

Roślinne związki bioaktywne indukują odpowiedź na stres u patogenicznego grzyba *Fusarium proliferatum*

Zasadniczym naukowym celem projektu jest identyfikacja bioaktywnych związków roślinnych obecnych w ekstraktach przygotowanych z tkanek potencjalnych gospodarzy dla patogenicznego grzyba *Fusarium proliferatum*, które mogą być związane z wywołaniem jego reakcji na stres.

Gatunki *Fusarium* są jednymi z najbardziej pospolitych patogenów grzybowych roślin. Są one zdolne infekować wiele gatunków roślin uprawnych, powodując obniżenie jakością i ilości plonu. Praktycznie wszystkie gatunki *Fusarium* syntetyzują toksyczne metabolity drugorzędowe, znane jako mykotoksyny, albo fuzariotoksyny. Trzy grupy tych związków zaliczane są do najbardziej szkodliwych spośród wszystkich zanieczyszczających ziarna zbóż: deoksynivalenol, zearalenon i fumonizyny. Fumonizyny z grupy B są najwydajniej syntetyzowanymi mykotoksynami *Fusarium proliferatum*, zarówno *in vitro* jak i w tkankach zainfekowanych roślin, którymi mogą być: kukurydza, ryż, pszenica, groch, soja, ananas, daktylowiec, szparag, czosnek, cebula, figowiec, bananowiec i wiele innych. Ponieważ lista gatunków potencjalnych gospodarzy *F. proliferatum* jest znacznie dłuższa niż dla innych patogenów z rodzaju *Fusarium*, uzasadnionym wydaje się przypuszczenie, że gatunek ten uzyskał w toku drogi ewolucji przystosowania dające mu konkretną przewagę w konkurencji o nowe nisze ekologiczne. Wpływ pić ekstraktów przygotowanych z gatunków roślin uznawanych za najczystszych gospodarzy (kukurydza, szparag, ananas, czosnek i groch) na metabolizm *F. proliferatum*, poddany został szczegółowym badaniom.

Poszczególne ekstrakty wywoływały spójny i powtarzalny wzór zmian w ilości uzyskanej biomasy grzybowej, a także wytworzonych przez badane szczepy fumonizyn. Stężenie fumonizyn w pożywce płynnej, w której hodowano grzyby zwiększało się gwałtownie, krótko po dodaniu ekstraktów, po czym powoli spadało. Może to sugerować, że dodanie ekstraktów do hodowli było przez patogen odbierane jako czynnik stresowy. Tak hipotezę zdają się potwierdzać wyniki analiz proteomicznych dwóch zbadanych szczepów, które wykazały obecność indukowanych białek związanych z odpowiedzią na stres wywołany poprzez dodanie do hodowli ekstraktów gospodarzy. W ciągu ostatnich kilkunastu miesięcy ukazało się kilka doniesień, dowodzących istnienia podobnych do roślinnych mechanizmów przekazywania sygnałów u grzybów *Fusarium*. Wydaje się więc niemal pewnym, że badania nad odpowiedzią tych patogenów na różne stresse (np. zasolenie, ciepło, zimno, temperatura i intensywność światła, czy stres wodny) będą w najbliższym czasie w centrum zainteresowania badaczy na całym świecie. Dlatego też zdecydowali my się prześledzić interakcje molekularne pomiędzy organizmem patogenicznym (*Fusarium proliferatum*) i jego gospodarzem, reprezentowanym przez związki roślinne obecne w każdym z pić ekstraktów dodawanych do hodowli płynnych grzyba.

Według naszej wiedzy, są to pierwsze tego typu badania, zakładające poszukiwanie roślinnych związków wywołujących stres u patogenów grzybowych. Bardzo intensywnie za to stosowano odwrotne podejście, zakładające analizy molekularnych podstaw oraz szlaków biochemicznych odpowiedzialnych za odpowiedź na stres wielu gatunków roślin, zarówno modelowych, jak i uprawnych. W niniejszym projekcie zamierzamy skupić się na identyfikacji roślinnych metabolitów obecnych w pić ekstraktach roślinnych, wywołujących reakcję na stres u dwóch szczepów *Fusarium proliferatum* różniących się gatunkiem rośliny, z której zostały wyizolowane. Analizowane będą tylko metabolity rozpuszczalne w wodzie, ponieważ w poprzednich badaniach wykazano ich zdolność do wywoływania specyficznych efektów w płynnych hodowlach szczepów tego gatunku. Dodatkowo, zbadana zostanie reakcja tych samych szczepów na stres temperaturowy (35°C i 10°C) oraz zasolenia (NaCl) w celu sprawdzenia, czy podobne mechanizmy są indukowane przez różne rodzaje czynników stresowych. Dzięki wykazaniu specyficznego działania poszczególnych zidentyfikowanych związków roślinnych obecnych w ekstraktach, będzie możliwe wskazanie konkretnych szlaków metabolicznych zaangażowanych w interakcję pomiędzy rośliną a patogenem.

Dla niektórych metabolitów roślinnych przypisano już funkcje w modyfikowaniu metabolizmu grzybowego. Najlepszym przykładem jest amylopektyna, będąca składnikiem skrobi, stymulująca biosyntezę fumonizyn. Ponadto, scharakteryzowano wpływ różnych cukrów jako źródła energii oraz niektórych aminokwasów na metabolizm patogena. Niemniej jednak, wiele związków pochodzenia roślinnego, rozpoznawanych przez *F. proliferatum* jako molekularne "przełączniki" specyficznych grzybowych szlaków metabolicznych, pozostaje wciąż nieodkrytych.

Eksperymenty przewidziane do realizacji w niniejszym projekcie, mogą dostarczyć dowodów na specyficzne efekty działania pewnych związków bioaktywnych, obecnych w analizowanych frakcjach ekstraktów przygotowanych z roślin gospodarzy, zdolnych do wywołania reakcji na stres u szczepów *F. proliferatum*. Frakcje, które będą aktywnie indukowały reakcję patogena na stres, będą poddane analizom spektrometrii mas w celu zidentyfikowania związków w nich obecnych. W czasie realizacji poprzedniego projektu, wykorzystując analizy MS peptydów wybranych na podstawie różnicowej analizy eli uzyskanych po elektroforezie dwukierunkowej, udało nam się zidentyfikować przynajmniej 100 białek, indukowanych poprzez dodanie jednego z pić ekstraktów z rośliny gospodarza. Przynajmniej kilka spośród nich powiązanych jest z odpowiedzią na stres, natomiast żadnego z nich nie badano jeszcze z wykorzystaniem stresu aplikowanego grzybom patogenicznemu, a takie podejście stwarza unikalną możliwość przypisania nowych ról i funkcji wcześnie poznany białkom i enzymom: białkom szoku cieplnego, dysmutazom, kinazom, syntazom aminokwasów, metylotransferazom i innym. Poziomy transkryptom genów kodujących poszczególne białka będą badane w trakcie hodowli patogenów po działaniu czynnika stresującego. Dodatkowo, zbadany zostanie poziom ekspresji kluczowego genu odpowiedzialnego za biosyntezę fumonizyn – FUM1, ponieważ już we wcześniejszych badaniach wykazano wyrażenie jego ekspresji po dodaniu niektórych ekstraktów.

Reakcje roślin na różne stresse biotyczne i abiotyczne, jak również mechanizmy za nie odpowiedzialne, studiowano od wielu lat z wykorzystaniem gatunków modelowych (*Arabidopsis*) i uprawnych, by wymienić tylko rzepak, pszenicę, kukurydzę i pomidor. Bada się te metabolity grzybowe, wywołujące u roślin odpowiedź na stres, jak również szlaki biochemiczne, związane z ich biosyntezą. Z drugiej strony, stosunkowo niewiele wiadomo o molekularnej komunikacji pomiędzy rośliną i patogenem. Niedawno odkryto powiązanie niektórych kinaz ze szlakiem transdukcji sygnałów i szeroko rozumianą odpowiedzią na stres u

*Fusarium graminearum*. Ten patogen jest modelowym gatunkiem *Fusarium*, dlatego prawdopodobnie wkrótce pojawi się publikacja wyników badań obejmujących inne gatunki, o znanych sekwencjach genomów i często wykorzystywanych w badaniach: *F. oxysporum*, *F. verticillioides* oraz *F. fujikuroi*. Jak dotąd nie opublikowano jednak wyników dotyczących stresów wywołanych związkami rolinnymi, lub opartych na *F. proliferatum* jako modelu. W naszym odczuciu, te dwa aspekty to zalety czyniące proponowany projekt nowatorskim i wyjątkowym.