

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. Edward Arseniuk, Dyrektor Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Radzików, 05-870 Błonie, 22 725 45 36. e.arseniuk@ihar.edu.pl.

1. Cele zadania:

1. Analiza populacji *S. nodorum* pod względem zdolności do produkcji toksyn białkowych.
2. Doskonalenie metodyki otrzymywania oraz oczyszczania białkowych toksyn.
3. Gromadzenie danych dotyczących odporności obiektów roślinnych na *S. 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 Winian 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 AGGGTTGCAGTCAATCCAG, SnTox1cF ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT SnTox1cR TGTGGCAGCTAACTAGCACA
- Oczyszczenie toksyny Tox1: Płyn pohodowlany izolatu 14-1/09 poddawano dializie w buforze 20mM NaOAc pH4.2, następnie filtrowano przez filtr 0,44um. 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.
- 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 *S. 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 *S. nodorum* testowano także w warunkach polowych: Poletka o powierzchni $1m^2$ 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

- Na podstawie wyników PCR DNA można stwierdzić, że geny kodujące toksyny wykryto w większości zbadanych izolatów. 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 18.4%, Tox1 w 64.6%, Tox3 w 49.2% przebadanych izolatów. Procentowy udział poszczególnych klas izolatów oraz częstość występowania poszczególnych toksyn są zgodne z danymi o europejskiej populacji *S. nodorum* przedstawionymi w publikacji McDonald i inni (2013).
- Przy pomocy metod: chromatografii jonowymiennej i sączenia żelowego uzyskano ekstrakty toksyn Tox1 i Tox3. Skład ekstraktów był weryfikowany przy pomocy zestawu różnicującego składającego się z obiektów o opisanej odporności na toksyny. Ekstrakt Tox1 pochodzący z izolatu 14-1/09 powodował nekrozę tylko na linii W7984 (Tox1), na linii różnicującej dla Tox3 (BG220) widoczne były niewielkie zmiany o charakterze chlorotycznym świadczące o niewielkich domieszkach tej toksyny. Izolat 14-1/09 posiada geny kodujące zarówno Tox1 jak i Tox3. Ekstrakt Tox3 został oczyszczony z płynu pohodowlanego izolatu 5-5/11. Test wstępnie oczyszczonego płynu pohodowlanego na liniach różnicujących wskazuje, że izolat ten produkuje głównie toksynę Tox5 oraz w mniejszej ilości Tox3. Przy pomocy technik chromatograficznych udało się wyizolować ekstrakt powodujący nekrozę tylko na liniach różnicujących BG220 (Tox3) i W7984 (Tox1). Obie aktywności wskazywałyby na obecność w ekstrakcie obu toksyn, jednak izolat 5-5/11 nie posiada genu kodującego toksynę Tox1. Obie aktywności w podobnym natężeniu odnajdywano w tych samych frakcjach w czasie chromatografii jonowymiennej (rozdział pod względem ładunku) oraz sączenia żelowego (rozdział pod wpływem wielkości cząsteczki), w literaturze nie ma obecnie opisanej reakcji linii W-7984 na toksynę Tox3. W korespondencji jej autorzy przyznali, że linia W-7984 może zawierać słaby allel Snn3 oznaczający niewielką reakcję także na Tox3. Fakt podobnego wymywania z kolumn oraz braku w izolacie genu kodującego Tox1 są wystarczającymi powodami do uznania, że oczyszczony ekstrakt z izolatu 5-5/11 zawiera tylko toksynę Tox3. Prace nad optymalizacją procedury i oczyszczaniem obu toksyn wg harmonogramu będą prowadzone w przyszłych latach, wskazane w nich jest dalsze poszukiwanie izolatów bardziej toksynotwórczych oraz próba ekspresji toksyn o znanej sekwencji w systemie ekspresyjnym drożdży. Dostępne w literaturze procedury oczyszczania toksyn nie zawsze przynosiły dobre efekty.
- Przy pomocy oczyszczonych ekstraktów dokonano weryfikacji działania linii różnicujących. W przypadku toksyny Tox3 wykazano jej aktywność na linii różnicującej W-7984, poza opisaną w literaturze aktywnością na linii BG220.
- W roku sprawozdawczym wykonano pierwsze analizy reakcji obiektów pszenicy i pszenżyta na ekstrakty toksyn Tox1 i Tox3. Na przebadanych obiektach roślinnych wykazano podobny wzorec reakcji na obydwa ekstrakty: 22% obiektów pszenicy i 68% obiektów pszenżyta było podatnych na badane toksyny. Obie toksyny występują wspólnie w większości izolatów *S. nodorum* pobranych z terenu Polski, podobnie w populacji europejskiej wykazano, że najliczniejszą klasę izolatów stanowią izolaty posiadające zarówno gen produkcji Tox1 jak i Tox3. W trakcie oczyszczania ekstraktu Tox3 wykazano, że może on powodować zmiany nekrotyczne na linii różnicującej dla Tox1, przez co wskazanym wydaje się wprowadzenie w przyszłych izolacjach zmiany izolatu produkującego Tox1 na izolat nieposiadający genu kodującego Tox3.
- W okresie sprawozdawczym zebrano wyniki dla zaplanowanej liczby obiektów zarówno z doświadczeń fitotronowych jak i z doświadczeń polowych. Aby ułatwić poszukiwanie związków korelacyjnych w doświadczeniach fitotronowych wskazane jest zwiększenie liczby obiektów danego gatunku badanego w pojedynczym doświadczeniu. Zmiany te zostaną wzięte pod uwagę w projektowaniu przyszłych doświadczeń. W związku z przypadającym na okres rozwoju *S. nodorum* okresem suszy porażenie obiektów w tegorocznym doświadczeniu polowym nie było wysokie, jednak zgodnie z założeniami każdy obiekt jest testowany w dwóch latach, co pozwoli na zwiększenie wiarygodności danych.

6. Wnioski:

- Wyniki analizy populacji *S. nodorum* potwierdzają integralność polskiej i europejskiej populacji tego patogena. Najliczniejszą grupę stanowią izolaty posiadające oba geny kodujące Tox1 i Tox3, co może wskazywać ich największy udział w wywoływaniu objawów chorobowych. Wskazano izolaty posiadające pojedyncze geny Tox1 i Tox3 mogące stanowić źródło tych toksyn, jednak konieczne jest potwierdzenie ekspresji toksyn z wykorzystaniem infiltracji zestawu różnicującego.
- Złożony, z opisanych w literaturze, różnicujący zestaw linii pszenicy może być stosowany do określania profilu produkcji toksyn jednak w trakcie jego stosowania trzeba brać pod uwagę, że w warunkach *in vitro* nie wszystkie geny toksyn badanego izolatu podlegają ekspresji. W tegorocznych badaniach wykazano również wpływ toksyny Tox3 na linię różnicującą toksyny Tox1, jednak dla obu toksyn dostępne są sekwencje genów umożliwiające wykorzystanie do ich bonitacji reakcji PCR.