

Prosta metoda selekcji materiałów hodowlanych pszenicy i pszenżyta z wykorzystaniem nieoczyszczonego filtratu zawierającego efektor Tox3



A simple method of selecting wheat and triticale breeding materials using a crude filtrate containing the Tox3 effector

Jakub Walczewski ✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05–870 Błonie, Polska,
Zakład Fitopatologii,
✉ e-mail: j.walczewski@ihar.edu.pl

Parastagonospora nodorum jest powszechnie występującym nekrotroficznym patogenem zbóż atakującym przede wszystkim pszenżyto i pszenicę, wywołuje on septoriozę liści i plew, która w sprzyjających warunkach pogodowych powoduje duże straty w plonie. Patogen ten wykorzystuje szereg specyficznych białkowych efektorów, które u wrażliwych genotypów uruchamiają szlaki sygnałowe prowadzące do programowanej śmierci komórek, w wyniku, czego powstają zmiany nekrotyczne w zainfekowanej tkance. W powyższej pracy przedstawiono procedurę testowania obiektów hodowlanych pod względem wrażliwości na efektor Tox3 z wykorzystaniem nieoczyszczonego filtratu z hodowli *P. nodorum*. Podejście to pozwala osiągnąć zadowalające efekty selekcji bez konieczności stosowania kłopotliwych procedur oczyszczania lub ekspresji opartej o genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy.

Słowa kluczowe: efekторы, SNB, nodorum, nekrotrof, selekcja, hodowla odpornościowa.

Parastagonospora nodorum is a wide spread necrotrophic pathogen of crop that primary attack wheat and triticale. It is casual agent of septoria nodorum leaf and glume blotch (SNB), which in favorable weather conditions causes large yield losses. This pathogen uses a number of specific protein effectors that in sensitive genotypes trigger signaling pathways leading to programmed cell death, resulting in necrotic changes in infected tissue. This work presents the procedure for testing breeding objects for sensitivity to the Tox3 effector using non-purified filtrate from *P. nodorum* culture. This approach allows achieving satisfactory selection results without the need for troublesome purification procedures or expression based on genetically modified microorganisms.

Key words: effectors, SNB, nodorum, necrotroph, selection, resistance breeding.

Patogeny nekrotroficzne charakteryzują się tym, że swoją strategię rozwojową opierają na indukcji u gospodarza zmian nekrotycznych, w których znajdują środowisko do rozwoju i rozmnażania oraz z których czerpią substancje odżywcze. Do najlepiej poznanych patogenów nekrotroficznych atakujących zboża, szczególnie pszenicę i pszenżyto należy *Parastagonospora nodorum* (*Septoria nodorum*) wywołujący septoriozę liści i plew. Jest to kosmopolityczny patogen powodujący największe straty w rejonach świata charakteryzującym się ciepłym i wilgotnym klimatem. Patogen ten występuje powszechnie na terenie Polski. W sprzyjających warunkach porażenie przybiera epidemiczny charakter przyczyniając się do dużego obniżenia, jakości oraz ilości plonu. Klasyczny pogląd na temat dziedziczenia odporności na ten patogen zakładał udział wielu *loci*

ilościowych w tym procesie (Francki 2013). Ostatnie badanie ujawniły wykorzystywanie przez patogen wielu białkowych efektorów, które po rozpoznaniu przez specyficzne dla danego efektora receptory prowadzą do indukcji programowanej śmierci komórki w zaatakowanej tkance. Odporność na poszczególne efekторы jest dziedziczona recesywnie. Dotychczas opisano 8 osobnych oddziaływań efektor-receptor (Friesen i inni 2006, 2007; Liu i inni 2006, 2009; Abeysekera i inni 2009; Gao i inni 2015; Shi i inni 2015). Oddziaływania te mają głównie charakter addytywny (Friesen i inni 2010). Pula genowa pszenicy i pszenżyta, warunkuje zróżnicowaną odporność tych zbóż na poszczególne efekторы. Podobnie populacja patogenu jest zróżnicowana pod względem zdolności do produkcji efektorów oraz poziomu ich ekspresji (McDonald i inni 2013, Faris i inni 2011).

Wykorzystanie w hodowli odpornościowej selekcji opartej o metody wynikające bezpośrednio z molekularnych mechanizmów patogenezы, pozwala uniezależnić ten proces od kłopotliwych i nie zawsze powtarzalnych badań fenotypowych, a w rezultacie skrócić i ułatwić ten proces. Wymaga to jednak dostępu do dużych ilości preparatów zawierających efektor, których pozyskanie może być kłopotliwe, gdyż w praktyce wiąże się z wykorzystaniem do procesu produkcji genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów, lub mozolnym oczyszczaniem efektorów z użyciem metod chromatograficznych.

Celem tej pracy jest wskazanie ogólnodostępnego izolatu *P. nodorum* wraz z metodyką pozyskania jego ekwiwalentu oraz prostej dostępnej dla niewyspecjalizowanych laboratoriów procedury wytworzenia z jego pomocą preparatu umożliwiającego testowanie materiałów roślinnych pod względem wrażliwości na efektor Tox3.

Materiały i Metody:

Pożywka płynna Frie: 5g winianu amonu, 1g azotan amonu, 0,5g siarczan magnezu (7H₂O), 1,3g fosforan potasu jednozasadowy, 2,6g fosforan potasu dwuzasadowy, 30g sacharoza, 1g ekstrakt drożdżowy na 1000ml H₂O. Autoklawowanie 20min 120°C. Fosforan potasu dwuzasadowy autoklawowany osobno i dodawany po ostygnięciu.

Pożywka YPD (Yeast extract Peptone Dextrose): 10g ekstrakt drożdżowy, 20g pepton, 20g glukoza (filtrowana dodawana po ostygnięciu) na 1000ml H₂O. Autoklawowanie 20min w 120 °C.

Pożywka zbożowa stała: 34g ziarniaków pszenżyta w 1000ml wody demineralizowanej, zaparzone w 95°C przez 20 min. Po odsączeniu dodawane 30g agaru. Autoklawowanie 20min w 120 °C.

Agar do izolacji: 45g agaru na 1000ml H₂O. Autoklawowanie 20min w 120 °C.

Izolacja DNA: Odsączona grzybnia pochodząca z hodowli płynnej na pożywce Frie, była dwukrotnie przemywana sterylną wodą, następnie rozcierana w ciekłym azocie przy pomocy moździerza. 20mg utartej grzybni wykorzystano do izolacji DNA według González-Mendoza i inni [2010].

Analiza PCR efektorów:

Startery:

ToxAF CGTCCGGCTACCTAGCAATA,

ToxAR TTGTGCTCCTCCTTCTCGA,

Tox3F CTCGAACCACGTGGACCCGGA,

Tox3R CTCCCCCTCGTGGGATTGCCCA-TATG,

Tox1F ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT,

Tox1R TGTGGCAGCTAACTAGCACA.

Skład 10µl mieszaniny reakcyjnej: 1µl - 50ng/µl matrycy, 1µl - 5mM mieszaniny starterów, 0,2µl - 10mM mieszaniny dNTP, 0,05µl - DreamTaq DNA Polymerase, 1µl - DreamTaq Green Buffer, 6,75µl - H₂O. Program PCR. Wstępna denaturacja: 95°C 5 min. 35 cykli: 95°C 45s denaturacja, 63 °C 45s przyłączanie, 72 °C 1min elongacja. Końcowa elongacja 72°C 10min.

Kultura stała *Parastagonospora nodorum*: Zaszczepione szalki inkubowano w 20°C, 12h fotoperiod. Źródło światła: świetlówki Exo Terra Repti Glo 10.0.

Produkcja filtratu Tox3 w *Parastagonospora nodorum*: Kolbki wypełnione w 20% pożywką Frie, szczepiono fragmentem agaru z widocznymi pyknidiami. Hodowla na wytrząsarce: 200rpm, 27°C, w ciemności, przez 72h. Następnie przez 28 dni w ciemności bez wytrząsania w temperaturze pokojowej. Kulturę płynną filtrowano przez bibułę filtracyjną a następnie przez filtr 0,45µm i wykorzystano do infiltracji roślin. Do produkcji efektora Tox3 wykorzystano izolat Sn13-1-1 dostępny w kolekcji roboczej Zakładu Fitopatologii.

Izolacja *P.nodorum* ze środowiska: Suchy liść z widocznymi pyknidiami, umieszczono w sterylnej szalce na bibułce namoczonej sterylną H₂O. Po wypłynięciu masy zarodnikowej rozmazano ją przy pomocy sterylnej igły na szalce z agarem do izolacji. Następnie przeniesiono pojedynczy zarodnik przy pomocy mikromanipulatora na pożywkę zbożową, bądź inkubowano szalkę w 20°C w ciemności do chwili, gdy była widoczna rozwijająca się grzybnia, którą przeniesiono na pożywkę zbożową.

Produkcja Tox3: Szczep *Pichia pastoris* zawierający plazmid pGAPZA ze sklonowanym genem *Tox3*, zaszczepiono na pożywkę płynną YPD. Hodowano 3 dni, wytrząsanie 200rpm, temperatura 30°C. Kulturę zwirowano oraz przefiltrowano przez filtr o średnicy porów 0,44µm. Preparat zawierający Tox3 wykorzystano do infiltracji roślin.

Oczyszczanie Tox5: Filtrat z hodowli izolatu 76-40 pochodzącego z kolekcji roboczej Zakładu Fitopatologii, poddano 2 krotnej dializie w 10 objętościach roztworu zawierającego 20mM octanu sodu i 20mM NaCl o pH 5, z wykorzystaniem membrany zatrzymującej cząsteczki o wymiarach 6-8 kDa. Dializat naniesiono na kolumnę chromatograficzną zawierającą złożę SP-Sepharose i wmywano gradientem NaCl od 0 do 200 mM. Frakcje zawierające Tox5 określono poprzez infiltrację wrażliwego obiektu LP749-29, oraz zagęszczono poprzez ultrafiltrację i wykonano sączenie żelowe z wykorzystaniem złoża Superdex 75 w 20mM octanu

sodu 100mM NaCl pH 6. Przy pomocy wrażliwego obiektu określono frakcje aktywne, które wykorzystano w badaniach.

Infiltracja roślin: Przy pomocy strzykawki 1ml przyłożonej delikatnie do górnej powierzchni w pełni rozwiniętego drugiego liścia siewki, powoli wtłaczano przez aparaty szparkowe filtrat. Piskiem zaznaczono obszar infiltracji. Po ok 5 dniach wykonano ocenę, uznając za podatne obiekty, które w zaznaczonym obszarze wykazują całkowitą nekrozę (rys. 1 C), bądź łżejsze zmiany o charakterze zaawansowanej chlorozy (rys.1 B). Obiekty niewrażliwe nie wykazują żadnych zmian w granicach infiltrowanego obszaru (rys.1 A). W przypadku, gdy filtrat ma zbyt niskie pH, w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca przyłożenia strzykawki pojawia się charakterystyczna nekroza, nieobejmująca swoim zasięgiem całego infiltrowanego rejonu (rys.1 D). Dla każdego obiektu roślinnego doświadczenie było prowadzone w 3 powtórzeniach, gdzie jedno powtórzenie stanowiła siewka.

Materiał roślinny: Na podstawie wstępnych badań wybrano łatwo dostępne na Polskim rynku odmiany pszenicy: Operetka, Natula, Torrild, oraz pszenżyta: Borowik i Cyrkon. Odmiany te umożliwiają analizę izolatów *P. nodorum* pod kątem produkcji efektorów Tox3 i Tox5. W badaniach w celach porównawczych wykorzystano również obiekty pszenicy BG220 i LP749–29 będące opisanymi w literaturze liniami różnicującymi dla efektorów Tox3 i Tox5.

Wyniki

We wstępnych badaniach izolat Sn13–1-1 wykorzystywano, jako źródło filtratu do złożonego z kilku etapów chromatograficznego procesu oczyszczania efektorów Tox3.

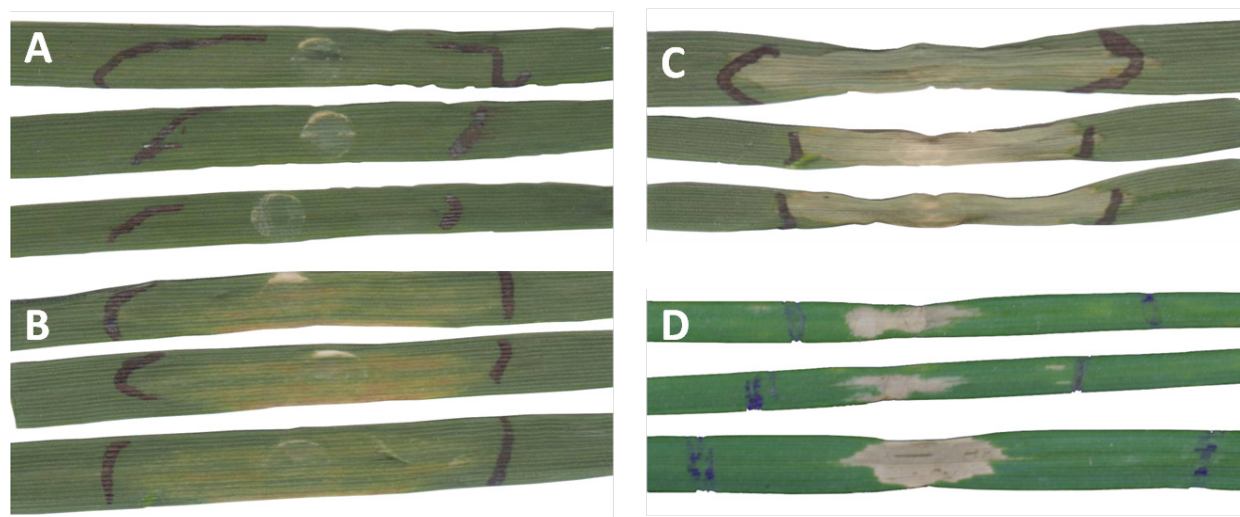
W celu określenia, jakie efekторы są potencjalnie produkowane przez izolat Sn13–1-1 z grzybni pozostałej po odsączeniu filtratu wyizolowano DNA, które wykorzystano do przeprowadzenia reakcji PCR ze starterami dla genów kodujących efekторы Tox1, Tox3 i ToxA. Po analizie elektroforetycznej określono, że izolat Sn13–1-1 zawiera gen *Tox3* natomiast nie zawiera genów *Tox1* i *ToxA* (tab. 1).

W celu sprawdzenia czy poza Tox3 izolat Sn13–1-1 produkuje również efektor Tox5 przez 28 dni prowadzono kulturę płynną, którą następnie odfiltrowano i wykorzystano do infiltracji liści łatwo dostępnych w Polsce odmian różnicujących oba efekторы. Zestaw ten infiltrowano również przy pomocy wypreparowanych efektorów Tox3 i Tox5. W wyniku infiltracji wykazano, że odmiany

Tabela 1
Table 1.

Efekторы produkowane przez izolat 13–1-1.
Effectors produced by isolate 13–1-1.

Izolat Isolate	Produkcja efektorów Production of effectors			
	Tox1	Tox3	Tox5	ToxA
13–1–1	-	+	-	-



Rys. 1. Rodzaje reakcji infiltrowanych liści na efektor Tox3: (A) niewrażliwe, (B) reakcja pośrednia, (C) wrażliwe, (D) miejsce infiltracji uszkodzone przez niskie pH.

Fig. 1. Reaction types of leaves infiltrated with Tox3 effector: (A) insensitive, (B) intermediate, (C) sensitive, (D) infiltration place damaged by low pH.

pszenicy Operetka i Natula oraz pszenżyto Borowik są wrażliwe zarówno na efektor Tox3 pochodzący z systemu ekspresyjnego jak i na nieoczyszczony filtrat izolatu Sn13–1-1, a niewrażliwe na oczyszczony preparat Tox5. Odmiana pszenicy Torrild oraz pszenżyta Cyrkon są wrażliwe na Tox5 a niewrażliwe na oba preparaty Tox3. Obiekty pszenicy jarej BG220 oraz LP749–29 są obiektami wykorzystywanymi w literaturze do różnicowania efektorów Tox3 oraz Tox5, ich reakcja na oczyszczone efekторы oraz filtrat Sn13–1-1 potwierdziły, że zawiera on efektor Tox3 a nie zawiera Tox5 (tab. 2).

Dyskusja

Niewrażliwość na efekторы białkowe ma wpływ na wykazywaną odporność na *P. nodorum* w warunkach polowych (Ruud i inni 2017). Trzy z nich Tox1, Tox3 oraz ToxA zostały sklonowane i są produkowane w systemach ekspresyjnych na masową skalę, oraz wykorzystywane do selekcji w programach hodowlanych pszenicy (Tan i inni 2014). Wykorzystanie systemów ekspresyjnych opartych o genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy, wiąże się z potrzebą posiadania odpowiednio wyposażonego laboratorium, spełnienia wymogów formalnych

związanych ze statusem prawnym GMM (Genetycznie Modyfikowanych Mikroorganizmów), oraz warunków licencyjnych, którymi podlegają komercyjnie dostępne systemy ekspresyjne. Również oczyszczanie efektorów do postaci homogenicznych białek metodami chromatograficznymi jest procesem kosztownym i skomplikowanym. Powoduje to, że początkowe nakłady wprowadzenia selekcji materiałów roślinnych z wykorzystaniem efektorów do programów hodowlanych są wysokie a proces jest kłopotliwy.

Rozwiązaniem zmniejszającym próg wejścia, może być uproszczenie procesu poprzez wykorzystanie częściowo oczyszczonych filtratów z hodowli wyselekcjonowanych izolatów *P. nodorum* produkujących tylko wybrane efekторы. Przedstawiony w powyższej pracy izolat Sn13–1-1 może być z powodzeniem wykorzystany do prostej produkcji filtratu zawierającego Tox3. Jego przydatność do tego celu potwierdziło wykluczenie poprzez badania PCR oraz powtarzane testy biologiczne, produkcji innych efektorów. Powodowane przez niego zmiany nekrotyczne u wrażliwych obiektów niczym nie różniły się od zmian powodowanych przez preparaty Tox3 pochodzące z transgenicznych systemów ekspresyjnych.

Reakcja obiektów pszenicy i pszenżyta na preparat zawierający efektor Tox3 jest powtarzalna. Pojawianie się zmian nekrotycznych można zaobserwować już po 48h, a infiltracja nawet kilku liści jednej siewki nie powoduje niebezpieczeństwa jej utracenia. Z tego powodu badania wrażliwości na efektor Tox3 mogą być prowadzone równoległe z innymi czynnościami hodowlany na tym samym materiale, co dodatkowo może ograniczyć koszty wprowadzenia tej metody do programów hodowlanych.

Wnioski

1. Wykorzystanie w hodowli odpornościowej na *P. nodorum*, selekcji materiałów z wykorzystaniem białkowych efektorów, może uniezależnić ten proces od nie zawsze powtarzalnych i kłopotliwych badań fenotypowych.
2. Wykorzystanie do produkcji efektorów odpowiednich izolatów *P. nodorum* może obniżyć koszty i ułatwić wprowadzenie tej metody do programów hodowlanych.
3. Izolat *P. nodorum* Sn13–1-1 może być wykorzystany, jako tanie źródło efektoru Tox3
4. Opisana metodyka oraz zestaw odmian może być wykorzystana do selekcji izolatów o podobnych właściwościach.

Tabela 1
Table 1.

Odmiany różnicujące wrażliwość na najpopularniejsze efekторы.

Differential cultivars for most common effectors.

Odmiana Cultivar	Wrażliwość na ekstrakt Extract sensitivity		
	Surowy filtrat 13–1–1 Crude filtrate 13–1–1	Oczyszczony Tox3 Purified Tox3	Oczyszczony Tox5 Purified Tox5
	BG 220	Wrażliwa Sensitive	Wrażliwa Sensitive
LP749–29	Niewrażliwa Insensitive	Niewrażliwa Insensitive	Wrażliwa Sensitive
Cyrkon	Niewrażliwa Insensitive	Niewrażliwa Insensitive	Wrażliwa Sensitive
Borowik	Wrażliwa Sensitive	Wrażliwa Sensitive	Niewrażliwa Insensitive
Torrild	Niewrażliwa Insensitive	Niewrażliwa Insensitive	Wrażliwa Sensitive
Natula	Wrażliwa Sensitive	Wrażliwa Sensitive	Niewrażliwa Insensitive

Literatura

- Abeysekera N., Friesen T. L., Keller B., Faris J. (2009) Identification and characterization of a novel host-toxin interaction in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem. *Theoret Appl Genetics* 120:117–126
- Faris J. D., Zhang Z., Rasmussen J. B., Friesen T. L. (2011) Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector SnToxA among isolates is correlated with levels of disease in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1419–1426.
- Francki M. G. (2013) Improving *Stagonospora nodorum* resistance in wheat: a review. *Crop Sci* 53:355–365
- 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. *Nat Genet* 38:953–956
- Friesen T. L., Meinhardt S. W., Faris J. D. (2007) The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. *Plant J. Cell Mol Biol* 51:681–692
- Friesen T. L., Faris J. D. (2010) Characterization of the wheat-*Stagonospora nodorum* disease system: what is the molecular basis of this quantitative necrotrophic disease interaction? *Can J. Plant Pathol-Rev Can Phytopathol* 32:20–28
- Gao Y., Faris J. D., Liu Z., Kim Y. M., Syme R. A., Oliver R. P., Xu S. S., Friesen T. L. (2015) Identification and characterization of the SnTox6-Snn6 interaction in the *Parastagonospora nodorum*-wheat pathosystem. *Mol Plant Microbe Interact M. P.I* 28:615–625
- González-Mendoza D., Argumedo-Delira R., Morales-Trejo A., Pulido-Herrera A., Cervantes-Díaz L., Grimaldo-Juarez O., Alarcón A. (2010) A rapid method for isolation of total D. N. from pathogenic filamentous plant fungi. *Genet. Mol. Res.* 9 (1): 162-166 (2010)
- Liu Z., Friesen T. L., Ling H., Meinhardt S. W., Oliver R. P., Rasmussen J. B., Faris J. D. (2006) The Tsn1-ToxA interaction in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat-tan spot system. *Genome* 49:1265–1273
- Liu Z., Faris J. D., Oliver R. P., Tan K. C., Solomon P. S., McDonald M. C., McDonald B. A., Nunez A., Lu S., Rasmussen J. B., Friesen T. L. (2009) SnTox3 acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the Snn3 gene. *P. L.S Pathog* 5:e1000581
- 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 Phytol*, 199: 241-251
- Ruud A. K., Windju S., Belova T., Friesen T. L., Lillemo, M. (2017) Mapping of SnTox3-Snn3 as a major determinant of field susceptibility to Septoria nodorum leaf blotch in the S. H.3/C.B.D×Naxos population. *TheorAppl Genet* 130: 1361
- Shi G., Friesen T. L., Saini J., Xu S. S., Rasmussen J. B., Faris J. D. (2015) The wheat gene confers susceptibility on recognition of the necrotrophic effector SnTox7. *Plant Genome* 8:1–10
- Tan K. C., Waters O. D., Rybak K., Antoni E., Furuki E., Oliver R. P. (2014) Sensitivity to three *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effectors in current Australian wheat cultivars and the presence of further fungal effectors. *Crop Pasture Sci* 65:150–158

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:

