

Aleksandra Boba

STRESZCZENIE

## TERPENOIDY W ODPOWIEDZI LNU NA FUZARIOZĘ

Len jest cenną rośliną uprawną, dostarczającą wartościowych surowców głównie w postaci oleju oraz włókna. Obecnie dzięki nowoczesnym technologiom, praktycznie wszystkie jego części mogą zostać wykorzystane, również te, które pierwotnie uważano za odpady jak paździerze czy wytloki, będące źródłem związków biologicznie aktywnych. Pomimo, iż w naszym kraju warunki do uprawy lnu są doskonałe, areal jego uprawy spada. Ma to związek z podatnością na choroby, wśród których najczęściej strat odnotowuje się w przypadku infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium*, w tym *F. oxysporum* będącym specyficznym patogenem lnu.

W zależności od rodzaju patogenu (specyficzny czy nie; nekrotrof lub biotrof) rośliny wykształciły różnorodne mechanizmy obronne, angażujące różne związki i procesy, mające na celu zahamowanie infekcji. Dane literaturowe wskazują na udział białek PR, fenylopropanoidów czy poliamin w odpowiedzi na infekcję, natomiast niewiele jest danych dotyczących roli terpenoidów. Również sam mechanizm infekcji *Fusarium* u lnu nie jest jeszcze do końca poznany.

Głównym celem pracy była ocena roli wybranych terpenoidów w odpowiedzi na infekcję grzybami z rodzaju *Fusarium*. Jako, iż terpenoidy stanowią niezwykle bogatą grupę metabolitów drugorzędowych, zdecydowano się na szczegółową analizę trzech grup związków: karotenoidów, tokoferoli i steroli. Dla wybranych dróg zidentyfikowano lniane sekwencje nukleotydowe kodujące geny syntezy badanych związków. Łącznie w ramach pracy zidentyfikowano sekwencje nukleotydowe dla 41 genów w obrębie szlaku syntezy terpenoidów, spośród uzyskanych sekwencji 24 zostały umieszczone w ogólnodostępnej bazie danych NCBI.

W siewkach lnianych traktowanych patogenem (w pięciu punktach czasowych: 6h, 12h, 24h, 36h, 48h od infekcji) zbadano poziom ekspresji tych genów i oznaczono wybrane metabolity. Sprawdzone również jak czyste związki (standardy analityczne) wpływają na wzrost patogenu.

Uzyskane wyniki wskazują, iż w przypadku infekcji *Fusarium* w lnie aktywowany jest szlak niemewalonowy, prowadzący do syntezy takich związków jak karotenoidy czy tokoferole. Synteza fitosteroli, pochodzących ze szlaku mewalonowego, ulega lekkiemu spadkowi, co potwierdza zarówno poziom samych steroli jak i ekspresja genów związanych z ich syntezą. Zawartość tokoferoli wzrasta nieznacznie w trakcie infekcji, co przekłada się na wzrost ekspresji genów związanych z ich syntezą. Jednakże sam  $\alpha$ -tokoferol nie wykazuje hamującego działania na wzrost patogenu. Zwiększona synteza tokoferoli może mieć więc związek z koniecznością wygaszania wolnych rodników powstałych w czasie infekcji. Poziom karotenoidów w czasie infekcji początkowo wzrasta by w następnych godzinach spaść

nieznacznie poniżej poziomu kontrolnego. Same karotenoidy podobnie jak tokoferol nie hamują wzrostu patogenu, choć wpływają na zmianę jego metabolizmu. Sprawdzone więc poziom ekspresji genów związanych z rozpadem karotenoidów i syntezą ABA. Znacznemu wzrostowi uległa ekspresja genu *nced3* i *nced6* odpowiedzialnych za rozpad karotenoidów do prekursorów, z których powstaje kwas abscysynowy. Również ekspresja genów bezpośrednio związanych z syntezą ABA wzrasta. Ma to przełożenia na zawartość samego ABA, która wzrasta od początku infekcji. Sam kwas abscysynowy coraz częściej w literaturze uznawany jest za kolejną cząstkę sygnałną uruchamiającą odpowiednie mechanizmy odpornościowe w roślinie, podobnie jak to robi kwas salicylowy czy jasmonowy. Dodatkowo około 10% genów w genomie roślinnym posiada w sekwencji promotorowej elementy *cis*-regulatorowe wrażliwe na ABA. Jednym z takich genów jest syntaza kalozy *pmr4*, której udział w odpowiedzi na infekcję został już wielokrotnie potwierdzony. W ramach pracy zidentyfikowano gen *pmr4* w lnie, zbadano jego poziom ekspresji oraz poziom samej kalozy. Zarówno poziom ekspresji jak i zawartość kalozy wzrastają w trakcie infekcji.

Uzyskane rezultaty wskazują, iż w ramach szlaku syntezy terpenoidów to właśnie droga prowadząca do syntezy kwasu abscysynowego odgrywa kluczową rolę w trakcie infekcji *Fusarium*. Wzrost zawartości ABA w komórce uruchamia różne mechanizmy odpornościowe w tym syntezę kalozy, wchodzącej w skład papilli, które stanowią fizyczną barierę dla patogenu.

Dodatkowym aspektem pracy było sprawdzenie jak manipulacja syntezą karotenoidów wpłynie na fenotyp i odporność lnu.

Pierwszym analizowanym typem roślin był len z represją genu likopenowej  $\beta$ -cyklazy. W dwóch wybranych liniach (L9 i L18) zbadano poziom ekspresji genów syntezy terpenoidów oraz odpowiadające im metabolity. Zawartość zarówno karotenoidów jak i tokoferoli jest w nich obniżona. Niewielkiemu wzrostowi ulega natomiast zawartość ABA. Nasiona uzyskane z tych roślin są odporniejsze na infekcję *Fusarium*, mechanizmu tej odporności nie udało się jeszcze wyjaśnić. Podjęto również próbę wyjaśnienia mechanizmu wyciszenia genu *lcb*, badając w tym celu poziom metylacji w roślinach, oraz wzór metylacji genu kodującego cyklazę.

Drugi typ roślin to len ze zwiększoną syntezą karotenoidów. Aby to uzyskać wprowadzono przy użyciu *Agrobacterium* do genomu lnianego geny bakteryjne kodujące syntazę fitoenu *crtB* oraz desaturazę karotenu *crtl* z *Erwinia uredovora*. Uzyskane transformanty roślinne posiadają zwiększoną zawartość karotenoidów w nasionach.

Dalsze prace nad lnem ze zmienionym metabolizmem karotenoidów będą prowadzone. Równocześnie będziemy starać się poznać dokładniej mechanizm interakcji len-*Fusarium*, za punkt wyjściowy biorąc rolę ABA w infekcji lnu.