

STRESZCZENIE

Len transgeniczny jako źródło udoskonalonego włókna. Manipulacja metabolizmem polimerów ściany komórkowej włókna lnianego.

Len (*Linum usitatissimum* L.) jest najczęściej uprawianą w naszej strefie klimatycznej rośliną włóknistą. Włókno lniane cechuje się wysoką chłonnością wody, wytrzymałością mechaniczną oraz posiada w swym składzie związki o charakterze przeciwutleniającym. Jest zbudowane z 4 głównych polimerów, które stanowią ok. 90% jego składu: celulozy, hemiceluloz, pektyn, lignin oraz z szeregu metabolitów drugorzędowych, białek, wosków i związków nieorganicznych stanowiących pozostałe 10%. Tym, co decyduje o właściwościach lnu jest właśnie jego kompozycja. Ligniny z jednej strony zapewniają ścianie komórkowej wytrzymałość i hydrofobowość oraz stanowią mechaniczną barierę dla patogenów, ale z drugiej strony powodują znaczną sztywność włókna oraz komplikują jego zastosowanie jako surowca w różnych gałęziach przemysłu. Pektyny m. in. wpływają na adhezję komórek czy biorą udział w odpowiedzi roślin na infekcje. W procesie pozyskiwania włókna ze słomy lnianej (roszenie) pektyny są degradowane przez mikroorganizmy, co determinuje czas rosznienia i jakość włókna. Trudności związane z uprawą i pozyskaniem włókna (podatność na infekcje, ryzyko utraty plonu czy pogorszenie jakości włókna, gdy rosznienie jest prowadzone niewłaściwie) i niektóre jego cechy (sztywność, lignifikacja włókna) powodują ciągły spadek zainteresowania uprawą lnu.

Realizując poszukiwania nowych typów lnu o ulepszonych właściwościach wytworzono rośliny o zmniejszonej zawartości lignin lub pektyn. Zamierzonym celem wszystkich modyfikacji była poprawa jakości włókna lnianego i dywersyfikacja jego zastosowania poprzez manipulację ilością/kompozycją polimerów ściany komórkowej. Szereg danych literaturowych oraz wstępne badania laboratoryjne potwierdziły, że dehydrogenaza alkoholu cynamonowego (CAD) jest kluczowym enzymem szlaku biosyntezy lignin, a obniżenie jej aktywności jest dobrym narzędziem do obniżenia poziomu lignin w ścianie komórkowej. Otrzymane transgeniczne rośliny lnu z represją genu *CAD* charakteryzował nie tylko obniżony poziom lignin, ale również zmieniony poziom polimerów ściany komórkowej, a w konsekwencji zmienione właściwości mechaniczne. Natomiast polisacharydowy skład lnu zmieniono dwiema odrębnymi modyfikacjami opartymi o tę samą zasadę – nadekspresję egzogenego enzymu grzybowego degradującego pektyny. Metodami biologii molekularnej do genomu lnu wprowadzono cDNA kodujące poligalakturonazę I (PGI) z *Aspergillus aculeatus* lub cDNA kodujące liazę ramnogalaturonową A (RHA) z *A. aculeatus*. Dostępne dane wskazują, że enzymy te efektywnie degradują pektyny i są właściwymi narzędziami do modyfikacji ilości tego polimeru. Otrzymane rośliny charakteryzowały się redukcją zawartości pektyn oraz skróconym czasem rosznienia w testach laboratoryjnych. Uzyskane dane pokazały skuteczność modyfikacji, co powinno się przełożyć na poprawę właściwości włókna lnianego. W związku z tym, głównym zamierzeniem tej pracy była ocena znaczenia wprowadzonych modyfikacji, a w konsekwencji obniżenia poziomu pektyn bądź lignin na skład i strukturę ściany komórkowej włókna lnianego. Ponadto badano, jak wprowadzona modyfikacja przekłada się na ekspresję genów związanych z metabolizmem poszczególnych polimerów.

Pierwszym etapem pracy była analiza ekspresji wybranych genów metabolizmu ściany komórkowej oraz genów związanych z patogenezą w roślinach z kultur *in vitro*. W szczególności badano wybrane geny kodujące syntezę i/lub degradację oraz rearanżację: celulozy, lignin, pektyn i hemiceluloz; geny

związane z patogenezą oraz kinazy regulujące syntezę poszczególnych polimerów w ścianie komórkowej. W ramach tego etapu zidentyfikowano w lnie gen białka SAD, a jego analiza filogenetyczna wykazała przynależność do klasy II rodziny białek o charakterze roślinnych dehydrogenaz alkoholowych. Ponadto, wskazano, że w lnie SAD nie jest niezbędny do utrzymania prawidłowego poziomu lignin. Dodatkowo zidentyfikowano i wyodrębniono z genomu lnu geny: biosyntezy lignin (*HCT*, *C3H*, *C4H*), metabolizmu sacharozy (*SUS*, *SPS*, *SPP*) oraz regulatorów syntezy ściany komórkowej (*WAK*, *THE*, *FEI*, *PERK1*, *PERK2*, *COBRA1*, *COBRA2*).

Zaobserwowano, że redukcja ekspresji genu *CAD* wpłynęła na zmianę ekspresji szeregu genów zaangażowanych w metabolizm polimerów ściany komórkowej. Przede wszystkim jednak nie wykazano obniżenia ekspresji innych genów szlaku biosyntezy lignin, ani kompensacji aktywności *CAD* przez zidentyfikowaną w lnie dehydrogenazę alkoholu sinapylowego (*SAD*). Ponadto zaobserwowano zróżnicowane zmiany w ekspresji genów związanych z demetylacją pektyn. Zauważono również wzrost poziomu mRNA genów odpowiedzialnych za degradację pektyn i hemiceluloz (*PL*, *PtL*, *XYLa*, *GS*, *MS*, *GLS*). Z kolei dla genu β -1,3-gukanazy obserwowano obniżenie ekspresji. Choć molekularny mechanizm łączący obniżenie ilości lignin i zmiany ekspresji genów związanych z patogenezą pozostaje niejasny, wskazano na pektynometylsterazy, jako możliwe połączenie.

Wprowadzenie do lnu egzogennej poligalakturonazy spowodowało wzrost ekspresji endogennej poligalakturonazy oraz liazy pektynowej. Obserwowane zmiany w ekspresji genów syntezy i degradacji pektyn nieznacznie się kompensują, co sugeruje, że całkowity spadek stężenia pektyn jest skutkiem wprowadzonej modyfikacji. Spośród pozostałych badanych genów uwagę zwraca wzrost ekspresji *pektynometylsterazy 1* oraz β -1,3-gukanazy, wybranych genów biosyntezy lignin (*PAL*, *C4H*, *4CL*) oraz celulozy (*CesA3*, *CesA4*, *CesA5*), a także metabolizmu sacharozy (*SPP* i *SPS*) i degradacji hemiceluloz (*XYN*, *GS*).

Chociaż rośliny typu RHA7 również mają obniżony poziom pektyn (podobnie jak typ PGI11), to jednak wprowadzony został enzym o innej swoistości. Spowodowało to odmienną niż w roślinach PGI11 odpowiedź genów metabolizmu ściany komórkowej. W roślinach linii RHA7 ekspresja liazy pektynowej została zredukowana, co prowadzi do wniosku, że spadek całkowitej ilości pektyn wiąże się wyłącznie z wprowadzoną modyfikacją. Ponadto obserwowano zróżnicowane zmiany w ekspresji genów związanych z demetylacją pektyn oraz obniżenie ekspresji niektórych genów: syntezy lignin (*C4H*, *CCR*), syntezy celulozy (*CesA2*, *CesA4*) oraz genów odpowiedzialnych za rearanżację i degradację hemiceluloz (*GMT*, *XXT*, *XYLa*, *GS*, *GLS*). Natomiast zmierzono wzrost ilości transkryptu genu β -1,3-gukanazy.

Drugim etapem pracy była uprawa polowa roślin na skalę laboratoryjną w celu uzyskania włókna i analiza fenotypowa roślin transgenicznych. Wizualnie len CAD27 nie odróżniał się od kontroli w uprawie polowej. Dokładna analiza wykazała, że charakteryzował się on opóźnioną i/lub zmniejszoną lignifikacją komórek elementarnych włókna oraz zmianami w anatomicznej budowie łodygi (większa średnica komórki włókna oraz cieńsza grubość wiązki włókna). Nie zanotowano różnic w parametrach fenotypowych (wzrost, masa nasion, ilość nasion w koszyczku), choć zaobserwowano obniżone plonowanie (zarówno nasion, jak i włókna). Weryfikacja odporności na infekcje grzybami z rodzaju *Fusarium* wykazała, że rośliny linii CAD27 były bardziej podatne na infekcję *F. oxysporum*, ale wykazały się większą odpornością na atak *F. culmorum*. Dla słomy z roślin CAD27 nie obserwowano wyraźnego skrócenia czasu rośnięcia, niemniej było ono ujednolicone i efektywne od pierwszego dnia.

Dla obu linii ze zmniejszoną ilością pektyn (PGI11 i RHA7) testy roszenia *in vivo* potwierdziły wyniki uzyskane *in vitro*, znaczne skrócenie czasu roszenia i jego większą efektywność. Ponadto, w uprawie polowej nie zaobserwowano żadnych zmian w parametrach fenotypowych oraz plonowaniu słomy i włókna. Zauważono natomiast obniżenie plonu nasion dla roślin PGI11 i zwiększenie dla roślin RHA7. Ponadto obie linie charakteryzowały się zwiększoną odpornością zarówno na infekcje *F. oxysporum*, jak i *F. culmorum*. Wyniki te wskazują, że jest możliwe uzyskanie normalnego fenotypu roślin z obniżoną zawartością pektyn/lignin oraz ich uprawa polowa, która nie odróżnia się agrotechnicznie od uprawy kontrolnej.

Trzecim etapem pracy było uzyskanie włókna i jego dokładna analiza pod kątem składu i właściwości ściany komórkowej. Włókno z roślin z wyciszonym genem *CAD* charakteryzowało się zmniejszoną zawartością lignin, zwiększoną zawartością celulozy oraz hemiceluloz, przy niezmienionej zawartości pektyn. Analiza metabolitów szlaku fenylopropanoidowego wykazała akumulację waniliny i witeksyny, co przełożyło się na zwiększony potencjał antyoksydacyjny ekstraktu z włókien. Co więcej, wykazano akumulację chlorofilu B oraz steroli: kampesterolu, stigmasterolu i β -sitosterolu. Zaobserwowano, że we włóknie PGI11 spadek całkowitej zawartości pektyn wiązał się ze spadkiem zawartości cukrów prostych frakcji wodorozpuszczalnej (za co odpowiada redukcja stężenia mannozy), przy nieznacznie zwiększonej zawartości kwasów uronowych. Zmierzona redukcja zawartości hemiceluloz, wynikała ze spadku zawartości cukrów prostych (glukozy i częściowo rybozy), mimo częściowej kompensacji przez wzrost kwasu uronowego, który jednak został zmieniony z kwasu galakturonowego na kwas glukuronowy. Analizując pozostałe składniki ściany komórkowej włókna PGI11 wykazano brak istotnych zmian w zawartości lignin, natomiast zaobserwowano wzrost zawartości celulozy. Ilości wszystkich zidentyfikowanych związków fenylopropanoidowych związanych ze ścianą komórkową uległa obniżeniu, za wyjątkiem aldehydu syringowego, którego ilość wzrosła w odniesieniu do kontroli. Natomiast zaobserwowano wzrost zawartości chlorofilu B, a także znaczną akumulację steroli (kampesterolu, stigmasterolu i β -sitosterolu). Z kolei włókno z roślin z wprowadzonym genem *RHA* charakteryzowało się wyraźną redukcją zawartości pektyn i hemiceluloz. Spadek całkowitej zawartości pektyn wiązał się z redukcją stężenia cukrów prostych (przede wszystkim mannozy) we frakcji wodorozpuszczalnej pektyn. Jednocześnie w pektynach nieznacznie wzrosła zawartość kwasów uronowych. Natomiast redukcja ilości hemiceluloz jest związana głównie ze znacznym spadkiem zawartości kwasów uronowych, podczas gdy ogólny poziom cukrów prostych nie zmienił się znacząco. Analizując pozostałe polimery ściany komórkowej we włóknach RHA7 zaobserwowano nieznaczny wzrost stężenia celulozy i brak zmian w zawartości lignin. W przeciwieństwie do włókien PGI11, włókna RHA7 charakteryzował wzrost ilości oznaczanych związków fenylopropanoidowych, które są związane ze ścianą komórkową. Zaobserwowano również dużą akumulację luteiny, chlorofilu b, CBD oraz steroli.

Analiza spektroskopowa włókien transgenicznych w podczerwieni pozwoliła zaobserwować zmianę charakteru wzajemnych oddziaływań i przestrzennej organizacji polimerów w ścianie komórkowej. Włókna *CAD27*, *PGI11* i *RHA7* charakteryzowała mniejsza ilość grup –OH zaangażowanych w wiązania wodorowe oraz wyraźny spadek indeksu krystaliczności (największy dla włókien *RHA7*), a także skrócenie długość mikrofibril celulozowych oraz rearanżacja pierścieni piranoidowych w polimerach celulozowych. Wilekość zaobserwowanych zmian charakteryzuje tendencja $I_{NIKE} < I_{CAD27} < I_{PGI11} < I_{RHA7}$.

W związku z wykazanymi zmianami w ilości modyfikowanych polimerów oraz w kompozycji całej ściany komórkowej ostatnim etapem zamierzonych badań była ocena wpływu modyfikacji i spowodowanych nią zmian na właściwości użytkowe włókna lnianego. Pod uwagę wzięto trzy potencjalne zastosowania: w przemyśle tekstylnym (przędza/tkanina lniana) oraz dwa biomedyczne: jako materiału opatrunkowego bądź jako nośnika i stabilizatora leków. W tym celu zbadano trzy aspekty otrzymanych włókien: właściwości mechaniczne, wpływ ekstraktu z włókien zawierającego związki fenylopropanoidowe na wzrost patogennych dla człowieka szczepów bakterii oraz zdolność wiązania substancji leczniczych. Testy mechaniczne włókna z obniżoną zawartością lignin wykazały wzrost wytrzymałości na rozciąganie i sztywności. Ekstrakt z włókna CAD27 zawierający związki fenylopropanoidowe działał hamująco na wzrost Gram ujemnych bakterii *E. coli* oraz wykazywał widoczne działanie opóźniające wzrost szczepu *P. aeruginosa*. Natomiast eksperyment z wiązaniem rutyny wykazał wysoką pojemność wiązania włókna z linii CAD27, zdecydowanie większą od włókien kontrolnych. Badania określające właściwości użytkowe włókna z obniżoną zawartością pektyn (PGI11 i RHA7) wykazały podobne właściwości dla obu linii. Zaobserwowano zwiększoną wytrzymałość na rozciąganie oraz znaczny wzrost pojemności wiązania. Przy czym, włókno PGI11 lepiej od włókna RHA7 wiązało rutynę, natomiast włókno RHA7 miało zdecydowanie lepszą wytrzymałość na rozciąganie. Ponadto, ekstrakt z włókien PGI11 miał najmniejsze działanie na wzrost patogennych bakterii, jednak jako jedyny widocznie opóźniał wzrost *E. hirae*. Natomiast ekstrakt z włókien RHA7 najefektywniej spośród testowanych hamował wzrost bakterii *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

Podsumowując, w przypadku włókna CAD27, mimo redukcji ilości lignin nie uzyskano zwiększenia elastyczności, jednak poprawie uległa wytrzymałość na rozciąganie oraz pozostałe badane właściwości użytkowe włókna. Obniżenie ilości pektyn w lnie (linie PGI11 oraz RHA7) przełożyło się na krótsze i wydajniejsze rosenie, oraz pozytywnie wpłynęło na skład i właściwości włókna lnianego. Porównując badane modyfikacje, najefektywniejsze okazało się wprowadzenie do roślin genu kodującego RHA. Rośliny i włókno z linii RHA7 charakteryzowały się zwiększonym plonem nasion i odpornością na infekcje, a zmiany w ścianie komórkowej włókna lnianego przekładały się na znaczną poprawę właściwości użytkowych.

W pracy tej potwierdzono, że ściana komórkowa jest strukturą dynamiczną i interaktywną, gdzie zmiany w ilości jednego składnika pociągają za sobą zmiany w ilości pozostałych składników, co przekłada się na sieć zależności genetycznych dotyczących ściany komórkowej. Zmiany w strukturze ściany komórkowej (indukowane, związane z czynnikami środowiskowymi czy rozwojowymi), a przez to w jej właściwościach mechanicznych są sygnałem przekazywanym do genów, który stymuluje mechanizm kompensacyjny na poziomie transkrypcyjnym i posttranslacyjnym, żeby utrzymać prawidłowe parametry funkcjonalne ściany komórkowej. Co z kolei prowadzi do rearanżacji ściany komórkowej. Ponadto, zmiany te wpływają na ekspresję genów związanych z patogenezą, co koreluje się z podatnością roślin na infekcje patogenne. Prowadzi to do rearanżacji ściany komórkowej oraz zmian w ilości i proporcjach poszczególnych składników. Wykazano, że zmiany w zawartości lignin lub pektyn w ścianie komórkowej są kompensowane przez zwiększenie się zawartości celulozy oraz zmianę jej struktury, jako głównego składnika odpowiedzialnego za wytrzymałość.