

1. STRESZCZENIE

Stres związany z infekcją mikroorganizmami patogenicznymi jest istotnym czynnikiem ograniczającym wzrost i plonowanie roślin uprawnych. Przebieg interakcji roślina – patogen oraz jej końcowy rezultat są zależne od stadium rozwojowego rośliny, jej kondycji fizjologicznej, mechanizmów obrony i cech patogena. *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (Psl) należy do patogenów hemibiotroficznych i powoduje u roślin dyniowatych, w tym u ogórka, kanciastą plamistość liści (ang. *angular leaf spot*).

Uznaje się, że za prawidłową reakcję roślin na stres na poziomie komórkowym odpowiedzialna jest koordynacja szlaków metabolicznych realizowanych przez różne kompartmenty, a także sprawna wymiana sygnałów między nimi. Szczególną rolę w tych procesach przypisuje się chloroplastom i mitochondriom, które są uznawane za czułe sensory zmian zachodzących w środowisku, w tym także związanych z infekcją patogenami. Chloroplasty i mitochondria są odpowiedzialne za powstawanie i przekazywanie sygnałów retrogradowych do jądra komórkowego. Sygnały te regulują ekspresję genów, które kodują białka zaangażowane w reakcje roślin na stres.

Abiotyczne i biotyczne czynniki stresowe mogą wywoływać stan nadmiaru energii wzbudzenia, która prowadzi do uniwersalnych następstw: zaburzenia transportu elektronów, wzmożonej redukcji plastochinonu (PQ) i generowania reaktywnych form tlenu (RFT), które produkowane w nadmiarze odpowiadają za stres oksydacyjny. Uważa się jednak, że RFT pełnią również ważną rolę w przekazywaniu sygnałów redoks w komórce roślinnej.

Za regulację poziomu RFT oraz RFT-zależnej sygnalizacji redoks odpowiada system antyoksydacyjny, którego ważnymi elementami są: katalaza (CAT), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) oraz cykl askorbinian-glutation (AA-GSH). Zasadniczą funkcją cyklu AA-GSH jest usuwanie nadmiaru H_2O_2 oraz utrzymywanie AA i GSH w formie zredukowanej. Stan redoks AA i GSH kształtowany przez: peroksydazę askorbinianową (APX), reduktazę dehydroaskorbinianową (DHAR), reduktazę monodehydroaskorbinianową (MDHAR) i reduktazę glutationową (GR) jest również źródłem sygnałów redoks, a GSH wraz z tioredoksynami (Trx), glutaredoksynami (Grx) i peroksyredoksynami (Prx) uczestniczy w regulacji aktywności białek ważnych dla odpowiedzi roślin na stres.

Istotnym elementem utrzymania homeostazy organizmu, potrzebnym do zachowania równowagi między procesami wzrostu i obroną przed stresem, są regulacje metaboliczne. Uznaje się, że w mechanizmie generowania, przetwarzania i odbioru sygnałów metabolicznych uczestniczą cukry i metabolity oddechowe, takie jak kwas L-jabłkowy (L-MA) i kwas szczawiooctowy, a także aminokwasy oraz enzymy biorące udział w metabolizmie fotosyntezy, oddychania i fotooddychania. Ważnymi regulatorami szlaków metabolicznych i sygnalizacji redoks są dinukleotydy nikotynoamidoadeninowe: NAD(P)H i NAD(P)⁺.

Celem pracy jest rozpoznanie roli chloroplastów i mitochondriów w powstawaniu sygnałów oksydoredukcyjnych i metabolicznych u ogórka siewnego po infekcji *PsI* i ich znaczenia dla powstawania lokalnej i ogólnoustrojowej (systemicznej) odpowiedzi na infekcję.

W pracy wykazano, że infekcja *PsI* obniżała konduktancję szparkową i prowadziła do ograniczenia wymiany gazowej oraz transpiracji. W odpowiedzi na atak patogena stwierdzono wzrost wartości niefotochemicznego wygaszania fluorescencji (NPQ). Wykazano także obniżenie intensywności netto fotosyntezy oraz maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II, PSII (Q_Y), a także wzrost intensywności oddychania mitochondrialnego, co świadczyło o reorganizacji metabolizmu na korzyść oddychania. Mogło to służyć ograniczeniu podaży asymilatów dla patogena przy jednoczesnym zapewnieniu energii i siły redukującej w postaci NADH.

W reakcjach roślin na stres ważną rolę pełnią antyoksydanty. Wykazane w pracy poinfekcyjne zmiany aktywności SOD i CAT oraz zmiany ekspresji kodujących je genów świadczyły o przesunięciu równowagi w kierunku prooksydacyjnym w początkowym stadium patogenezы oraz o mobilizacji ochrony antyoksydacyjnej zależnej od SOD i CAT w stadium późnym. Zmiany aktywności APX, DHAR, MDHAR i GR po infekcji oraz współczynników redoks $[AA]/[DHA]$ i $[GSH]/[GSSG]$, oznaczonych zarówno w ekstrakcie całkowitym, jak i w chloroplastach, świadczyły o uruchomieniu sygnalizacji redoks stresu biotycznego zależnej od RFT, AA i GSH. Akumulacja AA zarówno na poziomie komórkowym, jak i w chloroplastach liści trzeciego piętra mogła być odpowiedzialna za ochronę antyoksydacyjną w początkowej fazie patogenezы. W późnej fazie patogenezы, zarówno w chloroplastach, jak i na poziomie komórkowym stwierdzono mobilizację obrony antyoksydacyjnej, która charakteryzowała się wzrostem zawartości GSH i aktywności GR.

Stwierdzony spadek intensywności netto fotosyntezy mógł być sprzężony z obniżonym poziomem ekspresji genu kodującego dużą podjednostkę karboksylazy/oksygenazy 1,5-bisfosforybulozy ($RuBisCO_{lu}$) w liściach trzeciego piętra. Przy ograniczonej podaży CO_2 z uwagi na przymknięte aparaty szparkowe rekompensata w asymilacji CO_2 mogła następować przy udziale karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC), dla której stwierdzono poinfekcyjny wzrost poziomu ekspresji genu. Konsekwencją obniżonej intensywności fotosyntezy było też zmniejszenie stężenia D-glukozy, która mogła być również wykorzystywana do biosyntezy glukozy-6-fosforanu (G6P) z udziałem heksokinazy (HK). W liściach piętra trzeciego stwierdzono zarówno wzrost stężenia G6P, jak i wzrost poziomu ekspresji genu kodującego HK. Zwiększona podaż G6P była sprzężona ze wzrostem poziomu ekspresji genu kodującego dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową (G6PDH) i aktywności G6PDH, co mogło sprzyjać powstawaniu NADPH. Poinfekcyjne obniżenie stosunku redoks $[NADPH]/[NADP^+]$ w liściach piętra trzeciego mogło oznaczać

zużywanie NADPH w reakcjach biosyntezy metabolitów wtórnych ważnych w reakcjach obronnych. O intensyfikacji oddychania świadczył poinfekcyjny wzrost stężenia kwasu L-jabłkowego (L-MA) i kwasu szczawiooctowego oraz wzrost aktywności dehydrogenazy L-jabłczanowej (L-MDH) i fumarazy. Akumulacja L-MA mogła też aktywować czółenka jabłczanowe odpowiedzialne za wyprowadzanie siły redukującej z chloroplastów i mitochondriów liści trzeciego piętra. Wykazany wzrost zawartości aminokwasów: Gly, L-Ser, L-Glu i L-Gln mógł być związany z poinfekcyjną rearanżacją metabolizmu azotu oraz zapewniać substraty do biosyntezy metabolitów ważnych z punktu widzenia reakcji obronnych (np. GSH).

Dzięki zastosowaniu inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów: DCMU i DBMIB badano jak stan redoks PQ wpływa na rozwój choroby wywołanej przez *Pst*, obronę antyoksydacyjną zależną od enzymów cyklu AA-GSH oraz równowagę cukrów. Wykazano, że zachwianie równowagi PQ zarówno na korzyść formy zredukowanej, jak i utlenionej przyspiesza pojawienie się symptomów infekcji. Gdy w puli PQ dominowała forma utleniona stwierdzono nasilenie objawów choroby. Z kolei przesunięcie równowagi PQ w kierunku formy zredukowanej było związane z usuwaniem nadmiaru energii wzbudzenia na drodze niefotochemicznej, a także promowało obronę antyoksydacyjną zależną od AA.

W niniejszej pracy wykazano, że mechanizmy dostosowawcze do stresu były generowane nie tylko w liściach zakażonych, ale również w liściach nie mających bezpośredniego kontaktu z patogenem. W liściach piątego piętra roślin zakażonych stwierdzono podobny trend zmian badanych parametrów jak w zainfekowanych liściach trzeciego piętra. Mogło to być przejawem aklimatyzacji roślin i sprzyjać zachowaniu równowagi między procesami wzrostu i obrony przed stresem biotycznym.