

BIULETYN Nr 290 / 2020

ISSN 0373-7837

E-ISSN 2657-8913

INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN

BULLETIN

OF PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE



Dni Młodego Naukowca

Konferencja Dni Młodego Naukowca
Artykuły Naukowe

RADZIKÓW 2020
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

**BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
NR 290 / 2020**

DNI MŁODEGO NAUKOWCA 2020



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor: Prof. dr hab. Henryk Bujak

Komitety Redakcyjne

NAUKA

Redaktor Naczelny: Danuta Boros

Maja Boczkowska, Henryk J. Czembor, Anna Linkiewicz, Wiesław Mądry, Katarzyna Mikołajczyk,
Sławomir Podlaski, Barbara Zagdańska

WDROŻENIA

Redaktor Tematyczny: Wojciech Nowacki

Józef Adamczyk, Karol Bujoczek, Andrzej Chodkowski, Wiesław Dzwonkowski, Edward Gacek, Piotr
Kamiński, Karol Marciniak, Przemysław Matysik, Juliusz Młodecki, Jarosław Mostowski, Adam Stę-
pień, Roman Warzecha, Sławomir Wróbel

KONFERENCJE

Redaktor Tematyczny: Magdalena Szechyńska-Hebda

Katarzyna Gacek, Wiesław Podyma

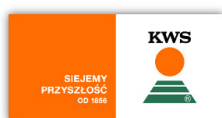
Czasopismo ukazuje się od 1951 roku

Redaktor techniczny i skład komputerowy: Aleksandra Pindor



OFICJALNI SPONSORZY

DNI MŁODEGO NAUKOWCA
W 2019 ROKU W IHAR — PIB W RADZIKOWIE



Najwyższa jakość
badań laboratoryjnych



Przydatność dla hodowli miejscowych populacji owsa siewnego o wysokim zróżnicowaniu cech fenotypowych



The importance of local oat populations with a wide variety of phenotypic traits in relation to breeding process

Grzegorz Kloc ✉, Denise F. Dostatny

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, Radzików 05–870, Błonie,
✉ e-mail: g.kloc@ihar.edu.pl

Wyjazdy kolekcyjne są jednym z ważniejszych źródeł pozyskiwania materiałów w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG). Wybór Litwy jako obszaru poszukiwań zasobów genowych był związany z historycznymi relacjami z Polską. W latach 2011 – 2013 przeprowadzono trzy ekspedycje, podczas których zebrano 32 obiekty *Avena sativa* L. wraz z danymi paszportowymi. Zebrane próbki zostały wysiane na 2,5 m² poletkach Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR-PIB) w Radzikowie w latach 2012, 2013, 2014. Na każdym poletku, ręcznie wysiano 600 nasion. Odnotowywano stan wylegania roślin, pojawiające się choroby, wyliczono masę tysiąca ziaren oraz plon. U większości obiektów wiechowanie występowało później niż u odmian wzorcowych. Lokalne obiekty odmian owsa były wyższe od wzorcowych obiektów a mimo to odznaczały się niskim stopniem wylegania. Lokalne odmiany owsa mogą stanowić źródło pojedynczych, unikalnych cech poszukiwanych przy tworzeniu nowych odmian.

Słowa kluczowe: owies, ekspedycje, zasoby genowe

Collecting missions are among the most important sources of collecting materials at the National Center for Plant Genetic Resources (KCRZG). The choice of Lithuania as a place to search for genetic resources was associated with historical relations with Poland. In the years 2011 - 2013 three collecting missions took place, collecting 32 accessions of *Avena sativa* L. with passport data. Collected samples were sown on 2.5 m² plots at Radzików IHAR in 2012, 2013, 2014. 600 seeds were manually sown on each plot. During observations, plant lodging and emerging diseases were noted, and thousand grain weight and yield was calculated. For most accessions, panicles appeared later than in reference varieties. Local objects in this category were higher than the reference objects and had a low lodging degree. Local oat can be a source of individual, unique traits for breeding.

Key words: oat, collecting missions, gene resources

Wstęp

Zbiór miejscowych oraz regionalnych odmian roślin rolniczych jest ważnym elementem w poszukiwaniu specyficznych cech, takich jak odporność na choroby czy przystosowanie do lokalnych warunków środowiskowych. Mogą one stanowić źródło przydatnych cech w hodowli nowych odmian. Kluczowym elementem globalnego bezpieczeństwa żywnościowego jest różnorodność genetyczna roślin, zapewniana poprzez gromadzenie obiektów podczas wyjazdów kolekcyjnych. Jest ona przydatna zarówno w procesie hodowlanym, jak i w zachowaniu bioróżnorodności roślin. (Rocha i in. 2017). Wybór obszaru poszukiwań zasobów genowych był związany z historycznymi relacjami Litwy i Polski. Decyzję o organizacji wyprawy na Litwę podjęto, ponieważ tereny te przez dłuższy czas i w dużym stopniu zamieszkiwane były przez Polaków. Nadal

widoczne jest tam podobieństwo w sposobie uprawy. W przeszłości miała miejsce duża wymiana, zarówno materiału siewnego, jak i informacji na temat sposobów prowadzenia gospodarstwa. Celem wypraw terenowych na Litwę był zbiór nasion roślin rolniczych do dalszego rozmnożenia oraz ewaluacji, a także ich zdeponowanie w przechowalni długoterminowej KCRZG. Celem pracy jest ukazanie wstępnej ewaluacji zebranych obiektów owsa podczas trzech ekspedycji na Litwę z zamiarem wyboru tych najbardziej przydatnych z przeznaczeniem do dalszych badań.

Metodyka

Litwa charakteryzuje się klimatem przejściowym. Średnia temperatura w lipcu wynosi +16,7°C, w styczniu -4,1°C (<https://tradingeconomics.com/lithuania/temperature>). Grunty rolne zajmują 47,98% (<https://tradingeconomics.com/>

lithuania/agricultural-land-percent-of-land-area-wb-data.html). Natomiast w Polsce średnia temperatura w lipcu wynosi + 16,8°C, w styczniu -2,7°C (<https://tradingeconomics.com/poland/temperatura>), a grunty rolne zajmują 46.93% powierzchni kraju (<https://tradingeconomics.com/poland/agricultural-land-percent-of-land-area-wb-data.html>). W latach 2011 – 2013 przeprowadzono trzy ekspedycje, podczas których zapisywano dane paszportowe wraz z cechami użytkowymi zbieranych próbek, a także wskazówkami od gospodarzy dotyczącymi ich uprawy. Zapisywanie dokładnych danych paszportowych jest istotne w przypadku zapoznawania się z wiedzą o tradycyjnych metodach uprawy oraz zmianach w nich wprowadzanych, które mogą wynikać z postępujących zmian klimatu (Bioversity International, 2015). Po powrocie z ekspedycji wszystkie informacje zostały wprowadzone do bazy danych w KCRZG IHAR-PIB w Radzikowie, a próbki owsa siewnego rozmnożono na poletkach doświadczalnych IHAR-PIB w Radzikowie. Zebrane próbki zostały wysiane na 2,5m² poletkach w latach 2012, 2013, 2014. Na każdym poletku, ręcznie wysiano 600 nasion. Odnutowywano stan wylegania roślin (skala 0–9, 9 oznacza brak wylegania) oraz pojawiające się choroby (septorioza, mączniak oraz rdza koronowa) w dwóch terminach w czasie sezonu wegetacyjnego. Wyliczono masę tysiąca ziaren (MTZ) oraz plon w gramach (w przeliczeniu na kg). W 2012 roku odmianę wzorcową w doświadczeniach stanowiła polska odmiana „Krezus”, a w 2013 i 2014 – „Celer”.

Wyniki i dyskusja

Podczas trzech ekspedycji zorganizowanych w latach 2011–2013 na terenie Litwy zebrano nasiona 124 obiektów należących do 6 gatunków roślin zbożowych, w tym 32 obiekty owsa siewnego (tab. 1). Duża część zebranych obiektów owsa była uprawiana na paszę, a niektóre pochodziły z mieszanek zbóż. W 2011 roku zebrano 9 prób *Avena sativa* L., cztery (138, 139 144, 168) o przeznaczeniu spożywczym, a pozostałe obiekty o przeznaczeniu na paszę. W 2012 roku zebrano 19 obiektów, 6 pochodziło z mieszanek z jęczmieniem (006, 383, 389, 390, 289, 309); 2 próbki o przeznaczeniu na kielki (338 oraz 360), a pozostałe 11 na paszę. Natomiast w 2013 roku w rejonie solecznickim zebrano tylko 5 próbek, które pochodziły z mieszanek, najczęściej z jęczmieniem, a także z żytem, grochem oraz peluszką, o przeznaczeniu wyłącznie na paszę.

Wśród obiektów *Avena sativa* L. obserwowanych w roku 2012 faza wiechowania najwcześniej wystąpiła dla obiektu LITLIT11 139, jednocześnie

Tabela 1

Table 1

Obiekty zebrane podczas trzech wyjazdów kolekcyjnych na terenie Litwy w latach 2011 – 2013

Samples collected during three collecting missions in Lithuania in 2011 - 2013

| Zboża Cereals | Liczba obiektów Number of samples |
|---|--------------------------------------|
| <i>Hordeum vulgare</i> L. | 31 |
| <i>Triticum aestivum</i> L. | 31 |
| <i>Triticum spelta</i> L.W | 1 |
| × <i>Triticosecale</i> Wittm. ex A.Camus | 14 |
| <i>Avena sativa</i> L. | 33 |
| <i>Secale cereale</i> L. | 15 |
| Łącznie / Total | 125 |

był on jednym z najszybciej dojrzewających. Obiekt był najniższy w danym roku, wyleganie nie wystąpiło oraz nie odnotowano występowania chorób. Charakteryzował się on najwyższą masą tysiąca ziaren (MTZ 38,6 g), najwyższą masą ziaren po omłóceniu oraz jednym z najwyższych plonów (1,24kg/2,5m², 70% odmiany wzorcowej). Najślabiej pod względem wielkości plonu (0,52kg/2,5m²) mimo braku wylegania i wysokiej odporności na choroby prezentował się obiekt LITLIT11 119, który stanowił zaledwie 30% plonu odmiany wzorcowej (rys.2 A).

W rozmnożeniu w roku 2013 podczas obserwacji najwyższy plon (1,58kg/2,5m², 87% odmiany wzorcowej) oraz MTZ (31 g) (rys.2 B) odnotowano dla obiektu LITZAP12 360 jednocześnie przy jego wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego oraz rdzę koronową. Wiechowanie tego obiektu wystąpiło pod koniec czerwca. Jest to owies z łuską, uprawiany na ziarno z przeznaczeniem na kielki. Najślabiej prezentował się obiekt LITZAP12 390, posiadał najniższy plon (43% w stosunku do odmiany wzorcowej), niskie MTZ (21,7 g) oraz wykazywał się najwyższym porażeniem rdzą koronową (rys. 2). (rys.1 B). Podczas, gdy u odmian wzorcowych porażenie mączniakiem odnotowano w przedziale między 4 a 6, to w przypadku odmian miejscowych był to przedział między 7 a 9 oraz 8 z 19 obiektów wykazywało się brakiem porażenia przez mączniaka (rys.1 B).

W roku 2014 u większości obiektów zaobserwowano porażenie mączniakiem (rys.1 C) i brak wylegania pomimo, że rośliny były wyższe w porównaniu do roślin wzorcowych. Wiecha obiektu LITCEN13 399 z największym plonem (980 g), (rys.2 C) pojawia się najpóźniej pod koniec

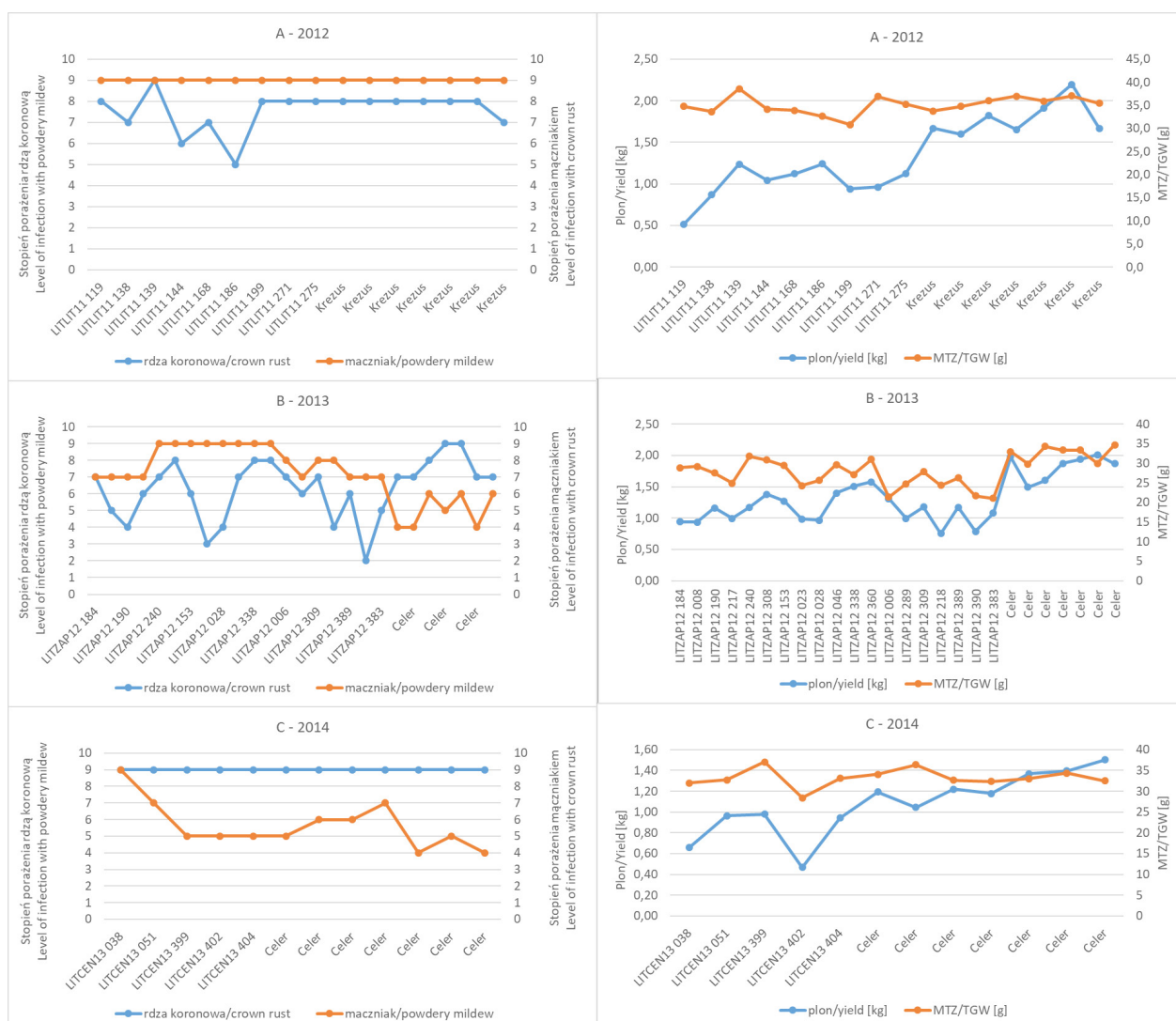
czerwca. Owies ten pochodzi z mieszanki (wyka, peluszką, owies) uprawianej na paszę dla zwierząt.

Zaobserwowano duże zróżnicowanie cech fenotypowych między badanymi miejscowymi populacjami owsa siewnego. Otwiera to drogę do selekcji korzystnych cech dla hodowli, (Łapiński i in 2013; Kordulasińska i Bulińska-Radomska 2014; Pszczółkowski i Sawicka, 2016). Według Nita (2003), odmiany wykazujące się najlepszymi cechami morfologicznymi czy rolniczymi powinny być wykorzystywane w procesie hodowlanym do tworzenia genotypów o pożądanym właściwościach (Nita, 2003). Iannucci i inni (2011) dodatkowo podkreślają, że brak silnych sprzężeń między badanymi cechami pozwala na uzyskanie

„użytecznych kombinacji” do badań hodowlanych.

Podsumowanie

Odmiany lokalne *Avena sativa* L. pozyskane w czasie ekspedycji na terenie Litwy charakteryzowały się dużą zmiennością cech. U większości obiektów wiechowanie występowało później niż u odmian wzorcowych. Lokalne obiekty odmian owsa były wyższe od wzorcowych obiektów, a mimo to odznaczały się niskim stopniem wylegania. Zaobserwowano mniejsze zróżnicowanie pod względem masy tysiąca ziaren (MTZ) w porównaniu z wzorcami mimo tego, że plon odmian lokalnych był ogólnie niższy. Obiekty zebrane w 2012 r. odznaczały się większą odpornością na mączniaka



Rys. 1. Stopień porażenia mączniakiem prawdziwym oraz rdzą koronową obiektów *Avena sativa* L. (2012–2014)

Fig. 1. Susceptibility of *Avena sativa* L. for powdery mildew and crown rust (2012–2014).

Rys. 2. Wysokość plonu oraz masa tysiąca ziaren obiektów *Avena sativa* L. (2012–2014).

Fig. 2. Yield level and thousand grain weight for *Avena sativa* L. (2012–2014).

niż odmiany wzorcowe. Lokalne odmiany zebrane w 2013 r. w regionie sołecznickim, gdzie nie ma tradycji uprawiania owsa były użytkowane tylko na paszę, dlatego odznaczały się niskimi parametrami plonu. Lokalne odmiany owsa mogą stanowić źródło pojedynczych, unikalnych cech, poszukiwanych do stworzenia nowych odmian.

Literatura

- Bioversity International. (2015). The history of Bioversity International collecting missions.: <http://www.bioversityinternational.org/e-library/databases/collecting-missions/history/>(dostęp: październik 2019).
- Iannucci, A., Codianni, P., Cattiveli, L., (2011). Evaluation of Genotype Diversity in Oat Germplasm and Definition of Ideotypes Adapted to the Mediterranean Environment. *International Journal of Agronomy*: 1–8.
- Kordulasińska, I., Bulińska-Radowska, Z., (2014). Ocena cech morfologicznych, użytkowych i składu chemicznego obiektów owsa zgromadzonych w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Radzikowie. *Polish Journal of Agronomy*, 16: 3–12.
- Łapiński, B., Nita, Z., Szołkowska, A., Wieczorek, P., (2013). Mieszaniec owsa uprawnego z dzikim gatunkiem *Avena macrostachya* jako nowe źródło zmienności do poprawy jakości plonu owsa nagoziarnistego. *Biuletyn IHAR*, 270: 43–54.
- Nita, Z. T., (2003). Współczesne osiągnięcia i perspektywy hodowli owsa w Polsce. *Biuletyn IHAR*, 229: 13–20.
- Pszczółkowski, P., Sawicka, B., (2016). Zmienność form i odmian owsa w Polsce. *Polish Journal of Agronomy* 27: 106–117.
- Rocha, F., Gaspar, C., Barata, A. M., (2017). The legacy of collecting missions to the valorisation of agro-biodiversity. *Agriculture & Forestry*, vol 63, issue 2: 25–38.
- Trading Economics. <https://tradingeconomics.com/poland/agricultural-land-percent-of-land-area-wb-data.html>.
- Trading Economics. <https://tradingeconomics.com/poland/temperature>.
- Trading Economics. <https://tradingeconomics.com/lithuania/agricultural-land-percent-of-land-area-wb-data.html>.
- Trading Economics. <https://tradingeconomics.com/lithuania/temperature> (dostęp: październik 2019).

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:



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 nekrotroficznymi 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 patogenez, 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.

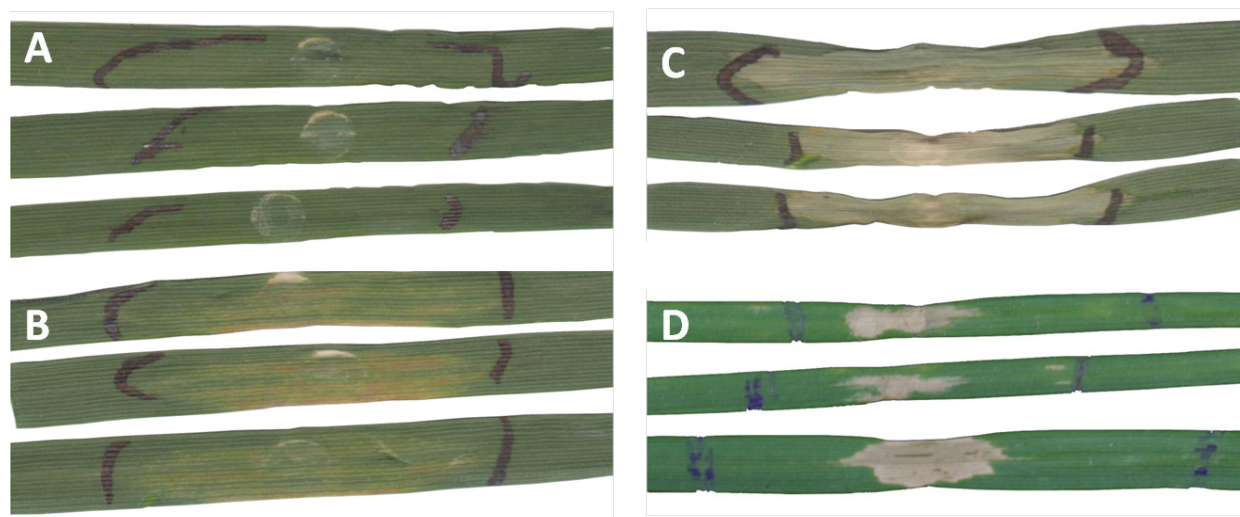
W celu określenia, jakie efekторы są potencjalnie produkowane przez izolat Sn13–1-1 z grzybni pozostałej po odsączeniu filtratu wyizolowano DNA, które wykorzystano do przeprowadzenia reakcji PCR ze starterami dla genów kodujących efekторы Tox1, Tox3 i ToxA. Po analizie elektroforetycznej określono, że 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 | Niewrażliwa Insensitive |
| | Niewrażliwa Insensitive | Niewrażliwa Insensitive | Wrażliwa Sensitive |
| LP749–29 | Niewrażliwa Insensitive | Niewrażliwa Insensitive | Wrażliwa Sensitive |
| | Wrażliwa Sensitive | Wrażliwa Sensitive | Niewrażliwa Insensitive |
| Cyrkon | Wrażliwa Sensitive | Wrażliwa Sensitive | Niewrażliwa Insensitive |
| | Niewrażliwa Insensitive | Niewrażliwa Insensitive | Wrażliwa Sensitive |
| Borowik | Wrażliwa Sensitive | Wrażliwa Sensitive | Niewrażliwa Insensitive |
| | Niewrażliwa Insensitive | Niewrażliwa Insensitive | Wrażliwa Sensitive |
| Torrild | Wrażliwa Sensitive | Wrażliwa Sensitive | Niewrażliwa Insensitive |
| | Niewrażliwa Insensitive | Niewrażliwa Insensitive | Wrażliwa Sensitive |
| Natula | Wrażliwa Sensitive | Wrażliwa Sensitive | Niewrażliwa Insensitive |
| | Niewrażliwa Insensitive | Niewrażliwa Insensitive | Wrażliwa Sensitive |

Literatura

- Abeyssekara 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:



System BER w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych u roślin

System BER in the repair of oxidative damage in plants

Sylwia Włodarczyk ✉



Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych,
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie, Radzików IHAR 1,
05–870 Błonie,
✉ s.wlodarczyk@ihar.edu.pl

Rośliny wytworzyły szereg mechanizmów odpowiadających za naprawę uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych reaktywnymi formami tlenu. System naprawy poprzez wycinanie zasad wydaje się głównym systemem naprawczym prowadzącym do zniwelowania zmian wytworzonych przez reaktywne formy tlenu. Uważa się, że dwoma ważnymi enzymami odpowiadającymi za usuwanie 8-oksoguaniny są glikozylaza 8-oksoguaniny DNA i glikozylaza DNA formamidopirimidyny. Wielu badaczy zauważa zależność pomiędzy nagromadzeniem zmian oksydacyjnych w komórce, a aktywnością glikozylazy 8-oksoguaniny DNA i glikozylazy DNA formamidopirimidyny, oraz starzeniem się nasion. Potwierdzono, że poziom FPG oraz OGG1 wzrasta podczas imbibicji nasion. Niniejsza praca ma na celu przybliżenie działania systemu naprawczego BER w procesie napraw uszkodzeń oksydacyjnych oddziałujących na starzenie się nasion. Celem pracy jest przedstawienie obecnego stanu na temat działania systemu BER (ang Base Excision Repair) w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych wpływających na starzenie się nasion.

Słowa klucze: system BER, starzenie nasion, ROS, uszkodzenia oksydacyjne, FPG, OGG1

Plants have developed a number of mechanisms that are responsible for repairing the oxidative damage caused by reactive oxygen species. The base excision repair system is the main repair system for removing such changes. Herein, 8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase are the two enzymes of importance for removing 8-oxoG. Researchers have confirmed that FPG and OGG1 levels increase during seed imbibition. Indeed, many researchers note the relationship between the accumulation of oxidative changes in the cell and the activity of OGG1 and FPG and the aging of seeds. This short review aims at presenting the published data on the operation of the base excision repair system in the process of repairing oxidative damage affecting seed aging.

Key words: BER system, seed aging, ROS, oxidative damage, FPG, OGG1

Wstęp

Reaktywne formy tlenu (Reactive Oxygen Species – ROS) mogą być wytwarzane jako produkty uboczne metabolizmu komórki i uważane są za jedną z głównych przyczyn utraty żywotności nasion oraz pogorszenia się ich zdolności kiełkowania (El-Maarouf-Bouteau i wsp., 2011). W trakcie przechowywania nasion, utrata żywotności związana jest z nagromadzeniem się pęknięć nici DNA i aberracjami chromosomów, co potwierdza związek pomiędzy zmniejszonym kiełkowaniem podczas starzenia się nasion, a uszkodzeniami DNA (Waterworth i wsp., 2011). ROS indukuje wiele uszkodzeń DNA w tym powstawanie modyfikacji guaniny najczęściej 8-oksoguaniny (8-oksog), której poziom znacznie wzrasta podczas starzenia się nasion. W naprawie tych uszkodzeń bierze udział system naprawczy BER (Base Excision Repair), w którym

pośredniczą dwa enzymy FPG (glikozylaza DNA formamidopirimidyny) oraz OGG1 (glikozylaza 8-oksoguaniny DNA) odpowiedzialne za rozpoznawanie oraz usuwanie zmian oksydacyjnych. Celem pracy jest przybliżenie działania systemu naprawczego BER w procesie napraw uszkodzeń oksydacyjnych oddziałujących na starzenie się nasion.

1. System naprawczy BER i jego rola w redukcji uszkodzeń oksydacyjnych

Jedną z głównych ścieżek naprawy DNA obecną we wszystkich organizmach jest naprawa poprzez wycinanie zasad. BER zapobiega mutagenym i cytotoksycznym skutkom uszkodzeń, które występują w zasadach azotowych DNA, a jego rola w utrzymaniu integralności genomu jest istotna (Drohat i Coey, 2016). Uszkodzenia oksydacyjne takie jak 8-oksoguanina (utleniona

forma guaniny) naprawiane są głównie poprzez system BER (Zharkov, 2008). Mechanizm naprawy BER jest inicjowany przez glikozylazy DNA (specyficzne dla danego uszkodzenia), które przecinają wiązanie N-glikozydowe między uszkodzoną zasadą, a deoksyrybozą tworząc w ten sposób miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP). Następnie niezbędna do usunięcia miejsca AP jest endonukleaza AP, bądź liaza AP, powodująca rozkład do oligonukleotydów poprzez rozerwanie wiązań fosfodiesterowych wewnątrz łańcucha DNA (Zharkov, 2008). W kolejnym etapie ścieżka naprawy może przebiegać w dwojaki sposób za pomocą mechanizmu „krótkiej” bądź „długiej” łąty. O wyborze danego mechanizmu decyduje rodzaj zaangażowanego enzymu oraz występująca zmiana. Mechanizm „krótkiej łąty” generowany jest w momencie gdy potrzebna jest wymiana jednego niewłaściwego nukleotydu natomiast „długa łąta” aktywowana jest podczas naprawy 2–13 nukleotydów. Obie ścieżki wymagają fragmentów oflankowanych poprzez 3'-OH i 5'-dRP. W proces naprawy „długiej łąty” jest zaangażowana polimeraza, która uzupełnia sekwencje wypychając fragment oflankowany 5'dRP wraz z kilkoma nukleotydami. Następnie endonukleaza usuwa wypchnięty przez polimerazę fragment. W kolejnym etapie uzupełniona sekwencja zostaje połączona z nicią DNA poprzez działanie ligazy. Natomiast w mechanizmie „krótkiej łąty” uczestniczy liaza 5'-dRP usuwając oflankowane miejsce. Następnie poprzez działanie polimerazy DNA oraz ligazy DNA następuje uzupełnienie usuniętego miejsca AP oraz połączenie nici. Niestety tożsamość polimerazy DNA zaangażowanej w ten proces nie jest jeszcze do końca poznana. Badacze sugerują, że może być to Polimeraza α jednak nie ma co do tego pewności. Niezbędne są dalsze badania, które dostarczą więcej informacji na ten temat (Roldan-Arjona T. i wsp., 2019). (Rys. 1).

1.1. Glikozylazy

Glikozylazy DNA to enzymy, które rozpoznają uszkodzone lub zmodyfikowane zasady w DNA i usuwają je poprzez rozszczepienie wiązania N-glikozydowego, które łączy zasady z cukrem 2-deoksyrybozowym (Brooks i wsp., 2013). Przeszukiwanie zasad w łańcuchu DNA ułatwia lokalizowanie zmian, które nie zniekształcają znacznie ogólnej struktury DNA. Każdy gatunek biologiczny ma kilka różnych glikozylaz DNA (Zharkov, 2008). Różne rodzaje glikozylaz DNA wyspecjalizowane są w wyszukiwaniu konkretnych typów

uszkodzeń i zmian. W roślinach wykryto cztery nadrodziny strukturalne glikozylaz DNA, w tym glikozylazę alkiladeniny DNA (AAG), glikozylazę uracylu DNA (UDG), glikozylazy zawierające motyw helisa-spinka-helisa (HhH-GPD) oraz glikozylazy z nadrodziny białek H2TH (Dalhus i wsp., 2009). Na szczególną uwagę zasługują nadrodziny HhH-GPD oraz H2TH. Nadrodzina HhH-GPD posiada domenę wiążącą DNA w sposób niezależny od sekwencji. Do tej grupy enzymów zaliczamy glikozylazy 8-oksoguaniny DNA (OGG), które usuwają główne produkty utleniania puryny 8-oksoG. Nadrodzina H2TH zawiera enzymy dwufunkcyjne mające zdolności przecinania szkieletu cukrowo-fosforanowego (Huffman i wsp., 2005). Do tej nadrodziny należy glikozylaza DNA formamidopirimidyny (FPG) rozpoznająca produkty utleniania 8-oksoG takie jak formamidopirimidyny, spiroiminodihydantoinę i guanidynohydantoinę (Kathe i wsp., 2009). Enzymy OGG1 oraz FPG są zaangażowane w naprawę uszkodzeń oksydacyjnych.

1.2. Endonukleazy AP

Endonukleazy te hydrolizują wiązanie 5'-3' fosfodiesterowe po stronie 5' od miejsca AP. W efekcie następuje pojedyncze pęknięcie nici z wolnymi końcami 3'-OH i 5'-dRP. W genomach rzodkiewnika, ryżu i trzciny cukrowej zidentyfikowano geny trzech endonukleaz: ARP (ang. apurinic endonuclease-redox protein), APE1L (ang. apurinic/aprimidinic endonuclease 1) i APE2 (ang. apurinic/aprimidinic endonuclease 2) (Murphy i wsp., 2009; Joldybayayeva i wsp., 2014; Maira i wsp., 2014; Cabral Medeiros i wsp., 2019). Endonukleaza ARP jest niezbędna do przetwarzania nacięć produktów pośrednich naprawy DNA w starzejących się nasionach. Aktywność liaz OGG1 i FPG podczas naprawy 8-oxoG powoduje powstawanie zablokowanych końców 3', które muszą zostać przetworzone do końców 3'-hydroksylowych, zanim nastąpi etap uzupełnienia luki oraz ligacja DNA. Endonukleaza ARP ma aktywność 3'-fosfodiesterazy, która usuwa grupy blokujące końce 3' (Cordoba-Cañero i wsp., 2014).

1.3. Polimerazy i ligazy

W syntezie DNA podczas naprawy BER bierze udział polimeraza należąca do jednej z trzech rodzin: A (eukariotyczna mitochondrialna Pol γ), B (eukariotyczna DNA Pol δ , ϵ , α) oraz X (eukariotyczna DNA Pol α , β) (Zharkov, 2008). Niestety badania na temat polimeraz biorących udział w naprawie

BER u roślin nie są jeszcze na tyle zaawansowane, aby w pełni scharakteryzować ich działanie. W systemie BER uzupełnienie jednoniciowych końcówek DNA następuje poprzez aktywność liganzy DNA. Enzymy te biorą udział w wielu procesach metabolizmu DNA i posiadają zdolność do wytworzenia wiązania fosfodiesterowego (Tomkinson i wsp., 2006).

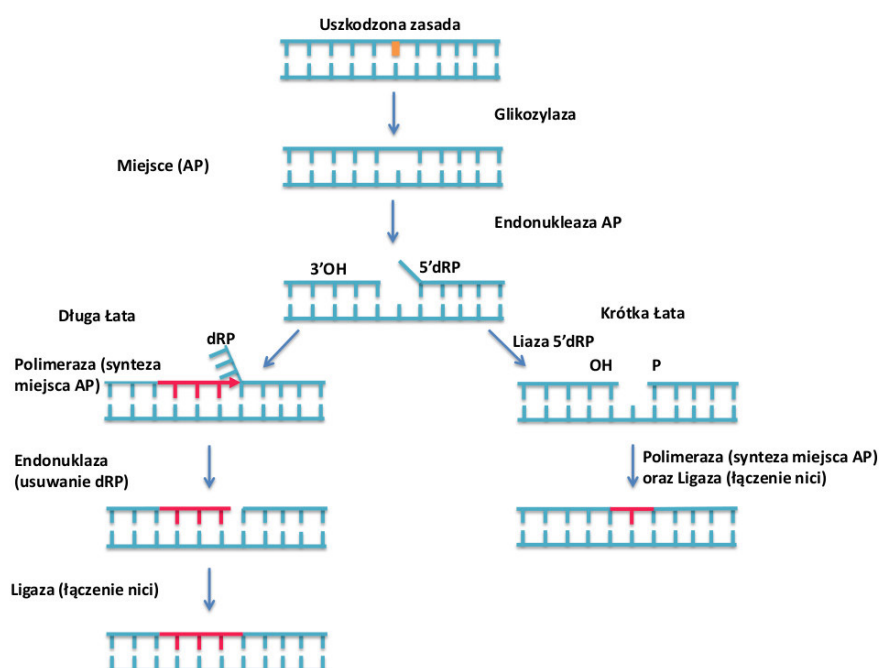
2. Rola systemu BER w starzeniu nasion

Nasiona przechowywane długoterminowo są podatne na uszkodzenia oksydacyjne wywołane przez reaktywne formy tlenu (Jeevan Kumar i wsp., 2015). W badaniach nad żywotnością przechowywanych nasion buka wykazano, że poziom H_2O_2 jest silnie skorelowany ze zmniejszonym poziomem kiełkowania (Ratajczyk i wsp., 2015). Wzrost poziomu H_2O_2 wpływa również negatywnie na zdolność kiełkowania u owsa, pszenicy, słonecznika, dębu i bawełny (Kong i wsp., 2015; Kibinza i wsp., 2006; Goel i Sheoran, 2003; Romero-Rodriguez i wsp., 2018). W badaniach nad *Arabidopsis thaliana* (Chen i wsp., 2012), *Medicago truncatula* (Macovei i wsp., 2011) i *Shorea robusta* (Chandra i wsp., 2018) wykazano, że zwiększony poziom 8-oksoG wpływa negatywnie na proces kiełkowania i prowadzi do przyśpieszonego starzenia się nasion. Uszkodzenia oksydacyjne wywołane przez ROS w szczególności 8-oksoG są naprawiane poprzez system BER, dzięki udziałowi specyficznych enzymów takich jak FPG oraz OGG1. Są to glikozylazy

DNA, które hydrolizują wiązanie glikozydowe między deoksyrybozą a błędną zasadą, uwalniając w ten sposób uszkodzoną zasadę i tworząc miejsce AP (Roldan-Arjona i Ariza, 2009). Geny FPG zostały opisane w *A. thaliana* oraz trzcinie cukrowej (Murphy i George, 2005; Scortecci i wsp., 2007). Roślinny OGG1 po raz pierwszy został wyizolowany i scharakteryzowany u *A. thaliana* (Dany i Tisser, 2001). W badaniach na *M. truncatula* wykazano, że geny OGG1 i FPG biorą udział w mechanizmach naprawy nasion podczas stresu oksydacyjnego. Potwierdzono, że poziom ekspresji obu genów wzrasta podczas imbibicji. Wskazuje to na ich udział w mechanizmach naprawy uszkodzeń oksydacyjnych w nasionach (Macovei i wsp., 2011).

Wnioski

Starzenie się jest poważnym problemem dla utrzymania żywotności nasion podczas długoterminowego przechowywania zarówno w warunkach naturalnych, jak i bankach genów. Udowodniono, że starzenie jest powiązane z szeregiem pogarszających się zmian zachodzących na poziomie komórkowym, biochemicznym i metabolicznym (El-Maaraouf-Bouteau i wsp., 2011). Zrozumienie mechanizmów fizjologii i biochemii zjawiska starzenia się jest niezbędne dla opracowania odpowiednich protokołów przechowywania nasion dla różnych gatunków roślin (Chen i wsp., 2013; Michalak i wsp., 2015). Uważa się, że nadmierna



Rys. 1. Mechanizm systemu naprawczego BER – Base Excision Repair

Fig.1. Mechanism of system repair BER - Base Excision Repair

akumulacja reaktywnych form tlenu przyczynia się do starzenia nasion podczas długoterminowego przechowywania (Chandra i wsp., 2018). System BER wydaje się głównym systemem naprawczym prowadzącym do zniwelowania zmian wytworzonych przez ROS. Uważa się, że dwoma ważnymi enzymami odpowiadającymi za usuwanie 8-oksoG są OGG1 i FPG. Enzymy te działają poprzez wyszukanie i wycięcie uszkodzenia oksydacyjnego. Wielu badaczy zauważa zależność pomiędzy nagromadzeniem zmian oksydacyjnych w komórce, a aktywnością OGG1 i FPG oraz starzeniem się nasion. Niestety dokładny mechanizm działania tych dwóch enzymów na proces starzenia wywołanego ROS nie jest jeszcze do końca poznany.

Literatura

- Brooks, S. C., Adhikary, S., Rubinson, E. H., Eichman, B. F., (2013). Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834, 247–271. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.005>
- Cabral Medeiros, N. M., Córdoba-Cañero, D., García-Gil, C. B., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., Scortecci, K. C., (2019). Characterization of an AP endonuclease from sugarcane – ScARP1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 514, 926–932. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.156>
- Chandra, J., Parkhey, S., Keshavkant, S., (2018). Ageing-regulated changes in genetic integrity of two recalcitrant seeded species having contrasting longevity. *Trees* 32, 109–123. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1615-6>
- Chen, H., Chu, P., Zhou, Y., Li, Y., Liu, J., Ding, Y., Tsang, E. W. T., Jiang, L., Wu, K., Huang, S., (2012). Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 63, 4107–4121. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers093>
- Chen, H., Osuna, D., Colville, L., Lorenzo, O., Graeber, K., Küster, H., Leubner-Metzger, G., Kranner, I., (2013). Transcriptome-Wide Mapping of Pea Seed Ageing Reveals a Pivotal Role for Genes Related to Oxidative Stress and Programmed Cell Death. *PLoS ONE* 8, e78471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078471>
- Córdoba-Cañero, D., Roldán-Arjona, T., Ariza, R. R., (2014). Arabidopsis ZDP DNA 3'-phosphatase and ARP endonuclease function in 8-oxoG repair initiated by FPG and OGG1 DNA glycosylases. *Plant J* 79, 824–834. <https://doi.org/10.1111/tbj.12588>
- Dalhus, B., Laerdahl, J. K., Backe, P. H., Bjørås, M., (2009). DNA base repair – recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev* 33, 1044–1078. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00188.x>
- Dany, A. L., Tissier, A., (2001). A functional OGG1 homologue from Arabidopsis thaliana. *Molecular Genetics and Genomics* 265, 293–301. <https://doi.org/10.1007/s004380000414>
- Drohat, A. C., Coey, C. T., (2016). Role of Base Excision “Repair” Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA. *Chem. Rev.* 116, 12711–12729. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00191>
- El-Maarouf-Bouteau, H., Mazuy, C., Corbineau, F., Bailly, C., (2011). DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *Journal of Experimental Botany* 62, 5003–5011. <https://doi.org/10.1093/jxb/err198>
- Goel, A., Sheoran, I., (2003). Lipid Peroxidation and Peroxide-Scavenging Enzymes in Cotton Seeds Under Natural Ageing. *Biologia Plantarum* 46, 429–434. <https://doi.org/doi.org/10.1023/A:1024398724076>
- Huffman, J. L., Sundheim, O., Tainer, J. A., (2005). DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 577, 55–76. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.012>
- Jeevan Kumar, S. P., Rajendra Prasad, S., Banerjee, R., Thammneni, C., (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Ann Bot* 116, 663–668. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv098>
- Joldybayeva, B., Prorok, P., Grin, I. R., Zharkov, D. O., Ishenko, A. A., Tudek, B., Bissenbaev, A. K., Saparbaev, M., (2014). Cloning and Characterization of a Wheat Homologue of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Ape1L. *PLoS ONE* 9, e92963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092963>
- Kathe, S. D., Barrantes-Reynolds, R., Jaruga, P., Newton, M. R., Burrows, C. J., Bandaru, V., Dizdaroglu, M., Bond, J. P., Wallace, S. S., (2009). Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases. *DNA Repair* 8, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.12.013>
- Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C., Corbineau, F., (2006). Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiol Plant* 128, 496–506. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00771.x>
- Kong, L., Huo, H., Mao, P., (2015). Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00158>
- Macovei, A., Balestrazzi, A., Confalonieri, M., Faé, M., Carbonera, D., (2011). New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 1040–1050. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.05.007>
- Maira, N., Torres, T. M., de Oliveira, A. L., de Medeiros, S. R. B., Agnez-Lima, L. F., Lima, J. P. M. S., Scortecci, K. C., (2014). Identification, characterisation and molecular modelling of two AP endonucleases from base exci-

- sion repair pathway in sugarcane provide insights on the early evolution of green plants. *Plant Biol J* 16, 622–631. <https://doi.org/10.1111/plb.12083>
- Michalak, M., Plitta-Michalak, B. P., Naskręt-Barciszewska, M., Barciszewski, J., Bujarska-Borkowska, B., Chmielarz, P., (2015). Global 5-methylcytosine alterations in DNA during ageing of *Quercus robur* seeds. *Ann Bot* 116, 369–376. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv104>
- Murphy, T. M., Belmonte, M., Shu, S., Britt, A. B., Hatteroth, J., (2009). Requirement for Abasic Endonuclease Gene Homologues in Arabidopsis Seed Development. *PLoS ONE* 4, e4297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004297>
- Murphy, T.M., George, A., (2005). A comparison of two DNA base excision repair glycosylases from Arabidopsis thaliana. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 869–872. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.054>
- Ratajczak, E., Małecka, A., Bagniewska-Zadworna, A., Kalemba, E. M., (2015). The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* 174, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.021>
- Roldán-Arjona, T., Ariza, R. R., (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research* 681, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.07.003>
- Roldán-Arjona, T., Ariza, R. R., Córdoba-Cañero, D., (2019). DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. *Front. Plant Sci.* 10, 1055. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01055>
- Romero-Rodríguez, M. C., Archidona-Yuste, A., Abril, N., Gil-Serrano, A. M., Meijón, M., Jorrín-Novo, J. V., (2018). Germination and Early Seedling Development in *Quercus ilex* Recalcitrant and Non-dormant Seeds: Targeted Transcriptional, Hormonal, and Sugar Analysis. *Front. Plant Sci.* 9, 1508. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01508>
- Scortecci, K. C., Lima, A. F. O., Carvalho, F. M., Silva, U. B., Agnez-Lima, L. F., de Medeiros, S. R. B., (2007). A characterization of a MutM/Fpg ortholog in sugarcane—A monocot plant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.134>
- Tomkinson, A. E., Vijayakumar, S., Pascal, J. M., Ellenberger, T., (2006). DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function. *Chem. Rev.* 106, 687–699. <https://doi.org/10.1021/cr040498d>
- Waterworth, W. M., Drury, G. E., Bray, C. M., West, C. E., (2011). Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together: Tansley review. *New Phytologist* 192, 805–822. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x>
- Zharkov, D. O., (2008). Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1544–1565. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7543-2>

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:



miRNA zaangażowane w proces starzenia i kiełkowania nasion



miRNAs involved in the seed ageing and germination process

Marta Puchta ✉

Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych,
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie,
✉ e-mail: m.puchta@ihar.edu.pl

Starzenie nasion jest procesem prowadzącym do nieodwracalnych zmian powodujących utratę ich wartości siewnej w czasie. W proces ten zaangażowanych jest wiele wzajemnie powiązanych zmian molekularnych, biochemicznych, fizjologicznych oraz metabolicznych. W związku z degradacją środowiska naturalnego wymagana jest intensywna ochrona gatunkowa roślin. Zachowanie zdolności do kiełkowania nasion odgrywa kluczową rolę w ochronie bioróżnorodności gatunkowej. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują na udział miRNA w dynamicznym procesie kiełkowania nasion. Jednak niewiele wiadomo na temat zagadnień dotyczących regulacji miRNA i ich genów docelowych, które są potencjalnie ważnymi czynnikami przyczyniającymi się do starzenia nasion podczas długotrwałego przechowywania.

Praca obejmuje przegląd wybranej literatury dotyczącej badania roli miRNA w regulacji procesów zaangażowanych w starzenie i kiełkowanie nasion.

Słowa kluczowe: miRNA, starzenie nasion, żywotność, kiełkowanie

The ageing of seeds is a process that leads to irreversible changes that cause the loss of seed value over time. Many interrelated molecular, biochemical, physiological and metabolic processes are involved in it. The degradation of the natural environment requires intensive plant species protection. Preserving germination capacity plays a key role in protecting the biodiversity damaged by genetic erosion. The studies conducted so far show that miRNAs are involved in the dynamic germination process of seeds. However, little is known about the state of specific miRNA regulations and their targets. These, are potentially important factors contributing to the ageing of seeds during long-term storage. germination germination

This review includes literature review of research concerning the role of miRNA in the regulation of processes leading to seed ageing and germination.

Key words: miRNA, seed aging, vitality, germination

Wstęp

Żywotność nasion miała znaczenie dla ludzkości od czasów rewolucji neolitycznej, kiedy nastąpiło przejście od magazynowania żywności do jej produkcji, a część zbiorów musiała zostać zachowana na następny sezon. Pierwsze informacje dotyczące starzenia się nasion zostały podane już w starożytnej Grecji, kiedy Teofrast z Erezos zauważył, że przechowywanie nasion w przewiewnych miejscach na dużych wysokościach przedłuża ich żywotność. Ponadto zaobserwował, że nasiona cebuli tracą żywotność znacznie szybciej, niż nasiona prosa. W I wieku Lucjusz Lunius Moderatus Columella dostrzegł negatywny wpływ wilgotności na proces przechowywania nasion. W średniowieczu Ibn al-’Awwām stworzył rozprawę naukową pt. „Kitāb al-filā-ḥah”,

zawierający informacje, jak prawidłowo przechowywać nasiona. Francuski botanik Henri-Louis Duhamel du Monceau w XVIII wieku zaobserwował zróżnicowanie w żywotności nasion w zależności od gatunku rośliny (Priestley, 1986).

Celem pracy jest przegląd wybranej literatury dotyczącej regulacyjnej roli miRNA w szlaki metaboliczne związane z procesem starzenia i kiełkowania nasion.

Starzenie Nasion

Starzenie jest to długotrwały i nieodwracalny proces zachodzący w rozwoju osobniczym żywych organizmów. Proces ten polega na postępujących w czasie zmianach w komórkach, których ostatecznym skutkiem jest śmierć organizmu. Długość życia to czynnik, który znacząco

różnicuje organizmy (Roberts, 1979). U roślin jego rozpiętość jest znacznie większa, niż u zwierząt, przykładem czego są osobniki *Pinus aristata* w White Mountain w Kalifornii, których wiek szacuje się na około 5000 lat (Currey, 1965). W 1877 r. znaleziono „próbkę wiedeńską”, którą przechowywano w hermetycznie zamkniętych pojemnikach w temperaturze 10 – 15°C i wilgotności 3,13% przez ponad 110 lat. Wśród próbek znajdowały się nasiona jęczmienia wykazujące 90% żywotności, owsa 81%, podczas gdy pszenica posiadała niską zdolność kiełkowania, a żyto całkowicie straciło żywotność (Steiner i Ruckenbauer, 1995). Nasiona większości gatunków roślin mogą przetrwać nawet do kilku tysięcy lat, np. nasiona *Nelumbo nucifera*, których wiek był datowany na ok. 1300 lat, miały zdolność kiełkowania na poziomie 84% (Shen-Miller, 2002).

Starzenie nasion prowadzi do nieodwracalnych zmian powodujących utratę wartości siewnej w czasie. W efekcie starzenia nasiona tracą wigor oraz żywotność. W 1876 r. Nobbe stwierdził występowanie różnic w zakresie kiełkowania i wzrostu w obrębie partii materiału siewnego nazywając zjawisko „siłą napędową”, czyli „wigorem nasennym” (Sun i in., 2007). W 1976 r. stowarzyszenie ISTA (ang. *International Seed Testing Association*) opracowało definicję wigoru nasion jako sumę tych właściwości nasion, które określają poziom ich aktywności i zachowania się podczas kiełkowania i wzrostu siewek. Zaobserwowano, iż spadek wigoru nasion następuje dużo wcześniej niż spadek zdolności kiełkowania; jest to związane z procesem starzenia, który rozpoczyna się już w fazie przedzławniej. O poziomie wigoru nasion decydują trzy główne czynniki: aspekt genetyczny, środowisko rozwoju i warunki przechowywania (Sun i in., 2007).

W proces starzenia nasion zaangażowanych jest wiele wzajemnie regulujących się mechanizmów na poziomie molekularnym, fizjologicznym, biochemicznym i metabolicznym (Boczkowska i in., 2019; Sarkar Das i in., 2018). Mimo wielu prób poznania przyczyn starzenia się nasion nie wyjaśniono, które czynniki mają zasadniczy wpływ na długość życia nasion oraz jakie mechanizmy prowadzą do utraty żywotności. Dotychczasowe badania wskazują, że w proces ten zaangażowane są czynniki zewnętrzne i wewnętrzne.

Do najważniejszych czynników egzogennych należą: warunki pogodowe w czasie wzrostu rośliny i zbioru nasion, technologia przygotowania nasion do przechowywania oraz warunki przechowywania. W oparciu o odporność nasion na odwodnienie,

podzielono je na trzy grupy: (I) nasiona „*orthodox*” wykazujące tolerancję na odwadnianie poniżej 5% wilgotności; oraz (II) nasiona „*recalcitrant*”, które wykazują brak tolerancji na odwadnianie i giną w trakcie suszenia do 20–50% oraz (III) „*suborthodox*” nasiona z umiarkowaną tolerancją na suszenie (Ellis et al., 1990; Roberts, 1979). Zgodnie z zasadą Harringtona, żywotność nasion typu „*orthodox*” podwaja się po obniżeniu temperatury o 5°C i obniżeniu wilgotności o 1% (Harrington, 1963).

Wraz z postępującym procesem starzenia w błonach komórkowych nasion dochodzi do pojawienia się nieciągłości. Ponadto wzrasta częstotliwość aberracji chromosomowych oraz mutacji genowych. Wraz ze spadkiem wigoru nasion, rbosomalne RNA 28S, i 18S rRNA ulegają stopniowej degradacji (Sun i in., 2007). Wykazano także, że degradacja RNA i starzenie się nasion soi przebiega w podobnym tempie (Fleming i in. 2017).

Ze względu na różną żywotność nasion w procesie naturalnego starzenia, wielu naukowców prowadzi badania w warunkach sztucznych, w których przyspiesza się naturalny proces starzenia poprzez podniesienie temperatury i wilgotności. Według dostępnych danych literaturowych symulacja ta nie odzwierciedla jednak zmian zachodzących podczas starzenia się suchych nasion (Gutiérrez i in., 1993; Neto i in., 2016).

Prowadzono wiele badań dotyczących starzenia i kiełkowania nasion (Priestley, 1986; Ventura i in., 2012; Wang i in., 2011), brak jednak odpowiedzi na pytanie: jakie konkretnie mechanizmy molekularne i w jaki sposób odpowiadają za starzenie i kiełkowanie nasion poddanych długotrwałemu przechowywaniu. Odkrycie małych, niekodujących RNA, które zaangażowane są w wiele procesów rozwojowych, przełożyło się na wzrost zainteresowania ich rolą w procesach kiełkowania i starzenia się nasion.

miRNA

Małocząsteczkowe RNA (ang. small RNA, sRNA) obejmują kilka klas krótkich niekodujących RNA: miRNA (mikroRNA, ang. *microRNA*), siRNA (małe interferujące RNA, ang. *small interfering RNA*) oraz piRNA (niekodujące cząsteczki RNA wykazujące aktywność małych regulatorowych RNA, ang. *piwi-interacting RNA*), które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym (Wang i in., 2011). Liczba sRNA w komórkach roślinnych jest na tyle duża, aby sugerować regulacyjną rolę tych cząsteczek (Wang i in., 2011). Najlepiej scharakteryzowaną klasą sRNA roślinnych jest miRNA (Wang i in., 2011).

MikroRNA (miRNA) to około 21 nukleotydowe endogeniczne niekodujące RNA, które odgrywają ważną rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. W wyniku działania miRNA dochodzi do przecięcia lub blokowania translacji docelowych mRNA (Hu i in., 2016; Rogers and Chen, 2013; Wang i in., 2019).

Biogeneza miRNA

Biogeneza miRNA jest procesem wieloetapowym (ryc.1). Dojrzałe miRNA powstaje z własnych podjednostek transkrypcyjnych. Przy udziale polimerazy II RNA dochodzi do transkrypcji genów *MIR* i powstania pierwotnego transkryptu pri-miRNA. W kolejnym etapie generowany jest prekursor miRNA (pre-miRNA) o strukturze „spinki do włosów” (ang. hairpin RNA, hpRNA). Proces powstania pre-miRNA zachodzi przy udziale kompleksu białka serrate (SE), hyponastic leaves (*HYL-1*) oraz dicer like 1 (*DCL1*) (Reinhart, 2002). Niskocząsteczkowa metylotransferaza *HEN1* metyluje wystające końce 3' i transportuje dupleks miRNA/miRNA* z jądra do cytoplazmy. Następnie dochodzi do enzymatycznego rozszczepienia dupleksu na dwie nici. Jedna z nich (nić prowadząca – miRNA) jest włączana do kompleksu wyciszającego RNA (ang. RNA-induced silencing complex, RISC). Wbudowane dojrzałe miRNA ukierunkowuje kompleks RISC na mRNA zawierające gen docelowy prowadząc do jego degradacji. W rezultacie kompleks RISC negatywnie reguluje ekspresję docelowego mRNA (Wang i in., 2011). Koniec 5' miRNA, zwłaszcza w pozycji 2–8 nukleotydów jest kluczowy dla interakcji z transkryptem genu docelowego (Brennecke i in., 2005). Miejsce docelowe wykazuje prawie doskonałą komplementarność z sekwencją miRNA. Większość docelowych mRNA jest przecinana przez RISC, chociaż istnieją przykłady gdzie translacja mRNA tłumiona jest bez rozcięcia (Chen, 2004). Regulacyjna rola miRNA została wykazana dla kluczowych etapów rozwoju korzeni, pędów, liści oraz kwiatów. Dodatkowo uczestniczą one w odpowiedzi na fitohormony, składniki odżywcze i stresy środowiskowe (Wang i in., 2011).

Roślinne miRNA i ich rola w regulacji ekspresji genów docelowych

Dotąd scharakteryzowano 14 197 dojrzałych miRNA roślinnych i zdeponowano je w ogólnodostępnej bazie miRBase (*miRBase ver.22.1*) [<http://www.mirbase.org/>]. Większość z nich stanowią miRNA pochodzące z kukurydzy, ryżu i *Arabidopsis thaliana* (Wang i in., 2011). Wang i in.

(2011) potwierdzili obecność 115 znanych miRNA oraz wykryli 167 nowych miRNA w kiełkujących nasionach kukurydzy. Badania rośliny dwuliściennej *Nelumbo nucifera* potwierdziły obecność 145 znanych i wykazały 78 nowych miRNA (Hu i in., 2016). Sarkar Das i in. (2018) podczas badań nad kiełkującymi ziarniakami *A. thaliana* zidentyfikowali 58 znanych miRNA należących do 30 różnych rodzin.

U *Arabidopsis thaliana*, piętnaście spośród zidentyfikowanych miRNA oraz ich geny docelowe wykazywały istotne różnice w poziomie ekspresji w stanie suchym oraz po 12, 24 i 48 godzinach imbibicji nasion. Zaproponowano, że dynamika zmian ekspresji miRNA i ich genów docelowych (tab. 1) ma wpływ na regulację kiełkowania nasion *A. thaliana* (Sarkar Das i in., 2018). miR417 poprzez oddziaływanie na geny *C2 domain-containing protein*, *RdRP*, *SNF ARF* ujemnie reguluje kiełkowanie nasion pod wpływem stresu zasolenia, natomiast nadekspresja miR402 którego celem jest gen *DML3*, zwiększa zdolność kiełkowania nasion w warunkach nadmiernego zasolenia (Jung and Kang, 2007; Kim i in., 2010). Z kolei nadekspresja miR160 powoduje zmniejszenie czułości reakcji na kwas abscysynowy (ang. abscisic acid, ABA) podczas kiełkowania (Hu i in., 2016). Ponadto Mallory i in. (Mallory i in., 2005) wykazali rolę miR160 w regulacji ekspresji czynnika odpowiedzi auksynowej ARF17 (ang. auxin response factor) w *A. thaliana*. Geny z rodziny *GAMYB* są zaangażowane w transdukcję sygnału giberelinowego (GA) w aleuronie, a ponadto biorą udział w aktywacji promotora α -amylazy oraz innych genów regulowanych przez GA niezbędnych do mobilizacji rezerw endospermy. Podczas nadekspresji miR159 zaobserwowano zmniejszenie poziomu *MYB33*, opóźniającego czas kwitnienia *A. thaliana* (Millar, 2005). Gen *LEC1 (NF-YB9)* jest kluczowym regulatorem dojrzewania nasion u *A.thaliana*. Mutacje prowadzące do utraty funkcji *LEC1* powodują poważne nieprawidłowości w rozwoju zarodków i nasion, podczas gdy nadekspresja *LEC1* powoduje przejście ze stanu wegetatywnego do embrionalnego i akumulację związków zapasowych w tkankach. Ponadto stwierdzono, że niektóre geny z rodziny *NF-Y* są zaangażowane w kontrolę kwitnienia, odporność na suszę oraz rozwój korzeni (Mu i in., 2013). Wykazano, że nadekspresja miR169, regulującego działanie rodziny genów NF-YA spowodowała nadwrażliwość na ABA podczas kiełkowania (Mu i in., 2013). Oksydaza *L*-askorbinowa, która może usuwać reaktywne formy tlenu produkowane podczas stresu oksydacyjnego, jest genem

docelowym dla miR408. Hu i in. (2016) zaobserwowali że, wszystkie miRNA z rodziny miR408 różniły się istotnie poziomem ekspresji w poszczególnych stadiach kiełkowania, jednoznacznie wskazując na zaangażowanie miR408 w przebieg tego procesu (Hu i in., 2016).

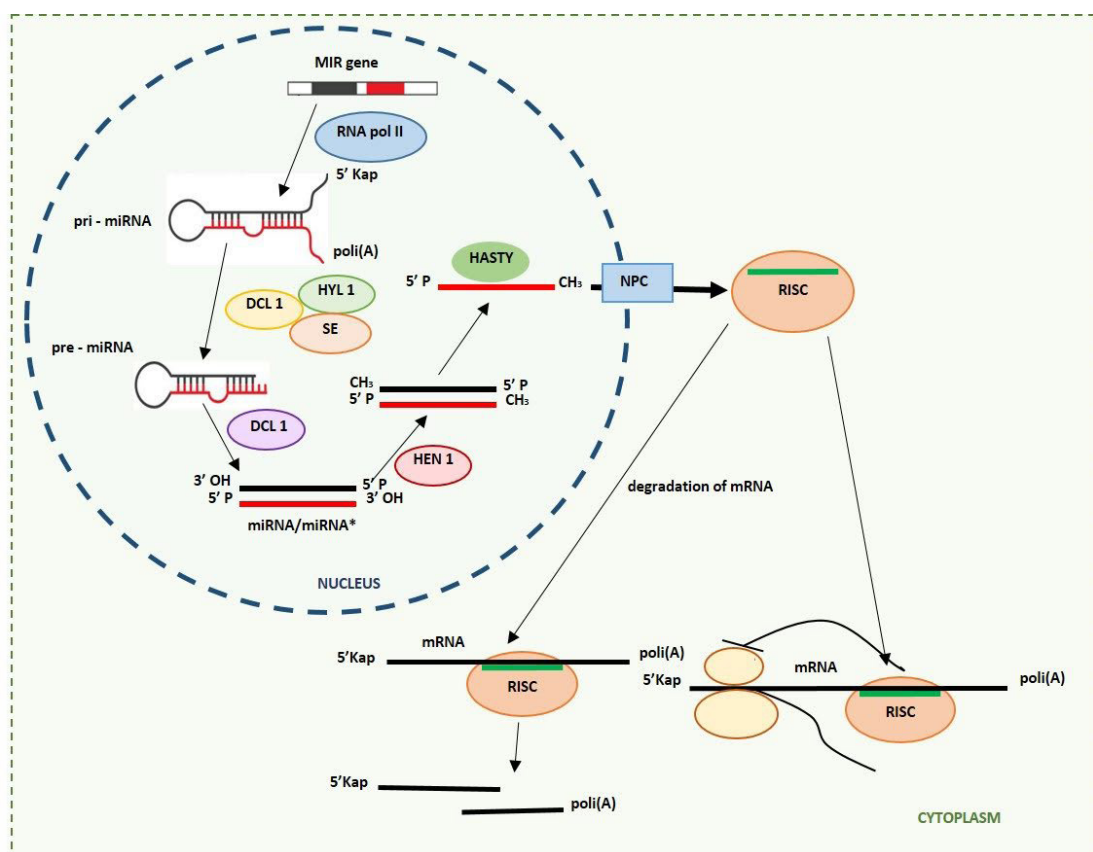
Wykazano, że mutacje w genie *ARF10* (czynnik odpowiedzi auksynowej 10, ang. *auxin response factor 10*), będącym genem regulowanym przez miR160, np. *ABI3* powodują wady rozwojowe: ząbkowanie liści, deformacje łodygi i kwiatów oraz skręcanie łuszczyń w efekcie działania ekspresji genów indukujących ABA (Liu i in., 2007). Natomiast miR159 reguluje rozwój kwiatów, płodność i kiełkowanie nasion poprzez obniżanie poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego *MYB* (Reyes and Chua, 2007).

Znokautowanie genu kodującego *GAMYB* u ryżu powoduje wady rozwojowe pylników i pyłku. Nadekspresja miR159 wpływała na karłowacenie pylników u ryżu oraz męską sterylność u rzodkiewnika (Achard i in., 2008).

Tabela 1
Table 1

miRNA oraz geny docelowe o istotnych różnicach w poziomie ekspresji zidentyfikowane u *A. thaliana* (Sarkar Das i in., 2018; Millar, 2005).

| miRNA | Geny docelowe |
|---------|------------------------------|
| miR165 | <i>PHB, ATHB15</i> |
| miR166 | <i>PHB, ATHB15</i> |
| miR172 | <i>AP2, TOE1, TOE2, TOE3</i> |
| miR160 | <i>ARF10, ARF16, ARF17</i> |
| miR156 | <i>SPC</i> |
| miR157 | <i>SPC</i> |
| miR164 | <i>NAC1, CUC1, CUC2</i> |
| miR169 | <i>NF-Y</i> |
| miR161 | <i>PPR</i> |
| miR399 | <i>PHO2</i> |
| miR824 | <i>AGC16</i> |
| miR834 | <i>DMC2, CIP1</i> |
| miR854 | <i>R3H</i> |
| miR2112 | <i>ERG4, PRR</i> |
| miR159 | <i>MYB33</i> |



Rys. 1. Schemat biogenezy roślinnych miRNA.

RNA pol II, RNA II polimeraza; DCL1, dicer like I; HYL1, hyponastic leaves 1; SE, białko serrate; HEN1, wzmacniacz transkrypcji HUA; HASTY, białko HASTY 1; RISC, kompleks wyciszający RNA (według: Rogers i in. 2013; Wang i in. 2019).

Fig. 1. miRNA biogenesis in plants.

W wyniku sekwencjonowania degradomu z nasion *N. nucifera* wykazano obecność genów docelowych: *SPL*, *NAC*, *ARF*, *TIR like*, *NFY*, *GAMYB*, *LAO* odpowiednio dla miR156, miR164, miR160, miR393, miR169, miR159 oraz miR408. Zidentyfikowane geny stanowiły głównie czynniki transkrypcyjne (Hu i in., 2016). Białka PPR (ang. pentatricopeptide repeat) wpływające na ekspresję genów w mitochondriach i chloroplastach u *N. nucifera* są regulowane przez niektóre miRNA: miR168, miR2673 oraz nowe miR7 i miR40 (Wang i in., 2011). Hu i in. (2016) podczas badań kiełkujących nasion *N. nucifera* potwierdzili ekspresję miR168, miR2673 oraz zidentyfikowali nowe miR7 i miR40, które regulują ekspresję genów kodujących powstawanie białek PPR, co może sugerować regulację przez nie przebiegu poszczególnych etapów fotosyntezy oraz gromadzenia się lipidów podczas kiełkowania nasion w *N. nucifera*. Geny *NF-Y* zaangażowane są w regulację różnych procesów rozwojowych i reakcje na stres. *NF-Y* (jądrowy czynnik Y, ang. nuclear transcription factor Y), który ma wpływ na rozwój nasion u wielu gatunków, jest genem docelowym dla miR169. W wyniku analiz degradomu zidentyfikowano *NFYA2*, *NFYA3* i *NFYA10* będące docelowymi genami miR169 u *N. nucifera* (Hu i in., 2016).

Przedstawiony w artykule rys literaturowy wskazuje na udział dużej liczby miRNA w dynamicznym procesie kiełkowania nasion. Zaangażowanie licznych rodzin miRNA w proces kiełkowania nasion może zatem wskazywać iż odgrywają one rolę także w procesie starzenia nasion. Pomimo zwiększającego się stanu wiedzy na temat regulacji procesów życiowych przez miRNA nadal niewiele wiadomo na temat wpływu miRNA i ich genów docelowych na procesy starzenia nasion (Hu i in., 2016). W Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, IHAR-PIB prowadzone są badania obejmujące tematykę starzenia i kiełkowania nasion poddanych długotrwałemu przechowywaniu, między innymi w ramach projektu badawczego NCN Preludium nr 2019/35/N/NZ9/01046 (2020 – 2023), oraz pracy doktorskiej realizowanej przez Autorkę artykułu; promotorem pracy jest dr hab. Maja Boczkowska natomiast promotorem pomocniczym – dr Jolanta Groszyk.

Podsumowanie

Dogłębne poznanie przyczyn procesu starzenia i zachowanie zdolności kiełkowania nasion odgrywa kluczową rolę w ochronie różnorodności biologicznej w bankach genów. Nasiona stanowią idealny model do analizy procesów starzenia,

ich przyczyn oraz zachowania zdolności do kiełkowania. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na udział miRNA w dynamicznym procesie kiełkowania i starzenia nasion. Obecnie scharakteryzowano 14 197 dojrzałych miRNA roślinnych i zdeponowano je w ogólnodostępnej bazie miRBase, jednak nadal ich rola w procesach starzenia i kiełkowania nasion nie została szczegółowo zdefiniowana. Autorzy w literaturze światowej sugerują konieczność kontynuacji badań dotyczących wpływu miRNA na procesy starzenia i kiełkowania. Dalsze badania miRNA i ich genów docelowych w nasionach umożliwią głębsze zrozumienie sieci regulacyjnej, w której uczestniczą miRNA podczas procesu starzenia i kiełkowania. Przyczynią się one do zwiększenia wiedzy na temat sposobów utrzymania efektywnego funkcjonowania komórek przez długi czas.

Literatura

- Achard, P., Renou, J. P., Berthomé, R., Harberd, N. P., Genschik, P., (2008). Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Curr. Biol.* 18, 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>
- Boczkowska, M., Rucińska, A., Targońska-Karasek, M., Olszak, M., Niedzielski, M., Rakoczy-Trojanowska, M., (2019). Starzenie się nasion – złożony problem banków genów. *Praca przeglądowa. Agron.Sci.* 73, 15–26. <https://doi.org/10.24326/asx.2018.4.2>
- Bray, C. M., Ashraf, M., Davison, P. A., (1993). Molecular markers of seed quality. In: Come D, Combineau F, eds, *Proceedings of the Fourth International Workshops on Seeds*. ASFIS, Paris 887–896.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., Cohen, S.M., (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol.* 3, e85. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085>
- Chen, X., (2004). A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science* 303, 2022–2025. <https://doi.org/10.1126/science.1088060>
- Currey, D. R., (1965). An Ancient Bristlecone Pine Stand in Eastern Nevada. *Ecology* 46, 564–566. <https://doi.org/10.2307/1934900>
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H., (1990). An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour?: I. COFFEE. *J Exp Bot* 41, 1167–1174. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.9.1167>
- Gutiérrez, G., Cruz, F., Moreno, J., González-Hernández, V. A., Vázquez-Ramos, J. M., (1993). Natural and artificial seed ageing in maize: germination and DNA synthesis. *Seed Sci. Res.* 3, 279–285. <https://doi.org/10.1017/S0960258500001896>
- Harrington, J., (1963). Practical instructions and device on seed storage. *Proceedings of the International Seed Testing Association.* 28, 989–994.

- Hu, J., Jin, J., Qian, Q., Huang, K., Ding, Y., (2016). Small RNA and degradome profiling reveals miRNA regulation in the seed germination of ancient eudicot *Nelumbo nucifera*. *BMC Genomics* 17, 684. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3032-4>
- Jung, H. J., Kang, H., (2007). Expression and functional analyses of microRNA417 in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 805–811. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.015>
- Kim, J. Y., Kwak, K. J., Jung, H. J., Lee, H. J., Kang, H., (2010). MicroRNA402 Affects Seed Germination of *Arabidopsis thaliana* Under Stress Conditions via Targeting DEMETER-LIKE Protein3 mRNA. *Plant Cell Physiol.* 51, 1079–1083. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq072>
- Liu, P. P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., Carrington, J. C., (2007). Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages: microRNA in *Arabidopsis* seed germination. *Plant J.* 52, 133–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03218.x>
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., Bartel, B., (2005). MicroRNA-Directed Regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *Plant Cell* 17, 1360–1375. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031716>
- Millar, A. A., (2005). The *Arabidopsis* GAMYB-Like Genes, MYB33 and MYB65, Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development. *Plant Cell* 17, 705–721. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027920>
- miRBase ver.22.1, n.d.
- Mu, J., Tan, H., Hong, S., Liang, Y., Zuo, J., (2013). *Arabidopsis* Transcription Factor Genes NF-YA1, 5, 6, and 9 Play Redundant Roles in Male Gametogenesis, Embryogenesis, and Seed Development. *Mol. Plant.* 6, 188–201. <https://doi.org/10.1093/mp/sss061>
- Neto, N. B. M., Ceci Castilho Custódio, Massanori Takaki, (2016). Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3093.9283>
- Priestley, D. A., (1986). Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Associates, Ithaca, N.Y.
- Reinhart, B. J., (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16, 1616–1626. <https://doi.org/10.1101/gad.1004402>
- Reyes, J. L., Chua, N. H., (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination: miR159 regulation of ABA responses during germination. *Plant J.* 49, 592–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02980.x>
- Roberts, E. H., (1979). Seed deterioration and loss of viability. *Advances in Research and Technology of Seeds* 4, 25–42.
- Rogers, K., Chen, X., (2013). Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell* 25, 2383–2399. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>
- Sarkar Das, S., Yadav, S., Singh, A., Gautam, V., Sarkar, A. K., Nandi, A. K., Karmakar, P., Majee, M., Sanan-Mishra, N., (2018). Expression dynamics of miRNAs and their targets in seed germination conditions reveals miRNA-ta-siRNA crosstalk as regulator of seed germination. *Sci. Rep.* 8, 1233. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18823-8>
- Shen-Miller, J., (2002). Sacred lotus, the long-living fruits of China Antique. *Seed Sci. Res.* 12, 131–143. <https://doi.org/10.1079/SSR2002112>
- Steiner, A. M., Ruckenbauer, P., (1995). Germination of 110-year-old cereal and weed seeds, the Vienna Sample of 1877. Verification of effective ultra-dry storage at ambient temperature. *Seed Sci. Res.* 5, 195–199. <https://doi.org/10.1017/S0960258500002853>
- Sun, Q., Wang, J., Sun, B., (2007). Advances on Seed Vigor Physiological and Genetic Mechanisms. *Agricultural Sciences in China* 6, 1060–1066. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(07\)60147-3](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(07)60147-3)
- Ventura, L., Donà, M., Macovei, A., Carbonera, D., Buttafava, A., Mondoni, A., Rossi, G., Balestrazzi, A., (2012). Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 60, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.031>
- Wang, J., Mei, J., Ren, G., (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Front. Plant Sci.* 10, 360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>
- Wang, L., Liu, H., Li, D., Chen, H., (2011). Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination. *BMC Genomics* 12, 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-154>

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:



Charakterystyka wybranych markerów molekularnych



Characteristic of selected molecular markers

Paulina Bolc ✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie,
Radzików IHAR 1, 05-870 Błonie,
Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych,
✉ e-mail: p.bolc@ihar.edu.pl

Postęp, jaki nastąpił w biologii molekularnej poprzez wprowadzenie markerów molekularnych nowej generacji, w ciągu ostatnich 20 lat umożliwił znaczny rozwój wielu dziedzin badań. Możliwe stało się uzyskanie dokładniejszych informacji genetycznych pozwalających na lepsze zrozumienie zasobów genetycznych organizmów. Markerem molekularnym może być każda sekwencja nukleotydowa (wybrany fragment DNA), rozproszony w całym genomie, której zmienność między osobnikami lub grupami taksonomicznymi umożliwia precyzyjną identyfikację osobnika/taksonu. Kompilacja właściwości enzymów restrykcyjnych jak również reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w technikach generujących markery molekularne pozwoliła na efektywne wykorzystanie ich w taksonomicznych, ewolucyjnych i ekologicznych badaniach roślin.

Słowa kluczowe: markery molekularne, RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR, SRAP, SNP, PCR, polimorfizm, różnorodność genetyczna

Over the last 20 years, the progress in molecular biology through the introduction of new generation molecular markers has allowed many areas to move forward. It has now become possible to obtain more accurate genetic information to better understand the genetic resources of organisms. A molecular marker can be any nucleotide sequence (selected DNA fragment) scattered throughout the genome, whose variability between individuals or taxonomic groups allows precise identification of the individual/taxon. The effectiveness of restriction digestion and polymerase chain reaction based on molecular markers has already proved their usefulness in taxonomic, evolutionary and ecological plant research.

Key words: molecular markers, RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR, SRAP, SNP, PCR, polymorphism, genetic diversity

Wstęp

Techniki molekularne są w ostatnich latach najczęściej stosowanymi metodami w wielu dziedzinach, np. w kryminalistyce, biologii molekularnej, czy hodowli roślin. W ostatnim czasie ich możliwości i łatwość wykorzystywania rośnie w szybkim tempie w naukach biologicznych, zwłaszcza w biologii molekularnej roślin, m.in. w identyfikacji genów odpowiedzialnych za określone cechy (Shulman 2007). Markery molekularne zrewolucjonizowały pracę w laboratoriach wszystkich dziedzin biologii i nie tylko, stanowiąc doskonałe narzędzie do badania struktury populacji, czy pokrewieństw między osobnikami (Kuleung i in., 2004). Szybki rozwój markerów molekularnych pozwala dziś na wybór tej techniki, która będzie najlepsza w danych badaniach. Takich możliwości nie było w latach 80. XX wieku,

kiedy następował rozwój biologii molekularnej. Aktualnie w grupie markerów molekularnych istnieją narzędzia uniwersalne, które można zastosować zarówno dla jednego gatunku, czy rodzaju oraz te bardziej specyficzne, gdzie wymagana jest wiedza na temat badanego genomu. Wybór odpowiedniego markera zależy od postawionych pytań badawczych, a także od informacji na temat badanego organizmu, jakim dysponuje eksperymentator. (Mikowska i in., 2012). Wybór określonej techniki molekularnej powinien opierać się na wiarygodności wyniku, kosztach oraz nakładzie pracy i ilości informacji, jakie niesie ze sobą wybrana metoda na temat badanego organizmu. Celem niniejszego artykułu jest przybliżenie ogólnych zasad działania, możliwości zastosowań, w tym wad i zalet wybranych markerów molekularnych.

Markery RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*)

Metoda RFLP była jedną z pierwszych stosowanych do analizy DNA w kryminalistyce oraz typowaniu genetycznym, obecnie jest zdecydowanie rzadziej stosowana (Al-Samari i Al-Kazaz, 2015). Markery RFLP opierają się na analizie długości fragmentów restrykcyjnych DNA różniących się między sobą wielkością. Endonukleazy rozpoznają określone miejsca (4-6 par zasad) i specyficznie trawią DNA, a fragmenty rozdzielane są w żelu i przenoszone na membrany (Sztuba-Solińska 2005). Wielkość fragmentów waha się od kilku do ponad kilku tysięcy par zasad. Podstawą polimorfizmu w tej metodzie są mutacje obejmujące miejsca restrykcyjne, czy też insercje, substytucje i delecje w pobliżu miejsc restrykcyjnych. Identyfikacja polimorfizmu odbywa się przy udziale znakowanych sond, które są komplementarne do fragmentów homologicznych na membranach (Yang i in., 2013). Ważną cechą markerów RFLP jest kodominujący charakter i wysoki polimorfizm. Markery RFLP wykorzystywane są do analiz polimorfizmu DNA chloroplastowego i mitochondrialnego, badań filogenetycznych i taksonomicznych (Besnard i in., 2002). Inne analizy przy użyciu RFLP przyczyniły się znacząco do mapowania genomu ludzkiego oraz dostarczania informacji dotyczących chorób genetycznych (Emadi i in., 2010, Prystupa i in., 2011). Do wad stosowania markerów RFLP zaliczyć można znaczną ilość wymaganego materiału wyjściowego, dosyć żmudną i powolną procedurę, a także duży koszt i pracochłonność.

Markery AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Technika AFLP została opracowana przez Vosa i współpracowników w 1995 roku i jest jedną z bardziej informatywnych metod opartych na reakcji PCR (*Polymerase Chain Reaction*). AFLP polega na braku lub obecności amplifikowanych, specyficznych fragmentów restrykcyjnych, więc łączy ze sobą zalety reakcji PCR i techniki RFLP (Matuszczak 2002). W AFLP wykorzystywane są dwa enzymy restrykcyjne (często i rzadko tnący), następnie dołączane są adaptory posiadające sekwencję rdzeniową oraz specyficzną dla miejsca restrykcyjnego, po czym następuje amplifikacja fragmentów i ich rozdział w żelu ([<https://patents.google.com/patent/EP0534858B2/en>]). Technika jest w stanie wygenerować setki markerów genetycznych w krótkim czasie, co zapewnia szerokie spektrum badań przesiewowych dowolnego genomu. Ważnym aspektem techniki AFLP jest możliwość

stosowania jej w badaniach organizmów niemoделowych, bez znajomości sekwencji, złożoności i struktury genomu w przeciwieństwie do mikrosatelitów (Sztuba-Solińska 2005). Markery AFLP były często stosowane w badaniach u roślin jak również w analizie pokrewieństwa, czy określaniu płci u zwierząt (Griffits i Orr, 1999, Chybicki i in., 2011). Szczególnie pomocne okazały się w przypadku genetyki populacyjnej i badaniach zróżnicowania genetycznego, jak również w tworzeniu map genetycznych. Niewątpliwą zaletą AFLP jest to, że technika ta wykrywa większą różnorodność genetyczną niż markery SSR i RAPD, oprócz tego charakteryzuje się wysoką powtarzalnością i wiarygodnością (Lourdes Rocha i in., 2015), a do analizy potrzebne są niewielkie ilości materiału wyjściowego (ok. 0,5 µg) (Mendelson i in., 2005). Negatywnym aspektem zastosowania markerów AFLP jest fakt, że zaliczane są do markerów dominujących (uniemożliwia to ocenę heterozygotyczności), z kolei niski poziom zanieczyszczeń (np. obcym DNA) może wpłynąć na wyniki, a analiza jest żmudna i wieloetapowa (Al-Samari i Al-Kazaz, 2015).

Markery RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

Technika RAPD opracowana została przez Williamsa i współpracowników w 1990 roku i jest uznawana za jedną z najprostszych metod umożliwiających wykrycie zróżnicowania DNA. RAPD opiera się na reakcji PCR wykorzystując losowo amplifikowany polimorficzny DNA. Zasada działania markerów polega na namnożeniu losowo wybranych fragmentów genomu stosując krótkie, 10-nukleotydowe startery o przypadkowych sekwencjach (Bardakci 2001). Dzięki temu uzyskiwane są unikalne wzory prążków w żelu charakteryzujące dany genotyp. W ten sposób możliwe jest stwierdzenie istniejących różnic między np. liniami hodowlanymi na poziomie DNA. Liczba stosowanych starterów jest nieograniczona, co jest szczególnie ważne w przypadku poszukiwania istotnych cech użytkowych, konstruowania map genetycznych, a także przy ocenie podobieństwa genetycznego taksonów roślinnych (Fukuoka i in., 1992). Polimorfizm RAPD wynika z mutacji w obrębie sekwencji komplementarnych do końca 3' startera oraz delecji lub insercji w pewnej odległości od miejsca wiązania. Za zastosowaniem metody RAPD przemawia głównie fakt, że generowana jest znaczna liczba generowanych markerów molekularnych, prostota i szybkość wykonania, a także stosunkowo niewielkie koszty i możliwość stosowania przy zupełnym braku danych dotyczących genomu referencyjnego

(Senthil Kumar i Gurusubramanian, 2011). Oczywiście technika ta ma również pewne wady, a najważniejszą jest podatność na różnego rodzaju zmiany warunków reakcji amplifikacji (np. zmiany stężenia i pochodzenia polimerazy, wahania w ilości materiału wyjściowego) oraz dominujący charakter markerów (Al-Samari i Al-Kazaz, 2015).

Markery SSR (Simple Sequence Repeat) i ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)

Technika SSR wykorzystuje proste sekwencje powtórzone i jest oparta, jak większość opisanych markerów na reakcji PCR. Określana jest również jako amplifikowane sekwencje mikrosatelitarne. SSR są krótkimi tandemowymi motywami składającymi się z 1-6 nukleotydów. Zostały zlokalizowane w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych, są szeroko rozpowszechnione w całym genomie. Technika SSR, oparta o zastosowanie markerów kodominujących (Sztuba-Solińska 2005) wykorzystywana jest w analizach roślin uprawnych, ze względu na wysoki stopień polimorfizmu, powtarzalność wyników, łatwość analizy (Kandemir i in., 2010). Dane literaturowe wskazują na częste wykorzystywanie markerów SSR do wykrywania różnorodności genetycznej u jęczmienia, w tym również dzikich gatunków, czy populacji miejscowych (Carmona i in., 2013, Viana i in., 2019, Turchetto i in., 2015). Markery SSR są używane do selekcji i mapowania pożądanych genotypów, więc znajdują zastosowanie w szeroko pojętej genetyce roślin (Szućko i in., 2012). Należy jednak wspomnieć o dosyć wysokim koszcie opracowania markerów SSR *de novo* dla każdego gatunku, co stanowi istotne ograniczenie w ich szerszym stosowaniu (Carneiro Vieira i in., 2016).

Istnieje jednak alternatywa dla markerów SSR, jaką są markery ISSR, czyli polimorfizm sekwencji międzymikrosatelitarnych. ISSR opiera się na amplifikacji fragmentów DNA znajdujących się pomiędzy dwoma mikrosatelitarnymi, powtórzonymi regionami, zorientowanymi w przeciwnych kierunkach (Abate 2017). Startery stosowane w technice ISSR mogą być: niezakotwiczone (składające się z powtórzeń typu dwójkowego, trójkowego lub czwórkowego) oraz zakotwiczone (zawierające oprócz motywów powtórzeniowych dodatkowe 1-4 zasady na końcach 3' lub 5'). Startery zakotwiczone wydają się lepszą opcją, ponieważ pozwalają na specyficzne wiązanie się do matrycy i tworzenie wyraźnych prążków, a dodatkowo ograniczają liczbę powstających w reakcji PCR amplikonów (Reddy i in., 2002). ISSR są wykorzystywane w analizach polimorfizmu DNA gatunków

o istotnym znaczeniu gospodarczym, ekologicznym, dla których opracowywanie markerów mikrosatelitarnych jest zbyt kosztowne. Markery ISSR były stosowane w analizach oceny zmienności genetycznej wiśni (Najafzadeh i in., 2014), analizach zależności genetycznych orzecha włoskiego (Potter i in., 2002), czy w analizach oceny różnorodności genetycznej moreli (Liu i in., 2015). Polimorfizm tych markerów wynika z insercji, bądź delekcji w obrębie sekwencji mikrosatelitarnych, takie zmiany prowadzą do obecności lub braku produktu w żelu w postaci prążka. ISSR należą do grupy markerów dominujących, charakteryzują się lepszą powtarzalnością niż markery RAPD, a do przeprowadzenia analiz wymagana jest niewielka ilość materiału wyjściowego (ok. 0,5-150 ng) (Szućko i in., 2012).

Markery SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism)

Spośród wyżej wymienionych markerów molekularnych ciekawą propozycją wydaje się technika SRAP. Opracowana przez Li i Quiros'a w 2001 roku. SRAP wykorzystuje kombinację starterów o długości 17 lub 18 nukleotydów: ang. „forward”, bogatych w zasady GC oraz ang. „reverse”, gdzie przeważają zasady AT. Technika SRAP opiera się na amplifikacji otwartych ramek odczytu (ORF), co może wpłynąć na wzmocnienie związku między polimorfizmami DNA, a cechami morfologicznymi (Ferriol i in., 2003). Na korzyść techniki SRAP przemawia niewielka ilość materiału wyjściowego do analiz (ok. 50ng), ponadto system nie wymaga znajomości informacji dotyczących sekwencji, czy genomu referencyjnego. Odtwarzalność tych markerów jest znacznie lepsza niż w technice RAPD, a dodatkową zaletą techniki SRAP jest możliwość zastosowania znakowanych fluorescencyjnie starterów i łączenie ich ze starterami nieznakowanymi, co pozwala na rozdział produktów w sekwenatorach kapilarnych (Li i in., 2013). Markery SRAP znalazły zastosowanie w konstrukcji map genetycznych, znakowaniu i klonowaniu genów, selekcji wspomaganą markerami, czy klasyfikacji genealogicznej (Robarts i Wolfe, 2014, Guindon i in., 2016). Szczególnie zastosowanie znalazły w badaniach nad strukturą populacji, różnorodnością genetyczną, czy mapami powiązań genetycznych u roślin takich jak: lucerna (Castonguay i in., 2010), bawełna (Li i in., 2007), owies (Tanhuanpää i in., 2007), *Dendrobium* (Lu i in., 2012), rzepak (Sun i in., 2007). Naukowcy wykorzystali także markery SRAP do analiz różnorodności genetycznej pasożytów *Fasciola hepatica* (Alasaad i in., 2008) i *Schistosoma japonicum* (Song i in., 2011).

Markery SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu jest najczęstszym typem polimorfizmu DNA. Analiza markerów SNP, określane jako bialleliczne w przeciwieństwie do markerów multiallelicznych może być w pełni zautomatyzowana. Możliwe jest jednoczesne przeanalizowanie nawet kilku tysięcy markerów SNP (Khlestkina i Salina, 2006). Ponadto w porównaniu z markerami SNP, żaden z innych typów polimorfizmów DNA nie dysponuje tak różnorodnymi i licznymi metodami. Obecnie dostępnych jest wiele platform i systemów genotypowania SNP, nowoczesne technologie pozwalają na przeprowadzenie tego rodzaju analiz wielokrotnie skuteczniej niż w przypadku innych metod. Istnieją systemy identyfikacji zmienności nukleotydowych DNA oparte na sekwencjonowaniu NGS (*Next Generation Sequencing*): sekwencjonowanie z analizą metylomu, sekwencjonowanie pełnogenomowe i sekwencjonowanie zredukowanej frakcji genomu. Pojawienie się kompaktowych sekwenatorów pozwoliło na identyfikację nawet kilkudziesięciu tysięcy SNP, czy też krótkich insercji i delecji na jednej płytce reakcyjnej. Wyniki uzyskane z tego rodzaju analiz mogą zostać wykorzystane do badań różnicowania genetycznego, poszukiwania genów kandydatów oraz markerów do selekcji genomowej, tworzenia map genetycznych, czy analizy asocjacyjnej (Puchta i in., 2018).

Podsumowanie

Markery molekularne można podzielić na dwie grupy: oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i oparte na hybrydyzacji (Jones i in., 2009). Oprócz wspomnianego podziału wśród markerów znaleźć można również te, bazujące na DNA jądrowym, chloroplastowym i mitochondrialnym, z kolei wśród nich istnieją markery dominujące i kodominujące (Mikowska i in., 2012). Mimo przynależności do różnych grup, markery są często wykorzystywane w różnego rodzaju analizach jak np. badaniu zmienności i różnorodności genetycznej, konstruowaniu map genetycznych, identyfikacji osobników, mapowaniu i klonowaniu genów, czy selekcji wspomaganej markerami (Kuleung i in., 2004, Adhikari i in., 2017). Brak oddziaływania środowiska na markery molekularne jest niewątpliwym atutem przemawiającym za częstym stosowaniem tego rodzaju metod. Wielu naukowców prowadząc badania początkowo posiada niewiele informacji na temat analizowanego organizmu, co przy wykorzystywaniu niektórych typów markerów molekularnych nie jest wymagane (Szućko i in., 2012). Obecnie istnieje wybór między licznymi technikami molekularnymi, a decyzja

dotycząca zastosowania określonych markerów powinna być wypadkową zalet oraz ograniczeń, które mogą wpłynąć na uzyskane wyniki. Przy wyborze techniki powinny być brane pod uwagę aspekty takie jak: poziom polimorfizmu, cel badawczy, skala i rodzaj analiz oraz fundusze (Sztuba-Solińska 2005).

Literatura

- Abate, T., (2017). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers for genetic diversity studies in *Trifolium* species. *Advances in Life Science and Technology* 55: 34-36.
- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T. S., Bandyopadhyay, T. K., Ghosh, P., (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus* 60: 283-297.
- Al-Samari, F. R., Al-Kazaz, A. A., (2015). Molecular Markers: an introduction and applications. *European Journal of Molecular Biotechnology* 9(3): 118-121.
- Alasaad, S., Li, Q. Y., Lin, R. Q., Martin-Atance, P., Granados, J. E., Diez-Banos, P., Perez, J. M., Zhu, X. Q., (2008). Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP markers. *Parasitology Research* 103(1): 181-186.
- Bardakci, F., (2001). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology* 25: 185-196.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., Bervillé, A., (2002). Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasm genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 139-144.
- Carmona, A., Friero, E., de Bustos, A., Jouve, N., Cuadrado, A., (2013). Cytogenetic diversity of SSR motifs within and between *Hordeum* species carrying the H genome: *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 949-961.
- Carneiro Vieira, M. L., Santini, L., Lima Diniz, A., de Freitas Munhoz, C., (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39(3): 312-328.
- Castonguay, Y., Cloutier, J., Bertrand, A., Michaud, R., Laberge, S., (2010). SRAP polymorphism associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*). *Theoretical Applied Genetics* 120: 1611-1619.
- Chybicki, I. J., Oleksa, A., Burczyk, J., (2011). Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data. *Heredity* 107: 589-600.
- Emadi, A., Crim, M. T., Brotman, D. J., Necochea, A. J., Samal, L., Wilson, L. M., Bass, E. B., Segal, J. B., (2010). Analytic validity of genetic tests to identify factor V Leiden and prothrombin G20210A. *American Journal of Hematology* 85(4): 264-270.
- Ferriol, M., Pico, B., Nuez, F., (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and

- AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 271-282.
- Fukuoka, S., Hosaka, K., Kamijima, O., (1992). Use of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japanese Journal of Genetics* 67: 243-252.
- Griffiths, R., Orr, K., (1999). The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Molecular Ecology* 8: 671-674.
- Guindon, M. F., Martin, E., Zayas, A., Cointy, E., Cravero, V., (2016). Evaluation of SRAP markers for mapping of *Pisum sativum* L.. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16: 182-188.
- Jones, N., Ougham, H., Thomas, H., Pašakinskienė, I., (2009). Marks and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist* 183: 935-96.
- Kandemir, N., Yildirim, A., Gunduz, R., (2010). Determining the levels of genetic variation using SSR markers in three Turkish barley materials known as Tokak. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 34: 17-23.
- Khlestkina, E. K., Salina, E. A., (2006). SNP Markers: Methods of Analysis, Ways of Development, and Comparison on an Example of Common Wheat. *Russian Journal of Genetics* 42(6): 585-592.
- Kuleung, C., Baenziger, P. S., Dweikat, I., (2004). Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theoretical and Applied Genetics* 108(6): 1147-1150.
- Li, G., McVetty, P. B. E., Quiros, C. F., (2013). SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science, w ed. Sven Bode Andersen, *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, IntechOpen, Dania.
- Li, G., Quiros, C. F., (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 455-461.
- Li, W., Lin, Z., Zhang, X., (2007). A Novel Segregation Distortion in Intraspecific Population of Asian Cotton (*Gossypium arboreum* L.) Detected by Molecular Markers. *Journal of Genetics and Genomics* 34(7): 634-640.
- Liu, M. P., Du, H. Y., Zhu, G. P., Fu, D. L., Tana, W. Y., (2015). Genetic diversity analysis of sweet kernel apricot in China based on SSR and ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* 14(3): 9722-9729.
- Lourdes Rocha, C. M., Vellisce, G. R., García, M. G., Pardo, E. M., Racedo, J., Perera, M. F., de Lucia, A., Gilli, J., Bogado, N., Bonnacarrère, V., German, S., Marcelino, F., Ledesma, F., Reznikov, S., Ploper, L. D., Welin, B., Castagnaro, A. P., (2015). Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi*. *Electronic Journal of Biotechnology* 18: 439-444.
- Lu, J. J., Wang, S., Zhao, H. Y., Liu, J. J., Wang, H. Z., (2012). Genetic linkage map of EST-SSR and SRAP markers in the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium* (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Research* 11(4): 4654-4667.
- Matuszczak, M., (2002). Zastosowanie metody AFLP do analizy DNA rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste XXIII*: 255-256. [<https://patents.google.com/patent/EP0534858B2/en>], dostęp 27.11.2019.
- Mendelson, T. C., Shaw, K. L., (2005). Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology* 395: 161-177.
- Mikowska, M., Świergosz-Kowalewska, R., Śliwińska, E., (2012). Ocena różnorodności genetycznej przy pomocy markerów molekularnych - zastosowanie w ekotoksykologii. *Wszechświat* 113: 171-175.
- Najafzadeh, R., Arzani, K., Bouzari, N., Saei, A., (2014). Genetic Diversity Assessment and Identification of New Sour Cherry Genotypes Using Intersimple Sequence Repeat Markers. *International Journal of Biodiversity* 2014: 1-8.
- Potter, D., Gao, F., Aiello, G., Leslie, C., McGranahan, G., (2002). Intersimple Sequence Repeat Markers for Fingerprinting and Determining Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia*) Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127(1): 75-81.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., Siddiq, E. A., (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Prystupa, A., Buś-Kicman, M., Dzida, G., Styliński, R., Piwoarczyk, P., Sawa, M., Janowska, M., Mosiewicz, J., (2011). Application of RFLP-PCR method for molecular diagnostics of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 5(2): 70-73.
- Puchta, M., Bolc, P., Piechota, U., (2018). Review of genome sampling methods in sequencing libraries preparation protocols. *Agronomy Science* LXXIII(4): 93-105.
- Robarts, D. W. H., Wolfe, A. D., (2014). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in Plant Sciences* 2(7): 1-8.
- Senthil Kumar, N., Gurusubramanian, G., (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision* 3: 116-124.
- Shulman, A., (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321.
- Song, H. Q., Mo, X. H., Zhao, G. H., Li, J., Zou, F. C., Liu, W., Wu, X. Y., Lin, R. Q., Weng, Y. B., Zhu, X. Q., (2011). Electrophoretic detection of genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates by sequence-related amplified polymorphism. *Electrophoresis* 32: 1364-1370.
- Sun, Z., Wang, Z., Tu, J., Zhang, J., Yu, F., McVetty, P. B. E., Li, G., (2007). An ultradense genetic recombination map for Brassica napus, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 114(8): 1305-1317.
- Sztuba-Solińska, J., (2005). Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos* 54(2-3): 227-239.
- Szućko, I., Achrem, M., Kalinka, A., (2012). Charakterystyka i zastosowanie SSR oraz ISSR w badaniach genomów

roślinnych. Kosmos 61(4): 597-601.

Tanhuanpää, P., Kalendar, R., Schulman, A. H., Kiviharju, E., (2007). A major gene for grain cadmium accumulation in oat (*Avena sativa* L.). *Genome* 50: 588-594.

Turchetto, C., Segatto, A. L. A., Beduschi, J., Bonatto, S. L., Freitas, L. B., (2015). Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants* 7: 1-9.

Vianna, L. S., Pereira, T. N. S., Santos, E. A., Viana, A. P., Pereira, M. G., Ramos, H. C. C., Rossi, A. A. B., (2019). ISSR and SSR markers for determining genetic relationships among three wild species of *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research* 18(1): 1-9.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.

Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y., Fang, M., (2013). Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of animal science and biotechnology* 4:1-6.

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:



Biosensory – nowoczesne narzędzia analityczne detekcji patogenów roślinnych



Biosensors – novel analytical tools for the plant pathogen detection

Małgorzata Łabańska✉, Włodzimierz Przewodowski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy Radzików, Oddział w Boninie

✉ e-mail: m.labanska@ihar.edu.pl

Ochrona upraw przed chorobami pełni kluczową rolę w zwiększaniu efektywności produkcji roślinnej. Do tej pory opracowano szereg metod dedykowanych identyfikacji patogenów roślinnych. Najważniejsze z nich to metody molekularne wykorzystujące reakcję łańcuchowej polimerazy DNA – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) oraz metody immunologiczne bazujące na specyficznych oddziaływaniach przeciwciał z odpowiadającymi im antygenami. Jednak wiele z konwencjonalnych metod są czasochłonne, wymagają złożonych urządzeń laboratoryjnych oraz nie są dostosowane do przeprowadzania analiz w warunkach polowych. Z tego względu poszukiwane są szybsze, tańsze metody detekcji patogenów roślinnych, które pozwoliłyby na diagnostykę zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i środowiskowych. Od wielu lat biosensory cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem jako urządzenia o szerokim potencjale aplikacyjnym. Wysoka czułość i selektywność, możliwość pomiarów w czasie rzeczywistym, a także często niewielkie rozmiary czynią je niezwykle atrakcyjnymi narzędziami analitycznymi. W pracy przedstawiono rutynowe metody identyfikacji patogenów roślinnych, a także budowę, zasadę działania oraz szeroki zakres zastosowań biosensorów. Szczególną uwagę poświęcono elektrochemicznym oraz optycznym biosensorom zawierającym w warstwie receptorowej przeciwciała – immunosensory lub fragmenty kwasów nukleinowych – sensory DNA zaprojektowanym do detekcji patogenów roślinnych.

Słowa kluczowe: biosensory, detekcja patogenów roślinnych, DNA-biosensory, immunosensory.

Crop protecting plays a key role in increasing the efficiency of plant production. So far, a number of methods dedicated to the identification of plant pathogens have been developed. The most important of them are molecular methods employed polymerase chain reaction – PCR and immunological methods based on specific interactions of antibodies with antigens. However, current methodologies are time-consuming, expensive, require complex laboratory equipment, are being not suitable for in-vivo plant pathogen detection. Therefore there is a strong need to develop alternative, low-cost, rapid and with high specificity methods for the detection of plant pathogens which would enable diagnostics both in laboratory and environmental conditions. Over the years biosensors are gaining increasing attention due to their wide range of applications. High sensitivity and selectivity, the possibility of real-time measurements, and often small sizes make them extremely attractive analytical tools. In this work the conventional methods of the plant pathogens identification as well as the structure, principle of operation and a wide range of applications of biosensors are described. Special attention was paid to electrochemical and optical biosensors including as sensing elements antibodies – immunosensors or fragments of nucleic acids – DNA sensors designed for the detection of plant pathogens.

Keywords: biosensors, DNA-biosensors, immunosensors, plant pathogens detection.

Wstęp

Liczba ludności na świecie z roku na rok wzrasta i przewiduje się, że do 2050 roku osiągnie poziom 9 miliardów. Przekłada się to bezpośrednio na rosnące zapotrzebowanie na żywność. Ostatnie badania wskazują, że w latach 2005–2050 globalny popyt na rośliny uprawne zwiększy się o 100% (Tilman i in., 2011). Zaspokojenie wciąż zmieniającego się popytu na produkty żywnościowe oraz zredukowanie negatywnego wpływu rolnictwa na środowisko stanowią kluczowe wyzwania, które stoją przed współczesnym światem (Godfray i in., 2010). Proponowaną przez naukowców oraz organizacje międzynarodowe

odpowiedzią jest zrównoważona intensyfikacja rolnictwa opierająca się na pozyskaniu większej ilości żywności z istniejących gruntów rolnych przy jednoczesnym zmniejszeniu jego wpływu na środowisko (Lichtfouse i in., 2009).

Kluczową rolę w zwiększeniu efektywności produkcji roślinnej odgrywa ochrona roślin, a zwłaszcza zabezpieczenie upraw przed chorobami i ich skutkami. Szacuje się, że roczne straty w plonach spowodowane przez patogeny, zwierzęta oraz chwasty sięgają 20-40% (Savary i in., 2012). W celu zminimalizowania szkód spowodowanych chorobami w uprawach w czasie ich wzrostu, zbiorów, przechowywania

oraz przetwarzania, a także w celu maksymalizacji produktywności i zapewnienia zrównoważonego rozwoju rolnictwa, niezbędna jest szybka i efektywna diagnostyka oraz bezpieczna ochrona.

Metody diagnostyczne patogenów roślinnych

Do tej pory opracowano szereg bezpośrednich oraz pośrednich metod służących do rozpoznawania patogenów roślinnych. Metody serologiczne, molekularne oraz mikrobiologiczne zaliczane są do metod bezpośrednich, które umożliwiają analizę wielu próbek jednocześnie. W tych metodach patogeny takie jak wirusy, bakterie czy grzyby wywołujące chorobę są oznaczane bezpośrednio. Za pomocą metod z drugiej grupy choroba jest diagnozowana na podstawie różnych parametrów takich jak: temperatura, zmiany morfologiczne, poziom transpiracji czy wydzielanie lotnych związków organicznych (Fang i Ramasamy, 2015).

Metody molekularne opierają się na analizie DNA patogenu znajdującego się w ekstrakcie z części badanej rośliny (Leonard i in., 2003). Najczęściej wykorzystywane są testy oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy DNA – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) i jego liczne modyfikacje m.in.: Multiplex PCR czy Real-Time PCR, a także fluorescencyjna hybrydyzacja in situ – FISH (ang. Fluorescence In situ Hybridization) (Salamońska i in., 2016). Metoda FISH polega na jednoczesnej molekularnej i immunologicznej analizie bakterii dzięki zastosowaniu znakowanych fluorescencyjnie sond rRNA oraz przeciwciał specyficznych wobec badanych patogenów. Metody te charakteryzują się wysoką czułością, specyficznością oraz dokładnością. Stanowią one dobrze poznaną technologię, która pozwala na detekcję pojedynczego patogenu w mieszaninie zawierającej kilka analitów. Z drugiej strony, próbki podatne są na zanieczyszczenia, co może doprowadzić do fałszywie pozytywnego wyniku testu. Dodatkowo pojawiające się w próbkach inhibitory polimerazy mogą zahamować przebieg reakcji co skutkuje błędnym rezultatem badań (Martinelli i in., 2015; Khater i in., 2017; Fang i Ramasamy, 2015).

Drugą grupą metod stosowanych do detekcji patogenów są metody serologiczne. Wykorzystują one specyficzne oddziaływania przeciwciał z odpowiadającymi im antygenami tworząc w ten sposób kompleks immunologiczny. Do przeciwciał dołączone są odpowiednie znaczniki (markery) tworząc tzw. koniugaty, które pozwalają na wykrycie powstałego kompleksu immunologicznego. Zastosowany znacznik determinuje metodę detekcji patogenu. Jako markery wykorzystywane są najczęściej

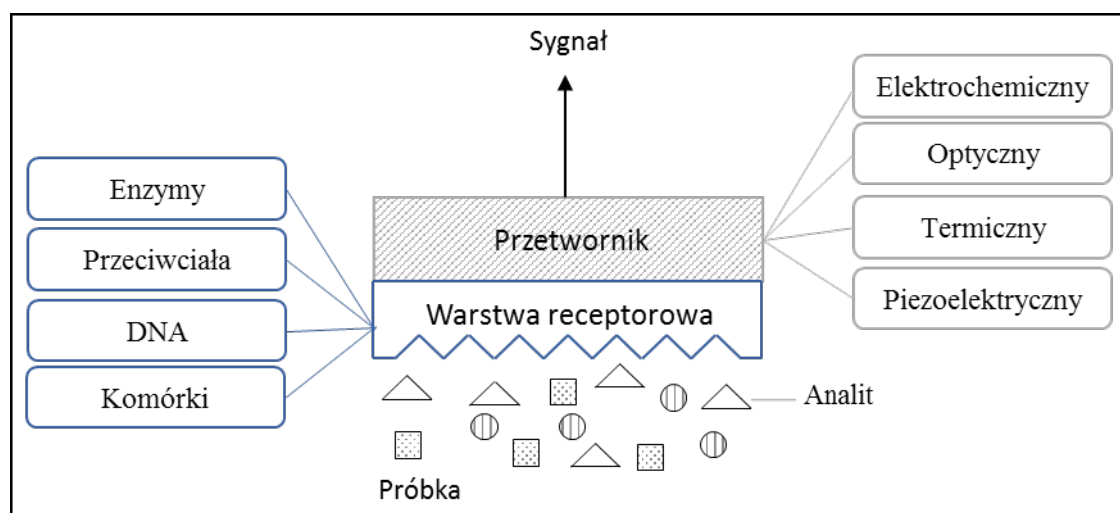
enzymy, barwniki fluorescencyjne lub radioizotopy (Stochła i in., 2017). Immunoenzymatyczny test ELISA (ang. Enzyme-linked Immunosorbent Assay) opracowany w latach 70-tych jest jednym z najczęściej wykorzystywanych, ze względu na możliwość badania dużej liczby prób w czasie pojedynczej analizy. Chociaż metody molekularne są bardziej specyficzne i czulsze niż metody serologiczne, to te ostatnie są szybsze, tańsze i pozwalają wykrywać nie tylko organizmy patogenne, ale również ich biotoksyny, które mogą nie być wyrażane w genomie organizmu (Leonard i in., 2003). Najstarszą techniką detekcji patogenów jest metoda mikrobiologiczna, w której zliczane są komórki bakterii hodowane na odpowiednich pożywkach. Wciąż jest ona stosowana jako metoda referencyjna potwierdzająca pozytywny wynik testu przeprowadzonego alternatywną techniką. Wadą tej metody jest czasochłonność, gdyż testy mogą trwać nawet kilkanaście dni (Lazcka i in., 2007). Pomimo, że zarówno metody molekularne jak i te wykorzystujące tworzenie kompleksów immunologicznych znacznie skróciły czas analizy w porównaniu do klasycznych metod mikrobiologicznych nadal brakuje możliwości wykrywania patogenów w czasie rzeczywistym tzw. real-time w warunkach polowych. Stosowane dotychczas metody analityczne są kosztowne, czasochłonne, a także wymagają wyspecjalizowanego sprzętu oraz personelu. Z tego powodu nieustannie trwają badania nad udoskonalaniem rutynowo stosowanych metod laboratoryjnych, a także poszukiwaniem nowych rozwiązań. Opracowane do tej pory metody diagnostyczne umożliwiające wykonanie analizy poza laboratorium (na polu, w szklarni) najczęściej wykorzystują tworzenie kompleksów przeciwciał-antygen (podobnie jak w testach ELISA), co wiąże się z mniejszą czułością w porównaniu do metod molekularnych. Te natomiast wymagają izolowania RNA/DNA oraz stosowania kosztownej aparatury przez co możliwe są do wykonania tylko w laboratorium. Poszukiwane są nowe techniki, które skrócą czas, koszt oraz pracochłonność analizy, będą charakteryzowały się wysoką czułością, selektywnością, a także umożliwią prowadzenie analiz bezpośrednio w warunkach środowiskowych. Od wielu lat wśród kierunków badań rozwijanych przez naukowców biosensory cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem jako urządzenia o szerokim potencjale aplikacyjnym.

Biosensory

Biosensory to rodzaj czujników chemicznych, które w swojej budowie zawierają element

biologiczny służący do rozpoznawania analitu (oznaczanej substancji). Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. International Union of Pure Applied Chemistry) są to samodzielne, zintegrowane urządzenia, które dostarczają specyficznych ilościowych lub pół-ilościowych informacji analitycznych za pomocą biologicznych elementów receptorowych (bioreceptorów) znajdujących się w bezpośrednim kontakcie z przetwornikiem (Thevenot i in., 2001). W budowie czujników chemicznych wyróżniane są dwie główne części: warstwa receptorowa oraz przetwornik. Warstwa receptorowa stanowi najważniejszy element, ponieważ odpowiada za specyficzne rozpoznanie analitu. W biosensorych tworzą ją elementy biologiczne takie jak: enzymy, nici DNA, przeciwciała, białka, porfiryny czy organelle komórkowe (rys. 1).

Warunkuje ona podstawowe parametry pracy czujnika, które decydują o jego użyteczności. Najważniejsze z nich to: selektywność, czułość, zakres dynamiczny i liniowy krzywej kalibracji, granica oznaczalności i wykrywalności oraz czas odpowiedzi. Istotne są również stabilne i powtarzalne odpowiedzi czujników, ich czas życia, a także wiarygodność otrzymywanych rezultatów (Brzózka i Wróblewski, 1999; Sankiewicz i in., 2014). Zadaniem przetwornika jest konwersja sygnału chemicznego na sygnał mierzalny fizycznie np. elektryczny lub optyczny. Detekcja może wiązać się ze zmianą mierzonego sygnału, jego pojawieniem się lub zanikiem. Najczęściej stosowane są przetworniki elektrochemiczne oraz optyczne. W literaturze opisywane są również biosensory zawierające przetworniki piezoelektryczne lub termiczne.



Rys.1 Schemat budowy biosensora wraz z przykładowymi przetwornikami oraz substancjami biologicznymi w warstwie receptorowej

Fig. 1. Schematic diagram of biosensor with exemplary transducers and biological substances forming receptor layer

Oddziaływanie bioreceptora z analitem generuje sygnał chemiczny charakterystyczny dla danego zjawiska biologicznego. Jest on następnie przetwarzany przez przetwornik na sygnał użyteczny analitycznie, a na końcu rejestrowany np. przez komputer. Mechanizm rozpoznawania i wiązania się analitu z receptorami w warstwie chemoczułej porównywany jest do dopasowania klucza do zamku. Tylko w przypadku odpowiedniego dopasowania analitu – klucza do receptora – zamku, inicjowany jest sygnał (Kłós-Witkowska, 2015).

Biosensory są najczęściej klasyfikowane ze względu na zawarty w warstwie receptorowej element biologiczny jak również rodzaj przetwornika. Najstarszą grupę stanowią biosensory enzymatyczne, w których enzymy (biokatalizatory)

selektywnie rozpoznają substraty i katalizują ich reakcję. Najpopularniejszym przedstawicielem tej grupy bioczujników jest glukometr. Często warstwę receptorową tworzą przeciwciała, które specyficznie (selektywnie) tworzą kompleksy z antygenami. Takie kompleksy stosowane są m.in. w komercyjnie dostępnych testach ciążowych. Wykorzystywane są poliklonalne, monoklonalne, a także rekombinowane przeciwciała zależnie od ich sposobu syntezy i selektywności. W literaturze przedstawiane są również biosensory w których elementem biologicznie aktywnym są antygeny, białka, porfiryny a także całe organizmy takie jak bakterie czy wirusy. Interesującą nową grupą biosensory są aptasensory, zawierające aptamery czyli jednoniciowe, syntetyczne oligonukleotydy (krótkie fragmenty DNA

badź RNA) lub peptydy, które dzięki możliwości przyjmowania ściśle określonych form przestrzennych specyficznie wiążą dany analit (Chambers i in., 2008).

Ze względu na rodzaj sygnału generowanego przez przetwornik, jako wyniki oddziaływania receptora z analitem, biosensory dzielą się na cztery główne grupy: elektrochemiczne, optyczne, piezoelektryczne oraz termiczne (Kłós-Witkowska 2015, Perumal i Hashim, 2014). W ostatnich latach wykorzystywane są również inne przetworniki np. magnetyczne lub mikromechaniczne. Najstarszą grupę stanowią biosensory elektrochemiczne, które dalej dzielą się na amperometryczne, potencjometryczne, konduktometryczne oraz impedancyjne w zależności od generowanego sygnału. Jest to odpowiednio: natężenie prądu, potencjał (siła elektromotoryczna ogniwa), przewodność lub impedancja. Są one wciąż jednymi z najczęściej stosowanych typów czujników (Grieshaber i in., 2008). Charakteryzują się niskim kosztem produkcji, łatwością obsługi, wysoką czułością, krótkim czasem odpowiedzi oraz możliwością miniaturyzacji. Z drugiej strony wykazują wrażliwość na zakłócenia pola magnetycznego oraz na zmiany pH środowiska pomiarowego, co może stanowić przeszkodę gdy zmiana ta jest wywołana innym czynnikiem niż oddziaływanie pomiędzy bioreceptorem a analitem. Zmiana pH lub siły jonowej badanego roztworu np. buforu zawierającego analit lub substrat reakcji enzymatycznej może skutkować zarejestrowaniem różnej wartości sygnału biosensora.

W ostatnich latach wielu naukowców prowadziło intensywne badania nad biosensorymi optycznymi. Są one równie popularne co biosensory elektrochemiczne (Łazcka i in., 2007). Dzięki wysokiej czułości, małym rozmiarom, możliwością bezpośredniej analizy bez użycia znaczników w czasie rzeczywistym oraz równoczesnemu oznaczeniu kilku analitów stanowią alternatywę w stosunku do konwencjonalnych metod. Czujniki te rejestrują zmiany parametrów optycznych wykorzystując takie zjawiska jak: luminescencja, fluorescencja, fosforescencja, absorpcja, polaryzacja oraz załamania światła. Coraz częściej spotykane w literaturze są optyczne biosensory opierające się na zjawisku powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR, ang. Surface Plasmon Resonance). Za pomocą metody SPR badane są zmiany współczynnika załamania promieniowania spowodowane związaniem się cząsteczek analitu na powierzchni metalu (Sankiewicz i in., 2014). Nieco rzadziej stosowane są przetworniki piezoelektryczne które opierają się na zjawisku odkrytym przez braci Curie

w 1880 r. Polega ono na pojawianiu się ładunków elektrycznych na powierzchni materiałów (piezoelektryków) pod wpływem naprężeń mechanicznych. W takich czujnikach przetwornik wykonany jest z materiału piezoelektrycznego, najczęściej kwarcu, pokrytego warstwą receptorową, który drga z pewną częstotliwością. Oddziaływanie analitu z bioreceptorem powoduje zmianę częstotliwości, kontrolowaną przez zewnętrzny sygnał prądowy. Wywołana zmiana prądu dostarcza informacji o masie analitu. Z reguły stosowane są dwa typy przetworników piezoelektrycznych: mikrowaga kwarcowa (QMB, ang. Quartz Microbalance) oraz czujniki bazujące na zjawisku akustycznej fali powierzchniowej (SAW, ang. Surface Acoustic Wave). W przeciwieństwie do wyżej opisywanych czujników, biosensory piezoelektryczne charakteryzują się niskimi czułościami i wysokimi granicami oznaczalności (Kłós-Witkowska, 2014). Za pomocą biosensorów termicznych rejestrowana jest zmiana ciepła wynikająca z rozpoznania przez bioreceptor analitu. Może być ona powiązana z ilością powstałego produktu lub ubytkiem substratu reakcji. Największymi zaletami tych czujników są: stabilność, wysoka selektywność, łatwa miniaturyzacja, krótki czas odpowiedzi, a także możliwość analizy zanieczyszczonych próbek. Z drugiej strony do ich stosowania potrzebna jest często skomplikowana aparatura.

Historia biosensorów rozpoczęła się w latach 50 ubiegłego wieku wraz z badaniami prof. Lelenda C. Clarka Jr., nad elektrochemiczną redukcją tlenu na elektrodzie platynowej. Rezultatem jego badań był sensor czuły na tlen nazwany później elektrodą Clarka. Służył do określania zawartości tlenu we krwi, wodzie i innych cieczach w czasie rzeczywistym. W 1962 r. L. C. Clark Jr. oraz C. Lyons opracowali pierwszy enzymatyczny biosensor do oznaczania glukozy. Opracowana technologia została przeniesiona do firmy Yellow Springs International Company (YSI), która w 1975 r. wprowadziła na rynek pierwszy analizator do bezpośredniego pomiaru glukozy. Urządzenia te były głównie wykorzystywane w laboratoriach klinicznych ze względu na swoją wysoką cenę. Pod koniec lat 60 został zaprezentowany pierwszy potencjometryczny biosensor służący do oznaczania mocznika. Była to jonoselektywna elektroda z unieruchomioną ureazą czuła na jony amonowe. W połowie lat 70 w warstwie receptorowej zastosowano po raz pierwszy przeciwciała, tworząc immunosensor. Biosensory zyskały popularność w latach 80. XX wieku, odzwierciedlając rosnący nacisk na biotechnologię. W ciągu tej dekady wprowadzono

nowe przetworniki, w tym optyczne (światłowodowy) i piezoelektryczne (masowe). Pierwszy biosensor do samodzielnego monitorowania poziomu glukozy we krwi był wielkości długopisu i został wprowadzony na rynek 1987 r. przez firmę Medisense Inc. Dalsze badania nad biosensorymi doprowadziły w latach 90 do opracowania podskórnie wszczepianych elektrod wielkości igły do ciągłego monitorowania poziomu glukozy. Kolejnym przełomowym odkryciem był biosensor zawierający kwasy nukleinowe (DNA) w warstwie receptorowej. Ostatnie dwie dekady to przede wszystkim połączenie nanotechnologii i biosensorymi poprzez m.in. wykorzystanie nanotechnologii krzemu, nanocząstek złota czy nanorurek węglowych (Kim i in., 2019). Można stwierdzić, że początkowo siłą napędową rozwoju biosensorymi była potrzeba opracowania czujnika do monitorowania poziomu glukozy we krwi w warunkach domowych (Magner, 2013). Z czasem projektowano biosensory do oznaczania wielu innych analitów. W przeciągu ostatnich dwudziestu lat liczba publikacji naukowych o tematyce

biosensorymi wzrosła ponad 10-krotnie, jak podaje baza danych Web of Science. Jest to potwierdzenie ogromnego zainteresowania nie tylko naukowców ale również przedstawicieli przemysłu, którzy wspierają finansowo badania nad biosensorymi (Kłós-Witkowska, 2014).

Początkowo biosensory projektowano do zastosowań medycznych, przede wszystkim oznaczania glukozy we krwi (Wang, 2008). Z czasem jednak zakres ich zastosowań stopniowo się powiększał. Wysoka czułość i selektywność, możliwość pomiarów w czasie rzeczywistym, a także często niewielkie rozmiary czynią je niezwykle atrakcyjnymi narzędziami analitycznymi. W literaturze odnaleźć można szereg prac przeglądowych przedstawiających wykorzystanie biosensorymi w medycynie, analizie żywności, ochronie środowiska, przemyśle obronnym czy w badaniach biofarmaceutycznych. W tabeli 1 zebrano przykładowe zastosowania biosensorymi w różnorodnych dziedzinach.

Tabela 1. Przykładowe zastosowania biosensorymi w różnych dziedzinach

Table 1. Examples of applications of biosensors in various fields

| Obszar zastosowań Field of application | Cel analizy Aim of the analysis | Referencja Reference |
|---|---|-------------------------|
| Medycyna | Monitorowanie poziomu glukozy we krwi | Wang, 2008 |
| | Diagnostyka chorób nowotworowych | Cynk i Gaweł, 2012 |
| | Wykrywanie wirusa HIV (ang. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>) | Farzina i in. 2020 |
| | Detekcja hormonów | Eguilaz i in. 2010 |
| | Wykrywanie markerów chorób układu sercowo-naczyniowego | Pultar, J. 2009 |
| Produkty spożywcze | Kontrola żywności modyfikowanej genetycznie | Radecki i in. 2006 |
| | Detekcja patogenów w żywności | Leonard i in. 2003 |
| | Wykrywanie alergenów w żywności | Zhou i in. 2019 |
| | Oznaczanie pestycydów | Cesarino i in. 2019 |
| Ochrona środowiska | Ocena jakości wody | Kołwzan 2009 |
| | Detekcja jonów metali ciężkich w wodzie | Gumpu i in. 2015 |
| | Oznaczanie pestycydów | Pundira i in. 2019 |
| Przemysł obronny | Detekcja węgla | Hao i in. 2009 |
| | Wykrywanie rycyny | Cunningham i in. 2015 |
| | Detekcja jadu kielbasianego | Shi i in. 2015 |

Zastosowanie biosensorymi do detekcji patogenów roślinnych

Intensywnie rozwijanym obszarem zastosowań biosensorymi jest rolnictwo. Prowadzone są badania nad bioczujnikami, które pozwoliłyby na szybką, niedrogą, łatwą oraz możliwą do przeprowadzenia w warunkach polowych detekcję patogenów roślinnych. Najczęściej do tego celu projektowane

są czujniki zawierające w warstwie receptorowej przeciwciała – immunosensory lub fragmenty kwasów nukleinowych – sensory DNA w połączeniu z przetwornikiem elektrochemicznym oraz optycznym.

W biosensorymi elektrochemicznych możliwe są dwa sposoby detekcji (rys 2). Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS, ang.

Electrochemical Impedance Spectroscopy) wykonywana jest jako metoda bezpośrednia, w której wartość rejestrowanego sygnału bezpośrednio jest związana z ilością oznaczanego patogenu w badanym materiale. Biosensorem impedancyjnym jest zwykle elektroda wykonana z metalu szlachetnego (złoto, platyna) lub węgla szklistego z unieruchomionym receptorem np. przeciwciałem lub pojedynczą nicią DNA. Rozpoznanie molekularne tj. utworzenie kompleksu z antygenem lub hybrydyzacja nici DNA (odpowiednio) generuje zmianę na granicy faz elektroda/roztwór czego wynikiem jest rejestrowana zmiana impedancji. Tego typu czujniki charakteryzują się wysoką czułością, jednak ich niewystarczająca selektywność w próbkach o złożonym składzie pozostaje nierozwiązanym wyzwaniem ograniczającym ich komercjalizację. Dodatkową trudnością jest interpretacja uzyskanych wyników. Współpraca dwóch polskich grup badawczych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN oraz Instytutu Ogrodnictwa kilka lat temu zaprezentowała immunosensory impedancyjne do detekcji dwóch patogenów wywołujących choroby roślin: wirusa ospowatości śliwy (PPV) (Jarocka i in., 2011) oraz wirusa nekrotycznej pierścieniowej plamistości (PNRSV) (Jarocka i in., 2013). Opracowany czujnik do detekcji PNRSV charakteryzował się dobrą czułością oraz selektywnością, a także wymagał niewielkiej objętości próbki (10 ml). Zademonstrowano zdolności dyskryminacyjne biosensora, który rozróżniał próbki z ekstraktów zdrowych roślin od próbek zawierających 0,01% ekstraktu z zakażonego materiału roślinnego (Jarocka i in., 2013).

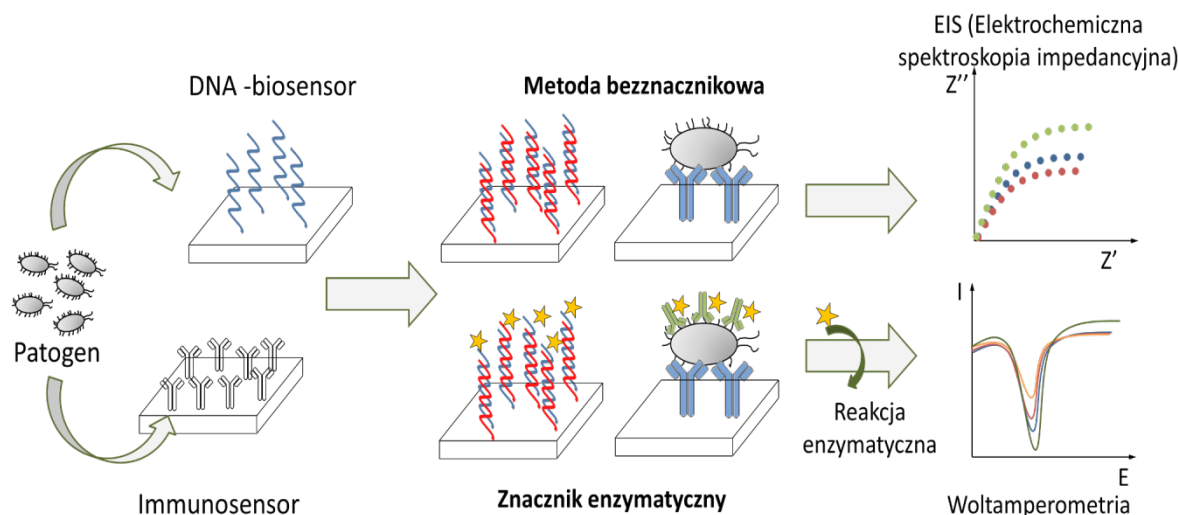
Metody pośrednie tzw. znacznikowe wymagają obecności odpowiedniej substancji, którego ilość z jednej strony wpływa na wielkość rejestrowanego sygnału, a z drugiej jest bezpośrednio związana z ilością patogenu w próbce. Jest to połączenie immunologicznej metody ELISA z technikami amperometrycznymi lub voltamperometrycznymi (Felix i Angnes, 2018; Kokkinos i in., 2016). Rejestrowany sygnał prądowy jest efektem reakcji utleniania lub redukcji produktu reakcji katalizowanej przez enzym, która zachodzi na powierzchni elektrody pracującej. Utworzenie kompleksu immunologicznego pomiędzy przeciwciałem a antygenem determinuje zajście reakcji enzymatycznej, analogicznie do testu ELISA. Przeciwciała znakowane są najczęściej peroksydazą chrzanową (HRP) lub alkaliczną fosfatazą (AP) ze względu na szeroki wybór substratów reakcji które katalizują, ich wysoką wydajność oraz warunki reakcji sprzyjające pomiarom prądowym (pH, stężenie, rozpuszczalność

w wodzie). Niestety niewielka dostępność koniugatów przeciwciał z enzymami stanowi istotne ograniczenie tej metody (Khater i in., 2017). Mendes wraz ze współpracownikami opracował voltamperometryczny immunosensor do wczesnej detekcji rdzy soi wywoływanej przez grzyba *Phakopsora Pachyrhiz*. Na powierzchnię zminiaturyzowanej elektrody węglowej (ang. screen-printed) nakładano zawieszinę zawierającą zmodyfikowane magnetyczne cząstki. Na ich powierzchni powstawał kompleks immunologiczny antygen-przeciwciało znakowane alkaliczną fosfatazą. Zaobserwowano nie tylko znaczą różnicę rejestrowanego sygnału w obecności antygeny w próbce, ale również liniową zależność pomiędzy jego zawartością a natężeniem prądu (Mendes i in., 2012). Voltamperometryczny immunosensor do detekcji bakterii *Pantoea stewartii* sbsp. *Stewartii* (PSS) przyczyny bakteryjnego więdnienia kukurydzy przedstawił Zhao i wsp. (Zhao i in., 2014). W celu amplifikacji sygnału zastosowano nanocząstki złota (AuNP), które powleczone przeciwciałami znakowanymi peroksydazą chrzanową. Dzięki temu uzyskano granicę detekcji na poziomie $7,8 \times 10^3$ CFU/ml co w porównaniu do wyników konwencjonalnego testu ELISA – $1,5 \times 10^5$ CFU/ml stanowiło 20-krotnie niższą granicę detekcji. Podobnie, voltamperometryczna detekcja wirusa mozaiki ogórka (CMV, *Cucumber Mosaic Virus*) z wykorzystaniem przeciwciał znakowanych HRP charakteryzowała się 5-krotnie niższą granicą detekcji w stosunku do referencyjnej metody ELISA połączonej ze spektrofotometryczną detekcją o-fenylendiaminy (Jiao i in., 2000).

W biosensorach elektrochemicznych dedykowanych do detekcji patogenów roślinnych jako bioreceptory stosowane są również pojedyncze fragmenty nici DNA (tzw. sondy DNA). Obecność w próbce komplementarnej nici do tej unieruchomionej na powierzchni elektrody prowadzi do reakcji hybrydyzacji, którą można obserwować za pomocą technik prądowych. Biosensor DNA do oznaczania wirusa śliwy (*Plum Pox Virus*) był efektem współpracy grup badawczych z Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN oraz Instytutu Ogrodnictwa (Malecka i in., 2014). Reakcja hybrydyzacji unieruchomionego na powierzchni elektrody z węgla szklistego zmodyfikowanego oligonukleotydu NH_2 -ssDNA i dwóch komplementarnych nici DNA o różnych długościach generowała sygnał rejestrowany za pomocą voltamperometrii fali prostokątnej w obecności sondy redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Uzyskano granicę detekcji na wynoszącą 12,8 pg/ml. Khater wraz z współpracownikami opracował

impedancyjny DNA-biosensor do oznaczania wirusa CTV (*Citrus tristeza virus*) atakującego cytrusy (Khater i in., 2019). Warstwę receptorową stanowiła powierzchnia sitodrukowanej elektrody węglowej (SPCE, ang. Screen-Printed Carbon Electrode) z osadzonymi nanocząsteczkami złota, do której przyłączono nici DNA zmodyfikowane

grupą tiolową. Pomiary prowadzono za pomocą spektroskopii impedancyjnej (EIS) w obecności sondy redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Otrzymano logarytmiczną zależność pomiędzy rejestrowaną wartością impedancji a stężeniem DNA wirusa w zakresie 0.1–10 μM .



Rys. 2 Schemat identyfikacji patogenów za pomocą biosensorów elektrochemicznych

Fig. 2. Schematic of pathogen identification strategies using electrochemical biosensors

Do detekcji patogenów roślinnych projektowane są również biosensory z przetwornikami optycznymi. Opisywane w literaturze immunosensory optyczne opierają się na systemach typu latera-flow (testy paskowe), zjawisku fluorescencji oraz powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Testy paskowe od wielu lat cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem ze względu na ich prostotę, niewielki koszt oraz możliwość wykonania analizy w warunkach środowiskowych (Stochła i in., 2017). W warstwie receptorowej tego typu czujników stosowane są nie tylko przeciwciała, ale również pojedyncze nici DNA oraz aptamery. Często w celu intensyfikacji sygnału wykorzystuje się nanocząstki metali np. złota, platyny lub srebra. Przewodowski wraz ze współpracownikami opracował i opatentował testy paskowe do identyfikacji bakterii *Clavibacter Sepedonicus* comb. nov. sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Zaprojektowane testy charakteryzowały się granicą detekcji na poziomie 5×10^3 CFU/ml (Przewodowski i Barnyk, 2009). Podobne rozwiązanie do detekcji wirusa ziemniaka X zaprezentował Drygin wraz ze współpracownikami (Drygin i in., 2012) uzyskując granicę detekcji 2 ng/ml. Selektowność testu zbadano względem innych wirusów ziemniaka Y, M

oraz A. Wciąż prowadzone są badania nad biosensorymi tego typu głównie pod kątem zwiększenia ich czułości oraz możliwości ilościowej analizy.

Fluorescencyjny immunosensor wykorzystano do oznaczania kilku patogenów roślinnych jednocześnie, bakterii *Acidovorax avenae subsp. Citrulli* (AAC) oraz trzech wirusów *Chilli vein-banding mottle virus* (CVbMV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) i *Melon yellow spot virus* (MYSV). W badaniach posłużono się magnetycznymi mikrosferami powleczonymi przeciwciałami specyficznymi względem każdego z badanych antygenów oraz przeciwciałami znakowanymi barwnikiem fluorescencyjnym R-fikoerytryną. Jednoczesne oznaczanie kilka patogenów w próbce to innowacyjne podejście, o dużym potencjale aplikacyjnym jednak wadą tego rozwiązania jest złożoność analizy (Charlermroj i in. 2013).

Biosensory SPR powstały ponad 20 lat temu i od tego czasu trwają intensywne prace nad ich udoskonalaniem (Damborsky i in., 2016). Immunosensor SPR zawierający nanopręty złota opracowano do detekcji wirusów rośliny storczykowatych (*Cymbidium Mosaic Virus* – CymMV oraz *Odontoglossum Ring Spot Virus* – ORSV) (Lin i in. 2014). Warstwa receptorowa zawierała przeciwciała

specyficzne względem wirusów zmodyfikowane za pomocą nanoprętów złota dzięki czemu uzyskano szersze spektrum w którym widoczne były zmiany sygnałów związane z rozpoznaniem molekularnym. W ten sposób rozwiązano problem interferencji matrycy próbki. Uzyskano granice oznaczalności na poziomie 48 pg/ml (CymMV) i 42 pg/ml (ORSV). Laboratoryjny prototyp immunosensora SPR wykorzystano do detekcji grzyba *Pseudocercospora fijiensis* sprawcy czarnej Sigatoki atakującej banany (Luna-Moreno i in. 2019). Zaprezentowany czujnik charakteryzował się granicą oznaczalności wynoszącą 11.7 µg/ml oraz zakresem liniowym 39.1 – 122 µg/ml. Wielu naukowców prowadzi badania nad immunosensorem SPR, rezultatami ich pracy są czujniki do detekcji wirusa mozaiki tytoniu (TMV) (Boltovets i in. 2002) czy grzyba *Phytophthora infestans* sprawcy zarazy ziemniaka.

Przetwornik optyczny SPR połączono również warstwą receptorową złożoną z nici DNA. Za pomocą takiego biosensora w połączeniu z reakcją PCR przeprowadzono detekcję grzyba *Fusarium culmorum* wywołującego choroby zbóż (Zezza i in. 2006). Sondę DNA unieruchomiono na powierzchni biosensora za pomocą niekowalencyjnego wiązania biotyna-streptawidyna. Hybrydyzacja sondy DNA z produktami reakcji PCR (dsDNA) generowała rejestrowany sygnał.

Popularnym rozwiązaniem optycznych biosensorów DNA jest detekcja kolorymetryczna z wykorzystaniem nanocząstek złota w testach paskowych oraz testach agregacji. Bakterie *Acidovorax avenae subsp. Citrulli* wywołujące bakteryjną plamistość owoców oznaczono za pomocą testu paskowego z unieruchomionymi na powierzchni nanocząstek złota sondami pojedynczymi nićmi DNA. Potwierdzono skuteczność oznaczenia patogenu oraz możliwość analizy półilościowej (Zhao i in., 2011). Przepływowy mikroczip do detekcji patogenów z gatunku *Phytophthora* zaprezentowała Schwenkbier wraz z współpracownikami (Schwenkbier i in., 2015). W opracowanym biosensorze wykorzystano izotermiczną amplifikację za pomocą helikazy do zaprojektowania starterów DNA. Hybrydyzacja komplementarnych nici DNA a następnie osadzenie nanocząstek srebra umożliwiło zarejestrowanie sygnału. W literaturze odnaleźć można wiele innych bioczujników zawierających różnorodne biologiczne elementy oraz wykorzystujące najnowsze odkrycia zakresu technologii materiałów dedykowane detekcji patogenów roślinnych. Przedstawione zostały przykładowe prototypy biosensorów. W laboratoriach na całym świecie trwają intensywne

prace nad czujnikami opartymi na innych metodach detekcji, a także nad udoskonalaniem dotychczas wykorzystywanych metod.

Podsumowanie

Detekcja patogenów roślinnych stanowi ważny kierunek badań naukowych. Opracowanie szybkiej, prostej oraz niedrożej metody wczesnego wykrywania patogenów roślinnych pozwoliłoby na większą kontrolę zdrowotności roślin co mogłoby się przełożyć na wzrost produktywności rolnictwa. Pomimo dobrze poznanych dotychczas stosowanych metod molekularnych i serologicznych, wciąż poszukiwane są nowe rozwiązania umożliwiające wykonanie analizy w warunkach polowych oraz redukcję czasu i kosztów pojedynczej analizy. Jednym z potencjalnych rozwiązań jest wykorzystanie biosensorów. Charakteryzują się prostą budową oraz możliwością miniaturyzacji, a mnogość potencjalnych materiałów do ich konstrukcji roślinie. Historia rozwoju biosensorów ściśle wiąże się z intensywną potrzebą opracowania urządzenia pozwalającego samodzielnie kontrolować poziom cukru we krwi. Z czasem zakres zastosowań tych urządzeń stopniowo się powiększał, od diagnostyki medycznej przez ochronę środowiska, kontrolę jakości produktów spożywczych po wykrywanie materiałów niebezpiecznych. Nadal jednak stanowią one znaczny obszar badawczy dla wielu naukowców. W literaturze zaprezentowano biosensory służące do detekcji wirusów, grzybów oraz bakterii wywołujących choroby roślin. Z reguły są to elektrochemiczne lub optyczne czujniki zawierające warstwę receptorową złożoną z przeciwciał lub sond DNA. Wciąż jednak większość z nich to laboratoryjne prototypy, które być może w przyszłości zostaną skomercjalizowane i spopularyzowane.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego MINIATURA 3 Nr DEC-2019/03/X/NZ9/01197 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Literatura

- Boltovets, P.M., Boyko, V.R., Kostikov, I.Y., Dyachenko, N.S., Snopok, B.A., Shirshov, Y.M. (2002). Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique J. Virol. Methods 105, 141–146.
- Brzózka, Z., Wróblewski, W. (1999) Sensory elektrochemiczne W: Z. Brzózka, W. Wróblewski (red), Sensory chemiczne (21–74). Warszawa. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej,
- Cesarino, I., Moraes, F.C., Lanza, M.R.V., Machado, S.A.S. (2012). Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based

- on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline–carbon nanotubes. *Food Chem.* 135, 873–879
- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A., Valdes, J.J. (2008). *Biosensor Recognition Elements. Curr. Issues Mol. Biol.* 10, 1–12.
- Charlarmroj, R., Himananto, O., Seepiban, C., Kumposiri, M., Warin, N., Opladowska, M., Gajanandana, O., Grant, I.R., Karoonuthaisiri, N., Elliott, C.T. (2013). Multiplex Detection of Plant Pathogens Using a Microsphere Immunoassay Technology *PLoS One* 8, e62344.
- Cynk P., Gaweł E. (2012). Zastosowanie biosensorów w diagnostyce choroby nowotworowej. *Prz. Med. Univ. Rzesz. Inst. Leków* 3, 373–378
- Cunningham, J.C., Scida, K., Kogan, M.R., Wang, B., Ellington, A.D., Crooks, R.M. (2015). Paper diagnostic device for quantitative electrochemical detection of ricin at picomolar levels. *Lab. Chip* 15, 3707–3715
- Damborsky, P., Svitel, J., Katrlík, J. (2016). Optical biosensors, *Essays. Biochem.* 60, 91–100.
- Drygin, Y.F., Blintsov, A.N., Grigorenko, V.G., Andreeva, I.P., Osipov, A.P., Varitzev, Y.A.,
- Uskov, A.I., Kravchenko, D.V., Atabekov, J.G. (2012). Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection *Appl. Microbiol. Biotech.* 93, 179–189.
- Eguilaz, M., Moreno-Guzman, M., Campuzano, S., González-Cortés, A., Yanez-Sedeno, P., Pingarrón, J.M. (2010). An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 26, 517–522
- Fang, Y., Ramasamy, R.P. (2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors*, 4, 537–561.
- Farzin, L., Shamsipur, M., Samandari, L., Sheibani, S. (2020). HIV biosensors for early diagnosis of infection: The intertwine of nanotechnology with sensing strategies. *Talanta* 206, 120201.
- Felix, F. B., Angnes, L. (2018). Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications. *Biosens. Bioelectron.*, 102, 470–478
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors – sensor principles and architectures. *Sensors* 8, 1400–1458
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. (2010). Food Security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812–818.
- Gumpu, M.B., Sethuraman, S., Krishnan, U.M., Rayappan, J.B.B. (2015). A review on detection of heavy metal ions in water – An electrochemical approach. *Sens. Actuators B. Chem.* 213, 515–533
- Hao, R.Z., Wang, D.B., Zhang, X.E., Zuo, G.M., Wei, H.P., Yang, R.F., Zhang, Z.P., Cheng, Z.X., Guo, Y.C., Cui, Z.Q. (2009). Rapid detection of bacillus anthracis using monoclonal antibody functionalized QMC sensor. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1330–1335
- Huang, X., Xu, J., Ji, H.F., Li, G., Chen, H., (2014). Quartz crystal microbalance based biosensor for rapid and sensitive detection of Maize Chlorotic Mottle Virus. *Anal. Methods*, 6, 4530–4536
- Jarocka, U., Radecka, H., Malinowski, T., Michalczyk, L., Radecki, J. (2013). Detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus in plant extracts with impedimetric immunosensor based on glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 25, 433–438
- Jarocka, U., Wąsowicz, M., Radecka, H., Malinowski, T., Michalczyk, L., Radecki, J. (2011). Impedimetric Immunosensor for Detection of Plum Pox Virus in Plant Extracts. *Electroanalysis*, 23, 2197–2204.
- Jiao K., Sun W., Zhang S-S. (2000). Sensitive detection of plant virus by electrochemical enzyme-linked immunoassay. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 667–671.
- Khater, M., de la Escosura-Muniz, A., Merkoci, A. (2017). Biosensors for plant pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.*, 93, 72–86.
- Kim, J., Campbell, A. S., Esteban-Fernández de Ávila, B., Wang, J. (2019). Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nat. Biotechnol.* 37, 389–406
- Kłós – Witkowska, A. (2014). Ewolucja i rozwój biosensorów – problemy i perspektywy. *PAK*, 60, 1178–1180.
- Kłós – Witkowska, A. (2015). Biosensory. *PAK*, 19, 37–40.
- Kokkinos, C., Economou, A., Prodromidis, M. I. (2016). Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. *Trends Anal. Chem.* 79, 88–105
- Koźwzan, B. (2009). Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody – Ochrona środowiska 4, 3–14
- Lazcka, O., Del Campo, F. J., Munoz, F.X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 22, 1205–1217
- Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R. (2003). Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme Microb. Tech.*, 32, 3–13.
- Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchere, V., Alberola, C., Menassieu, J. (2009). Agronomy for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 29, 1–6.
- Lin, H.Y., Huang, C.H., Lu, S.H., Kuo, I.T., Chau, L.K., (2014). Direct detection of orchid viruses using nanorod-based fiber optic particle plasmon resonance immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 51, 371–378.
- Luna-Moreno, D., Sanchez-Alvarez, A., Islas-Flores, I., Canto-Canche, B., Carrillo-Pech, M., Villarreal-Chiu, J.F., Rodríguez-Delgado, M. (2019). Early detection of the Fungal Banana Black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* by an SPR Immunosensor Method.

- Sensors 19, 465–477.
- Magner, E. (2013). Biosensory elektrochemiczne – możliwości i ograniczenia komercjalizacji. *Chemik*. 67, 11–13.
- Malecka, K., Michalczyk, L., Radecka, H., Radecki, J., (2014). Ion-channel genosensor for the detection of specific DNA sequences derived from Plum Pox Virus in plant extracts. *Sensors*, 14, 18611–18624.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L.R., Davis, C.E., Dandekar, A.M. (2015) Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 35, 1–25.
- Mendes, R.K., Laschi, S., Stach-Machado, D.R., Kubota L.T., Marrazza G. (2012) A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust. *Sens. Actuators B Chem* 166–167, 135–140.
- Perumal, V., Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: principle, architecture and applications, *J. Appl. Bio-med.* 12, 1–15.
- Przewodowski, W., Barnyk, A. (2009). Szybki test do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Post. Ochr. Rośl.* 49, 696–700.
- Pultar, J. (2009). Aptamer–antibody on-chip sandwich immunoassay for detection of CRP in spiked serum – *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1456–1461
- Pundira, C.S., Malik, A., Pretty, M. (2019) Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review *Biosens. Bioelectron.* 140, 11134
- Radecki, J., Radecka, H., Cieśla, J. (2006). Sensory i biosensory w kontroli żywności modyfikowanej genetycznie, *Biotechnol.* 3, 67–78
- Salamońska, K., Stochła, W., Przewodowski, W. (2016). Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka. *Ziemn. Pol.*, 4, 41–45.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.-N., Hollier C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Sec.*, 4, 519–537
- Sankiewicz, A., Puzan, B., Gorodkiewicz E. (2014). BioczuJNIKI SPRI – narzędzia diagnostyczne przyszłości. *Chemik* 68, 528–535
- Schwenkbier, L., Pollok, S., König, S., Urban, M., Werres, S., Cialla-May, D., Weber, K., Popp, J., (2015). Towards on-site testing of *Phytophthora* species. *Anal. Methods* 7, 211–217
- Shi, J.Y., Guo, J.B., Bai, G.X., Chan, C.Y., Liu, X., Ye, W.W., Hao, J.H., Chen, S., Yang, M. A. (2015). Graphene oxide based fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor for ultrasensitive detection of botulinum neurotoxin a (BoNT/A) enzymatic activity. *Biosens. Bioelectron.* 65, 238–244
- Skottrup, P., Nicolaisen, M., Justesen, A.F., (2007). Rapid determination of *Phytophthora infestans* sporangia using a surface plasmon resonance immunosensor. *J. Microbiol. Methods* 68, 507–515
- Stochła W., Przewodowski, W., Przewodowska, A., Salamońska, K. (2017). Immunodiagnostyczne metody wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka – *Ziemn. Pol.*, 1, 14–21.
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification – *Biosens. Bioelectron.* 16, 121–131
- Tilman, D., Balzer C., Hill, J., Belfort, B.L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 20260–20264.
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chem. Rev.* 108, 814–825
- Zeza, F., Pascale, M., Mulè, G., Visconti, A., (2006). Detection of *Fusarium culmorum* in wheat by a surface plasmon resonance-based DNA sensor. *J. Microb. Methods* 66 (3), 529–537
- Zhao, Y., Liu, L., Kong, D., Kuang, H., Wang, L., Xu, C. (2014). Dual amplified electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of *Pantoea stewartii* sbsp. *stewartii* ACS Appl. Mater. Interfaces, 6, 21178–21183.
- Zhao, W., Lu, J., Ma, W., Xu, C., Kuang, H., Zhu, S., (2011). Rapid on-site detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citullii* by gold-labeled DNA strip sensor. *Biosens. Bioelectron.* 26, 4241–4244
- Zhou, J., Qi Q., Wang, C., Qian, Y., Liu, G., Wang, Y., Fu, L. (2019). Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices – *Biosens. Bioelectron.* 142, 111449

The impact of *Fusarium* ear rot in Poland and methods to reduce losses caused by the disease



Znaczenie fuzariozy kolb kukurydzy w Polsce i metody ograniczenia strat powodowanych przez tą chorobę

Seweryn Frasiński¹✉, Elżbieta Czembor¹,
Justyna Lalak-Kańczugowska²

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików Zakład Traw, Roślin Motylkowatych i Energetycznych Pracownia Traw Pastewnych i Roślin Motylkowatych,

² Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin,

✉ e-mail: s.frasinski@ihar.edu.

Maize has a significant economic impact all over the world. Fungi in the genus *Fusarium* that cause Fusarium ear rot (FER) of maize have significant effect on the yield quality and quantity. The main threat is the contamination of grain with the mycotoxins they produce - as these are harmful to humans and animals. Such mycotoxins are a group of secondary metabolites of varied structure, which belong mainly to trichothecenes, fumonisins and zearalenones. As no efficient chemical control and pink rot in the field is possible, prevention relies on cultural practices and use resistant hybrids. Insects play an important role in the infection, which is why it is recommended to control their prevalence during growing season.

Keywords: *Fusarium*, Fusarium ear rot, mycotoxins, deoxynivalenol, fumonisins, zearalenone

Kukurydza ma istotne znaczenie ekonomiczne na całym świecie. Grzyby należące do rodzaju *Fusarium* powodujące fuzariozę kolb kukurydzy (FER) mają istotny wpływ na powstawanie strat jakościowych i ilościowych w plonie. Głównym zagrożeniem jest skażenie ziarna wytwarzanymi przez nie mykotoksynami, które są szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Jest to grupa metabolitów wtórnych, o zróżnicowanej budowie, należących głównie do trichotecenów, fumonizyn i zearalenonów. Z uwagi na fakt, że ochrona chemiczna jest mało efektywna, ważne jest stosowanie prawidłowej agrotechniki i dobór odpornej odmiany. Istotną rolę w zakażeniu odrywają żerujące na kukurydzy owady, stąd wskazane jest kontrolowanie ich występowania w uprawie.

Słowa kluczowe: *Fusarium*, fuzarioza kolb kukurydzy, mykotoksyny, deoksynivalenol, fumonizyny, zearalenon,

Introduction

The importance of maize in Poland and world-wide

Maize play an important economic role and is often recognized as the 3rd most cultivated crop in the world. It is growing both in the tropics (Africa and Central America) and in the moderate latitudes (FAOSTAT, 2020). It is used as a major and direct human food source, a raw material for processed food and as essential source of feed for farm animals, depending on the location (Ranum et al., 2014). The biofuel derived from maize also represents an important share of its use. It is included in the first generation of biofuels, with a low EROI index (Energy Returned on Energy Invested) that makes it on a so-called 'Net Energy Cliff', and the use of bioethanol in the context of reduction of CO₂ emissions

is criticised (Murphy et al., 2011; Brandt, 2017; IPCC AR5).

In Poland as well, there was a significant increase in the area of maize cultivation after 2010. The total cultivated area has surpassed 1 million ha (GUS 2020), of which about half of the crop is grain maize, exceeding 670 thousand ha in 2015 (GUS 2020; data for 2010-2017). Maize has a high yield per hectare, reaching an average value of 73.2 dt/ha for grain maize in Poland in 2013 (GUS 2020; data for 2010-2017).

The aim of this article is to summarise the state of knowledge in the world and to relate it to the situation in Poland. The article is also a summary of a speech from the conference “Dni Młodego Naukowca 2019” (“Young Scientist Days 2019”).

The importance of Fusarium ear rot in Poland and worldwide

Fungi in the genus *Fusarium* causing fusarium red and pink ear rot have a significant impact on qualitative and quantitative yield losses. They causing many maize diseases at various stages of plants development such as seedling damping off, stalk rot of the adult plants or red and pink ear rot. Stalk rot is important because the plants are lodged and cannot be harvested. Fungi in the genus *Fusarium* that affect maize cobs produce secondary metabolites called mycotoxins which are harmful to humans and animals (Munkvold et al., 2019)

Discolor section

Individual *Fusarium* species are able to produce many different mycotoxins. *Fusarium cumorum* (W.G. Smith) Saccardo, which belong to *Discolor* section, causing red ear rot and produce mainly deoxynivalenol (DON). In chemical terms, it is a type B trichothecene (unlike type A trichothecenes, it has a ketone group in position C-8). It may also occur in two acetylated forms - 3-AcDON and 15-AcDON and as double acetylated 3,15-AcDON, although this occurs in much smaller concentrations than other forms (Bottalico 1998; Leslie, Summerell, 2006). *Fusarium graminearum* Schwabe chemotypes are more common on maize, most often producing 15-AcDON. In contrast, 3-AcDON can be found mainly on wheat. However, their composition may vary and may be affected by weather conditions. The dangerous phenomenon is the presence in the plant material of DON-3-glucoside, called 'masked mycotoxin'. It is produced by plants as a defensive response and is not detectable by simple methods of DON testing, and can be converted back into a toxic form in the digestive tract. Little is known about masked mycotoxin bioactivity and this problem requires further research. (Berthiller et al., 2009; Berthiller et al., 2011; Galaverna et al., 2009). The *Discolor* section species also produce nivalenol (NIV), group B trichothecene which, despite being present in lower concentrations, is more toxic - having twice as low LD50 compared to DON (IARC, 1993). Moreover, these produce zearalenone (ZEA) – which is associated mainly with its ability to activate estrogen receptors and thus induce hormonal imbalance (Kowalska et al., 2016; Pasquali et al., 2016; Shier et al., 2001).

Liseola section

The *Fusarium* species of the *Liseola* section, causing pink fusariosis of cobs, produce other groups

of toxins, the most important of which include FB1 and FB2 fumonisins (FUM). These are produced by *Fusarium verticillioides* (Saccardo) (Nirenberg), *Fusarium temperatum* Scaufl. & Munaut and *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg (mainly FB1). Members of the *Liseola* section - *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking), *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. and *F. proliferatum* - are able to produce beauvercin (BEA) and moniliformin (MON). Apart from BEA and FUM, *F. poae* frequently colonizing maize grain, may occasionally produce T-2 toxin. T-2 toxin is produced in large quantities by *Fusarium sporotrichioides* Sherb., it's presence in Poland in silage has been confirmed, but it is not detected in maize grain (Panasiuk et al., 2019). T-2 and its deacetylated HT-2 derivative belong to type A trichothecenes and show relatively high toxicity (low LD50) (Logrieco et al., 2002; Leslie, Summerell, 2006; Miedaner et al., 2017).

Fusarium mycotoxins

A single species usually produces many types of mycotoxins, and different *Fusarium* species may co-exist on a single host. An additional risk is that contamination with *Fusarium* mycotoxins may occur despite the absence of any external signs or symptoms on the plants. All of them have a negative impact on animals and humans. For example, mentioned earlier DON, commonly found in plant- and animal-based food, also known as vomitoxin, overcomes the blood-brain barrier. When it exceeds the safe level, it first causes a vomiting reaction, as well as a number of other complaints including dizziness, headaches and fever. Animal and *in vitro* tests have shown geno- and immunotoxic effects, effects on fertility, liver and kidney damage (Marasas, 2001; Missmer et al., 2006; Sobrova et al., 2010).

Toxins such as fumonisin B1 and B2 are classified by IARC in category B2 - probably carcinogenic to humans, while ZEA, DON and NIV still remain in category 3 (Ostry et al., 2017). For this reason, standards for acceptable concentrations have been established in many countries. In the European Union, the current regulations date back to 2006 (Commission Regulation (EC) No 1881/2006) with maximum levels specified for DON, ZEA, FB1, FB2. In 2013, Recommendation 2013/165/EU was made for T-2 and HT-2 with an advice for testing in case if the indicator level is exceeded, while the acceptable limits remain unset. There is still not enough data available, although the compounds seem to show high toxicity at low doses. For this reason, European Food Safety Authority 2017

recommendations set the tolerable daily intake (TDI) for humans at 0.02 µg/kg, where it is 1 µg/kg for DON, 2 µg/kg for fumonisins, NIV 0.7 µg/kg, and 0.2 µg/kg for ZEA (Brera et al., 2008; Arcella et al., 2017).

Fusarium on maize in Poland

The species most commonly found on maize in Poland include *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, and *F. temperatum*. The occurrence of individual species has been changing over the years, however, the trend is towards a higher incidence of species associated with warmer regions, such as those from the *Lisolea* spp. section: *F. verticillioides* and *F. temperatum*, as compared to *F. graminearum* and *F. poae* which favour more temperate climate (Czembor et al., 2015; Gromadzka et al., 2019; Stępień et al., 2019). Therefore, also in Poland, a great deal of attention is paid to the monitoring of fungi populations of the genus *Fusarium* spp.

Using traditional and molecular methods, the IHAR-PIB (The Plant Breeding and Acclimatization Institute - National Research Institute) team identifies *Fusarium* species derived from maize grain of selected varieties grown in many locations (about 13 locations in 2015-2017, depending on the year). Initial findings from on-going unpublished study was presented at the conference “Dni Młodego Naukowca 2019”, where authors investigating effects of environmental conditions on the susceptibility of maize to FER and associated grain contamination with toxins. Following initial morphological evaluation, the obtained isolates are identified primarily with the molecular method, using species-specific primers based on SCAR markers (Mule et al., 2004; Scaufaire et al., 2011; Czembor et al., 2015). In case if there is no result obtained for the isolate, the identification is based on the *tef-1α* factor sequencing - amplification with the EF728M and Tef1R primer pairs and reading of the sequence using Applied Biosystems devices (ABI Prism 3130XL) (Stępień et al., 2012). The sequences are put together using the ClustalW and MEGA5 software (Thompson et al., 2002; Tamura et al., 2011). The species determination is performed through comparative analysis of the results with known sequences of individual *Fusarium* species from the GeneBank database.

Molecular identification of isolates shows statistically significant differences in the general species profile of the *Fusarium* genus. In general, *F. verticillioides*, whose secondary metabolites are fumonisins (FB1, FB2, FB3), has been

the dominant species in the material collected over the last 3 years. In contrast, *F. proliferatum*, the second most common species in 2015 and 2017, was isolated only occasionally in 2016. Similarly, *F. subglutinans* isolated in larger quantities in 2016, appeared incidentally or not at all in 2015 and 2017. Over the years, the constant presence of *F. temperatum* and *F. graminearum* draws the attention, as well. In addition, many isolates were identified as *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. in 2017, and *F. poae* – in 2015. The obtained results also indicate considerable diversification of the population of *Fusarium* strains depending on the morphology and earliness of the tested varieties at different locations in Poland, which may be dependent on the course of weather conditions (Frasiniński et al., 2019)

Factors promoting the appearance of infection

For their propagation and survival in the environment, individual *Fusarium* spp. species use hardened hyphae, micro and macrospores, chlamydospores, and in the case of sexual reproduction ascospores (Munkvold et al., 1997). Residues of infested maize plants left in the field can be a source of primary infection for many years, also affecting other plants susceptible to these fungi as e.g. wheat (mainly *F. graminearum*) (Munkvold, 2003a). Although *Fusarium* species are mainly associated with the rhizosphere, in favourable conditions fungal spores can be transmitted by the wind for many kilometers (Munkvold, 2003b; Keller et al., 2014). Furthermore, there are reports of inter-continental transmissibility, e.g. with the Sahara dust (Palmero et al., 2011). Moreover, *Fusarium* can grow in alternative hosts such as weeds, fescue, soya, or sunflower cultures. Spore transmission vectors include plant feeding insects, such as the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) and corn beetle (*Diabrotica virgifera*) (Lew et al., 1996; Sobek, Munkvold, 1999; Munkvold, 2003b).

An important and well-described way of corn kernel infection by fungi belonging to the group *Fusarium* spp., especially *F. graminearum*, is the infection through the pistil of female inflorescences (cobs). Spores sprouting on their surface, transferred via wind or water from a neighbouring plants or from male inflorescences (panicles), can easily reach the kernels. A characteristic sign of this type of infection is the lightening that runs radially from kernel top (Thompson, Raizada, 2018). Another important route of infection is mechanical damage caused by insects, such as the corn borer,

and this is particularly true for fungi from the *Lise-ola* section. Significant correlations have been proven between the occurrences of damage caused by the corn borer and disease intensity. This issue is discussed in many literature reports and own studies (Lew et al., 1991; Sobek, Munkvold, 1999; Munkvold, 2003b). In the case of *F. verticillioides*, the mechanism of systemic infection of the plant has also been ascertained; however, due to the short vegetation period and lower temperatures in Polish conditions, it requires experimental confirmation (Munkvold, Carlton, 1997; Murillo-Williams, Munkvold, 2008).

Fusarium ear rot and climate change

Observed climate changes and forecasts indicate changes in environmental conditions that result in a shift in range or the appearance of pathogens previously not observed in a given area. General forecasts for Poland can be found e.g. in the document "National Environmental Policy 2030" and are consistent with the current state of knowledge, presented in generally e.g. in Intergovernmental Panel on Climate Change reports (IPCC AR5). These reports show continuous increase of average air temperature with more frequent temperature extremes, uneven precipitation with extended periods without rain, growing water shortage areas, and decreasing ground water levels. Temperature changes favour corn crop culture (advantageous WCI), while increasing the risk resulting from water deficit and shifting corn borer occurrence range to the north of the country (Uchwała nr 67 Rady Ministrów z dnia 16 lipca 2019 r.; Kundzewicz et al., 2017; Popkiewicz, Sierpińska, 2019). What is more, it is expected that sowing and harvesting will speed up by 16-21 days, depending on the greenhouse gas emission scenario (Piniewski et al., 2017).

Key climatic factors determining *Fusarium* pathogens impact are, to a greater extent, temperature and humidity. Species differ in optimum conditions they require. It was found, in general, *F. graminearum* is favoured by high moisture levels around silking and maturation period (Reid et al. 1999). *F. verticillioides* have been associated with warm and dry weather after milk stage (Munkvold et al., 2019). A shifts in pathogen geographic distribution has been observed in recent years for *Fusarium* species – a higher incidence of more thermophilic *F. graminearum* and the retreat of *F. culmorum* which prefers lower temperatures have been confirmed in the United Kingdom and Central and Northern Europe (Moretti et al., 2019). Currently, at the Plant Breeding and Acclimatization

Institute - National Research Institute (IHAR-PIB), research is carried out on the impact of weather and climatic conditions on the occurrence of individual *Fusarium* species on maize in Poland. Some of the results were also presented during the Conference "Dni Młodego Naukowca 2019" in Radzików IHAR, 7-8.11.2019.

Corn protection methods

The level of mycotoxins content, is influenced by a number of factors and interactions between them, such as genotype resistance, environmental conditions and the agrotechnology used. Weather conditions and the timing of infestation are important factors, as well. If the infection occurs at the end of the season and favourable conditions for mycelium development have occurred, the content of toxins in the grain may be low despite obvious morphological symptoms. On the other hand, high mycotoxin content at small mycelium reach may be caused by a situation wherein the infection occurs at the early kernel growth stage and then the development of mycelium is inhibited by unfavourable conditions (Herrera et al., 2010). Contamination with these compounds is also a risk factor after harvesting, and its main component is grain moisture. The risks in this case are posed in particular by *F. verticillioides* and *F. proliferatum* fumonisins, which have the capacity to grow and produce toxins with less water availability than other species (e.g. ZEA, *F. graminearum* producing DON and ZEA). Therefore, the harvested grain should be brought to a safe moisture level of 14% (0.70 aw) as soon as possible (Marín et al., 2004; Magan, Aldred, 2007; Chulze, 2010).

The growing and using of resistant hybrid in cultivation is considered to be an economically reasonable and environmentally friendly method of protection against *Fusarium* diseases (Zijlstra et al., 2011; Czembor et al., 2018). There is no complete single gene resistance to infection. A number of studies have found different inheritance of resistance modes: additive, possibly non-additive effects, digenic (dominant) and polygenic patterns. Some genes have been found impacting silk resistance, but kernel resistance are under separate genetic control (Chungu et al., 1996). Studies reporting finding separate quantitative trait loci (QTL) for disease control in silk and kernel, but this approach is hard to incorporate into breeding programs. In this moment, breeders depend mainly on phenotyping system, as well investigating silk channel and kernel resistance, which helps to eliminate very susceptible genotypes

and grow moderately resistant hybrids. Breeders depends mainly on intraspecific genetic variability in search of more resistance levels, thus using more markers, improving phenotypic protocols and testing in multiple environments is way to go. (Robertson-Hoyt et al., 2007; Mestehazy et al., 2012, Lanubile et al., 2017, Munkvold et al. 2019). As the example, the different maize genotypes have different kernel morphologies, which affects susceptibility to *Fusarium*, in particular considering genotypes with grain of dent (*Zea mays* var. *indentata*) and flint (*Zea mays* var. *indurata*) types. The flint forms are characterised by hard outer endosperm layer, unlike the dent forms, where this layer does not cover the whole kernel and does not occur at its top (Hallauer, 2010, Wit et al., 2011). The level of resistance of individual varieties may be dependent on this (Czembor, Ochodzki, 2009). Silk way of *Fusarium* infection can be managed by selection for tighter husks, shorter silk emergence stage and faster silk abscission to reduce susceptibility period (Thomson et al., 2018).

Due to the route of infection, it is important to protect crops from insects, using both chemical and biological methods (the assessment of the efficiency of biological methods is carried out under Postępowanie Wieloletni 3.5 program) (Munkvold, 2003a; Folcher et al., 2009). Less intensity of cob fusariosis and less accumulation of toxins is observed in the *Bt* maize varieties (Ostry et al., 2010). The use of fungicides is problematic and their effectiveness is limited to seed treatment, in order to protect against seedling damping off. Some prevention efficacy of spraying during the dusting phase, and later at the milky-wax phase boundary has been proven, but the method can be hardly justified economically because of the difficulty in assessing the risk of disease occurrence or its intensification at the early phases (De Curtis et al., 2011).

Methods of protection against *Fusarium* diseases also include the use of proper agro-technical practices (Parsons, Munkvold, 2010). Balanced fertilization improves the resistance of the plants, especially during drought - positive effect of long-acting nitrogen fertilizers with the additive of potassium has been proven in the case of resistance to *Fusarium* ear rot. In addition, ensuring an optimal amount of nutrients during the vegetation period determines reduced accumulation of mycotoxins in the case of infestation. Furthermore, there is an evidence of less ear rot infections in stay-green varieties (Reid et al., 2001; Szulc et al., 2014; Bocianowski et al., 2016).

Post-harvest residues may be an important

source of *Fusarium* pathogens, therefore, the plant succession and cultivation method play a very important role. It is recommended to schedule crops in such a way that the pathogens do not have constant access to the host, and it is not advised to continuously cultivate maize in monoculture. The same negative effect will be observed for direct succession of host plants (maize and cereals) or too short cycle between them (Mabuza et al., 2018; Munkvold, 2003a).

The correct technique for harvest residues is to mulch them. The use of ploughing to cover them is subject to discussion. Although the results of studies show greater infestation and mycotoxin accumulation in cereals and maize with residues left on fields, it is indicated that correct plant succession is more important. The advantage of less invasive cultivation methods, including the improvement of water retention, microbiome and nutrient availability in soil is that they can have positive effect on plant resistance and yield under difficult conditions. They also contribute to reduced use of raw materials and emissions from cultivation, although in this case yield is the decisive factor (Reid et al., 2001; Ferrigo et al., 2016; Król et al., 2018).

Summary

The risk assessment of maize cultivation and the prevention of adverse effects associated with *Fusarium* fungi is a complex issue that requires further research. This group of pathogens covers a broad spectrum of species differing inter alia in environmental preferences, which is of particular importance in the context of the climate changes. The risk assessment is problematic because phenotypic symptoms do not always reflect the content of harmful compounds produced by *Fusarium*. Due to species and intra-species variability (chemotypes), there is a need to test yields for a number of compounds, which complicates, prolongs and increases the cost of the quality control process. Therefore, it is crucial to know the composition of the *Fusarium* spp. populations in the country and the factors affecting it. Resistance of plants to the pathogen is a complex factor under multi-genic control, which prolongs the process of creation of higher resistance varieties. Therefore, it is important to reduce the risk of the disease occurrence by using proper agrotechnology methods and controlling insect pests (mainly the corn borer), which are the vectors of the disease.

Literature

Arcella, D., Gergelova, P., Innocenti, M. L., Steinkell-

- ner, H. (2017). Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA J.* 15:. doi:10.2903/j.efsa.2017.4972.
- Berthiller, F., Dall'asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., et al. (2009). Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D-glucoside in wheat and maize. *Food Addit. Contam. Part A* 26: 507–511. doi:10.1080/02652030802555668.
- Berthiller F., Krska R., Domig K. J., Kneifel W., Juge N., Schuhmacher R., Adam G. (2011). Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicol Lett.* Oct 30;206(3):264-7. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.08.006.
- Bocianowski, J., Szulc, P., Tratwal, A., Nowosad, K., Piesik, D. (2016). The influence of potassium to mineral fertilizers on the maize health. *J. Integr. Agric.* 15: 1286–1292. doi:10.1016/S2095-3119(15)61194-7.
- Bottalico, A. (1998). Fusarium diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 85–103. <https://doi.org/10.4454/jpp.v80i2.807>
- Brandt, A. R. (2017). How Does Energy Resource Depletion Affect Prosperity? Mathematics of a Minimum Energy Return on Investment (EROI). *Biophys. Econ. Resour. Qual.* 2: 2. doi:10.1007/s41247-017-0019-y.
- Brera, C., De Santis, B., Debegnach, F., Miraglia, M. (2008). "Mycotoxins," in *Food contaminants and residue analysis. Comprehensive analytical chemistry. volume 51 Food Science Text Series.*, ed. Y. Piko (Oxford: Elsevier), 582.
- Chungu, C., Mather, D.E., Reid, L.M., Hamilton, R.I. (1996) Comparison of techniques for inoculating maize silk, kernel, and cob tissues with *Fusarium graminearum*. *Plant Dis* 80: 81-84
- Chulze, S. N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Addit. Contam. Part A* 27: 651–657. doi:10.1080/19440040903573032.
- Commission Recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products: <http://data.europa.eu/eli/reco/2013/165/oj> [Accessed: 12.11.2020]
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs: <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj> [Accessed: 12.11.2020]
- Czembor, E., Frasiński, S., Elżbieta, C., Seweryn, F. (2018). Polskie elitarne linie wsobne kukurydzy źródłem odporności na fuzariozę kolb (*Fusarium* spp.) i głównie guzowatą (*Ustilago maydis*). *Prog. Plant Prot.* 58: 22–27. doi:10.14199/ppp-2018-002.
- Czembor, E., Ochodzki, P. (2009). Resistance of flint and dent maize forms for colonization by *Fusarium* spp. and mycotoxins contamination. *Maydica* 54: 263–267.
- Czembor, E., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A. (2015). Effect of Environmental Factors on *Fusarium* Species and Associated Mycotoxins in Maize Grain Grown in Poland. *PLoS One* 10: e0133644. doi:10.1371/journal.pone.0133644.
- De Curtis, F., De Cicco, V., Haidukowski, M., Pascale, M., Somma, S., Moretti, A. (2011). Effects of agrochemical treatments on the occurrence of *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of maize in Southern Italy. *F. Crop. Res.* 123: 161–169. doi:10.1016/j.fcr.2011.05.012.
- FAOSTAT (2020). Statistical Division of the UN Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/faostat> [Accessed: 12.11.2020]
- Genebank NIH genetic sequence database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> [Accessed: 12.11.2020]
- Ferrigo, D., Raiola, A., Causin, R. (2016). Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules* 21: 627. doi:10.3390/molecules21050627.
- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., Gérault, F., Eychenne, N., Delos, M., et al. (2009). Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium mycoflora* in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Prot.* 28: 302–308. doi:10.1016/j.cropro.2008.11.007.
- Frasiński, S., Czembor E., Lalak-Kańczugowska, J. (2019) Czynniki środowiskowe modyfikujące porażenie odmian kukurydzy pastewnej grzybami z rodzaju *Fusarium* spp. Dni Młodego Naukowca 2019, Radzików IHAR, 7-8.11.2019
- Galaverna G., DallAsta C., Mangia M., Dossena A., Marchelli R. (2009): Masked Mycotoxins: an Emerging Issue for Food Safety. *Czech J. Food Sci.*, 27: S89-S92.
- Gromadzka, K., Błaszczyk, L., Chelkowski, J., Waśkiewicz, A. (2019). Occurrence of mycotoxigenic fusarium species and competitive fungi on preharvest maize ear rot in Poland. *Toxins (Basel)*. 11:. doi:10.3390/toxins11040224.
- GUS (2020) Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2019, Warszawa: 140, 141, 149.
- Herrera, M., Conchello, P., Juan, T., Estopañan, G., Herrera, A., Ariño, A. (2010). Fumonisin concentrations in maize as affected by physico-chemical, environmental and agronomical conditions. *Maydica* 55: 121–126.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2017) IPCC Fifth Assessment Report (AR5) Observed Climate Change Impacts Database, Version 2.01. Palisades, NY: NASA Socioeconomic Data and Applications Center (SEDAC). <https://doi.org/10.7927/H4FT8J0X> [Accessed: 12.11.2020]
- Keller, M. D., Bergstrom, G. C., Shields, E. J. (2014). The aerobiology of *Fusarium graminearum*. *Aerobiologia (Bologna)*. 30: 123–136. doi:10.1007/s10453-013-9321-3.
- Kowalska K., Habrowska-Górczyńska D. E., Piastowska-Ciesielska A. W. (2016) Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environ Toxicol Pharmacol.* Dec;48:141-149. doi: 10.1016/j.etap.2016.10.015. Epub

- 2016 Oct 18. PMID: 27771507.
- Król, A., Żyłowski, T., Kozyra, J., Księżak, J. (2018). Soil moisture under no-tillage and tillage systems in maize long-term experiment. *Polish J. Soil Sci.* 51: 103–117. doi:10.17951/pjss/2018.51.1.103.
- Kundzewicz, Z. W., Hov, Ø., Okruszko, T. (2017). Zmiany klimatu i ich wpływ na wybrane sektory w Polsce. ISRL PAN Poznań: CHASE-PL.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*, eds. J. F. Leslie and B. A. Summerell Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing doi:10.1002/9780470278376.
- Lew, H., Adler, A., Edinger, W. (1991). Moniliformin and the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*). *Mycotoxin Res.* 7: 71–76. doi:10.1007/BF03192189.
- Lew, H., Chelkowski, J., Pronczuk, P., Edinger, W. (1996). Occurrence of the mycotoxin moniliformin in maize (*Zea mays* L.) ears infected by *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson et al. *Food Addit. Contam.* 13: 321–324. doi:10.1080/02652039609374414.
- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., Bottalico, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 597–609. doi:10.1023/A:1020679029993.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 131–139. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034.
- Mabuza, L.M., Janse van Rensburg, B., Flett, B.C. et al. (2018) Accumulation of toxigenic *Fusarium* species and *Stenocarpella maydis* in maize grain grown under different cropping systems. *Eur J Plant Pathol* **152**, 297–308. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1475-y>
- Marasas, W. F. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl: 239–43. doi:10.2307/3435014.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A. J., Sanchis, V. (2004). Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *J. Food Prot.* 67: 1792–805. doi:10.4315/0362-028X-67.8.1792.
- Mesterházy, A. K., Lemmens, M., Reid, L. (2012). Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize – a review. *Plant Breeding.* 131. 1-19.
- Miedaner, T., Gwiazdowska, D., Waśkiewicz, A. (2017). Editorial: Management of *Fusarium* Species and their Mycotoxins in Cereal Food and Feed. *Front. Microbiol.* 8: 1–3. doi:10.3389/fmicb.2017.01543.
- Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A. H., Rothman, K. J., et al. (2006). Exposure to Fumonisins and the Occurrence of Neural Tube Defects along the Texas–Mexico Border. *Environ. Health Perspect.* 114: 237–241. doi:10.1289/ehp.8221.
- Moretti, A., Pascale, M., Logrieco, A. F. (2019). Mycotoxin in risks under a climate change scenario in Europe. *Trends Food Sci. Technol.* 84: 38–40. doi:10.1016/j.tifs.2018.03.008.
- Munkvold, G. P. (2003)a. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 99–116. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095510.
- Munkvold, G. P. (2003)b. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 705–713. doi:10.1023/A:1026078324268.
- Munkvold, G. P., Arias, S., Taschl, I., and Gruber-Dorninger, C. (2019). “Mycotoxins in corn: occurrence, impacts, and management,” in *Corn Chemistry and Technology*, ed. S. O. Serna-Saldivar (Cambridge: Woodhead Publishing), 235–287.
- Munkvold, G. P., Carlton, W. M. (1997). Influence of Inoculation Method on Systemic *Fusarium moniliforme* Infection of Maize Plants Grown from Infected Seeds. *Plant Dis.* 81: 211–216. doi:10.1094/PDIS.1997.81.2.211.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., Carlton, W. M. (1997). Importance of Different Pathways for Maize Kernel Infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87: 209–217. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.2.209.
- Murillo-Williams, A., Munkvold, G. P. (2008). Systemic Infection by *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Temperature Regimes. *Plant Dis.* 92: 1695–1700. doi:10.1094/PDIS-92-12-1695.
- Murphy, D. J., Hall, C. A. S., Powers, B. (2011). New perspectives on the energy return on (energy) investment (EROI) of corn ethanol. *Environ. Dev. Sustain.* 13: 179–202. doi:10.1007/s10668-010-9255-7.
- Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. (2004) A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *Eur J Plant Pathol*: 110: 495–502.
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res.* 33: 65–73. doi:10.1007/s12550-016-0265-7.
- Ostry, V., Ovesna, J., Skarkova, J., Pouchova, V., Ruprich, J. (2010). A review on comparative data concerning *Fusarium* mycotoxins in Bt maize and non-Bt isogenic maize. *Mycotoxin Res.* 26: 141–145. doi:10.1007/s12550-010-0056-5.
- Palmero, D., Rodríguez, J. M., De Cara, M., Camacho, F., Iglesias, C., Tello, J. C. (2011). Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from atmospheric dust and rainfall dust. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 13–20. doi:10.1007/s10295-010-0831-5.
- Panasiuk, L., Jedziniak, P., Pietruszka, K., Piatkowska, M., Bocian, L. (2019). Frequency and levels of regulated and emerging mycotoxins in silage in Poland. *Mycotoxin Res.* 35: 17–25. doi:10.1007/s12550-018-0327-0.
- Parsons, M. W., Munkvold, G. P. (2010). Associations of plant-

- ing date, drought stress, and insects with *Fusarium* ear rot and fumonisin B1 contamination in California maize. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 27: 591–607. doi:10.1080/19440040903456337.
- Pasquali, M., Beyer, M., Logrieco, A., Audenaert, K., Balmas, V., Basler, R., et al. (2016). A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Front. Microbiol.* 7: doi:10.3389/fmicb.2016.00406.
- Piniewski, M., Szczęśniak, M., Marcinkowski, P., O’Keeffe, J., Okruszko, T., Nieróbca, A., et al. (2017). “Projekcje wpływu zmian klimatu na rośliny jare do roku 2050 w oparciu o symulacje modelu,” in *Zmiany klimatu i ich wpływ na wybrane sektory w Polsce*, eds. Z. Kundzewicz, Ø. Hov, and T. Okruszko (Poznań: ISRL PAN Poznań), 182–198.
- Popkiewicz, M., Sierpińska, A. (2019). Konsekwencje zmiany klimatu dla Polski wg Ministerstwa Środowiska. Available at: <https://naukaoklimacie.pl/aktualnosci/konsekwencje-zmiany-klimatu-dla-polski-wg-ministerstwa-srodowiska-311> [Accessed: 15.01.2020].
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312: 105–112. doi:10.1111/nyas.12396.
- Reid, L., Nicol, R., Ouellet, T., Savard, M., Miller, J., Young, J., Stewart, D., Schaafsma, A. (1999) Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 89 (11), 1028–1037.
- Reid, L. M., Zhu, X., Ma, B. L. (2001). Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to gibberella (*Fusarium graminearum*) ear rot. *Plant Soil* 237: 1–14. doi:10.1023/A:1013311703454.
- Scauflaire, J., Gourgue, M., Munaut, F. (2011) *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 103: 586–597. PMID:21186324
- Shier W.T., Shier A.C., Xie W., Mirocha C.J. (2001) Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol. Sep*;39(9): 1435-8. doi: 10.1016/s0041-0101(00)00259-2.
- Sobek, E. A., Munkvold, G. P. (1999). European Corn Borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) Larvae as Vectors of *Fusarium moniliforme*, Causing Kernel Rot and Symptomless Infection of Maize Kernels. *J. Econ. Entomol.* 92: 503–509. doi:10.1093/jee/92.3.503.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* 3: 94–99. doi:10.2478/v10102-010-0019-x.
- Stępień, Ł., Gromadzka, K., Chelkowski, J. (2012) Polymorphism of mycotoxin biosynthetic genes among *Fusarium equiseti* isolates from Italy and Poland. *J Appl Genet*; 53: 227–236. PMID:22354659
- Stępień, Ł., Gromadzka, K., Chelkowski, J., Basińska-Barczak, A., Lalak-Kańczugowska, J. (2019). Diversity and mycotoxin production by *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* as causal agents of pre-harvest *Fusarium* maize ear rot in Poland. *J. Appl. Genet.* 60: 113–121. doi:10.1007/s13353-018-0478-x.
- Szulc, P., Rybus-Zajac, M., Jagla, M. (2014). Influence of nitrogen dose, type of nitrogen fertilizer and method of its application on plant health of maize hybrids (*Zea mays* L.). *Electron. J. Polish Agric. Univ. Ser. Agron.* 17
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. (2002) Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinform.* 00: 2.3.1–2.3.2
- Thompson, M., Raizada, M. (2018). Fungal Pathogens of Maize Gaining Free Passage Along the Silk Road. *Pathogens* 7: 81. doi:10.3390/pathogens7040081.
- Uchwała nr 67 Rady Ministrów z dnia 16 lipca 2019 r. w sprawie przyjęcia „Polityki ekologicznej państwa 2030 – strategii rozwoju w obszarze środowiska i gospodarki wodnej”. (2019) *Monitor Polski* 2019: poz 794. <http://www.monitorpolski.gov.pl/mp/2019/794/1> [Accessed: 16.01.2020].
- Wit, M., Warzecha, R., Mirzwa-Mróz, E., Jabońska, E., Ochodzki, P., Waśkiewicz, A., et al. (2011). Susceptibility of flint and dent maize ears to *Fusarium* species. *Phytopathologia*; 35–45.
- Zijlstra, C., Lund, I., Justesen, A. F., Nicolaisen, M., Jensen, P. K., Bianciotto, V., et al. (2011). Combining novel monitoring tools and precision application technologies for integrated high-tech crop protection in the future (a discussion document). *Pest Manag. Sci.* 67: 616–625. doi:10.1002/ps.2134.

Sponsorzy Dni Młodego Naukowca:



SPIS TREŚCI

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Dni Młodego Naukowca w 2019 roku w IHAR — PIB w Radzikowie | 3 |
| Grzegorz Kloc, Denise F. Dostatny | 5 |
| Przydatność dla hodowli miejscowych populacji owsa siewnego o wysokim zróżnicowaniu cech fenotypowych The importance of local oat populations with a wide variety of phenotypic traits in relation to breeding process | |
| Jakub Walczewski | 9 |
| 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 | |
| Sylwia Włodarczyk | 15 |
| System BER w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych u roślin System BER in the repair of oxidative damage in plants | |
| Marta Puchta | 21 |
| miRNA zaangażowane w proces starzenia i kiełkowania nasion miRNAs involved in the seed ageing and germination process | |
| Paulina Bolc | 27 |
| Charakterystyka wybranych markerów molekularnych Characteristic of selected molecular markers | |
| Paulina Bolc | 27 |
| Charakterystyka wybranych markerów molekularnych Characteristic of selected molecular markers | |
| Małgorzata Łabańska, Włodzimierz Przewodowski | 33 |
| Biosensory – nowoczesne narzędzia analityczne detekcji patogenów roślinnych Biosensors – novel analytical tools for the plant pathogen detection | |
| Seweryn Frasiński, Elżbieta Czembor, Justyna Lalak-Kańczugowska | 43 |
| The impact of fusarium ear rot in Poland and methods to reduce losses caused by the disease Znaczenie fuzariozy kolb kukurydzy w Polsce i metody ograniczenia strat powodowanych przez tą chorobę | |