

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 10.

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

Kierownik zadania: **prof. dr hab. E. Arseniuk**

Cele zadania:

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

Materiały i metody:

- Hodowla izolatów w celu pozyskania grzybni i płynów pohodowlanych na pożywce Frie: 5g winianu amonu, 1g azotan amonu, 0,5g siarczan magnezu (7H₂O), 3,9g fosforan potasu jednozasadowy, 30g sacharoza, 1g ekstrakt drożdżowy na 1000ml H₂O. pH 5,7.
- Izolacja DNA z homogenizowanej w ciekłym azocie grzybni: Kit Omni prep (G-Biosciences) lub szybką metodą izolacji [González-Mendoza i inni 2010]. Genet Mol Res. 2010 2;9:162-6
- Startery: ToxA1 CGTCCGGCTACCTAGCAATA, ToxA2 TTGTGCTCCTCCTTCTCGA, Tox3 8981cF ATGCATTTTACAAAGTTCCT, 8981cR CTACTCCCCCTCGTGGGATTGCCCAT, 8981g1F TTCGACAGCCTTCACACGTA, 8981g1R ACAACGAGATTTGGCTTTGC, Tox11F TTCCGGTGATCAATGCTGCT, Tox11R AGGGTTGCAGTCAATCCCAG, Tox12F CTGCCGAGCAAGTATTTCCG, Tox12R AGAGCAGCAGAGTTCGTGAG.
- Procedura przygotowywania ekstraktów toksyn: Hodowla izolatów na pożywce płynnej, odfiltrowywanie grzybni na bibule filtracyjnej, oczyszczanie filtratu przy użyciu bibuły Whatman 6, ultrafiltracja przy użyciu filtrów membranowych 0,45µm, dializa na membranie 8,5 kDa, wytrącanie acetonem, zawieszanie białek w buforze MOPS pH 7,5.
- Testowanie odporności obiektów na ekstrakty: Drugi liść infiltrowany ekstraktem przy użyciu strzykawki bez igły, wynik po 3-4 dniach.
- Testowanie odporności obiektów na *S.nodorum* w warunkach fitotronowych: Siewki hodowane w multiplatach w 2 powtórzeniach zakażanych, inokulowanych po pełnym rozwinięciu drugiego liścia, przy pomocy inokulum zarodników pyknidialnych o stężeniu 2mln/ml. Ocena 7-14 dni. Wynik: Średnia z powierzchni porażonego liścia dla 2 serii po 8 liści każda.
- Testowanie odporności obiektów na *S.nodorum* w warunkach polowych: Poletka 1m², 3 powtórzenia zakażane trzykrotnie w ciągu sezonu. Oceny w odstępach tygodniowych od pierwszych objawów do zaschnięcia roślin.
- Hodowla linii różnicujących w warunkach szklarniowo fito tronowych.

Wyniki i dyskusja:

- Na podstawie wyników PCR DNA izolatów można stwierdzić, że geny kodujące toksyny wykryto w większości z nich. Dotychczas dostępne są sekwencje DNA trzech z sześciu opisanych toksyn. Nie można jednak wykluczyć, że izolaty *S. nodorum*, u których nie wykryto badanych genów posiadają także inne geny kodujące toksyny białkowe. Obecność ToxA stwierdzono w 9,5%, Tox1 w 82,1% i Tox3 w 83,3% przebadanych izolatów. Procentowy udział poszczególnych klas izolatów oraz procenty występowania poszczególnych toksyn są zgodne z danymi o europejskiej populacji *S. nodorum* przedstawionych w publikacji McDonald i inni (2013).
- Friesen i Faris (2012) dowodzą, że płyn pohodowlany z trzytygodniowej kultury izolatów *S.nodorum* może powodować nekrozy u podatnych obiektów pszenicy. W przeprowadzanych badaniach tylko dla jednego izolatu uzyskano zdolność do wywoływania nekrozy dla niezagęszczanego płynu pohodowlanego. Oznacza to konieczność poszukiwania odpowiednich

izolatów patogena zdolnych do produkcji dużych ilości toksyn oraz optymalizacji warunków ich hodowli.

- Według dostępnych w literaturze procedur oczyszczania toksyn, na końcu procesu znajdują się one w buforze o niskim pH 4,4–5,2 (Abeysekara i inni 2009, Friesen i inni 2007, Friesen i inni 2008, Liu i inni 2004). Podczas prób wstępnego oczyszczania z wykorzystaniem buforów o składzie i pH podanych w publikacjach napotymano problemy w kwestii braku różnic między oczyszczaną próbką i kontrolą. Opierając się na opisie z publikacji Friesen i inni (2008) opisano warunki przeprowadzania kontroli z proteinazą w których frakcja białkowa znajdowała się w buforze MOPS o pH 7,5. Również w obecnie prowadzonych badaniach bufor MOPS pH 7,5 okazał się nietoksyczny w stosunku do tkanki liścia. Przeprowadzono testy z 20mM octanem sodu w różnych pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0. Właściwości toksyczne wykazały tylko próbki buforu o pH 4,5 i 5,0. W razie konieczności rozdzielania toksyn za pomocą chromatografii jonowymiennej stwarza to potrzebę wymiany buforu na bardziej odpowiedni [np. MOPS pH 7,5] bądź jego zobojętnianie przed wykonywaniem testów na liściach siewek.

- Przygotowano zagęszczone 50x ekstrakty izolatów w buforze MOPS pH 7,5 wykazujące aktywność nekrotyczną na niektórych odmianach pszenicy oraz pszenżyta.

- W dotychczasowych badaniach zmierzających do uzyskania próbek toksyn umożliwiających testowanie odporności siewek odmian ozimej pszenicy i ozimego pszenżyta sporym utrudnieniem okazał się brak linii różnicujących, które umożliwiałyby identyfikację toksyn w próbce. W tej sytuacji wykorzystywano dwa izolaty 13-1-1 (Tox3) i 13-2-2 (Tox1), które według wyników testu z wykorzystaniem reakcji PCR posiadają pojedyncze, możliwe do wykrycia tą metodą toksyny. W przetestowanym zestawie odmian wykryto obiekty podatne oraz odporne na ekstrakty ww. izolatów. W celu otrzymania lepiej oczyszczanych białek zidentyfikowane podatne i odporne obiekty mogą być wykorzystane do wyszukiwania frakcji aktywnych w eluacie z kolumn chromatograficznych. Do rozdzielania za pomocą metod chromatograficznych ekstraktu z izolatu 5-5/11 na toksyny ToxA i Tox3 pomocne jest posiadanie linii odpornej na pierwszą toksynę oraz podatnej na drugą. Warunek ten może spełniać linia rekombinacyjna Danko13 odporna na ekstrakt zawierający Tox3 oraz podatna na ekstrakt zawierający ToxA i Tox3. Przy jej pomocy możliwe będzie zidentyfikowanie w eluacie z kolumny chromatograficznej frakcji zawierającej ToxA. W tym kierunku prowadzone są dalsze prace badawcze.

- Przedstawione w niniejszym sprawozdaniu wyniki odporności na ekstrakty obiektów pszenicy i pszenżyta nie mogą być jeszcze uznane za docelową bonitację odporności na poszczególne toksyny. Testowanie obiektów badanych zbóż rozpocznie się dopiero po dalszym oczyszczeniu ekstraktów toksyn oraz ich zweryfikowaniu na liniach różnicujących.

- Dotychczasowe badania nad udziałem toksyn *S. nodorum* w wywoływaniu objawów nekrotycznych prowadzono na genotypach pszenicy. Wyniki obecnie prowadzonych badań ujawniły, że na toksyny ww. patogena podatne są także genotypy pszenżyta.

Wnioski:

- Wyniki przeprowadzonej w okresie sprawozdawczym pracy badawczej ujawniły obecność toksyn białkowych w filtratach pochodzących większości izolatów *S. nodorum*.

- Toksyny te są zdolne do wywołania nekrozy liści siewek ozimych odmian pszenicy i pszenżyta.

- Wykonywanie oceny genotypów badanych zbóż pod względem odporności na poszczególne toksyny wymaga jednakże dalszej pracy nad oczyszczaniem i koncentracją toksyn, a także zweryfikowania ich aktywności fitotoksycznej na obecnie namnażanych różnicujących toksyny genotypach pszenicy.