

AHMED ZEITOUN

ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY KOMPOZYCJĄ BIOCHEMICZNĄ LNU MODYFIKOWANEGO GENETYCZNIE A JEGO PRODUKTYWNOŚCIĄ

STRESZCZENIE

Len (*Linum usitatissimum* L.) jest jedną z cennych roślin o wielorakich możliwościach zastosowania. Nawet nazwa rodziny, do której należy; *Lineaceae* odzwierciedla jego potencjał. Len jest uznawany za surowiec bezodpadowy, ponieważ każda jego część może posłużyć do wytworzenia cennych produktów. Nasiona lnu są używane w celach spożywczych, olej natomiast ma zastosowania zarówno spożywcze jak i przemysłowe. Wytłoki lniane zawierają wiele fenylopropanoidów i w związku z tym mają potencjalne zastosowanie w medycynie. Włókno lniane jest wykorzystywane do produkcji tkanin, a od niedawna także biokompozytów i biopaliw. Również paździerz lniane mogą być wykorzystywane do produkcji biopaliw oraz być wykorzystywane jako źródło antyoksydantów.

Areał uprawy lnu spadł w ciągu ostatnich 40 lat znacząco wskutek splotu wielu czynników. Część z nich miała podłoże ekonomiczno-polityczne, inne wiązały się z właściwościami lnu jako surowca. Jedną z podstawowych przyczyn była podatność lnu na infekcje. *Fusarium oxysporum*, powodujące wędnięcie fuzaryjne, które jest uznawane za najgroźniejszą chorobę lnu. Prowadzi ono do spadku plonu i obniżenia jakości.

Celem poprawy właściwości mechanicznych włókna lnianego użyto inżynierii genetycznej. Użyto dwóch głównych dróg wiodących do poprawy właściwości włókna lnianego. Pierwsza prowadziła poprzez wyciszenie dehydrogenazy alkoholu cynamonowego (CAD) celem zredukowania poziomu lignin. Obniżenie poziomu lignin w roślinach CAD spowodowało polepszenie jakości włókna poprzez zwiększenie jego elastyczności. Druga droga prowadziła poprzez redukcję poziomu pektyn, osiągniętą przez nadekspresję poligalakturonaz. Celem obniżenia poziomu pektyn było skrócenie czasu rośnięcia. Linie PGI wykazywały ponadto lepsze własności mechaniczne w porównaniu do roślin kontrolnych. Niestety zaobserwowano niekorzystne zmiany w odporności roślin w kulturach *in vitro*. Wiele czynników wpływa na produktywność roślin. Jednym z najbardziej istotnych jest wrażliwość albo odporność na infekcję.

Celem tej pracy było zbadanie zmian w składzie i biochemicznej kompozycji polimerów w nasionach i roślinach transgenicznych linii lnu, spowodowanych przez wprowadzone modyfikacje, celem stwierdzenia jakie czynniki korelują z obserwowanymi zmianami w odporności linii transgenicznych na infekcje *Fusarium*. Zbadano trzy stadia rozwojowe lnu: nasiona, rośliny czterotygodniowe i jedenastotygodniowe. Nasiona zawierają materiały zapasowe, których roślina używa w czasie kiełkowania. Około czwartego tygodnia od kiełkowania zapasy biopolimerów z nasiona są już prawie wyczerpane i roślina polega na produktach fotosyntezy zarówno w dziedzinie wzrostu i rozwoju jak i w odporności na patogen. Jedenastotygodniowa roślina jest już prawie dojrzała i jakakolwiek infekcja może spowodować znaczną utratę plonu.

Odporność linii transgeniczných na patogen sprawdzono wysiewając nasiona na pożywkę MS. Kiedy siewki wyrosły, pożywka została zarażona *F. oxysporum* lub *F. culmorum*. Następnie zmierzono odporność linii transgeniczných na *Fusarium*. Siewki PGI 11 były bardziej odporne w porównaniu do kontroli, natomiast CAD 33 bardziej wrażliwe na zakażenie *Fusarium*. Ponadto zbadano witalność nasion używając testu kiełkowania. Zaobserwowano spadek witalności dla nasion CAD 33 i jej wzrost dla linii PGI 11.

Zbadano kompozycję biochemiczną nasion aby określić zachodzące w nich zmiany. Określono zawartość celulozy, hemicelulozy, pektyn i lignin. Do analizy składu monomerowego pektyn i hemiceluloz oraz śluzu z nasion Inianych zastosowano ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC). Użyto jej również do określenia zawartości i kompozycji związków fenolowych. Kompozycję i zawartość kwasów tłuszczowych określono za pomocą chromatografii gazowej (GC-FID).

W nasionach efekty modyfikacji były znaczące. Zawartość lignin znacząco spadła w linii CAD 33, pektyn natomiast w PGI 11. Modyfikacja wpłynęła także na pozostałe biopolimery. Zarówno zawartość hemiceluloz jak i pektyn wzrosła w linii CAD 33, podczas gdy zawartość celulozy znacząco spadła. Zawartość lignin spadła w PGI 11, hemiceluloz natomiast symultanicznie wzrosła. Zawartość fenylopropanoidów znacząco spadła w CAD 33, nieznacznie natomiast w PGI 11. Nie zaobserwowano istotnych zmian w zawartości i kompozycji kwasów tłuszczowych w liniach transgeniczných w stosunku do rośliny kontrolnej.

Zanalizowano zawartość biopolimerów w czterotygodniowych i jedenastotygodniowych roślinach. Podobnie jak w nasionach oznaczono zawartość celulozy, hemicelulozy, pektyn i lignin. Kompozycja monomerów cukrowych pektyn i hemiceluloz została oznaczona przy użyciu UPLC, podobnie jak zawartość i skład fenylopropanoidów. Określono również poziom ekspresji wybranych genów zaangażowanych w metabolizm biopolimerów oraz genów związanych z odpowiedzią na infekcję (PR) jak β 1, 3 glukanaza i chitynaza, przy użyciu Real-Time PCR.

Pomimo użycia promotora 35S do ekspresji transgenów zmiany w zawartości i kompozycji biopolimerów w roślinach były mniej wyraźne niż nasionach. W linii CAD 33 nie tylko nie zaobserwowano spadku zawartości lignin, ale wręcz nieznaczny jej wzrost. Redukcja zawartości pektyn w roślinach PGI 11 była znacznie mniej wyraźna niż w nasionach. Podobnie jak w nasionach zarówno zawartość hemiceluloz jak i pektyn była wyższa niż w kontroli w roślinach CAD 33. W linii PGI 11, zawartość lignin spadła przy jednoczesnym wzroście zawartości hemicelulozy. Zawartość fenylopropanoidów zachowała jednakże tendencje obserwowane w nasionach i była znacznie obniżona w roślinach CAD 33, nieco obniżona natomiast w PGI 11.

Zmiany składu biochemicznego mogą być częściowo wyjaśnione zmianami ekspresji genów. W roślinach CAD 33 jednakże, jakkolwiek gen CAD był wyciszony, brak jego aktywności został skompensowany przez nadekspresję genu dehydrogenazy alkoholu sinapylowego (SAD). Ekspresja genów odpowiedzi na infekcję korelowała się dodatnio z obserwowanymi zmianami w odporności roślin. Rośliny PGI 11 wykazywały zwiększoną ekspresję β 1, 3 glukanazy co może sugerować ich zwiększoną odporność na infekcję. W linii CAD 33 nastąpiła represja zarówno genów PR, jak i β 1, 3 glukanazy i chitynazy.

W roślinach jedenastotygodniowych, czyli w trzecim analizowanym etapie życia roślin, występowały znaczące różnice w stosunku do roślin kontrolnych. Zawartość lignin spadła znacząco w roślinach CAD33. Zawartość pektyn pozostała przy tym bez zmian, celulozy i hemicelulozy natomiast spadła. W roślinach PGI 11 zawartość pektyn znacząco spadła, hemiceluloz spadła dramatycznie, natomiast ilość lignin i celulozy znacznie wzrosła. Podobnie jak w roślinach czterotygodniowych zawartość fenylopropanoidów była obniżona zarówno w roślinach CAD 33 jak i PGI 11. Analizy ekspresji genów były zgodne z analizami biochemicznymi. Zarówno ekspresja genów CAD jak i SAD była obniżona w roślinach CAD 33. Spadek zawartości hemicelulozy w linii P 11, szczególnie zaś zawartości w niej monomerów ksylozowych, może być wyjaśniony obserwowaną nadekspresją 1,4-alfa-ksylozydazy (XYLa), która odpowiada za degradację hemicelulozy poprzez usówanie reszt ksylozy. Chitynaza była nadekspresjonowana w linii P 11, represjonowana natomiast w roślinach CAD 33.

Zaiste zmiana kompozycji biochemicznej transgenicznych nasion lnu ma wpływ na odporność skiełkowanych roślin w początkowym okresie ich życia. Oligosacharydy uwalniane z łańcuchów homogalacturonanu w pektynach wskutek wprowadzenia poligalakturonazy w roślinach PGI 11 zdają się działać jak elicytory indukując odporność rośliny na infekcję. Ten stan indukowanej odporności był odpowiedzialny za nadekspresję genów PR i WAK, które zwiększają odporność. Ponadto, fizyczne bariery przeciw patogenowi zostały wzmocnione, zwłaszcza w roślinach jedenastotygodniowych w których poziom celulozy i lignin wzrósł. Wprowadzona modyfikacja poprawiła też produktywność roślin PGI 11.

Jednakowoż wyciszenie genu CAD miało negatywny wpływ na odporność roślin CAD33. Roślina reaguje jak gdyby nie było żadnego sygnału o infekcji. Może to być odpowiedzialne za spadek ekspresji genów PR, zawartości związków fenolowych i aktywności antyutleniającej roślin CAD 33 i w konsekwencji podnosić wrażliwość roślin na infekcje.

Redukcja zawartości pektyn przez wprowadzenie grzybowej poligalakturonazy było zatem lepszą strategią poprawy właściwości włókna w porównaniu do obniżenia zawartości lignin poprzez wyciszenie genu CAD.