

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

**Kierownik zadania:** Prof. dr hab. Edward Arseniuk, Dyrektor Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Radzików, 05-870 Błonie, 22 725 45 36. [e.arseniuk@ihar.edu.pl](mailto:e.arseniuk@ihar.edu.pl).

**1. Cele zadania:**

1. Analiza populacji *P. nodorum* pod względem zdolności do produkcji toksyn białkowych.
2. Doskonalenie metodyki otrzymywania oraz oczyszczania białkowych toksyn.
3. Gromadzenie danych dotyczących odporności fenotypowej obiektów roślinnych na *P. nodorum* celem poszukiwania związków korelacyjnych z odpornością na poszczególne toksyny.
4. Rozpoczęcie testowania obiektów roślinnych na odporność na białkowe toksyny.
5. Dalsze namnażanie linii różnicujących.

**4. Materiały i metody:**

- Hodowla izolatów w celu pozyskania grzybni i płynów pohodowlanych na pożywce płynnej. 5g Winianu amonu, 1g Azotan amonu, 0,5g Siarczan magnezu ( $7H_2O$ ), 1,3 Fosforan potasu jednozasadowy, 2,6 Fosforan potasu dwuzasadowy, 30g Sacharoza, 1g Ekstrakt drożdżowy na 1000ml  $H_2O$ . (Fosforan potasu dwuzasadowy autoklawowany osobno i dodawany po ostygnięciu)
- Izolacja DNA z homogenizowanej w ciekłym azocie grzybni szybką metodą izolacji [González-Mendoza i inni 2010]. Genet Mol Res. 2010 2;9:162-6
- Startery: ToxA1 CGTCCGGCTACCTAGCAATA, ToxA2 TTGTGCTCCTCCTTCTCGA, SnTox3cF CTCGAACCACGTGGACCCGGA SnTox3cR CTCCCCTCGTGGGATTGCCCCATATG, 8981g1F TTCGACAGCCTTCACACGTA, 8981g1R ACAACGAGATTTGGCTTTGC, Tox11F TTCCGGTGATCAATGCTGCT, Tox11R AGGGTTGCAGTCAATCCCAG, SnTox1cF ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT SnTox1cR TGTGGCAGCTAACTAGCACA  
Testy biologiczne wykonywano nastrzykując drugie liście siewek obiektów linii różnicujących.
- Oczyszczenie toksyny Tox1: Płyn pohodowlany izolatu 14-1/09 poddawano dializie w buforze 20mM NaOAc pH4.2, następnie filtrowano przez filtr 0,44um. Następni filtrat nakładano na kolumnę chromatograficzną z wypełnieniem SP XL GE Healthcare Life Sciences. Zanieczyszczenia wypłukiwano buforem zawierającym 175 mM NaCl, Frakcja toksyn była wypłukiwana buforem zawierającym 225 mM NaCl. Eluat zagęszczony do około 1ml i rozdzielono przy pomocy sączenia żelowego na kolumnie wypełnionej złożem Superdex 75. Frakcje aktywne zawierające Tox1 identyfikowano przy pomocy podatnych linii różnicujących.
- Oczyszczenie toksyny Tox3: Płyn pohodowlany izolatu 5-5/11 poddawany dializie w buforze 20 mM NaOAc pH 5.0. Dializat nakładano na kolumnę chromatograficzną z wypełnieniem SP XL GE Healthcare Life Sciences. Frakcję toksyn wypłukiwano buforem zawierającym 120 mM NaCl. Eluat zagęszczano do około 1ml i rozdzielano przy pomocy sączenia żelowego na kolumnie wypełnionej złożem Superdex 75. Frakcje aktywne zawierające Tox3 identyfikowano przy pomocy podatnej linii różnicującej BG220.
- Oczyszczenie toksyny Tox5: Płyn pohodowlany izolatu Sn16-48-9 poddawany dializie w buforze 20 mM NaOAc pH 5.0. Dializat nakładano na kolumnę chromatograficzną z wypełnieniem SP XL GE Healthcare Life Sciences. Frakcję toksyn wypłukiwano Gradientem NaCl szczyt elucji Tox5 wynosił ok. 80mM. Eluat zagęszczano do około 1ml i rozdzielano przy pomocy sączenia żelowego na kolumnie wypełnionej złożem Superdex 75. Frakcje aktywne zawierające Tox5 identyfikowano przy pomocy podatnej linii różnicującej LP-749-29.

- Testowanie odporności obiektów roślinnych na ekstrakty: Drugi liść infiltrowano ekstraktem przy użyciu strzykawki bez igły, wynik otrzymywano po 3-4 dniach. Dla każdego obiektu przetestowano 3 siewki.
- Odporność fenotypową obiektów na *P. nodorum* testowano w warunkach fitotronowych: Siewki były hodowane w multiplatach w 2 powtórzeniach inokulowanych po pełnym rozwinięciu drugiego liścia. Inokulum stanowiła wodna zawiesina zarodników piknidialnych o stężeniu ok. 5mln/ml. Ocenę porażenia wykonywano po 7-14 dniach. Wynikiem była średnia powierzchnia porażonej tkanki drugiego liścia dla 2 serii po 8 liści każda.
- Odporność fenotypową obiektów na *P. nodorum* testowano także w warunkach polowych: Poletka o powierzchni 1m<sup>2</sup> w 3 powtórzeniach zakażano trzykrotnie w ciągu sezonu. Ocenę wykonywano w odstępach tygodniowych od pierwszych objawów do zaschnięcia roślin.
- Różnicujące linie pszenicy prowadzono w szklarni i fitotronie.

## 5. Wyniki i dyskusja

- Wśród przebadanych przy pomocy techniki PCR izolatów: 18,5% wykazało obecność genu kodującego ToxA, 64,6% wykazało obecność Tox1 a 49,2% wykazało obecność genu Tox3. Najczęściej występującą klasą są izolaty zawierające Tox1 i Tox3 równocześnie a nie zawierające ToxA. Dane te są zbliżone do danych uzyskiwanych w latach wcześniejszych.
- Analizę izolatów pod względem zdolności do produkcji toksyn wykonano również przy pomocy testów biologicznych. Potwierdzono produkcję w warunkach in vitro toksyn Tox1, Tox3, Tox5, Tox6 i w bardzo małej liczbie izolatów Tox2. Niestety nie odnaleziono izolatów produkujących toksyny ToxA, Tox4.
- Z wykorzystaniem technik chromatograficznych uzyskano ilość toksyn: Tox1, Tox3 i Tox5 wystarczającą do przetestowania zakładanej liczby obiektów pszenicy i pszenżyta.
- Zbadano reakcję ok. 142 obiektów hodowlanych na oczyszczone ekstrakty toksyn. Dla obiektów pszenżyta po 28% i 29% stanowią obiekty odporne na Tox3 i Tox5, natomiast 93% obiektów pszenżyta jest odporne na Tox1. W przypadku obiektów pszenicy na Tox5 odporne jest 58%, na Tox3 52% a na Tox1 90%.
- Po około 142 obiekty pszenicy i pszenżyta zostały przetestowane na *P. nodorum* w warunkach fitotronowych jak i w warunkach polowych. Dane te zostały wykorzystane w celu poszukiwań związków korelacyjnych z odpornością na toksyny.

### Związek między odpornością na toksyny a odpornością na *P. nodorum*.

Tabela zawiera wartości korelacji między odpornością na toksyny a odpornością w doświadczeniach fitotronowych i polowych. Im większa wartość korelacji tym większy związek między odpornością na toksyny a odpornością na *P. nodorum*.

Kolorem żółtym i zielonym oznaczono istotne statystycznie zależności dla poziomów istotności 0,05 i 0,08.

Pszenica n=88	Tox1		Tox3		Tox5	
		Korelacja		Korelacja		Korelacja
	Fitotron	0,074	Fitotron	0,425	Fitotron	0,318

	NL Pole	-0,153	NL Pole	0,198	NL Pole	0,255
	NK Pole	-0,071	NK Pole	0,075	NK Pole	0,139

Pszennyto n=68 pole		Korelacja		Korelacja		Korelacja
	Fitotron	-0,229	Fitotron	0,439	Fitotron	0,286
	NL Pole	-0,139	NL Pole	0,213	NL Pole	0,222
	NK Pole	-0,27	NK Pole	0,235	NK Pole	0,2

Poziom istotności 0,05

Poziom istotności 0,08

## Dyskusja:

Największe związki korelacyjne wykazano między odpornością na **Tox3** i odpornością na *P. nodorum* w warunkach **fitotronowych**, dla obu gatunków. Podobna, lecz nieco niższa korelacja została wykazana dla **Tox5**. Korelacje te są istotne statystyczne przy granicznym poziomie istotności 0,05.

Ocena polowa składała się z osobnych ocen na liściach oraz na kłosach. Korelacje między odpornością na toksyny a opornościami na polu uwzględniają odwróconą skalę ocen polowych, więc dodatnia wartość korelacji rzeczywiście oznacza dodatnią korelację między odpornością na toksynę a odpornością na patogen. Wartości korelacji między odpornością na **Tox3** i **Tox5** a odpornością polową są **istotne statystycznie** od granicznego poziomu istotności 0.08 dla obu gatunków. Wśród nich największa jest korelacja między odpornością na **Tox5** a **odpornością liści u pszenicy**, jest ona istotna również przy granicznym poziomie istotności równym 0,05.

Związki korelacyjne między odpornością na daną toksynę a odpornością na *P. nodorum* wyliczono na podstawie danych uzyskanych w tym roku. Rozmiar serii danych wynosi 88 obiektów, z wyjątkiem korelacji między doświadczeniami polowymi dla pszenżyta gdzie wynosi on 68 obiektów.

Badania odporności obiektów pszenicy i pszenżyta wykonano przy pomocy mieszaniny kilkunastu izolatów *P. nodorum*. Większość z nich zawiera geny toksyn Tox1, Tox3, Tox5 i Tox6 a przynajmniej 3 z nich gen ToxA. Niestety nie udało się potwierdzić obecności w izolatach wykorzystanych w inokulum genów kodujących toksyny Tox2 i Tox4, jednak prawdopodobne jest, że brak produkcji w warunkach *in vitro* nie wyklucza produkcji tych toksyn w warunkach *in planta*. W ostatnim czasie opisano nową toksynę Tox7, zestaw różnicujący wykorzystany w temacie 1 nie zawierał linii różnicującej dla tej toksyny. Można, więc założyć, że w doświadczeniach fitotronowych oraz polowych w **rozwoju objawów chorobowych bierze udział, co najmniej 5 toksyn białkowych**, a prawdopodobny jest udział 3 kolejnych oraz że zestaw izolatów odpowiada polskiej populacji *P. nodorum*.

Jako materiał roślinny w badaniach zostały wykorzystane obiekty doświadczeń wstępnych i linie DH pochodzące z różnych źródeł i z odrębnych programów hodowlanych. Nie tworzą one jednolitej populacji segregującej tylko pod względem wybranej toksyny, za to dają ogólny obraz puli genowej pszenicy i pszenżyta hodowanego w Polsce.

Najprawdopodobniej jest to powodem spadku wartości korelacji dla poszczególnych toksyn gdyż może się zdarzyć, że silniejszy wpływ na powstawanie objawów chorobowych jednej toksyny będzie maskował wpływ innej toksyny. Możliwe są też związki epistatyczne między poszczególnymi toksynami dodatkowo zaciemniające obraz.

W tegorocznych badaniach wykazano istotną odwrotną korelację między odpornością na Tox1 a odpornością na patogen pośród obiektów pszenżyta. Jest to nietypowe w stosunku do badań dostępnych w literaturze donoszących o pozytywnym wpływie odporności na tę toksynę. Badania te zwykle prowadzone były z wykorzystaniem zdefiniowanej populacji segregującej pod względem odporności na Tox1 oraz pojedynczego izolatu. W przypadku mniejszego wkładu toksyny Tox1 w powstawanie objawów chorobowych, w naszym układzie doświadczalnym może dochodzić do istotnego maskowania prawdziwego wpływu tej toksyny przez inne oddziaływania, szczególnie w przypadku, dużej dysproporcji ilości obiektów podatnych na Tox1 a obiektów podatnych na Tox3 i Tox5 w badanej serii. Dalsza analiza wpływu tej toksyny na rozwój choroby będzie się odbywać w przyszłych latach w miarę zbierania danych o innych obiektach.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że możliwe jest uzyskanie odporniejszych odmian pszenicy i pszenżyta poprzez eliminację dominujących genów warunkujących podatność na toksyny. Testowanie materiałów hodowlanych z wykorzystaniem oczyszczonych toksyn może być wydajną i taną metodą ich eliminacji ze względu na szybkość i jednoznaczność wyniku.

## **6. Wnioski:**

- Uzyskane wyniki potwierdziły, że możliwe jest uzyskanie odporniejszych odmian pszenicy i pszenżyta poprzez eliminację dominujących genów warunkujących podatność na toksyny.
- Testowanie materiałów hodowlanych z wykorzystaniem oczyszczonych toksyn może być wydajną i taną metodą ich eliminacji ze względu na szybkość i jednoznaczność wyniku.