

OCENA ZNACZENIA POLIMERÓW ŚCIANY KOMÓRKOWEJ W ODPOWIEDZI LNU NA FUZARIOZĘ

STRESZCZENIE

Len (*Linum usitatissimum*) od dawna ceniony jako źródło wartościowych surowców, dzięki jego wieloaspektowemu wykorzystaniu stał się obecnie rośliną bezodpadową. Odpady uzyskiwane po wyciśnięciu oleju z nasion (wytłoki lniane) oraz po wydzieleniu włókna ze słomy (paździerze) stanowią niedoceniony materiał zawierający ważne związki o charakterze antyoksydacyjnym, antybakteryjnym, przeciwgrzybiczym czy przeciwnowotworowym. Czynnikiem ograniczającym wzrost i rozwój lnu są warunki klimatyczne, jednak największą stratę w uprawie spowodowaną jest chorobami wywoływanymi przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Najgroźniejszym patogenem lnu jest *Fusarium oxysporum*, którego zakażenie prowadzi do fuzaryjnego wędnięcia lnu. Mniej specyficznym wobec lnu, lecz równie groźnym jest *Fusarium culmorum* wywołujący fuzaryjną zgniliznę podstawy pędu. Oba typy fuzariozy obniżają uzyskany plon oraz jakość otrzymanych surowców.

Ściana komórkowa stanowi pierwszą, zewnętrzną barierę roślin przed infekcjami patogennymi. Atak patogennych grzybów rozpoczyna się wydzielaniem przez nie enzymów degradujących ścianę komórkową gospodarza. Początkowo produkcja pektynaz prowadzi do degradacji pektyn, a przez to do rozluźnienia ściany komórkowej i odsłonięcia pozostałych polimerów, umożliwiając ich rozkład przez celulazy i hemicelulazy grzybowe. W wyniku działania poligalakturonaz wydzielanych przez patogeny uwalniane są oligogalakturoniany (OG), fragmenty pektyn, które pełnią rolę elicytorów i aktywują mechanizmy obronne roślin. OG poprzez szlak sygnałny prowadzą do indukcji transkrypcji genów związanych z patogenezą i innych genów odpowiedzi metabolicznej i systemicznej.

Głównym założeniem pracy było określenie roli polimerów ściany komórkowej w odpowiedzi lnu na infekcje patogennymi szczepami *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum*. W tym celu siewki lnu inkubowano z grzybami, zbierając tkankę roślinną w czasie postępującej infekcji (po 6, 12, 24, 36 i 48 godzinach). Następnie sprawdzono zmiany w poziomie ekspresji genów metabolizmu polimerów ściany komórkowej przez użycie reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Analizy te musiały zostać poprzedzone identyfikacją i weryfikacją sekwencji mRNA badanych genów w lnie. Ze względu na brak większości poszukiwanych sekwencji mRNA lnianych w bazie danych i brak sekwencji genomu lnianego w czasie wykonywanych analiz przeprowadzono izolację poszczególnych fragmentów cDNA używając zdegenerowanych starterów zaprojektowanych na najbardziej homologiczne fragmenty mRNA z innych roślin. Z powodzeniem wydzielono kilkadziesiąt częściowych sekwencji genów metabolizmu polimerów ściany komórkowej i genów PR, a następnie potwierdzono je po opublikowaniu sekwencji genomu lnianego. Szczególną uwagę poświęcono pektynom, stanowiącym pierwszy cel enzymów patogennych, a następnie pozostałym polimerom: celulozie, hemicelulozie i ligninom, aby dobrze poznać mechanizm obronny roślin. Ponadto zwrócono również uwagę na poliaminy, szczególnie te związane ze ścianą komórkową, ponieważ z danych literaturowych wiadomo o ich zaangażowaniu w odpowiedź roślin na stres biotyczny. W celu dokładnego określenia kolejnych etapów infekcji w lnie i porównania ich ze zmianami w polimerach ściany komórkowej przyjrano się genomowi związanym z patogenezą (β -1,3-glukanazie i chitynazie).

Analiza poziomów ekspresji genów metabolizmu polimerów ściany komórkowej w lnie infekowanym *F.oxysporum* i *F.culmorum* umożliwiła wyodrębnienie dwóch grup genów różnie odpowiadających na zakażenie. Pierwszą grupę stanowiły geny reagujące najmocniej, których poziomy ekspresji podwyższone zostały ponad 5-10-krotnie. Scharakteryzowano je jako geny odpowiedzi systemicznej, ponieważ pomimo wysokiego wzrostu ekspresji, geny te odpowiadały później (po 12 godzinie inkubacji z patogenami), a maksimum wzrostu ekspresji najczęściej przypadło na 48 godzinę. Po infekcji *F.culmorum* w lnie najwyższym poziomem ekspresji odznaczały się geny: syntezy lignin (amoniakolizaza fenyloalaniny; PAL, transferaza glukozowa; GT, dehydrogenaza alkoholu synapinowego; SAD, dehydrogenaza alkoholu hydroksycynamonowego; CAD i transferaza *p*-hydroksycynamoiloCoA: kwas szikimowy/chinonowy; HCT), syntezy poliamin (dekarboksylaza argininy; ADC i dekarboksylaza ornityny; ODC) oraz chitynaza. Podobne zmiany zauważono po zakażeniu lnu *F. oxysporum*, gdzie do genów pierwszej grupy zaliczono geny syntezy lignin (amoniakolizazę fenyloalaniny; PAL i transferazę glukozową; GT), syntezy poliamin (dekarboksylazę ornityny; ODC) oraz geny związane z patogenezą (β -1,3-glukanazę i chitynazę). Do drugiej grupy genów przyporządkowano geny słabiej indukowane. Uczestniczą one w odpowiedzi metabolicznej, a ich aktywacja związana jest z działaniem elicitorów (oligogalakuronianów) powstałych w wyniku trawienia ściany komórkowej przez enzymy grzybowe. Wśród tej grupy występują geny, których poziom ekspresji wzrósł (do 5 razy), został obniżony i geny o różnych, często niespecyficznych zmianach ekspresji. Pierwszą podgrupę, wspólną, po infekcji dwoma grzybami, stanowią pozostałe geny syntezy lignin, gen β -glikozydazy (GLS) i β -1,3-glukanazy 2. Dodatkowo po zakażeniu *F.culmorum* wzrosła ekspresja genu celulozy 2 i β -1,3-glukanazy 1. W drugiej podgrupie genów o obniżonych poziomach ekspresji znalazły się geny metabolizmu pektyn (transferaza galakturonianu 1; GAUT1, transferaza galakturonianu 7; GAUT7, transferaza ksylozy ramnogalakuronianu II; RGXT, metylotransferaza pektynowa; PMT, metyloesteraza pektynowa 3; PME3, poligalakuronaza; PG, liaza pektynowa I; PaL), metabolizmu hemicelulozy (4- β -mannozylotransferaza glukomannanu; GMT, galaktozylotransferaza galaktomannanu; GGT, ksylozylotransferaza ksyloglukanu; XXT, endo-1,4- β -ksylanaza; XYN, 1,4- β -ksylozydazy; XYLb, α -galaktozydaza; GS) oraz syntezy celulozy (trzy izoformy syntazy celulozy: CLS1, CSL2 i CSL4). Natomiast do genów ostatniej podgrupy, wykazujących różne zmiany w ekspresji, należą pozostałe geny metabolizmu pektyn, hemicelulozy i celulozy. Przypuszcza się, że geny słabo odpowiadające na infekcje patogenne stanowią jedynie szum transkrypcyjny i nie biorą udziału w mechanizmach obronnych roślin.

Kolejnym etapem było sprawdzenie wpływu zmian ekspresji genów metabolizmu polimerów na ich zawartość. Za pomocą metod spektrofotometrycznych oznaczono ilości celulozy, hemicelulozy, pektyn i lignin, a za pomocą analizy UPLC ilość poliamin. Uzyskane wyniki pokazały, że zawartości poszczególnych polimerów nie zmieniały się znacząco, a jedyne różnice widoczne były dopiero po 48 godzinach inkubacji lnu z patogenami. Zauważono jednak zmiany w rearanżacji ściany komórkowej wynikające z ilości poszczególnych frakcji pektynowych i hemicelulozowych. Wyniki te potwierdzono analizą spektroskopii w podczerwieni, która dodatkowo wskazała na różnice w strukturze celulozy. Największe zmiany zaobserwowano w zawartości poliamin związanych ze ścianą komórkową. W szczególności ilość spermidyny wzrosła znacząco. Wyniki z tej części pracy wskazują na udział polimerów ściany komórkowej w odpowiedzi lnu na fuzariozę, wyrażający się zmianami w ekspresji genów.

Kolejnym etapem pracy była weryfikacja znaczenia polimerów ściany komórkowej w odpowiedzi lnu na infekcje patogenne przez analizę transgenicznego lnu z nadekspresją β -1,3-glukanazy (len typu B). Ze względu na silną odpowiedź genów związanych z patogenezą po

zakażeniu lnu fuzariozą postanowiono sprawdzić czy zwiększenie aktywności genów PR (w tym przypadku β -1,3-glukanazy i chitynazy) bezpośrednio wpływa na aktywację genów metabolizmu polimerów ściany komórkowej lub czy istnieją inne drogi, niezależne od genów PR, prowadzące do takich zmian. W tym celu oznaczono ekspresje genów metabolizmu polimerów oraz zawartość metabolitów w transgenicznym lnie typu B (w liniach B10, B11 i B14). Największymi zmianami w poziomach ekspresji charakteryzowała się linia B14, w której wykazano indukcję genów zarówno odpowiedzi systemicznej, jak i metabolicznej.

Pomimo mniejszych zmian w ekspresji genów w lnie typu B zauważono pewne podobieństwa, ale również i różnice w stosunku do lnu infekowanego *F.oxysporum* i *F.culmorum*. Analiza zawartości polimerów wykazała zmiany w rearanżacji ściany komórkowej przy prawie niezmiennych ich ilościach. Dodatkowo len typu B charakteryzował się wzrostem zawartości poliamin związanych ze ścianą komórkową, pomimo braku wyraźnych różnic w całkowitej ich ilości. Uzyskane w tej części wyniki pokazują, że wzrost ekspresji β -1,3-glukanazy wpływa na aktywację ekspresji genów metabolizmu polimerów ściany komórkowej. Jednakże ze względu na różnice w poziomach ekspresji analizowanych genów i innej rearanżacji polimerów w lnie infekowanym patogennymi szczepami *Fusarium* i w transgenicznym lnie z nadekspresją β -1,3-glukanazy wnioskuje się, że podczas infekcji patogennej geny metabolizmu polimerów ściany komórkowej aktywowane są nie tylko na drodze zależnej od genów PR, ale również przez inne szlaki sygnałowe.

Ostatnia część pracy miała charakter częściowo aplikacyjny. Jej celem była ocena jakości włókna otrzymanego z transgenicznego lnu typu B. Do analiz wybrano linię B14, ponieważ w uprawie polowej linia ta charakteryzowała się najlepszą produktywnością ze względu na największą produkcję nasion w porównaniu z liniami B10 i B11. Len z nadekspresją ziemniaczanej β -1,3-glukanazy cechował się wzrostem ekspresji endogennej β -1,3-glukanazy i chitynazy oraz wzrostem odporności na *Fusarium culmorum* i *Fusarium oxysporum*. Analizy mechaniczne i biochemiczne włókna lnianego miały odpowiedzieć na pytanie czy zmiany wywołane wprowadzeniem egzogennej genu β -1,3-glukanazy do genomu lnu wpłynęły na plonowanie i spowodowały zmiany we włóknach i paździerzach, odpadach uzyskanych po wydzieleniu włókna ze słomy lnianej. Czwarte pokolenie transgenicznego lnu typu B uprawiano na poletku doświadczalnym. Po osiągnięciu dojrzałości rośliny zostały zebrane, oddzielono nasiona od słomy, którą następnie poddano procesowi roszenia. Kolejnym etapem było wydzielenie włókna ze słomy lnianej i przeprowadzenie eksperymentów określających właściwości mechaniczne. Ponadto w uzyskanym z lnu linii B14 włóknie i paździerzach sprawdzono dokładny skład ściany komórkowej obejmujący analizę poszczególnych polimerów: celulozy, hemicelulozy, pektyn, lignin i kalozy oraz przyłączonych do nich związków fenolowych. Ze względu na możliwości zastosowania surowców lnianych, jako źródła związków o charakterze przeciwutleniającym, oszacowano potencjał antyoksydacyjny ekstraktów izolowanych z całości surowców i dodatkowo z frakcji ściany komórkowej w celu określenia konkretnego źródła tych składników.

Włókna lniane uzyskane z lnu nadekspresjonującego β -1,3-glukanazę charakteryzowały się zmienionym składem polimerów ściany komórkowej. Zawartość kolejnych polisacharydów: celulozy, hemicelulozy i pektyn była wyższa, podczas gdy poziom lignin został obniżony. Ponadto zaobserwowano spadek zawartości kalozy, substratu dla β -1,3-glukanazy, co mogłoby sugerować, że uwalniane z kalozy cząsteczki glukozy są zużywane do produkcji innych polisacharydów. Wzrost zawartości monosacharydów frakcji hemicelulozy przełożył się na akumulację związków fenolowych w tej frakcji, a następnie na wzrost potencjału antyoksydacyjnego. Podsumowując, włókna uzyskane z transgenicznego lnu B14 charakteryzowały się wyższym potencjałem antyoksydacyjnym w porównaniu z włóknami kontrolnymi, wskazując na możliwości ich wykorzystania jako surowca

biomedycznego. Ponadto po raz pierwszy pokazano, że β -1,3-glukanaza wpływa na metabolizm polimerów ściany komórkowej, a jej nadprodukcja w lnie prowadzi do uzyskania ulepszonych włókna.

Analiza paździerzy lnianych ujawniła zmieniony skład polimerów ściany komórkowej: zwiększoną zawartość pektyn, hemicelulozy i lignin oraz obniżony poziom kalozy. Ponadto odpady uzyskane z transgenicznego lnu B14 charakteryzowały się zmienioną strukturą polimerów ściany komórkowej oraz obniżonym poziomem związków fenolowych związanych ze ścianą, a przez to niższym potencjałem antyoksydacyjnym frakcji pektynowych i hemicelulozowych. Jednakże pomimo obniżonego w porównaniu z kontrolą potencjału antyoksydacyjnego paździerze, jako odpady wcześniej niewykorzystywane stanowią cenne źródło związków fenolowych, których jest znacznie więcej niż we włóknach lnianych.

Podsumowując, z transgenicznego lnu linii B14 uzyskano lepszej jakości włókno i paździerze o nieznacznie gorszych parametrach biochemicznych, jednak nadal będące bogatym źródłem związków przeciwutleniających.