



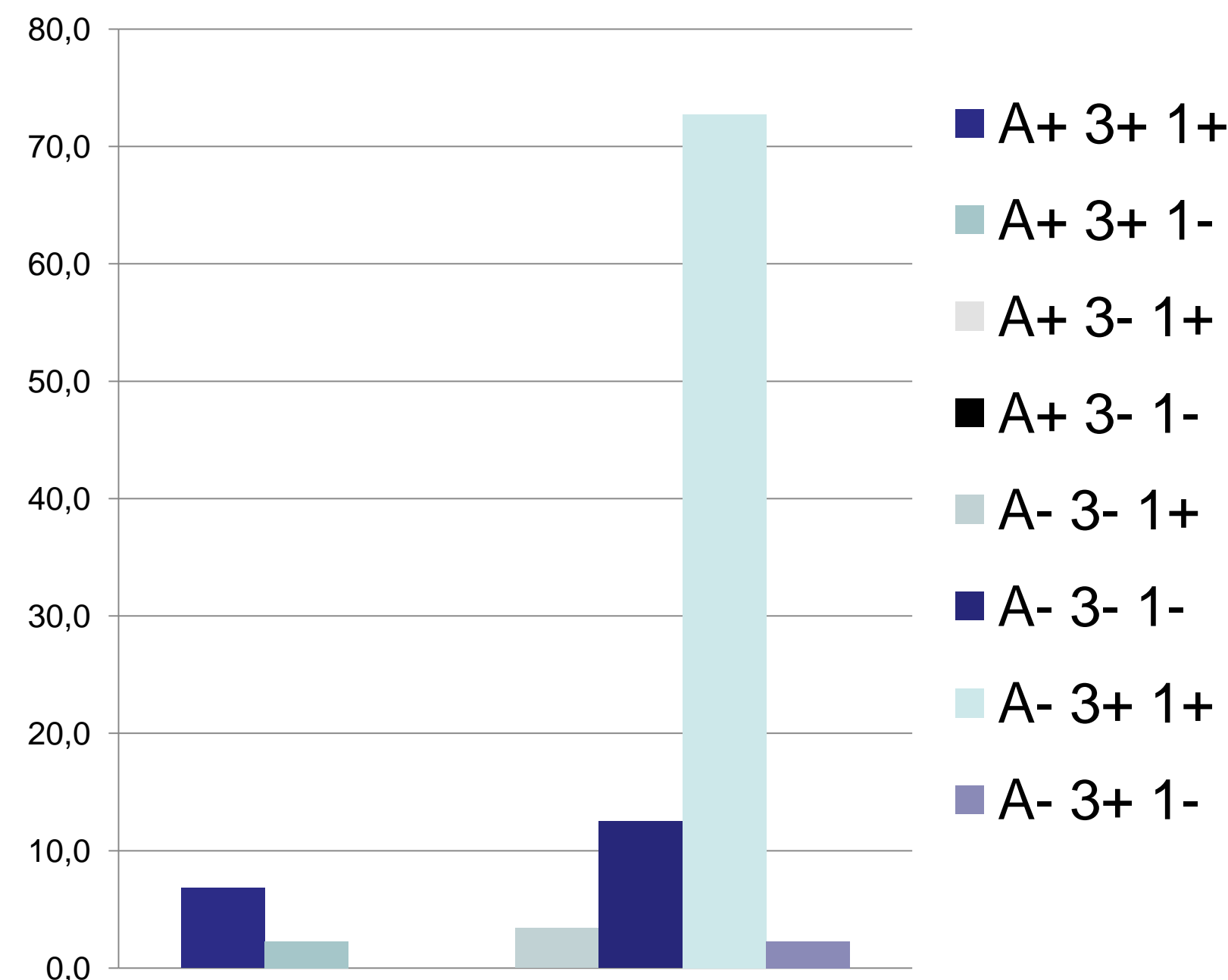
# Produkcja białkowych toksyn przez izolaty z krajowej populacji *S. nodorum*

Jakub Walczewski, Edward Arseniuk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB, Radzików, 05-870 Błonie

### Wstęp:

*Stagonospora nodorum* jest nekrotroficznym patogenem pszenicy oraz pszenżyta. Po infekcji powoduje powstawanie nekrotycznych obszarów, w których się rozwija, oraz z których się rozprzestrzenia zarówno w obrębie tej samej rośliny jak i roślin przyległych. Pojawienie się tego patogenu w okresie wysokiej wilgotności i temperatury może doprowadzić do poważnego obniżenia plonowania na drodze zmniejszenia powierzchni fotosyntetycznie czynnej liści oraz uszkodzeń plew. W ciągu kilku ostatnich lat pojawiły się doniesienia o wytwarzaniu przez *S. nodorum* białkowych toksyn pełniących kluczową rolę w indukcji zmian nekrotycznych w porażonej tkance żywiciela. Toksyny te oddziałują na specyficzne geny żywiciela. Pozytywne współdziałanie toksyny z dominującą formą genu prowadzi do indukcji nekrozy, natomiast w przypadku obecności jedynie recesywnej formy obserwuje się niewrażliwość na daną toksynę [Friesen i inni 2008]. Doświadczenia prowadzone zarówno w kontrolowanych warunkach jak i w testach polowych potwierdziły, że białkowe toksyny są ważnym czynnikiem w rozwoju septoriozy liści i plew na pszenicy, co jest zgodne z doniesieniem Friesena i innych (2009). Nie stwierdzono żadnych negatywnych skutków eliminacji dominujących alleli warunkujących podatność na toksyny, stwierdzono natomiast wzrost odporności, co koresponduje z badaniami Oliviera i innych (2014). Dotychczas opisano sześć różnych toksyn białkowych, dla genów kodujących trzy z nich zostały opublikowane sekwencje nukleotydowe, oraz zostały przeprowadzone badania populacyjne na ogólnoswiatowym zestawie izolatów *S. nodorum* [McDonald i inni 2013]. Prezentowany plakat zawiera dane o izolatach z obszaru Polski uzupełniające obraz europejskiej populacji *S. nodorum* opisanej w literaturze.



Wykres 1. Grupy izolatów pod względem produkcji toksyn.

### Wyniki i wnioski:

Spośród przebadanych izolatów tylko nieliczne nie posiadały genów żadnej z badanych toksyn [Tabela 1]. Geny poszczególnych toksyn obecne były w *ToxA* 9,5%, *Tox1* 82,1%, *Tox3* 83,3% badanej próby [Tabela 2]. Dane te są zbieżne z danymi dotyczącymi europejskiej populacji *S. nodorum* opisanymi w McDonald i inni 2013, gdzie poszczególne toksyny występowały w: *ToxA* 12%, *Tox1* 89%, *Tox3* 67%.

Najliczniejszą grupę izolatów w naszych badaniach stanowiły izolaty produkujące toksyny Tox1 i Tox3 a nie produkujące ToxA [Tabela 2, Wykres 1], również te wyniki są zbieżne z wynikami prac opublikowanych do tej pory [McDonald et al 2013].

Nasze badania uzupełniły dotychczasowy obraz europejskiej populacji *S. nodorum*, oraz potwierdziły integralność polskiej i europejskiej populacji tego patogenu.

### Materiały i metody

Izolaty *S. nodorum* pochodzące z terenu Polski, hodowane na **pożywce płynnej** [g/L] : 3g Octan sodu, 5g Azotan amonu, 0,5g Siarczan magnezu (7H<sub>2</sub>O), 3,9g Fosforan potasu jednozasadowy, 30g Sacharoza, 1g Ekstrakt drożdżowy. pH 5,7. Grzybnia po przemyciu steryną dejonizowaną wodą mieloną w ciepłym azocie. **Izolacja DNA** przeprowadzana szybką metodą opisaną w D. González-Mendoza i inni 2010. (SDS i fenol) **Warunki PCR.** 4 min 96C początkowa denaturacja, 45s 96C denaturacja, 40 s X przyłączanie, 35s-1min 72C elongacja, 4min 72C końcowe wydłużanie. Reakcje prowadzone w 10ul przy użyciu 0.25U DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Scientific), 0.2mM dNTPs, 0.5 uM startery, 5ng/ul matryca. **StarteryPRC:** ToxA: ToxA1, ToxA2 (63C) Friesen et al 2006 Tox3: 8981cF, 8981cR (55C), 8981g1F, 8981g1R (63C) Liu et all 2009 Tox1: Tox11F TTCCGGTGATCAATGCTGCT, (58C) Tox11R AGGGTTGCAGTCAATCCAG, (58C) Tox12F CTGCCGAGCAAGTATTCCG, (58C) Tox12R AGAGCAGCAGAGTTCGTGAG (58C)

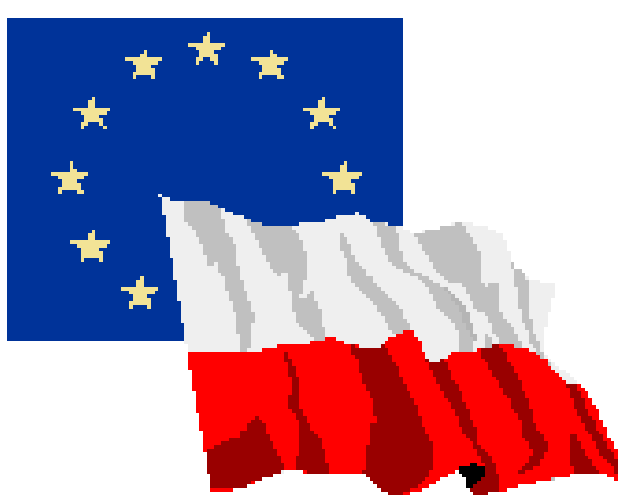


Tabela 1.

Próbka polskich izolatów *S. nodorum*. „1” obecność genu kodującego toksynę, „0” brak genu.

Lp.	Izolat	ToxA	Tox1	Tox3
1	9079	0	1	1
2	9074	0	1	1
3	9281	0	1	1
4	9282	0	1	1
5	30-2	0	1	1
6	37-1	1	1	1
7	54-1	0	1	1
8	57-1	0	0	0
9	73-1	0	1	1
10	80-1	1	1	1
11	81-1	0	1	1
12	1-2/10	0	1	1
13	1-3/12	0	0	0
14	1-4/10	0	1	1
15	1-4/12	0	0	0
16	1-7/10	0	1	1
17	1-7/12	0	1	1
18	2-1/10	0	1	1
19	2-2/12	0	1	1
20	2-3/12	0	1	1
21	2-4/12	0	1	1
22	2-5/11	0	1	1
23	2-6/12	1	1	1
24	2-7/10	0	1	1
25	2-7/12	0	1	1
26	3-1/12	0	1	1
27	3-4/12	0	1	1
28	3-5/12	0	1	1
29	4-1/11	0	1	1
30	4-2/11	0	1	1
31	4-2/12	0	1	1
32	4-3/12	0	1	1
33	4-4/11	0	1	1
34	4-5/11	0	1	1
35	4-6/11	0	1	1
36	4-7/12	0	1	1
37	5-1/11	0	1	1
38	5-1/12	0	1	1
39	5-2/11	0	1	1
40	5-3/10	0	0	0
41	5-3/11	0	1	1
42	5-3/12	0	1	1
43	5-4/11	0	1	1
44	5-4/12	0	1	1
45	5-5/11	1	0	1
46	5-5/12	0	1	1
47	5-6/11	0	1	1
48	5-6/12	0	1	1
49	6-1/11	0	1	0
50	6-1/12	0	0	0
51	7-1/11	0	1	1
52	7-2/11	0	1	1
53	13-1-1	0	0	1
54	13-1-2	1	0	1
55	13-1-3	0	0	1
56	13-2-2	0	1	0
57	13-4-4	0	1	1
58	13-4-5	0	1	1
59	13-4-6	0	1	1
60	13-4-7	1	1	1
61	13-4-8	1	1	1
62	13-4-9	0	1	1
63	13-6-5	0	1	1
64	13-6-12	0	1	1
65	13-7-2	0	1	1
66	13-7-3	0	1	1
67	13-7-5	0	1	1
68	13-7-8	0	1	1
69	21-1	0	1	1
70	28-1	0	1	1
71	16-2	0	0	0
72	10-1	0	0	0
73	16-3/09	1	1	1
74	301-20	0	0	0
75	5-14/12	0	1	0
76	5-15/12	0	1	1
77	5-16/12	0	1	1
78	5-17/12	0	1	1
79	5-23/12	0	1	1
80	5-24/12	0	1	1
81	74-20A	0	0	0
82	76-40	0	0	0
83	80-301	0	0	0
84	S-79-4	0	1	1

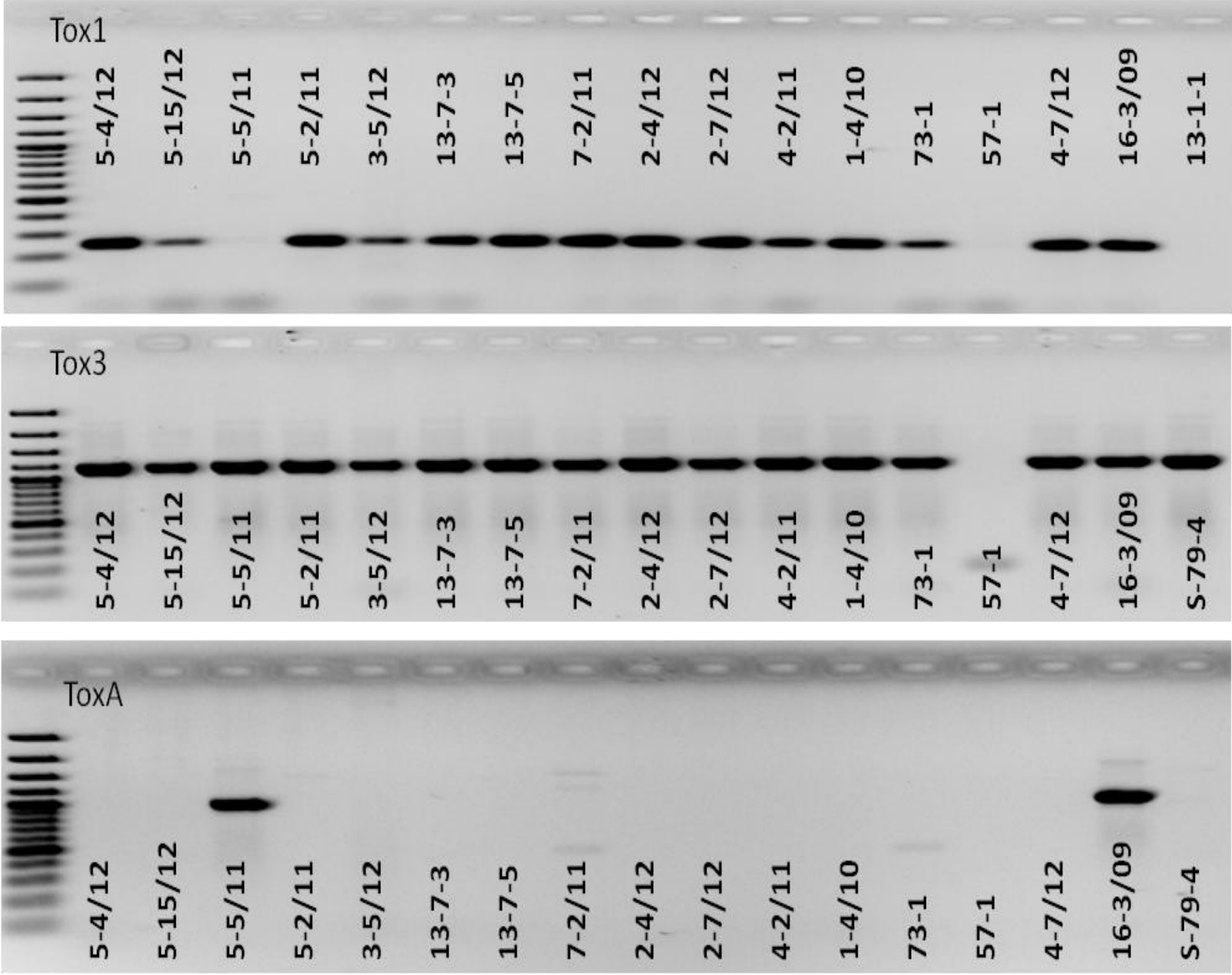
ToxA+	ToxA+	ToxA+	ToxA+	ToxA-	ToxA-	ToxA-	ToxA-
Tox3+	Tox3+	Tox3-	Tox3-	Tox3-	Tox3-	Tox3+	Tox3+
Tox1+	Tox1-	Tox1+	Tox1-	Tox1+	Tox1-	Tox1+	Tox1-
7,1%	2,4%	0,0%	0,0%	3,6%	13,1%	71,4%	2,4%

ToxA 9,5%  
Tox1 82,1%  
Tox3 83,3%

n=84

Tabela 2.

Grupy izolatów pod względem produkcji toksyn.



Rycina 1.

Przykładowy rozdział produktów PCR dla genów poszczególnych toksyn.

### Cytowania:

Friesen T. L., Stukenbrock E.H., Liu Z., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S, McDonald B.A., Oliver R.P. (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer NATURE GENETICS 38:. 593-956

Liu Z, Faris JD, Oliver RP, Tan K-C, Solomon PS, McDonald MC, McDonald BA, Nunez A, Lu S, Rasmussen JB, Friesen TL (2009). SnTox3 acts in effector triggered susceptibility to induce Disease on Wheat Carrying the Snn3 Gene. PLoS Pathogens 5:9

González-Mendoza D., Argumedo-Delira R., Morales-Trejo A., Pulido-Herrera A., Cervantes-Díaz L., Grimaldo-Juarez O. and Alarcón A. (2010) A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. Genetics and Molecular Research 9 (1): 162-166

McDonald M.C., Oliver R.P., Friesen T.L., Brunner P.C. and McDonald B.A. (2013) Global diversity and distribution of three necrotrophic effectors in Phaeosphaeria nodorum and related species. New Phytologist 199: 241–251