,39
Tox5	0,14	0,29	0,13	0,19	0,28	0,30	0,06
Tox A	0,01	-0,05	-0,09	-0,10	-0,07	-0,08	- 0,19

Korelacja między niewrażliwością na efektor, a odpornością polową							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	B-D	-0,05	-0,03	0,02	-0,09	0,02	- 0,05
Tox3	0,37	-0,14	0,11	0,24	0,19	0,07	0,24
Tox5	0,01	0,03	-0,08	0,28	0,17	0,09	0,18
Tox A	-0,08	-0,16	0,07	-0,19	-0,13	-0,01	- 0,18

Kolorem oznaczono wartości istotne statystycznie przy $p < 0,05$

Nr zadania: 10

Tabela 4. Stopień zmienności porażenia wyjaśnianego przez wrażliwości na efekторы.

Pszenica							
Wyjaśniana zmienność porażenia w stadium siewki							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	2,66 %	2,30 %	0,69 %	0,03 %	0,33 %	0,12 %	3,92 %
Tox3	2,62 %	15,1 9%	26,1 3%	55,4 8%	37,4 3%	30,8 4%	25,94 %
Tox5	0,07 %	0,76 %	0,21 %	1,02 %	0,04 %	2,21 %	0,55 %
ToxA	1,93 %	0,19 %	0,58 %	1,96 %	0,50 %	0,02 %	0,28 %
Wyjaśniana zmienność porażenia w warunkach polowych							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	0,15 %	1,91 %	0,04 %	0,00 %	0,72 %	1,24 %	2,27 %
Tox3	1,88 %	3,92 %	2,16 %	3,42 %	0,23 %	4,19 %	4,76 %
Tox5	7,12 %	0,02 %	1,61 %	8,55 %	0,13 %	1,05 %	0,34 %
ToxA	0,25 %	0,19 %	0,10 %	2,75 %	1,31 %	0,61 %	0,76 %

Pszenżyto							
Wyjaśniana zmienność porażenia w stadium siewki							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	18,0 7%	0,02 %	0,26 %	0,00 %	0,03 %	0,45 %	0,05 %
Tox3	0,18 %	17,5 1%	13,3 7%	42,4 3%	12,5 3%	23,1 1%	13,5 1%
Tox5	8,54 %	12,7 3%	1,84 %	8,65 %	4,69 %	4,74 %	0,01 %
ToxA	0,32 %	1,48 %	0,00 %	7,07 %	0,03 %	0,01 %	2,73 %
Wyjaśniana zmienność porażenia w warunkach polowych							
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Tox1	9,96 %	1,91 %	0,15 %	0,99 %	0,25 %	0,48 %	0,09 %
Tox3	12,8 4%	3,92 %	2,19 %	5,04 %	2,72 %	0,67 %	4,07 %
Tox5	0,25 %	0,02 %	0,53 %	5,44 %	2,04 %	0,98 %	1,72 %
ToxA	1,05 %	0,19 %	0,71 %	0,58 %	0,04 %	0,23 %	1,36 %

Nr zadania: 10

Tabela 5. Wartości korelacji między niewrażliwością, a odpornością dla wszystkich przetestowanych obiektów

Pszenica									
		Tox3							
		0,53							
		0,21							

Kolorem oznaczono wartości istotne statystycznie przy $p < 0,05$

Tabela 6. Stopień zmienności porażenia wyjaśniany przez wrażliwość na efekторы.

Pszenica					Pszennyto				
	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA		Tox1	Tox3	Tox5	ToxA
Siewka	0,90%	26,87%	0,05%	0,03%	Siewka	0,57%	11,34%	2,44%	0,07%
Dorośle	0,02%	2,81%	0,48%	0,05%	Dorośle	0,47%	3,09%	1,74%	0,00%

Kolorem oznaczono wartości istotne statystycznie przy $p < 0,05$

Tabela 7. Średnie porażenie wrażliwych i niewrażliwych grup pszenicy i pszenżyta

	Pszenica		Pszennyto	
	Siewka	Dorośle	Siewka	Dorośle
Średnie porażenie obiektów niewrażliwych na badane efekторы	21,4%	40,6%	29,4%	45,6%
Średnie porażenie obiektów wrażliwych na badane efekторы	38,4%	47,2%	41,7%	50,3%
Procentowy wzrost porażenia obiektów wrażliwych	78,9%	16,2%	41,8%	10,4%

- 1) W wyniku przeprowadzonych badań populacji *P. nodorum* w Polsce stwierdzono, że do produkcji inokulum patogena należy wybierać izolaty syntetyzujące efekторы Tox1, Tox3 i Tox5 z niewielkim udziałem izolatów produkujących ToxA.
- 2) Stwierdzono, że efekторы o największym znaczeniu (Tox3 i Tox5) są produkowane przez większość izolatów w dużych ilościach zarówno w porażonej tkance roślin pszenicy, jak i pszenżyta. Z kolei efekторы Tox1 i ToxA są trudniejsze do uzyskania, lecz wraz z Tox3 można je uzyskać w wyniku ekspresji w drożdżaku *Pichia pastoris*.
- 3) Na podstawie wyników wykonanych doświadczeń stwierdzono iż efekторы białkowe w większym stopniu wpływają na odporność fenotypową roślin w stadium siewki w warunkach kontrolowanych, niż na dorosłe rośliny badanych obiektów zbóż w warunkach polowych.
- 4) Uzyskane wyniki wskazują, że w praktyce hodowlanej do selekcji można użyć łatwiejszych w uzyskaniu, nieoczyszczanych filtratów z hodowli wybranych izolatów *P. nodorum*.
- 5) Porażenie liści badanych obiektów pszenicy mieściło się w zakresie 3,7 (SMH 9674) – 7,4 (STH 6583), a plew kłosów w zakresie 4,8 (NAD 17084) – 7,3 (STH 6583). Odmiana STH 6583 charakteryzowała się wysoką odpornością liści i kłosów. Wartość średnia porażenia liści wynosiła 5,6, a plew kłosów 6,3. Spośród odmian wzorcowych najwyższą odpornością liści i kłosów charakteryzowała się odmiana Tonacja.
- 6) U pszenżyta najwyższą odpornością liści charakteryzowała się odmiana wzorcowa Borwo, natomiast plewy były najmniej porażone u odmiany Fredro.

Doniesienia konferencyjne

Walczewski J., Arseniuk E., 2015. Produkcja białkowych toksyn przez izolaty z krajowej populacji *S. nodorum*. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych", Zakopane, (2 - 6.02.2015r.): str 366.

Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P. 2015. Proteinaceous toxins production by *Stagonospora nodorum* in necrotized tissue of triticales. XVIII. International Plant Protection Congress (IPPC) Berlin (23-27.08.2015r.).

Ochodzki P., Walczewski J., Arseniuk E. 2015. Characteristics of selected strains of *Stagonospora nodorum* detected in Poland in terms of necrotrophic activity and production of proteinaceous toxins. 37th Mycotoxin Workshop, Słowacja, Bratysława (1-3.06.2015r.).

Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P. 2018 Contribution of proteinaceous toxins in *Parastagonospora nodorum* blotch development in triticales. 9. Międzyn. Sympozjum Pszenżyta, Szeged, Węgry, (23-27.05, 2016).

Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P. 2016. Effect of proteinaceous toxins on *Parastagonospora nodorum* blotch development in wheat. EUCARPIA Cereal Section/IWIW2 meetings, Clermont Ferrand, France (18-22.03)

Walczewski J., Ochodzki P., Arseniuk E., Tan Kar-Chun, 2017. *P. nodorum* effectors resistance among Polish wheat and triticales germplasm. 3rd Global Summit on Plant Science August 07-09, 2017 Rome, Italy,

Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P., 2017. Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum*. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych" 30.01.2017, Zakopane,

Ochodzki P., Walczewski J., Arseniuk E., 2017. Production, isolation and necrotrophic activity of *Parastagonospora nodorum* proteinaceous toxin Tox5. 39th Mycotoxin Workshop 19-21.06.2017, Bydgoszcz, PL.

Ochodzki P., J. Walczewski, E. Arseniuk, 2018. Production, isolation and necrotrophic activity of selected *Parastagonospora nodorum* proteinaceous toxins. 40th Mycotoxin Workshop, Monachium, czerwiec 11 - 13, 2018.

Walczewski J., P. Ochodzki, E. Arseniuk, 2018. Tox5 and its effect on SNB development in Polish wheat and triticales germplasm. International Association for Plant Biotechnology Congress, Dublin, sierpień, 19 – 24, 2018

Publikacje

Arseniuk E., Walczewski J., Ochodzki P. 2019. Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum* i ich związek z patogennością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew. *Parastagonospora nodorum* proteinaceous toxins and their connection with wheat and triticales susceptibility and resistance on *stagonospora nodorum* blotch. Biuletyn IHAR 286:71-73.

Walczewski J. 2020. Prosta metoda selekcji materiałów hodowlanych pszenicy i pszenżyta z wykorzystaniem nieoczyszczonego filtratu zawierającego efektor Tox3. BIULETYN IHAR 290 : 9–13