

Wgląd w mechanizm toksycznego oddziaływania miedzi na *Phytophthora infestans* - sprawcę zarazy ziemniaka

ZNACZENIE PROJEKTU I CEL BADAŃ

Powszechnie wiadomo, że każdy żywy organizm narażony jest na wiele niekorzystnych czynników środowiskowych, w tym na metale ciężkie (HM), które mogą być toksyczne nawet w niskich stężeniach. Metale ciężkie można podzielić na dwie grupy tj. pierwiastki niezbędne i zbędne. Jednym z metali ciężkich zaliczanych do gupy pierwiastków niezbędnych jest miedź (Cu), będąca ważnym kofaktorem białek, które pełnią podstawowe funkcje biologiczne. Tymczasem, źródła antropogeniczne, w tym stosowanie w skali globalnej chemicznych biocydów przyczyniły się do rozprzestrzenienia metali ciężkich tj. Cu w środowisku. Od momentu pierwszej rejestracji pestycydu zawierającego Cu w 1956r., nadal brak jest danych eksperymentalnych dotyczących długotrwałego oddziaływania Cu na ważne gospodarczo patogeny roślin. Co istotne, nagromadzenie metali ciężkich w glebie, a także w roślinach-gospodarzach wzrastających na zanieczyszczonych glebach może wpłynąć na tempo ewolucji patogenów, ponieważ aby przetrwać muszą się one dynamicznie przystosować do nowego, zanieczyszczonego (mikro)środowiska. Co więcej, najnowsze dane literaturowe wskazują, że w wyniku ekspozycji patogenu na metale ciężkie można zaobserwować ich zwiększoną patogeniczność. W świetle powyższego priorytetem powinny być badania nad rozpoznaniem molekularnego mechanizmu toksyczności HM, w tym jonów Cu na fitopatogeny. W związku z powyższym, głównym celem niniejszego projektu jest określenie mechanizmu toksyczności Cu na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, jednego z najgroźniejszych w skali globalnej patogenów roślin. Planowane badania będą skoncentrowane na rozpoznaniu zależnych od Cu kluczowych zmian na poziomie komórkowym i molekularnym, które mogą bezpośrednio odzwierciedlać toksyczność powszechnego stosowania fungicydów zawierających Cu, a także potencjał adaptacyjny patogenu do środowiska zanieczyszczonego miedzią.

OPIS BADAŃ

Proponowane badania będą prowadzone w oparciu o analizę porównawczą pomiędzy izolatami wirulentnym (*vr*) i awirulentnym (*avr*) *P. infestans* względem genotypu ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) posiadającego gen *R3a*. Patogen będzie wzrastał w warunkach *in vitro* w obecności dwóch stężeń Cu odzwierciedlających umiarkowany (5 mg/L) i subletalny (10 mg/L) stres metali ciężkich. W pierwszych etapach realizacji projektu planuje się wyjaśnić, czy i na ile Cu wpływa na integralność ścian i błon komórkowych *P. infestans*. Następnie zostanie scharakteryzowany komórkowy status nitro-oksydacyjny. Na tym etapie badań zostaną przeprowadzone analizy związane z określeniem poziomu generowanych reaktywnych form tlenu i azotu, a także sprawdzona zostanie aktywność wybranych elementów systemu antyoksydacyjnego m.in. dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i reduktazy S-nitrozoglutationu. Kolejny etap badań, będzie skoncentrowany na identyfikacji zależnych od Cu nitro-oksydacyjnych modyfikacji RNA i DNA w postaci 8-nitroguaniny, 8-hydroksyguanozyny i 8-hydroksydeoksyguanozyny. Ponadto, zostaną oznaczone powszechne markery oksydacyjnych uszkodzeń DNA w postaci miejsc apurynowych/apirymidynowych, a także podwójnych pęknięć nici DNA. W ostatnim etapie projektu planuje się ustalić, czy i w jakim stopniu obserwowane zmiany wywołane przez Cu na poziomie molekularnym wpływają na żywotność, rozwój, a także patogeniczność *P. infestans*.

SPODZIEWANE EFEKTY

Jak się spodziewamy, uzyskane wyniki zweryfikują postawioną w projekcie hipotezę roboczą, która zakłada, że ekspozycja *P. infestans* na Cu (i) skutkuje zaburzeniem równowagi nitro-oksydacyjnej, (ii) i prowadzi do modyfikacji RNA i DNA, czego efektem są: zmniejszona żywotność, zaburzenia rozwoju i zmiany w stopniu patogeniczności *P. infestans*.