



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Mikrobiologii, Biotechnologii
i Biologii Eksperymentalnej

Tomasz Kopczewski

Udział chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi ogórka siewnego (*Cucumis sativus*) na infekcję *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*

Involvement of chloroplasts and mitochondria
in the response of cucumber (*Cucumis sativus*)
to *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* infection

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Fizjologii
i Biochemii Roślin
Instytutu Biologii Eksperymentalnej

pod kierunkiem
dr hab. Elżbiety Kuźniak-Gębarowskiej, prof. UŁ

*Składam serdeczne podziękowania
mojej Pani Promotor
dr hab. Elżbiecie Kuźniak-Gębarowskiej, prof. UŁ
za życzliwą pomoc, wsparcie i wyrozumiałość
oraz cenne wskazówki merytoryczne
przy przygotowywaniu rozprawy doktorskiej*

Dziękuję:

- ***Pani dr hab. Iwone Ciereszko, prof. UwB*** z Zakładu Fizjologii Roślin Instytutu Biologii oraz ***Panu dr. Lechowi Szczepaniakowi*** z Instytutu Chemii Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku za udostępnienie zaplecza laboratoryjnego, cenne wskazówki merytoryczne i pomoc w oznaczeniach zawartości metabolitów metodą GC-MS
- ***Panu dr. hab. Andrzejowi Kornasiowi, prof. UP*** z Zakładu Biologii Komórki i Genetyki oraz ***Panu dr. Grzegorzowi Rutowi*** z Zakładu Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie za udostępnienie zaplecza laboratoryjnego oraz pomoc w przeprowadzeniu analizy autofluorescencji chlorofilu, termografii w podczerwieni i intensywności wymiany gazowej
- ***Pani dr Marzenie Wielanek*** z Katedry Fizjologii i Biochemii Roślin Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego za pomoc w oznaczeniu zawartości aminokwasów metodą HPLC
- ***Pani dr hab. Zdzisławie Romanowskiej-Dudzie, prof. UŁ*** z Katedry Ekofizjologii Roślin Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego za użyczenie przyrządu pomiarowego i pomoc w oznaczeniu zawartości chlorofilu

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE.....	7
ABSTRACT	10
2. WSTĘP	13
2.1. Rośliny w warunkach stresu biotycznego	13
2.1.1. Typy odporności roślin na patogeny	13
2.1.2. Interakcja ogórek siewny – <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>lachrymans</i> (Psl).....	18
2.2. Współdziałanie regulacyjne chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi roślin na stres.....	21
2.2.1. Znaczenie stanu nadmiaru energii wzbudzenia w chloroplastach w uruchamianiu reakcji odpornościowych	21
2.2.2. Znaczenie cyklu askorbinian-glutation w stresie biotycznym u roślin	28
2.2.3. Rola cukrów i enzymów ich metabolizmu w sygnalizacji stresu u roślin	34
2.2.4. Koncepcja sygnalizacji retrogradowej w komórce roślinnej	38
3. CEL PRACY	41
4. MATERIAŁY I METODY	43
4.1. Układ eksperymentalny	43
4.1.1. Uprawa <i>Cucumis sativus</i> L	43
4.1.2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>lachrymans</i>	43
4.1.3. Inokulacja roślin	44
4.1.4. Warianty eksperymentalne.....	44
4.1.5. Izolacja chloroplastów.....	45
4.1.6. Aplikacja inhibitorów fotosyntezy.....	45
4.2. Metody eksperymentalne	46
4.2.1. Pomiar fluorescencji i oznaczanie zawartości chlorofilu a	46
4.2.2. Termografia w podczerwieni i mikroskopia fluorescencyjna	47
4.2.3. Pomiar intensywności wymiany gazowej	47
4.2.4. Antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne	48
4.2.4.1. Przygotowywanie ekstraktów enzymatycznych	48
4.2.4.2. Oznaczanie aktywności katalazy	48
4.2.4.3. Oznaczanie aktywności peroksydazy askorbinianowej.....	48
4.2.4.4. Oznaczanie aktywności reduktazy dehydroaskorbinianowej	48
4.2.4.5. Oznaczanie aktywności reduktazy monodehydroaskorbinianowej.....	49
4.2.4.6. Oznaczanie aktywności reduktazy glutationowej	49
4.2.4.7. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.....	49
4.2.4.8. Elektroforeza natywna izoform dysmutazy ponadtlenkowej	50
4.2.4.9. Oznaczanie aktywności oksydazy askorbinianowej	51
4.2.4.10. Oznaczanie zawartości kwasu askorbinowego	51
4.2.4.11. Oznaczanie zawartości glutationu	52
4.2.5. Analiza zawartości dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych	53
4.2.6. Oznaczanie zawartości cukrów i fosforanów cukrów	54
4.2.6.1. Zawartość D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy	54
4.2.6.2. Zawartość glukozy-6-fosforanu	56
4.2.7. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej.....	57
4.2.8. Oznaczanie wybranych metabolitów i enzymów cyklu Krebsa	57

4.2.8.1. Zawartość kwasu L-jabłkowego	57
4.2.8.2. Zawartość kwasu szczawiooctowego.....	58
4.2.8.3. Aktywność dehydrogenazy L-jabłczanowej.....	58
4.2.8.4. Aktywność fumarazy.....	59
4.2.9. Oznaczanie zawartości białka.....	59
4.2.10. Oznaczanie aminokwasów metodą HPLC	60
4.2.11. Analiza wybranych metabolitów metodą GC-MS	61
4.2.12. Oznaczanie profilu ekspresji genów metodą qRT-PCR.....	62
4.2.12.1. Izolacja RNA	62
4.2.12.2. Oznaczanie stężenia, czystości i jakości preparatu RNA	63
4.2.12.3. Odwrotna transkrypcja	64
4.2.12.4. Reakcja Real Time PCR z wykorzystaniem fluoroforu SYBR-Green®	64
4.3. Statystyczne opracowanie wyników	66
5. WYNIKI.....	67
5.1. Rozwój infekcji <i>PsI</i>.....	67
5.2. Analiza parametrów fluorescencji chlorofilu	69
5.3. Indeks zawartości chlorofilu <i>a</i>	72
5.4. Parametry wymiany gazowej	73
5.5. Analiza wybranych antyoksydantów.....	75
5.5.1. Aktywność katalazy i ekspresja genu katalazy	75
5.5.2. Aktywność i ekspresja genów enzymów cyklu Halliwella-Asady	76
5.5.3. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. Ekspresja genu chloroplastowej dysmutazy ponadtlenkowej	82
5.5.4. Aktywność oksydazy askorbinianowej.....	86
5.5.5. Zawartość kwasu askorbinowego i glutationu	87
5.6. Zawartość dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych	91
5.7. Zawartość cukrów i aktywność enzymów ich metabolizmu	93
5.7.1. Zawartość D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy.....	93
5.7.2. Ekspresja genów inwertazy kwaśnej i inwertazy zasadowej.....	96
5.7.3. Zawartość glukozo-6-fosforanu i aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej. Ekspresja genów heksokinazy i dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej	97
5.8. Wybrane metabolity i enzymy cyklu Krebsa.....	99
5.8.1. Zawartość kwasu L-jabłkowego i szczawiooctowego. Aktywność dehydrogenazy L-jabłczanowej i fumarazy.....	99
5.8.2. Ekspresja genów dehydrogenazy L-jabłczanowej, fumarazy i dehydrogenazy izocytrynianowej	100
5.9. Ekspresja genów związanych z fotosyntezą.....	102
5.10. Zawartość aminokwasów	103
5.11. Ekspresja genów dekarboksylazy glicyny i oksydazy glikolanowej.....	105
5.12. Zawartość metabolitów oznaczanych metodą GC-MS.....	105

6. DYSKUSJA	108
6.1. Rozkład temperatury radiacyjnej liści i wpływ infekcji na stan fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów	109
6.2. Udział antyoksydantów w reakcjach na stres biotyczny	114
6.3. Regulacja metaboliczna w odpowiedzi roślin na stres biotyczny	120
7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI.....	129
8. LITERATURA.....	132
ŹRÓDŁA FINANSOWANIA	151

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* (Ps) 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 H₂O₂ 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 rearanżacji 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 ($RuBisCO_{1u}$) 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 reorganizacją 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 *Psi*, 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.

ABSTRACT

Stress associated with infection with pathogenic microorganisms is an important factor limiting growth and yielding of crop plants. The course of the plant – pathogen interaction, as well as its final result depend on the developmental stage of the plant, its physiological condition, defense mechanisms and pathogen characteristics. *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (Psl) belongs to hemibiotrophic pathogens and causes in *Cucurbitaceae*, including cucumber, the disease called angular leaf spot.

It is recognized that the appropriate plants response to stress at the cellular level depends on the coordination of metabolic pathways carried out by various compartments and on the efficient exchange of signals between them. A special role in these processes is attributed to chloroplasts and mitochondria that are considered as sensitive sensors of changes occurring in the environment, including pathogens infection. Chloroplasts and mitochondria generate and transmit retrograde signals to cell nucleus. These signals regulate the expression of genes that encode proteins involved in plant reactions to stress.

Abiotic and biotic stressors can cause a state of excess excitation energy which leads to universal consequences: disturbances in electron transport, increased reduction of plastoquinone (PQ) and generation of reactive oxygen species (ROS) responsible for oxidative stress when they are overproduced. However, it is believed that ROS also play an important role in redox signaling in the plant cell.

ROS level regulation and ROS-dependent redox signalization are under control of the antioxidant system. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and the ascorbate-glutathione (AA-GSH) cycle are crucial elements of this system. The essential function of the AA-GSH cycle is scavenging the excess of H₂O₂ and maintaining AA and GSH in reduced forms. The redox status of AA and GSH formed by: ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and glutathione reductase (GR) is also a source of redox signals and GSH together with thioredoxins (Trx), glutaredoxins (Grx) and peroxyredoxins (Prx) is involved in the regulation of activity of proteins important to plants in response to stress.

Metabolic regulations are important elements of maintaining the plants' homeostasis and they are needed to protect the balance between growth and stress defense processes. It is considered that sugars and respiratory metabolites, such as L-malic acid (L-MA) and oxaloacetic acid, likewise amino acids and enzymes, involved in photosynthesis metabolism, respiration and photorespiration, participate in the mechanism of generation, processing and perception of metabolic signals. Nicotinamide adenine dinucleotides: NAD(P)H and NAD(P)⁺ are the important regulators of metabolic pathways and redox signalization.

Recognition of the role of chloroplasts and mitochondria in the formation of oxidoreductive and metabolic signals in cucumber after *PsI* infection and determination of their importance for the development of local and systemic response to disease are the aim of this PhD thesis.

The study showed that *PsI* infection limited stomatal conductance and led to the limitation of gas exchange and transpiration. There was an increase in non-photochemical quenching (NPQ) value after pathogen attack. It was also shown that the net photosynthesis and the maximum quantum yield of photosystem II, PSII (Q_y) were decreased, while the intensity of mitochondrial respiration was increased suggesting metabolism rearrangement in favor of respiration. It may limited assimilates supplementation for the pathogen and provided energy and reducing power as NADH.

Antioxidants play an important role in plants reactions to stress. Post-infectious changes in SOD and CAT activities and in genes expressions encoding them indicated shifting the prooxidative balance in the early infection phase as well as the mobilization of the antioxidative protection dependent on SOD and CAT in the late infection phase. Changes in APX, DHAR, MDHAR and GR activity after infection as well as in [AA]/[DHA] and [GSH]/[GSSG] redox ratios, determined both at the cellular level and in chloroplasts, indicated activation of RFT, AA and GSH-dependent biotic stress signaling. AA accumulation both at the cellular level and in chloroplasts of the third true leaves could be responsible for antioxidant protection in the initial phase of pathogenesis. The mobilization of antioxidant defense characterized by the increase in both GSH content and GR activity was found in the late phase of pathogenesis, both in the chloroplasts and at the cellular level.

The decrease in net photosynthesis intensity could be coupled with a decreased expression level of the gene encoding 1,5-bisphosphoribulose carboxylase/oxygenase large subunit (RuBisCO_{lu}) in the third true leaves. Limitation of CO₂ supplementation accompanied by stomatal closure could lead to CO₂ assimilation mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) for which a post-infectious increase in the level of its gene expression was found. The reduction of D-glucose content was the consequence of limited photosynthesis rate and D-glucose could also be used for glucose-6-phosphate (G6P) biosynthesis catalyzed by hexokinase (HK). Increase in both G6P concentration and expression level of HK gene were found in the third true leaves. Increased G6P supplementation was coupled with an increase in the expression level of the gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) as well as an increase in G6PDH activity, which could have contributed to the formation of NADPH. The post-infectious reduction of the redox [NADPH]/[NADP⁺] ratio in the third true leaves could be associated with the consumption of NADPH in biosynthesis pathways of secondary metabolites important in defense reactions. The intensification of respiration was demonstrated by the post-infectious

increase in L-malic acid (L-MA) and oxaloacetic acid concentrations as well as an increase in L-malate dehydrogenase (L-MDH) and fumarase activities. L-MA accumulation could also activate malate shuttles responsible for deriving of reducing power from chloroplasts and mitochondria of the third true leaves. The increase in amino acids: Gly, L-Ser, L-Glu and L-Gln contents could be connected with the post-infectious rearrangement of nitrogen metabolism as well as could provide substrates to biosynthesis of metabolites important for defense reactions (for example GSH).

It was investigated how PQ redox status affects the development of *PsI*-induced disease, AA-GSH cycle enzymes-dependent antioxidant defense as well as sugars balance by using inhibitors of the photosynthetic electron transport chain: DCMU and DBMIB. It was shown that the PQ equilibrium disturbance both in favor of the reduced and oxidized form accelerates the appearance of infection symptoms. When the oxidized form in the PQ pool was dominant the increased disease symptoms were noted. On the other hand shifting PQ balance towards its reduced form was associated with the dissipation the excess excitation energy by non-photochemical way as well as promoted AA-dependent antioxidative defense.

This study showed that stress adaptation mechanisms were generated not only in infected leaves but also in leaves not being in direct contact with the pathogen. Similar trend of changes in studied parameters was found in the fifth true leaves of infected plants compared to the infected third true leaves. This trend could manifest the plants acclimatization and favor maintaining a balance between growth and defense against the biotic stress processes.

2. WSTĘP

2.1. Rośliny w warunkach stresu biotycznego

W ekosystemach naturalnych rośliny nieustannie poddane są wpływom niekorzystnych czynników środowiskowych. Każdy taki czynnik oraz reakcja przez niego wywoływana określane są mianem stresu. Wyróżnia się dwa rodzaje stresu: abiotyczny i biotyczny (Redondo-Gómez, 2013) (Tab. 1).

Tab. 1. Klasyfikacja stresowych czynników środowiska

Czynnik abiotyczny	Czynnik biotyczny
<p>Woda: Deficyt wody/susza Nadmiar wody/zalanie</p>	<p>Mikroorganizmy patogeniczne: Wirusy Bakterie Grzyby</p>
<p>Sole mineralne: Niedobór soli mineralnych Zasolenie</p>	<p>Rośliny: Konkurencja Pasożytnictwo Allelopatia</p>
<p>Temperatura: Wychłodzenie Stres cieplny</p>	<p>Zwierzęta: Zgryzanie Pasożytnictwo Zdeptanie</p>
<p>Promieniowanie: Niedobór/nadmiar promieniowania widzialnego Promieniowanie UV</p>	<p>Czynniki antropogeniczne: Zanieczyszczenia przemysłowe Użycie pestycydów</p>
<p>Gazy oddechowe: Niedobór O₂/CO₂ Nadmiar O₂/CO₂</p>	
<p>Skład podłoża: Obecność metali ciężkich Zakwaszenie Alkalizacja Uszkodzenia mechaniczne</p>	

2.1.1. Typy odporności roślin na patogeny

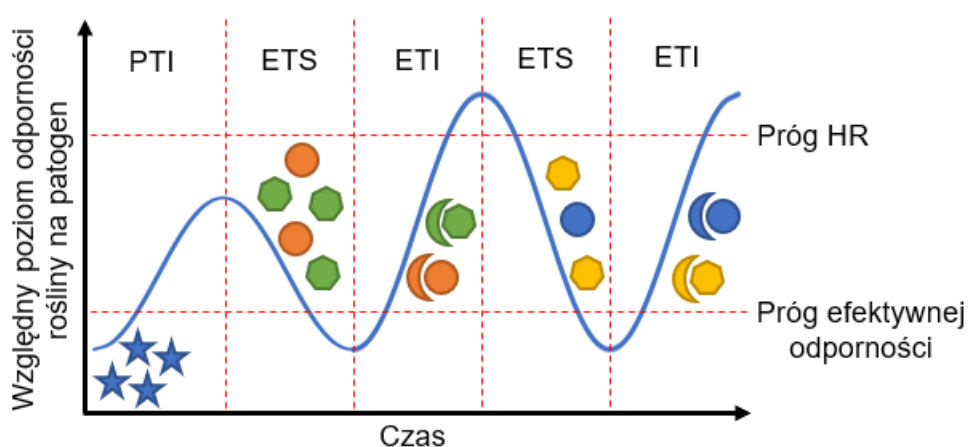
Przebieg i wynik interakcji roślina – patogen jest zależny od wielu czynników, m.in. wieku i kondycji fizjologicznej rośliny, jej mechanizmów obronnych oraz właściwości czynnika chorobotwórczego. Jednym z typów odporności roślin jest niegościnnność (ang. *non-host*).

Patogen nie może wówczas skolonizować rośliny z powodu istnienia naturalnych barier strukturalnych (ściana komórkowa, warstwa kutykuli) i biochemicznych – wytwarzania przez roślinę toksycznych metabolitów wtórnych (Jones i Dangl, 2006). Te konstytutywnie funkcjonujące mechanizmy obrony przed atakiem drobnoustrojów są wspomagane reakcjami indukowanymi. Rozpoznanie obecności patogena odbywa się przy udziale specyficznych receptorów PRRs (ang. *pattern recognition receptors*) w błonie plazmatycznej komórek roślinnych. Ich aktywacja uwarunkowana jest pojawieniem się swoistych dla patogenów wzorców molekularnych PAMPs (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) lub oligogalakturonidów uwalnianych przez roślinę podczas uszkodzenia tkanki, DAMPs (ang. *damage-associated molecular patterns*). W obu przypadkach reakcje te określa się jako odporność typu PTI (ang. *PAMP triggered immunity*). Percepcja PAMPs lub DAMPs przez PRRs skutkuje uruchomieniem wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej, w której uczestniczą m.in. reaktywne formy tlenu (RFT) oraz kationy Ca^{2+} , białka wiążące GTP (białka G), kinazy aktywowane mitogenami i hormony, takie jak kwas salicylowy (SA), kwas jasmonowy (JA), etylen, kwas abscysynowy (ABA) i auksyny. Efektem sygnalizacji z udziałem wymienionych czynników są zmiany w ekspresji określonych genów jądrowych i uruchomienie przez roślinę reakcji obronnych (Rys. 1) (Vidhyasekaran, 2014). Jednym z lepiej poznanych wzorców PAMP jest flagelina – białko budujące podjednostkę wici bakteryjnej, która jest niezbędna do ruchu mikroorganizmu (Ciarroni i wsp., 2018).

Gdy dochodzi do przełamania odporności rośliny przez patogen, staje się ona dla niego gospodarzem (ang. *host*) (Chisholm i wsp., 2006). Mikroorganizmy chorobotwórcze są wówczas w stanie zahamować lub całkowicie zablokować odporność typu PTI. Dzięki specyficznym efektorom (czynnikom wirulencji) dochodzi do rozwinięcia się u danego gatunku rośliny-gospodarza podatności na chorobę wywołaną przez efekторы – ETS (ang. *effector triggered susceptibility*). W odpowiedzi na dany efektor roślina mobilizuje określone białko NB-LRR (ang. *nucleotide-binding and leucine-rich repeat*). U roślin wykształca się wówczas odporność indukowana przez efekторы, ETI (ang. *effector triggered immunity*). ETI uważa się za rodzaj odpowiedzi PTI, w której dochodzi nie tylko do powstania odporności na chorobę, ale również do uruchomienia reakcji nadwrażliwości, HR (ang. *hypersensitive response*) polegającej na śmierci komórek rośliny-gospodarza w miejscu zakażenia i przez to zablokowaniu dalszego rozprzestrzeniania się infekcji (Miller i wsp., 2017; Jones i Dangl, 2006). Wykazano, że odporność typu ETI jest warunkowana obecnością u roślin czynnika R, natomiast awirulencja patogena (niezdolność do wywołania choroby) zależna jest od występowania u niego czynnika Avr. W obu przypadkach występowanie tych czynników podlega dziedziczeniu. W modelu gen na gen przyjmuje się, że na każdy roślinny gen odporności (R) przypada określony gen awirulencji (Avr) patogena. Model gen na gen zakłada, iż w wypadku próby kolonizacji rośliny, u której dochodzi do ekspresji genu R przez

patogen z aktywnym genem *Avr*, mikroorganizm chorobotwórczy zostaje rozpoznany, co w konsekwencji prowadzi do uruchomienia procesów obronnych i powstania odporności. W każdym z pozostałych przypadków (brak genu *R* lub *Avr*) u rośliny rozwija się choroba (Flor, 1971; Shehzadi i wsp., 2017).

Odporność rośliny warunkowana obecnością czynników *R* może być tłumiona pojawieniem się kolejnych efektorów u patogena lub eliminacją czynników *Avr*. Ekspresja kolejnych serii efektorów idzie jednak w parze z rozpoznawaniem ich przez nowe czynniki *R*. Podczas interakcji roślina – patogen dochodzi więc do nieustannego przeplatania się faz ETS oraz ETI. Schemat, w którym po pierwotnej fazie PTI obserwuje się okresową zmianę poziomu odporności rośliny na dany drobnoustrój chorobotwórczy i cykliczne przejścia ETS-ETI został określony jako model zygzaka (Rys. 1) (Jones i Dangl, 2006).



Rys. 1. Model zygzaka w interakcji roślina – patogen

Podczas próby kolonizacji przez patogen, roślina nie będąca dla niego gospodarzem manifestuje pierwotny typ odporności oparty na rozpoznaniu wzorców molekularnych swoistych dla patogenów lub oligogalakturonidów uwalnianych z uszkodzonych tkanek rośliny (PAMPs lub DAMPs, niebieskie gwiazdki). Dochodzi wówczas do ujawnienia się odporności PTI. W wyniku adaptacji patogenów i ekspresji specyficznych dla nich efektorów (czynników wirulencji, zielone siedmiokąty i pomarańczowe koła) dochodzi do przełamania PTI i podatności rośliny na ETS. W kolejnej fazie białka NB-LRR (zielony i pomarańczowy księżyc) rozpoznają określony efektor, co aktywuje ETI. Amplituda tego typu odporności jest większa niż dla PTI i często przekracza próg wywołania reakcji HR. Ekspresja kolejnych efektorów (żółte siedmiokąty, niebieskie koła) prowadzi do wytłumienia ETI i spadku odporności rośliny. Selekcja naturalna sprzyja jednak ekspresji kolejnych alleli dla białek NB-LRR (żółty i niebieski księżyc), które rozpoznają określone efekторы i wprowadzają roślinę w kolejną fazę ETI. Szczegółowy opis i wyjaśnienie skrótów w tekście nad rysunkiem.

Infekcja może doprowadzić do powstania w całej roślinie systemicznej odporności nabytej, SAR (ang. *systemic acquired resistance*) na ten sam lub inny czynnik chorobotwórczy. Może się ona ujawnić u roślin, u których rozwinęła się odpowiedź HR, ale również pod wpływem induktorów SAR, takich jak elicytory (Mishina i Zeier, 2007). W pierwszej fazie SAR dochodzi do rozpoznania patogena oraz powstania i transmisji sygnałów o infekcji do części rośliny, które nie mają bezpośredniego kontaktu z patogenem.

Następnie w komórkach docelowych dochodzi do rozpoznania tych sygnałów i uruchomienia mechanizmów aktywujących geny SAR. Ekspresja tych genów objawia się biosyntezą białek związanych z patogenezą (PR; ang. *pathogenesis-related proteins*) i fitoaleksyn, a także lignifikacją ścian komórkowych. Białka PR ograniczają rozwój patogenów i w efekcie hamują infekcję rośliny. Wyróżnia się 17 klas białek PR, a do najważniejszych z nich należą: lizozym, chitynazy i β -1,3-glukanazy rozkładające polimery ściany komórkowej patogenów (Ali i wsp., 2018). Fitoaleksyny powstają *de novo*, po ataku rośliny przez patogen. Są to związki mikrobójcze należące do różnych grup związków organicznych. Przykładami są niektóre flawanony, stilbeny i saponiny (Singh i Singh Chandrawat, 2017). Odkładanie lignin (polimerów związków fenolowych), a także suberyny, glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę i nieorganicznych związków wapnia i krzemu, jak również formowanie papilli na wewnętrznej powierzchni ściany komórkowej sprzyja wytworzeniu bariery ochronnej, której patogen nie może sforsować. Jest to wyraz uruchomienia przez roślinę strukturalnych mechanizmów obronnych. Przejawem SAR jest także gromadzenie kalozy w plazmodesmach. Dzięki temu przemieszczanie się mikroorganizmów z komórki do komórki ulega zahamowaniu (Métraux, 2001). Odporność SAR jest długotrwała (może trwać przez całą ontogenezę) i niespecyficzna, czyli skuteczna przeciwko różnym patogenom i nie jest dziedziczona w sposób klasyczny (Gao i wsp., 2015). Jednak rośliny z raz uruchomioną odpornością SAR skuteczniej radzą sobie z ponowną infekcją w porównaniu z reakcją roślin przy pierwszym kontakcie z patogenem. To zjawisko określa się mianem defensywnego primingu (Espinosa i wsp., 2016). Jako przyczynę tego zjawiska wymienia się udział mechanizmów epigenetycznych, polegających na regulacji ekspresji genów bez zmian w DNA. Niektóre zmiany epigenetyczne mogą utrzymywać się po ustąpieniu stresu i być przekazywane komórkom potomnym na drodze mitozy lub mejozy. Mowa wówczas o epigenetycznej pamięci stresu, która odpowiada za lepsze tolerowanie stresu przez rośliny kolejnych pokoleń. Wymienia się trzy podstawowe mechanizmy epigenetycznej kontroli genomu: wyciszanie genów przez małe RNA (sRNA), metylację DNA i modyfikację histonów (Lechowska i wsp., 2014). Wykazano przykładowo, że rośliny potomne *Arabidopsis thaliana*, których pokolenie rodzicielskie zakażone było *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Pst) wykazują zwiększoną odporność na szkodniki owadzie. Autorzy tych badań wiązali zaobserwowane zjawisko ze zwiększonym poziomem acetylacji dziewiątego aminokwasu (lizyna, Lys) w histonie 3 (H3K9) w promotorach genów indukowanych przez SA (Luna i Ton, 2012).

Wykazano, że w roślinach poddanych stresowi biotycznemu wywołanemu przez patogeny dochodzi do wzmożonej syntezy SA. Endogenne SA wykryto nie tylko w zainfekowanych tkankach, ale również w tych częściach rośliny, które nie miały uprzednio kontaktu z patogenem. Dowodzi to, że metabolit ten zaangażowany jest w indukcję SAR.

Sygnalizacja za pośrednictwem SA, prowadząca do SAR jest zależna od białka zawierającego powtórzenie ankiryiny, NPR1 (ang. *Non-expressor of Pathogenesis-Related genes*). W warunkach fizjologicznych białko NPR1 występuje w cytozolu w postaci nieaktywnego oligomeru. Po wystąpieniu stresu i akumulacji SA dochodzi do dysocjacji oligomeru NPR1 i powstania aktywnych monomerów, które ulegają translokacji do jądra komórkowego. Monomeryzacja NPR1 warunkowana jest stanem redoks komórki zależnym od GSH, który redukuje siarkę w wiązaniach disiarczkowych oligomeru NPR1. Wykazano, że do dysocjacji tego oligomeru wymagany jest odpowiedni poziom GSH w komórce. U *A. thaliana* infekowanego *P. syringae* pv *maculicola* ES4326 wykryto monomeryczną formę NPR1 przy stosunku [GSH]/[GSSG] przekraczającym 15:1 (Mou i wsp., 2003, Pieterse i Van Loon, 2004). W jądrze komórkowym monomery NPR1 wchodzi w interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi posiadającymi strukturę zamka leucynowego. Czynniki te wiążą motyw TGACG określonej sekwencji DNA, w wyniku czego dochodzi do ekspresji genów zależnych od NPR1 (Gao i wsp., 2015). Wykazano, że na aktywność NPR1 ma wpływ S-nitrozylacja tioli, która promuje oligomeryzację NPR1 i jego inaktywację, co hamuje SAR (Tada i wsp., 2008). Z motywem TGACG oddziałują również białka NPR3 i NPR4, które wiążą SA i działając jako adaptory ligazy E3 ubikwityny pośredniczą w degradacji NPR1 w sposób zależny od SA. Wykazano, że mutanty *npr3* i *npr4*, w których nie dochodzi do ekspresji NPR3 i NPR4 akumulują większe ilości oligomerów NPR1, a w konsekwencji odpowiedź SAR nie jest u nich wyzwolana (Fu i wsp., 2012). W miejscach inokulacji wysoki poziom SA sprzyja jego wiązaniu się z NPR3 mającym niskie powinowactwo do SA. Kompleks NPR3-SA pośredniczy w degradacji NPR1 będącym supresorem HR, co promuje programowaną śmierć komórki, PCD (ang. *programmed cell death*) oraz ETI. W miejscach, które nie mają bezpośredniego kontaktu z patogenem zawartość SA jest niska i wówczas wiąże się on wyłącznie z receptorem NPR4. Białko to ma wysokie powinowactwo do SA. Nie dochodzi zatem do równoległego kompleksowania SA z NPR3, dlatego degradacja NPR1 jest zahamowana. W ten sposób promowana jest ekspresja genów związanych z SAR (Mou i wsp., 2003).

Cząsteczka SA nie jest transportowana przez floem z zakażonych części rośliny do tkanek nie objętych infekcją. Uważa się, że lotna pochodna SA – salicylan metylu (MeSA) może być wydzielany do atmosfery przez np. zakażone liście roślin, a następnie docierać do części tej samej lub innej rośliny i wyzwać w niej SAR. W literaturze wymienia się także kilka innych metabolitów zaangażowanych w indukcję SAR: dehydroabietinal, kwas azelainowy, kwas pipekolowy, auksyny, glicerolo-3-fosforan i galaktolipidy (Gao i wsp., 2015).

Oprócz SAR wyróżnia się także systemiczną odporność indukowaną (ISR, ang. *induced systemic resistance*), która jest uruchamiana przez ryzobakterie promujące wzrost

roślin, bytujące w ryzosferze (PGPR, ang. *plant growth-promoting rhizobacteria*). Cechą charakterystyczną ISR jest to, iż nie jest ona związana z akumulacją SA. Za przekazywanie sygnałów wyzwalających ISR odpowiedzialne są natomiast JA i etylen. (Vallad i Goodman, 2004). Najnowsze badania wskazują, że niektóre mikroorganizmy PGPR, takie jak wybrane szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma* są zdolne do indukcji pośredniej (mieszanej) odporności, określanej mianem TISR (ang. *Trichoderma-Induced Systemic Resistance*), która łączy szlaki SAR i ISR. Wykazano, że w indukcji TISR mogą brać udział niektóre nienasycone aldehydy i alkohole oraz estry SA, które m.in. indukują ekspresję genów kodujących białka PR. Wśród nich wyróżnia się białka PR1 i PR5, które są charakterystyczne dla SAR oraz białka PR4, których obecność świadczy o aktywacji szlaków charakterystycznych dla ISR (Nawrocka i Małolepsza, 2013).

2.1.2. Interakcja ogórek siewny – *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (Psl)

Pseudomonas syringae pv *lachrymans* (Psl) jest jednym z 50 patowarów należących do domeny *Bacteria*, gromady *Proteobacteria*, klasy *Gammaproteobacteria*, rzędu *Pseudomonadales*, rodziny *Pseudomonadaceae*, rodzaju *Pseudomonas* i gatunku *Pseudomonas syringae*. Jest to Gram-ujemna, tlenowa, pałeczkowata bakteria właściwa nie wytwarzająca spor. Porusza się za pomocą 1-5 polarnych wici. Jej średnie rozmiary wynoszą 0,5-1,0 x 1,5-4,0 μm . Poszczególne patowary gatunku *P. syringae* charakteryzują się zróżnicowaną budową łańcuchów polisacharydowych tworzących błonę zewnętrzną komórki, co wpływa na specyfikę interakcji drobnoustroju z rośliną-gospodarzem. Od zewnątrz komórki Psl znajduje się gęsta otoczka złożona z polisacharydów: lewanu i alginianów, lipopolisacharydów i niewielkich ilości białek. Bakterie Psl hodowane na skosach z agarem odżywczym tworzą owalne, lekko wzniesione, gładkie, błyszczące i całobrzegie kolonie barwy białawej (Olczak-Woltman i wsp., 2008).

P. syringae pv *lachrymans* (Psl) jest patogenem hemibiotroficznym i wywołuje u roślin dyniowatych, w tym u ogórka chorobę nazywaną kanciastą plamistością liści (ang. *angular leaf spot*). Choroba ta uważana jest za jedną z najpoważniejszych (zaraz po mączniaku rzekomym) chorób tych roślin. Kanciasta plamistość liści ogórka występuje zarówno w uprawach polowych, jak i pod osłonami. Najczęstszymi miejscami wnikania patogena są naturalne otwory międzykomórkowe (m.in. aparaty szparkowe), a jego rozwojowi sprzyja duża wilgotność powietrza oraz mechaniczne uszkodzenie tkanek. Infekcja Psl obniża jakość plonów z uwagi na wytwarzanie mniejszych i porażonych chorobą owoców (Bhat i wsp., 2010).

Choroba wywoływana przez Psl daje objawy nie tylko na liściach, ale również na owocach, a nawet łodygach. Charakterystycznymi cechami kanciastej plamistości liści

ogórka są ciemnozielone, uwodnione plamy na spodniej stronie blaszki liściowej. Plamy te pozostają ograniczone wiązkami przewodzącymi. Przy dużej wilgotności względnej powietrza w miejscach bezpośrednio objętych infekcją pojawiają się śluzowate wycieki, które jako oznaki etiologiczne mogą ułatwiać zdiagnozowanie infekcji. W warunkach deficytu wody wycieki te zasychają i tworzą białe błonki. W zaawansowanym stadium bakteriozy na górnej powierzchni liści pojawiają się brązowe nekrozy, otoczone charakterystycznymi, chlorotycznymi obwódkami (halo). Infekcja hamuje również rozwój owoców, na których pojawiają się beżowe, miękkie, uwodnione plamy (Hossain i wsp., 2017, Olczak-Woltman i wsp., 2009). W zależności od podatności odmiany ogórka na infekcję *PsI*, kanciasta plamistość liści ogórka może wywoływać straty plonów od 30 do 60% (Kłosińska i wsp., 2014). W Polsce, w 2013 roku choroba wywoływana przez *PsI* wystąpiła z różnym nasileniem w województwach: lubelskim (39,0% porażenia liści), podkarpackim (28,0%), wielkopolskim (24,0%), świętokrzyskim (17,5%), łódzkim (14,0%), dolnośląskim (12,5%), małopolskim (11,5%), lubuskim (4,0%) i mazowieckim (3,3%) (Walczak i wsp., 2014).

Czynniki warunkujące patogeniczność *PsI* to: toksyny bakteryjne, bakteriocyny, enzymy, polisacharydy zewnątrzkomórkowe (EPS), fitohormony i siderofory (Olczak-Woltman i wsp., 2008). *PsI* wytwarza cztery toksyny należące do cyklicznych lipodepsypteptydów: syringopeptynę, syringomycynę, syringostatynę i syringotoksynę. Doprowadzają one do gwałtownej lizy ściany komórkowej i powstawania porów w błonie, co ostatecznie prowadzi do nekrozy tkanki. Bakteriocyny są białkami o dużej masie cząsteczkowej, wykazującymi toksyczność w stosunku do innych szczepów tego samego gatunku. Do enzymów wytwarzanych przez *PsI* należą poligalakturonazy, pektynazy i proteazy. Poligalakturonazy i pektynazy katalizują hydrolizę pektyn, z których zbudowana jest ściana komórkowa rośliny. Wykazano również, że w miarę rozwoju infekcji wzrasta aktywność proteaz, a w silnie uwodnionych miejscach objętych chorobą stwierdza się obecność wolnych aminokwasów pochodzących z hydrolizy białek liści rośliny (Olczak-Woltman i wsp., 2008). Polisacharydy zewnątrzkomórkowe (lewan i alginian) są odpowiedzialne za powstawanie uwodnionych plam w miejscu infekcji. Podczas lizy komórek do przestrzeni międzykomórkowych wypływa woda zawierająca jony, aminokwasy i białka, niezbędna do rozwoju bakterii. Panuje pogląd, iż rolą EPS jest ochrona komórek bakteryjnych przed wysychaniem i indukowanymi mechanizmami obronnymi rośliny. Wśród fitohormonów wytwarzanych przez *PsI*, które najprawdopodobniej biorą udział w patogenezie wyróżnia się auksyny, cytokininy i etylen. Siderofory to związki chemiczne o małej masie cząsteczkowej, które tworzą kompleksy z jonami Fe^{3+} . Dzięki wychwytywaniu tych jonów ze środowiska i ich chelatowaniu, *PsI* może namnażać się na pożywkach ubogich w żelazo. Przykładem sideroforu jest fluoresceina (Olczak-Woltman i wsp., 2008).

Identyfikacja bakterii z gatunku *P. syringae* na podstawie objawów choroby, jakie ta bakteria wywołuje sprawia trudności. Zdarza się, że choroba manifestuje się innymi oznakami niż charakterystyczne, kanciaste plamy z chlorotyczną obwódka. W celu właściwej identyfikacji patogena wykonuje się testy diagnostyczne bakterii wyizolowanych z porażonych liści. W pierwszym etapie przeprowadza się test na fluorescencję komórek bakteryjnych na pożywce King B, na świetle UV. W kolejnej fazie prowadzi się testy biochemiczno-fizjologiczne pozwalające na wyodrębnienie gatunku *P. syringae* wśród bakterii, które wykazały fluorescencję w nadfiolecie. Najbardziej znanym jest test LOPAT (Olczak-Woltman i wsp., 2007). Polega on na analizie zdolności wytwarzania przez bakterię lewanu (L), pomiarze aktywności oksydazy cytochromowej c (O), analizie aktywności pektynolitycznej (P), sprawdzeniu wytwarzania dihydrolazy argininy (A) oraz wywołaniu reakcji nadwrażliwości u tytoniu (T). Lewan jest wytwarzany przez wszystkie patowary z gatunku *P. syringae*. Zbudowany jest z reszt fruktozy, które pochodzą z cząsteczek sacharozy. Na pożywce zawierającej sacharozę *P. syringae* tworzy wypukłe, błyszczące kolonie, co jest jednym z dowodów na obecność w izolacie patowarów tego gatunku. W teście O wykorzystuje się specjalne pałeczki z indykatorem redoks, które w kontakcie z kolonią bakterii wykazujących aktywność oksydazy cytochromu c zmieniają barwę na amarantową. W przypadku *P. syringae* reakcja zmiany barwy nie zachodzi. W analizie aktywności pektolitycznej na przekrojoną bulwę ziemniaka nakłada się kultury bakterii i obserwuje rozkład tkanki. U *Psl* można wykazać słabą aktywność pektolityczną. Test A polega na wykryciu aktywności dwóch enzymów: desmidazy argininy i ureidazy cytruliny. Enzymy te katalizują reakcję powstawania ATP z argininy z jednoczesnym wydzieleniem CO₂ i NH₃. Powstawanie NH₃ jest reakcją wskaźnikową, którą przeprowadza się na pożywce Thornley'a. Patowary *P. syringae* nie posiadają enzymów rozkładających argininę i wynik testu na obecność NH₃ w pożywce jest negatywny. Inokulacja liści tytoniu *Psl* prowadzi po 24 h od aplikacji drobnoustroju do gwałtownego obumierania miękiszu i powstawania jasnej nekrozy tkanki w miejscu inokulacji, co potwierdza wyzwolenie reakcji HR przez ten patowar. Biochemiczno-fizjologiczne testy identyfikacyjne nie są jednak doskonałe: wymagają dużego nakładu czasu i nie zawsze dają jednoznaczny wynik. Istnieją szczepy, zwłaszcza w obrębie *Psl*, które nie wykazują fluorescencji na pożywce King B lub manifestują silną aktywność pektolityczną. Z tego powodu coraz częściej prowadzi się identyfikację drobnoustrojów metodami biologii molekularnej. Pozwalają one na szybkie znalezienie różnic w sekwencjach DNA między patowarami poszczególnych gatunków lub między szczepami w obrębie patowaru (Olczak-Woltman i wsp., 2007).

Bakteryjna plamistość liści ogórka występuje na terenie całej Polski. Walka chemiczna z patogenem opiera się na opryskiwaniu roślin fungicydami zawierającymi chlorek triwodorotlenek dimiedzi, wodorotlenek miedzi (II) i siarczan diwodorotlenek dimiedzi.

Preparat aplikuje się przed sezonem kwitnienia ze względu na fitotoksyczny wpływ fungicydu na kwiaty i owoce. Najlepszą strategią przeciwdziałania infekcji wywołanej przez *PsI* jest uprawa odmian odpornych na patogena. Niestety, odporność linii ogórka otrzymanych dotychczas, które pierwotnie nie były infekowane przez *PsI* została przełamana. Obecnie nie są znane odmiany całkowicie odporne na *PsI*. Dlatego prowadzone są prace nad oceną wybranych linii ogórka siewnego pod kątem odporności zarówno w fazie liścieni, jak i pierwszych liści na chorobę wywołwaną przez *PsI* (Kłosińska i wsp., 2014).

2.2. Współdziałanie regulacyjne chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi roślin na stres

Kompartamentacja komórki jest cechą charakterystyczną wszystkich organizmów eukariotycznych. Sprzyja to przestrzennej i czasowej separacji szlaków metabolicznych oraz ich niezależnej regulacji. Z drugiej strony fizyczne oddzielenie poszczególnych organelli wymaga koordynacji ich aparatu enzymatycznego oraz sprawnego transportu metabolitów (Jarvis i López-Juez, 2013). Zgodnie z założeniami teorii endosymbiozy, chloroplasty i mitochondria wyewoluowały z komórek sinic lub wolno żyjących bakterii, które stworzyły symbiotyczny układ z komórkami innych organizmów. W wyniku ewolucji część genów chloroplastów i mitochondriów została przechwycona przez jądro komórek eukariotycznych, jednak niewielki fragment genomu chloroplastowego i mitochondrialnego został w tych organellach zachowany (Bayer i wsp., 2014). Z uwagi na fakt, iż nie tylko jądro komórkowe posiada własny materiał genetyczny, istnieje konieczność sprawnej, dwukierunkowej komunikacji na drodze chloroplasty-mitochondria-jądro komórkowe, która zapewnia koordynację ekspresji genów i prawidłowe funkcjonowanie ogólnego metabolizmu komórkowego (Kmieciak i wsp. 2016).

2.2.1. Znaczenie stanu nadmiaru energii wzbudzenia w chloroplastach w uruchamianiu reakcji odpornościowych

Ostatnie lata badań w dziedzinie fizjologii stresu u roślin pozwoliły opracować koncepcję, zgodnie z którą chloroplasty uważane są za czułe sensory zmian zachodzących w środowisku, w tym także związanych z infekcją patogenami. Organelle te są nie tylko miejscem, w którym zachodzą reakcje jasnej i ciemnej fazy fotosyntezy, ale stanowią również ważne centrum szlaków biosyntetycznych, w którym powstają hormony stresu (np. ABA), metabolity wtórne (niektóre izoprenoidy i pochodne erytrozo-4-fosforanu), a także reaktywne formy tlenu (RFT) i związki uczestniczące w sygnalizacji redoks, które modulują ekspresję genów jądrowych i są odpowiedzialne za uruchomienie reakcji obronnych przeciw patogenom (Delprato i wsp., 2015). Rośliny odbierają bodziec świetlny i reagują na jego jakość (skład widmowy), natężenie oraz czas trwania. W komórce roślinnej każda z tych

właściwości podlega określonym regulacjom. Natężenie i całkowita ilość pochłanianego przez roślinę światła wpływają bezpośrednio na chloroplasty i aparat fotosyntezy. Pierwotnymi objawami zakłóceń związanych z niewłaściwym oświetleniem są: zmiany w statusie redoks fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, intensyfikacja wytwarzania tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$) oraz wzmożona produkcja anionorodnika nadadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$), nadtlenku wodoru (H_2O_2) oraz rodnika hydroksylowego (OH^{\cdot}) (Christie i wsp., 2014). W wielu pracach podkreśla się dualistyczną naturę RFT. Pierwotnie uważano je jedynie za uboczne produkty metabolizmu tlenu, których nadprodukcja prowadzi do stresu oksydacyjnego i zniszczenia struktury biomolekuł, takich jak lipidy, białka i kwasy nukleinowe. Jednak w odpowiednim stężeniu RFT są istotnym elementem złożonej sieci sygnalizacyjnej uruchamianej pod wpływem stresu, w tym stresu biotycznego (Foyer i wsp., 2017). Funkcje RFT u roślin są ściśle związane ze ścieżkami sygnalizacyjnymi regulowanymi przez fitohormony. Dowiedziono, że RFT współdziałają z etylenem, SA, JA, a także auksynami, cytokininami i giberelinami kontrolując wzrost i rozwój roślin (Zwack i wsp., 2016). Poziom RFT wpływa na stan redoks wielu metabolitów, które w komórce tworzą pozostającą w równowadze termodynamicznej parę form: zredukowaną i utlenioną. Takimi metabolitami są np. tiole. Uznaje się, że RFT interferują z tiolami w reakcjach syntezy SA oraz uczestniczą w sygnalizacji związanej z SA (Han i wsp., 2013). Efekty współdziałania RFT z elementami ścieżek sygnalizacyjnych są zależne od rodzaju RFT, związku, z którym interferują oraz typu komórki, w której interakcja ma miejsce. Oprócz wpływu toksycznego, działanie RFT może mieć charakter regulacyjny lub naprawczy, a także prowadzić do PCD. W ostatnim przypadku wskazuje się na kluczową rolę eliminacji niektórych komórek w generowaniu odporności całej rośliny (del Pozo, 2016).

RFT wytwarzane w tylakoidach chloroplastów podczas jasnej fazy fotosyntezy mogą odgrywać zasadniczą rolę jako przekaźniki sygnałów pochodzących ze środowiska, które dostarczają komórce informacji o jego stanie. Przykładowo $^1\text{O}_2$, który powstaje w wyniku przeniesienia nadmiaru energii wzbudzenia z chlorofilu trypletowego na cząsteczkę tlenu trypletowego ($^3\text{O}_2$) utlenia białka i lipidy błonowe, co traktuje się jako jeden z pierwszych efektów sygnalizacji kierowanej z fotosystemu II (PSII) do jądra komórkowego (Foyer i wsp., 2017). Inaktywacja oksydacyjna PSII, zwłaszcza białek D1 i D2 przez $^1\text{O}_2$ wiąże się z koniecznością ich ciągłej biosyntezy nawet kilka razy w ciągu godziny. Równoległe z tym procesem odbywa się degradacja utlenionych białek PSII przez specyficzne proteazy. Uważa się, że produkty rozpadu białka D1 mogą pełnić rolę cząsteczek sygnałowych regulujących ekspresję genów jądrowych, jednak hipoteza ta nie została jak dotąd potwierdzona u roślin wyższych (Malnoë i wsp., 2014). Oprócz komponentów PSII wrażliwe na utlenianie przez $^1\text{O}_2$ są także wielonienasycone kwasy tłuszczowe i lipidy błonowe. Produkty ich peroksydacji, w tym oksylipiny uważane są za markery uszkodzeń

fotooksydacyjnych (Allahverdiyeva i wsp., 2015; Delprato i wsp., 2015). Najlepiej poznane ścieżki transdukcji sygnałów wyzwalanych w chloroplastach i kierowanych do jądra komórkowego (tzw. sygnalizacja retrogradowa, rozdział 2.2.4), zależnych od $^1\text{O}_2$ oparte są o oddziaływanie z β -karotenem oraz kodowanymi przez geny jądrowe białkami chloroplastowymi EXECUTER 1 i 2 (EX1, EX2) (Shumbe i wsp., 2016). Utlenianie β -karotenu i innych karotenoidów przez $^1\text{O}_2$ prowadzi do ich rozpadu. Produkty degradacji karotenoidów oraz białka EX1 i EX2 niezależnie od siebie uruchamiają lokalne i systemiczne szlaki sygnałowe prowadzące do zmian ekspresji genów, które stanowią podstawę aklimatyzacji do stresu (Carmody i wsp., 2016). $^1\text{O}_2$ może być także wytwarzany w chloroplastach podczas biosyntezy chlorofilu. Wykazano, że mutant *flu* (ang. *fluorescent*) *A. thaliana* akumuluje w ciemności protochlorofilid (prekursor chlorofilu). Ekspozycja tego mutantu na światło inicjowała przekształcenie protochlorofilidu w chlorofil, czemu towarzyszyło wzmożone generowanie $^1\text{O}_2$. Mogło być to związane z przekazywaniem części energii świetlnej niewykorzystanej do przekształcenia protochlorofilidu w chlorofil na cząsteczkę $^3\text{O}_2$ (Delprato i wsp., 2015).

Do powstawania RFT w chloroplastach przyczynia się także „wyciek” elektronów z fotosystemu I (PSI) i redukcja cząsteczki O_2 zamiast NADP^+ . Reakcja ta jest znana jako reakcja Mehlera (cykl woda-woda). Jest ona sprzężona z transportem protonów z wnętrza tylakoidów do stromy i powstawaniem ATP bez jednoczesnej redukcji NADP^+ (Dietz i wsp., 2015; Foyer i wsp., 2017). Powstający w reakcji Mehlera $\text{O}_2^{\cdot-}$ jest redukowany do H_2O_2 przy udziale tylakoidowej miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej (CuZnSOD). H_2O_2 ulega następnie redukcji przez kwas askorbinowy (AA) do wody, a reakcję tę katalizuje w chloroplastach peroksydaza askorbinianowa (APX) (Awad i wsp., 2015). Zużycie łącznie czterech moli elektronów pochodzących pierwotnie z fotolizy wody do pełnej redukcji jednego mola O_2 umożliwia rozproszenie nadmiaru energii wzbudzenia i zagospodarowanie elektronów w pseudocyklicznej fosforylacji, chroniąc aparat fotosyntetyczny przed uszkodzeniami. Cykl woda-woda jest ważnym źródłem sygnałów redoks zależnych od RFT, które w warunkach stresu są przenoszone do jądra komórkowego (Foyer, 2018). W szczególności, produkt pośredni reakcji Mehlera – H_2O_2 z uwagi na swój relatywnie długi okres półtrwania może docierać bezpośrednio do jądra komórkowego działając jako sygnał o stanie metabolicznym chloroplastów (Exposito-Rodriguez i wsp., 2017; Foyer, 2018).

Potencjały redoks $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 są relatywnie niskie w porównaniu z potencjałem $^1\text{O}_2$. W chloroplastach i mitochondriach $\text{O}_2^{\cdot-}$ jest szybko redukowany do H_2O_2 przy udziale SOD, jak również na drodze nieenzymatycznej przy udziale antyoksydantów takich jak AA. O ile enzymy cyklu Calvina-Bensona nie są inaktywowane przez $\text{O}_2^{\cdot-}$, to ulegają inaktywacji przez H_2O_2 . W mitochondriach natomiast $\text{O}_2^{\cdot-}$ może utlenić np. akonitazę – enzym cyklu Krebsa (Foyer, 2018).

Wszystkie czynniki stresowe, bez względu na pochodzenie, mogą wywoływać stan nadmiaru energii wzbudzenia, która nie może być wykorzystana w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów. Stan nadmiaru energii wzbudzenia jest spowodowany obniżeniem sprawności fotosystemów, ich uszkodzeniami, a także zmianami warunków wegetacji roślin. Może go wywołać zarówno zbyt silne światło, jak i susza, zranienie, czy atak patogena. Stan nadmiaru energii wzbudzenia prowadzi do uniwersalnych następstw: zaburzenia transportu elektronów, wzmożonej redukcji plastochinonu (PQ) i generowania RFT. Uniwersalne są również mechanizmy odpowiedzialne za dostosowanie rośliny do stanu nadmiaru energii wzbudzenia: rozpraszanie tej energii na drodze niefotochemicznej (NPQ, ang. *Non-Photochemical Quenching*), usuwanie RFT przez antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne oraz generowanie sygnałów retrogradowych wysyłanych do mitochondriów i jądra komórkowego. W rezultacie dochodzi do zmiany ekspresji genów, ale nie tylko związanych z optymalizacją fotosyntezy, lecz również prowadzących do uruchomienia reakcji obronnych, w tym zależnych od SA. Odpowiedź ta zachodzi zarówno na poziomie lokalnym, jak i systemicznym (Szechyńska-Hebda i Karpiński, 2013). Powstawanie RFT w stanie nadmiaru energii wzbudzenia i ich uniwersalna rola w przekazywaniu sygnałów bez względu na rodzaj bodźca zewnętrznego (nadmiar promieniowania, odwodnienie, stres biotyczny, itd.) nie oznacza jednak indukowania w jednakowym stopniu ekspresji tych samych genów i uruchamiania identycznych odpowiedzi rośliny na różne stresory. Regulacja specyficznych reakcji ze strony rośliny jest uzależniona od kombinacji trzech czynników: typu RFT, ich lokalnego poziomu progowego, a także lokalizacji komórkowej, gdzie dane RFT powstają. Istotna jest także zróżnicowana regulacja poziomu RFT przez elementy systemu antyoksydacyjnego w różnych kompartmentach komórki (Karpiński i wsp., 1999). Z tego względu różne czynniki stresowe, a nawet ten sam stresor w zależności od natężenia indukują specyficzne wzory ekspresji genów zaangażowanych w obronę, w tym kodujących enzymy antyoksydacyjne. Można zatem powiedzieć, że unikatowa kombinacja czynników: rodzaj i stężenie oraz wydajność usuwania RFT jest funkcją różnowartościową zmiennej niezależnej, jaką jest stresor (Mateo i wsp., 2004). Eksperyment, w którym rośliny *A. thaliana* przenoszono ze standardowych warunków oświetlenia ($150 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na światło o niskim, wysokim lub bardzo wysokim natężeniu wykazał, że określona zmiana oświetlenia indukuje specyficzne zmiany ekspresji genów. W roślinach przeniesionych na światło o niskim natężeniu ($50\text{-}75 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$) stwierdzono ekspresję peroksysomowej izoformy SOD (CSD3) i zlokalizowanej w błonie komórkowej peroksydazy glutationowej GPX5. Rośliny umieszczone na świetle o wysokim natężeniu ($400 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$) manifestowały podwyższoną aktywność chloroplastowych enzymów biorących udział w reakcji Mehlera: chloroplastowej izoformy SOD (FSD3), stromalnej APX (sAPX) oraz peroksydaz

glutationowych GPX6 i GPX7, a także cytozolowych izoform APX (APXs) i reduktazy dehydroaskorbinianowej DHAR1. W przypadku bardzo wysokiego natężenia światła ($1000\text{-}1800 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$) stwierdzono podwyższony poziom ekspresji APX2 (Szechyńska-Hebda i Karpiński, 2013).

Indukcję reakcji odpornościowych roślin zależną od chloroplastowych RFT analizowano także u transgenicznej odmiany tytoniu z nadekspresją flawodoksyny działającej jako antyoksydant chroniący komponenty fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów przed inaktywacją oksydacyjną. Skutkiem działania flawodoksyny jest obniżenie poziomu chloroplastowych RFT przy jednoczesnym braku wpływu na stężenie biologicznie aktywnych form SA i JA oraz ekspresję genów kodujących białka PR (Zurbriggen i wsp., 2009). Wykazano również, że potraktowanie egzogenną koronatiną (COR) *Nicotiana benthamiana* z wyciszoną ekspresją genu kodującego chloroplastową peroksyredoksynę 2-Cys Prx wywołało nekrozę komórek. 2-Cys Prx zaangażowana jest w usuwanie H_2O_2 , a COR jest fitotoksyną wytwarzaną przez zjadliwe szczepy *Pseudomonas*, m.in. *Pst*. Wyciszenie ekspresji genu 2-Cys Prx u *N. benthamiana* wywołało utratę zdolności do skutecznej obrony antyoksydacyjnej i wyłączenie mechanizmów prowadzących do wytworzenia homeostazy redoks między H_2O_2 i systemem detoksykacji RFT. Aplikacja COR skutkowałą akumulacją chloroplastowego H_2O_2 w ilości przekraczającej próg toksyczności dla *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją genu kodującego 2-Cys Prx i prowadziła do negatywnych zmian w postaci zmian nekrotycznych. Stwierdzono jednak, że u tego samego gatunku rośliny z zahamowaną ekspresją genu kodującego 2-Cys Prx nie dochodzi do nekrozy komórek w odpowiedzi na *Pst*, który wyzwała u *N. benthamiana* odpowiedź typu niegościnnosc (Ishiga i wsp., 2012). Wykazano ponadto, że u *A. thaliana* i roślin pomidora po inokulacji *Pst*, który wytwarza COR, tłumiona jest ekspresja genów kodujących peroksyredoksyny 2-Cys Prx, Prx IIE i Prx Q. Dochodzi wówczas do akumulacji chloroplastowego H_2O_2 i szybkiego rozprzestrzeniania się infekcji. Na obszarach objętych chorobą pojawiają się zmiany chlorotyczne, a później także zmiany nekrotyczne, które otaczają miejsca zajęte przez chlorozę. Aplikacja egzogennej COR wywołała podobne zmiany wyłącznie u pomidora, co sugeruje, że COR w połączeniu z innymi efektorami różnie kształtuje intensywność wytwarzania RFT i specyficznie indukuje nekrozę u różnych gatunków roślin (Ishiga i wsp., 2012).

Istotną rolę w generowaniu odpowiedzi roślin na stres nadmiaru energii wzbudzenia pełni również plastochinon (PQ). Wykazano, że ekspozycja *A. thaliana* na nadmiar światła białego lub promieniowania o długości fali $\lambda = 680 \text{ nm}$ wywołuje śmierć komórkową. Z kolei traktowanie tych roślin 3,4-dichlorofenyl-1,1-dimetylomocznikiem (DCMU), który działa po akceptorowej stronie plastochinonu Q_B i hamuje utlenianie plastochinonu Q_A oraz redukcję PQ skutkuje zablokowaniem transportu elektronów, inhibicją wytwarzania H_2O_2 ,

zmniejszeniem NPQ oraz zamknięciem aparatów szparkowych. Natomiast traktowanie liści *A. thaliana* 2,5-dibromo-3-metylo-6-izopropyl-*p*-benzochinonem (DBMIB) skutkuje zahamowaniem przepływu elektronów ze zredukowanego PQ na kompleks cytochromowy b_6f i wzmożonym wytwarzaniem H_2O_2 oraz wzrostem NPQ i zamknięciem aparatów szparkowych. Dowiedziono również, że DCMU blokuje, a DBMIB promuje przejście z metabolizmu C_3 na CAM u *Mesembryanthemum crystallinum*. Taka zmiana metaboliczna może być również indukowana nadmiarem energii wzbudzenia, zasoleniem i atakiem patogenów. Wyniki te świadczą o kluczowej roli stanu redoks PQ oraz znaczeniu NPQ w regulacji śmierci komórkowej w warunkach nadmiaru energii wzbudzenia (Karpieński i wsp., 2013).

Chloroplasty nie są jedynym źródłem RFT w komórce roślinnej. Powstawaniem RFT sprzężone jest z metabolizmem niemalże wszystkich innych kompartmentów: mitochondriów, peroksysomów, glioksysomów, a także cytozolu i apoplastu. RFT wytwarzane w wielu organellach stanowią uniwersalny sygnał i mogą być wykorzystywane w różnych ścieżkach sygnalizacyjnych. W błonie komórkowej funkcjonuje oksydaza NADPH, która katalizuje reakcje utleniania frakcji cytozolowej NADPH przez tlen, co prowadzi do powstawania O_2^- i H_2O_2 w apoplaste (Sagi i Fluhr, 2006). Sygnały redoks, wynikające z wzajemnego oddziaływania RFT i antyoksydantów mogą być przekazywane lokalnie, z komórki do komórki i systemicznie na zasadzie fali RFT (Schmitt i wsp., 2014). Autopropagacyjny charakter fali RFT oznacza, iż każda komórka na drodze transferu sygnałów redoks aktywuje niezależnie błonową oksydazę RBOH (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homologue*), co prowadzi do wytwarzania RFT w apoplaste. Fala RFT może działać zatem jako sygnał stresu mający swoje źródło w komórce bezpośrednio narażonej na czynnik stresowy i rozprzestrzeniający się systemicznie. Ten długodystansowy transport sygnałów redoks jest wspomagany jonami Ca^{2+} i hormonami (Bechtold i wsp., 2005 i 2008; Mittler i wsp., 2011; Gilroy i wsp., 2014). Na podstawie eksperymentów z udziałem mutantów *AtrbohD* i *AtrbohF* *A. thaliana* wykazujących nadekspresję genów kodujących oksydazy RBOH stwierdzono, że enzymy te odpowiadają za wybuch tlenowy i wzmożone wytwarzanie O_2^- po infekcji roślin np. awirulentnym patogenem *Pst*. Uważa się, że oksydaza AtRBOHF ma również większy wpływ na aktywację śmierci komórkowej niż oksydaza AtRBOHD (Torres i wsp., 2002). Istnieją mutanty, u których reakcja HR wyzwalana po infekcji wirulentnym patogenem zachodzi w sposób niekontrolowany. Należą do nich mutanty *Isd1* (ang. *lesion simulating disease 1*) *A. thaliana*. Wykazują one objawy niekontrolowanej śmierci komórkowej, RCD (ang. *Runaway Cell Death*), charakteryzujące się niezdolnością do ograniczenia postępu śmierci komórkowej po jej zainicjowaniu. Wykazano, że ta cecha jest indukowana przez egzogenne O_2^- (Aviv i wsp., 2002). Wybuch tlenowy wywołuje lokalną akumulację SA w komórkach sąsiadujących z miejscem infekcji oraz inicjuje ekspresję genów kodujących

białka odpowiedzialne za obronę, w tym enzymów antyoksydacyjnych. Niemożność akumulacji SA u mutantu *Isd1* hamuje RCD. Wykazano, że utrata funkcji AtRBOHD sprzyja śmierci komórkowej, co jest zależne od SA. Zatem RFT generowane przez AtRBOHD mogą działać antagonistycznie z sygnałami zależnymi od SA, które prowadzą do śmierci komórek w obszarach sąsiadujących z miejscami objętymi infekcją. Taki mechanizm ma na celu stłumienie śmierci komórkowej w obliczu rosnącego poziomu SA, który jest niezbędny do zainicjowania odpowiednich reakcji obronnych poza pierwotnym obszarem zakażenia (Dangl i Jones, 2001; Karpiński i wsp., 2013). Mutanty *Isd1* wykazują również zmniejszoną przewodność szparkową, zmniejszoną aktywność katalazy (CAT), a także zwiększoną akumulację etylenu i H_2O_2 w warunkach RCD (Mateo i wsp., 2004; Mühlenbock i wsp., 2007).

Powstawanie RFT jest również związane z aktywnością innych oksydaz niż homologi RBOH. Wykazano, że oksydaza szczawianowa uczestniczy w wytwarzaniu RFT w komórkach korzenia kukurydzy poddanej stresowi suszy (Voothuluru i Sharp, 2013). Stwierdzono również, że enzym szlaku fotooddychania, oksydaza glikolanowa jest istotnym elementem zaangażowanym w odpowiedź rośliny typu niegościnność na patogeny. U *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją genu kodującego oksydazę glikolanową oraz u mutantu *A. thaliana* posiadającego w genomie insercję T-DNA kodującego oksydazę glikolanową występuje osłabienie odpowiedzi typu niegościnność na infekcję *Pst*. Ponadto stwierdzono, że u wspomnianego mutantu *A. thaliana* dochodzi do obniżenia akumulacji H_2O_2 , redukcji depozycji kalozy i zmniejszenia wycieku elektrolitów po inokulacji *Pst* (Rojas i wsp., 2012).

Ważnym źródłem RFT, które mogą działać jako sygnały są także mitochondria. Mitochondrialny enzym, dehydrogenaza proliny (ProDH) uczestniczy w powstawaniu reakcji HR i intensyfikacji wytwarzania RFT przez dostarczanie elektronów do łańcucha oddechowego. Wykazano, że mutanty z wyciszoną ekspresją genu ProDH gromadzą mniej RFT i odznaczają się zmniejszoną intensywnością lokalnej śmierci komórkowej oraz słabszą reakcją na awirulentne patogeny (Cecchini i wsp., 2011). Zaburzenia stanu redoks w mitochondriach wpływają na komórkową homeostazę redoks. Przepływ elektronów w mitochondrialnym łańcuchu transportu może kontrolować biosyntezę AA, ponieważ enzym uczestniczący w jego powstawaniu, dehydrogenaza L-galaktono-1,4-laktonowa jest zasocjowana z kompleksem I dehydrogenazy NADH i wykorzystuje utleniony cytochrom c jako jedyny akceptor elektronów (Millar i wsp., 2003). Ponadto powstający w mitochondriach kwas L-jabłkowy (L-MA) odpowiada za równowagę redoks między chloroplastami i mitochondriami. Chloroplastowa dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NADPH, której aktywność regulowana jest przez tioredoksynę (Trx) wykorzystuje nadmiar NADPH do redukcji szczawiooctanu w celu zregenerowania $NADP^+$ i zapobieżenia fotoinhibicji. Jednak skuteczność tego mechanizmu zależy od gradientu L-MA między chloroplastami i cytozolem,

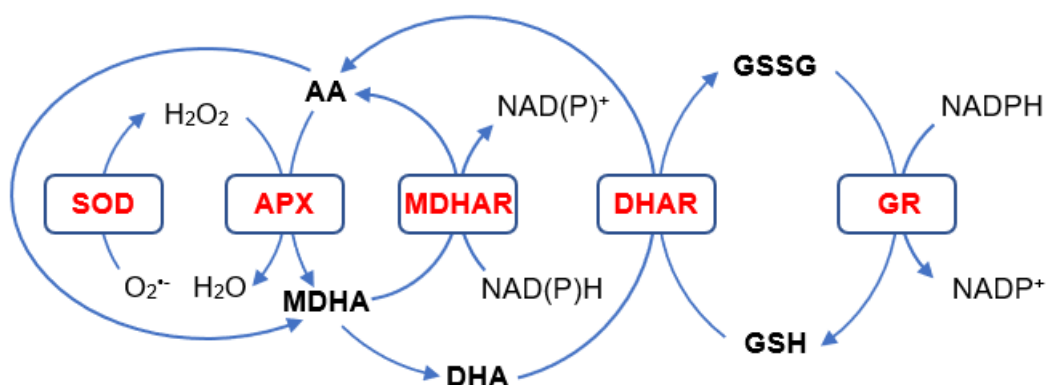
a wzrost stężenia L-MA w cytozolu sprzężony jest z jego wyższą zawartością w mitochondriach (Nunes-Nesi i wsp., 2008). Wykazano również, że alternatywna oksydaza mitochondrialna (AOXM) kontroluje stan redoks mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów i zapobiega nadmiernej redukcji jego komponentów ze względu na kierowanie elektronów na cząsteczkę O_2 zamiast na kompleksy III i IV łańcucha oddechowego. U tytoniu z obniżoną aktywnością AOXM stwierdzono podwyższony poziom $O_2^{\cdot -}$ w mitochondriach. Wykazano również podwyższoną zawartość NO w liściach roślin, w których aktywność AOXM była zahamowana, co świadczy o tłumieniu przez ten enzym tworzenia NO (Vanlerberghe, 2013).

2.2.2. Znaczenie cyklu askorbinian-glutation w stresie biotycznym u roślin

Stan redoks komórki jest kształtowany przez zależny od pH potencjał redoks każdej sprzężonej pary reduktor-utleniacz. Wpływ na położenie stanu równowagi termodynamicznej w obrębie każdej z par redoks mają warunki utleniająco-redukujące w komórce, zależne od stężenia RFT i antyoksydantów nieenzymatycznych oraz aktywności antyoksydantów enzymatycznych. Jednymi z najważniejszych antyoksydantów funkcjonujących w komórce roślinnej są kwas askorbinowy (AA) i glutation (GSH) (Kuźniak i wsp., 2017). Związki te są reagentami cyklu askorbinian-glutation (AA-GSH), którego zasadniczą funkcją jest usuwanie nadmiaru H_2O_2 oraz utrzymywanie AA i GSH w formie zredukowanej. Cykl AA-GSH zachodzi w chloroplastach, mitochondriach, peroksysomach i cytoplazmie (Kozłowska-Szerenos i Ciereszko, 2013). AA i GSH mogą bezpośrednio przekazywać elektrony na cząsteczki lub jony o właściwościach utleniających lub brać udział w enzymatycznych reakcjach redoks, w których utleniają się odpowiednio do kwasu monodehydroaskorbinowego (MDHA) i kwasu dehydroaskorbinowego (DHA) oraz disulfidu glutationu (GSSG). Utlenianie AA do MDHA może być katalizowane przez peroksydazę askorbinianową (APX). W reakcji tej H_2O_2 jest akceptorem elektronów i ulega redukcji do wody. MDHA może ulec dalszemu utlenieniu do DHA lub enzymatycznej redukcji do AA przy udziale reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR), która wykorzystuje NADH lub NADPH jako donor elektronów. Regeneracja AA może również zachodzić na drodze redukcji DHA przy jednoczesnym utlenieniu GSH do GSSG. Reakcję tę katalizuje reduktaza dehydroaskorbinianowa (DHAR). Odzysk GSH zachodzi na drodze enzymatycznej redukcji GSSG przy udziale reduktazy glutationowej (GR), która wykorzystuje cząsteczki NADPH jako donory elektronów (Rys. 2) (Foyer i Noctor, 2011).

W chloroplastach MDHA ulega także redukcji na drodze alternatywnej – przez ferredoksynę. Podaje się, że MDHA ma kilkadziesiąt razy większe powinowactwo do elektronów pochodzących z fotosyntetycznego łańcucha transportu niż $NADP^+$. Z tego powodu równowaga redoks między AA i MDHA może regulować wydajność powstawania

siły redukującej w postaci NADPH i efektywność wiązania CO₂ w cyklu Calvina-Bensona (Kuźniak i wsp., 2017). Na drodze nieenzymatycznej, w środowisku alkalicznym może dochodzić również do nieenzymatycznej redukcji DHA do AA przez GSH, co ma szczególne znaczenie w chloroplastach. Główny donator elektronów dla cyklu AA-GSH, NADPH pochodzi przede wszystkim z cyklu pentozofosforanowego. Podaż NADPH oraz zapotrzebowanie na ten dinukleotyd w innych procesach, takie jak rearanżacja uszkodzonych błon komórkowych i biosynteza metabolitów wtórnych istotnych dla uruchamiania reakcji obronnych rośliny przed patogenami mogą zatem regulować potencjał antyoksydacyjny cyklu AA-GSH (Doubnerová i Ryšlavá, 2011).



Rys. 2. Cykl askorbinian-glutation

O₂^{•-} ulega dysproporcjonacji z wytworzeniem H₂O₂ w reakcji katalizowanej przez SOD. W reakcji katalizowanej przez APX H₂O₂ jest usuwany, natomiast AA utlenia się do MDHA. AA regenerowany jest przy udziale MDHAR, która wykorzystuje NADH lub NADPH jako donator elektronów i katalizuje redukcję MDHA. W wyniku nieenzymatycznego utlenienia MDHA powstaje DHA. DHAR katalizuje redukcję DHA do AA przy jednoczesnym utlenieniu GSH do GSSG. Regeneracja GSH odbywa się na drodze reakcji enzymatycznej z udziałem GR, w której GSSG jest akceptorem elektronów pochodzących z NADPH.

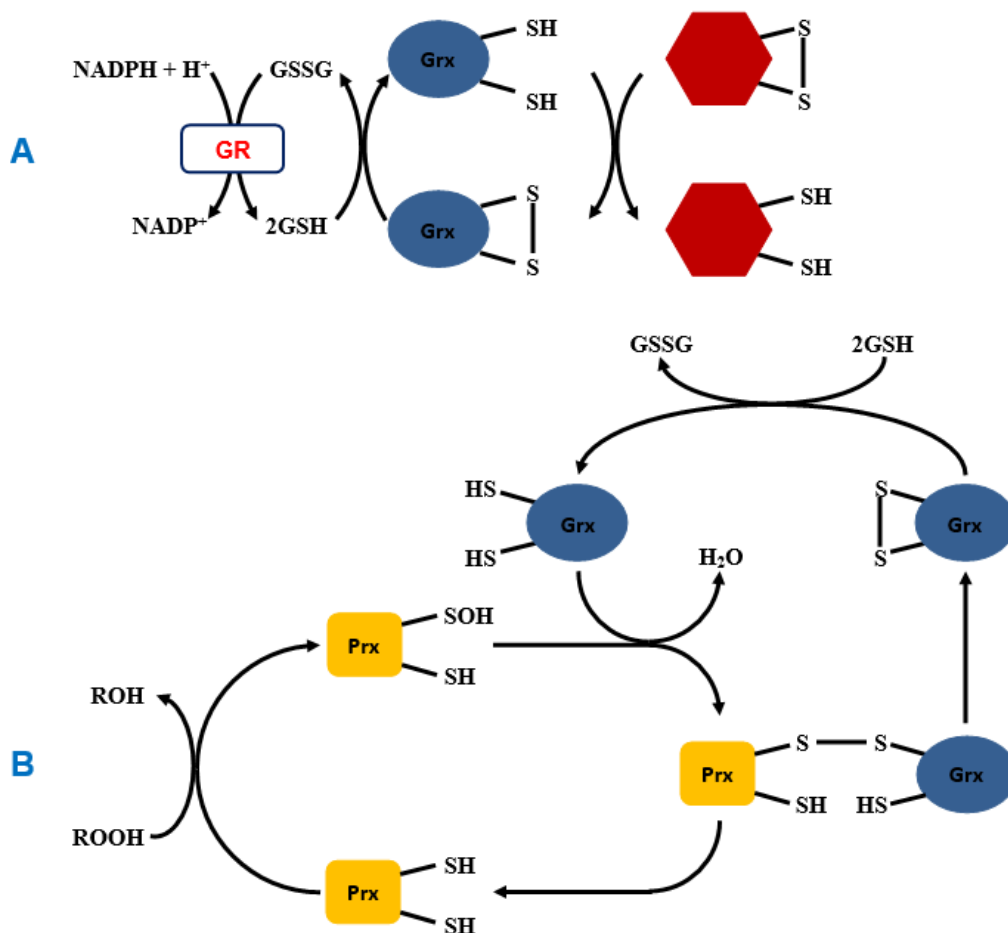
AA – kwas askorbinowy, APX – peroksydaza askorbinianowa, DHA – kwas dehydroaskorbinowy, DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa, GR – reduktaza glutationowa, GSH – glutation, GSSG – disulfid glutationu, MDHA – kwas monodehydroaskorbinowy, MDHAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa.

Biologiczna rola AA i GSH jest bardzo zróżnicowana. Metabolity te biorą udział m.in. w regulacji procesów wzrostu i podziałów komórkowych, embriogenezie, kiełkowaniu nasion oraz kwitnieniu. Jednak nie wszystkie funkcje AA i GSH są w pełni poznane. Równowaga redoks między formą zredukowaną i utlenioną AA i GSH w różny sposób może wpływać na efektywność obrony roślin przed mikroorganizmami chorobotwórczymi. Najlepiej poznaną funkcją w procesie kształtowania tej obrony jest regulacja przez AA i GSH stężenia RFT poprzez usuwanie ich nadmiaru, co zapobiega szkodliwemu utlenianiu ważnych dla komórki cząsteczek lipidów, białek i kwasów nukleinowych (Kuźniak i wsp., 2017). Ponadto AA jest

kofaktorem enzymów uczestniczących w powstawaniu etylenu, który odgrywa rolę w sygnalizacji stresu biotycznego i odpowiedzi ISR. AA bierze również udział w biosyntezie związków fenolowych, takich jak flawonoidy i antocyjany, które posiadają właściwości antyoksydacyjne i stanowią substraty reakcji prowadzących do tworzenia barier strukturalnych ograniczających rozprzestrzenianie się patogenów. AA pełni także rolę kofaktora enzymów katabolizmu glukozyolanów prowadzącym do powstawania biologicznie aktywnych pochodnych (m.in. estrów kwasu tiocyjanowego i izotiocyjanowego), które działają odstraszaająco i toksycznie np. na szkodniki owadzie. AA uczestniczy także w hydroksylacji proliny, która wchodzi w skład ekstensyn biorących udział w sieciowaniu ściany komórkowej po ataku patogena (Arrigoni i De Tullio, 2002; Gallie, 2013; Veljović-Jovanović i wsp., 2017). W chloroplastach AA pełni funkcję kofaktora deepoksydazy wiolaksantyny, która katalizuje przekształcenie wiolaksantyny w zeaksantynę w cyklu ksantofilowym. Proces ten zachodzi na świetle i pełni funkcję mechanizmu rozpraszającego nadmiar energii wzbudzenia. Wymienia się również udział AA w regeneracji form zredukowanych innych antyoksydantów (np. α -tokoferolu) oraz w utrzymywaniu aktywności enzymów antyoksydacyjnych (Zhang, 2013).

Wśród funkcji GSH, które mają znaczenie dla reakcji roślin na biotyczne czynniki stresowe wymienia się jego zdolność do usuwania RFT w cyklu AA-GSH oraz w odrębnych reakcjach m.in. katalizowanych przez peroksydazę glutationową (GPX). GSH jako substrat dla S-transferazy glutationowej (GST) uczestniczy również w procesach detoksykacji ksenobiotyków oraz w redukcji wodoronadtlenków lipidowych i regulacji aktywności białek, w tym enzymów poprzez ich odwracalną S-tiolację (Noctor i wsp., 2012; Zaffagnini i wsp., 2012). W procesie tym GSH wiąże się z resztami cysteiny (Cys) w cząsteczce białka (glutationylacja), co prowadzi do wyłączenia lub włączenia jego funkcji, ale także chroni białko przed nieodwracalną inaktywacją. Ważną funkcją GSH jest również regeneracja glutaredoksyn (Grx). Są to niskocząsteczkowe białka, które wykorzystują GSH do redukcji wiązań disiarczkowych docelowych białek. Regeneracja zredukowanego GSH odbywa się przy udziale GR, która wykorzystuje NADPH jako donor elektronów (Rys. 3A) (Ströher i Millar, 2012; Rouhier, 2010). Grx współdziałają również z peroksyredoksynami (Prx). Na podstawie liczby reszt katalitycznych Cys, ich pozycji w sekwencji aminokwasowej i mechanizmu katalizowanej reakcji wyróżnia się cztery klasy Prx: 1-Cys Prx, 2-Cys Prx, Prx Q oraz Prx II (Tripathi i wsp., 2009). Białka te uczestniczą w usuwaniu H_2O_2 i wodoronadtlenków lipidowych. Mogą posiadać jedną (1-Cys Prx) lub dwie reszty Cys i funkcjonować jako monomery (1-Cys Prx, Prx Q i Prx II) lub dimery (2-Cys Prx). W klasycznym modelu działania Prx, reprezentowanym przez 2-Cys Prx i Prx Q reszta Cys jest utleniana do kwasu sulfenowego, a następnie redukowana przez drugą resztę Cys, co prowadzi do powstania wiązania disiarczkowego w obrębie tej samej cząsteczki lub między

dwiema cząsteczkami Prx. Interakcja z Grx polega na tworzeniu heterodimerów Grx z Prx II. Heterodimery te ulegają łatwo reakcji dysproporcjonowania, w wyniku której powstają utlenione cząsteczki Grx i zredukowana forma Prx II. Redukcja utlenionej Grx przez GSH prowadzi do odtworzenia grup tiolowych Grx. Zredukowana Grx sprzęga się z produktem utlenienia Prx przez wodoronadtlenki – kwasem sulfenowym, co umożliwia cykliczną regenerację zredukowanej Prx (Rys. 3B) (Kopczewski i Kuźniak, 2013).



Rys. 3. Interakcja glutationu z glutaredoksynami i peroksyredoksynami w usuwaniu wodoronadtlenków i regulacji aktywności białek

(A) Zredukowana glutaredoksyna, Grx-(SH)₂ reguluje aktywność określonego białka (czerwony sześciokąt) poprzez jego odwracalną redukcję. Regeneracja Grx-(SH)₂ z disulfidu, Grx-S₂ zachodzi przy udziale glutationu, GSH, który utlenia się do disulfidu glutationu, GSSG. Redukcja GSSG odbywa się przy udziale reduktazy glutationowej, GR, która wykorzystuje NADPH jako donor elektronów.

(B) Wodoronadtlenki ROOH (w szczególności H₂O₂) są usuwane przez peroksyredoksyny, Prx-(SH)₂, m.in. należące do rodziny Prx II. Powstający kwas sulfenowy, HS-Prx-SOH ulega reakcji sprzęgania z Grx-(SH)₂ tworząc heterodimer HS-Prx-S-S-Grx-SH. W wyniku jego dysproporcjonowania powstaje Prx-(SH)₂ oraz Grx-S₂. Regeneracja Grx-(SH)₂ z jej utlenionej formy zachodzi przy udziale GSH jako donora elektronów.

Przesunięcie równowagi RFT-antyoksydanty w kierunku prooksydacyjnym jest jednym z pierwszych znamion reakcji rośliny na stres biotyczny. W wielu interakcjach roślina – patogen wykazano wpływ infekcji na zawartość AA i GSH w tkankach zakażonej rośliny. Po infekcji roślin pomidora *Cladosporium fulvum* stwierdzono poinfekcyjne gromadzenie GSSG w liścieniach zakażonej rośliny (May i wsp., 1996). W układzie pomidor-*Pst* stwierdzono zmniejszenie zawartości GSH w tkankach podatnej na infekcję odmiany pomidora i wzrost zawartości AA u tej odmiany. Natomiast u odmiany odpornej na infekcję wywołaną przez *Pst* nie wykazano istotnych zmian zawartości GSH i AA (Kuźniak i Skłodowska, 2004b). Uważa się, że zwiększona zawartość GSH w zakażonych tkankach roślin może odzwierciedlać intensywniejsze zapotrzebowanie na obronę antyoksydacyjną lub być związana z zaangażowaniem GSH w sieć sygnałów redoks leżących u podstaw sprawnych reakcji obronnych (Noctor i wsp., 2012). Przeciwnie, zmniejszona zawartość AA może służyć, zwłaszcza w początkowej fazie patogenezы, akumulacji RFT i uruchamianiu sygnałów stresu. Poinfekcyjny wzrost zawartości GSH może wówczas sprzyjać zachowaniu bezpiecznej równowagi między wytwarzaniem i usuwaniem RFT tak, aby nie doszło do przekroczenia progu ich toksyczności (Kuźniak i wsp., 2017). W niektórych badaniach zwraca się uwagę na możliwość uzupełniania niedoborów jednego antyoksydantu innym w celu zapobieżenia akumulacji RFT. Na przykład w układzie eukaliptus-*Phytophthora cinnamomi* stwierdzono poinfekcyjny wzrost zawartości AA, który rekompensował zmniejszoną pulę GSH (Dempsey i wsp., 2012). Inne badania interakcji patogen – gospodarz wskazują jednak, że u roślin zmiany w puli AA i GSH oraz funkcje tych antyoksydantów w patogenezы mogą być niezależne (Kuźniak i Skłodowska, 2001) lub synchroniczne, jak w mitochondriach liści *A. thaliana* zakażonych *Botrytis cinerea* kiedy wykazano spadek zawartości zarówno AA i GSH (Simon i wsp., 2013).

Różne modele zmian zawartości AA i GSH oraz aktywności enzymów takich jak APX, MDHAR, DHAR i GR, wskazują że AA i GSH nie pełnią podczas infekcji wyłącznie roli antyoksydacyjnej (Zhang i wsp., 2013). Wykazano, że aplikacja AA w dużej dawce oraz kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksylowego (związek imitujący działanie GSH) łagodziło objawy infekcji u dyni zakażonej wirusem żółtej mozaiki cukinii, natomiast zastosowanie dimetylotiomocznika i tironu, które usuwają RFT nie wywoływało takiego efektu (Zechmann i wsp., 2007; Wang i wsp., 2011). Uważa się, że stan redoks AA i GSH reguluje reakcje obronne wyrażane poprzez ekspresję genów białek PR i syntezę fitoaleksyn. Zaburzenia równowagi RFT-antyoksydanty mogą natomiast inicjować ścieżki sygnałowe prowadzące do zmian w regulacji hormonalnej i ekspresji genów (Kuźniak i wsp., 2017). Badania na mutantach, u których poziom AA i GSH był obniżony wykazały, że określona zawartość antyoksydantów cyklu AA-GSH jest niezbędna do skutecznej obrony rośliny przed patogenami. U mutantu *pad2* (ang. *phytoalexin-deficient 2*) *A. thaliana*, u którego

zahamowana została ekspresja genu kodującego pierwszy enzym szlaku biosyntezy GSH, poziom tego metabolitu był obniżony, a jednocześnie obserwowano niższą zawartość kamaleksyny (fitoaleksyna indolowa) i utratę zdolności do indukowania odpowiedzi HR (Parisy i wsp., 2007). U tego samego mutantu stwierdzono również obniżony poziom glukozyolanów, których biosynteza regulowana jest podażą siarki, której donorem jest GSH. Zmniejszona zawartość glukozyolanów u mutantu pad2 skutkowało jego mniejszą odpornością na szkodniki owadzie (Schlaeppli i wsp., 2008). Mimo, iż AA i GSH są ze sobą ściśle związane w cyklu AA-GSH, regulacja ich poziomu w zakażonej komórce odbywa się niezależnie. W opozycji do wielu danych świadczących o konieczności utrzymania wyższej zawartości GSH w zakażonych częściach roślin stoi fakt obniżenia poziomu AA u mutantów *A. thaliana*, u których stwierdzono zwiększoną odporność na *P. syringae* i podwyższony poziom SA, który jest mediatorem odporności na patogeny biotroficzne i hemibiotroficzne (Pastori i wsp., 2003).

W komórce roślinnej każdy kompartment charakteryzuje się specyficznymi mechanizmami wytwarzania i usuwania RFT, zgodnymi z jego wymaganiami metabolicznymi. Z tego względu sygnalizacja redoks oparta o RFT wytwarzane w danym kompartmentcie komórki stanowi swego rodzaju „odcisk palca”. Czasowo-przestrzenne zmiany sygnałów zależnych od RFT przyrównuje się do sygnatury wapniowej (Kuźniak i wsp., 2017). Pierwszym przedziałem komórki, w którym ma miejsce bezpośrednia interakcja roślina – patogen jest apoplast. W apoplacie, pod wpływem stresu biotycznego, dochodzi do wybuchu oksydacyjnego, tzn. gwałtownej produkcji RFT przez oksydazy NADPH będące homologami RBOH, peroksydazy apoplastowe i oksydazy aminowe (Bolwell i wsp., 2002). RFT intensywnie wytwarzane w apoplacie po ataku patogena mogą działać na niego toksycznie, ale są także wykorzystywane w reakcjach sieciowania związków fenolowych. RFT utleniając prekursorzy fenolowe uczestniczą w powstawaniu lignin. Sprzyjają również deponowaniu kalozy ograniczającej rozprzestrzenianie się czynnika infekcyjnego (Li i wsp., 2017). Wykazano, że niektóre RFT, takie jak H_2O_2 mogą przedostawać się z apoplastu do cytoplazmy, chloroplastów, mitochondriów i jądra komórkowego przez wyspecjalizowane białka błonowe z rodziny akwaporyn i peroksypery (Tian i wsp., 2016). Wykazano, że sygnały zależne od H_2O_2 docierające z apoplastu do chloroplastów mogą inicjować wtórną produkcję RFT (Shapiguzov i wsp., 2012). Apoplastowy H_2O_2 może także indukować ekspresję genów chloroplastowych enzymów cyklu AA-GSH: APX i GR (Hu i wsp., 2005). Regulacja poziomu AA i GSH oraz aktywności enzymów cyklu AA-GSH jest częścią szlaków sygnałowych odpowiedzialnych nie tylko za optymalizację fotosyntezy i innych szlaków metabolicznych w chloroplastach, ale stanowi także podłoże sygnałów retrogradowych (rozdział 2.2.4) wysyłanych z chloroplastów do jądra komórkowego (Kopczewski i Kuźniak, 2013). Wiadomo, że aktywne metabolicznie chloroplasty są

niezbędne do uruchomienia odpowiedzi HR. Szczególną rolę w tym procesie przypisuje się cyklowi AA-GSH zachodzącemu w chloroplastach (Mateo i wsp., 2004). Sygnały redoks zależne od AA i GSH wysyłane z chloroplastów do jądra komórkowego są zaangażowane w regulację ekspresji genów odpowiedzi na stres, w tym kodujących enzymy antyoksydacyjne (Blanco i wsp., 2014). Enzymy antyoksydacyjne (np. SOD, APX, DHAR) są białkami docelowymi dla Trx, a regulowanie aktywności tych enzymów przez Trx decyduje o ich znaczeniu w reakcjach obronnych (Begara-Morales i Loake, 2016). Stresory biotyczne wpływają na równowagę redoks komórek roślinnych, a cykl AA-GSH odgrywa istotną rolę w kształtowaniu poziomu RFT generowanych w odpowiedzi na atak patogenów. Oprócz bezpośredniego udziału w usuwaniu RFT, cykl AA-GSH chroni przed skutkami stresu biotycznego poprzez aktywację sygnałów redoks i indukowanie mechanizmów obronnych, a AA i GSH odgrywają w tych procesach szczególną rolę. Złożona interakcja między AA i GSH jest kluczowa dla warunkowania odpowiedzi roślin na stres zarówno abiotyczny, jak i biotyczny. Na poziomie komórkowym interakcja RFT – cykl AA-GSH generuje organello-specyficzną sygnalizację stresu, która odgrywa istotną rolę w detekcji stresora, dekodowaniu sygnału stresu oraz aktywacji mechanizmów obrony na poziomie lokalnym (w miejscu działania stresora) i systemicznym (Kuźniak i wsp., 2017).

2.2.3. Rola cukrów i enzymów ich metabolizmu w sygnalizacji stresu u roślin

Cukry odgrywają u roślin istotną rolę nie tylko jako podstawowe źródła węgla i energii, ale również ze względu na swoje właściwości regulujące funkcje życiowe podczas całej ontogenezy (Rolland i wsp., 2006). Metabolity te kształtują metabolizm i procesy wzrostowe komórek roślinnych regulując kiełkowanie nasion, rozwój organów i starzenie się. Zmiany poziomu cukrów wpływają na przebieg metabolizmu fotosyntezy, oddychania mitochondrialnego, biosyntezy białek i gospodarki azotowej. Cukry regulują również transport i dystrybucję asymilatów od donora do akceptora oraz uczestniczą w procesach magazynowania i dekompozycji związków zapasowych. Istotną funkcją cukrów jest także udział w powstawaniu i przekazywaniu sygnałów, które modulują ekspresję genów (Ciereszko, 2002). Stężenie cukrów takich, jak glukoza, fruktoza i sacharoza może regulować poziom ekspresji określonych genów jądrowych. Zjawisko to określa się jako kontrolę metaboliczną (kontrolę sygnałem metabolicznym) ekspresji genów jądrowych. Udowodniono, że ekspresja wielu genów kodujących enzymy katabolizmu związków niecukrowych jest tłumiona, gdy zawartość cukru w komórce przekroczy pewną wartość progową. Po raz pierwszy efekt ten zaobserwowano u mikroorganizmów i określono jako represję kataboliczną. Występuje ona również u roślin, jednak jej podłoże molekularne jest jeszcze słabo poznane (Jackowski i wsp., 2007). Metabolizm cukrów i sygnalizacja z ich udziałem pozostają w skomplikowanej sieci interakcji z hormonami. Uważa się, że

w komórce roślinnej biosynteza, metabolizm i sygnalizacja z udziałem cukrów, hormonów, a także RFT są ze sobą ściśle powiązane (Ramon i wsp., 2008). Synergistyczne oddziaływanie cukrów lub ich pochodnych (np. alkohole polihydroksylowe, glikozydy) i związków fenolowych stanowi część zintegrowanego układu redoks, który jest odpowiedzialny za usuwanie RFT i przyczynia się do tolerancji stresu, co ma miejsce zwłaszcza w tych tkankach, w których zawartość rozpuszczalnej frakcji cukrów jest stosunkowo wysoka (Bolouri-Moghaddam i wsp., 2010).

Rola cukrów u roślin jest szczególnie dobrze poznana dla glukozy, która stanowi podstawowe źródło węgla i energii. Uznaje się, że glukoza bierze udział przede wszystkim w sygnalizacji podziałów komórkowych, oddychaniu, biosyntezie polisacharydów wchodzących w skład ściany komórkowej i regulacji fotosyntezy (Jang i wsp., 1997). Wykazano także, że cukier ten uczestniczy w indukcji ekspresji genów kodujących enzymy katalizujące biosyntezę metabolitów wtórnych związanych z reakcjami obronnymi: syntazę chalkonową i amoniakoliazę L-fenylalaniny (Kanwar i Jha, 2018).

Pierwszy enzym katabolizmu glukozy, heksokinaza (HK) został zidentyfikowany jako swoisty sensor poziomu glukozy pełniąc w jej metabolizmie funkcje katalityczne, ale również uczestnicząc w zależnych od glukozy procesach transdukcji sygnałów (Jang i wsp., 1997; Ciereszko, 2002). HK odgrywa kluczową rolę w chloroplastowym i cytozolowym metabolizmie glukozy, ale jej aktywność katalityczna związana jest także z mitochondriami, w których HK reguluje poziom glukozo-6-fosforanu (G6P) i RFT, stymulując mechanizmy obrony antyoksydacyjnej i biosyntezę związków fenolowych (Moore i wsp., 2003). HK jako sensor poziomu glukozy może zatem w połączeniu z hormonami i RFT kontrolować podziały komórek i ich ekspansję. Glukoza pod wpływem HK ulega fosforylacji do G6P, który następnie sprzęga się z nukleozydotrifosforanami tworząc nukleozydodifosforan glukozy (NDP-glukoza). Aktywne fosforany glukozy biorą udział w glikozylacji związków fenolowych, biosyntezie AA, a współdziałając z hormonami przyczyniają się do ustalenia homeostazy komórkowej, co może sprzyjać dostosowaniu rośliny do niekorzystnych warunków środowiska (Xiao i wsp., 2000).

Uważa się, że HK występuje w dwóch rodzajach: w połączeniu z białkami chloroplastowymi (typ A) oraz z N-terminalnym końcem białek błonowych (typ B). Drugi rodzaj HK jest charakterystyczny dla cytozolu, stromy plastydów, aparatu Golgiego i błony mitochondrialnej (Bolouri-Moghaddam i wsp., 2010). U *A. thaliana* występuje izoforma HK1 (AtHXK1), która służy jako wewnątrzkomórkowy detektor glukozy. Jest ona głównie związana z mitochondriami, jednak jej obecność stwierdzono również w jądrze komórkowym. Jądrowa AtHXK1 może być elementem kompleksu biorącego udział w sygnalizacji związanej z glukozą, który tłumy ekspresję genów fotosyntezy (Balasubramanian i wsp., 2007; Kanwar i Jha, 2018). Aktywność sygnalizacyjna AtHXK1 wymaga obecności dwóch podjednostek:

VHA-B1 (ang. *V-type proton ATPase subunit B1*) i RPT5B (ang. *Regulatory Particle 5B*). VHA-B1 jest jedną z trzech izoform podjednostki B peryferycznego kompleksu V1 w H⁺-ATPazie typu wakuolarnego i jest odpowiedzialna za wiązanie ATP. RPT5B jest podjednostką 19S rRNA, która wiąże oba końce proteasomu 20S, aby zapewnić dostępność i specyficzność ATP dla białek ubikwitynowanych. Przy niskim stężeniu glukozy docelowe dla niej geny fotosyntezy ulegają ekspresji regulowanej przez odpowiednie czynniki transkrypcyjne. Przy wysokim stężeniu glukozy, cukier ten dyfunduje do jądra komórkowego i wiąże się z jądrową HK1. Powoduje to prawdopodobnie zmianę konformacyjną HK1, która w zmienionej postaci, razem z VHA-B1 i RPT5B działa jako represor transkrypcji genów fotosyntezy (Stoltzman i wsp., 2008). Wykazano, że u kukurydzy dochodzi do hamowania mitochondrialnej HK przez ADP, mannoheptulozę i glukozaminy, przy jednoczesnym braku wpływu tych związków na cytozolową HK, co potwierdza rolę mitochondrialnej HK w detekcji heksoz (da-Silva i wsp., 2001). Wskazuje się również, że mitochondrialna HK może odgrywać kluczową rolę w regulacji poziomu RFT. Mitochondrialna HK może działać jako sensor zmian w zapotrzebowaniu na G6P, który stanowi istotny półprodukt w wielu szlakach metabolicznych zależnych od stosunku ADP/ATP, np. w glikolizie, biosyntezie sacharozy, cyklu pentozofosforanowym, biosyntezie celulozy, fenylopropanoidów oraz flawonoidów (Bolouri-Moghaddam i wsp., 2010). Powiązania metaboliczne między glukozą, HK i RFT mają miejsce nie tylko w mitochondriach. G6P może stanowić prekursor l-galaktozy i zasilać szlak Smirnoffa-Wheelera, którego produktem jest AA zaangażowany m.in. w usuwanie RFT (Linster i wsp., 2008).

W kontekście sygnalizacji i uruchamiania odpowiedzi roślin na stres, w tym biotyczny, ważną rolę odgrywa również sacharoza. Jest ona jednym z najbardziej rozpowszechnionych disacharydów w przyrodzie. W roślinach wyższych stanowi główny nośnik szkieletów węglowych transportowanych przez floem z aktywnych fotosyntetycznie liści do akceptorów asymilatów. Wskazuje się również, że sacharoza może być zaangażowana w regulację szlaków biosyntezy antocyjanów – metabolitów wtórnych o działaniu antyoksydacyjnym (Tauzin i Giardina, 2014). Sacharoza uczestniczy również w procesach rozwoju roślin, regulacji ich wzrostu, różnicowania tkanek i rozwoju organów, np. korzeni (Tognetti i wsp., 2013). Hydroliza sacharozy dostarcza glukozy i fruktozy, które mogą odgrywać rolę sygnalizacyjną. O ile funkcja sygnalizacyjna glukozy opiera się przede wszystkim o interakcję z HK, to dla fruktozy zaproponowano specyficzną ścieżkę sygnalizacji z udziałem ABA i etylenu (Li i wsp., 2011). Wykazano także, że wstępne traktowanie roślin ryżu egzogenną sacharozą znacznie złagodziło objawy infekcji wywołanej patogenicznym grzybem *Magnaporthe oryzae*, co potwierdziło przypuszczalną rolę sacharozy jako metabolitu uczestniczącego w przekazywaniu sygnałów stresu (Gómez-Ariza i wsp., 2007).

Istotną rolę w metabolizmie sacharozy pełnią inwertazy, które nieodwracalnie hydrolizują sacharozę do glukozy i fruktozy. Znane są trzy grupy inwertaz: dwa typy inwertaz kwaśnych: nierozpuszczalna, związana z apoplastem (CWInv, ang. *Cell Wall Invertase*) i rozpuszczalna, związana z wakuolą (VInv, ang. *Vacuolar Invertase*) oraz alkaliczne/obojętne (AInv/NInv) zlokalizowane w cytozolu, mitochondriach i/lub w plastydach (Tauzin i Giardina, 2014). Obie inwertazy kwaśne są regulowane potranslacyjnie przez specyficzne inhibitory białkowe, które należą do rodziny białek związanych z inhibitorami metylosteraz pektynowych (PMEI-RP, ang. *Pectin Methylsterase Inhibitor Related Protein*) (Hothorn i wsp., 2004). Stwierdzono, że podczas infekcji roślin dochodzi do różnych zmian w poziomie ekspresji genu VInv, w zależności od układu roślina – patogen. Po zakażeniu bobu (*Vicia faba*) przez *Uromyces fabae* oraz winorośli właściwej (*Vitis vinifera*) przez *Erysiphe necator* oraz *Plasmopora viticola* wykazano obniżenie poziomu ekspresji genu VInv, co wiązano ze zmniejszeniem zawartości sacharozy w organach spichrzowych (Voegelé i wsp., 2006; Hayes i wsp., 2010). Natomiast w początkowej fazie infekcji rącznika pospolitego (*Ricinus communis*) przez *Agrobacterium tumefaciens* stwierdzono podwyższoną aktywność VInv. Z tego względu dokładna rola VInv w odpowiedzi roślin na stres biotyczny nie jest wyjaśniona (Wächter i wsp., 2003). Inaczej kształtuje się poinfekcyjny poziom ekspresji genu kodującego CWInv. Wykazano, że w zdecydowanej większości układów eksperymentalnych poziom mRNA genu kodującego CWInv jest wyższy po infekcji roślin bakteriami, grzybami, czy wirusami. Ponadto stwierdzono, że podczas infekcji aktywność CWInv i reakcje obronne, takie jak indukcja ekspresji genów związanych z obroną, deponowanie kalozy, zahamowanie fotosyntezy lub lokalna śmierć komórek są skorelowane, co sprzyja ograniczeniu rozprzestrzeniania się patogena. Wyciszenie genów kodujących CWInv zakłócało natomiast zdolność rośliny do prawidłowej odpowiedzi na atak patogenów i osłabiało indukcję reakcji obronnych (Essmann i wsp., 2008).

Inwertazy zasadowe biorą udział w procesach wzrostu i rozwoju roślin oraz kiełkowaniu nasion. Wykazano, że aktywności inwertaz kwaśnych i zasadowych są ze sobą sprzężone i podlegają regulacji przez cukry. Zaproponowano, że wzrost aktywności CWInv może być konsekwencją odpowiedniej podaży sacharozy, co wtórnie wyzwała aktywność AInv i NInv (Essmann i wsp., 2008). Wykazano ponadto, że AInv i NInv stanowią elementy układu antyoksydacyjnego zaangażowanego w homeostazę RFT, a także uczestniczą w procesach regulowanych przez hormony (Welham i wsp., 2009). Traktowanie egzogennym kwasem giberelowym (GA) mutantów z wyciszoną ekspresją genów kodujących AInv i NInv, które charakteryzowały się opóźnieniem w kiełkowaniu nasion przywracało prawidłowy proces kiełkowania (Martin i wsp., 2013). Wykazano również, że wraz ze wzrostem aktywności CWInv dochodzi do wzrostu aktywności AInv i NInv u groszku siewnego (*Pisum sativum*), tytoniu i *A. thaliana* po infekcji przez patogeniczne lęgniowce. Jednak

u transgenicznego tytoniu z wyciszoną ekspresją genu kodującego CWInv nie stwierdzono zmian w aktywnościach AInv i NInv w interakcji rośliny z patogenem (Essmann i wsp., 2008).

2.2.4. Koncepcja sygnalizacji retrogradowej w komórce roślinnej

Chloroplasty i mitochondria są w ciągłym kontakcie biochemicznym ze sobą i innymi kompartmentami komórki roślinnej. Szczególnie istotna wydaje się komunikacja, w której sygnały zbierane i przetwarzane w chloroplastach i mitochondriach wysyłane są do jądra komórkowego. Dzięki tym sygnałom (tzw. sygnałom retrogradowym) do jądra komórkowego dociera informacja o stanie funkcjonalnym chloroplastów i mitochondriów, a skutkiem tego jest regulacja ekspresji genów jądrowych, również w warunkach stresu (Pogson i wsp., 2008). Ważnymi źródłami sygnałów retrogradowych są RFT, np. $^1\text{O}_2$, O_2^- i H_2O_2 . Uważa się, że białka EX1 i EX2 są mediatorami sygnałów zależnych od $^1\text{O}_2$ (rozdział 2.2.1). EX1 odpowiada za percepcję $^1\text{O}_2$ wytwarzanego w chloroplastach, natomiast EX2 kontroluje aktywność EX1. Wykazano, że wyciszenie ekspresji genów kodujących EX1 i EX2 u mutantu *ex1 ex2 flu A. thaliana* tłumilo całkowicie ekspresję genów indukowanych przez $^1\text{O}_2$, np. genów odpowiedzialnych za PCD (Lee i wsp., 2007; Gadjev i wsp., 2008). Uważa się, że H_2O_2 jest zaangażowany w modulowanie ekspresji genów za pomocą kaskad sygnalizacyjnych z udziałem kinaz MAPK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*) (Desikan i wsp., 1999). Istotną rolę w powstawaniu i transmisji sygnałów retrogradowych pełnią także AA, GSH oraz enzymy cyklu AA-GSH. Stan redoks AA i GSH kształtowany m.in. przez RFT może być traktowany jako informacja o stanie redoks w chloroplastach i mitochondriach, która jest przekazywana do jądra komórkowego (rozdział 2.2.2) (Kuźniak i wsp., 2017).

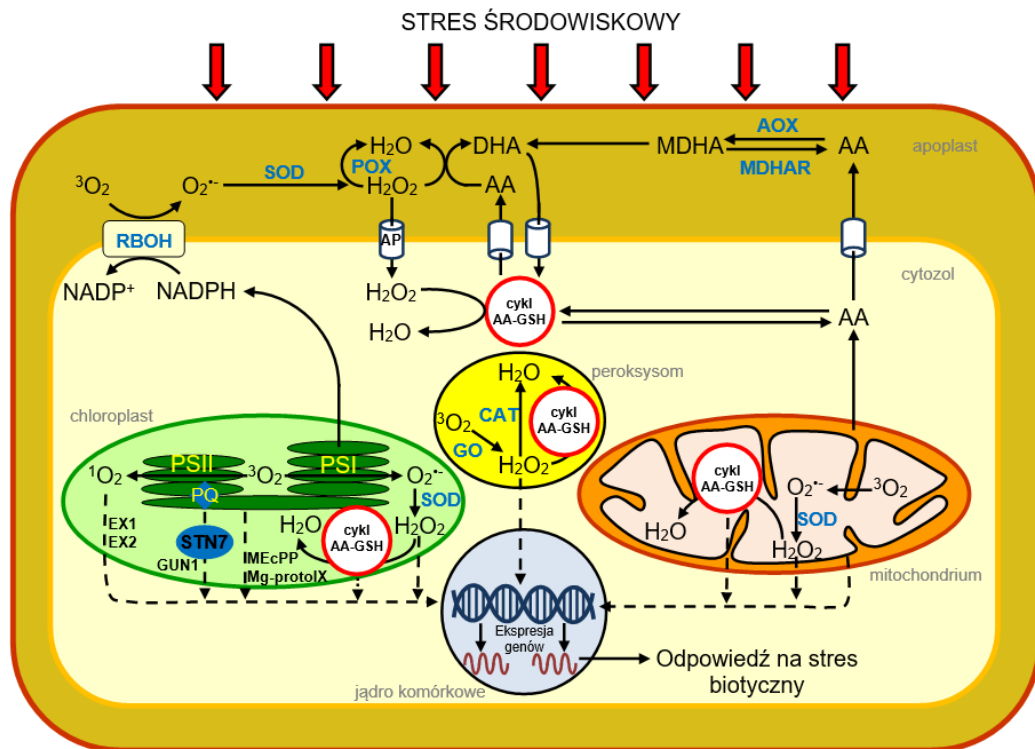
Za sygnalizację retrogradową odpowiada również Mg-protoporfiryna IX (Mg-protolIX), półprodukt w szlaku biosyntezy chlorofilu. Mg-protolIX jest negatywnym regulatorem ekspresji genów fotosyntezy w jądrze komórkowym i chloroplastach. Gromadzi się pod wpływem stresu i po aplikacji norflurazonu (inhibitor ostatniej reakcji biosyntezy chlorofilu). Dlatego uważa się, że Mg-protolIX jest odpowiedzialny za hamowanie reakcji fotosyntetycznych i generowanie odpowiedzi na stres, w tym biotyczny (Pesaresi i wsp. 2007; Stenbaek i Jensen, 2010). Badania nad mutantem *gun* (ang. *genome uncoupled*) *A. thaliana*, który nie wykazuje wytlumienia ekspresji genów jądrowych związanych z fotosyntezą po potraktowaniu norflurazonem wykazały, że w wyzwaniu sygnałów chloroplasty-jądro komórkowe przez Mg-protolIX pośredniczy czynnik transkrypcyjny ABI4 (ang. *ABA Insensitive 4*). Białko GUN1 integruje sygnały związane z Mg-protolIX, fotosyntetycznym transportem elektronów oraz stresem oksydacyjnym w chloroplastach i jest odpowiedzialny za ich transmisję do jądra komórkowego. W odpowiedzi na sygnały pochodzące od GUN1, czynnik transkrypcyjny ABI4 hamuje ekspresję jądrowych genów fotosyntezy blokując

wiązanie się do DNA innych czynników transkrypcyjnych, które promują tę ekspresję (Moulin i wsp., 2008; Jung i Chory, 2010).

Uważa się, że za sygnalizację retrogradową odpowiedzialne są również komponenty fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Szczególnie istotna w tym procesie wydaje się rola zredukowanego PQ i komponentów po redukującej stronie PSI, zwłaszcza ferredoksyny. Za transport sygnałów o zmianie stanu redoks chloroplastów do jądra komórkowego odpowiada również kinaza białkowa STN7 (ang. *Serine/Threonine-Protein Kinase*), która katalizuje odwracalną fosforylację LHCII (ang. *Light-Harvesting Complex II*), jak również długoterminową aklimatyzację rośliny do zmiany jakości lub natężenia światła (Oelze i wsp., 2008). Wykazano ponadto, że elektrony, których donorem jest zredukowana ferredoksyna mogą być przekazywane na Trx i GSSG. Razem z Grx i Prx, Trx mogą brać udział w modyfikacji funkcji białek docelowych. Uznaje się, że chloroplastowe i jądrowe czynniki transkrypcyjne mogą być dezaktywowane lub aktywowane na drodze odwracalnych reakcji redoks z udziałem Trx, Grx i Prx (rozdziały 2.2.1, 2.2.2) (Rodermeil, 2011).

Stwierdzono również, że w regulacji ekspresji genów jądrowych związanych z reakcjami roślin na czynniki stresowe uczestniczy 3'-fosfoadenozyno-5'-fosforan (PAP). Poziom chloroplastowego PAP jest pod kontrolą fosfatazy SAL1, która katalizuje konwersję PAP do AMP (Woodson i Chory, 2012). Wykazano, że w warunkach silnego oświetlenia lub suszy rośliny *A. thaliana* gromadzą w chloroplastach PAP, który migruje do jądra komórkowego, gdzie hamuje aktywność 5'-3' egzorybonukleaz. Prowadzi to do aktywacji czynników transkrypcyjnych i indukcji ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w uruchamianiu reakcji obronnych na stres (Estavillo i wsp., 2011; Woodson i Chory, 2012). Co więcej wykazano, że SAL1 jest aktywna także w mitochondriach, co świadczy o zależności metabolicznej chloroplastów i mitochondriów w ramach sygnalizacji retrogradowej (Van Aken i Whelan, 2012).

Wskazuje się również na udział cyklodifosforanu metyloerytrytolu (MEcPP), prekursora izoprenoidów powstających w chloroplastowym szlaku MEP (ang. *MethylErythritol 4-Phosphate pathway*). Szlak ten uważa się za źródło sygnałów kierowanych z chloroplastów do jądra komórkowego w warunkach stresowych (Karpiński i wsp., 2013). W warunkach prawidłowych MEcPP jest przekształcany przy udziale syntazy hydroksymetylobutenylo-difosforanowej (HDS) do hydroksy-2-metylo-2-(E)-butenylo-4-difosforanu (HMBPP). Wykazano, że mutant *ceh1* (ang. *constitutively expressed hydroperoxide lyase*) *A. thaliana* z mutacją w genie HDS gromadzi MEcPP. Mutant *ceh1* wykazuje zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych za uruchamianie odpowiedzi na stres, które są zależne od szlaku sygnalizacji SA i charakteryzuje się zwiększoną odpornością na *P. syringae*. Dowodzi to, że akumulacja MEcPP w chloroplastach jest związana z regulacją ekspresji jądrowych genów stresu (Rys. 4) (Xiao i wsp., 2012).



Rys. 4. Interakcje metaboliczne między kompartmentami i ścieżki transmisji sygnałów retrogradowych w komórce roślinnej w warunkach stresu środowiskowego

W cytozolu, peroksysomach, chloroplastach i mitochondriach funkcjonuje cykl AA-GSH. Całkowita pula AA podlega zmianom w stresie, co stanowi element sygnalizacji redoks związanej z AA. W stanie nadmiaru energii wzbudzenia, który jest charakterystycznym następstwem wystąpienia np. stresu biotycznego w komórce roślinnej dochodzi do wzmożonego wytwarzania RFT: $^1\text{O}_2$, O_2^- oraz H_2O_2 . W chloroplastach i mitochondriach RFT powstają na skutek wycieku elektronów z fotosyntetycznego/oddechowego łańcucha transportu. Chloroplastowy $^1\text{O}_2$ powstaje jako produkt przekazania nadmiaru energii wzbudzenia z cząsteczki chlorofilu w PSII, natomiast O_2^- jest produktem redukcji $^3\text{O}_2$ w PSI. Stan redoks PQ, potencjał redoks AA i GSH w chloroplastowym i mitochondrialnym cyklu AA-GSH, stan redoks w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów oraz RFT są źródłem sygnałów retrogradowych kierowanych z chloroplastów i mitochondriów do jądra komórkowego (przerwane strzałki). W przekazywaniu tych sygnałów uczestniczą specyficzne białka, m.in.: EX1, EX2, STN7 i GUN1. Sygnały te mogą być też przekazywane za pośrednictwem chloroplastowej Mg-protolIX i MEcPP. Skutkiem odbioru sygnałów retrogradowych jest zmiana ekspresji genów jądrowych i biosynteza odpowiednich białek zaangażowanych w indukcję odpowiedzi rośliny na warunki środowiska.

AA – kwas askorbinowy, AOX – oksydaza askorbinianowa, AP – akwaporyna, CAT – katalaza, DHA – kwas dehydroaskorbinowy, DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa, EX1 – białko EXECUTER 1, EX2 – białko EXECUTER 2, GO – oksydaza glikolanowa, GSH – glutation, GUN1 (ang. *Genome UNcoupled*) – białko integrujące sygnały retrogradowe, MDHA – kwas monodehydroaskorbinowy, MDHAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa, MEcPP – cyklodifosforan metyloerytrytolu, Mg-protolIX – Mg-protoporfiryna IX, POX – peroksydaza, PQ – plastochinon, PSI – fotosystem I, PSII – fotosystem II, RBOH (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homolog*) – homolog oksydazy NADPH, RFT – reaktywne formy tlenu, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, STN7 (ang. *Serine/Threonine-Protein Kinase*) – kinaza białkowa serynowo-treoninowa.

3. CEL PRACY

Chloroplasty i mitochondria, poza rolą w metabolizmie podstawowym (reakcje fotosyntezy, oddychanie komórkowe), pełnią także funkcję czułych sensorów zmian zachodzących w środowisku. W aktywnych fotosyntetycznie komórkach roślinnych stres środowiskowy, w tym biotyczny, wywołuje stan nadmiaru energii wzbudzenia, który prowadzi do zaburzenia transportu elektronów, wzmożonej redukcji PQ i nadprodukcji RFT oraz zakłóceń w szlakach metabolizmu podstawowego, m.in. w fotosyntezie i oddychaniu mitochondrialnym. W odpowiedzi na te zmiany komórka roślinna uruchamia program dostosowania metabolicznego opartego o rozpraszanie nadmiaru energii wzbudzenia na drodze niefotochemicznej, detoksykację RFT z udziałem antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych oraz rearanżację szlaków biosyntezy metabolitów pierwotnych i wtórnych. Ma to na celu zrównoważenie reakcji obronnych i wzrostowych ważnych z punktu widzenia plonowania i konkurencji w ekosystemie. Aklimatyzacja rośliny do stresu wymaga uruchomienia odpowiednich ścieżek sygnalizacyjnych, w tym sygnałów retrogradowych wyzwalanych w chloroplastach i mitochondriach, kierowanych do jądra komórkowego i regulujących ekspresję genów związanych z odpowiedzią rośliny na dany czynnik stresowy. Odbiór sygnałów stresu oraz ich właściwa integracja nie tylko na poziomie komórkowym, ale także lokalnym i systemicznym zapewnia aktywację mechanizmów obronnych zarówno w miejscu bezpośredniego działania stresora, jak i w całej roślinie.

Ogórek siewny jest ważnym gospodarczo gatunkiem, podatnym na kanciastą plamistość liści ogórka wywoływaną przez *Psl*. Z powodu braku odmian całkowicie odpornych na tę chorobę istotne jest poznanie mechanizmów odpowiedzi obronnej u ogórka w interakcji z *Psl*.

Celem pracy jest rozpoznanie roli chloroplastów i mitochondriów w powstawaniu sygnałów metabolicznych i oksydoredukcyjnych u ogórka siewnego po infekcji *Psl* i ich znaczenia dla kształtowania lokalnej (w liściu inokulowanym) i systemicznej (w liściu odległym od inokulowanego) odpowiedzi na infekcję. Zadania badawcze obejmowały:

1. Charakterystykę interakcji ogórek – *Psl* w oparciu o analizę objawów infekcji
2. Identyfikację sygnałów generowanych w chloroplastach w warunkach stresu biotycznego i ocenę ich znaczenia funkcjonalnego na podstawie analizy:
 - fluorescencji i stężenia chlorofilu,
 - parametrów wymiany gazowej,
 - aktywności cyklu AA-GSH,
 - aktywności enzymów antyoksydacyjnych CAT i SOD,
 - stężenia wybranych cukrów i ich pochodnych oraz aktywności enzymów metabolizmu cukrów (G6PDH, HK, inwertazy)

W celu określenia powiązań między reakcjami fotochemicznymi fotosyntezy i odpowiedzią na infekcję *Pst* zastosowano inhibitory fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów: DCMU i DBMIB.

3. Rozpoznanie wzajemnych zależności metabolicznych chloroplastów i mitochondriów po infekcji *Pst* i ich roli w regulacji lokalnej i systemicznej odpowiedzi obronnej na podstawie analizy:

- zawartości dinukleotydów: NAD(P)H i NAD(P)⁺,
- stężenia wybranych metabolitów i aktywności enzymów cyklu Krebsa,
- zawartości aminokwasów: Gly, L-Ser, L-Glu, L-Gln i L-Met,
- poziomu ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną, metabolizm węgla i azotu oraz regulację redoks.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Układ eksperymentalny

4.1.1. Uprawa *Cucumis sativus* L.

Nasiona ogórka siewnego (*Cucumis sativus* L.) odmiany Cezar F1 (W. Legutko) wykładano na szalki Petriego, na cieką warstwę ligniny nasączonej wodą destylowaną i utrzymywano w ciemności, w temperaturze 30 °C, przez 24 h, a następnie przenoszono do fitotronu (fotoperiod 16/8 h dzień/noc, natężenie oświetlenia 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$, temperatura 23 °C, względna wilgotność powietrza 50-60%). Rozwijające się siewki pozostawiano przez 6 dni pod przezroczystą osłoną ograniczającą parowanie wody. Jednotygodniowe siewki pikowano do podłoża glebowego Sterlux® (Hollas), suplementowanego granuletem Azofoska (Florovit®), perlitem i mieszaniną dolomitu z piaskiem (w proporcji 10 g granulatu, 2 dm³ perlitu, 100 cm³ dolomitu, 2 dm³ piasku na 50 dm³ podłoża). Rośliny ogórka uprawiano w plastikowych doniczkach o objętości 400 cm³ przez cztery tygodnie w fitotronie, w warunkach oświetlenia, temperatury i wilgotności jw., podlewając je wodą wodociągową.

4.1.2. *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*

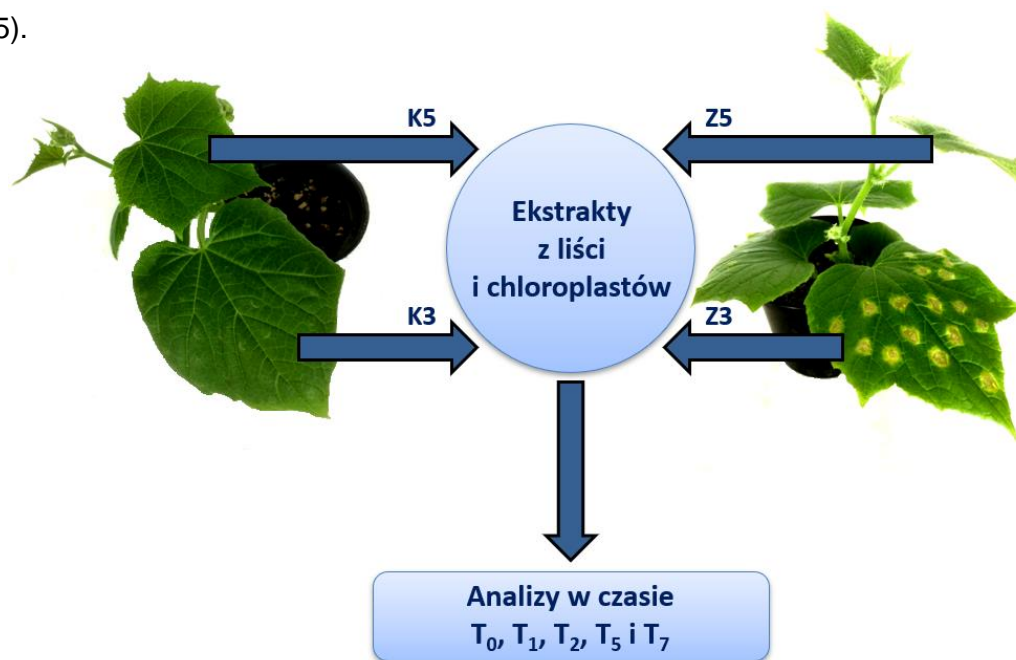
Pseudomonas syringae pv *lachrymans* (*PsI*) nr IOR 1990 otrzymano z Banku Patogentów Roślin Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu i przechowywano w temperaturze -80 °C, w próbkach typu Eppendorf (1,5 cm³), w 50% glicerynie. W celu przygotowania zawiesiny *PsI* do inokulacji roślin ogórka, kulturę bakterii rozmrażano, zawieszano w płynnej pożywce King B (LAB-AGAR™) w stosunku objętościowym 1,5:10 i umieszczano na wytrząsarce rotacyjnej (150 g, 28 °C), na 48 h. Po tym czasie bakterie wysiewano za pomocą ezy na podłożu King B zestalone agarem, na szalki Petriego o średnicy 6 cm. Hodowlę *PsI* na podłożu stałym prowadzono w temperaturze 28 °C, przez 72 h. Następnie bakterie przenoszono eżą do 25 cm³ płynnej pożywki King B. Otrzymaną zawiesinę wytrząsano w kolbach Erlenmeyera o pojemności 100 cm³ na wytrząsarce rotacyjnej (150 g, 28 °C) przez 24 h. W celu otrzymania zawiesiny bakterii do inokulacji roślin ogórka, hodowlę bakterii wirowano (10 000 g, 15 min, 4 °C) i po usunięciu supernatantu, otrzymany osad zawieszano w 10 cm³ sterylnej wody destylowanej. Zawiesinę ponownie wirowano w warunkach jw. Procedurę przemywania osadu powtarzano dwukrotnie. Otrzymany osad *PsI* zawieszano w 10 cm³ sterylnej wody destylowanej. Końcowe stężenie komórek bakterii w zawiesinie ustalano na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru transmitancji przy długości fali $\lambda = 630 \text{ nm}$. Do inokulacji roślin ogórka stosowano zawiesinę *PsI* o stężeniu 10⁷ jtk cm⁻³ (transmitancja 38%).

4.1.3. Inokulacja roślin

Po czterech tygodniach od wysadzenia do podłoża glebowego, rośliny ogórka dzielono na dwie grupy: inokulowane zawiesiną *PsI* (Z) oraz kontrolne (K). Liście właściwe trzeciego piętra roślin ogórka grupy Z od spodniej strony inokulowano zawiesiną *PsI* za pomocą strzykawki bez igły. Aplikowano 1 – 2 cm³ zawiesiny *PsI* (w zależności od wielkości blaszki liściowej) w kilku – kilkunastu punktach, równomiernie na całym liściu (Rys. 1). W ten sam sposób liściom właściwym trzeciego piętra roślin kontrolnych (K) aplikowano sterylną wodę destylowaną. Wszystkie rośliny uprawiano przez 7 dni od dnia zakażenia w niezmienionych warunkach oświetlenia i temperatury, przy podwyższonej wilgotności (80-90%).

4.1.4. Warianty eksperymentalne

Do analiz pobierano liście trzeciego piętra roślin kontrolnych (K3) i inokulowanych zawiesiną *PsI* (Z3) oraz nietknięte liście piętra piątego obu grup roślin (odpowiednio K5, Z5). Materiał do analiz zbierano tuż po inokulacji (T₀) oraz 1 (T₁), 2 (T₂), 5 (T₅) i 7 (T₇) dni od inokulacji roślin ogórka. Do badań wykorzystywano ekstrakty z liści (z pominięciem głównych wiązek przewodzących) lub chloroplastów, chyba że podano inaczej (rozdziały 4.2.1 – 3) (Rys. 5).



Rys. 5. Układ eksperymentalny *Cucumis sativus* L. – *PsI*

Liście trzeciego piętra czterotygodniowych roślin ogórka traktowano wodą (K3) lub inokulowano zawiesiną *PsI* (Z3). Liście piątego piętra nie były traktowane wodą (K5) ani zawiesiną *PsI* (Z5). Do analiz wykorzystywano liście z pominięciem głównych wiązek przewodzących i wyizolowane z nich chloroplasty. Badania prowadzono w dniu inokulacji (T₀) oraz 1 (T₁), 2 (T₂), 5 (T₅) i 7 (T₇) dni od inokulacji *PsI*.

4.1.5. Izolacja chloroplastów

W celu uzyskania zawiesiny chloroplastów, 5 g liści ogórka (fragmenty blaszki liściowej między wiązkami przewodzącymi) z każdego wariantu eksperymentalnego homogenizowano w 25 cm³ 50 mM buforu HEPES-KOH (pH = 7,5), zawierającego 0,3 M sorbitol, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃ i 0,5 mM ditiotreitól (DTT). Homogenizację prowadzono z użyciem homogenizatora nożowego (Universal Laboratory Aid, type MPW-309, Polska) w trzech etapach, po 30s każdy: (1) 150 obr. min⁻¹, (2) 200 obr. min⁻¹, (3) 150 obr. min⁻¹. Otrzymane homogenaty przesączano przez pojedynczą warstwę Miracloth[®] (Merck Millipore) zwilżonego buforem do homogenizacji. Przesącz wirowano (2 000 g, 2 min, 4 °C). Po usunięciu supernatantu, otrzymany osad zawieszano w 0,75 cm³ 50 mM buforu HEPES-KOH (pH = 7,5) bez dodatku DTT i наносzono na powierzchnię mieszaniny Percollu (GE Healthcare Percoll[™]) i dwukrotnie stężonego buforu do homogenizacji bez DTT (1:1). Po wirowaniu (1 800 g, 2 min, 4 °C) pobierano ciemnozieloną zawiesinę chloroplastów, którą trzykrotnie przepłukiwano 5 cm³ buforu bez DTT w celu usunięcia Percollu. Po każdym płukaniu zawiesinę wirowano (3 500 g, 8 min, 4 °C). Otrzymany osad ostatecznie zawieszano w 0,75 cm³ buforu bez DTT. Jakość i liczbę wyizolowanych chloroplastów oceniano pod mikroskopem świetlnym. Stopień uszkodzenia chloroplastów badano metodą fotoredukcji heksacyjanożelazianu tripotasu (Heber i Santarius, 1970). W zebranej frakcji chloroplasty nieuszkodzone stanowiły 80-90% wszystkich wyizolowanych chloroplastów. Czystość frakcji chloroplastowej potwierdzano poprzez pomiar aktywności katalazy (CAT, rozdział 4.2.4.2), dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PDH, rozdział 4.2.7) i fumarazy (rozdział 4.2.8.4) – enzymów znacznikowych odpowiednio dla: peroksysomów, cytozolu i mitochondriów. Stwierdzano 100% czystość uzyskiwanej frakcji chloroplastów (aktywność ww. enzymów poniżej progu detekcji).

4.1.6. Aplikacja inhibitorów fotosyntezy

Inhibitory fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów: 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik (DCMU) oraz 2,5-dibromo-3-metylo-6-izopropiolo-*p*-benzochinon (DBMIB) rozpuszczano w niewielkiej ilości odpowiednio: etanolu i dimetylosulfotlenku (DMSO), a następnie rozcieńczano wodą destylowaną do stężenia 100 μM (Karpiński i wsp., 1999). Liście trzeciego i piątego piętra roślin ogórka opryskiwano przygotowanymi roztworami inhibitorów 24 h przed inokulacją *PsI*. Kontrolę stanowiły rośliny, których liście trzeciego i piątego piętra opryskiwane były wodnymi roztworami etanolu i DMSO o stężeniu 1‰ (v/v), nie zawierającymi inhibitorów. Uzyskane warianty eksperymentalne: K3/5, Z3/5,

K3/5 + DCMU, Z3/5 + DCMU, K3/5 + DBMIB oraz Z3/5 + DBMIB wykorzystywano do analizy wybranych parametrów fizjologicznych i biochemicznych.

4.2. Metody eksperymentalne

4.2.1. Pomiar fluorescencji i oznaczanie zawartości chlorofilu a

Detekcji fluorescencji chlorofilu a dokonywano fluorymetrem Handy FluorCam FC 1000-H (Photon System Instruments, Czechy). Pomiaru fluorescencji dokonywano w 10 różnych punktach blaszek liściowych K3/5, Z3/5, K3/5 + DCMU, Z3/5 + DCMU, K3/5 + DBMIB i Z3/5 + DBMIB w 3 niezależnych powtórzeniach eksperymentalnych, a wyniki uśredniano. Analiza prowadzona była metodą wielokrotnego naświetlania światłem wysycającym w trybie pulsacyjnej modulacji amplitudy (PAM) w następujących etapach:

- (1) Liście roślin adaptowanych do ciemności (20 min) poddawano przez 5 s działaniu impulsów światła wysycającego (800 ms) – pomiar fluorescencji maksymalnej chlorofilu (F_M).
- (2) Po 15 s od chwili rozpoczęcia pomiaru uruchamiano światło aktyczne (620 nm) i mierzono fluorescencję maksymalną przy danym natężeniu światła (F_P).
- (3) Po 24 s pomiaru, co 12 s liście traktowano impulsem światła wysycającego (800 ms) – pomiar fluorescencji maksymalnej chlorofilu na świetle (F_{MLn}).
- (4) Po 84 s od chwili rozpoczęcia analizy wyłączono światło aktyczne, a liście potraktowano impulsami światła wysycającego i dalekiej czerwieni (520 ms) – pomiar stacjonarnej fluorescencji maksymalnej na świetle (F_{MLss}).
- (5) W celu zmierzenia chwilowej fluorescencji maksymalnej podczas wygaszania w ciemności (F_{MDn}) traktowano liście impulsami światła wysycającego i dalekiej czerwieni (520 ms).

Wizualizacji wyników pomiaru dokonano z wykorzystaniem programu FluorCam 7.0 (wersja 1.0.27.0), a zmierzone parametry fluorescencji pozwoliły wyznaczyć maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II (Q_Y), współczynnik fotochemicznego wygaszenia fluorescencji w stanie stacjonarnym (Q_P) oraz współczynnik niefotochemicznego wygaszenia fluorescencji w stanie stacjonarnym (NPQ):

$$Q_Y = (F_M - F_0) / F_M$$

$$Q_P = (F_{MLss} - F_{tLss}) / (F_{MLss} - F_{0Lss})$$

$$NPQ = (F_M - F_{MLss}) / F_{MLss}$$

gdzie:

F_0 – fluorescencja minimalna po adaptacji roślin do ciemności

F_M – fluorescencja maksymalna po adaptacji roślin do ciemności

F_{MLss} – stacjonarna fluorescencja maksymalna na świetle

F_{tLss} – stacjonarna fluorescencja na świetle

F_{0Lss} – stacjonarna fluorescencja minimalna na świetle

Indeks zawartości chlorofilu *a* w liściach roślin ogórka oceniano za pomocą miernika chlorofilu SPAD-502 (Konica Minolta, Japonia) i wyrażano w jednostkach względnych.

4.2.2. Termografia w podczerwieni i mikroskopia fluorescencyjna

Rozkład temperatury w liściach ogórkach obrazowany był z wykorzystaniem kamery termowizyjnej na podczerwień (Flir, seria SC7000) dla liści Z3 w czasie T_2 i T_7 . W tych samych punktach czasowych, za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon, seria ECLIPSE Ni, Japonia) zintegrowanego z kamerą cyfrową (Nikon, seria DS-Filc), wizualizowano autofluorescencję chlorofilu obszarów liści zmienionych w wyniku infekcji *PsI*.

4.2.3. Pomiar intensywności wymiany gazowej

Wewnątrzkomórkowe stężenie dwutlenku węgla (C_i), intensywność netto fotosyntezy (P_N), przewodnictwo szparkowe (G_s) oraz intensywność transpiracji (E) określano przy użyciu analizatora gazowego podczerwieni CIRAS 2 (PP Systems, Hitchin, Wielka Brytania). Do pomiarów wykorzystano komorę PLC 4 Board (PP Systems, Hitchin, Wielka Brytania) o powierzchni $2,5 \text{ cm}^2$. Natężenie wymiany gazowej w krążkach o średnicy 5 cm, wyciętych z liści ogórka określano w układzie zamkniętym, przy przepływie powietrza (21% O_2 , 350ppm CO_2) przez kuwetę pomiarową wynoszącym $300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Pomiarów dokonywano przy natężeniu oświetlenia $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, w stałej temperaturze $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Wyniki pomiarów wyrażano w następujących jednostkach: C_i [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$], P_N [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], G_s [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], E [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$].

Intensywność oddychania mitochondrialnego (R) oznaczano przy użyciu elektrody Clarka (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Wielka Brytania). Elektrode umieszczano w komorze LD/2 o objętości 5 cm^3 i podłączano do urządzenia do odczytu danych (CB1D). Pomiarów dokonywano dla krążków o średnicy 5 cm, wyciętych z liści ogórka, a wyniki analizowano przy pomocy programu komputerowego Acquire. Badania prowadzono w powietrzu (21% O_2 , 350ppm CO_2), w układzie zamkniętym, przy natężeniu oświetlenia $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i w stałej temperaturze $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Intensywność oddychania mitochondrialnego wyrażano w $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.2.4. Antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne

4.2.4.1. Przygotowywanie ekstraktów enzymatycznych

W celu oznaczenia aktywności CAT, peroksydazy askorbinianowej (APX), reduktazy dehydroaskorbinianowej (DHAR), reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR), reduktazy glutationowej (GR) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) homogenizowano 0,5 g liści ogórka lub 0,3 cm³ zawiesiny chloroplastów odpowiednio w 2,5 lub 0,1 cm³ 50 mM buforu Na-fosforanowego (pH = 7,0), zawierającego 1 mM EDTA, 1% PVP i 1 M NaCl (oznaczanie aktywności CAT) oraz 1 mM askorbinian sodu (Asc) (oznaczanie aktywności APX, MDHAR, SOD) albo 2 mM β-merkaptoetanol (oznaczanie aktywności DHAR). Otrzymane homogenaty wirowano (18 000 g, 15 min, 4 °C).

4.2.4.2. Oznaczanie aktywności katalazy

Aktywność CAT (EC 1.11.1.6) oznaczano spektrofotometrycznie (Dhindsa i wsp., 1981) na podstawie szybkości rozkładu H₂O₂. Mieszaninę reakcyjną sporządzano z 0,025 cm³ ekstraktu roślinnego, 1,825 cm³ 50 mM buforu Na-fosforanowego (pH = 7,0) oraz 0,15 cm³ 1% H₂O₂. Próba odnośna zawierała 0,025 cm³ buforu użytego do homogenizacji zamiast ekstraktu. Spadek absorbancji w próbach, wywołany rozkładem H₂O₂ mierzono przez 4 min, w temp. 25 °C, przy długości fali λ = 240 nm. Aktywność CAT wyrażano w mmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ białka (ε_{H₂O₂} = 36 mol⁻¹ dm³ cm⁻¹).

4.2.4.3. Oznaczanie aktywności peroksydazy askorbinianowej

Aktywność APX (EC 1.11.1.11.) oznaczano metodą spektrofotometryczną na podstawie szybkości utleniania Asc do dehydroaskorbinianu (DHAsc) (Nakano i Asada, 1981). Do 0,025 cm³ ekstraktu roślinnego dodawano 1,8 cm³ 50 mM buforu Na-fosforanowego (pH = 7,0), 0,025 cm³ 1 mM EDTA, 0,05 cm³ 0,25 mM Asc i 0,1 cm³ 25 μM H₂O₂. Próbkę odnośną sporządzano dodając zamiast ekstraktu roślinnego 0,025 cm³ buforu do homogenizacji. Spadek absorbancji w próbach, wywołany utlenianiem Asc do DHAsc mierzono przez 4 min, w temp. 25 °C, przy długości fali λ = 265 nm. Aktywność APX wyrażano w μmol kwasu askorbinowego (AA) min⁻¹ mg⁻¹ białka (ε_{AA} = 14 mmol⁻¹ dm³ cm⁻¹).

4.2.4.4. Oznaczanie aktywności reduktazy dehydroaskorbinianowej

Aktywność DHAR (EC 1.8.5.1) oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie szybkości redukcji kwasu dehydroaskorbinowego (DHA) do AA (Hossain i Asada, 1984). W celu sporządzenia mieszaniny reakcyjnej do 0,05 cm³ ekstraktu roślinnego dodawano 1,15 cm³ 50 mM buforu Na-fosforanowego (pH = 6,4), 0,4 cm³ 13 mM zredukowanego glutationu (GSH) i 0,4 cm³ 10 mM DHAsc. Próba odnośna zawierała 0,05 cm³ buforu do

homogenizacji zamiast ekstraktu. Przyrost absorbancji w próbach spowodowany redukcją DHA do AA mierzono przez 4 min, w temp. 25 °C, przy długości fali $\lambda = 265$ nm. Aktywność DHAR wyrażano w $\mu\text{mol AA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka ($\epsilon_{\text{AA}} = 14 \text{ mmol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$).

4.2.4.5. Oznaczanie aktywności reduktazy monodehydroaskorbinianowej

Aktywność MDHAR (EC 1.6.5.4) oznaczana była spektrofotometrycznie (4 min, 25 °C, $\lambda = 340$ nm) poprzez pomiar szybkości utleniania NADH do NAD^+ (spadek absorbancji) przez monodehydroaskorbinian (MDHAsc) generowany z Asc z udziałem oksydazy askorbinianowej (AOX) (Arrigoni i wsp., 1981). Mieszanina reakcyjna zawierała 0,1 cm^3 ekstraktu roślinnego, do którego dodawano 1 cm^3 0,1 M buforu Tris-HCl (pH = 7,2), 0,2 cm^3 200 μM NADH, 0,2 cm^3 2 mM Asc i 0,2 cm^3 AOX o aktywności 5 U cm^{-3} . Próba odnośna zawierała 0,1 cm^3 buforu do homogenizacji zamiast ekstraktu. Aktywność MDHAR wyrażano w $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$).

4.2.4.6. Oznaczanie aktywności reduktazy glutationowej

Aktywność GR (EC 1.6.4.2) oznaczano spektrofotometrycznie (Beutler, 1975) poprzez pomiar szybkości utleniania NADPH do NADP^+ przez disulfid glutationu (GSSG) w mieszaninie zawierającej 0,1 cm^3 ekstraktu roślinnego, do którego dodawano 0,25 cm^3 1 M buforu Tris-HCl (pH = 8,0), 0,05 cm^3 600 μM EDTA, 0,2 cm^3 3 mM GSSG, 0,1 cm^3 100 μM NADPH i 1,3 cm^3 wody destylowanej. Próba odnośna zawierała 0,1 cm^3 buforu do homogenizacji zamiast ekstraktu roślinnego. Spadek absorbancji monitorowano przez 4 min, w temperaturze 25 °C, przy długości fali $\lambda = 340$ nm. Aktywność GR wyrażano w $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$).

4.2.4.7. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Metoda oznaczania aktywności SOD (EC 1.15.1.1) polegała na spektrofotometrycznym pomiarze stopnia inhibicji redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT, żółty) do fioletowego diformazanu przez anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generowany w wyniku fotochemicznej redukcji ryboflawiny na świetle UV (Beauchamp i Fridovich, 1971). Do 2,85 cm^3 mieszaniny inkubacyjnej zawierającej 1,45 mg EDTA, 3 mg NBT i 97 mg metioniny w 50 cm^3 50 mM buforu Na-fosforanowego (pH = 6,4) dodawano 0,05 cm^3 ekstraktu roślinnego i 0,1 cm^3 roztworu ryboflawiny (2,3 mg w 100 cm^3 50 mM buforu Na-fosforanowego pH = 7,8). Zawartość otrzymanych próbek mieszano i umieszczano w 50 cm^3 zlewkach 30 cm pod oświetleniem składającym się z dwóch lamp UV. Próby inkubowano 10 min, a następnie mierzono absorbancję w temperaturze 25 °C przy długości fali $\lambda = 560$ nm. W próbie odnośnej (zawierającej roztwór buforowy do homogenizacji

zamiast ekstraktu roślinnego) zachodziła maksymalna redukcja NBT przez $O_2^{\cdot-}$ i odnotowano dla niej maksymalną absorbancję (100%). Jednostka aktywności SOD (1U) odpowiadała 50% zahamowaniu redukcji NBT w porównaniu z próbą odnośną. Aktywność enzymu przeliczano na 1 mg białka.

4.2.4.8. Elektroforeza natywna izoform dysmutazy ponadtlenkowej

W celu oznaczenia izoform SOD (Beauchamp i Fridovich, 1971) homogenizowano 0,5 g liści ogórka w 2,5 cm³ 50 mM buforu Tris-HCl (pH = 8,0) zawierającego 3 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂ i 2% PVP. Uzyskane homogenaty wirowano (15 000 g, 15 min, 4 °C), a do supernatantów dodawano bufor obciążający (40% sacharoza, 0,01% błękit bromofenolowy, 50 mM bufor Tris-HCl pH = 8,0) w stosunku objętościowym 2:1.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w dwustopniowym gradiencie żeli poliakrylamidowych. Otrzymane próbki nanoszono na 5% żel zagęszczający o następującym składzie: 1,4 cm³ wody, 0,6 cm³ 0,5 M buforu Tris-HCl (pH = 6,8), 0,4 cm³ 30% akrylamidu i bisakrylamidu (Sigma), 0,015 cm³ 10% nadtlenodisiarczanu diamonu i 0,01 cm³ N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED, Sigma). Właściwa elektroforeza następowała w 12% żelu rozdzielającym zawierającym 4,9 cm³ wody, 1,9 cm³ 1,5 M buforu Tris-HCl (pH = 8,8), 6 cm³ 30% akrylamidu i bisakrylamidu (Sigma), 0,04 cm³ 10% nadtlenodisiarczanu diamonu i 0,02 cm³ TEMED. Każda próbka (zawierająca 20 µg białka) była nanoszona do odpowiedniej studzienki w kasecie aparatu do elektroforezy (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). Rozdział prowadzono w buforze elektrodowym (10 mM Tris-HCl pH = 8,3, 80 mM glicyna), w temperaturze 4 °C, przy napięciu 200 V prądem stałym o natężeniu 40 mA (w jednej gałęzi obwodu) aż do momentu dotarcia czoła barwnika do dolnej krawędzi żelu rozdzielającego.

Po elektroforezie wykonywano barwienie żeli w celu wykrycia trzech izoform SOD: miedziowo-cynkowej (CuZnSOD), żelazowej (FeSOD) i manganowej (MnSOD). Metoda detekcji tych izoform oparta jest na reakcji dysproporcjonacji $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 katalizowanej przez SOD. Na obszarach żelu wysyconych SOD dochodziło do hamowania redukcji NBT przez $O_2^{\cdot-}$ (rozdział 4.2.4.7) i obszary te pozostawały niewybarwione. Barwienie żeli poprzedzono preinkubacją w obecności inhibitorów: KCN (inhibitor CuZnSOD) oraz H_2O_2 (inhibitor CuZnSOD i FeSOD). W celu detekcji izoform: FeSOD i MnSOD żele inkubowano przez 15 min w 5 mM roztworze wodnym KCN (wizualizacja FeSOD i MnSOD) lub w 5 mM H_2O_2 (wizualizacja MnSOD). Identyfikacja wszystkich trzech izoform wymagała preinkubacji żeli w wodzie destylowanej bez dodatku inhibitorów. W kolejnym kroku wszystkie żele inkubowano bez dostępu światła przez 20 min w 0,05 M buforze Na-fosforanowym (pH = 7,8), zawierającym 2,45 mM NBT, 28 mM EDTA, 28 mM ryboflawinę oraz 28 mM TEMED (Sigma). Po przepłukaniu żeli w wodzie destylowanej inkubowano je na świetle

białym przez 10 min w 0,05 M buforze Na-fosforanowym (pH = 7,8), aż do pojawienia się fioletowego zabarwienia żeli i niewybarwionych prążków w miejscach obecności izoform SOD.

Półilościową analizę aktywności izoform SOD prowadzono przy wykorzystaniu urządzenia do dokumentacji żeli Gel Doc EZ System (BioRad) pracującym na oprogramowaniu Image Lab Software (wersja 5.2.1). Monitorowano pola powierzchni prążków SOD (volume), które wyrażane były w jednostkach względnych. Jako referencyjne przyjęto pole powierzchni dolnego prążka SOD pochodzącej z liścia piętka trzeciego rośliny nieinfekowanej *Ps*/i przypisano mu wartość 1.

4.2.4.9. Oznaczanie aktywności oksydazy askorbinianowej

W celu oznaczenia aktywności AOX (EC 1.10.3.3) homogenizowano 0,25 g liści ogórka w 2,5 cm³ 0,1 M buforu Na-fosforanowego pH = 6,5, zawierającego 1 M NaCl. Otrzymane homogenaty wirowano (15 000 g, 10 min, 4 °C). Zasada oznaczania aktywności AOX polega na pomiarze szybkości reakcji utleniania AA do DHA przez tlen, katalizowanej przez AOX zawartą w ekstrakcie roślinnym (Pignocchi i wsp., 2003). Mieszanina reakcyjna sporządzana była z 0,05 cm³ ekstraktu, 0,75 cm³ 0,1 M buforu Na-fosforanowego pH = 5,6, 0,1 cm³ 0,5 mM EDTA i 0,1 cm³ 0,2 mM Asc. Próba odnośna zawierała bufor do homogenizacji zamiast ekstraktu. Mierzono spadek absorbancji wywołany utlenianiem AA w próbach (4 min, 25 °C, $\lambda = 265$ nm). Aktywność AOX wyrażano w $\mu\text{mol AA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ białka ($\epsilon_{\text{AA}} = 14 \text{ mmol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$).

4.2.4.10. Oznaczanie zawartości kwasu askorbinowego

W celu oznaczenia zawartości AA i DHA homogenizowano 0,5 g liści lub 0,3 cm³ zawiesiny chloroplastów odpowiednio w 2,5 lub 0,1 cm³ 10% kwasu trichlorooctowego (TCA). Uzyskane homogenaty wirowano (18 000 g, 15 min, 4 °C). Zawartość AA i DHA oznaczano spektrofotometrycznie metodą bipirydylową (Kampfenkel i wsp., 1995). W środowisku kwasowym AA redukuje Fe³⁺ do Fe²⁺, który tworzy z 2,2'-bipirydyłem związek kompleksowy o barwie różowej.

Ekstrakty z liści lub chloroplastów z każdego wariantu eksperymentalnego rozdzielono na dwie serie (I i II) po 0,1 cm³ do osobnych probówek typu Eppendorf. Do każdej probówki dodano 0,1 cm³ 0,2 M buforu Na-fosforanowego (pH = 7,4). W celu oznaczenia całkowitej zawartości AA i DHA do prób I serii dodawano 0,05 cm³ 10 mM DTT, który redukuje DHA zawarty w próbce do AA. Następnie próby z DTT inkubowano przez 15 min w temperaturze 37 °C, a po inkubacji nadmiar DTT usuwano przez dodanie 0,05 cm³ 0,5% roztworu *N*-etylomaleimidu (NEM). Równoległe do prób, w których oznaczano zawartość AA (seria II) dodawano 0,1 cm³ 0,2 M buforu Na-fosforanowego (pH = 7,4).

W kolejnym etapie do wszystkich prób dodawano 0,4 cm³ 44% H₃PO₄, 0,2 cm³ 4% 2,2'-bipirydyli w 70% etanolu i 0,1 cm³ 3% FeCl₃. Próby odnośne zawierały 0,1 cm³ 10% TCA zamiast ekstraktu roślinnego. Próby po homogenizacji zawiesiny chloroplastów sporządzano w tej samej proporcji, jednak w dwukrotnie mniejszej objętości. Tak otrzymane mieszaniny inkubowano przez 60 min w temperaturze 37 °C, a następnie mierzono ich absorbancję (25 °C, λ = 525 nm).

Zawartość AA ([AA]) oraz całkowitą zawartość AA i DHA ([AA+DHA]) oznaczano w oparciu o roztwór wzorcowy AA (0,1 mg w 1 cm³ 10% roztworu TCA). Zawartość DHA obliczano ze wzoru: [DHA] = [AA+DHA] – [AA]. Wyniki wyrażano w μmol g⁻¹ świeżej masy (ś.m.) liści lub w nmol g⁻¹ ś.m. (oznaczanie AA i DHA w chloroplastach).

4.2.4.11. Oznaczanie zawartości glutationu

Zawartość GSH i GSSG w liściach i chloroplastach ogórka oznaczano metodą spektrofotometryczną z użyciem kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego), DTNB (Brehe i Burch, 1976). Zasada tej metody opiera się na reakcji grup tiolowych (-SH) GSH z DTNB, w wyniku której powstaje żółty kwas 2-nitro-5-tiobenzoesowy.

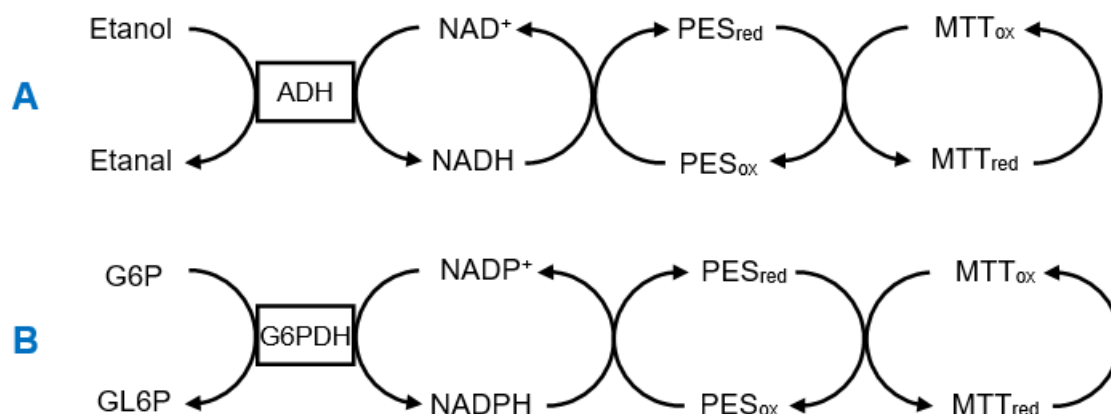
Homogenizowano 0,5 g liści lub 0,3 cm³ zawiesiny chloroplastów odpowiednio w 2,5 lub 0,3 cm³ 1% kwasu sulfosalicylowego, a uzyskane homogenaty wirowano (15 000 g, 15 min, 4 °C). Ekstrakty z każdego wariantu eksperymentalnego przenoszono po 0,5 cm³ do probówek typu Eppendorf i zobojętniano 0,1 cm³ 1 M trietanolaminy. Następnie próby podzielono na dwie równe porcje po 0,3 cm³ każda uzyskując dwie serie prób.

W pierwszej serii prób oznaczano zawartość GSSG. W tym celu dodawano do nich 0,01 cm³ 2-winylopirydyny (etap precypitacji tioli). Tak przygotowane próby po wymieszaniu poddawano 60 min inkubacji w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano (2680 g, 3 min, 25 °C). Równolegle w drugiej serii prób oznaczano całkowitą zawartość GSH i GSSG. Próby te nie zawierały 2-winylopirydyny, ale były uzupełniane 0,01 cm³ 1% roztworu kwasu sulfosalicylowego, inkubowane w temperaturze pokojowej (60 min) i wirowane (2680 g, 3 min, 25 °C). Następnie próby z obu serii wykorzystywano do oznaczeń spektrofotometrycznych. Mieszanina reakcyjna zawierała: 0,02 cm³ ekstraktu roślinnego otrzymanego po inkubacji i wirowaniu, 0,15 cm³ 0,07 M bufor Na-fosforanowy (pH = 7,8), 0,01 cm³ 6,8 mM EDTA, 0,02 cm³ 0,3 mM DTNB, 0,05 cm³ 0,01% albuminy z surowicy bydlęcej (BSA) i 0,05 cm³ 0,2 mM NADPH. Próba odnośna zawierała 0,02 cm³ 1% kwasu sulfosalicylowego zamiast ekstraktu roślinnego. Tuż przed rozpoczęciem pomiaru absorbancji do każdej próby dodawano 1,2 U GR w celu zredukowania GSSG. Wszystkie pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej przez 15 min, λ = 412 nm. Zawartość GSSG ([GSSG]) oraz sumę zawartości GSH i GSSG w przeliczeniu na GSH ([TOTAL]) określano przez porównanie z absorbancją próby zawierającej roztwór wzorcowy GSSG

w 0,1 M buforze Na-fosforanowym (pH = 7,8) o stężeniu $0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Zawartość GSH ([GSH]) obliczano ze wzoru: $[\text{GSH}] = [\text{TOTAL}] - 2[\text{GSSG}]$. Wyniki wyrażano w $\text{nmol g}^{-1} \text{ s.m.}$

4.2.5. Analiza zawartości dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych

Metoda oznaczania zawartości dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych polega na spektrofotometrycznym pomiarze stopnia redukcji bromku 3-(4,5-dimetylotiazolilo-2)-2,5-difenylotetrazoliowego (MTT) do fioletowego formazanu przez zredukowany etylosiarczan fenazy (PES) (Gibon i Larher, 1997). Wydajność redukcji MTT jest wprost proporcjonalna do zawartości dinukleotydów w mieszaninie reakcyjnej. NAD^+ i NADP^+ zawarte w ekstrakcie roślinnym po homogenizacji w środowisku kwasowym redukowane są przez odpowiednio: etanol i glukozy-6-fosforan (G6P) przy udziale dehydrogenazy alkoholowej (ADH, EC 1.1.1.1) i G6PDH (EC 1.1.1.49), a powstające zredukowane dinukleotydy: NADH i NADPH przekazują elektrony na PES, który jest ich donorem dla MTT (Rys. 6). Homogenizacja w środowisku kwasowym prowadzi do hydrolizy NADH oraz NADPH i umożliwia oznaczenie NAD^+ i NADP^+ , natomiast w środowisku zasadowym dochodzi do hydrolizy NAD^+ oraz NADP^+ , dzięki czemu możliwe jest oznaczenie zawartości form zredukowanych dinukleotydów.



Rys. 6. Enzymatyczny cykl redoks z udziałem dinukleotydów: NAD(P)H i NAD(P)^+

ADH i G6PDH katalizują reakcje redukcji utlenionych dinukleotydów: NAD^+ i NADP^+ przez odpowiednio: (A) etanol i (B) G6P. Elektrony ze zredukowanych dinukleotydów: NADH i NADPH są następnie przenoszone przez PES na ich końcowy akceptor – MTT, który redukuje się do fioletowego formazanu. Wydajność tej redukcji jest wprost proporcjonalna do zawartości dinukleotydów.

ADH – dehydrogenaza alkoholowa, G6P – glukozy-6-fosforan, G6PDH – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, GL6P – 6-fosfoglukonolakton, MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazolilo-2)-2,5-difenylotetrazoliowy, PES – etylosiarczan fenazy, red – forma zredukowana, ox – forma utleniona.

W celu oznaczenia zawartości dinukleotydów: NAD(P)H i NAD(P)⁺ homogenizowano 0,25 g liści ogórka w 1 cm³ 0,1 M NaOH (oznaczenie NADH i NADPH) lub 1 cm³ 0,1 M HCl (oznaczenie NAD⁺ i NADP⁺). Otrzymane homogenaty inkubowano w łaźni wodnej w temp. 100 °C przez 5 min, a następnie schładzano na lodzie i wirowano (10 000 g, 10 min, 4 °C). Supernatanty zobojętniano odpowiednio 0,1 M HCl i NaOH i ponownie wirowano w warunkach jw.

Następnie przygotowywano mieszaniny reakcyjne: do dwóch serii probówek typu Eppendorf wprowadzano po 0,5 cm³ mieszaniny sporządzonej z równych objętości 0,1 M buforu trycyna-NaOH (pH = 8,0), 40 mM EDTA, 4,2 mM MTT, 16,6 mM PES oraz substratów dla enzymów: 5,0 M etanolu (seria A, Rys. 2A) albo 25 mM glukozy-6-fosforanu dipotasu (G6PK₂) (seria B, Rys. 2B). Do obu serii probówek dodawano następnie 0,05 cm³ zobojętnionych ekstraktów roślinnych po homogenizacji NaOH (oznaczenie NADH i NADPH) albo HCl (oznaczenie NAD⁺ i NADP⁺) i całość uzupełniano do 0,9 cm³ 0,1 M roztworem NaCl. Tak przygotowane próby inkubowano w łaźni wodnej w temp. 37 °C przez 5 min. Reakcje enzymatyczne rozpoczynano przez dodanie 0,1 cm³ ADH o aktywności 100 U cm⁻³ (seria A, Rys. 2A) lub 0,1 cm³ G6PDH o aktywności 14 U cm⁻³ (seria B, Rys. 2B). Próby odnośne sporządzano dodając 0,1 cm³ 0,1 M buforu trycyna-NaOH (pH = 8,0) zamiast enzymu. Enzymatyczny cykl redoks trwał 40 min i był przerywany przez dodanie 0,5 cm³ 6 M NaCl.

Następnie próby wirowano (10 000 g, 5 min, 4 °C). Supernatant usuwano, a wytrącony osad formazanu rozpuszczano w 1 cm³ 96% etanolu i mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 570$ nm w temp. 25 °C. Krzywą wzorcową do oznaczenia zawartości NAD(P)H i NAD(P)⁺ przygotowywano w zakresie 0-0,05 cm³ 40 μ M NAD⁺ lub NADP⁺. Zawartość dinukleotydów wyrażano w nmol g⁻¹ ś.m.

4.2.6. Oznaczanie zawartości cukrów i fosforanów cukrów

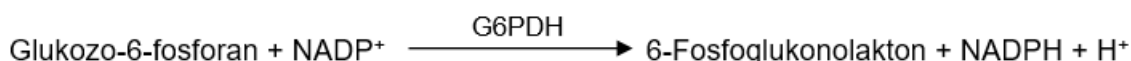
4.2.6.1. Zawartość D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy

Zawartość D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy w liściach ogórka oznaczano metodą spektrofotometryczną wykorzystując enzymatyczny zestaw diagnostyczny (Boehringer Mannheim/R-Biopharm).

W środowisku lekko zasadowym (pH = 7,6) D-glukoza ulega fosforylacji przez ATP do G6P. Reakcję tę katalizuje heksokinaza (HK):

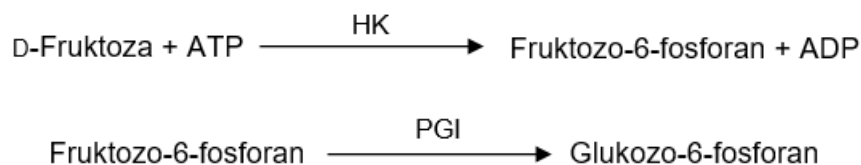


G6P w obecności G6PDH utlenia się do 6-fosfoglukonolaktanu (GL6P). Akceptorem elektronów w tej reakcji jest NADP⁺, który redukuje się do NADPH:



Przyrost absorbancji próby jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego NADPH i zawartości D-glukozy w materiale roślinnym.

Metoda oznaczania zawartości D-fruktozy w liściach ogórka polega na spektrofotometrycznym pomiarze ilości NADPH powstającego w wyniku redukcji NADP^+ przez G6P, który jest końcowym produktem dwóch następujących po sobie reakcji: fosforylacji D-fruktozy przez ATP do fruktozo-6-fosforanu (F6P) przy udziale HK oraz izomeryzacji F6P do G6P katalizowanej przez izomerazę fosfoglukozy (PGI):



G6P utlenia się do GL6P. Reakcję tę katalizuje G6PDH. Elektrony oddawane przez G6P pobierane są przez NADP^+ , który redukuje się do NADPH. Stężenie NADPH powstającego w mieszaninie reakcyjnej jest wprost proporcjonalne do zawartości D-fruktozy w ekstrakcie roślinnym.

W środowisku kwasowym ($\text{pH} = 4,6$) sacharoza ulega hydrolizie do D-glukozy i D-fruktozy. Reakcja ta katalizowana jest przez β -fruktozydazę (inwertazę kwaśną):



Zawartość sacharozy w materiale roślinnym ustala się na podstawie różnicy zawartości D-glukozy w mieszaninie reakcyjnej po i przed enzymatyczną hydrolizą sacharozy.

W celu oznaczenia zawartości D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy 100 mg liści ogórka ucierano na proszek w ciekłym azocie, a następnie homogenizowano w 5 cm^3 ciepłego etanolu 80% (v/v). Homogenaty wirowano (15 000 g, 15 min, 4 °C). Procedurę homogenizacji osadu i wirowania powtarzano jeszcze dwukrotnie, a uzyskane supernatanty łączono. Uzyskiwano w sumie 12 cm^3 ekstraktów, które odparowywano do sucha na wyparce próżniowej w temp. 37 °C. Uzyskany osad zawieszano w 1 cm^3 wody destylowanej i wykorzystywano do oznaczeń.

Mieszaninę do oznaczania zawartości D-glukozy sporządzano z 0,1 cm^3 ekstraktu roślinnego, do którego dodawano 1 cm^3 buforu A (7,2 g trietanolaminy, 110 mg NADP^+ , 260 mg ATP i MgSO_4 w 45 cm^3 wody, $\text{pH} = 7,6$) i 1,9 cm^3 wody destylowanej. Całość mieszano i mierzono absorbancję (A_1) otrzymanej próby (25 °C, $\lambda = 340$ nm). Następnie inicjowano reakcje enzymatyczne dodając 0,02 cm^3 roztworu HK i G6PDH (320 U HK i 160 U G6PDH w 1,1 cm^3 wody). Próby mieszano i po 15 min mierzono ich absorbancję (A_2 , 25 °C, $\lambda = 340$ nm). Próba odnośna zawierała wodę destylowaną zamiast ekstraktu roślinnego. W kolejnym etapie przygotowane mieszaniny wykorzystywano do oznaczenia zawartości

D-fruktozy. Dodawano 0,02 cm³ roztworu PGI (420 U w 0,6 cm³ wody), próby mieszano i po 15 min mierzono absorbancją (A_3 , 25 °C, $\lambda = 340$ nm).

Próby do oznaczania zawartości sacharozy sporządzano z 0,1 cm³ ekstraktu roślinnego i 0,2 cm³ buforu B (0,5 g zliofilizowanego buforu cytrynianowego i 720 U β -fruktozydazy w 10 cm³ wody, pH = 4,6). Całość mieszano i inkubowano przez 10 min w temp. 37 °C – etap hydrolizy sacharozy. Próba odnośna zawierała wodę destylowaną zamiast ekstraktu roślinnego. Następnie dodawano 1 cm³ buforu A oraz 1,7 cm³ wody destylowanej i po wymieszaniu mierzono absorbancję prób (A_{1s} , 25 °C, $\lambda = 340$ nm). W kolejnym kroku przeprowadzono reakcje enzymatyczne. Dodawano 0,02 cm³ roztworu HK i G6PDH – oznaczanie sumy zawartości D-glukozy wolnej i pochodzącej z hydrolizy sacharozy (całkowita D-glukoza). Po wymieszaniu i 15 min inkubacji (25 °C) mierzono absorbancję prób (A_{2s} , 25 °C, $\lambda = 340$ nm). Następnie obliczano różnicę absorbancji:

$$\Delta A_{\text{całkowita D-glukoza}} = (A_{2s} - A_{1s})_{\text{próba z ekstraktem}} - (A_{2s} - A_{1s})_{\text{próba odnośna}}$$

Zawartość cukrów obliczano na podstawie następujących różnic absorbancji:

$$\text{D-glukoza: } \Delta A_{\text{D-glukoza}} = (A_2 - A_1)_{\text{próba z ekstraktem}} - (A_2 - A_1)_{\text{próba odnośna}}$$

$$\text{D-fruktoza: } \Delta A_{\text{D-fruktoza}} = (A_3 - A_2)_{\text{próba z ekstraktem}} - (A_3 - A_2)_{\text{próba odnośna}}$$

$$\text{sacharoza: } \Delta A_{\text{sacharoza}} = \Delta A_{\text{całkowita D-glukoza}} - \Delta A_{\text{D-glukoza}}$$

Wyniki wyrażano w mg g⁻¹ ś.m. ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

4.2.6.2. Zawartość glukozy-6-fosforanu

Zawartość G6P w liściach ogórka oznaczano metodą spektrofotometryczną opartą o pomiar stopnia redukcji NADP⁺ do NADPH przez G6P katalizowanej przez G6PDH (rozdział 4.2.6.1). Ilość powstałego w mieszaninie reakcyjnej NADPH jest wprost proporcjonalna do zawartości G6P w ekstrakcie roślinnym (Chen i wsp., 2002).

Homogenizowano 0,5 g liści ogórka w 2,5 cm³ schłodzonego, 4% (v/v) HClO₄. Homogenaty inkubowano na lodzie przez 30 min, a następnie wirowano (20 000 g, 10 min, 4 °C). Uzyskane supernatanty zobojętniano za pomocą 5 M K₂CO₃ i ponownie wirowano (20 000 g, 10 min, 4 °C) w celu przyspieszenia sedymentacji wytrąconego osadu KClO₄. Po usunięciu osadu do supernatantu dodawano 50 mg węgla aktywnego przemytego 1 M HCl. Po wytrząsaniu przez 15 min otrzymaną zawiesinę wirowano (20 000 g, 10 min, 4 °C). Supernatanty wykorzystywano do oznaczenia zawartości G6P.

Sporządzano 1 cm³ mieszaniny zawierającej 0,1 cm³ ekstraktu roślinnego, 0,7 cm³ 10 mM buforu HEPES-KOH (pH = 7,6), 0,05 cm³ 0,2 mM NADP⁺, 0,1 cm³ 4 mM MgCl₂ i 0,05 cm³ G6PDH o aktywności 20 U cm⁻³. Próba odnośna zawierała 0,1 cm³ 4% HClO₄ zamiast ekstraktu roślinnego. Absorbancję prób mierzono przed dodaniem G6PDH oraz po 4 min od dodania enzymu (25 °C, $\lambda = 340$ nm).

Zawartość G6P w liściach ogórka wyrażano w $\mu\text{g g}^{-1}$ ś.m. ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

4.2.7. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej

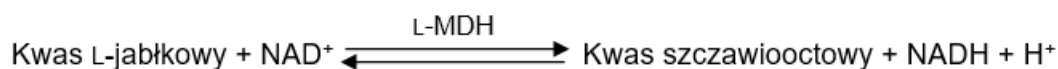
Zasada metody oznaczania aktywności G6PDH (EC 1.1.1.49) polega na spektrofotometrycznym pomiarze szybkości utleniania G6P do GL6P przez NADP^+ (rozdział 4.2.6.1). Szybkość powstawania NADPH jest wprost proporcjonalna do aktywności G6PDH (Sgherri i wsp., 2002).

Homogenizowano 0,5 g liści ogórka lub 0,3 cm^3 zawiesiny chloroplastów (sprawdzenie czystości frakcji) odpowiednio w 2,5 lub 0,1 cm^3 50 mM buforu Tris-HCl (pH = 7,7). Homogenaty wirowano (20 000 g, 15 min, 4 °C). Do sporządzenia mieszaniny reakcyjnej używano 0,1 cm^3 ekstraktu roślinnego, 1,7 cm^3 50 mM buforu Tris-HCl (pH = 7,0), 0,1 cm^3 200 mM MgCl_2 , 0,05 cm^3 10 mM NADP^+ i 0,05 cm^3 80 mM G6P. Próba odnośna zawierała bufor ekstrakcyjny zamiast ekstraktu roślinnego. Pomiar przyrostu absorbancji wywołanego powstawaniem NADPH prowadzono przez 4 min w temp. 25 °C przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$. Aktywność G6PDH wyrażano w $\text{nmol NADP}^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

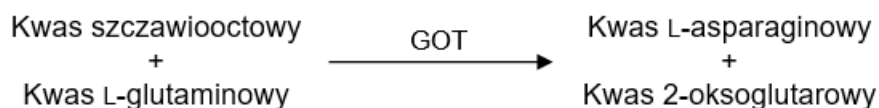
4.2.8. Oznaczanie wybranych metabolitów i enzymów cyklu Krebsa

4.2.8.1. Zawartość kwasu L-jabłkowego

Zawartość kwasu L-jabłkowego (L-MA) w liściach ogórka oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiaru ilości NADH gromadzonego w mieszaninie reakcyjnej jako produktu reakcji redukcji NAD^+ przez L-MA katalizowanej przez dehydrogenazę L-jabłczanową (L-MDH) (Möllering, 1985):



W mieszaninie reakcyjnej ustala się stan równowagi dynamicznej i w celu przesunięcia tej równowagi w prawo usuwa się z układu kwas szczawiooctowy. W tym celu do środowiska reakcji wprowadza się kwas L-glutaminowy (L-Glu) i aminotransferazę L-glutaminian:szczawiooctan (GOT, EC 2.6.1.1), która katalizuje reakcję przeniesienia grupy aminowej z cząsteczki L-Glu na cząsteczkę kwasu szczawiooctowego:



W celu oznaczenia zawartości L-MA w liściach ogórka homogenizowano 0,5 g liści w 2,5 cm³ wody destylowanej. Otrzymane homogenaty wirowano (15 000 g, 15 min, 4 °C).

Mieszaninę reakcyjną sporządzano z 1 cm³ 0,6 M buforu glicyloglicynowego (pH = 10,0), 0,2 cm³ 47 mM NAD⁺, 0,01 cm³ GOT o aktywności 400 U cm⁻³, 1,4 cm³ wody destylowanej i 0,1 cm³ ekstraktu roślinnego. Próba odnośna nie zawierała ekstraktu. Mieszaninę tę inkubowano przez 3 min w temp. 25 °C i mierzono jej absorbancję przy długości fali $\lambda = 340$ nm. Następnie dodawano 0,01 cm³ L-MDH o stężeniu 5 mg cm⁻³ i uzyskane próby inkubowano przez 10 min w temp. 25 °C. Po tym czasie ponownie mierzono absorbancję mieszaniny przy długości fali $\lambda = 340$ nm. Ilość wytworzonego NADH była wprost proporcjonalna do zawartości L-MA w ekstrakcie roślinnym, którą wyrażano w mg g⁻¹ ś.m. ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

4.2.8.2. Zawartość kwasu szczawiooctowego

Zawartość kwasu szczawiooctowego w liściach ogórka oznaczano metodą spektrofotometryczną. W obecności L-MDH kwas szczawiooctowy z ekstraktu roślinnego redukuje się do L-MA. Donorem elektronów w tej reakcji jest NADH. Spadek absorbancji próby jest wprost proporcjonalny do ilości utlenionego NADH i zawartości kwasu szczawiooctowego (Wahlefeld, 1974):



Ekstrakty roślinne do oznaczania zawartości kwasu szczawiooctowego przygotowywano wg procedury opisanej dla G6P (rozdział 4.2.6.2).

Mieszaninę reakcyjną sporządzano z 0,77 cm³ 150 mM buforu Tris-HCl (pH = 7,6), 0,05 cm³ 10 mM EDTA (sól sodowa, pH = 7,0), 0,05 cm³ 0,15 mM NADH oraz 0,03 cm³ L-MDH o aktywności 67 U cm⁻³ i 0,1 cm³ ekstraktu roślinnego. Do przygotowania próby odnośnej używano 0,1 cm³ 4% (v/v) HClO₄ zamiast ekstraktu roślinnego. Absorbancję prób monitorowano przed dodaniem oraz 4 min po dodaniu L-MDH (25 °C, $\lambda = 340$ nm).

Zawartość kwasu szczawiooctowego wyrażano w mg g⁻¹ ś.m. ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

4.2.8.3. Aktywność dehydrogenazy L-jabłczanowej

Zasada metody oznaczania aktywności L-MDH (EC 1.1.1.37) polega na spektrofotometrycznym pomiarze szybkości utleniania NADH do NAD⁺ przez kwas szczawiooctowy, który redukuje się do L-MA (rozdział 4.2.8.2). Spadek absorbancji wywołany

utlenianiem NADH w próbie zawierającej L-MDH jest wprost proporcjonalny do aktywności tego enzymu (Asahi i Nishimura, 1973).

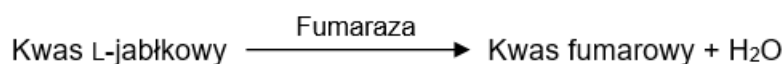
Homogenizowano 0,5 g liści ogórka w 2,5 cm³ 50 mM buforu K-fosforanowego (pH = 7,5). Homogenaty wirowano (14 000 g, 10 min, 4 °C). Otrzymane supernatanty wykorzystywano do oznaczeń.

Mieszaninę reakcyjną sporządzano z 2,6 cm³ 0,1 M buforu K-fosforanowego (pH = 7,5), 0,2 cm³ 3,75 mM NADH, 0,1 cm³ 6 mM kwasu szczawiooctowego i 0,1 cm³ ekstraktu roślinnego. Spadek absorbancji monitorowano przez 4 min (25 °C, $\lambda = 340$ nm). Próba odnośna zawierała 0,1 cm³ buforu K-fosforanowego (pH = 7,5) zamiast ekstraktu.

Aktywność L-MDH wyrażano w nmol NADH min⁻¹ mg⁻¹ białka ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

4.2.8.4. Aktywność fumarazy

Aktywność fumarazy (EC 4.2.1.2) oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiaru szybkości dehydratacji L-MA do kwasu fumarowego (Bergmeyer i wsp., 1974):



Homogenizowano 0,5 g liści ogórka lub 0,3 cm³ zawiesiny chloroplastów (oznaczenie czystości frakcji) odpowiednio w 2,5 lub 0,1 cm³ 50 mM buforu Tris-HCl (pH = 7,7). Homogenaty wirowano (20 000 g, 15 min, 4 °C). Mieszaninę reakcyjną sporządzano z 0,05 cm³ ekstraktu roślinnego, 1,6 cm³ 50 mM buforu Tris-HCl (pH = 8,0), 0,25 cm³ 0,133% Tritonu X-100 oraz 0,1 cm³ 1,2 M L-MA. Próba odnośna zawierała 0,05 cm³ buforu do homogenizacji zamiast ekstraktu roślinnego. Spadek absorbancji wywołany dehydratacją L-MA monitorowano przez 4 min w temp. 25 °C przy długości fali $\lambda = 240$ nm. Aktywność fumarazy wyrażano w nmol L-MA min⁻¹ mg⁻¹ białka ($\epsilon_{\text{L-MA}} = 2,25 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$).

4.2.9. Oznaczanie zawartości białka

Zawartość białka w ekstrakcie z liści i chloroplastów ogórka oznaczano spektrofotometrycznie metodą wykorzystującą kompleksowanie białek przez błękit kumazyny G-250 (CBB, ang. *Coomassie Brilliant Blue G-250*) (Bradford, 1976). Zasadowe i aromatyczne łańcuchy boczne reszt aminokwasowych (Arg, His, Lys, Phe, Trp, Tyr) białek mają zdolność tworzenia w roztworze H₃PO₄ wiązań jonowych i oddziaływań hydrofobowych z CBB. Związanie białka z CBB powoduje przesunięcie maksimum absorpcji barwnika z $\lambda = 465$ nm na $\lambda = 595$ nm, czemu towarzyszy zmiana barwy roztworu z brunatnej na niebieską. Intensywność niebieskiego zabarwienia kompleksu białko-CBB jest wprost proporcjonalna do zawartości białka w mieszaninie reakcyjnej.

Dziesięciokrotnie rozcieńczony ekstrakt enzymatyczny z liści lub nierozcieńczony ekstrakt po homogenizacji zawiesiny chloroplastów mieszano z odczynnikiem Bradford (100 mg CBB w 50 cm³ 95% etanolu, 100 cm³ 85% H₃PO₄, 850 cm³ wody dejonizowanej) w proporcji objętościowej 1:50 i tak otrzymane mieszaniny inkubowano przez 5 min w temp. 25 °C. Absorbancję prób mierzono przy długości fali $\lambda = 595$ nm w kuwetach 1 cm.

Zawartość białka oznaczano przez porównanie z krzywą wzorcową sporządzoną dla roztworów albuminy surowicy bydlęcej w 0,9% NaCl w zakresie stężeń 0-500 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Zawartość białka podawano w mg cm^{-3} .

4.2.10. Oznaczanie aminokwasów metodą HPLC

W celu oznaczenia zawartości aminokwasów: glicyny (Gly), L-seryny (L-Ser), kwasu L-glutaminowego (L-Glu), L-glutaminy (L-Gln) i L-metioniny (L-Met) homogenizowano 0,5 g liści ogórka w 2,5 cm³ 80% metanolu (v/v). Homogenaty wirowano (20 000 g, 15 min, 4°C). Uzyskane supernatanty odparowano do sucha na wyparce próżniowej w temp. 37 °C. Następnie do powstałych osadów dodawano 5 cm³ 6 M HCl i przez 12 h prowadzono hydrolizę prób. W kolejnym etapie hydrolizaty odparowywano do sucha na wyparce próżniowej w temp. 37 °C. Do rozpuszczenia próbek stosowano bufor boranowy (pH = 9,11) sporządzony poprzez zmieszanie roztworów A i B w stosunku objętościowym 1:9. Roztwór A o objętości 1 L otrzymywano poprzez rozpuszczenie 12,404 g H₃BO₃ i 2,892 g NaCl w wodzie destylowanej. Roztwór B sporządzano z 19,108 g Na₂B₄O₇•10H₂O rozpuszczając go w wodzie destylowanej (objętość końcowa V = 1 L). Osady po hydrolizie rozpuszczano w 1 cm³ buforu boranowego zawierającego 10 mM β -merkaptotanol.

Otrzymane próbki poddawano rozdzielaniu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, DIONEX, Sunnyvale, CA, USA) z wykorzystaniem chromatografu wyposażonego w detektor fotodiodowy i fluorymetryczny na kolumnie z odwróconym układem faz (Accucore C18, 150 nm \times 4,6 mm, 2,6 μm , ThermoScientific, USA), połączonej z prekolumną (Hypersil GOLD Drop-In guards, 10 mm \times 4 mm, 5 mm), w temperaturze 40 °C.

Chromatografię prowadzono stosując gradient 40 mM buforu Na-fosforanowego (pH = 7,8) (C) oraz mieszaniny acetonitrylu, metanolu i wody (45:45:10; v/v/v) (D) przy przepływie 2 cm³ min⁻¹, w następujących warunkach: 0 – 1 min: 0% D; 1 – 18,1 min: 0 – 57% D; 18,1 – 18,6 min: 57-100% D; 18,6 – 22,3 min: 100% D; 22,3 – 26 min: 0% D. Przed naniesieniem próby (0,02 cm³) na kolumnę prowadzono derywatyzację aminokwasów o-ftaldialdehydem (OPA) w mieszaninie reakcyjnej sporządzonej z: 0,375 cm³ 0,4 M buforu boranowego (pH = 10,2), 0,075 cm³ 20 μM roztworu aminokwasu wzorcowego/próby badanej, 0,075 cm³ OPA, 0,075 cm³ acetonitrylu, 0,48 cm³ wody destylowanej. Detekcję

OPA-pochodnych aminokwasów prowadzono metodą fluorymetryczną przy fali wzbudzenia $\lambda = 340$ nm i emisji $\lambda = 450$ nm oraz metodą spektrofotometryczną ($\lambda = 338$ nm). Maksima pików pochodzących od OPA-pochodnych aminokwasów na chromatogramach identyfikowano przez porównanie z czasami retencji oraz widmami absorpcyjnymi on-line OPA-pochodnych aminokwasów wzorcowych: Gly, L-Ser, L-Glu, L-Gln, L-Met. Zawartość aminokwasów w próbach badanych obliczano w oparciu o krzywą kalibracyjną wykreśloną dla roztworów aminokwasów wzorcowych i podawano w $\mu\text{mol g}^{-1}$ ś.m.

4.2.11. Analiza wybranych metabolitów metodą GC-MS

Metodę chromatografii gazowej (GC) sprzężonej ze spektrometrią masową (MS) stosowano do oznaczenia względnej zawartości mio-inozytolu, fitolu, α -, γ - oraz δ -tokoferolu, kwasów: glicerynowego, palmitynowego, linolowego, α -linolenowego i stearynowego, 3-fosfoglicerynianu, palmitynianu fitylu oraz trehalozy i rafinozy w liściach ogórka.

W celu przygotowania prób do oznaczeń GC-MS ucierano na sucho 1 g zliofilizowanych liści ogórka. Ze względu na zróżnicowaną budowę cząsteczek analizowanych metabolitów, do ekstrakcji użyto rozpuszczalników o różnej polarności: n-heksanu, eteru dietylowego i metanolu. W pierwszym etapie ekstrahowano najmniej polarne metabolity: tokoferole, długołańcuchowe alkohole, kwasy karboksylowe i estry. Proszek z liści zalewano 20 cm^3 n-heksanu, dodawano $0,05 \text{ cm}^3$ heksanowego roztworu n-dokozanu o stężeniu 1 mg cm^{-3} (standard wewnętrzny) i poddawano ekstrakcji z użyciem mieszadła magnetycznego przez 30 min. Po sedymentacji osadu ekstrakt sączono przez bibułę filtracyjną, a do osadu dodawano ponownie 20 cm^3 n-heksanu (bez standardu wewnętrznego) i procedurę ekstrakcji powtarzano jeszcze dwukrotnie. Pozyskany przesącz odparowywano na wyparce próżniowej w temp. $65 \text{ }^\circ\text{C}$ pozostawiając ok. $0,5 \text{ cm}^3$ ekstraktu, który uzupełniano n-heksanem do 1 cm^3 uzyskując właściwą próbkę do rozdziału na kolumnie GC. Wysuszony osad liści po ekstrakcji n-heksanem zalewano następnie 20 cm^3 eteru dietylowego i ekstrahowano kolejne metabolity: niskocząsteczkowe kwasy karboksylowe i estry analogicznie jak w pierwszym etapie. Po odparowaniu ekstraktów do sucha na wyparce próżniowej w temp. $40 \text{ }^\circ\text{C}$ uzyskany osad rozpuszczano w $0,5 \text{ cm}^3$ pirydyny. W otrzymanym roztworze prowadzono derywatyzację metabolitów uzyskując lotne pochodne trimetylosililowe. W tym celu do pirydynowego roztworu dodawano $0,05 \text{ cm}^3$ *N,O*-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (BSTFA) zawierającego 1% chlorotrimetylosilan (TMCS). Derywatyzację przeprowadzano ogrzewając roztwory w termobloku w temp. $70 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 30 min uzyskując właściwe próbki do analizy GC. Suchy osad liści po ekstrakcji eterem dietylowym wykorzystywano do ekstrakcji metanolem niskocząsteczkowych alkoholi

i cukrów. Po ekstrakcji i odparowaniu ekstraktów (90 °C) prowadzono identycznie jak poprzednio derywatyzację z wykorzystaniem BSTFA i TMCS.

Przygotowane próbki ze wszystkich trzech serii ekstrakcji analizowano za pomocą chromatografu gazowego HP 6890 wyposażonego w detektor masowy MSD 5973 (Agilent Technologies, USA) z autosamplerem 7693A, elektroniczną kontrolą ciśnienia i dozownikiem Split/Splitless. Dozownik pracował w trybie Split 1:50 w temperaturze 250 °C. Objętość wprowadzanej do dozownika próbki wynosiła 0,001 cm³. Rozdział prowadzono na kolumnie wypełnionej 5% difenylem i 95% dimetylopolisiloksanem (HP-5MS, 30 m × 0,25 mm, 0,25 μm, Agilent Technologies) z szybkością przepływu helu 1 cm³ min⁻¹. Widma EIMS uzyskiwano przy energii jonizacji 70 eV, co odpowiada przeciętnej energii wiązań w cząsteczkach związków organicznych, w temperaturze źródła 230 °C i temperaturze kwadrupola 150 °C. Detektor MS ustawiony był na skanowanie mas cząsteczkowych w zakresie 40-620 u. Chromatogramy rejestrowano w zaprogramowanym reżimie temperatury zmieniającej się liniowo w przedziale 50-320 °C z szybkością 3 °C min⁻¹. Dla wszystkich próbek chromatogramy zintegrowano w celu uzyskania czasów retencji i obszarów pików chromatograficznych przy użyciu oprogramowania Chemstation (Agilent Technologies). W analizach GC-MS identyfikacja metabolitów wymagała uwzględnienia dwóch niezależnych parametrów analitycznych: widma masowego i wskaźnika retencji (Van Den Dool i Kratz, 1963). Do obliczenia wskaźników retencji pików chromatograficznych zastosowano roztwór n-alkanów (C₉-C₄₀) w n-heksanie. Wartości doświadczalne wskaźników widm retencji i widm masowych porównywano z bazami literaturowymi (NIST'11, Adams 4). Zawartości analizowanych metabolitów obliczano względem standardu wewnętrznego biorąc pod uwagę pola powierzchni pików na chromatogramach GC.

4.2.12. Oznaczanie profilu ekspresji genów metodą qRT-PCR

4.2.12.1. Izolacja RNA

Izolacja RNA z liści ogórka wykonywana była z użyciem zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EUR^x®). Przed izolacją przygotowywano bufor do homogenizacji: roztwory LG i RL (elementy zestawu) mieszano z β-merkaptioetanołem w stosunku objętościowym 100:1.

Liście ogórka o masie 50 mg umieszczano w sterylnej probówce typu Eppendorf i homogenizowano za pomocą plastikowej szpatułki w 0,3 cm³ buforu do homogenizacji (0,2 cm³ buforu LG, 0,1 cm³ buforu RL). Próbę wirowano (20 000 g, 4 min, 4 °C). Supernatant przenoszono do nowej próbki typu Eppendorf (RNase-free) i dodawano 0,2 cm³ buforu RL. Po dokładnym wymieszaniu zawartość próbki przenoszono do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 cm³ probówce odbierającej. Minikolumnę

wirowano (11 000 g, 2 min, 4 °C). Do probówki odbierającej z przesączem dodawano 0,3 cm³ 96% etanolu i całość mieszano przez pipetowanie. Otrzymaną mieszaninę przenoszono do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Minikolumnę wirowano (11 000 g, 1 min, 4 °C). Przesącz usuwano. Do minikolumny dodawano 0,4 cm³ buforu płuczącego Wash DN1 i całość ponownie wirowano (11 000 g, 1 min, 4 °C). Przesącz usuwano, a do minikolumny umieszczonej w nowej probówce odbierającej dodawano 0,05 cm³ buforu DNR zawierającego 2 U (0,001 cm³) DNAzy I i całość inkubowano przez 10 min w temp. 25 °C. Następnie do minikolumny dodawano 0,4 cm³ buforu Wash RB1. Minikolumnę wirowano (11 000 g, 1 min, 4 °C). W kolejnym etapie dodawano 0,65 cm³ buforu płuczącego Wash RBW i minikolumnę ponownie wirowano (11 000 g, 1 min, 4 °C). Przesącz usuwano, a minikolumnę umieszczano w nowej probówce odbierającej. Po dodaniu 0,35 cm³ buforu płuczącego Wash RBW minikolumnę wirowano (11 000 g, 2 min, 4 °C). Po usunięciu przesączu minikolumnę przenoszono do nowej probówki odbierającej i dodawano 0,05 cm³ wody wolnej od RNAz. Minikolumnę wirowano (11 000 g, 1 min, 4 °C). Uzyskany przesącz w probówce zawierał RNA wykorzystywany do dalszych etapów analizy.

4.2.12.2. Oznaczanie stężenia, czystości i jakości preparatu RNA

Stężenie wyizolowanego RNA oceniano metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru NanoDrop[®] (ND-1000). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 260$ nm, a zawartość RNA wyrażano w $\mu\text{g cm}^{-3}$ przyjmując wynik 1 dla stężenia $40 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Czystość preparatu RNA oznaczano w oparciu o pomiar stosunków absorbancji: A_{260}/A_{280} oraz A_{260}/A_{230} (NanoDrop[®], ND-1000). Wartość w przedziale 1,8 – 2,2 wskazywała na wysoką czystość uzyskanego RNA.

Jakość otrzymanego preparatu oceniano przeprowadzając elektroforezę próbek w żelu agarozowym. Żel do elektroforezy sporządzano rozpuszczając na gorąco 0,6 g agarozy w 60 cm³ buforu 1×TAE (40 mM Tris pH = 8,0, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA). Po przestudzeniu do uzyskanego roztworu dodawano 0,0015 cm³ bromku etydyny. Po wymieszaniu roztwór wylewano do saneczek aparatu do elektroforezy i pozostawiano do zastygnięcia. Do 0,01 cm³ preparatu RNA zawierającego 5 μg RNA dodawano 0,002 cm³ buforu 1×TAE i 0,004 cm³ buforu obciążającego (15% glicerol, 0,1% EDTA, 0,025% błękit bromofenolowy, 0,025% cyjanoksylen). Uzyskany roztwór RNA przenoszono do studzienek w żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono przez 45 min przy stałym napięciu $U = 100$ V. Rozwinięty elektroforegram oceniano w świetle UV w transiluminatorze.

4.2.12.3. Odwrotna transkrypcja

Synteza komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy RNA (reakcja odwrotnej transkrypcji) została wykonana przy użyciu zestawu NG dART RT Kit (EUR^x®).

Mieszaninę reakcyjną przygotowano w sterylnej, wolnej od nukleaz próbówce 0,2 cm³ (tzw. PCR-ówka). Jedna próbka zawierała 0,002 cm³ buforu 5×NG cDNA, 0,002 cm³ wody wolnej od RNAz, 0,0005 cm³ starterów (Random Hexamer Primers), 0,0005 cm³ mieszaniny NG dART Mix (zawierającej deoksynukleotydy, odwrotną transkryptazę i inhibitor RNAz) oraz 0,005 cm³ preparatu zawierającego 800 ng RNA. Zawartość próbki mieszano i wirowano (10 000 g, 1 min, 25 °C), a następnie inkubowano kolejno przez 10 min w temp. 25 °C i 50 min w temp. 50 °C. Reakcję odwrotnej transkrypcji przerywano inkubując próbkę przez 5 min w temp. 85°C.

4.2.12.4. Reakcja Real Time PCR z wykorzystaniem fluoroforu SYBR-Green®

Łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) wykonano na aparacie LightCycler 480 II (Roche Applied Science) z użyciem SensiFAST SYBR® No-ROX Kit (Bioline). Analizowano ekspresję 19 genów – 2 referencyjnych: genu białka ubikwitynopodobnego i genu α -tubuliny oraz 17 genów badanych. Projekty starterów (Tab. 2) oparto na podstawie sekwencji transkryptów dostępnych w bazie danych Reference Sequence (program BLAST, NCBI). Sprawdzano specyficzność starterów dla określonych transkryptów oraz analizowano, czy podczas reakcji nie będą tworzyć się niepożądane produkty splicingowe. Metoda qRT-PCR polega na monitorowaniu kinetyki łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie jej trwania. W tym celu do mieszaniny reakcyjnej wprowadza się barwnik fluorescencyjny tworzący kompleksy z DNA. Intensywność fluorescencji emitowanej przez te kompleksy jest wprost proporcjonalna do stężenia amplikonów, którego przyrost można analizować na bieżąco. W badaniach ekspresji genów użyto barwnik SYBRGreen.

Reakcje qRT-PCR przeprowadzano w objętości 0,015 cm³. Mieszanina reakcyjna składała się z 0,0075 cm³ 2×Master Mix SYBRGreen, 0,0025 cm³ 3 μ M starterów (lewego i prawego) oraz 0,005 cm³ 15-krotnie rozcieńczonych preparatów cDNA lub przygotowanych rozcieńczeń pozwalających wykreślić krzywą wzorcową. Krzywa wzorcową składała się z pięciu punktów. Wyjściowy roztwór cDNA dla tej krzywej stanowiła 4-krotnie rozcieńczona mieszanina dziesięciu losowo wybranych preparatów cDNA. Kolejne punkty krzywej uzyskiwano poprzez 3-krotne, seryjne rozcieńczenia mieszaniny cDNA. Kontrola negatywna zawierała 0,005 cm³ wody używanej do rozcieńczeń zamiast preparatu cDNA. Łańcuchowe reakcje polimerazy prowadzono w warunkach podanych w Tab. 3.

Tab. 2. Zestawienie genów referencyjnych i badanych wraz z sekwencjami starterów

Numer NCBI	Gen	Starter lewy	Starter prawy
AY372537.1	Białko ubikwitynopodobne	ACCTTGTGCTCCGTCTCAG	CCTTCTTGTGCTTGTGCTTGAT
AJ715498	α -Tubulina	GCACTGGTCTTCAAGGAT	GTAAGGCTCAACGACAGA
GU248529	Katalaza	TTCCAATCAATTACCGTCACAT	ATTCTAATAGCCTCCTCTTCCA
D88649	Peroksydaza askorbinianowa	GCAAGGATTCCAAGACTG	GTAACCTCAACAGCAACAA
XM_004146902	Reduktaza glutationowa	TAGTGCTGTTCTTGTGCTGTT	GCCGAAAGTTTGTGTGTAGATG
XM_011654801	Dysmutaza ponadtlenkowa	GAACTGAAGCCTCCTCCATA	CTCTATCTGTCTGTTAAGGTTGTC
L21937	Duża podjednostka RuBisCO	ATATCTTGGCAGCATTCC	TTCCATAGCATCGTCCTT
AJ417435	Karboksylaza fosfoenolopirogronianowa	ACTTCGTCTCCGTGATTCATACAT	GGTTTGCTTGCTTCCATTATTCC
LT160744	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	AAGGTGGCAATCAATGGA	GACGACAACAACATCAAGG
XM_004144692	Dehydrogenaza glukozy- 6-fosforanowa	CTCGGCAAGTTCCTGAATCG	TCAACATCCACTGAAGCATCC
XM_004137169	Dehydrogenaza L-jabłczanowa	CAAGATGGAGGAACAGAAGTAG	TTCGGTGACGGTTGATTG
NM_001308925	Dehydrogenaza izocytrynianowa	CAAGAAGTCTACGAATCTCAGT	CAGAAGTCATCAAGCCAAGA
XM_004152189	Fumaraza	TGCCACACCTCTAACTCTTG	CAACAGCCGTTCCACCTT
XM_004136337	Heksokinaza	ATTCATCCTGAGCACACC	CACACCTCTACGACGATT
XM_004142877.2	Dekarboksylaza glicyny	TGCGGCTGGAGAATATGC	CGTGTGCTGAGAGTGAAT
XM_004144390	Oksydaza glikolanowa	GTGGAAGCAGGTGTTGATGGAAT	CAGAAATAGTGGCAGGAGCAAAGT
XM_004136929	Tiodoksyna M3	TTCAATCGCCGTCTTAATCC	GTCCACACCAACTAGCATAA
KP727817.1	Inwertaza kwaśna	ACCATCCGCTTCATTATGC	CGTCGTGCCTTGATCATC
XM_004150438	Inwertaza zasadowa	CTCTTGAAGGTCAGGAAT	TTCTGGTCTGTTTCATCTT

Tab. 3. Warunki reakcji qRT-PCR prowadzonej w obecności barwnika SYBRGreen

Program	Parametry
Denaturacja wstępna	95 °C, 5 min
Amplifikacja (35 cykli)	95 °C, 10 s 55 °C, 15 s 72 °C, 20 s
<i>Odczyt fluorescencji</i>	
Krzywa topnienia	65-95 °C, 0,1 °C s ⁻¹
Schłodzenie aparatu	40 °C, 30 s

Analiza krzywych topnienia wskazała na powstawanie pojedynczego produktu PCR w każdej reakcji. Otrzymane wyniki normalizowano względem genów referencyjnych. Obliczanie względnej ekspresji genów przeprowadzono metodą podwójnej delty (metoda Livak'a) z wykorzystaniem pakietu Project R, wersja 3.2.2 (GNU Project, Bell Laboratories, Lucent Technologies).

4.3. Statystyczne opracowanie wyników

Zawarte w pracy wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 3-7 niezależnych powtórzeń eksperymentalnych. Przy wszystkich wynikach liczbowych podano odchylenia standardowe ($\pm\sigma$). Dla każdego wariantu eksperymentalnego i dla wszystkich punktów czasowych jedno powtórzenie eksperymentalne pochodziło z jednej uprawy roślin. Dokładna liczba powtórzeń eksperymentalnych wskazana jest przy opisie danego parametru.

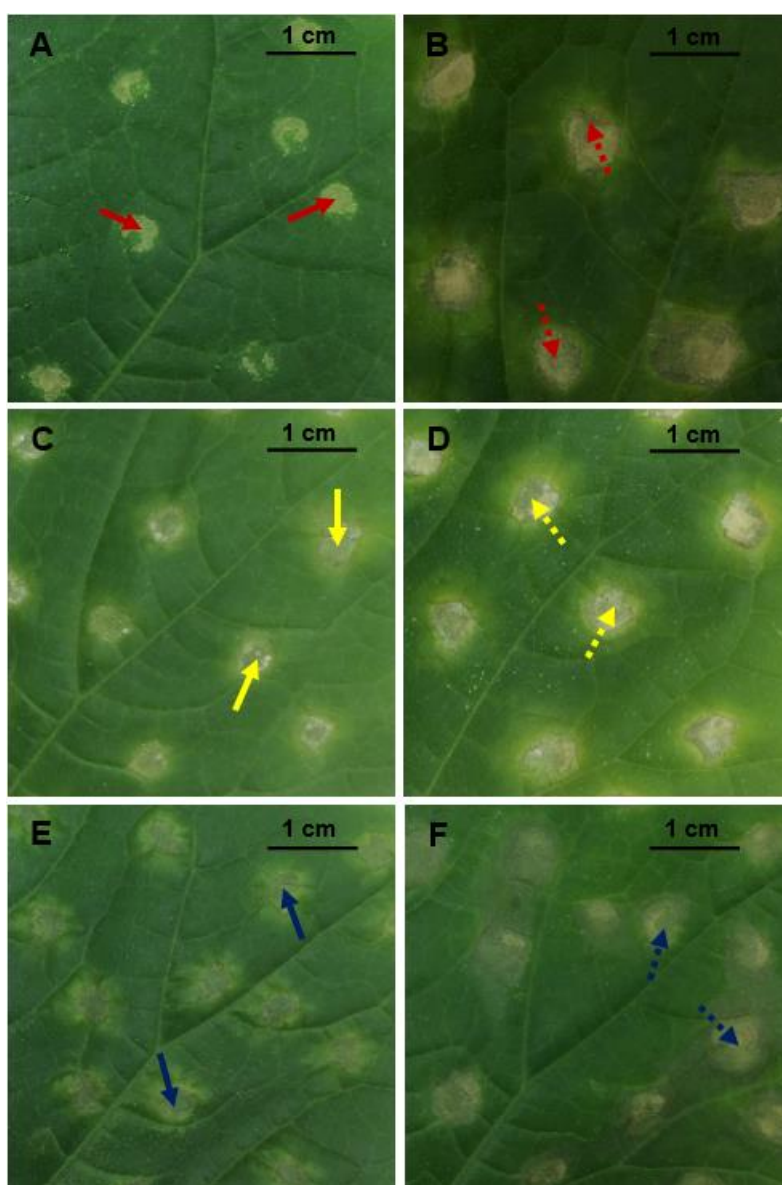
Istotność statystyczną uzyskanych wyników oceniano stosując test ANOVA rang Kruskala-Wallisa (Statistica[®], wersja 12). Badano hipotezę zerową (H_0) o braku wpływu danego czynnika oraz hipotezę alternatywną (H_1) o istotnym wpływie tego czynnika przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Dane w jednym punkcie czasowym, które oznaczone są tymi samymi literami alfabetu pozostają wobec siebie nieistotne statystycznie.

5. WYNIKI

5.1. Rozwój infekcji *PsI*

Pierwsze objawy kanciastej plamistości liści ogórka w postaci chlorotycznych plam w miejscach inokulacji liści Z3 pojawiały się w czasie T₂ (Rys. 7A). W ciągu kolejnych 5 dni plamy powiększały się, stawały się nieregularne, a ostatecznie ulegały nekrozie (Rys. 7B). Przez cały okres prowadzenia analiz infekcja nie rozprzestrzeniła się poza liście Z3, a nekrozy otoczone chlorotycznymi obwódkami były ograniczone nerwami bocznymi.



Rys. 7. Makroskopowe objawy infekcji *PsI*

We wczesnej fazie infekcji (T₂) obserwowano chlorotyczne zmiany obszarów inokulowanych *PsI* (czerwone, ciągłe strzałki, A).

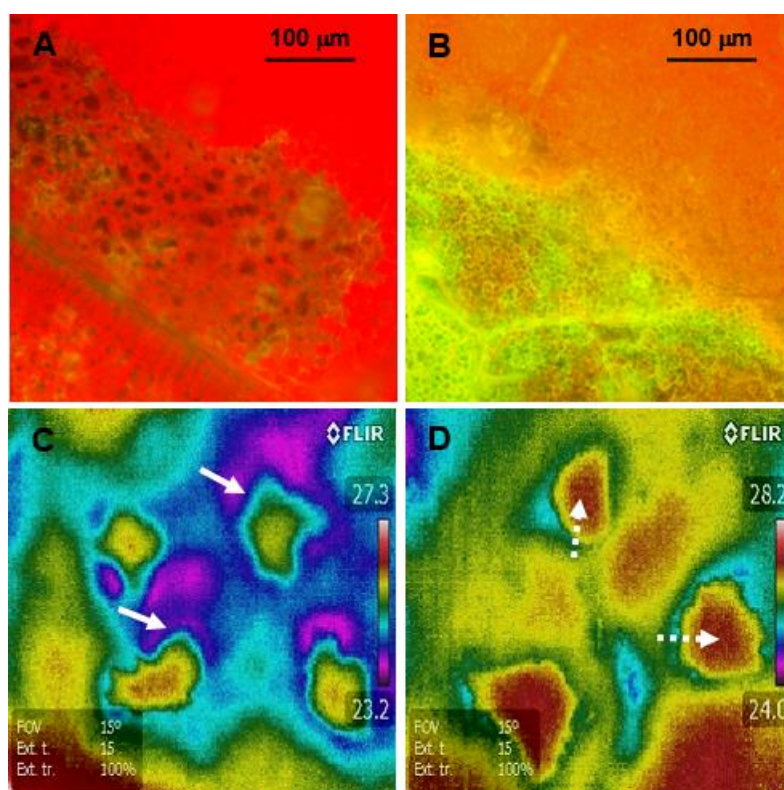
Wraz z rozwojem choroby (T₇) wokół miejsc inokulacji pojawiały się nieregularne nekrozy z chlorotycznymi obwódkami (czerwone, przerywane strzałki, B).

W T₂, na liściach po aplikacji DCMU, pojawiały się jasne nekrozy otoczone cienkimi, chlorotycznymi obwódkami (żółte, ciągłe strzałki, C), które w T₇ obejmowały większą powierzchnię liścia (żółte, przerywane strzałki, D).

Po aplikacji DBMIB, w T₂, na liściach rozwijały się jasne nekrozy bez chlorotycznych obwódek (niebieskie, ciągłe strzałki, E), które wraz z upływem czasu (T₇) stawały się ciemniejsze (niebieskie, przerywane strzałki, F).

Makrofotografie na planszy są reprezentatywne.

Po aplikacji DCMU i DBMIB pierwsze objawy makroskopowe w postaci nekroz o jaśniejszym odcieniu i mniejszych rozmiarach wystąpiły wcześniej, niż u roślin zakażonych nietraktowanych inhibitorami. W przypadku DCMU nekrozy te były otoczone cienkimi, chlorotycznymi obwódkami (Rys. 7C), natomiast po aplikacji DBMIB nie stwierdzono obecności chlorotycznych obwódek (Rys. 7E). W T_7 zmiany chorobowe nasiliły się w stosunku do stwierdzonych w T_2 po aplikacji inhibitorów. Stwierdzono rozwój nekroz otoczonych chlorotycznymi obwódkami po aplikacji DCMU, które zajmowały większą powierzchnię niż we wczesnej fazie patogenezы (Rys. 7D) i pozbawionych obwódek po zastosowaniu DBMIB (Rys. 7F). Znamiona infekcji po aplikacji DBMIB w T_7 przypominały objawy zakażenia mniej wirulentnym szczepem.



Rys. 8. Mikroskopowe i termiczne objawy infekcji *PsI*

We wczesnej fazie infekcji (T_2) obserwowano zaburzenia fluorescencji chlorofilu w miejscach inokulacji (A) oraz obniżenie temperatury obszarów wokół miejsc inokulacji liści Z3 (białe, ciągłe strzałki, C). Wraz z rozwojem choroby (T_7) dochodziło do znacznego obniżenia fluorescencji chlorofilu w miejscach inokulacji i w ich sąsiedztwie (B) oraz wzrostu temperatury miejsc inokulacji (białe, przerywane strzałki, D). Mikrofotografie i obrazy termowizyjne na planszy są reprezentatywne.

Rozwojowi choroby wywołanej przez *PsI* towarzyszyło znaczne zmniejszenie intensywności autofluorescencji chlorofilu w liściach Z3, szczególnie w miejscach inokulacji (Rys. 8A, B).

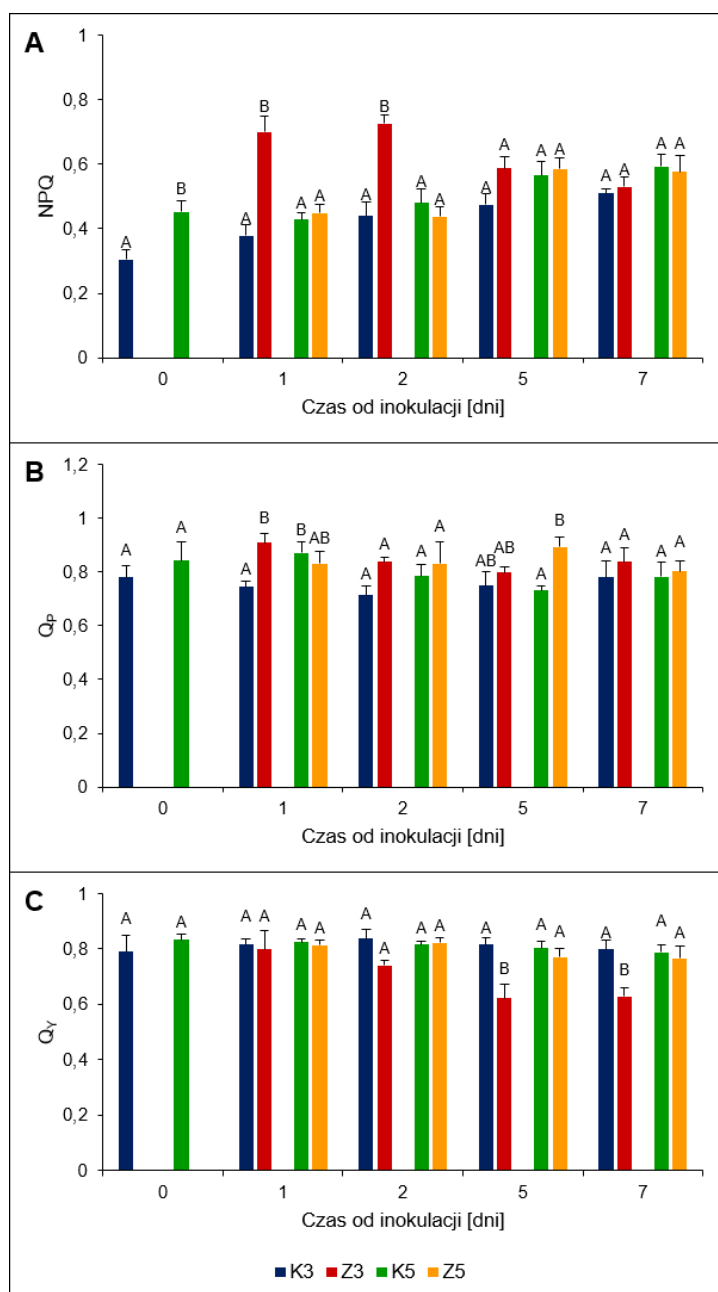
Obrazowanie rozkładu temperatury powierzchni blaszki liściowej ujawniło, że obszary wokół miejsc inokulacji liści Z3 początkowo (T_2) charakteryzują się niższą temperaturą niż regiony aplikacji *PsI* (Rys. 8C). Wraz z rozwojem infekcji (T_7) efekt ten ustępował, a nekrozie obszarów inokulacji towarzyszyło ich wysuszenie i wzrost temperatury (Rys. 8D).

5.2. Analiza parametrów fluorescencji chlorofilu

W dniu inokulacji *PsI* (T_0) liście K5 odznaczały się o 48% wyższą wartością NPQ w porównaniu z K3. We wczesnej fazie patogenezы (T_1 , T_2) stwierdzono poinfekcyjny wzrost wartości NPQ w liściach Z3 w porównaniu z K3 odpowiednio o 85 i 65% (Rys. 9A).

Istotne zmiany wartości Q_P po inokulacji stwierdzono jedynie w liściach Z3 w czasie T_1 (wzrost o 22% w stosunku do K3) i w Z5 w czasie T_5 (wzrost o 22% w porównaniu z K5). Wartości Q_P oznaczone dla liści K3 i K5 nie różniły się (Rys. 9B).

Wykazano, że wyłącznie w późnym stadium patogenezы dochodzi do poinfekcyjnego obniżenia wartości Q_Y w liściach Z3 (o 24% w T_5 i o 21% w T_7 w porównaniu z K3). Stwierdzono również, że w T_5 i T_7 w liściach Z5 wartości Q_Y są większe odpowiednio o 24 i 22% niż w liściach Z3 (Rys. 9C).



Rys. 9. Parametry fluorescencji chlorofilu a w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Mierzono: (A) niefotochemiczne wygaszanie fluorescencji (NPQ), (B) fotochemiczne wygaszanie fluorescencji (Q_P) oraz (C) maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II (Q_Y). Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Stwierdzono, że zastosowanie inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów (DCMU i DBMIB) wywołało wzrost wartości NPQ w liściach K3 we wszystkich punktach czasowych, przy czym największą różnicę oznaczono w T₅ (wzrost NPQ o 79 i 114% odpowiednio dla DCMU i DBMIB w porównaniu z kontrolą). Podobną zmianę stwierdzono dla liści K5. W T₇ NPQ liści K5 traktowanych DCMU było o 55% wyższe w porównaniu z kontrolą, natomiast w T₁ stwierdzono o 57% większe NPQ liści K5 traktowanych DBMIB w porównaniu z kontrolą (Rys. 9A, 10A, D). Stwierdzono, że wartości Q_P w liściach K3 i K5 po potraktowaniu DCMU są we wszystkich punktach czasowych mniejsze niż dla odpowiedniej kontroli. W T₇ oznaczono o 49% mniejsze Q_P w liściach K3 traktowanych DCMU w porównaniu z K3, którym nie aplikowano inhibitora (Rys. 9B, 10B). Analogiczne zmiany stwierdzono dla Q_Y w liściach K3 po potraktowaniu ich zarówno DCMU, jak i DBMIB. Największe różnice oznaczono w T₇: po potraktowaniu DCMU w liściach K3 wartość Q_Y była o 25% niższa niż w kontroli, natomiast po aplikacji DBMIB liście K3 miały o 50% mniejsze Q_Y niż liście K3, które nie były traktowane tym inhibitorem (Rys. 9C, 10C, F).

Pod wpływem inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów profil parametrów fluorescencji chlorofilu *a* zmienił się. Stwierdzono, że w początkowym stadium patogenezы (T₁, T₂) infekcja stymuluje NPQ w liściach Z3 potraktowanych DCMU (Rys. 10A). Efekt ten jest silniejszy niż w liściach nietraktowanych inhibitorem (Rys. 9A). Natomiast w późnej fazie infekcji u roślin traktowanych DCMU trend poinfekcyjnych zmian był przeciwny i w T₅ oraz T₇ w liściach Z3 oznaczono odpowiednio o 58 i 51% niższą wartość NPQ niż w liściach K3. Istotne statystycznie zmiany w wartości NPQ dla liści piętra piątego po inokulacji stwierdzono jedynie w T₇ (obniżenie o 40% w stosunku do kontroli) (Rys. 10A). U roślin kontrolnych traktowanych DCMU wartości NPQ w liściach młodszych były wyższe niż w liściach starszych: za wyjątkiem T₅, w kolejnych dniach analizy (T₀, T₁, T₂ i T₇) stwierdzono odpowiednio o 29, 33, 31, 30% wyższe NPQ w liściach K5. Z kolei u roślin zakażonych wartość NPQ była wyższa w liściach Z5 o 93% w porównaniu z Z3 jedynie w T₅ (Rys. 10A).

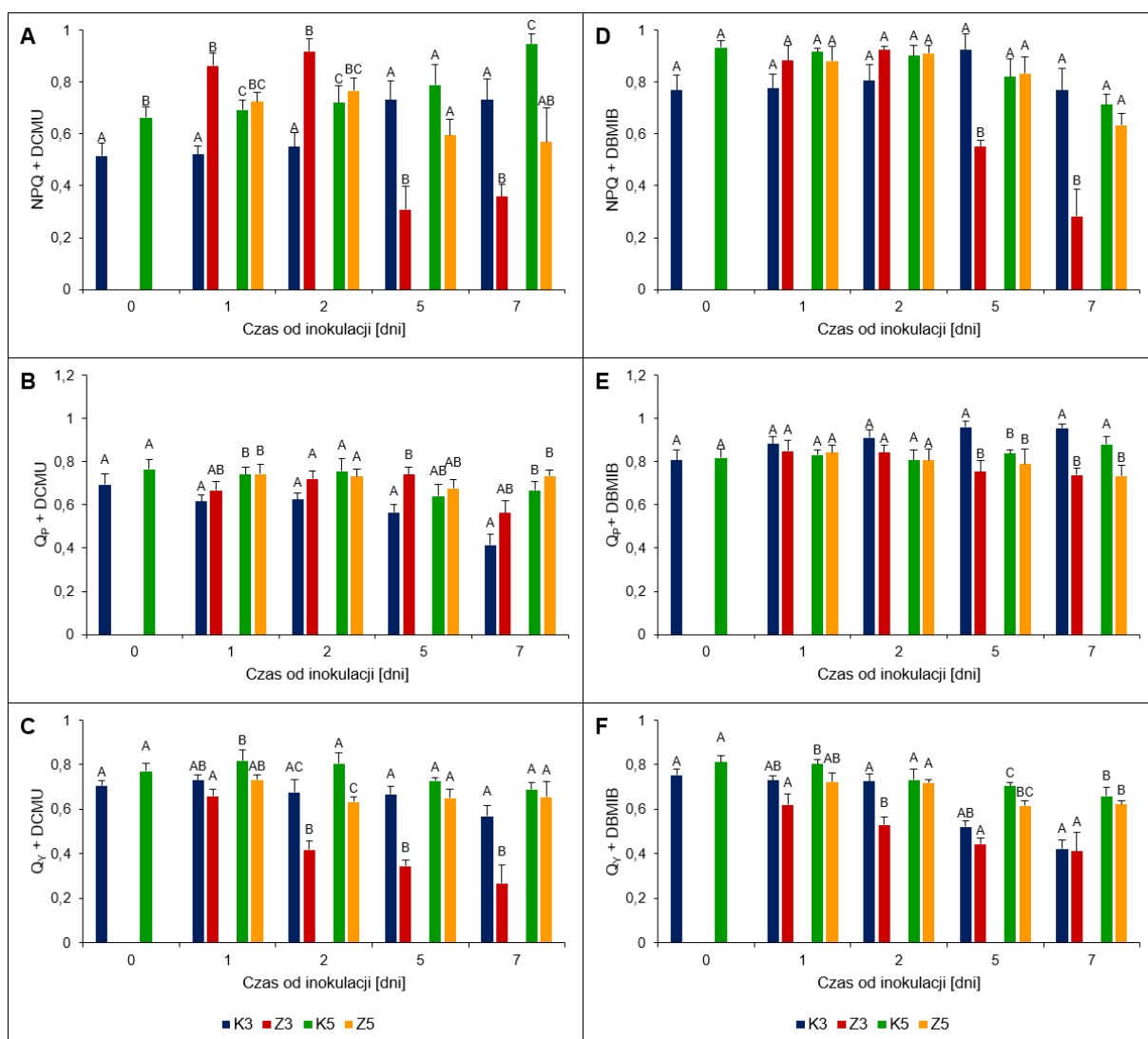
Aplikacja DCMU wpłynęła na poinfekcyjny wzrost wartości Q_P w liściach Z3 w T₅ (wzrost o 31% w stosunku do kontroli). Stwierdzono również, że w T₁ i T₇ wartości Q_P w liściach K5 stanowiły odpowiednio 120 i 161% wartości Q_P w liściach K3 (Rys. 10B).

Potraktowanie roślin ogórka DCMU wywołało poinfekcyjny spadek wartości Q_Y w liściach obu pięter. Efekt ten nasilał się wraz z rozwojem infekcji i był szczególnie zauważalny dla liści piętra trzeciego. W T₂, T₅ i T₇ wartości Q_Y były niższe w liściach Z3 odpowiednio o 38, 48 i 53% w stosunku do kontroli. W liściach Z5 stwierdzono natomiast obniżenie wartości Q_Y o 21% w stosunku do K5 jedynie w T₂. Ponadto w T₂, T₅ i T₇, w liściach Z5 oznaczono odpowiednio o 52, 88 i 145% wyższe wartości Q_Y niż w liściach Z3 (Rys. 10C).

Po aplikacji DBMIB w T_5 i T_7 wartości NPQ w liściach Z3 były niższe w porównaniu z liśćmi K3 odpowiednio o 40 i 63%. W tych samych punktach czasowych NPQ w liściach Z5 stanowiło natomiast odpowiednio 151 i 224% wartości NPQ w liściach Z3 (Rys. 10D).

Odwrotnie niż w przypadku DCMU, aplikacja DBMIB wywołała w późnym stadium infekcji obniżenie Q_p w liściach Z3 w porównaniu z liśćmi K3 (o 22 i 23% odpowiednio w T_5 i T_7). W T_7 , w liściach Z5 po aplikacji DBMIB oznaczono o 17% mniejszą wartość Q_p w porównaniu z liśćmi K5 traktowanymi tym inhibitorem. Różnice wartości Q_p między liśćmi K3 i K5 były istotnie niższe tylko w T_5 (Rys. 10E).

U roślin traktowanych DBMIB w T_2 oznaczono o 27% niższą wartość Q_y w liściach Z3 w porównaniu do K3. Podobnie jak w przypadku DCMU, w liściach młodszych po aplikacji DBMIB oznaczono wyższe wartości Q_y niż w liściach starszych: w T_5 i T_7 wartości Q_y w liściach K5 były odpowiednio o 35 i 56% wyższe niż w liściach K3. Ponadto w T_2 , T_5 i T_7 oznaczono odpowiednio o 35, 38 i 52% wyższe wartości Q_y w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 10F).



Rys. 10. Parametry fluorescencji chlorofilu *a* w liściach ogórka zainfekowanych *Pst* po aplikacji inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów: DCMU (A, B, C) i DBMIB (D, E, F)

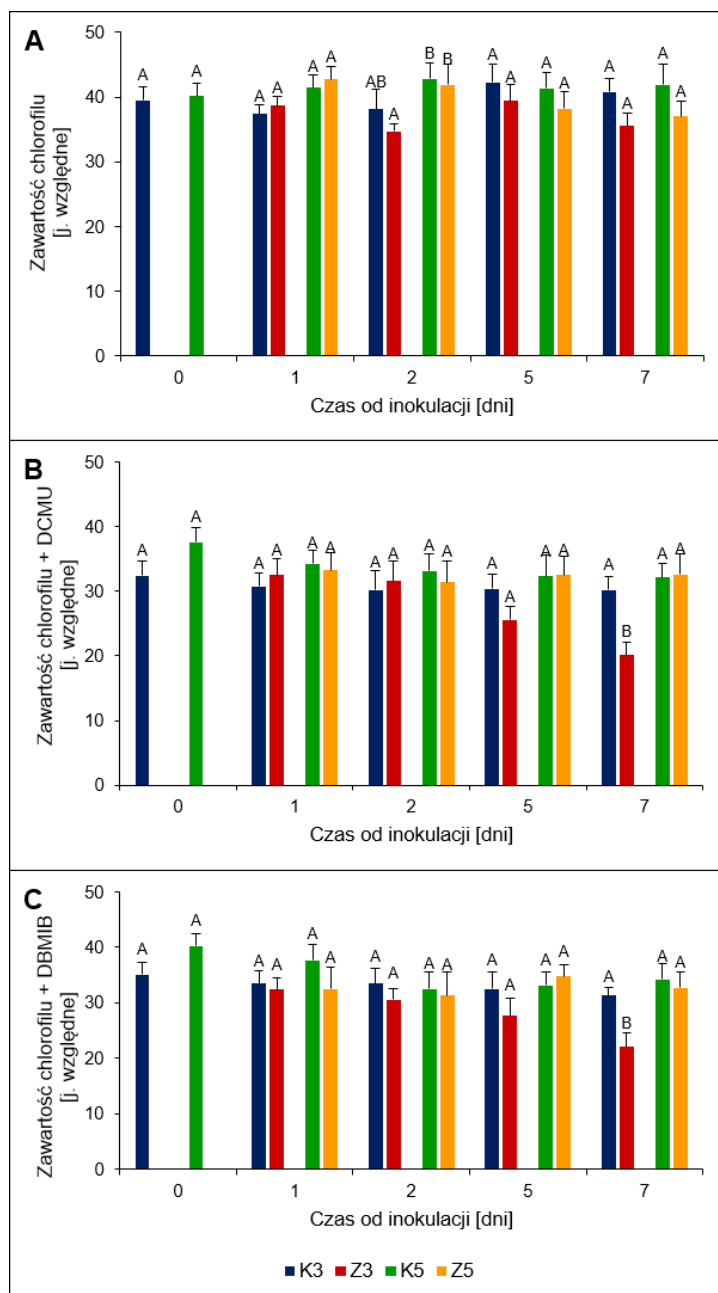
Mierzono niefotochemiczne: (A, D) wygaszanie fluorescencji (NPQ), (B, E) fotochemiczne wygaszanie fluorescencji (Q_P) oraz (C, F) maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II, (Q_Y). Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy p ≤ 0,05 (n = 4).

5.3. Indeks zawartości chlorofilu *a*

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian poinfekcyjnych indeksu zawartości chlorofilu *a* w liściach Z3 i Z5. Wykazano jednak, że w początkowej fazie patogenezы (T₂), w liściach Z5 indeks zawartości chlorofilu *a* jest o 21% wyższy niż w liściach Z3 (Rys. 11A).

W T₇, po aplikacji inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów wykazano poinfekcyjny spadek indeksu zawartości chlorofilu *a* z 30 (K3) do 20 (Z3) w przypadku DCMU i z 31 (K3) do 22 (Z3) w przypadku DBMIB. W tym samym punkcie

czasowym stwierdzono o 62 i 48% wyższy indeks zawartości chlorofilu *a* w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (dane odpowiednio dla DCMU i DBMIB) (Rys. 11B, C).



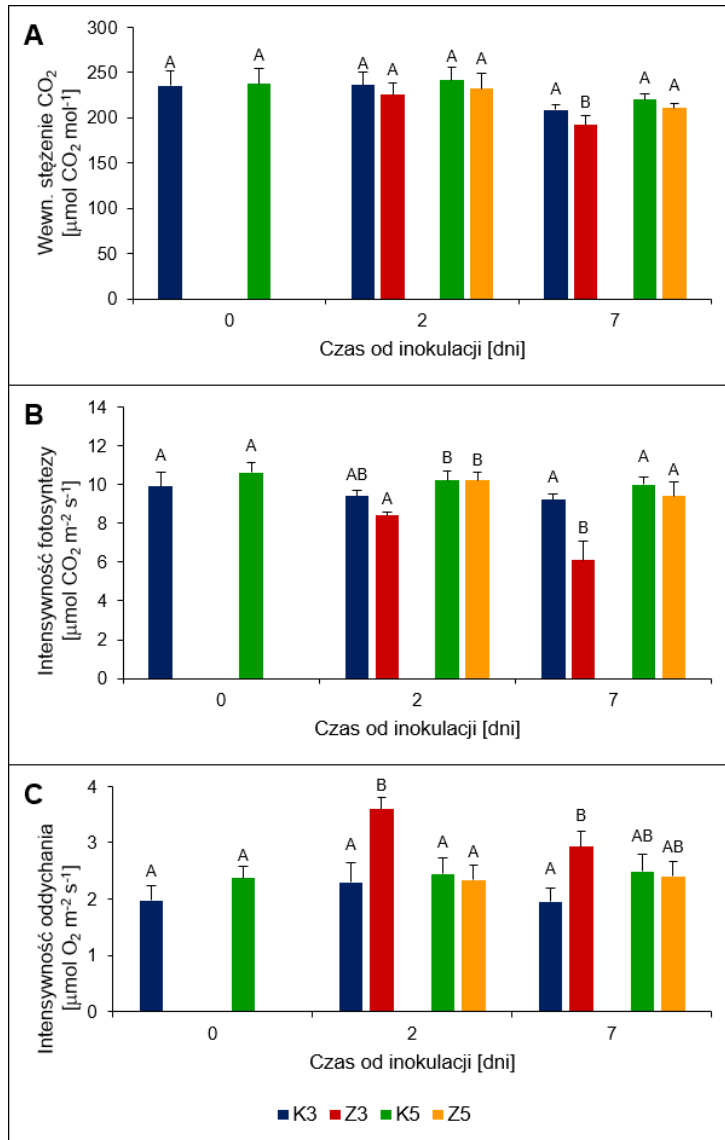
Rys. 11. Indeks zawartości chlorofilu *a* w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Oznaczano zawartość chlorofilu *a* w: (A) liściach nietraktowanych inhibitorami fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, (B) po aplikacji DCMU oraz (C) po potraktowaniu liści DBMIB. Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 7$).

5.4. Parametry wymiany gazowej

Stres biotyczny związany z infekcją *PsI* wywołał w T_7 obniżenie międzykomórkowego stężenia CO_2 (C_i) w liściach Z3 o 8% w porównaniu z liśćmi K3 (Rys. 12A). W tym punkcie czasowym poinfekcyjny deficyt C_i w Z3 był sprzężony z obniżoną intensywnością fotosyntezy (P_N) w tych liściach (Rys. 12B). W T_2 , w liściach Z5 stwierdzono wyższe o 21% P_N w porównaniu z Z3. Natomiast w T_7 , w liściach Z5 oznaczono o 10% większe C_i oraz o 21% większe P_N w porównaniu z Z3 (Rys. 12A, B).

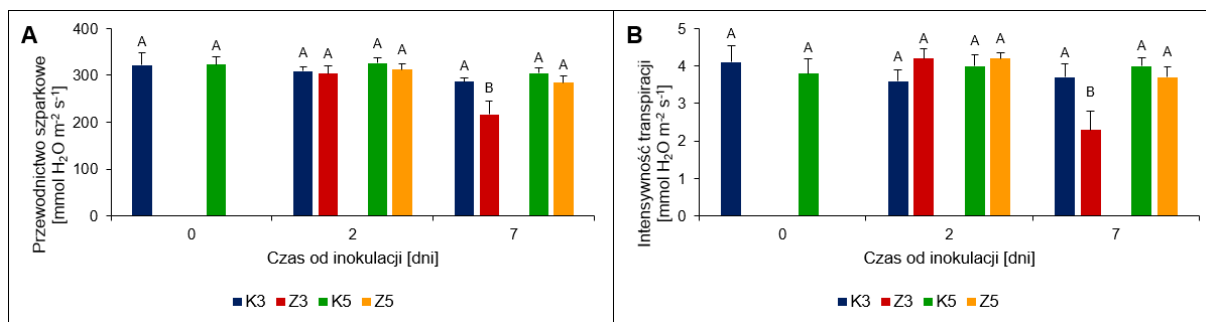
Poinfekcyjnemu obniżeniu P_N towarzyszył wzrost intensywności oddychania mitochondrialnego (R) w liściach Z3. Zaobserwowano zwiększenie R od $2 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ w liściach K3 do wartości 4 i $3 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ w liściach Z3, odpowiednio w T_2 i T_7 . U roślin zakażonych wykazano natomiast niższe wartości R dla liści Z5 niż dla liści Z3, przy czym statystycznie istotne różnice stwierdzono wyłącznie w T_2 (około 2 razy wyższa wartość R dla liści Z3 niż dla Z5) (Rys. 12C).



Rys. 12. Intensywność wymiany gazowej: (A) wewnątrzkomórkowe stężenie CO₂ (C_i), (B) intensywność netto fotosyntezy (P_N) i (C) intensywność oddychania (R) w liściach ogórka po infekcji Psl

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 3$).

Poinfekcyjne różnice w przewodnictwie szparkowym (G_s) i intensywności transpiracji (E) w liściach ogórka stwierdzono wyłącznie w późnym stadium patogenezy (T_7). Wartości G_s oraz E w liściach Z3 były wówczas niższe niż w K3: stwierdzono, że G_s spada poinfekcyjnie od 24% w porównaniu z kontrolą, natomiast E maleje o 38% w porównaniu z kontrolą (Rys. 13A, B). W tym samym punkcie czasowym wartości G_s i E w Z5 stanowiły odpowiednio 131 i 161% wartości dla Z3 (Rys. 13A, B).



Rys. 13. Intensywność wymiany gazowej: (A) przewodnictwo szparkowe (G_s) i (B) intensywność transpiracji (E) w liściach ogórka po infekcji *Ps*

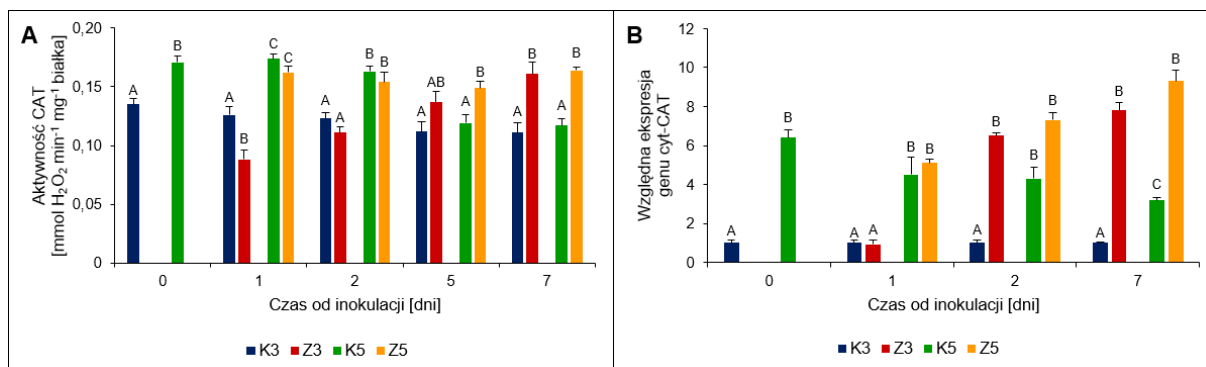
Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 3$).

5.5. Analiza wybranych antyoksydantów

5.5.1. Aktywność katalazy i ekspresja genu katalazy

We wczesnej fazie patogenezы (T_1) stwierdzono poinfekcyjne obniżenie aktywności CAT w liściach Z3 (spadek aktywności o 30% w porównaniu z kontrolą). Natomiast w T_7 aktywność CAT w liściach Z3 wzrosła o 45% w porównaniu z kontrolą. Dla liści piętra piątego w T_5 i T_7 stwierdzono odpowiednio o 25 i 40% większą aktywność CAT w Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 14A). W T_0 , T_1 i T_2 aktywność CAT, zarówno u roślin kontrolnych, jak i zakażonych była wyższa w liściach młodszych. Największe różnice stwierdzono w T_1 : aktywność CAT była wówczas wyższa o 38% w liściach K5 w porównaniu z K3 i o 84% większa w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 14A).

Poinfekcyjny wzrost aktywności CAT w liściach Z3 w T_7 był zbieżny ze wzrostem ekspresji genu izoformy cytozolowej katalazy (cyt-CAT). W T_2 stwierdzono siedmiokrotny wzrost ekspresji genu cyt-CAT w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą. Natomiast w T_7 liście Z3 odznaczały się ośmiokrotnie wyższym poziomem ekspresji genu cyt-CAT w porównaniu z K3. W liściach Z5 infekcja roślin ogórka istotnie stymulowała ekspresję genu cyt-CAT wyłącznie w T_7 , kiedy to stwierdzono trzykrotny wzrost ekspresji genu cyt-CAT w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi K5 (Rys. 14B). Wykazano ponadto, że w liściach K5 poziom ekspresji genu cyt-CAT jest wyższy w porównaniu z liśćmi K3 przez cały okres trwania eksperymentu, przy czym stwierdzone różnice malały w czasie (w T_0 poziom ekspresji genu cyt-CAT był sześciokrotnie wyższy, a w T_7 trzykrotnie wyższy dla liści K5 w porównaniu z K3). U roślin zakażonych wykazano podobny trend, jednak statystycznie istotne różnice stwierdzono jedynie w T_1 , kiedy to w liściach Z5 oznaczono pięciokrotnie wyższy poziom ekspresji genu cyt-CAT w porównaniu z Z3. Stwierdzone różnice w ekspresji genu cyt-CAT między liści K5 i K3 oraz między Z5 i Z3 odpowiadały różnicom w poziomie aktywności CAT w tych liściach (Rys. 14A, B).



Rys. 14. (A) Aktywność katalazy (CAT) i (B) względna ekspresja genu cytozolowej katalazy (cyt-CAT) w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Na rysunku B wartości liczbowe względnej ekspresji genu cyt-CAT w liściach kontrolnych piętra trzeciego (K3) w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1.

5.5.2. Aktywność i ekspresja genów enzymów cyklu Halliwella-Asady

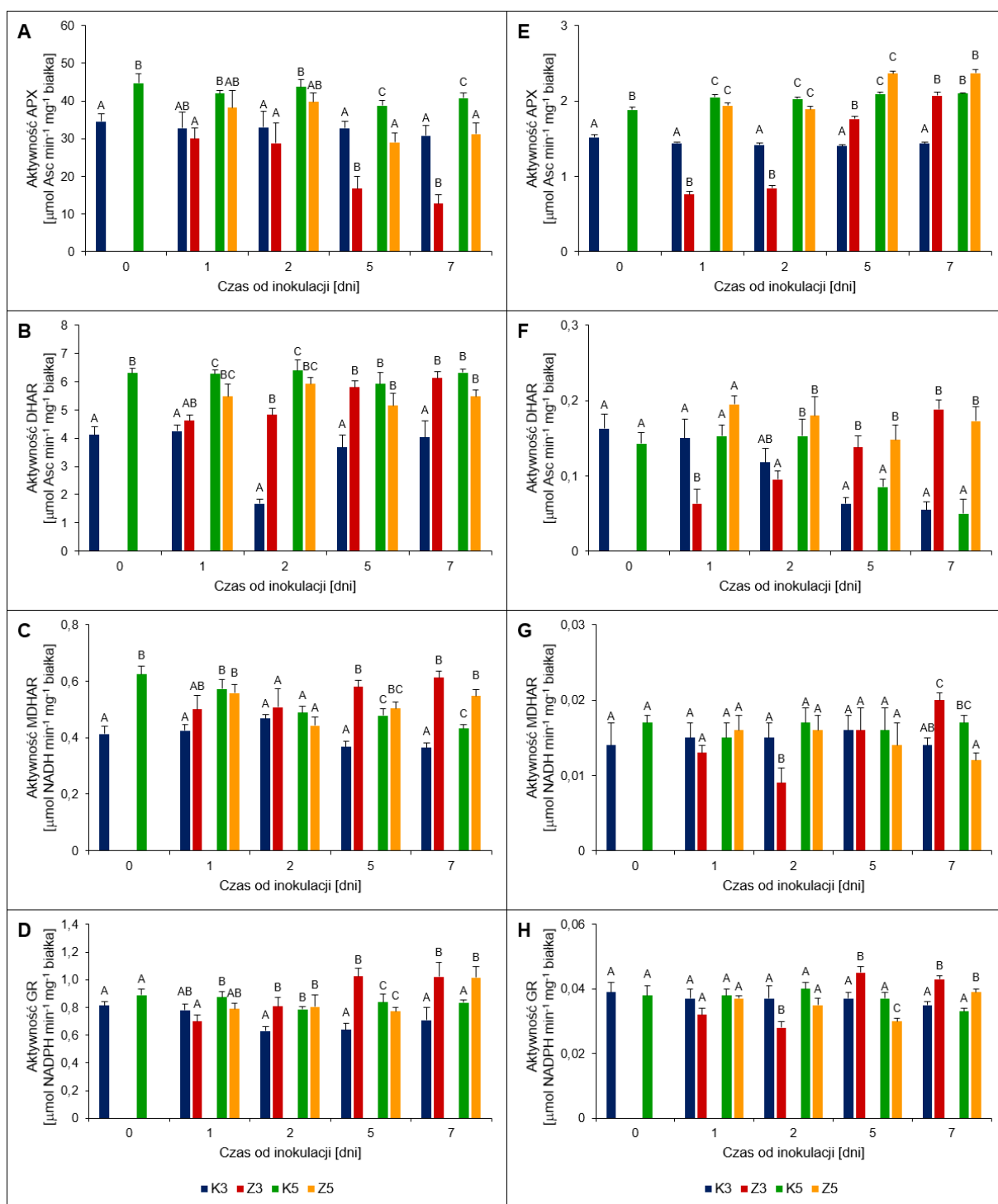
Po inokulacji *PsI* wykazano obniżenie aktywności APX w ekstraktach całkowitych z liści Z3 i Z5 w porównaniu z kontrolą, jednak statystycznie istotne różnice stwierdzono wyłącznie w T₅ i T₇. Aktywność APX w liściach Z3 była wówczas niższa odpowiednio o 49 i 59% niż w K3, a w liściach Z5 mniejsza odpowiednio o 25 i 23% w porównaniu z K5 (Rys. 15A). Stwierdzono również, że aktywność APX jest wyższa w liściach K5 w porównaniu z K3 oraz jest większa w liściach Z5 niż w liściach Z3. W T₂ aktywność APX w liściach K5 była większa o 33% niż w liściach K3. W T₅ i T₇ wykazano odpowiednio o 73 i 145% wyższą aktywność APX w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 15A).

Trend poinfekcyjnych zmian aktywności DHAR w liściach trzeciego piętra był odwrotny do obserwowanego dla APX. W T₂ stwierdzono wzrost aktywności DHAR w liściach Z3 o 188% w porównaniu z K3. Wraz z upływem czasu efekt ten słabł i w T₇ wykazano, że aktywność DHAR w liściach Z3 jest większa o 53% niż w liściach K3 (Rys. 15B). W T₁ i T₂ aktywność DHAR w liściach K5 była wyższa odpowiednio o 48 i 282% niż w liściach K3. W tych samych punktach czasowych aktywność DHAR w Z5 była wyższa o 18% niż w liściach Z3 (Rys. 15B).

Podobnie jak w przypadku DHAR, aktywność MDHAR w liściach Z3 była wyższa od aktywności tego enzymu w K3 w późnej fazie infekcji. W T₅ i T₇ stwierdzono odpowiednio o 58 i 68% wyższą aktywność MDHAR w liściach Z3 w porównaniu z K3. Stwierdzono również, że w T₇ aktywność MDHAR w liściach Z5 jest o 27% wyższa niż w K5 (Rys. 15C). Tak samo jak dla APX i DHAR wykazano, że aktywność MDHAR w liściach K5 jest wyższa od aktywności tego enzymu w liściach K3, przy czym największą różnicę stwierdzono w T₀

(aktywność wyższa o 51%). U roślin zakażonych, w punktach czasowych T₂, T₅ i T₇ aktywność MDHAR była natomiast nieznacznie niższa w liściach Z5 niż Z3 (Rys. 15C).

W T₂, w liściach Z3 aktywność GR była wyższa niż w K3. Efekt ten utrzymał się aż do T₇, przy czym zaznaczył się najsilniej w T₅, gdy stwierdzono o 61% wyższą aktywność GR w liściach Z3 niż w K3. W T₇, w liściach Z5 stwierdzono wyższą o 22% aktywność GR w porównaniu z liśćmi K5 (Rys. 15D). W T₂ i T₅ aktywność GR w liściach K5 była większa odpowiednio o 25% i 31% niż w K3. W T₅ aktywność GR była natomiast o 25% niższa w liściach Z5 niż Z3 (Rys. 15D).



Rys. 15. (A, E) Aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX), (B, F) reduktazy dehydroaskorbinianowej (DHAR), (C, G) reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR) i (D, H) reduktazy glutationowej (GR) w liściach ogórka (A-D) i chloroplastach (E-H) po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Poinfekcyjne zmiany aktywności APX w chloroplastach liści trzeciego piętra miały charakter dwufazowy. W początkowym stadium patogenezы (T_1 i T_2) stwierdzono, że aktywność APX w chloroplastach liści Z3 jest odpowiednio o 42 i 43% mniejsza niż w chloroplastach liści K3. W T_5 i T_7 wykazano natomiast, że aktywność APX w chloroplastach liści Z3 jest odpowiednio o 29 i 50% wyższa w chloroplastach liści K3 (Rys. 15E). Ponadto stwierdzono, że aktywność chloroplastowej APX jest wyższa w liściach piętra piątego niż w liściach piętra trzeciego roślin obu wariantów eksperymentalnych przez cały okres trwania eksperymentu. U roślin kontrolnych maksymalną różnicę między liśćmi K3 i K5 w aktywności chloroplastowej APX oznaczono w T_5 (aktywność większa o 49% w K5 w porównaniu z K3). U roślin zakażonych największą różnicę między liśćmi Z3 i Z5 stwierdzono w T_1 , kiedy aktywność APX w Z5 była większa o 156% w porównaniu z Z3. Wraz z rozwojem infekcji obserwowane różnice zmniejszały się (Rys. 15E).

Różnice w aktywnościach DHAR w chloroplastach liści trzeciego piętra kształtowały się podobnie jak dla chloroplastowej APX: w T_1 i T_2 wykazano mniejszą aktywność DHAR w chloroplastach liści Z3 (odpowiednio o 58 i 20% w stosunku do kontroli), natomiast w T_5 i T_7 w chloroplastach liści Z3 aktywność DHAR była odpowiednio o 119 i 242% wyższa niż w kontroli. W chloroplastach liści Z5 już od wczesnej fazy infekcji stwierdzono stymulujący wpływ zakażenia na aktywność DHAR, przy czym wraz z postępowaniem patogenezы efekt ten nasilał się i w T_7 wykazano wzrost aktywności chloroplastowej DHAR o 246% w porównaniu z K5 (Rys. 15F). U roślin zakażonych stwierdzono, że we wczesnej fazie infekcji (T_1 i T_2) aktywność chloroplastowej DHAR w liściach Z5 jest odpowiednio o 210 i 90% wyższa od aktywności tego enzymu w chloroplastach liści Z3 (Rys. 15F).

W chloroplastach liści Z3 aktywność MDHAR różniła się istotnie od aktywności tego enzymu w chloroplastach liści K3 wyłącznie w T_2 i T_7 . W T_2 wykazano obniżenie o 40% aktywności chloroplastowej MDHAR w Z3 w porównaniu z K3, natomiast w T_7 – wzrost aktywności tego enzymu o 43% w stosunku do kontroli. W T_7 , w chloroplastach liści Z5 wykazano obniżenie o 29% aktywności chloroplastowej MDHAR w stosunku do K5 (Rys. 15G). W T_2 , w chloroplastach liści Z5 wykazano wyższą o 78% aktywność MDHAR w porównaniu z Z3, a w T_7 aktywność MDHAR w chloroplastach liści Z5 była niższa o 40% w porównaniu z Z3 (Rys. 15G).

W liściach Z3, w T_2 stwierdzono obniżenie o 24% aktywności chloroplastowej GR w porównaniu z K3. W T_5 i T_7 wykazano natomiast odpowiednio o 22 i 23% wyższą aktywność chloroplastowej GR w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą. W T_5 , w chloroplastach liści Z5 stwierdzono niższą o 19% aktywność GR w porównaniu z K5, a w T_7 wykazano wzrost aktywności tego enzymu w chloroplastach liści Z5 o 18% w porównaniu z K5 (Rys. 15H). W T_2 stwierdzono wyższą o 25% aktywność chloroplastowej

GR w liściach Z5 w porównaniu z Z3, natomiast w T₅ aktywność tego enzymu w liściach Z5 była o 33% niższa niż w chloroplastach liści Z3 (Rys. 15H).

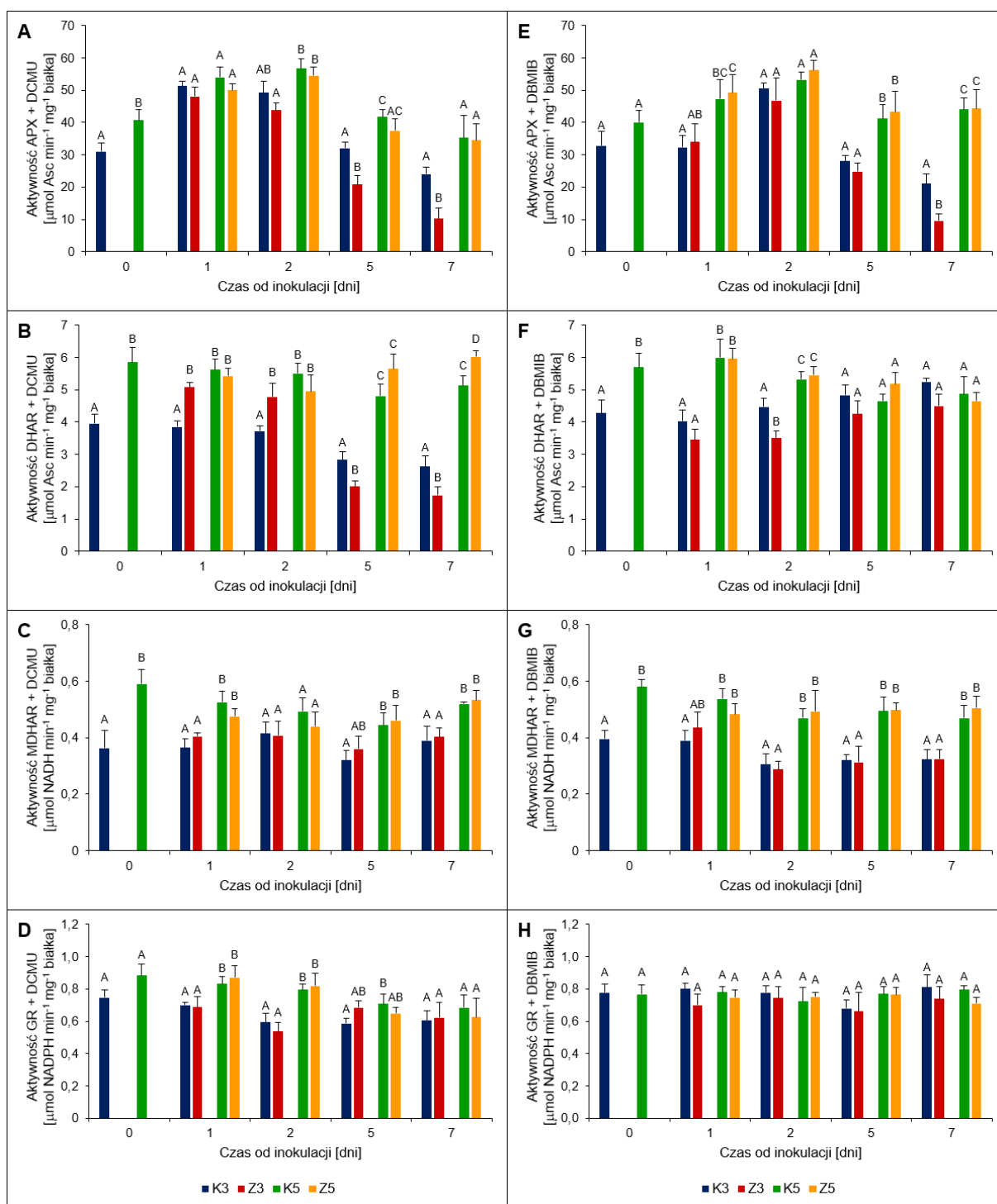
Po aplikacji DCMU poinfekcyjny trend zmian aktywności APX w liściach piętra trzeciego i piątego nie uległ zmianie, jednak najsilniejsze obniżenie aktywności tego enzymu stwierdzono w późnym stadium patogenezy dla liści Z3 (spadek odpowiednio o 35 i 57% w T₅ i T₇ w porównaniu z liśćmi K3) (Rys. 16A). U roślin traktowanych DCMU w T₀ i T₅ stwierdzono, że aktywność APX jest odpowiednio o 24 i 23% wyższa w liściach K5 niż w liściach K3. Natomiast w T₇ wykazano trzykrotnie wyższą aktywność APX w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 16A).

Po potraktowaniu DCMU aktywność DHAR w liściach Z3 w czasie T₁ i T₂ była wyższa o 31 i 30% od aktywności tego enzymu w liściach K3, natomiast w T₅ i T₇ była odpowiednio o 29 i 34% niższa niż dla liści K3 (Rys. 16B). Po aplikacji DCMU w T₇, w liściach K5 stwierdzono wyższą o 95% aktywność DHAR niż w liściach K3. W T₅ i T₇, u roślin zakażonych potraktowanych DCMU stwierdzono odpowiednio o 183 i 249% wyższą aktywność DHAR w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 16B).

U roślin traktowanych DCMU nie stwierdzono zmian aktywności MDHAR po inokulacji *PsI*. Podobnie, jak w przypadku roślin kontrolnych, których nie traktowano DCMU (Rys. 16C), u roślin po aplikacji tego inhibitora wyższą aktywność MDHAR oznaczono w liściach młodszych (K5): w T₀ była ona większa o 63% niż w liściach K3. W T₁ i T₇ stwierdzono wyższą odpowiednio o 17 i 32% aktywność MDHAR w liściach Z5 roślin traktowanych DCMU niż w liściach Z3 (Rys. 16C).

Nie stwierdzono zmian aktywności GR po inokulacji *PsI* u roślin traktowanych DCMU. W T₁ oraz w T₂ w liściach K5 potraktowanych DCMU oznaczono wyższą aktywność GR niż w liściach K3. Podobna zależność w tych punktach czasowych dotyczyła liści Z5 i Z3 traktowanych DCMU (Rys. 16D).

U roślin traktowanych DBMIB nie stwierdzono zmian aktywności wszystkich enzymów po inokulacji *PsI* za wyjątkiem Z3 dla APX w T₇ i dla DHAR w T₂ (Rys. 16E, F). W przypadku APX, DHAR i MDHAR aktywność w liściach młodszych (K5) była wyższa niż w starszych (K3). Taką samą zależność stwierdzono między liśćmi Z5 i Z3. Szczególnie duże różnice, widoczne we wszystkich punktach czasowych stwierdzono dla MDHAR. Przykładowo, w T₅ oznaczono wyższą o 55% (K5) i 59% (Z5) aktywność MDHAR w porównaniu do odpowiednich kontroli. Taka sama zależność utrzymywała się dla APX i DHAR tylko w niektórych punktach czasowych (Rys. 16E, F, G).

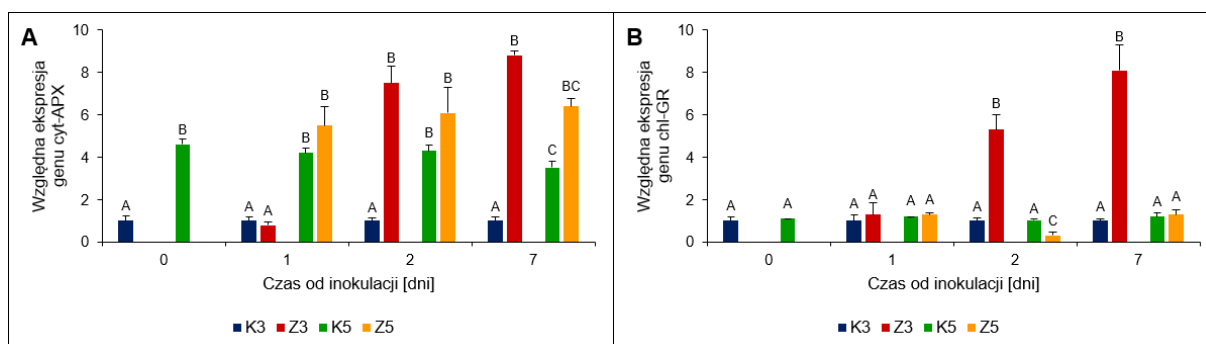


Rys. 16. (A, E) Aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX), (B, F) reduktazy dehydroaskorbinianowej (DHAR), (C, G) reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR) i (D, H) reduktazy glutationowej (GR) w liściach ogórka zainfekowanych *Ps* po aplikacji inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów: DCMU (A-D) i DBMIB (E-H)

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotnie statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

W T_2 i T_7 stwierdzono odpowiednio siedmio- i ośmiokrotny wzrost poziomu ekspresji genu cytozolowej peroksydazy askorbinianowej (cyt-APX) w liściach Z3 w porównaniu z K3 (Rys. 17A). W liściach Z5 poziom ekspresji genu cyt-APX był wyższy niż dla K5 przez cały okres trwania eksperymentu, jednak stwierdzone różnice nie były istotne statystycznie (Rys. 17A). Poziom ekspresji genu cyt-APX był około pięciokrotnie wyższy w liściach K5 niż w liściach K3. Różnica ta była zbieżna z aktywnością APX w K5 w porównaniu do K3 (Rys. 15A, 17A). W T_1 stwierdzono również siedmiokrotnie wyższy poziom ekspresji tego genu w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 17A).

W T_2 i T_7 poziom ekspresji chloroplastowej GR (chl-GR) był odpowiednio pięcio- i ośmiokrotnie wyższy w Z3 niż w K3. Zmiany te poprzedzały wzrost aktywności chloroplastowej GR w późnej fazie patogenezы. W liściach młodszych poziom ekspresji genu chl-GR po infekcji nie zmieniał się za wyjątkiem T_2 , gdy stwierdzono trzykrotnie niższy poziom ekspresji chl-GR w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi K5 (Rys. 17B). W T_2 i T_7 wykazano odpowiednio osiemnasto- i sześciokrotnie niższy poziom ekspresji genu chl-GR w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 17B).



Rys. 17. Względna ekspresja genu: (A) cytozolowej peroksydazy askorbinianowej (cyt-APX) i (B) chloroplastowej reduktazy glutationowej (chl-GR) w liściach ogórka po infekcji *PsI*

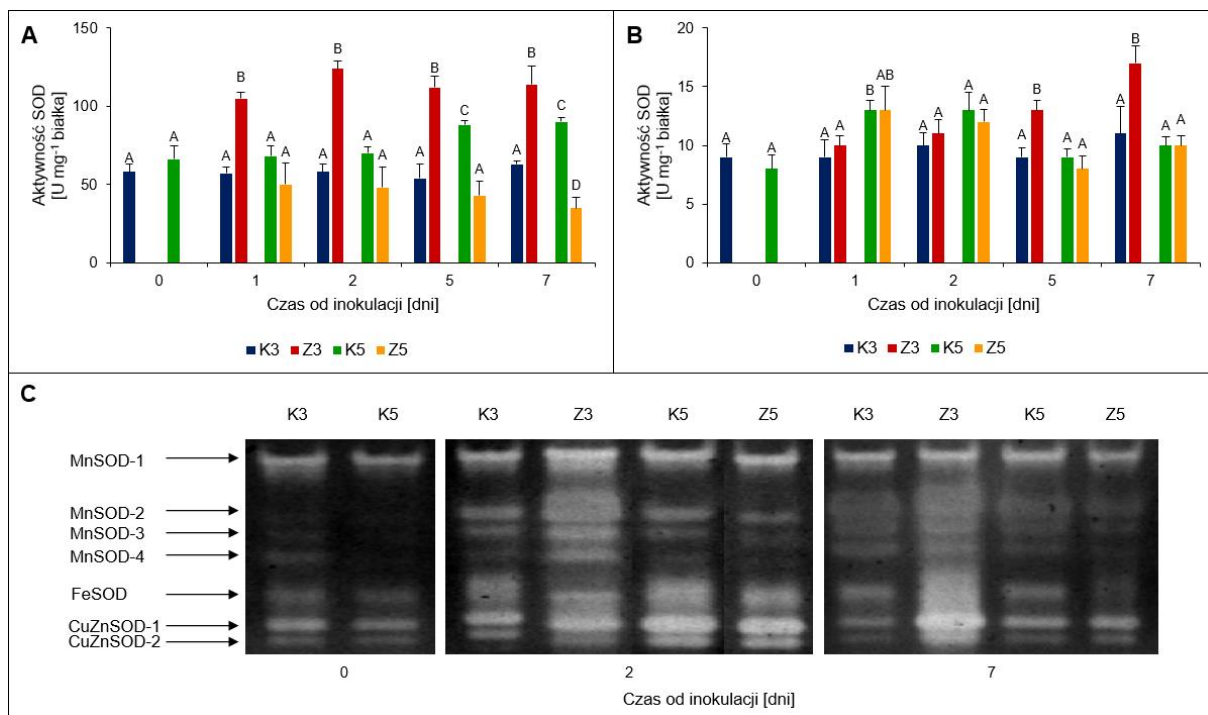
Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Wartości liczbowe względnej ekspresji genów w liściach kontrolnych piętra trzeciego (K3) w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1.

5.5.3. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. Ekspresja genu chloroplastowej dysmutazy ponadtlenkowej

Stwierdzono, że aktywność SOD była od 81 do 114% wyższa w liściach Z3 w porównaniu z K3. Za te zmiany odpowiadały izoformy manganowe SOD (MnSOD-2, MnSOD-3, Mn-SOD-4) w T_2 oraz żelazowa (FeSOD) i miedziowo-cynkowe (CuZnSOD-1, CuZnSOD-2) w T_7 , których względna aktywność rosła około trzykrotnie w porównaniu z kontrolą (Rys. 18C, Tab. 4). W liściach Z5 obserwowano efekt przeciwny, jednak tylko w późnej fazie infekcji *PsI*: w T_5 i T_7 stwierdzono, że aktywność SOD w tych liściach jest

niższa odpowiednio o 51 i 61% w porównaniu z K5 (Rys. 18A). W T₇ mogło to być związane z obniżeniem względnej aktywności izoform MnSOD-3, a zwłaszcza MnSOD-4 i FeSOD (Rys. 18C, Tab. 4). Ponadto stwierdzono, że w T₅ i T₇ aktywność SOD jest wyższa odpowiednio o 63 i 43% w liściach K5 w porównaniu z K3 (Rys. 18C). Przeciwnie kształtowała się zależność między aktywnością SOD w liściach Z3 i Z5. Przykładowo w T₇ stwierdzono o 69% mniejszą aktywność SOD w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 18A), co mogło być związane z mniejszą aktywnością izoform MnSOD-2, MnSOD-3, MnSOD-4 i FeSOD (Rys. 18C, Tab. 4).

W chloroplastach liści Z3 aktywność SOD była wyższa w porównaniu z kontrolą. Wykazano wzrost aktywności chloroplastowej SOD o 44% w T₅ i o 55% w T₇ (Rys. 18B). W T₇ względna aktywność FeSOD w liściach Z3 była większa o 118% w porównaniu z kontrolą (Rys. 18C, Tab. 4). W T₇, w liściach Z5 względna aktywność FeSOD była natomiast trzykrotnie niższa niż w K5 (Rys. 18B, C, Tab. 4). Wykazano ponadto, że w T₁ aktywność SOD w chloroplastach liści K5 była o 44% wyższa niż w chloroplastach liści K3. W T₅ i T₇ stwierdzono mniejszą odpowiednio o 39 i 41% aktywność SOD w chloroplastach liści Z5 w porównaniu z chloroplastami liści Z3 (Rys. 18B). W T₇, w liściach Z5 stwierdzono siedmiokrotnie niższą aktywność izoformy FeSOD w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 18C, Tab. 4).



Rys. 18. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w: (A) liściach i (B) chloroplastach ogórka oraz (C) rozdział elektroforetyczny białek SOD wyizolowanych z liści ogórka po infekcji *PsI*

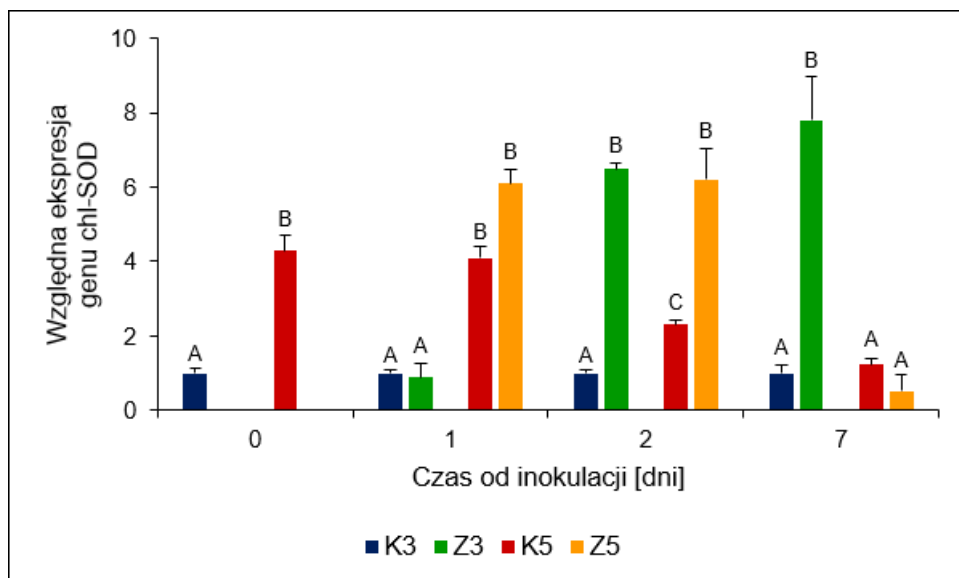
W wyniku rozdziału elektroforetycznego uzyskano siedem izoform SOD: manganową (MnSOD-1, MnSOD-2, MnSOD-3 i MnSOD-4), żelazową (FeSOD) oraz miedziowo-cynkową (CuZnSOD-1 i CuZnSOD-2). Figura C na planszy przedstawia reprezentatywny elektroforegram. Wartości dla danego punktu czasowego na rysunkach A i B oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Tab. 4. Względna aktywność izoform dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) uzyskanych po elektroforetycznym rozdziale SOD w warunkach natywnych

W wyniku rozdziału elektroforetycznego uzyskano siedem izoform SOD: manganową (MnSOD-1, MnSOD-2, MnSOD-3 i MnSOD-4), żelazową (FeSOD) oraz miedziowo-cynkową (CuZnSOD-1 i CuZnSOD-2). Pole powierzchni każdego prążka na elektroforegramie (Rys. 13C) odpowiada względnej aktywności danej izoformy. Aktywność izoformy CuZnSOD-2 w liściach K3 w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1,00. Wartości dla danego punktu czasowego i dla danej izoformy oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 3$).

Czas od inokulacji [dni]	Izoforma	K3	Z3	K5	Z5
T ₀	MnSOD-1	1,31±0,23(A)		1,25±0,18(A)	
	MnSOD-2	0,38±0,04(A)		0,19±0,06(B)	
	MnSOD-3	0,44±0,02(A)		0,22±0,01(B)	
	MnSOD-4	0,63±0,03(A)		0,16±0,03(B)	
	FeSOD	1,16±0,12(A)		0,88±0,07(A)	
	CuZnSOD-1	1,28±0,07(A)		1,22±0,06(A)	
	CuZnSOD-2	1,00±0,09(A)		0,88±0,13(A)	
T ₂	MnSOD-1	1,26±0,22(A)	1,46±0,11(A)	1,31±0,04(A)	1,34±0,22(A)
	MnSOD-2	1,03±0,07(A)	1,40±0,03(B)	1,06±0,07(A)	1,00±0,04(A)
	MnSOD-3	0,83±0,06(A)	1,34±0,08(B)	0,89±0,06(A)	0,80±0,06(A)
	MnSOD-4	0,54±0,01(A)	1,34±0,23(B)	0,60±0,07(A)	0,63±0,11(A)
	FeSOD	1,86±0,02(A)	1,51±0,04(B)	2,06±0,11(A)	1,97±0,08(A)
	CuZnSOD-1	1,23±0,18(A)	1,37±0,19(A)	2,46±0,13(B)	2,34±0,18(B)
	CuZnSOD-2	1,00±0,04(A)	1,06±0,03(A)	1,51±0,07(B)	1,49±0,15(B)
T ₇	MnSOD-1	1,45±0,03(A)	1,41±0,23(A)	1,48±0,05(A)	1,41±0,03(A)
	MnSOD-2	1,28±0,14(A)	1,38±0,04(A)	1,24±0,11(A)	1,10±0,11(A)
	MnSOD-3	1,21±0,06(A)	1,41±0,16(A)	1,17±0,03(A)	0,83±0,05(B)
	MnSOD-4	1,17±0,11(A)	1,45±0,11(A)	1,10±0,07(A)	0,38±0,01(B)
	FeSOD	1,69±0,07(A)	3,86±0,09(B)	1,76±0,22(A)	0,59±0,06(C)
	CuZnSOD-1	1,10±0,09(A)	3,14±0,16(B)	1,41±0,14(A)	1,34±0,03(A)
	CuZnSOD-2	1,00±0,15(A)	2,48±0,06(B)	0,97±0,02(A)	0,97±0,07(A)

W T₂ i T₇, w liściach Z3 stwierdzono odpowiednio siedmio- i ośmiokrotnie wyższy poziom ekspresji genu chloroplastowej SOD (chl-SOD) w porównaniu z kontrolą (Rys. 19). W liściach Z5, we wczesnej fazie patogenezы (T₁, T₂) wykazano ponadto wzrost poziomu ekspresji genu chl-SOD, natomiast w T₇ – obniżenie poziomu jego ekspresji w porównaniu z liśćmi K5, co było zbieżne ze zmniejszeniem aktywności FeSOD w tych liściach, w tym samym punkcie czasowym (Rys. 18C, 19, Tab. 4). Stwierdzono także, że w liściach K5 poziom ekspresji genu chl-SOD był wyższy niż w liściach K3, przy czym różnice malały wraz z upływem czasu. U roślin zakażonych, we wczesnej fazie patogenezы (T₁) poziom ekspresji genu chl-SOD w liściach Z5 był siedmiokrotnie wyższy, a w fazie późnej (T₇) piętnastokrotnie niższy w porównaniu z poziomem ekspresji tego genu w Z3 (Rys. 19, Tab. 4).

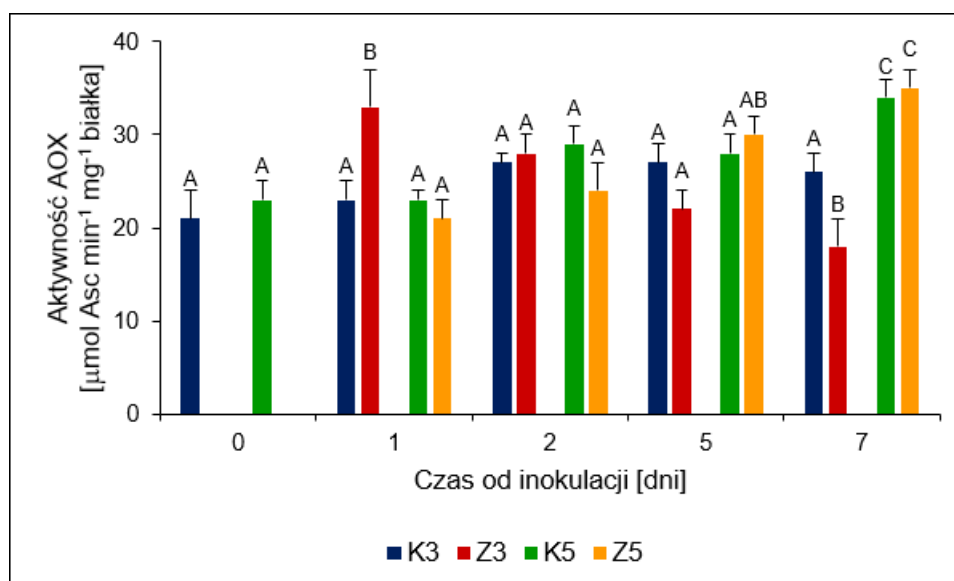


Rys. 19. Względna ekspresja genu chloroplastowej dysmutazy ponadtlenkowej (chl-SOD) w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Wartości liczbowe względnej ekspresji genu w liściach kontrolnych piętra trzeciego (K3) w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1.

5.5.4. Aktywność oksydazy askorbinianowej

Stwierdzono, że w T_1 aktywność AOX w liściach Z3 była wyższa o 44% w porównaniu z kontrolą, natomiast w T_7 aktywność tego enzymu w Z3 była niższa o 31% w porównaniu z K3. Infekcja *PsI* nie wywołała zmian w aktywności AOX w liściach młodszych (Rys. 20). Statystycznie istotne różnice w aktywności AOX między liśćmi K3 i K5 stwierdzono wyłącznie w T_7 . We wczesnej fazie patogenezy (T_1) w liściach Z5 oznaczono niższą o 36% aktywność AOX niż w liściach Z3. W T_7 , w liściach Z5 wykazano natomiast o 94% wyższą aktywność AOX w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 20).



Rys. 20. Aktywność oksydazy askorbinianowej (AOX) w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

5.5.5. Zawartość kwasu askorbinowego i glutationu

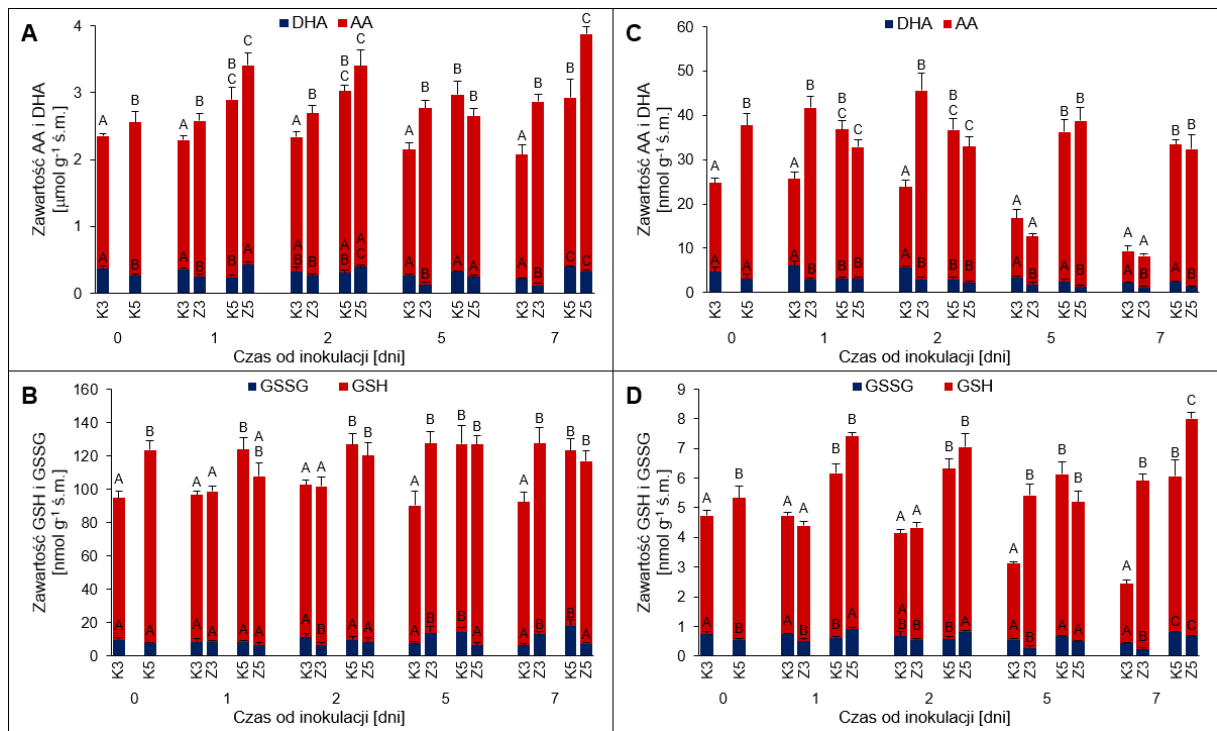
Przez cały okres trwania eksperymentu zawartość AA w liściach Z3 była wyższa niż w K3, a zawartość DHA – niższa. W T_7 stwierdzono wyższą o 48% zawartość AA w liściach Z3 w porównaniu do K3, natomiast w T_5 wykazano niższą o 52% zawartość DHA w liściach Z3 w stosunku do kontroli. W obu punktach czasowych współczynnik redoks dla AA oznaczony w ekstraktach z liści (tot) – $[AA]_{tot}/[DHA]_{tot}$ był około trzykrotnie wyższy w liściach Z3 niż w liściach K3 (Tab. 5). W przypadku liści K5 i Z5 stwierdzono większą zawartość AA w Z5 w porównaniu do K5 (z wyjątkiem T_5), jednak statystycznie istotne różnice oznaczono wyłącznie w T_7 (zawartość AA w Z5 większa o 44% w stosunku do K5). W T_1 , w liściach Z5 stwierdzono wyższą o 91% zawartość DHA w porównaniu z K5. Towarzyszył temu około dwukrotnie niższy współczynnik redoks $[AA]_{tot}/[DHA]_{tot}$ w liściach Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 21A, Tab. 5). Wykazano wyższą zawartość AA w liściach K5 w porównaniu z K3. Największą różnicę stwierdzono w T_5 , kiedy to zawartość AA w K5 była o 41% wyższa niż w K3. Ponadto stwierdzono, że w początkowej fazie patogenezы liście K3 miały wyższą zawartość DHA niż liście K5 (maksymalnie o 42% w T_0). Natomiast w T_7 , w liściach K5 zawartość DHA była o 46% wyższa niż w K3. W przypadku roślin zakażonych zawartość AA była wyższa w liściach Z5 niż w Z3 (z wyjątkiem T_5), maksymalnie o 29% w T_7 . Przeciwnie niż u roślin kontrolnych, różnice w zawartościach DHA między liśćmi Z3 i Z5 wraz z upływem czasu stawały się coraz większe i w T_7 stwierdzono, że zawartość DHA w liściach Z5 jest wyższa o 175% w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 21A).

Stwierdzono, że zawartość GSH jest w późnej fazie infekcji większa w liściach Z3 w porównaniu do liści K3, odpowiednio o 37 i 33% w T_5 i T_7 . Po przejściowym spadku (w T_2)

wykazano ponadto większą zawartość GSSG w liściach Z3: w T₅ o 85% i w T₇ o 103% w porównaniu z liśćmi K3 (Rys. 21B). W T₇ oznaczono także niższy współczynnik redoks dla glutationu $[GSH]_{tot}/[GSSG]_{tot}$ w ekstraktach z liści (tot) K3 niż Z3 (Tab. 5). W późnej fazie patogenezы zawartość GSSG w liściach Z5 była niższa w porównaniu z Z3 (o 56% w T₅ i o 60% w T₇), a współczynnik $[GSH]_{tot}/[GSSG]_{tot}$ w tych punktach czasowych przyjmował odpowiednio o 144 i 163% wyższe wartości w Z5 niż w Z3 (Rys. 21B, Tab. 5). Podobnie jak dla AA, stwierdzono, że liście K5 mają wyższą zawartość GSH niż liście K3 (maksymalna obserwowana różnica przypadła na T₅ i wynosiła 36% w stosunku do kontroli). W T₅ i T₇ stwierdzono również wyższą zawartość GSSG w liściach K5 niż w liściach K3 (odpowiednio o 91 i 186%). Efektem tych różnic była wyższa wartość współczynnika $[GSH]_{tot}/[GSSG]_{tot}$ dla liści K5 niż K3 we wczesnej fazie infekcji i jego niższa wartość w fazie późnej (Tab. 5). W początkowym stadium infekcji w liściach Z3 stwierdzono wyższą zawartość GSH niż w liściach K3. Trend zmian obserwowany dla GSSG w T₅ i T₇ był natomiast odwrotny: stwierdzono niższą, odpowiednio o 55 i 44%, zawartość tego metabolitu w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 21B).

W chloroplastach liści Z3 zawartość AA była wyższa niż w chloroplastach liści K3 tylko we wczesnej fazie patogenezы: maksymalna różnica wynosiła 135% w porównaniu z kontrolą i była stwierdzona w T₂. Poza zmianami zawartości AA w chloroplastach liści piętra trzeciego spowodowanymi infekcją bakteryjną stwierdzono również obniżenie jego zawartości w chloroplastach liści K3 i Z3 wraz z czasem trwania eksperymentu. W całym badanym okresie oznaczano niższą zawartość DHA w chloroplastach liści Z3 w porównaniu z K3. Największą różnicę stwierdzono w T₁ (zawartość mniejsza o 52% w stosunku do kontroli). W T₂ stwierdzono natomiast największy wzrost (o 338%) współczynnika redoks $[AA]_{chl}/[DHA]_{chl}$ dla chloroplastów (chl) liści Z3 w porównaniu z K3 (Tab. 5). Zawartość DHA w późnej fazie infekcji była istotnie mniejsza w chloroplastach liści Z5 w porównaniu z K5, odpowiednio o 43 i 52% w T₅ i T₇. Wartość współczynnika $[AA]_{chl}/[DHA]_{chl}$ była wówczas dwukrotnie większa w chloroplastach liści Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 21C, Tab. 5). Podobnie jak dla całkowitej zawartości AA, stwierdzono, że chloroplasty liści K5 mają wyższą zawartość AA niż chloroplasty liści K3, a także niższą (z wyjątkiem T₇) zawartość DHA w porównaniu do chloroplastów liści K3 oraz wyższą wartość współczynnika $[AA]_{chl}/[DHA]_{chl}$ (Tab. 5). Największą różnicę zawartości AA między chloroplastami liści K5 i Z5 (o 343% w stosunku do kontroli) oznaczono w T₇, natomiast dla DHA (o 48% w stosunku do kontroli) w T₁. Stwierdzono ponadto, że we wczesnej fazie infekcji, w chloroplastach liści Z5 zawartość AA jest niższa (o około 25%) w porównaniu z chloroplastami liści Z3. W późnej fazie patogenezы chloroplasty liści Z5 miały wyższą o około 293% zawartość AA niż chloroplasty liści Z3 (Rys. 21C).

W chloroplastach liści Z3 stwierdzono większą zawartość GSH (w T_5 o 100% i w T_7 o 185%) niż w chloroplastach liści K3. Zmianom tym towarzyszył wzrost aktywności chloroplastowej GR w tych samych punktach czasowych (Rys. 15H). Zawartość GSSG w chloroplastach liści Z3 była mniejsza niż w K3. Przez cały okres trwania eksperymentu stwierdzono także większą wartość współczynnika $[GSH]_{chl}/[GSSG]_{chl}$ w chloroplastach (chl) liści Z3 w porównaniu z K3. W T_7 różnica była sześciokrotna (Tab. 5). Po początkowym wzroście (T_1 i T_2) i przejściowym spadku (T_5) zawartość GSH po infekcji roślin ogórka była istotnie wyższa w chloroplastach Z5 porównaniu z K3. Podobny trend, ale we wczesnej fazie patogenezы stwierdzono dla GSSG. W T_1 i T_2 , w chloroplastach liści Z5 wykazano większą odpowiednio o 50 i 37% zawartość GSSG w porównaniu z chloroplastami liści K5 (Rys. 21D). We wszystkich punktach czasowych zawartość GSH w chloroplastach liści K5 utrzymywała się na wyższym poziomie niż stwierdzona dla chloroplastów liści K3; w miarę upływu czasu różnice te stawały się coraz większe i w T_7 stwierdzono o 164% wyższą zawartość GSH w chloroplastach liści K5. Trend obserwowany dla GSSG był natomiast zmienny. We wczesnej fazie patogenezы chloroplasty liści K5 miały niższą zawartość GSSG niż chloroplasty liści K3. W T_7 stwierdzono jednak wyższą o 84% zawartość tego metabolitu w chloroplastach liści K5 w porównaniu z kontrolą. Mimo tego we wszystkich punktach czasowych współczynnik redoks $[GSH]_{chl}/[GSSG]_{chl}$ utrzymywał się w chloroplastach liści K5 na wyższym poziomie niż w chloroplastach liści K3 (Tab. 5). U roślin zakażonych, we wszystkich punktach czasowych (z wyjątkiem T_5) stwierdzono istotnie wyższą zawartość GSH w chloroplastach liści Z5 (nawet o 68% w T_1) niż w K5. W liściach młodszych roślin zakażonych (Z5) stwierdzono także większą akumulację GSSG niż w chloroplastach liści Z3 (maksymalna zaobserwowana różnica wyniosła 183% w T_7) (Rys. 21D).



Rys. 21. Zawartość kwasu askorbinowego (AA), kwasu dehydroaskorbinowego (DHA), glutationu (GSH) i disulfidu glutationu (GSSG) w: (A, B) liściach i (C, D) chloroplastach ogórka po infekcji *Ps*

Wartości dla danego punktu czasowego i dla danego metabolitu oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Tab. 5. Współczynniki redoks kwasu askorbinowego (AA) i glutationu (GSH) w liściach i chloroplastach ogórka po infekcji *Psi*, zdefiniowane jako ilorazy zawartości formy zredukowanej i utlenionej: [AA]/[DHA] i [GSH]/[GSSG]

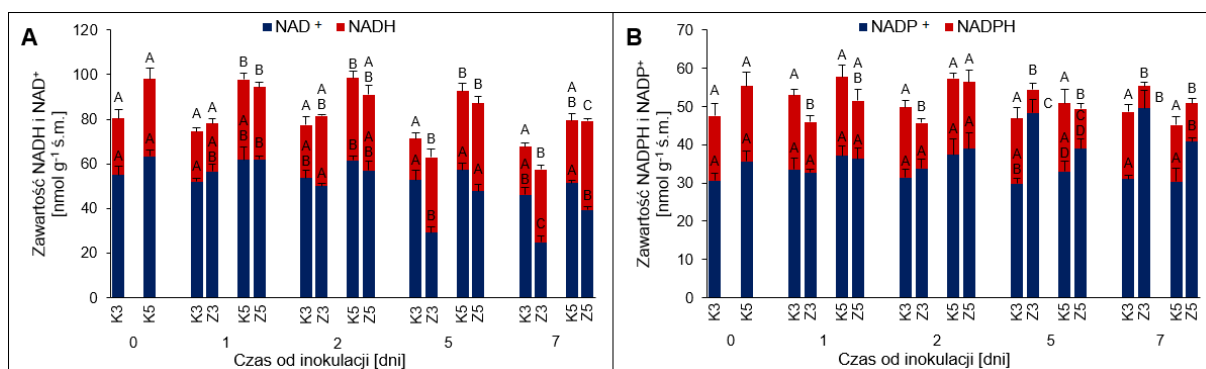
Zestawiono stosunki zawartości metabolitów oznaczonych w liściach (tot) i chloroplastach (chl). Wartości dla danego punktu czasowego i dla danego współczynnika redoks oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Współczynnik redoks	Czas od inokulacji [dni]	K3	Z3	K5	Z5
[AA] _{tot} /[DHA] _{tot}	T ₀	5,5±0,2(A)		8,8±0,4(B)	
	T ₁	5,4±0,1(A)	9,2±0,6(B)	11,6±0,3(B)	6,9±0,5(A)
	T ₂	6,2±0,3(A)	9,3±0,2(A)	8,8±0,8(A)	7,6±0,1(A)
	T ₅	7,0±0,6(A)	20,3±0,5(B)	8,1±0,4(A)	9,7±0,9(A)
	T ₇	8,7±0,3(A)	23,4±0,8(B)	6,5±0,9(A)	10,8±1,0(A)
[GSH] _{tot} /[GSSG] _{tot}	T ₀	8,8±0,5(A)		15,4±0,3(B)	
	T ₁	10,2±1,2(A)	10,9±0,5(A)	13,5±0,8(A)	14,9±1,0(A)
	T ₂	7,9±0,6(A)	14,2±0,4(B)	11,9±0,2(B)	13,7±0,3(B)
	T ₅	10,8±0,4(A)	8,0±0,8(A)	7,7±0,7(A)	18,8±0,9(B)
	T ₇	13,4±0,6(A)	8,8±0,3(B)	5,7±0,3(C)	15,0±0,7(A)
[AA] _{chl} /[DHA] _{chl}	T ₀	4,2±0,6(A)		10,8±0,2(B)	
	T ₁	3,2±0,3(A)	13,4±0,9(B)	10,7±0,7(B)	9,1±0,3(B)
	T ₂	3,2±0,1(A)	14,0±0,8(B)	11,1±0,1(B)	14,3±0,5(B)
	T ₅	3,8±0,8(A)	5,6±0,6(A)	13,3±0,3(B)	25,7±0,5(C)
	T ₇	3,0±0,2(A)	6,3±0,3(B)	13,0±0,8(C)	23,9±0,7(D)
[GSH] _{chl} /[GSSG] _{chl}	T ₀	5,3±0,7(A)		8,9±0,3(B)	
	T ₁	5,4±0,3(A)	7,4±0,2(A)	9,3±0,1(B)	7,2±0,2(A)
	T ₂	5,2±0,7(A)	7,0±0,8(A)	9,7±0,2(B)	7,7±0,3(A)
	T ₅	4,7±0,1(A)	19,1±0,3(B)	8,2±0,1(C)	9,6±0,8(C)
	T ₇	4,5±0,6(A)	26,5±1,2(B)	6,5±0,9(A)	10,8±1,1(C)

5.6. Zawartość dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych

Infekcja *Psi* wywołała wzrost wartości współczynnika redoks [NADH]/[NAD⁺] w liściach Z3 w późnej fazie patogenezy (T₅, T₇), co było związane z poinfekcyjnym wzrostem zawartości NADH (o 51% w T₅ i o 41% w T₇ w stosunku do K3) i obniżeniem zawartości NAD⁺ (o 41% w T₅ i o 46% w T₇ w stosunku do K3). W liściach Z5 stwierdzono natomiast wyższą o 67% wartość współczynnika [NADH]/[NAD⁺] w porównaniu z K5 jedynie w T₇ (Rys. 22A, Tab. 6). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości NAD⁺ i wartości współczynnika [NADH]/[NAD⁺] między liśćmi K5 i K3. Wykazano, że w T₁ i T₇, w liściach Z5 zawartość NADH jest większa odpowiednio o 50 i 23% w stosunku do liści Z3 (Rys. 22A, Tab. 6)

We wczesnej fazie patogenezy nie stwierdzono różnic w wartościach współczynnika redoks $[NADPH]/[NADP^+]$ między liśćmi K3 i Z3 mimo statystycznie istotnego obniżenia zawartości NADH w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą. Podobnie jak dla układu redoks $NADH/NAD^+$, w T_5 i T_7 współczynnik redoks $[NADPH]/[NADP^+]$ w liściach piątra trzeciego zmieniał się w wyniku infekcji, jednak w tym przypadku wykazano jego mniejszą wartość w liściach Z3 w porównaniu z K3. Było to wywołane obniżeniem zawartości NADPH (o 64 i 67% odpowiednio w T_5 i T_7 w porównaniu do kontroli) i wzrostem zawartości $NADP^+$ (o 62 i 60% w tych samych punktach czasowych). Podobny trend poinfekcyjnych zmian obserwowany był w liściach Z5 w późnej fazie infekcji, kiedy to wykazano spadek wartości współczynnika $[NADPH]/[NADP^+]$ w porównaniu z K5 (Rys. 22B, Tab. 6). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości NADPH i $NADP^+$ między liśćmi K3 i K5. W T_2 wykazano o 47% wyższą zawartość NADPH w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 22B, Tab. 6).



Rys. 22. Zawartość: (A) NADH i NAD^+ oraz (B) NADPH i $NADP^+$ w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego i dla danej formy dinukleotydu oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Tab. 6. Współczynniki redoks dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych w liściach ogórka po infekcji *PsI* zdefiniowane jako ilorazy zawartości postaci zredukowanej i utlenionej: [NADH]/[NAD⁺] i [NADPH]/[NADP⁺]

Wartości dla danego punktu czasowego i dla danego współczynnika redoks oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Współczynnik redoks	Czas od inokulacji [dni]	K3	Z3	K5	Z5
[NADH]/[NAD ⁺]	T ₀	0,5±0,2(A)		0,6±0,1(A)	
	T ₁	0,4±0,1(A)	0,4±0,1(A)	0,6±0,2(A)	0,5±0,1(A)
	T ₂	0,5±0,2(A)	0,6±0,2(A)	0,6±0,0(A)	0,6±0,2(A)
	T ₅	0,4±0,0(A)	1,2±0,0(B)	0,6±0,3(A)	0,8±0,1(A)
	T ₇	0,5±0,1(A)	1,3±0,4(B)	0,6±0,1(A)	1,0±0,3(B)
[NADPH]/[NADP ⁺]	T ₀	0,6±0,1(A)		0,6±0,2(A)	
	T ₁	0,6±0,0(A)	0,4±0,1(A)	0,6±0,0(A)	0,4±0,0(A)
	T ₂	0,6±0,1(A)	0,4±0,1(A)	0,5±0,1(A)	0,5±0,1(A)
	T ₅	0,6±0,1(A)	0,1±0,1(B)	0,5±0,0(A)	0,3±0,1(B)
	T ₇	0,6±0,2(A)	0,1±0,2(B)	0,5±0,2(A)	0,3±0,0(B)

5.7. Zawartość cukrów i aktywność enzymów ich metabolizmu

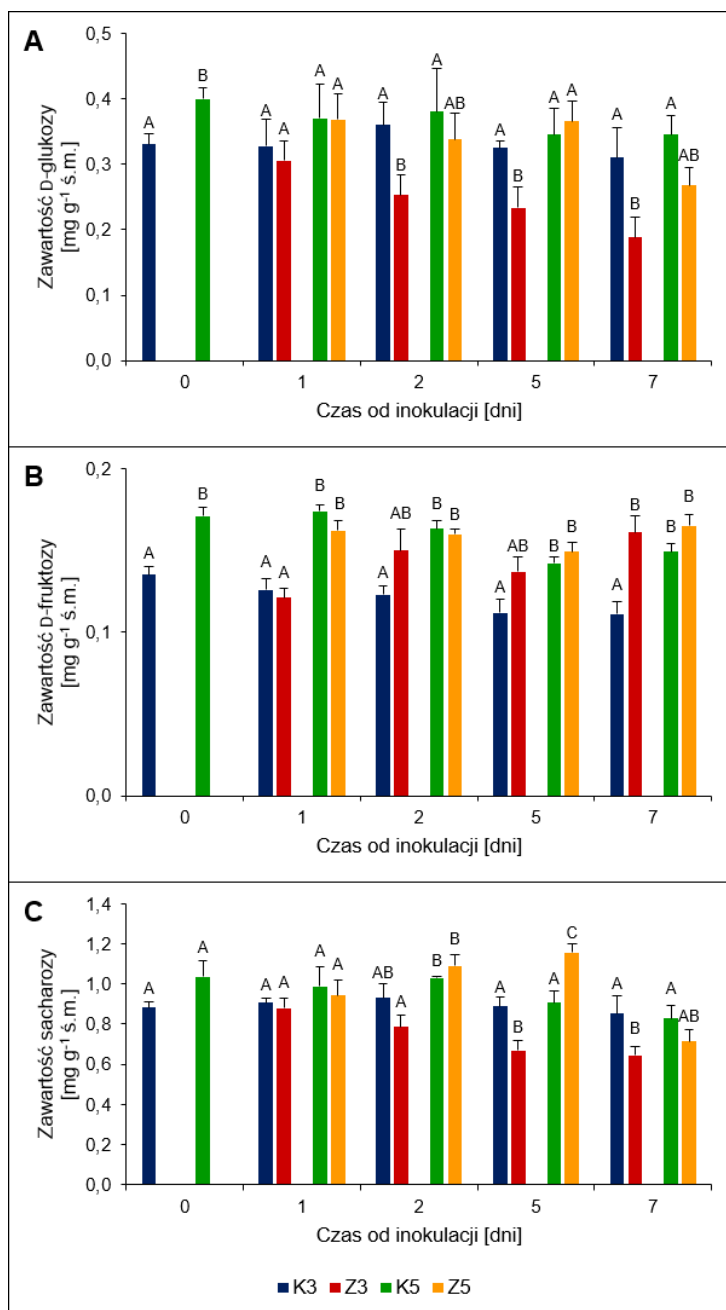
5.7.1. Zawartość D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy

Stres biotyczny wywołany infekcją *PsI* spowodował obniżenie zawartości D-glukozy w liściach Z3 w porównaniu do K3 w przedziale czasowym T₂ – T₇ (Rys. 23A). Nie stwierdzono zmian po infekcji w liściach Z5. W T₀ stwierdzono wyższą zawartość D-glukozy w liściach K5 w porównaniu z liśćmi K3 (Rys. 23A).

W tych samych punktach czasowych (T₂ – T₇), w których stwierdzono niższą zawartość D-glukozy w liściach Z3 w porównaniu do K3 wykazano wyższą zawartość D-fruktozy w Z3 niż w K3. Największa różnica (o 45% w stosunku do kontroli) oznaczona została w T₇ (Rys. 23B). W liściach K5 zawartość D-fruktozy była wyższa niż w liściach K3 i inaczej niż w przypadku D-glukozy różnice zawartości D-fruktozy utrzymywały się w całym badanym okresie. W T₁ wykazano wyższą o 33% zawartość D-fruktozy w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 23B).

Poinfekcyjny wzrost zawartości D-fruktozy w liściach Z3 w porównaniu z K3 był sprzężony z obniżeniem zawartości sacharozy w tych samych punktach czasowych. W T₅ zawartość sacharozy w liściach Z5 zwiększyła się o 28% w porównaniu z liśćmi K5 (Rys. 23C). Wykazano, że odmiennie niż w przypadku D-glukozy i D-fruktozy, liście K3 i K5 nie różnią się statystycznie istotnie pod względem zawartości sacharozy w żadnym punkcie

czasowym. W T_2 i T_5 stwierdzono natomiast istotnie wyższą (odpowiednio o 39 i 73%) zawartość sacharozy w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 23C).



Rys. 23. Zawartość cukrów: (A) D-glukozy, (B) D-fruktozy i (C) sacharozy w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Po aplikacji DCMU zawartość D-glukozy w liściach K3 obniżyła się. Podobne zmiany miały miejsce po infekcji w liściach Z3, którym aplikowano DCMU, jednak nie były one tak intensywne jak stwierdzone w przypadku roślin nietraktowanych inhibitorem (Rys. 24A). Po aplikacji DCMU wykazano wyższą zawartość D-glukozy w liściach K5 w porównaniu z liśćmi K3. Podobny trend zawartości D-glukozy stwierdzono dla liści Z3 i Z5, jednak w żadnym punkcie czasowym stwierdzone różnice nie były istotne statystycznie (Rys. 24A).

U roślin traktowanych DCMU nie stwierdzono zmian w zawartości D-fruktozy po infekcji, zarówno w liściach starszych jak i młodszych (Rys. 24B). Po aplikacji DCMU

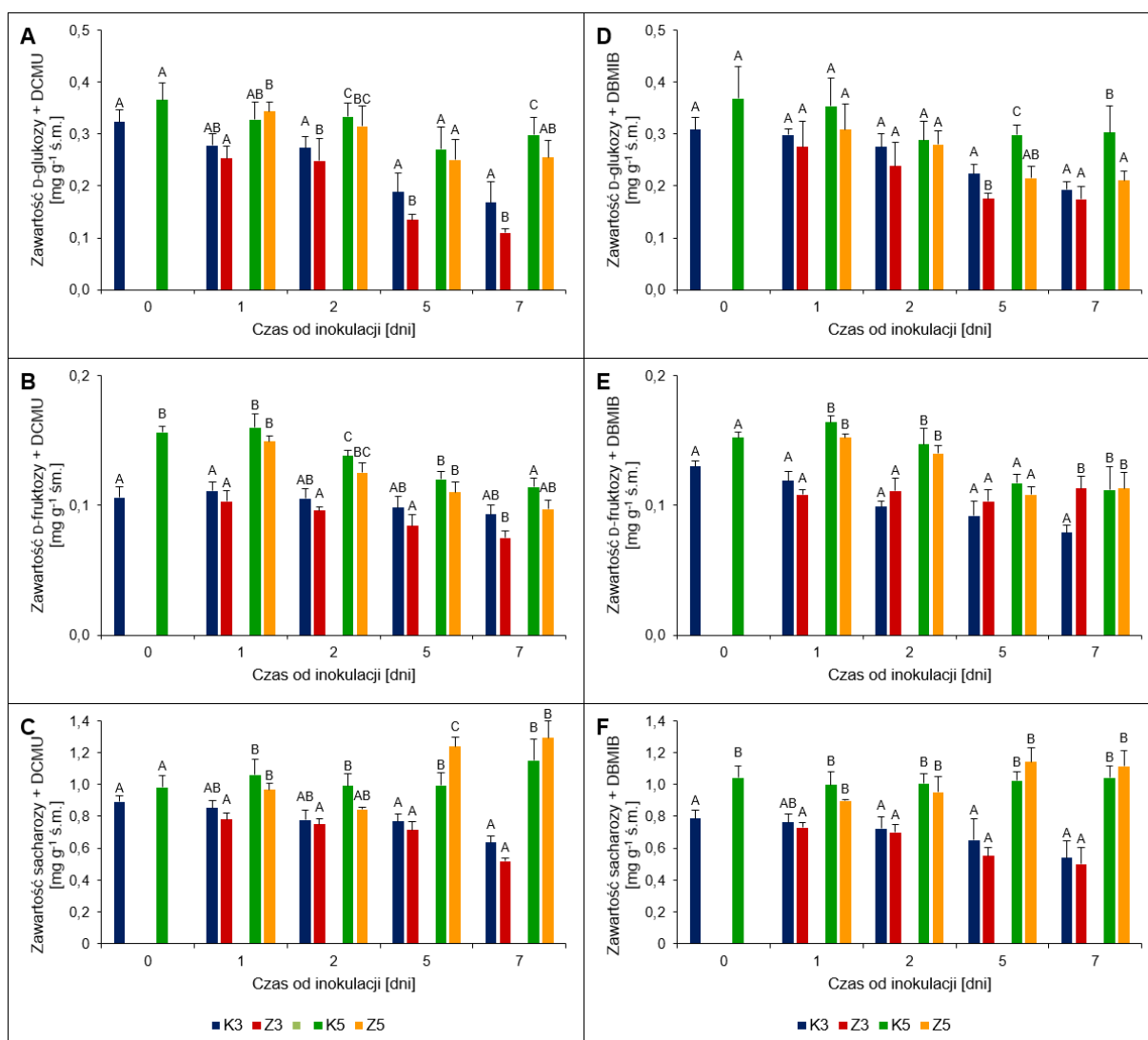
zawartość D-fruktozy w liściach K5 była wyższa niż w K3 (w T_0 o 47%). Podobnie w liściach Z5 zawartość D-fruktozy utrzymywała się na wyższym poziomie niż w liściach Z3. Największą różnicę, o 45%, stwierdzono w T_1 (Rys. 24B).

Infekcja nie spowodowała zmian zawartości sacharozy u roślin traktowanych DCMU, za wyjątkiem liści młodszych w T_5 , kiedy stwierdzono o 24% wyższą zawartość tego metabolitu w porównaniu do kontroli. W całym badanym okresie w liściach piętra piątego roślin kontrolnych i zakażonych zawartość sacharozy utrzymywała się na wyższym poziomie niż w odpowiednich liściach piętra trzeciego (Rys. 24C).

U roślin traktowanych DBMIB w przypadku obu pięter nie wykazano różnic w zawartości D-glukozy między liśćmi kontrolnymi i zakażonymi. Jedynie w T_5 stwierdzono niższą o 22% zawartość D-glukozy w liściach Z3 w porównaniu z K3. W późnym stadium patogenezы (T_5 i T_7) u roślin traktowanych DBMIB oznaczono niższą odpowiednio o 28 i 31% zawartość D-glukozy w liściach Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 24D).

Stwierdzono, że u roślin traktowanych DBMIB już od T_2 zawartość D-fruktozy w liściach Z3 była niższa w porównaniu z K3 (w T_7 o 43% w stosunku do kontroli) (Rys. 24E). Liście K5 potraktowane DBMIB miały natomiast wyższą (o 38, 49 i 42% odpowiednio w T_1 , T_2 i T_7) zawartość D-fruktozy w porównaniu z liśćmi K3 potraktowanymi DBMIB (Rys. 24E).

Podobnie jak dla DCMU stwierdzono, że infekcja *Ps* nie powoduje zmian zawartości sacharozy w liściach obu pięter, które były traktowane DBMIB (Rys. 24F). U roślin, którym aplikowano DBMIB, w T_7 oznaczono wyższą o 93% zawartość sacharozy w liściach K5 w porównaniu z K3 i o 123% wyższą zawartość tego cukru w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 24F).



Rys. 24. Zawartość cukrów: (A, D) D-glukozy, (B, E) D-fruktozy i (C, F) sacharozy w liściach ogórka zainfekowanych *PsI* po aplikacji inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów: DCMU (A-C) i DBMIB (D-F)

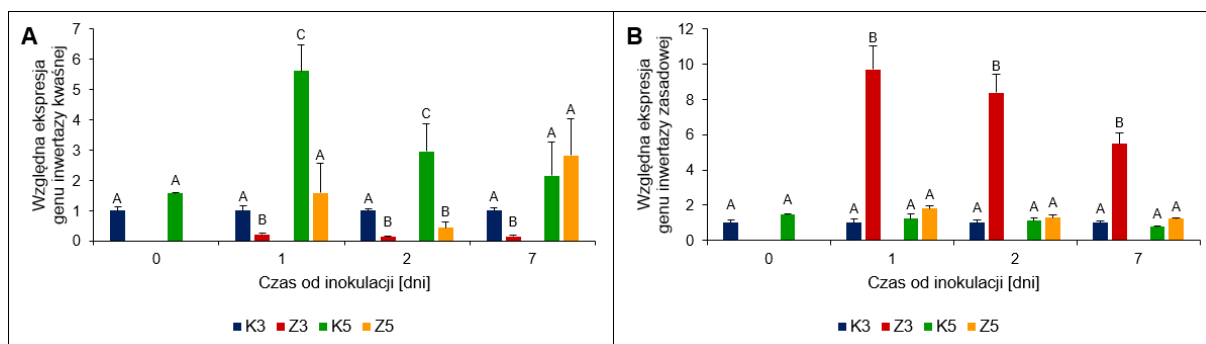
Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

5.7.2. Ekspresja genów inwertazy kwaśnej i inwertazy zasadowej

W wyniku infekcji *PsI* dochodziło do ok. sześciokrotnego obniżenia poziomu ekspresji genu inwertazy kwaśnej w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą. W liściach Z5 podobne zmiany stwierdzono jedynie we wczesnej fazie patogenez. W T_1 i T_2 wykazano odpowiednio cztero- i siedmiokrotne obniżenie poziomu ekspresji inwertazy kwaśnej w Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 25A). W tych samych punktach czasowych u roślin kontrolnych stwierdzono odpowiednio sześć- i trzykrotnie wyższy poziom ekspresji genu inwertazy kwaśnej w liściach K5 w porównaniu do liści K3. W przypadku roślin zakażonych istotne różnice w poziomach ekspresji genu inwertazy kwaśnej między liśćmi Z3 i Z5 stwierdzono w T_1 i T_7

(odpowiednio siedmio- i osiemnastokrotnie wyższy poziom ekspresji opisywanego genu w Z5 w stosunku do liści Z3) (Rys. 25A).

Zmiany poziomu ekspresji genu inwertazy zasadowej w liściach Z3 były odmienne niż stwierdzone dla inwertazy kwaśnej. W T_1 , T_2 i T_7 wykazano odpowiednio dziesięcio-, ośmio- i sześciokrotnie wyższy poziom ekspresji genu inwertazy zasadowej w liściach Z3 w porównaniu z liśćmi K3 (Rys. 25B). Przeciwnie niż w wypadku inwertazy kwaśnej, liście K5 nie różniły się istotnie pod względem poziomu ekspresji genu inwertazy zasadowej od liści K3. Stwierdzono natomiast odwrotny trend dla roślin zakażonych: we wszystkich punktach czasowych poziom ekspresji genu inwertazy zasadowej był odpowiednio pięcio-, sześć- i czterokrotnie niższy w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 25B).



Rys. 25. Względna ekspresja genów: (A) inwertazy kwaśnej i (B) inwertazy zasadowej w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Wartości liczbowe względnej ekspresji danego genu w liściach kontrolnych piętra trzeciego (K3) w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1.

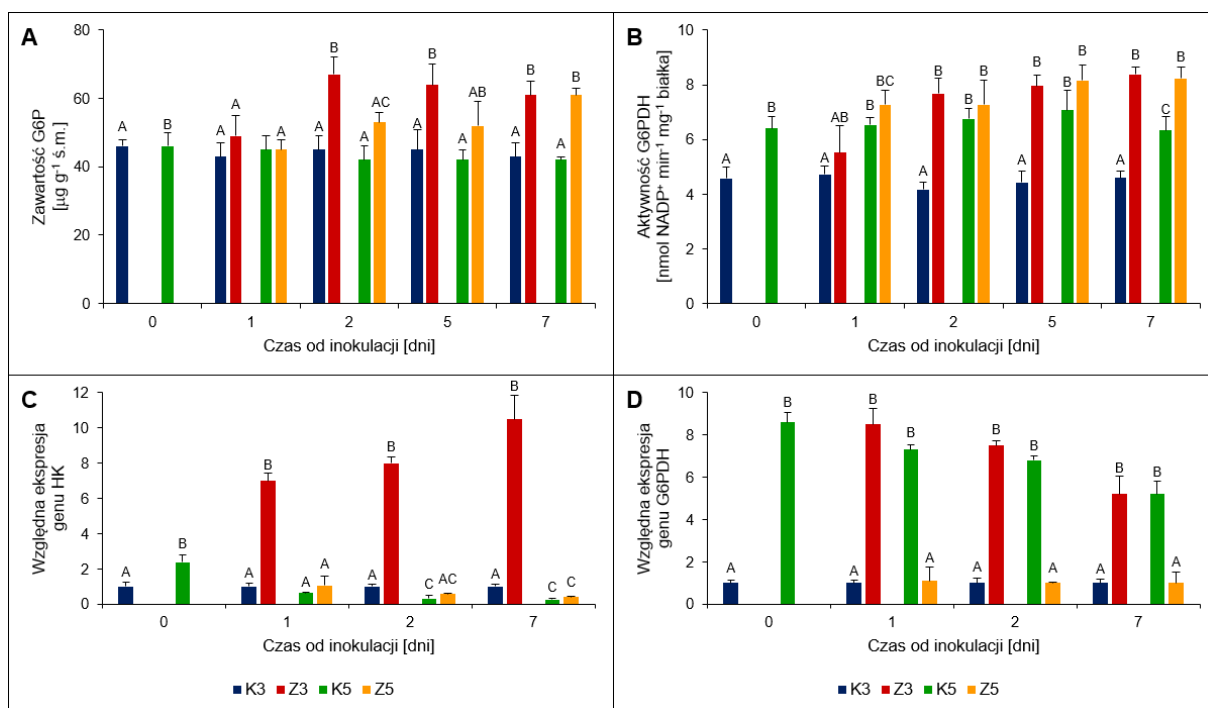
5.7.3. Zawartość glukozy-6-fosforanu i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Ekspresja genów heksokinazy i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej

Stwierdzono, że poinfekcyjnemu spadkowi zawartości D-glukozy w liściach Z3 w T_2 , T_5 , i T_7 (Rys. 23A) towarzyszy statystycznie istotny wzrost zawartości G6P w tych liściach, odpowiednio o 49, 42 i 42% w stosunku do kontroli. W liściach Z5 infekcja *PsI* spowodowała statystycznie istotny wzrost (o 45%) zawartości tego metabolitu jedynie w T_7 (Rys. 26A).

W Z3, wraz z poinfekcyjnymi zmianami zawartości G6P rosła również aktywność G6PDH. W T_2 , T_5 i T_7 stwierdzono odpowiednio o 84, 80 i 82% wyższą aktywność G6PDH w liściach Z3 w porównaniu z K3. W liściach młodszych jedynie w T_7 oznaczono o 30% większą aktywność G6PDH w Z5 w porównaniu do K5 (Rys. 26B). We wszystkich punktach czasowych, w liściach K5 oznaczono wyższą aktywność G6PDH w porównaniu z K3, przy czym w T_2 różnica aktywności była największa i wynosiła 62%. Nie stwierdzono natomiast różnic w aktywności G6PDH między liśćmi Z5 i Z3 (Rys. 26B).

Zmiany poziomu ekspresji genu HK po infekcji stwierdzono tylko w liściach starszych, a w młodszych – nie. Poziom ekspresji tego genu w liściach piętra piątego był niższy niż w liściach piętra trzeciego, zarówno u roślin kontrolnych, jak i zakażonych. W T₀, T₁, T₂ i T₇ stwierdzono odpowiednio siedmio-, czternasto- i dwudziestoczekrotnie niższy poziom ekspresji genu HK w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 26C).

Podobnie jak w przypadku HK, wykazano wzrost poziomu ekspresji genu G6PDH w liściach Z3 w porównaniu z liśćmi K3 (odpowiednio dziewięć-, ośmio- i pięciokrotny w T₁, T₂ i T₇). Natomiast w liściach młodszych roślin zakażonych *Psi* ekspresja genu G6PDH obniżała się i w liściach Z5 była około sześciokrotnie niższa niż w liściach K5 (Rys. 26D). W liściach K5 we wszystkich punktach czasowych stwierdzono wyższy poziom ekspresji genu G6PDH w porównaniu z liśćmi K3. Odwrotna zależność dotyczyła roślin zakażonych, gdzie stwierdzono odpowiednio ośmio-, pięcio- i siedmiokrotnie niższy poziom ekspresji genu G6PDH w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 26D).



Rys. 26. (A) Zawartość glukozy-6-fosforanu (G6P), (B) aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PDH) oraz względna ekspresja genów: (C) heksokinazy (HK) i (D) G6PDH w liściach ogórka po infekcji *Psi*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Na rysunkach C i D wartości liczbowe względnej ekspresji genów HK i G6PDH w liściach kontrolnych piętra trzeciego (K3) przyjęto jako 1.

5.8. Wybrane metabolity i enzymy cyklu Krebsa

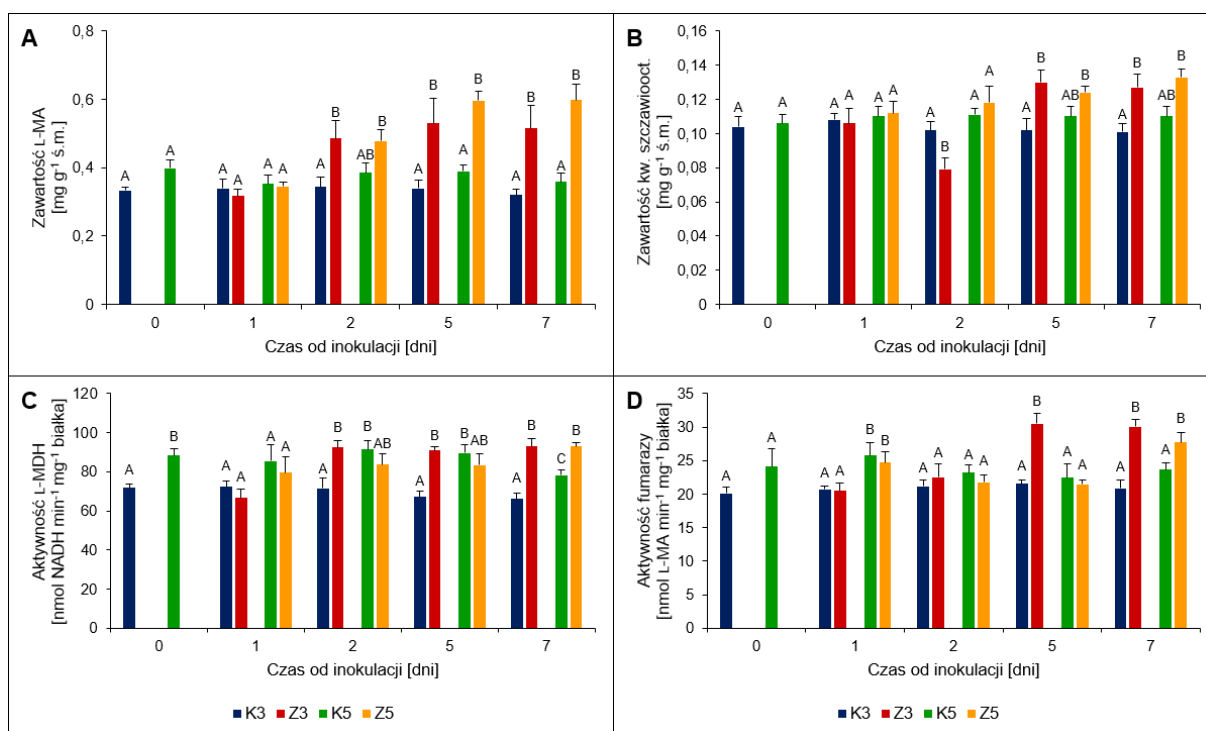
5.8.1. Zawartość kwasu L-jabłkowego i szczawiooctowego. Aktywność dehydrogenazy L-jabłczanowej i fumarazy

Po infekcji następował wzrost zawartości L-MA w liściach Z3 i Z5, przy czym w liściach piętra trzeciego zmiany w stosunku do kontroli stwierdzono w przedziale czasowym T₂ – T₇, a w liściach piętra piątego od T₅ (Rys. 27A).

Po infekcji zmieniał się także profil zawartości kwasu szczawiooctowego w liściach Z3. W T₂ wykazano spadek jego zawartości, a w T₅ i T₇ następował wzrost, odpowiednio o 28 i 26% w stosunku do K3 (Rys. 27B).

Poinfekcyjnemu wzrostowi zawartości L-MA w liściach Z3 w czasie T₂-T₇ towarzyszył wzrost aktywności L-MDH względem kontroli mieszczący się w zakresie od 29 do 41%. W liściach Z5 aktywność L-MDH nie różniła się istotnie od stwierdzonej dla K5, z wyjątkiem T₇, kiedy to wykazano wyższą aktywność L-MDH dla liści Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 27C). U roślin kontrolnych stwierdzono wyższą aktywność L-MDH w liściach K5 w porównaniu z liśćmi K3, maksymalnie o 33% w T₅. U roślin zakażonych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w aktywności L-MDH między liśćmi Z3 i Z5 (Rys. 27C).

Stwierdzono, że w późnym stadium patogenezy (T₅, T₇), w liściach Z3 aktywność fumarazy jest wyższa o 43% w porównaniu z K3. W T₇ stwierdzono także wyższą aktywność fumarazy w Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 27D). W T₁ aktywność fumarazy była większa w liściach K5 w porównaniu z K3. W przypadku roślin zakażonych, w T₁ aktywność fumarazy była wyższa o 21% w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3, natomiast od T₂ stwierdzono wyższą aktywność tego enzymu w liściach Z3 (w T₅ o 30% w porównaniu z Z5) (Rys. 27D).



Rys. 27. Zawartość: (A) kwasu L-jabłkowego (L-MA) i (B) kwasu szczawiooctowego oraz aktywność: (C) dehydrogenazy L-jabłczanowej (L-MDH) i (D) fumarazy w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

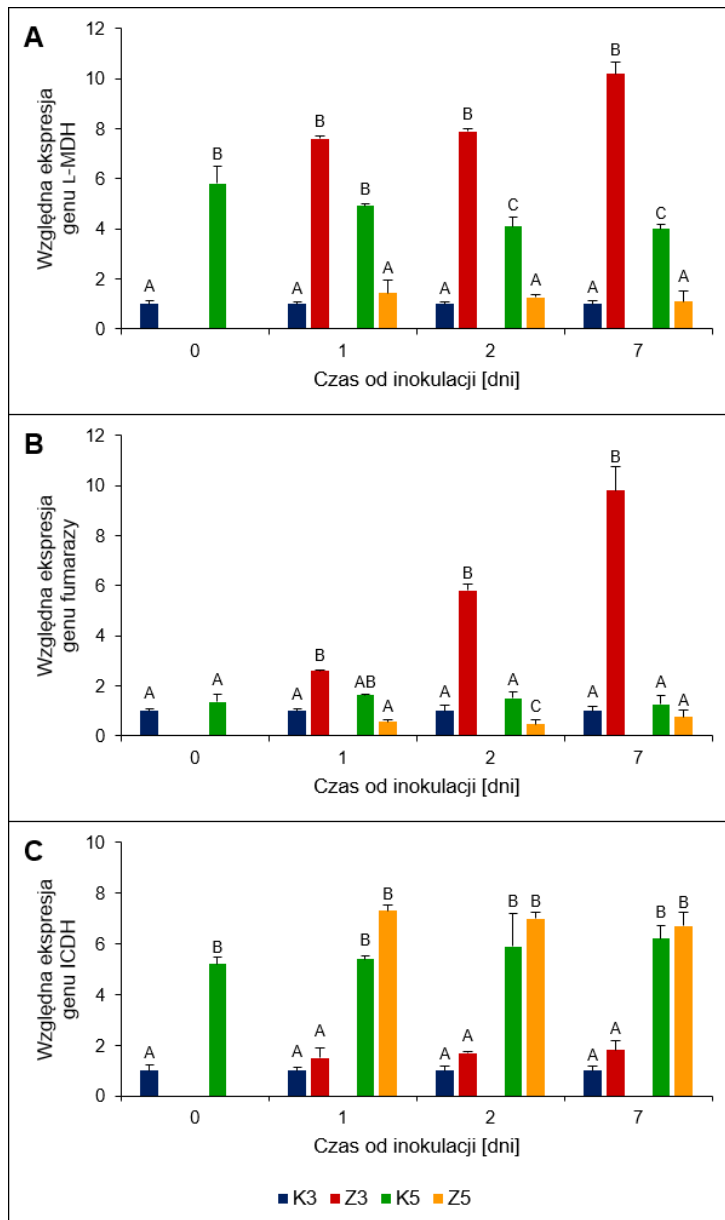
5.8.2. Ekspresja genów dehydrogenazy L-jabłczanowej, fumarazy i dehydrogenazy izocytrynianowej

Poinfekcyjnemu wzrostowi aktywności L-MDH w liściach piętra trzeciego od T_2 do T_7 (Rys. 27C) towarzyszył wzrost poziomu ekspresji genu kodującego ten enzym. W liściach Z3 stwierdzono około dziesięciokrotnie wyższy poziom ekspresji genu L-MDH w porównaniu z K3. W przedziale $T_1 - T_7$ wykazano około trzykrotnie niższy poziom ekspresji genu kodującego ten enzym w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi K5 (Rys. 28A). Ponadto stwierdzono, że liście K5 charakteryzują się około pięciokrotnie wyższym poziomem ekspresji genu L-MDH w porównaniu z liśćmi K3. Z kolei u roślin zakażonych, w T_1 , T_2 i T_7 wykazano odpowiednio pięcio-, sześć- i dziesięciokrotnie niższy poziom ekspresji genu L-MDH w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 28A).

W liściach Z3 stwierdzono postępujące w czasie zwiększanie poziomu ekspresji genu fumarazy w porównaniu z K3. W T_7 był on dziesięciokrotnie wyższy w porównaniu z kontrolą. W liściach Z5 wykazano natomiast obniżenie poziomu ekspresji genu fumarazy w porównaniu z K5. We wczesnej fazie patogenezy (T_2), w liściach Z5 był on trzykrotnie niższy w stosunku do poziomu wykazanego dla liści K5 (Rys. 28B). U roślin zakażonych,

w przedziale $T_1 - T_7$ stwierdzono od pięcio- do trzynastokrotnie niższy poziom ekspresji genu fumarazy w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 28B).

Stres biotyczny wywołany infekcją *PsI* nie powodował zmian ekspresji genu ICDH. Wykazano jedynie różnice między liśćmi piątra trzeciego i piątego. We wszystkich punktach czasowych, w liściach K5 poziom ekspresji genu ICDH był czterokrotnie wyższy niż w liściach K3, natomiast w liściach Z5 był on sześciokrotnie wyższy niż w liściach Z3 (Rys. 28C).



Rys. 28. Względna ekspresja genów: (A) dehydrogenazy L-jabłczanowej (L-MDH), (B) fumarazy i (C) dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDH) w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotnie statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Wartości liczbowe względnej ekspresji danego genu w liściach kontrolnych piątra trzeciego (K3) w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1.

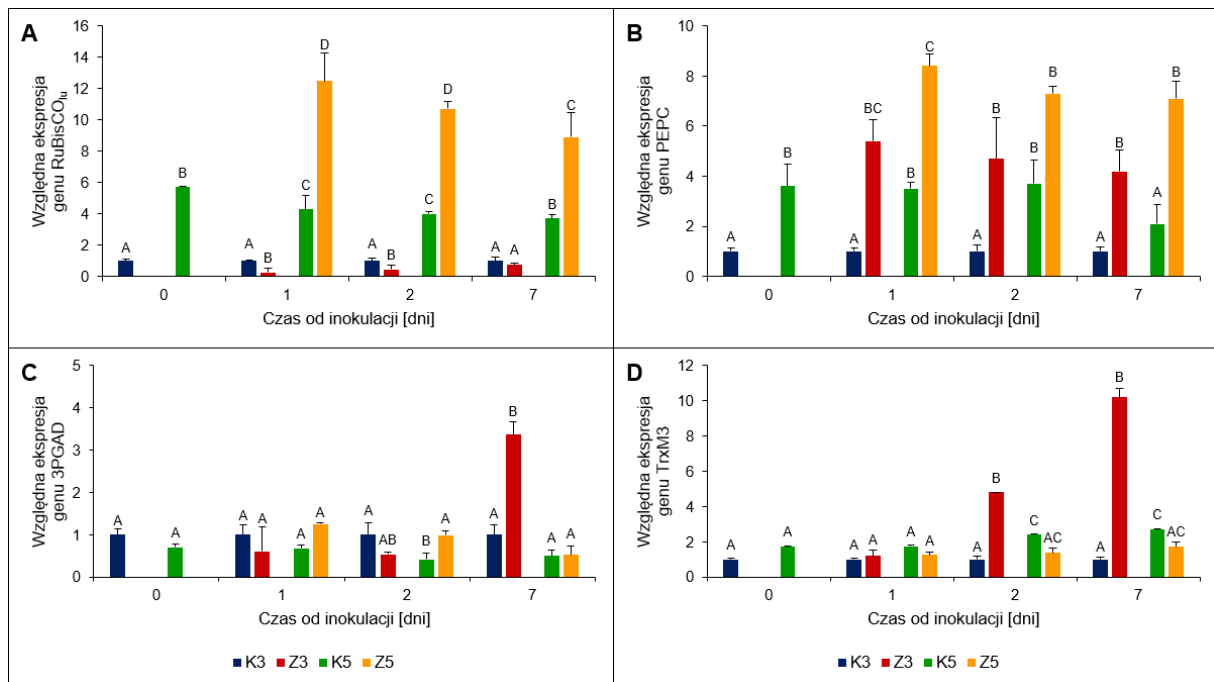
5.9. Ekspresja genów związanych z fotosyntezą

Obniżeniu wartości P_N , stwierdzonemu w liściach Z3 w porównaniu z K3 w późnym stadium patogenezy (Rys. 12B) towarzyszyło odpowiednio cztero- i dwukrotne obniżenie poziomu ekspresji genu dużej podjednostki RuBisCO ($RuBisCO_{lu}$) we wczesnej fazie patogenezy (T_1 , T_2) w liściach Z3 w stosunku do K3. W liściach Z5, we wszystkich punktach czasowych stwierdzono natomiast około trzykrotnie wyższy poziom ekspresji opisywanego genu w porównaniu do K5 (Rys. 29 A). Liście młodsze roślin kontrolnych i zakażonych charakteryzowały się wyższym poziomem ekspresji genu kodującego $RuBisCO_{lu}$. Stwierdzono pięciokrotnie wyższy poziom ekspresji genu $RuBisCO_{lu}$ w liściach K5 w porównaniu z K3 i dziesięciokrotnie wyższy poziom ekspresji tego genu w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 29A).

We wszystkich punktach czasowych wykazano około pięciokrotnie wyższy poziom ekspresji genu PEPC w liściach Z3 w porównaniu z K3. Podobną zależność po infekcji stwierdzono w liściach piętra piątego i tak w T_1 i T_7 wykazano odpowiednio dwu- i trzykrotnie wyższy poziom ekspresji tego genu w liściach Z5 w porównaniu do K5 (Rys. 29B). Ponadto u roślin kontrolnych w T_0 , T_1 i T_2 stwierdzono wyższy poziom ekspresji genu PEPC w liściach K5 niż w K3 (Rys. 29B).

Poinfekcyjne zmiany poziomu ekspresji genu 3PGAD w liściach Z3 wykazano jedynie w T_7 (trzykrotny wzrost w porównaniu do K3), a w liściach Z5 w czasie T_2 (dwukrotny wzrost w stosunku do K5) (Rys. 29C). Wykazano ponadto, że w T_7 poziom ekspresji genu 3PGAD był sześciokrotnie niższy w liściach Z5 w porównaniu z Z3 (Rys. 29C).

Stwierdzono, że w T_2 i T_7 poziom ekspresji genu TrxM3 był odpowiednio pięcio- i dziesięciokrotnie wyższy w liściach Z3 w porównaniu do K3 (Rys. 29D). Infekcja nie spowodowała zmian w ekspresji genu TrxM3 w liściach piętra piątego. Istotne różnice między poziomem ekspresji opisywanego genu w liściach trzeciego i piątego piętra roślin obu wariantów eksperymentalnych były oznaczone w T_2 i T_7 . W liściach K5 poziom ekspresji genu TrxM3 był w tych dniach odpowiednio dwu- i trzykrotnie wyższy niż w liściach K3, a w liściach Z5 trzy- i sześciokrotnie niższy niż w liściach Z3 (Rys. 29D).



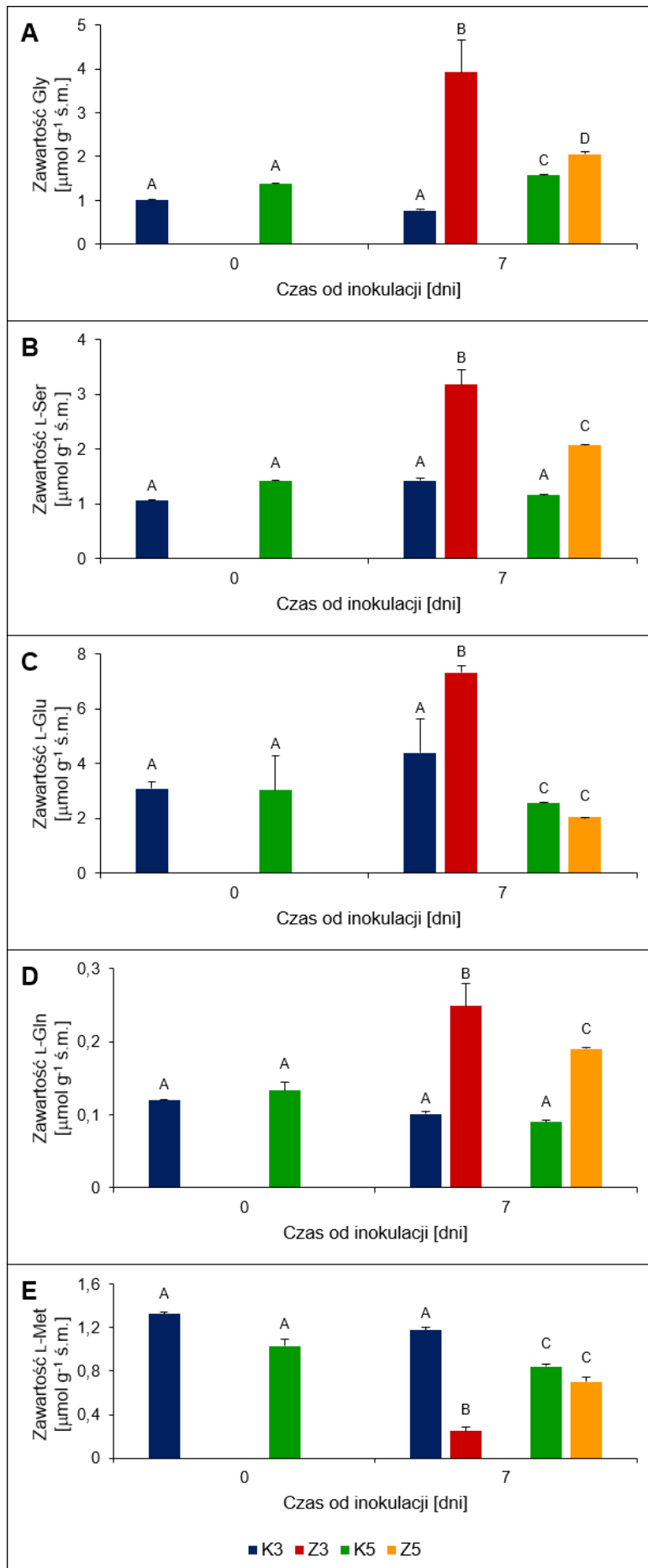
Rys. 29. Względna ekspresja genów: (A) dużej podjednostki karboksylazy 1,5-bisfosforybułozu (RuBisCO_{II}), (B) karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC), (C) dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (3PGAD) i (D) chloroplastowej tioredoksyny M3 (TrxM3) w liściach ogórka po infekcji *Psi*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Wartości liczbowe względnej ekspresji danego genu w liściach kontrolnych piętra trzeciego (K3) w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1.

5.10. Zawartość aminokwasów

Stwierdzono, że w T₇ zawartość Gly, L-Ser, L-Glu i L-Gln w liściach Z3 jest większa niż w K3. W tym dniu wykazano o około 250% większą zawartość Gly i L-Ser w liściach Z3 w porównaniu do K3. Natomiast dla L-Glu i L-Gln stwierdzono odpowiednio o 67 i 149% większą zawartość w liściach Z3 niż w liściach K3. Podobną zależność po infekcji stwierdzono również w T₇ dla Gly, L-Ser i L-Gln w liściach Z5 (Rys. 30 A-D). W przypadku L-Met zmiany po infekcji stwierdzono tylko dla liści piętra trzeciego – w T₇ w liściach Z3 zawartość aminokwasu była około pięciokrotnie niższa niż w K3 (Rys. 30E).

U roślin kontrolnych liście K5 różniły się istotnie od liści K3 pod względem zawartości aminokwasów i tylko w przypadku Gly i L-Glu w T₇. Tego samego dnia u roślin zakażonych wykazano natomiast istotnie niższą zawartość wszystkich czterech aminokwasów w liściach Z5 w porównaniu z Z3, przy czym największa różnica stwierdzona była dla L-Glu (Rys. 30A, C). W T₇ były również widoczne istotne różnice w zawartości L-Met w liściach trzeciego i piątego piętra roślin kontrolnych i zakażonych. W tym dniu liście K5 miały o 28% niższą zawartość tego aminokwasu w porównaniu do liści K3, natomiast w liściach Z5 stwierdzono o 180% wyższą zawartość L-Met niż w liściach Z3 (Rys. 30E).



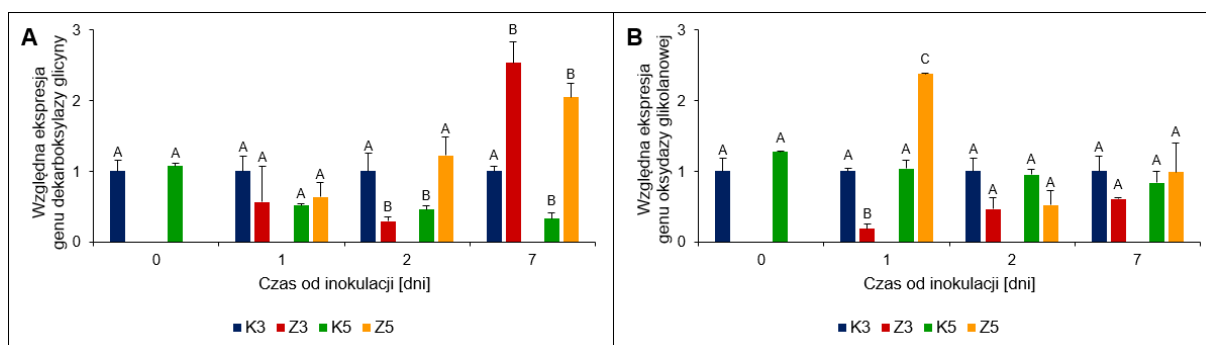
Rys. 30. Zawartość: (A) glicyny (Gly), (B) L-seryny (L-Ser), (C) kwasu L-glutaminowego (L-Glu), (D) L-glutamininy (L-Gln) i (E) L-metioniny (L-Met) w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotnie statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 3$).

5.11. Ekspresja genów dekarboksylazy glicyny i oksydazy glikolanowej

W liściach piętka trzeciego stwierdzono zmiany poziomu ekspresji genu dekarboksylazy glicyny po infekcji. W T_2 stwierdzono trzykrotnie mniejszy poziom ekspresji tego genu w liściach Z3, natomiast w T_7 był on trzykrotnie wyższy niż w K3. Po zakażeniu poziom ekspresji genu dekarboksylazy glicyny był również wyższy (odpowiednio trzy- i sześciokrotnie w T_2 i T_7) w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi K5 (Rys. 31A). Stwierdzono, że poziom ekspresji genu dekarboksylazy glicyny w liściach K5 był w każdym punkcie czasowym oprócz T_0 niższy niż w liściach K3. Ponadto w T_2 poziom ekspresji opisywanego genu był czterokrotnie wyższy w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Rys. 31A).

Poziom ekspresji genu oksydazy glikolanowej zmieniał się pod wpływem stresu biotycznego jedynie w T_1 . Stwierdzono, że w liściach Z3 jest on pięciokrotnie niższy w porównaniu z K3, a w liściach Z5 dwukrotnie wyższy niż w K5 (Rys. 31B). Ponadto w T_1 , w liściach Z5 poziom ekspresji genu oksydazy glikolanowej był trzynastokrotnie wyższy niż w liściach Z3 (Rys. 31B).



Rys. 31. Względna ekspresja genów: (A) dekarboksylazy glicyny i (B) oksydazy glikolanowej w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Wartości dla danego punktu czasowego oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 4$). Wartości liczbowe względnej ekspresji danego genu w liściach kontrolnych piętka trzeciego (K3) w każdym punkcie czasowym przyjęto jako 1.

5.12. Zawartość metabolitów oznaczanych metodą GC-MS

Stwierdzono, że w T_2 zawartość mio-inozytolu, α -, γ -, i δ -tokoferolu oraz kwasów: palmitynowego i α -linolenowego była większa w liściach Z3 niż w K3, przy czym zawartość δ -tokoferolu była czterokrotnie wyższa w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą. Wykazano również, że w T_7 zawartość mio-inozytolu i kwasów: palmitynowego oraz α -linolenowego była wyższa w liściach Z3 w porównaniu z K3. Tego dnia oznaczono także większą zawartość trehalozy i rafinozy w liściach Z3. W T_2 , w liściach Z5 stwierdzono obecność δ -tokoferolu, który w K5, zarówno w T_0 , jak i T_2 nie był identyfikowany. W T_2 wykazano obecność trehalozy

w liściach Z3 i Z5, a zawartość rafinozy w liściach Z5 była znacznie wyższa niż w K5. Tego samego dnia stwierdzono, że w Z5 zawartość kwasu glicerynowego jest niższa niż w K5, a poziom kwasów: palmitynowego i α -linolenowego jest wyższy w Z5 niż w K5. W T₇ zawartość rafinozy była sześciokrotnie wyższa w liściach Z5 w porównaniu z K5. W tym samym dniu, w liściach Z5 stwierdzono obniżenie zawartości fitolu oraz dominujących form tokoferolu: α i γ w porównaniu z K5 (Tab. 7).

Wykazano, że w T₀ liście K5 mają wyższą zawartość mio-inozytolu, fitolu i kwasów: glicerynowego, linolowego, α -linolenowego (kwas dominujący) oraz 3-fosfoglicerynowego, a także ośmiokrotnie niższy poziom γ -tokoferolu i pięciokrotnie mniejszą zawartość rafinozy w porównaniu z K3. Różnice w profilu metabolicznym między liśćmi piętra trzeciego i piątego utrzymywały się w dalszych punktach czasowych. W T₂ stwierdzono niższą zawartość rafinozy w liściach K5 w porównaniu z K3. W T₇ taka zależność dotyczyła δ -tokoferolu. Wykazano również, że w T₂ zawartość γ - i δ -tokoferolu w liściach Z5 jest znacznie niższa niż w Z3. W T₇ poziom γ -tokoferolu był znacznie niższy w Z5 w porównaniu z Z3, natomiast δ -tokoferol w Z5 nie został oznaczony. W T₂ stwierdzono dwukrotnie niższą zawartość trehalozy i dwukrotnie wyższy poziom kwasu α -linolenowego w liściach Z5 w porównaniu z liśćmi Z3 (Tab. 7).

Tab. 7. Względna zawartość metabolitów oznaczanych metodą GC-MS w liściach ogórka po infekcji *PsI*

Podane wartości wyliczane były względem standardu wewnętrznego (n-dokoza), po uwzględnieniu pól powierzchni pików na chromatogramach GC. Wartości dla danego punktu czasowego i dla danego metabolitu oznaczone tymi samymi literami alfabetu są nieistotne statystycznie wobec siebie przy $p \leq 0,05$ ($n = 3$).

Metabolit	T0		T2				T7			
	K3	K5	K3	Z3	K5	Z5	K3	Z3	K5	Z5
Alkohole										
mio-inozytol	3,5±0,1(A)	6,9±0,2(B)	3,7±0,5(A)	8,4±0,6(B)	6,5±0,1(AB)	6,0±0,5(AB)	3,8±0,5(A)	7,3±0,4(B)	6,2±0,7(AB)	6,2±1,0(AB)
fitol	636,4±98,0(A)	985±42,0(B)	593,8±240,0(A)	934,3±561,7(A)	1325,9±650,0(A)	1196,7±626,1(A)	309,3±259,9(A)	350,5±98,2(A)	1234,4±180,2(B)	599,2±198,7(A)
Fenole										
α-tokoferol	208,9±53,9(A)	115,1±69,5(A)	94,2±10,9(A)	199,4±15,4(B)	101,7±25,3(A)	138,3±41,5(AB)	222,5±17,4(A)	152,0±1,1(B)	373,7±86,1(A)	100,6±11,2(C)
γ-tokoferol	147,5±48,8(A)	17,9±8,6(B)	50,2±5,6(A)	171,9±12,8(B)	23,2±7,6(AC)	18,9±1,1(C)	205,0±14,0(A)	165,7±18,8(B)	100,2±28,9(B)	14,6±8,5(C)
δ-tokoferol	13,7±4,0(A)	-	8,2±4,0(A)	33,0±10,2(B)	-	2,8±1,2(A)	59,3±3,8(A)	66,4±3,1(A)	2,8±4,0(B)	-
Kwasy karboksylowe										
kw. glicerynowy	1,1±0,1(A)	6,1±1,0(B)	1,8±0,4(A)	3,0±0,2(A)	7,1±0,2(B)	2,8±0,1(A)	2,3±0,1(A)	4,7±1,0(B)	4,5±0,3(B)	3,0±0,2(A)
kw. palmitynowy	5,3±1,3(A)	5,3±0,7(A)	5,6±0,4(A)	9,9±0,2(B)	5,3±0,3(A)	10,1±0,7(B)	6,4±0,4(A)	15,2±0,8(B)	12,9±4,0(AB)	8,6±0,4(AB)
kw. linolowy	1,5±0,2(A)	2,7±0,3(B)	1,4±0,2(A)	1,6±0,1(A)	2,1±0,1(A)	2,9±0,3(A)	1,4±0,7(A)	2,7±0,4(A)	2,2±0,1(A)	2,6±0,7(A)
kw. α-linolenowy	39,4±1,4(A)	98,5±4,6(B)	47,8±6,2(A)	85,1±0,3(B)	130,2±2,2(C)	162,5±0,8(D)	45,8±2,1(A)	89,1±5,1(BC)	115,7±0,6(B)	75,3±4,4(C)
kw. stearynowy	1,0±0,0(A)	0,8±0,1(A)	0,8±0,1(A)	1,2±0,2(A)	1,1±0,1(A)	1,4±0,3(A)	1,0±0,2(A)	2,1±0,1(A)	1,4±0,4(A)	1,4±0,1(A)
kw. 3-fosfoglicerynowy	1,6±0,3(A)	3,3±0,4(B)	1,4±0,1(A)	2,1±0,4(AB)	3,3±0,1(B)	3,8±0,1(B)	1,3±0,1(A)	3,0±0,2(B)	2,9±0,2(B)	2,2±0,4(AB)
Estry										
palmitynian fitylu	10,6±0,8(A)	12,5±5,0(A)	12,9±5,0(AB)	25,4±2,2(A)	11,1±3,0(B)	20,1±2,7(AB)	12,1±4,3(A)	20,2±15,3(A)	11,8±1,0(A)	9,3±7,3(A)
Cukry										
trehaloza	-	-	-	0,6±0,2(A)	-	0,3±0,1(B)	0,4±0,1(A)	0,8±0,2(B)	0,4±0,1(A)	0,7±0,1(B)
rafinoza	1,0±0,1(A)	0,2±0,1(B)	1,0±0,2(A)	1,9±0,1(A)	0,1±0,2(B)	2,8±0,0(A)	1,0±0,2(A)	4,0±0,3(B)	0,5±0,1(C)	3,0±0,1(B)

6. DYSKUSJA

Ogórek siewny jest ważnym gospodarczo gatunkiem roślin warzywnych, którego areal upraw w Polsce stanowi około 12% ogólnej powierzchni polowej uprawy warzyw. Wysoka wrażliwość ogórka na choroby wywoływane przez czynniki chorobotwórcze powoduje coroczne straty plonu. Jednym z groźniejszych patogenów ogórka jest *Psl*, sprawca kanciastej plamistości liści ogórka, który zajmuje drugie miejsce – tuż po mączniaku rzekomym dyniowatych (*Pseudoperonospora cubensis*) – pod względem wielkości szkód wywoływanych w uprawach ogórka. Spadek plonu ogórka spowodowany przez *Psl* może sięgać nawet 60% (Kłosińska i wsp., 2014). Dane statystyczne wskazują, że średni wskaźnik zakażeń ogórka przez *Psl* w ostatnich latach wynosi 13% i wykazuje tendencję rosnącą. Choroba często przybiera charakter epidemii. Uznaje się, że przyczyną tego zjawiska mogą być zmiany klimatyczne, które sprzyjają wzrostowi częstości zachorowań roślin na choroby wywoływane przez mikroorganizmy patogeniczne. Duża wilgotność powietrza i uszkodzenia mechaniczne to tylko niektóre czynniki, które ułatwiają infekcję ogórka przez *Psl* i wystąpienie kanciastej plamistości liści. Choroba atakuje zarówno rośliny uprawiane na polach, jak i pod osłonami. Znaczne obniżenie plonowania wiąże się z ograniczeniem powierzchni asymilacyjnej porażonych liści. W uprawach dominują odmiany ogórka mało i średnio podatne na kanciastą plamistość liści, do których zalicza się również „Cezar” wykorzystywany w tej pracy. Brak odmian ogórka całkowicie odpornych na *Psl* (Kłosińska i wsp., 2014).

Zrozumienie mechanizmów odpowiedzi roślin na stres biotyczny jest konieczne w kontekście skuteczności klasycznej hodowli odpornościowej i hodowli molekularnej drogą transformacji roślin użytkowych (Rejeb i wsp., 2014). Jednym z priorytetowych celów producentów żywności jest co najmniej dwukrotny wzrost produkcji owoców i warzyw do roku 2050, przy zachowaniu niezmienionej powierzchni gruntów przeznaczonych pod uprawy. Z uwagi na postępujący wzrost liczby ludności na świecie, zmiany klimatu, wzrost szkodliwości oraz zmiany zasięgu występowania patogenów roślin, cel ten może okazać się trudny do osiągnięcia (Anioł i wsp., 2008).

Badania reakcji roślin na stresowe czynniki środowiska koncentrują się na interakcji roślin modelowych, np. *A. thaliana* i stresorów abiotycznych. Zdecydowanie mniej jest opracowań dotyczących reakcji roślin użytkowych na stres biotyczny i odnoszą się one najczęściej do odpowiedzi roślin na stres na poziomie komórek, tkanek lub organów. Wątek organellowo-specyficznych reakcji roślin na stres biotyczny poruszany jest w nielicznych opracowaniach (Kuźniak i Skłodowska, 2005). W niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia udziału chloroplastów i mitochondriów w regulacji profilu metabolicznego i enzymatycznego u ogórka siewnego po infekcji *Psl*. Organizm roślinny stanowi zintegrowaną całość.

Skuteczne reakcje na zmieniające się warunki środowiska wymagają sprawnej kooperacji między jego częściami, polegającej na wymianie sygnałów między miejscem percepcji bodźca środowiskowego, a organami rośliny, które nie były bezpośrednio narażone na jego działanie. W celu scharakteryzowania odpowiedzi na stres związany z zakażeniem *PsI* na poziomie lokalnym i systemicznym, analizy prowadzono na liściach zakażonych i tych nie mających bezpośredniego kontaktu z patogenem.

Podobnie jak w innych interakcjach roślina – patogen (Wijekoon i wsp., 2008; Matsunaga i wsp., 2017) wykazano, że wzrostowi pola powierzchni ognisk chorobowych na liściach ogórka zakażonych *PsI* towarzyszyła zmiana wyglądu i tekstury miejsc infekcji (Rys. 7A, B) związana z odwodnieniem tkanki i kurczeniem się liścia na skutek utraty turgoru (Wang i wsp., 2012). Przy zastosowaniu cyfrowej termografii w podczerwieni (DIT, ang. *Digital Infrared Thermography*), która może być wykorzystana do obrazowania wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych sprzężonych ze stopniem uwodnienia tkanek, wykazano, że rozwój objawów infekcji był powiązany ze zmianą stosunków wodnych w obszarach zmienionych chorobowo (Rys. 8C, D).

Rozwój patogena może prowadzić do zmian w transpiracji i zaburzenia stosunków wodnych. Wang i wsp. (2012) wykazali, że we wczesnych stadiach zakażenia liści ogórka przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (*Foc*) dochodziło do indukowanego przez ABA zamknięcia aparatów szparkowych zainfekowanych liści, co ograniczyło transpirację i utrudniło termoregulację. W konsekwencji następował wzrost temperatury liści w obszarach zmienionych chorobowo w porównaniu z miejscami nieobjętymi infekcją. Wzrost temperatury obszarów liści ogórka zmienionych chorobowo w wyniku infekcji *PsI* stwierdzony w niniejszej pracy w późnym stadium infekcji (T_7) mógł być zatem związany z postępującą nekrozą komórek, zaburzoną termoregulacją, zmniejszeniem konduktancji szparkowej i zahamowaniem transpiracji (Rys. 7B, 8D, 13). Podobną, negatywną korelację między intensywnością transpiracji, a temperaturą zainfekowanych organów stwierdzono w interakcjach ogórek – *Pseudoperonospora cubensis* (Lindenthal i wsp., 2005), soja – *Phytophthora sojae* (McDonald i Cahill, 1999) i tytoń – wirus mozaiki tytoniowej (TMV, ang. *Tobacco Mosaic Virus*) (Chaerle i wsp., 2001).

6.1. Rozkład temperatury radiacyjnej liści i wpływ infekcji na stan fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów

W początkowej fazie patogenezы u roślin dochodzi do podobnych procesów, jakie zachodzą w stanie nadmiaru energii wzbudzenia powodującym obniżenie sprawności PSII i PSI oraz uszkodzenia przenośników elektronów (Szechyńska-Hebda i Karpiński, 2013). Dodatkowo na sprawność fotosystemów mogą wpływać toksyny wydzielane zarówno przez patogeny, jak i przez roślinę – gospodarza (Rolfe i Scholes, 2010). Ekspozycja rośliny na

światło o dużym natężeniu wywołuje dynamiczne wysycenie centrów reakcji fotosystemów i utrzymywanie przenośników elektronów w formie zredukowanej. Prowadzi to do nagromadzenia nadmiaru energii wzbudzenia, która nie może być wykorzystana do przeprowadzenia reakcji fotochemicznych (Ruban, 2016). Wykazano, że w stanie nadmiaru energii wzbudzenia w chloroplastach powstaje specyficzny sygnał fotoelektrofizjologiczny. Wewnątrz- i zewnątrzkomórkowa transdukcja tego sygnału opiera się na propagacji fali RFT, zmianach NPQ i Q_Y , a także zmianach potencjału elektrycznego błon komórkowych i może prowadzić do uruchomienia mechanizmów kontroli procesów aklimatyzacji lub obrony przed stresem (Szechyńska-Hebda i wsp., 2010). W wielu badaniach wykorzystywano obrazowanie fluorescencji chlorofilu i pomiar jej parametrów jako sposób wykrywania infekcji jeszcze przed pojawieniem się objawów chorobowych. W badaniach nad interakcją *A. thaliana* – *Pst* wykorzystano wirulentne i awirulentne szczepy *Pst* w celu określenia różnic w czasie i zakresie reakcji gospodarza w zależności od szczepu patogena. Stwierdzono, że po 3 h od inokulacji makroskopowe objawy infekcji nie były zauważalne zarówno w przypadku patogena wirulentnego, jak i awirulentnego. Pierwsze symptomy choroby były dostrzegalne po inokulacji patogenem awirulentnym 24 h od inokulacji. Dopiero po 48 h od inokulacji *Pst* stwierdzono wystąpienie makroskopowych objawów infekcji patogenem wirulentnym. W przypadku obu szczepów *Pst* infekcja doprowadziła do spadku Q_Y w miejscu infekcji zanim objawy choroby stały się zauważalne. Stwierdzono, że obniżenie Q_Y było silniejsze i zaistniało wcześniej w liściach inokulowanych awirulentnym szczepem *Pst* oraz zależało od stężenia inokulum. Wykazano także, że na najwcześniejszych etapach interakcji z wirulentnym szczepem *Pst* dochodziło do przejściowego wzrostu NPQ (Bonfig i wsp., 2006). Uważa się, że wzrost NPQ jest charakterystycznym objawem występującym u roślin poddanych działaniu stresu. Może mieć to związek z zablokowaniem przepływu elektronów w łańcuchu fotosyntetycznym, co stymuluje NPQ jako mechanizm ochronny. W późniejszych stadiach infekcji dochodzi także do nieodwracalnego spadku Q_Y (Rolfe i Scholes, 2010). Inni autorzy wykazali obniżenie Q_Y w liściach fasoli zakażonej *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* (*Psg*) (Zou i wsp., 2005). W niniejszej pracy wykazano, że infekcja *Pst* prowadzi do przejściowego wzrostu NPQ oraz Q_P , a także przesuniętego w czasie obniżenia Q_Y . Początkowy wzrost NPQ w liściach Z3 mógł być związany z generowaniem nadmiaru energii wzbudzenia w wyniku rozwoju patogena i uruchomieniem mechanizmów obronnych w postaci jej rozpraszania na drodze niefotochemicznej. Stwierdzone zmiany NPQ w liściach piętra trzeciego miały jednak charakter przemijający i w późnej fazie infekcji nie stwierdzono różnic między Z3 i K3 w wartościach NPQ. W liściach Z5 NPQ nie było stymulowane (Rys. 9A). Epizodyczny wzrost Q_P w liściach Z3, który nie utrzymał się do późnej fazy patogenezы, ale miał wówczas swoje odzwierciedlenie w liściach Z5 świadczył o tym, że PSII nie był uszkodzony za sprawą infekcji, a część energii wzbudzenia mogła być w warunkach

stresu zagospodarowana do przeprowadzenia reakcji fotochemicznych (Rys. 9B). W innej pracy analiza wpływu kadmu na parametry fluorescencji chlorofilu u dwóch odmian kapusty białej wykazała, że u odmiany wczesnej dochodziło do obniżenia Q_P u roślin potraktowanych kadmem w porównaniu z kontrolą, natomiast u odmiany późnej stwierdzono nieznaczne podwyższenie Q_P u roślin, którym aplikowano kadm (Borek i wsp., 2013). Z kolei w badaniach nad interakcją *M. crystallinum* – *B. cinerea* nie stwierdzono wpływu infekcji na Q_P (Nosek i wsp., 2015). Dane te wskazują na zależność kierunku zmian Q_P zarówno od gatunku i odmiany rośliny, jak i rodzaju stresora. Natomiast za stwierdzone w niniejszej pracy obniżenie Q_Y w liściach Z3 w późnym stadium patogenezy mogła odpowiadać zmniejszona aktywność PSII, która świadczyła o wytworzeniu stanu nadmiaru energii wzbudzenia (Rys. 9C) (Foyer, 2018).

W początkowym stadium patogenezy reakcja na poziomie fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów obejmowała wzrost NPQ i Q_P . Postępujące w wyniku rozwoju objawów chorobowych zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej i transpiracyjnej liści Z3 (Chojak-Koźniewska i wsp., 2018) oraz zmiana stosunków wodnych w zakażonej tkance prowadziły do spadku Q_Y (T_5 , T_7), obniżenia konduktancji szparkowej (Rys. 13A), ograniczenia transpiracji (Rys. 13B) i zaburzenia wymiany gazowej. Modułacja reakcji fotochemicznych może być jednym z elementów regulacji procesów umożliwiających funkcjonowanie rośliny w warunkach środowiska zmienionych pod wpływem infekcji (Delprato i wsp., 2015).

Pomimo wielu badań, rola światła oraz znaczenie fotosyntezy w interakcji roślina – patogen wymaga dalszych wyjaśnień (Chandra-Shekara i wsp., 2006). Uznaje się, że chloroplasty stanowią ważne centrum regulujące reakcje roślin na stres. Sygnały pochodzenia chloroplastowego, które zapewniają aktywację reakcji obronnych roślin mogą być związane z aktywnością syntazy izochoryzmianu (ICS) odpowiedzialnej za powstawanie kwasu izochoryzmowego. Kwas izochoryzmowy jest prekursorem SA – ważnego induktora odporności roślin na patogeny biotroficzne i hemibiotroficzne. ICS zlokalizowana w chloroplastach bierze również udział w syntezie filochinonu – przenośnika elektronów znajdującego się po akceptorowej stronie PSI (Gawroński i wsp., 2013). Ponadto, w warunkach nadmiaru energii wzbudzenia i zaburzeń transportu elektronów w łańcuchu fotosyntetycznym, które towarzyszą patogenezie, dochodzi do przesunięcia równowagi między utlenioną i zredukowaną formą PQ. Uznaje się, że akumulacja zredukowanego PQ koreluje z uruchomieniem reakcji HR i indukcją genów obrony. Zmiany w puli PQ są źródłem sygnałów retrogradowych wysyłanych z chloroplastów (Nosek i wsp., 2015). Stan redoks PQ odgrywa w tych organellach funkcję zasadniczego czujnika redoks i na poziomie komórki uczestniczy w indukcji odpowiedzi na zmiany zachodzące w środowisku (Nowicka i wsp., 2009). Uważa się, że PQ działa jako główny przełącznik regulujący złożone reakcje na stan

nadmiaru energii wzbudzenia, takie jak zmiany równowagi między RFT i antyoksydantami, przewodnictwa szparkowego, równowagi metabolicznej i hormonalnej (Mühlenbock i wsp., 2008; Kangasjärvi i wsp., 2014). Poza tym stan redoks PQ reguluje proces fosforylacji anten energetycznych LHCII oraz białka D1 w PSII, a także moduluje ekspresję chloroplastowych genów kodujących podjednostki PSI oraz PSII i ekspresję jądrowych genów kodujących SOD oraz peroksydazy askorbinianowe APX1 i APX2 (Nowicka i wsp., 2009). Użycie inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów: DCMU i DBMIB pozwala symulować zmienne warunki oświetlenia. Podanie DCMU imituje efekt występujący podczas aklimatyzacji do obniżonego natężenia światła z powodu całkowitego utlenienia puli PQ, natomiast DBMIB symuluje efekt powstający w warunkach nadmiaru światła poprzez zablokowanie odpływu elektronów ze zredukowanego PQ na kompleks cytochromowy b_6/f . Zastosowanie DCMU i DBMIB pozwala zatem poznać udział stanu redoks PQ w regulacji różnych reakcji roślin na stres (Karpiński i wsp., 2013). W badaniach nad interakcją *M. crystallinum* – *B. cinerea* wykazano, że światło jest konieczne do wykształcenia odporności lokalnej typu HR, a DCMU promuje rozwój infekcji u roślin o metabolizmie fotosyntezy typu C_3 . Natomiast po aplikacji DBMIB stwierdzono, że wzorzec rozwoju infekcji był niezmienny i identyczny jak u roślin infekowanych bez uprzedniej aplikacji inhibitorów (Kuźniak i wsp., 2010; Nosek i wsp., 2015). W niniejszej pracy potwierdzono promujący wpływ DCMU na rozwój infekcji *PsI* u ogórka (roślina C_3). U roślin pretraktowanych DCMU objawy infekcji we wczesnym stadium patogenezy przypominały te stwierdzone dla roślin nietraktowanych inhibitorami w późnej fazie choroby (nekrozy otoczone chlorotycznymi obwódkami). Po potraktowaniu liści DBMIB, inaczej niż dla interakcji *M. crystallinum* – *B. cinerea* (Nosek i wsp., 2015), wykazano również odmienny wzór zmian wywołanych infekcją niż u roślin nietraktowanych tym inhibitorem, przypominający objawy zakażenia mniej wirulentnym szczepem patogena (Rys. 7).

Stosując inhibitory fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów wykazano, że w interakcji *M. crystallinum* – *B. cinerea* przyczyną spadku wartości Q_Y u roślin zakażonych po aplikacji DCMU nie był czynnik stresowy, tylko stan redoks PQ (Gabara i wsp., 2012). Wykazano także, że u roślin *M. crystallinum* infekowanych *B. cinerea* utrzymanie PQ w formie utlenionej (dzięki zastosowaniu DCMU) znacznie obniżało NPQ i Q_P , które odzwierciedla poziom energii wykorzystanej do przeprowadzenia reakcji fotochemicznych. Podobnych zależności nie zaobserwowano dla roślin traktowanych DBMIB (Nosek i wsp., 2015). Zredukowana forma PQ ma właściwości antyoksydacyjne, uczestniczy w wygaszaniu 1O_2 i $O_2^{\cdot-}$ oraz hamuje peroksydację lipidów i pełni rolę ochronną w stosunku do komponentów PSII w warunkach stresu świetlnego (Nowicka i wsp., 2009). Wykazane w niniejszej pracy obniżenie Q_Y na początku rozwoju infekcji w liściach Z3 pretraktowanych zarówno DCMU, jak i DBMIB wskazywało, że sygnał wysłany z PQ nie był dominujący

w kształtowaniu metabolizmu jasnej fazy fotosyntezy we wczesnej fazie patogenezы (Rys. 10C, F). Potwierdzono jednak, że odpowiedź rośliny na infekcję *PsI* była dwufazowa. Stan redoks PQ wpływał na poinfekcyjną sprawność PSII w późnym stadium choroby. Pretraktowanie DCMU wywołało wówczas obniżenie Q_Y w liściach Z3 w porównaniu z K3, co mogło być związane z obniżeniem zawartości chlorofilu (Rys. 10C, 11B) oraz przesunięciem równowagi PQ na korzyść formy utlenionej. Nadmiar utlenionej formy PQ sprzyjał gromadzeniu RFT, np. $O_2^{\cdot-}$ w chloroplastach. $O_2^{\cdot-}$ mógł utleniać komponenty PSII i powodować obniżenie Q_Y lub działać jako cząstka sygnałowa uruchamiając kaskadę sygnałów stresu biotycznego. Aplikacja DBMIB (przesunięcie równowagi PQ w kierunku formy zredukowanej) również wywołała poinfekcyjne obniżenie zawartości chlorofilu w T₇ w liściach piętra trzeciego (Rys. 11C). Mimo spadku NPQ oraz Q_P sygnał pochodzący z puli PQ prowadził wówczas do powstrzymania poinfekcyjnego obniżenia Q_Y w liściach Z3 w porównaniu z K3 (Rys. 10F). Zmiany w puli PQ w liściach Z3 w późnym stadium patogenezы mogły być sprzężone z obniżeniem aktywności APX i DHAR po aplikacji zarówno DCMU, jak i DBMIB w tych liściach. Obniżenie aktywności APX mogło sprzyjać podwyższeniu współczynnika redoks $[AA]_{tot}/[DHA]_{tot}$ i utrzymaniu AA w formie zredukowanej (Rys. 16A, B, E, F). Udział PQ w kształtowaniu NPQ i Q_P w liściach ogórka zainfekowanych *PsI* nie potwierdzał w całości wyników uzyskanych przez innych autorów. Stwierdzony na początku patogenezы wzrost NPQ w liściach Z3 pretraktowanych DCMU w porównaniu z K3, którym aplikowano ten inhibitor mógł być związany z uruchomieniem mechanizmów obronnych i wygaszaniem nadmiaru energii wzbudzenia na drodze niefotochemicznej z powodu wysycenia elektronami przonośników elektronów PSII o potencjale elektrochemicznym niższym niż posiada PQ (Rys. 10A). Natomiast za obniżenie NPQ i wzrost Q_P w późnym stadium infekcji w liściach Z3 pretraktowanych DCMU w porównaniu z odnośnymi K3 mógł odpowiadać sygnał niezależny od puli PQ (Rys. 10A, B). Z kolei spadek NPQ i Q_P w późnym stadium infekcji w liściach Z3 pretraktowanych DBMIB w porównaniu z liśćmi K3, którym aplikowano ten inhibitor można wytłumaczyć przesunięciem równowagi w puli PQ na korzyść formy zredukowanej i przejściem przez zredukowany PQ funkcji ochrony PSII przed namiarem energii wzbudzenia (Nowicka i wsp., 2009) (Rys. 10B, D). W pracy potwierdzono także, że zmiana stanu redoks PQ może być sygnałem regulującym nie tylko odpowiedź lokalną, ale również systemiczną. Wykazano, że na początku patogenezы w liściach Z5 pretraktowanych DCMU dochodzi do przejściowego zmniejszenia wartości Q_Y w porównaniu z K5, którym aplikowano DCMU. W dalszym przebiegu patogenezы nadmiernie utleniony PQ nie wpływał jednak na obniżenie Q_Y w liściach Z5 w porównaniu z K5. Stwierdzono również, że podobnie jak w liściach Z3, zastosowanie DCMU spowodowało obniżenie wartości NPQ w późnej fazie choroby w liściach Z5 w porównaniu z K5, co potwierdzało, że zmiany w puli PQ generowane po

potraktowaniu inhibitorem mogą mieć znaczenie sygnałne i pośredniczyć w przekazywaniu informacji o stresie również na poziomie systemicznym (Rys. 10).

6.2. Udział antyoksydantów w reakcjach na stres biotyczny

Antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne pełnią w komórce roślinnej istotną rolę w utrzymywaniu odpowiedniego poziomu RFT oraz właściwej homeostazy redoks. Uważa się, że zarówno zbyt niskie, jak i zbyt wysokie stężenie RFT nie jest korzystne dla komórki. RFT pozostające pod kontrolą systemu antyoksydacyjnego biorą udział w procesach wzrostu i rozwoju roślin, różnicowaniu komórek, powstawaniu i transmisji sygnałów stresu, a także działają toksycznie na patogeny i odpowiadają za mobilizację mechanizmów obronnych rośliny (Mittler, 2017). Spośród RFT generowanych po ataku patogena największe znaczenie przypisuje się $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . Ich stężenie, a pośrednio również funkcja, są kontrolowane przez systemy antyoksydacyjne, w tym SOD, CAT i APX (Hernández i wsp., 2001). Infekcja *PsI* wywołuje stres oksydacyjny (Grun i wsp., 2007). Wykazany w badaniach będących przedmiotem tej pracy wzrost aktywności SOD w liściach Z3 w porównaniu z K3 (Rys. 18A) mógł pełnić rolę ochronną i być związany z koniecznością usuwania $O_2^{\cdot-}$ generowanego w stanie stresu oksydacyjnego po ataku patogena. Co więcej mógł służyć akumulacji H_2O_2 – związku ważnego z punktu widzenia jego roli sygnalizacyjnej. Nie potwierdzono jednak podobnych zmian aktywności SOD we wczesnej fazie patogenezы w chloroplastach liści Z3 (Rys. 18B), co wskazuje, że dominujące znaczenie dla całkowitej aktywności SOD miały izoformy tego enzymu zlokalizowane w innych przedziałach komórkowych lub też, że mobilizacja ochrony antyoksydacyjnej chloroplastów nie była konieczna albo zapewniały ją inne mechanizmy. W badaniach odpowiedzi roślin z nadekspresją genów kodujących chloroplastowe izoformy SOD (FeSOD i CuZnSOD) wykazano, że ich odporność na stres oksydacyjny nie była istotnie wyższa od wykazanej dla roślin kontrolnych, np. u roślin *A. thaliana* traktowanych solami miedzi (II) o wysokim stężeniu (Pilon i wsp., 2011). Uważa się zatem, że chloroplastowe izoformy SOD nie są czynnikami gwarantującymi tolerancję na stres abiotyczny. W niniejszej pracy stwierdzono jednak, że w późnym stadium infekcji aktywność chloroplastowej SOD w liściach Z3 była wyższa w porównaniu z kontrolą, a za te zmiany mogły odpowiadać izoforma FeSOD oraz zwiększony poziom ekspresji genu kodującego chl-SOD (Rys. 18B, C, 19). Wyniki te świadczą o potrzebie usuwania nadmiaru $O_2^{\cdot-}$ w chloroplastach, gdy infekcja była zaawansowana.

Wykazano, że u roślin występują trzy klasy CAT: CAT klasy pierwszej są zlokalizowane w tkankach prowadzących fotosyntezę i odpowiedzialne są za usuwanie H_2O_2 powstającego podczas fotooddychania. CAT klasy drugiej działają w ksylemie i mogą odgrywać rolę w procesach lignifikacji. CAT klasy trzeciej są odpowiedzialne za usuwanie

H₂O₂ powstającego w cyklu glioksalanowym w glioksysomach podczas degradacji kwasów tłuszczowych w nasionach i u młodych roślin (Dat i wsp., 2001). Względnie duża wartość stałej Michaelisa (K_M) dla CAT: 20-25 mM H₂O₂ sprawia, że enzym ten nie ma dużego powinowactwa do swojego substratu i nie wykazano roli regulatorowej CAT w powstawaniu sygnałów zależnych od H₂O₂ u roślin (Sofo i wsp., 2015; Kuźniak i wsp., 2017). W niniejszej pracy stwierdzono dwufazową zmianę aktywności CAT w liściach Z3. W początkowym stadium infekcji stwierdzono zmniejszenie aktywności CAT w porównaniu z kontrolą, natomiast w stadium późnym – jej wzrost, i to zarówno w liściu piątego, jak i trzeciego, co mogło wynikać ze wzrostu poziomu względnej ekspresji genu cyt-CAT w liściach Z3 i Z5, a także ze wzrostu aktywności SOD w liściach Z3 (Rys. 14, 18A). W liściach Z3, w początkowym stadium patogenezy, mogła zatem istnieć konieczność utrzymania podwyższonego poziomu H₂O₂, który jest zaangażowany w reakcję HR, działa toksycznie na patogeny i uczestniczy w lignifikacji oraz sieciowaniu polimerów ścian komórkowych (Ros Barceló i Gómez Ros, 2009). W późnej fazie patogenezy istniała natomiast potrzeba usuwania nadmiaru H₂O₂ w celu ochrony przed jego toksycznym działaniem. Stwierdzone zmiany dla liści Z5 mogły wskazywać na udział CAT i SOD w regulacji stężenia RFT w liściach nie mających bezpośredniego kontaktu z patogenem i ich roli jako elementu sygnalizacji systemicznej. Kontrola stężenia O₂⁻ i H₂O₂, które są istotne z punktu widzenia przekazywania sygnału o infekcji, służyła regulacji ekspresji genów jądrowych zaangażowanych w powstawanie odpowiedzi roślin na stres (Foyer, 2018). W interakcji fasola – *P. syringae* pv *phaseolicola* (*Psp*) w liściach inokulowanych również dochodziło do zmniejszenia aktywności CAT w początkowym stadium patogenezy, co interpretowano jako konieczność utrzymania odpowiedniego poziomu H₂O₂ dla skutecznej reakcji HR (Ádám i wsp., 1995).

Jednym z najważniejszych elementów układu antyoksydacyjnego funkcjonującego w komórce roślinnej i odpowiedzialnego za kształtowanie jej równowagi redoks jest cykl AA-GSH (Foyer i Noctor, 2003). Zmiany zawartości AA i GSH oraz współczynników redoks [AA]/[DHA] i [GSH]/[GSSG] wywołane stresowymi czynnikami środowiska mogą być dla komórki sygnałami pełniącymi istotną rolę w regulacji szlaków metabolicznych i generowaniu reakcji dostosowawczych w odpowiedzi na stres (Noctor i Foyer, 2016). W kształtowaniu równowagi między zredukowaną i utlenioną formą AA i GSH biorą udział enzymy cyklu AA-GSH: APX, DHAR, MDHAR i GR oraz inne enzymy antyoksydacyjne, bezpośrednio niezwiązane z cyklem AA-GSH: AOX i GPX. AA jest utleniany na drodze enzymatycznej (przy udziale APX) lub nieenzymatycznej przez H₂O₂ do MDHA, który następnie utlenia się do DHA. Jednak rola AA w komórce roślinnej znacznie wykracza poza jego funkcję antyoksydacyjną (Kuźniak i wsp., 2017). W mitochondriach liści pomidora infekowanego *B. cinerea* obserwowano, że drugiego i trzeciego dnia patogenezy dochodziło do obniżenia

zawartości AA, natomiast od drugiego do piątego dnia poinfekcyjnemu obniżeniu ulegała także zawartość GSH. Zmiany te nie były jednak skorelowane ze zmianami zawartości DHA i GSSG, co mogło być spowodowane obniżeniem wydajności biosyntezy AA i aktywności enzymów odpowiedzialnych za regenerację AA i GSH (Kuźniak i Skłodowska, 2004b). Stwierdzone w niniejszej pracy: poinfekcyjny wzrost zawartości AA, spadek zawartości DHA oraz wzrost współczynnika redoks $[AA]_{tot}/[DHA]_{tot}$, a także obniżenie aktywności APX i wzrost aktywności DHAR w ekstrakcie całkowitym z liści trzeciego piętra służyły regeneracji AA i utrzymaniu jego funkcji antyoksydacyjnej. Akumulacji AA w późnej fazie rozwoju choroby w liściach Z3 mogło sprzyjać również obniżenie aktywności AOX, która jest głównym enzymem regulującym poziom AA w apoplacie. Podwyższenie aktywności AOX w liściach Z3 w porównaniu z K3 we wczesnej fazie patogenezы i jej obniżenie w fazie późnej mogło zatem służyć utrzymaniu odpowiedniego stężenia RFT w apoplacie w poszczególnych stadiach rozwoju choroby, co miało znaczenie dla penetracji i wzrostu patogena w apoplacie, powstawania odpowiednich sygnałów zależnych od RFT lub wpływało na skuteczność ochrony antyoksydacyjnej (Rys. 20). Przesunięciu równowagi między AA i MDHA na korzyść AA w późnej fazie patogenezы w liściach Z3 mógł również sprzyjać obserwowany w nich wzrost aktywności MDHAR. Obniżona aktywność APX sprzyjała utrzymaniu równowagi między AA i MDHA/DHA przesuniętej w kierunku AA biorącego udział w przekazywaniu sygnałów stresu. Podobne zmiany stwierdzono również dla AA i APX w liściach piętra piątego, w których dochodziło do poinfekcyjnego wzrostu poziomu AA (T_7) i obniżenia aktywności APX (T_5 , T_7), co świadczyło o uruchomieniu podobnych mechanizmów regulacyjnych zależnych od AA w organach nie mających bezpośredniego kontaktu z patogenem (liście systemiczne) (Rys. 15A-C, 21A, Tab. 5). W warunkach stresu zmiany zawartości GSH mogą być podobne lub przeciwne do zmian zawartości AA (Dempsey i wsp., 2012; Simon i wsp., 2013). Wskazuje się, że GSH jest antyoksydantem zintegrowanym na poziomie molekularnym i metabolicznym z SA podczas regulacji odpowiedzi roślin na stan nadmiaru energii wzbudzenia (Karpiński i Szechyńska-Hebda, 2012). Dowiedzono również, że GSH uczestniczy jako cząsteczka sygnalizacyjna w szlaku sygnalizacji stresu biotycznego z udziałem białka NPR1, zależnego od SA. W obliczu stresu, gdy gromadzony jest SA, dochodzi do redukcji siarki w wiązaniach disiarczkowych oligomeru NPR1 przy udziale GSH. W wyniku tego NPR1 dysocjuje na monomery, które ulegają translokacji do jądra komórkowego działając tam jako czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów stresu (Mou i wsp., 2003). Wykazano, że transgeniczna odmiana tytoniu o wyższej zawartości GSH charakteryzuje się także podwyższonym stężeniem SA i zwiększonym poziomem ekspresji genów pozostających pod kontrolą zależnych od NPR1 szlaków sygnalizacyjnych, w których uczestniczy SA. Jednocześnie nie stwierdzono zmian w poziomie ekspresji genu kodującego GST, który nie jest kontrolowany przez NPR1.

U opisanej odmiany tytoniu stwierdzono podwyższoną odporność na *P. syringae* (biotrof) i niską odporność na *B. cinerea* (nekrotrof) (Ghanta i wsp., 2011). Zróżnicowany udział AA i GSH w odporności na *P. syringae* wykazano również u pomidora. Porównanie profilu zmian w puli obu antyoksydantów i aktywności metabolizujących je enzymów u odmiany odpornej i wrażliwej na *P. syringae* wykazało, że GSH i GST są ważnymi elementami odporności na *P. syringae* (Kuźniak i Skłodowska, 2004a). Wykazane w niniejszej pracy podwyższenie stężenia GSH w liściach Z3, które towarzyszyło wzrostowi zawartości AA w tych liściach w późnym stadium patogenezy mogło być sprzężone z enzymatyczną redukcją GSSG do GSH przez GR, dla której w liściach Z3 potwierdzono podwyższenie aktywności w T₂, T₅ i T₇. Po przejściowym spadku zawartości GSSG i wzroście współczynnika redoks $[GSH]_{tot}/[GSSG]_{tot}$ w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą, w późnym stadium patogenezy stwierdzono w tych liściach wzrost poziomu GSSG w porównaniu z K3, co mogło świadczyć o zużywaniu GSH w innych procesach, np. związanych z generowaniem reakcji odpornościowych i nieadekwatnej aktywności GR, która nie była wystarczająca do utrzymania GSH w stanie zredukowanym. Potwierdzało to obniżenie współczynnika redoks $[GSH]_{tot}/[GSSG]_{tot}$ w liściach Z3 w porównaniu z liśćmi K3 w T₅ i T₇. Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy świadczą również o udziale GSH w dostosowaniu rośliny do stresu na poziomie systemicznym i uruchomieniu w późnym stadium patogenezy podobnych jak w liściach Z3 mechanizmów regulacyjnych w liściach Z5. Stwierdzono w nich wzrost aktywności GR w porównaniu z K5, obniżenie zawartości GSSG i wzrost współczynnika redoks $[GSH]_{tot}/[GSSG]_{tot}$, co świadczyło o intensyfikacji regeneracji GSH potrzebnego do usuwania RFT, detoksykacji przy udziale GST, sygnalizacji i reakcji obronnych (Rys. 15D, 21B, Tab. 5).

GSH i AA mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów, których źródłem są chloroplasty. Sygnały te prowadzą do zmian w ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w reakcjach odpowiedzi na stres (Blanco i wsp., 2014). Wykazany w niniejszej pracy większy udział AA w całkowitej puli askorbinianu w początkowym stadium patogenezy oraz GSH w stosunku do GSSG w stadium późnym w chloroplastach liści Z3 w porównaniu z kontrolą (Rys. 21C, D, Tab. 5) potwierdził opisane wyżej koncepcje o synchronicznej interakcji AA i GSH oraz o możliwym uzupełnianiu deficytu jednego antyoksydantu innym. Za podwyższony poziom AA we wczesnej fazie patogenezy w chloroplastach liści Z3 mogła odpowiadać obniżona aktywność chloroplastowej APX, co potwierdzało koncepcję o roli antyoksydacyjnej APX i pośredniczeniu tego enzymu w przekazywaniu sygnałów redoks zależnych od AA, wyzwalanych w chloroplastach (Karpiński i wsp., 2013). Natomiast brak poinfekcyjnych zmian w puli AA w chloroplastach Z3 w późnej fazie patogenezy mógł wynikać ze wzrostu aktywności zarówno chloroplastowej APX, jak i DHAR. Z kolei za zmiany w puli chloroplastowej frakcji glutationu mogła odpowiadać zwiększona aktywność

chloroplastowej GR w późnym stadium infekcji (Rys. 15E, F, H). Poinfekcyjna aktywność GR w chloroplastach liści Z3 mogła być regulowana na poziomie transkrypcji, ponieważ w T₂ i T₇, w liściach Z3 wykazano wzrost względnego poziomu ekspresji genu kodującego chl-GR w porównaniu z kontrolą (Rys. 17B). Opisane przesunięcia chloroplastowej równowagi redoks zależnej od AA i GSH mogą świadczyć o konieczności obrony antyoksydacyjnej chloroplastów w obliczu infekcji oraz o powstawaniu sygnałów stresu biotycznego w chloroplastach, które pochodzą od AA i GSH. Stwierdzony w późnym stadium patogenezы w chloroplastach liści Z5 wzrost aktywności DHAR i wartości współczynnika redoks $[AA]_{chl}/[DHA]_{chl}$ w porównaniu z K5 mógł również służyć utrzymaniu AA w chloroplastach liści Z5 w stanie zredukowanym i ich ochronie antyoksydacyjnej oraz mieć znaczenie w uruchamianiu reakcji dostosowawczych do stresu, w których uczestniczy AA (Rys. 15F, Tab. 5). Dwufazowa zmiana wartości współczynnika redoks $[GSH]_{chl}/[GSSG]_{chl}$ w chloroplastach liści Z5 w porównaniu z K5 – najpierw jego obniżenie, a później wzrost, mogła mieć związek ze wzrostem aktywności GR w chloroplastach liści Z5 jedynie w ostatnim dniu analiz i służyć uruchomieniu zależnych od GSH reakcji systemicznych w chloroplastach w odpowiedzi na atak patogena (Rys. 15H, Tab. 5). Natomiast stwierdzone obniżenie aktywności GR w T₅ w chloroplastach liści Z5 w porównaniu z K5 mogło wynikać z wcześniejszego obniżenia poziomu ekspresji genu kodującego chl-GR w liściach Z5 (Rys. 15H, 17B).

W ochronie przed stresem oksydacyjnym biorą udział również inne antyoksydanty, np. tokoferole. Ze względu na swój hydrofobowy charakter są one głównymi antyoksydantami błon komórkowych. α -tokoferol wspomaga AA w usuwaniu RFT we frakcji błonowej komórki (Niki, 1987). Wskazuje się również na funkcję fotoprotekcyjną α -tokoferolu. Powstawanie formy utlenionej α -tokoferolu (forma chinonowa) promuje cykliczną fosforylację, co stanowi element mechanizmów fotoprotekcyjnych (Munné-Bosch i Alegre, 2002). Uznaje się również, że rozpraszanie nadmiaru energii wzbudzenia na drodze niefotochemicznej i wzrost NPQ w warunkach stresu wiąże się najczęściej z intensyfikacją cyklu ksantofilowego wywołaną stymulacją enzymów zaangażowanych w ten cykl przez tokoferole. Wykazano, że u mutantów *A. thaliana* pozbawionych mechanizmów skutecznego rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia z powodu zablokowanego cyklu ksantofilowego dochodziło do akumulacji α -tokoferolu w warunkach intensywnego oświetlenia (Golan i wsp., 2006). Dowiedziono także, że wzrost zawartości tokoferoli stymuluje metabolizm węglowodanów, kształtuje relacje donor – akceptor i indukuje procesy wzrostu roślin (Sattler i wsp., 2003). W niniejszej pracy wykazano, że w początkowym stadium patogenezы (T₂), kiedy mogły być akumulowane RFT, w liściach Z3 dochodziło również do wzrostu zawartości α , γ i δ -tokoferolu w porównaniu z K3, co mogło sprzyjać ochronie antyoksydacyjnej

w liściach zakażonych i wspomagać w nich mechanizmy wygaszania nadmiaru energii wzbudzenia na drodze nefotochemicznej (Tab. 7).

Jak wspomniano wcześniej, równowaga między RFT i antyoksydantami może być regulowana przez stan redoks PQ. W interakcji *M. crystallinum* – *B. cinerea* wykazano, że zarówno zablokowanie strony akceptorowej (przez DCMU), jak i donorowej (przez DBMIB) PQ wywoływało obniżenie aktywności CAT u *M. crystallinum*. Ponadto stwierdzono, że u *M. crystallinum* po infekcji *B. cinerea* i pretraktowaniu DBMIB wykształca się specyficzny wzorzec sekwencji zmian aktywności CAT: po początkowym obniżeniu (3 h po inokulacji) następował wzrost aktywności CAT (24 h po inokulacji), a następnie (48 h po inokulacji) ponowny spadek aktywności tego enzymu (Nosek i wsp., 2015). W niniejszej pracy pretraktowanie DCMU i przesunięcie równowagi PQ na korzyść formy utlenionej nie wpłynęło na trend poinfekcyjnych zmian aktywności APX w liściach piętra trzeciego. Sygnał pochodzący od PQ po aplikacji DCMU odwrócił jednak zależność między liśćmi Z3 i K3 w aktywności DHAR w późnym stadium patogenezy. We wczesnej fazie rozwoju infekcji poinfekcyjne podwyższenie aktywności DHAR w liściach piętra trzeciego miało miejsce wcześniej niż w liściach nietraktowanych inhibitorem. Mogło to służyć utrzymaniu AA w formie zredukowanej i obronie antyoksydacyjnej uruchamianej sygnałem od PQ. W późnym stadium patogenezy nie potwierdzono zależnych od PQ mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, w której mógłby uczestniczyć AA. Brak poinfekcyjnych zmian aktywności APX i DHAR, zwłaszcza w początkowym stadium patogenezy w liściach piętra piątego pretraktowanych DCMU wskazywał natomiast na tłumienie obrony antyoksydacyjnej zależnej od AA w obecności inhibitora. Przesunięcie równowagi w kierunku formy utlenionej PQ niwelowało także wpływ infekcji na aktywność MDHAR i GR w liściach obu pięter (Rys. 16A-D). Pretraktowanie DBMIB wywołało utrzymujący się do późnego stadium patogenezy stan obniżonej aktywności APX w liściach Z3 w porównaniu z K3, który w liściach nietraktowanych DBMIB był stwierdzony wyłącznie w fazie wczesnej. Zmiany w aktywności APX po aplikacji DBMIB mogły sprzyjać utrzymaniu AA w formie zredukowanej w liściach Z3 dłużej niż miało to miejsce w liściach nietraktowanych inhibitorem. Przesunięcie równowagi PQ na korzyść formy zredukowanej tłumilo jednak wpływ infekcji na aktywność APX w liściach Z5, jak również wywołało zrównoważenie aktywności DHAR, MDHAR i GR w liściach kontrolnych i zakażonych zarówno w przypadku liści piętra trzeciego, jak i piątego. Podsumowując, zmiany w puli PQ regulowały (najczęściej przez APX i DHAR) poziom AA w liściach Z3 i nie wpływały na ochronę antyoksydacyjną zależną od AA w liściach, które nie miały bezpośredniego kontaktu z patogenem. Przesunięcie równowagi między zredukowanym i utlenionym PQ nie modulowało stężenia GSH, co mogło wskazywać, że sygnał pochodzący od PQ nie brał udziału w zależnej od GSH odpowiedzi ogórka na stres wywołany przez *PsI* (Rys. 16E-H).

6.3. Regulacja metaboliczna w odpowiedzi roślin na stres biotyczny

Odpowiedź roślin na stres jest zawsze związana z przeprogramowaniem reakcji metabolicznych sprzężonych z koniecznością utrzymania dynamicznej równowagi między procesami wzrostu i zaopatrzeniem szlaków zaangażowanych w aklimatyzację roślin do stresu lub aktywację odpowiedzi obronnych na patogeny (Pinheiro i Chaves, 2011).

We wstępnej fazie kontaktu rośliny z patogenem stwierdza się wiele charakterystycznych reakcji fizjologicznych, które mogą być pośrednio związane ze zmianą stosunków wodnych w komórce roślinnej, jak ograniczona przewodność szparkowa i intensywność transpiracji. W takim stanie występuje utrudniona wymiana gazowa, co może przyczyniać się, poza innymi czynnikami, do obniżenia wydajności fotosyntezy netto (Bhagat i wsp., 2014). W niniejszym opracowaniu wykazano, że w T₇ liście Z3 odznaczały się mniejszym przewodnictwem szparkowym i intensywnością transpiracji w porównaniu z kontrolą, co mogło być związane z mechanicznym uszkodzeniem tkanki, a także regulacją zamykania aparatów szparkowych przez endogenne ABA (Bright i wsp., 2006). W tym samym punkcie czasowym stwierdzono także obniżoną wydajność netto fotosyntezy i nieznacznie obniżone stężenie międzykomórkowego CO₂ w liściach Z3 w porównaniu z K3 (Rys. 12A, B, 13). Natomiast już od T₂ stwierdzono wzrost intensywności oddychania w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą, co mogło wynikać z rearanżacji metabolizmu podstawowego i przesunięcia równowagi między fotosyntezą i oddychaniem na korzyść oddychania mitochondrialnego. Miało to na celu zapewnienie dopływu energii z utleniania biologicznego potrzebnej do uruchomienia mechanizmów obronnych związanych np. z biosyntezą metabolitów wtórnych uczestniczących w odpowiedzi na stres.

Reakcje ciemnej fazy fotosyntezy u roślin o typie metabolicznym C₃ rozpoczyna wiązanie CO₂ przez RuBisCO. U roślin C₄/CAM, które są uznawane za bardziej odporne na stres środowiskowy od roślin C₃, wiązanie CO₂ i dekarboksylację L-MA prowadzą odpowiednio PEPC i chloroplastowa dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca zależna od NADP⁺ (enzym jabłczanowy, NADP-ME). Wskazuje się, że PEPC i NADP-ME pełnią u roślin C₃ ważne funkcje podczas stresu środowiskowego. Są zaangażowane w wytwarzanie NADPH, który jest potrzebny jako reduktor w wielu szlakach metabolicznych, np. syntezy metabolitów wtórnych spełniających funkcje obronne (Kuźniak i wsp., 2010; Hýskova i Ryslava, 2013; Corpas i Barroso, 2014). W warunkach stresu istotną rolę w regulacji aktywności enzymów, w tym zaangażowanych w cykl Calvina-Bensona, pełnią Trx. Uczestniczą one w odwracalnych reakcjach redoks, w których redukowane są atomy siarki w wiązaniach disiarczkowych enzymów, co modyfikuje ich aktywność. Modyfikacja aktywności enzymatycznej przez Trx stanowi uniwersalny mechanizm regulacyjny, który jest szczególnie ważny podczas stresu, gdy stanowi źródło sygnałów uruchamiających

adekwatne reakcje rośliny na dany czynnik stresowy (Tovar-Méndez i wsp., 2011). W niniejszej pracy wykazano, że we wczesnej fazie patogenezы poziom ekspresji genu kodującego RuBisCO_{lu} był niższy w liściach Z3 niż w K3. Mogło to być związane z koniecznością przeprogramowania metabolizmu na korzyść oddychania, co również wykazano w pracy, ale także z ograniczoną dostępnością CO₂ dla RuBisCO. Podwyższony poziom ekspresji genu kodującego TrxM3 w liściach Z3 w porównaniu z K3 mógł natomiast wskazywać na uruchomienie mechanizmów regulacji aktywności enzymów (np. z cyklu Calvin-Bensona i antyoksydacyjnych) przez Trx (Rys. 29A, D).

Przy zamkniętych aparatach szparkowych dopływ CO₂ do komórek jest ograniczony. W takich warunkach metabolizm roślin C₃ przypomina metabolizm C₄/CAM, a w wiązaniu CO₂ bierze udział PEPC. Stała Michaelisa dla PEPC jest mniejsza niż dla RuBisCO i dlatego PEPC odznacza się większym powinowactwem do CO₂. Wskazuje się, że im mniejsza aktywność RuBisCO, tym większa aktywność PEPC (Doubnerová i Ryšlavá, 2011). W warunkach ograniczonej podaży CO₂ aktywność RuBisCO obniża się, zahamowany jest cykl Calvin-Bensona i stymulowana jest aktywność PEPC. Może wówczas dochodzić do transferu siły asymilacyjnej w postaci NADPH z chloroplastów do cytozolu. Z tego względu PEPC uważany jest za ważny enzym podtrzymujący sprawność fotosyntezy i wspierający reakcje obronne u roślin C₃ (Doubnerová i Ryšlavá, 2011). Uznaje się, że PEPC może zasilać cykl Krebsa w L-MA dzięki stymulacji jego syntezy. Intensyfikacja cyklu Krebsa prowadzi z kolei do akumulacji NADPH, który bierze udział w dezaktywacji RFT z pośrednictwem enzymów antyoksydacyjnych (MDHAR, GR) oraz biosyntezie metabolitów wtórnych takich jak związki fenolowe i fitoaleksyny, ważnych z punktu widzenia reakcji obronnych (Chojak-Koźniewska i wsp., 2018). Stwierdzony w niniejszej pracy poinfekcyjny wzrost poziomu ekspresji genu kodującego PEPC w liściach Z3 w porównaniu z K3 mógł prowadzić do intensyfikacji karboksylacji fosfoenolopirogronianu przy ograniczonym dostępie do CO₂ spowodowanym obniżoną przewodnością szparkową i ograniczoną wymianą gazową, a także służyć poinfekcyjnej akumulacji L-MA zarówno w liściach Z3, jak i Z5 (Rys. 27A, 29B).

3PGAD katalizuje reakcję utlenienia aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-bisfosfoglicerynianu podczas glikolizy oraz reakcję odwrotną w fazie redukcji cyklu Calvin-Bensona. Wykazany w późnej fazie patogenezы wzrost poziomu ekspresji genu kodującego 3PGAD w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą mógł stanowić w warunkach ograniczonej intensywności fotosyntezy element procesu intensyfikacji glikolizy z powodu utleniania aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-bisfosfoglicerynianu. Intensyfikacja glikolizy mogła służyć dostarczeniu energii w postaci ATP i siły redukującej w formie NADH do reakcji metabolizmu podstawowego (fotosynteza, oddychanie) i wtórnego oraz sprzyjała akumulacji pirogronianu, który mógł być kierowany do cyklu Krebsa (Rys. 29C). Stwierdzony w niniejszej

pracy wzrost poziomu ekspresji genów kodujących RuBisCO_{lu} oraz PEPC w liściach Z5 w porównaniu z K5 mógł służyć utrzymaniu intensywności fotosyntezy i karboksylacji fosfoenolopirogronianu w celu zapewnienia podaży energii i metabolitów w liściu, który nie był w pełni rozwinięty na wypadek przerwania transportu asymilatów z liścia Z3 (Rys. 29A, B). Poinfekcyjne zmiany poziomu ekspresji wyżej wymienionych genów w liściach piętra piątego stanowiły również przejaw dostosowania metabolicznego. W liściu systemicznym wzbudzony został specyficzny stan metaboliczny wskazujący na jego dostosowanie do warunków środowiska zmienionych pod wpływem infekcji. Stan ten charakteryzuje się optymalizacją najważniejszych szlaków metabolicznych dostarczających energii i siły redukującej: fotosyntezy i oddychania mitochondrialnego.

Zmiany stężenia cukrów wpływają na wiele procesów metabolicznych i wzrost roślin. Cukry stanowią dla komórki źródło energii i jako cząsteczki sygnałowe odpowiadają za fizjologiczną regulację metabolizmu w warunkach „prawidłowych” i w stresie. Uznaje się, że przy wysokim stężeniu cukrów takich jak D-glukoza, D-fruktoza i sacharoza hamowana jest aktywność RuBisCO i innych enzymów cyklu Calvina-Bensona, co określa się jako represję metaboliczną (Ciereszko, 2002). Wykazano, że D-glukoza aplikowana dolistnie lub dodawana do pożywki z kulturami tkankowymi/protoplastami powodowała represję metaboliczną wielu genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm fotosyntezy, np. *cab* (ang. *chlorophyll a/b-binding protein*), *rbcS*, *rbcL* (ang. *ribulose biphosphate carboxylase Small, Large unit*) (Koch, 1996). Glukoza jako substrat glikolizy ulega reakcji fosforylacji, którą katalizuje HK. Pochodne glukozy, takie jak 3-O-metyloglukoza i 6-deoksyglukoza nie ulegają fosforylacji przez HK i nie obserwowano obniżenia poziomu transkryptów wyżej wymienionych genów po aplikacji tych pochodnych (Jang i Scheen, 1997). Z kolei działanie represyjne na ekspresję niektórych genów fotosyntezy wykazuje diastereoizomer D-glukozy, D-mannoza oraz 2-deoksyglukoza, które ulegają fosforylacji przez HK, ale nie są metabolizowane i gromadzą się w cytozolu (Ciereszko, 2002). Z tego względu zmiany zawartości glukozy, jej izomerów i pochodnych, jak również zmiany aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm glukozy mogą świadczyć o uruchamianiu sygnałów metabolicznych zależnych od cukrów w regulacji odpowiedzi roślin na stres. Stwierdzone w niniejszej pracy poinfekcyjne obniżenie zawartości D-glukozy w liściach Z3 w porównaniu z K3 było zbieżne ze wzrostem zawartości D-fruktozy oraz obniżeniem zawartości sacharozy w tych liściach (Rys. 23). Wzrost zawartości D-fruktozy mógł być sprzężony ze zmianami zawartości sacharozy, która ulega reakcji hydrolizy dając D-glukozę i D-fruktozę. Poinfekcyjne obniżenie zawartości sacharozy w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą mogło wynikać z jej hydrolizy katalizowanej przez inwertazę zasadową oraz transportu z liścia Z3 (donor) do liścia Z5 (akceptor). Wykazany w niniejszej pracy wzrost poziomu transkrypcji genu kodującego inwertazę zasadową w liściach Z3

w porównaniu z kontrolą (Rys. 25) mógł wpływać na zwiększoną aktywność tego enzymu i być pośrednią przyczyną poinfekcyjnego obniżenia puli sacharozy w tych liściach. Opisane w pracy obniżenie poziomu ekspresji genu kodującego inwertazę kwaśną i podwyższenie poziomu ekspresji genu inwertazy zasadowej w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą nie potwierdziły jednak wyników uzyskanych przez innych autorów, którzy wykazali wzrost aktywności inwertazy kwaśnej lub zgodną stymulację aktywności zarówno inwertazy kwaśnej, jak i zasadowej po infekcji. Wzrost aktywności CWInv wykazano u papryki po infekcji *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Sonnewald i wsp., 2012). Natomiast u pszenicy stwierdzono wzrost aktywności CWInv, VInv, AInv i NInv po infekcji *Blumeria graminis* (Sutton i wsp., 2007). Uznaje się, że inwertaza zasadowa działająca w cytozolu jest specyficzna dla sacharozy, a inwertaza kwaśna działa na oligosacharydy, w których cząsteczkach również obecna jest reszta fruktozy. Aktywność inwertaz może zapewnić podaż do miejsc zakażonych cukrów prostych, stanowiących źródło węgla dla patogena (Skłodowska i wsp., 2015). Wykazane w pracy w późnej fazie patogenezы obniżenie zawartości sacharozy w liściach Z3 w porównaniu z K3 i wzrost zawartości D-fruktozy w tych liściach potwierdzały tę koncepcję. Natomiast jednoczesne obniżenie stężenia D-glukozy mogło wynikać z jej wykorzystania np. w reakcjach fosforylacji do G6P lub zużycia jako źródło węgla i energii przez patogen (Rys. 23). W niniejszej pracy stwierdzono ponadto, że w T₅ zawartość sacharozy w liściach Z5 była wyższa w porównaniu z K5, co mogło świadczyć o jej wycofywaniu z liści piętra trzeciego po zakażeniu i transporcie do liści młodszych (Rys. 23C). Pulę D-glukozy kształtują procesy biosyntezy i tworzenia pochodnych (Bezruczyk i wsp., 2018). Pochodne D-glukozy, które powstają na drodze fosforylacji D-glukozy lub jej sprzęgania z innymi związkami mogą pełnić funkcje sygnałowe podczas stresu. Przykładem takiego metabolitu jest G6P (substrat szlaku pentozofosforanowego i produkt przejściowy glikolizy), którego obrót metaboliczny jest zależny od aktywności HK i G6PDH. G6PDH jest enzymem limitującym aktywność szlaku pentozofosforanowego, ponieważ od aktywności tego enzymu zależy poziom NADPH będącego produktem wspomnianego szlaku. Plastydowa G6PDH może być stymulowana przez niski współczynnik redoks [NADPH]/[NADP⁺] na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego: w przypadku dużego zapotrzebowania na NADPH do reakcji obronnych indukowana jest aktywność G6PDH (Berg i wsp., 2007). Z kolei cytozolowa G6PDH jest stymulowana przez wysoki poziom cukrów. Wykazano także, że G6PDH jest hamowana na świetle przez układ ferredoksyna-Trx (Elhefny i wsp., 2011). Stwierdzony w pracy wzrost zawartości G6P w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą mógł być związany ze wzrostem poziomu ekspresji genu kodującego HK w liściach Z3 i mógł stymulować ekspresję genu kodującego G6PDH w tych liściach, dla której potwierdzono także wzrost aktywności. Poinfekcyjne zmiany zawartości G6P w T₇ w liściach Z5 odzwierciedlały te, które opisano dla liści Z3 we

wcześniejszych etapach infekcji. Wzrost poziomu G6P w liściach Z5 w porównaniu z K5 w późnym stadium patogenezy (T_7) mógł świadczyć o przekazywaniu sygnału stresu biotycznego zależnego od D-glukozy do jądra komórkowego na poziomie nie tylko lokalnym, ale i systemicznym. Stwierdzone zmiany zawartości G6P mogły również stymulować G6PDH w liściach Z5, dla której w T_7 stwierdzono wzrost aktywności (Rys. 26).

Wskazuje się, że w reakcjach roślin na stres mogą brać udział również alkohole polihydroksylowe (np. inozytyle) i cukry takie jak trehaloza i rafinoza. Metabolity te pełnią rolę osmoprotektantów, uczestniczą w koordynacji metabolizmu, procesach wzrostu i rozwoju roślin, a także działają jako cząsteczki sygnałowe. Trehaloza i rafinoza jako cukry transportowe są przekazywane od donora do akceptora (Ciereszko, 2002; Ramon i Rolland, 2007). W pracy wykazano, że w T_2 i T_7 dochodziło do wzrostu zawartości mio-inozytolu w liściach Z3 w porównaniu z K3 oraz do akumulacji trehalozy i rafinozy zarówno w liściach Z3, jak i Z5 w porównaniu odpowiednio z K3 i K5, co mogło sprzyjać indukcji reakcji obronnych na stres. Trehaloza i rafinoza w liściach Z3 nie były wykorzystywane przez patogen jako źródło węgla, a wzrost ich zawartości w tych liściach mógł mieć znaczenie w sygnalizacji stresu. Z kolei akumulacja tych cukrów w liściach Z5 mogła wynikać z ich transportu z liści starszych (Tab. 7). Infekcja jest silnym promotorem procesu starzenia się (Häffner i wsp., 2015), a transport sacharozy z liści Z3 do liści Z5 mógł być jego przejawem. Hipotezę tę potwierdziła również stwierdzona w liściach Z3 zależność charakterystyczna dla procesu starzenia się: podwyższenie intensywności oddychania z powodu mobilizacji lipidów jako substratów oddechowych jest sprzężone z obniżeniem stężenia substratów dostarczanych przez fotosyntezę (Simeonova i Mostowska, 2001).

Zmiany stanu redoks PQ podczas infekcji mogą mieć znaczenie dla metabolizmu ciemnej fazy fotosyntezy i w konsekwencji dla równowagi metabolicznej zależnej np. od cukrów. W pracy stwierdzono, że zmiany w puli D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy stwierdzone po infekcji nie zachodziły, gdy rośliny traktowano DCMU (równowaga PQ przesunięta w kierunku formy utlenionej). Mogło być to związane z zahamowaniem produkcji metabolitów pierwotnych fotosyntezy z powodu zaburzonego transportu elektronów zarówno u roślin kontrolnych, jak i zakażonych. U roślin pertraktowanych DBMIB wykazano, że przesunięcie równowagi na korzyść formy zredukowanej PQ opóźnia reakcję lokalną i systemiczną pod względem poinfekcyjnych zmian w puli cukrów. Podobne relacje między liśćmi K3/Z3 i K5/Z5, jakie stwierdzono u roślin nietraktowanych DBMIB, wykazano u roślin potraktowanych inhibitorem dopiero od T_5 (D-glukoza) i w T_7 (D-fruktoza). Nie stwierdzono również poinfekcyjnych zmian w puli sacharozy zarówno w liściach piętra trzeciego, jak i piątego pretraktowanych DBMIB. Jak wspomniano wcześniej, cukry proste stanowią źródło węgla dla patogenów, a di- oraz oligosacharydy mogą być prekursorami tych cukrów. Obniżenie zawartości D-glukozy, D-fruktozy i sacharozy w późnym stadium patogenezy

w liściach Z3 pretraktowanych inhibitorami fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów w porównaniu do liści Z3 u roślin, którym nie aplikowano DCMU i DBMIB mogło tłumaczyć słabszy rozwój plam nekrotycznych na liściach potraktowanych inhibitorami w porównaniu z liśćmi, które nie były nimi traktowane (Rys. 23, 24).

Szczególnie istotną rolę w reakcjach biosyntezy metabolitów ważnych dla obrony roślin przed stresem pełnią dinukleotydy nikotynoamidoadeninowe: NADPH i NADH. Dinukleotydy te są wykorzystywane jako kofaktory przez ponad 500 enzymów w katalizie reakcji redoks zachodzących w komórce roślinnej. Z tego powodu NADPH i NADH pełnią ważną funkcję w regulacji metabolizmu. Enzymy wykorzystujące NADP(H) biorą udział w takich szlakach metabolicznych jak: cykl Calvina-Bensona, cykl Krebsa i glikoliza. Dinukleotydy NAD(P)H uczestniczą także w reakcjach biosyntezy metabolitów wtórnych, procesach ich degradacji oraz są zaangażowane w regulację stężenia RFT ([Kasimova i wsp., 2006](#)). Najważniejszymi źródłami NADH w komórce roślinnej są: szlak glikolizy oraz cykl Krebsa, natomiast NADPH powstaje jako produkt netto szlaku pentozofosforanowego oraz podczas fosforylacji fotosyntetycznej niecyklicznej. Z tego względu aktywność takich enzymów jak: 3PGAD, ICDH, L-MDH, G6PDH oraz reduktaza ferredoksyna-NADP⁺ mogą kształtować pulę NADH i NADPH w komórce roślinnej. Uznaje się, że gdy współczynnik redoks [NADPH]/[NADP⁺] w stromie chloroplastów jest wysoki, to skuteczna jest funkcja członka jabłczanowo-szczawiooctanowego, co oznacza wyprowadzenie siły redukującej z chloroplastów. Jest to istotny mechanizm w punkcie widzenia metabolizmu komórki i skuteczności reakcji obronnych związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych. Zawartość NADP⁺, substratu dla reduktazy ferredoksyna-NADP⁺ w stromie chloroplastów determinuje stopień przepływu elektronów w fotosyntetycznym łańcuchu transportu na alternatywne akceptory, takie jak tlen ([Scheibe i wsp., 2005](#)). Ponadto cytozolowe frakcje NADH i NADPH są źródłem elektronów wykorzystywanych przy wytwarzaniu RFT z udziałem oksydaz NAD(P)H, ale również są odpowiedzialne za utrzymywanie AA i GSH w stanie zredukowanym ([Foreman i wsp., 2003](#)). Wskazuje się również na istnienie specyficznych enzymów podobnych do zwierzęcych syntaz NO (NOS) zależnych od NADPH, które katalizują powstawanie NO z L-argininy ([Moreau i wsp., 2010](#)). NO w interakcji z RFT uczestniczy u roślin w regulacji wzrostu i sygnalizacji obrony przed stresem ([Crawford i Guo, 2005](#)). Uważa się, że stan redoks NADH odgrywa istotną rolę w powstawaniu RFT w mitochondriach, a ich detoksykacja jest zależna zarówno od NADH, jak i NADPH ([Møller, 2001](#)). Ponadto stwierdzono, że oksopochodne nadtlenków lipidowych są usuwane na drodze utleniania przez NADP⁺ lub redukcji z udziałem NADPH w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazy aldehydowe, ketonowe i alkenylowe ([Sunkar i wsp., 2003](#); [Mano i wsp., 2005](#)). Uważa się także, że reakcje hydroksylacji zależne od NADPH katalizowane przez cytochromy z grupy cytP450 są istotne w procesach detoksykacji ksenobiotyków

(Mezzari i wsp., 2005). W niniejszej pracy w późnej fazie patogenezы wykazano wzrost zawartości NADH i spadek zawartości NAD⁺ oraz wzrost współczynnika redoks [NADH]/[NAD⁺] w liściach Z3 w porównaniu z kontrolą (Rys. 22A, Tab. 6). W liściach Z3 wykazano także wzrost poziomu ekspresji genów kodujących 3PGAD (T₇) (Rys. 29C) oraz L-MDH (T₁, T₂, T₇) (Rys. 28A). Mogło to świadczyć o intensyfikacji procesów oddechowych (wzrost intensywności oddychania mitochondrialnego w T₂ i T₇) w liściach Z3 w porównaniu z K3. Nie stwierdzono jednak wzrostu poziomu ekspresji genu kodującego ICDH po infekcji (Rys. 28C). W T₇ stwierdzono również wzrost zawartości NADH i spadek zawartości NAD⁺ w liściach Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 22A). Zmiany te były poprzedzone wzrostem poziomu ekspresji genu kodującego 3PGAD (T₂) (Rys. 29C). Brak zmian poziomu ekspresji genu kodującego ICDH (Rys. 28C) oraz spadek poziomu transkryptu genu kodującego L-MDH (Rys. 28A) w liściach Z5 w porównaniu z K5 (T₁, T₂, T₇) wskazywały, że regulacje na poziomie transkryptu nie służyły intensyfikacji oddychania.

Pod wpływem stresu u roślin dochodzi do obszernej reorganizacji szlaków pierwotnego metabolizmu węgla i azotu lub nieodwracalnych uszkodzeń prowadzących do śmierci rośliny. Reakcja zależy od długości trwania epizodu stresu, jego nasilenia oraz fazy rozwojowej organizmu. Przekierowanie szlaków metabolicznych na procesy biochemiczne dostarczające energii, jak również związane z wytwarzaniem NAD(P)H oraz metabolitów wtórnych istotnych z punktu widzenia obrony przed stresem to główne elementy strategii aklimatyzacji do stresu. Wiele z tych reakcji realizowanych jest w chloroplastach i mitochondriach. Wskazuje się, że stres środowiskowy prowadzi do przesunięcia równowagi między metabolizmem fotosyntezy i oddychania komórkowego (Flexas i wsp., 2006). Sprawność procesów oddechowych w mitochondriach kształtowana jest przez dostępność kwasów organicznych: L-MA i kwasu szczawiooctowego oraz enzymów takich jak L-MDH i fumaraza. Pula mitochondrialnego L-MA regulowana jest jego transportem między cytozolem i mitochondriami, ale również jego powstawaniem na drodze hydratacji do kwasu fumarowego katalizowanej przez fumarazę oraz utlenianiem L-MA do kwasu szczawiooctowego przy udziale L-MDH (Szweykowska, 2002). L-MA pełni ważną funkcję w dostosowaniu roślin do stresu zarówno abiotycznego, jak i biotycznego. Uczestniczy w biosyntezie związków organicznych, kontroluje prawidłowy przebieg fotosyntezy i oddychania komórkowego oraz reguluje proces asymilacji azotu. Kwas ten, jako element antyportowego czółenka jabłczanowo-asparaginianowego, odpowiedzialny jest za generowanie siły redukcyjnej w postaci NADH w mitochondriach i tworzenie gradientu stężenia H⁺ w poprzek błony mitochondrialnej (Igamberdiev i Eprintsev, 2016). Kwas szczawiooctowy pozostaje w równowadze termodynamicznej z L-MA, a także ulega dalszym przemianom w cyklu Krebsa przekształcając się pośrednio w kwas 2-oksoglutarynowy, który pełni rolę intermediatu w szlaku biosyntezy ważnego osmoprotektanta – L-proliny, której przypisuje się również funkcję antyoksydacyjną (Chen

i Murata, 2008; Doubnerová i Ryšlavá, 2011). Wykazano, że na silnym świetle dochodzi do zahamowania fumarazy i akumulacji L-MA (Eprintsev i wsp., 2016). Stwierdzono również, że przekształcenie L-MA do kwasu pirogronowego przez enzym jabłczanowy w mitochondriach pozostaje pod kontrolą kwasu fumarowego (Wheeler i wsp., 2009; Tronconi i wsp., 2015). W niniejszej pracy wykazano, że od T₂ dochodzi do wzrostu zawartości L-MA w liściach Z3 w porównaniu z K3, za co mógł odpowiadać wzrost poziomu ekspresji genu kodującego L-MDH (T₁, T₂, T₇) oraz wzrost aktywności L-MDH. Procesy te mogły być związane ze stymulacją oddychania komórkowego w warunkach presji stresu biotycznego, co stwierdzono w liściach Z3 w T₂ i T₇ (Rys. 12C, 27A, C, 28A). Za poinfekcyjne zmiany poziomu L-MA w liściach piętra trzeciego mógł być również odpowiedzialny wzrost poziomu ekspresji genu kodującego fumarazę w liściach Z3 w porównaniu z K3 (T₁, T₂, T₇) i poinfekcyjny wzrost aktywności fumarazy w liściach piętra trzeciego w T₅ i T₇ (Rys. 27D, 28B). Wykazano, że sygnały przekazywane z liścia Z3 do liścia Z5 odpowiadają także za akumulację L-MA w liściach piętra piątego po infekcji, jednak zmiany te były stwierdzone dopiero od T₅. Natomiast wzrost aktywności L-MDH i fumarazy w liściach Z5 w porównaniu z K5 był zauważalny wyłącznie w T₇ potwierdzając przesunięcie czasowe w odpowiedzi metabolicznej między liśćmi trzeciego i piątego piętra. Akumulacja L-MA oraz wzrost aktywności fumarazy i L-MDH nie były skorelowane ze zmianami intensywności oddychania komórkowego w liściach systemicznych po infekcji, a wzrostu aktywności L-MDH i fumarazy w tych liściach nie można było wiązać ze zmianami ekspresji ich genów (Rys. 12C, 27A, C, D, 28A, B). Większa podaż L-MA w liściach piętra trzeciego po zakażeniu mogła sprzyjać jego intensywniejszemu obrotowi metabolicznemu, stymulacji oddychania, akumulacji NADH (T₅, T₇), a także wzrostowi zawartości kwasu szczawiooctowego w liściach Z3 w porównaniu z K3 (Rys. 22A, 27B). Opisane zmiany w puli L-MA i kwasu szczawiooctowego oraz aktywności L-MDH i fumarazy mogły stanowić element aklimatyzacji rośliny do stresu wywołanego przez *PsI*. Rearanżacja metabolizmu na korzyść oddychania mitochondrialnego powiązana z obniżeniem intensywności fotosyntezy mogła służyć ograniczeniu podaży źródeł węgla i energii dla rozwoju patogena. Dostarczanie siły redukującej w formie NADH oraz energii dzięki intensyfikacji cyklu Krebsa mogła natomiast sprzyjać mobilizacji obrony przed stresem.

Istotną rolę w reakcji roślin na stres środowiskowy mogą również pełnić wolne aminokwasy. Oprócz funkcji prekursorów w wielu reakcjach metabolizmu podstawowego: biosyntezy białek, nukleotydów i hormonów aminokwasy są intermediami w szlakach syntezy metabolitów wtórnych, m.in. alkaloidów i osmoprotektantów. Wykazano, że cząsteczki aminokwasów spełniają też funkcje regulatorowe i sygnałowe (Rai, 2002). Ponadto aminokwasy takie jak: Gly, L-Ser, L-Glu i L-Gln uczestniczą w szlaku fotooddychania, który u roślin typu C₃ pełni ważne funkcje fizjologiczne. Z uwagi na mnogość

produktów powstających podczas fotooddychania, szlak ten określa się jako „dyspozytornię metabolitów”. W komórkach aktywnych fotosyntetycznie fotooddychanie prowadzi do powstawania H_2O_2 uczestniczącego w sygnalizacji redoks, sprzyja reakcjom obronnym roślin, reguluje metabolizm azotu i stanowi źródło Gly, L-Ser, L-Gln. Ponadto, w warunkach silnego światła fotooddychanie uczestniczy w rozpraszaniu nadmiaru energii, co zabezpiecza rośliny przed fotoinhibicją (Starck, 2014). U roślin C_3 , w komórkach aktywnych fotosyntetycznie, Gly nie jest wyłącznie reagentem fotooddychania, ale stanowi także główny substrat oddechowy na świetle. Ponadto reszty Gly i L-Glu są potrzebne do syntezy GSH (Buchanan i wsp., 2015). W stresie deficytu wody u kukurydzy, oprócz gromadzenia L-proliny, dochodziło do akumulacji Gly i L-Ser (Slukhai i Shvedova, 1972), a u bawełny gromadzone były L-Glu i L-Gln (Hanower i Brzozowska, 1975). W niniejszej pracy w T_7 wykazano akumulację Gly, L-Ser, L-Glu i L-Gln w liściach Z3, co mogło sprzyjać intensyfikacji konwersji Gly do L-Ser w mitochondriach i reakcji odwrotnej w peroksosomach oraz stymulacji cyklu syntetaza glutaminy-syntaza glutaminianowa (GS-GOGAT) w chloroplastach. W późnym stadium patogenezy wykazano również wzrost poziomu Gly, L-Ser i L-Gln w liściach Z5 w porównaniu z K5, co świadczyło o tym, że zachodzą tam podobne zmiany metaboliczne, jakie stwierdzono w liściach zakażonych (Rys. 30A-D). O intensyfikacji procesów fotooddechowych mógł też świadczyć wzrost poziomu ekspresji genu kodującego dekarboksylazę glicyny w T_7 zarówno w liściach Z3 w porównaniu z K5, jak i w Z5 w porównaniu z K5 (Rys. 31A).

Dostosowawcze reakcje metaboliczne w warunkach stresu służą przywróceniu dynamicznej równowagi organizmu. Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy świadczą o tym, że są one uruchamiane nie tylko w liściach zakażonych, ale również w liściach, które nie miały bezpośredniego kontaktu z patogenem. Wykazano, że zmiany fizjologiczne i metaboliczne w liściach Z5 są odwzorowaniem tych, które były stwierdzone w liściach Z3. Rearanżacja metaboliczna polegająca na obniżeniu intensywności fotosyntezy i intensyfikacji oddychania mogła mieć znaczenie w strategii aklimatyzacyjnej rośliny polegającej na ograniczeniu rozwoju patogena przy jednoczesnym zapewnieniu podaży energii i siły redukującej do mobilizacji mechanizmów obrony rośliny przed stresem. Regulacja procesów metabolicznych mogła odbywać się przy udziale RFT pozostających pod kontrolą systemu antyoksydacyjnego, sygnałów redoks zależnych od AA, GSH i NAD(P)H, jak również za pośrednictwem cukrów oraz niektórych metabolitów pośrednich oddychania i fotooddychania. W regulację tę na poziomie lokalnym i systemicznym zaangażowane były chloroplasty i mitochondria – centra odbioru, transformacji i przekazywania sygnałów o stresie. Na podstawie uzyskanych danych można proponować, iż opisane regulacje metaboliczne w skali całego organizmu służą utrzymaniu równowagi między procesami wzrostu rośliny i obroną przed patogenem.

7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. **Rozwój kanciastej plamistości liści ogórka prowadził do zmian nekrotycznych na liściach oraz obniżenia autofluorescencji i stężenia chlorofilu. Infekcja *PsI* powodowała także zamykanie aparatów szparkowych, co obniżało konduktancję szparkową, utrudniało wymianę gazową i ograniczało transpirację. Choroba wywoływała stan nadmiaru energii wzbudzenia i zaburzenia transportu elektronów w łańcuchu fotosyntetycznym w liściu Z3:**
 - wygaszanie nadmiaru energii wzbudzenia na drodze niefotochemicznej, które objawiało się wzrostem NPQ świadczyło o uruchomieniu mechanizmów dostosowawczych na stres związany z infekcją *PsI*;
 - wraz z postępem patogenezы dochodziło do obniżenia sprawności fotosyntetycznej i zmniejszenia Q_Y .
2. **Zmiany zachodzące w puli PQ i systemie antyoksydacyjnym pod wpływem infekcji świadczyły o uruchamianiu sygnalizacji redoks zależnej od równowagi RFT – antyoksydanty i potwierdzały rolę chloroplastów w tym procesie:**
 - Stan redoks PQ stanowił sygnał regulujący lokalną i systemiczną odpowiedź ogórka na infekcję *PsI*. Nadmierne utlenienie PQ było sprzężone z obniżeniem Q_Y i NPQ oraz tłumieniem obrony antyoksydacyjnej zależnej od AA w liściach Z5. Przesunięcie równowagi na korzyść formy zredukowanej PQ sprzyjało natomiast usuwaniu nadmiaru energii wzbudzenia na drodze niefotochemicznej oraz wspomagało obronę antyoksydacyjną w liściach Z3. Sygnał pochodzący od PQ regulował stężenie AA w liściach Z3, nie uczestniczył jednak w zależnej od GSH odpowiedzi ogórka na infekcję *PsI*;
 - poinfekcyjne zmiany aktywności i ekspresji genów SOD i CAT potwierdzały przesunięcie równowagi w kierunku prooksydacyjnym w początkowej fazie patogenezы i mobilizację zależnych od SOD i CAT mechanizmów antyoksydacyjnych w późnej fazie patogenezы oraz wskazywały na rolę CuZnSOD i FeSOD w obronie chloroplastów przed stresem oksydacyjnym;
 - zmiany aktywności APX, DHAR i MDHAR w liściach trzeciego piętra służyły utrzymaniu wysokiego współczynnika redoks [AA]/[DHA], co miało znaczenie dla obrony, jak również dla sygnalizacji redoks zależnej od AA w chloroplastach w początkowej fazie patogenezы. Mobilizacja obrony antyoksydacyjnej zależnej od GSH w liściach infekowanych następowała głównie w późnej fazie patogenezы i przejawiała się wzrostem aktywności GR i zawartości GSH zarówno w chloroplastach, jak i na poziomie komórkowym;

- wzrost zawartości tokoferoli w liściach inokulowanych w początkowym stadium patogenezы wspomagał ochronę antyoksydacyjną, wzmacniał mechanizmy fotoprotekcyjne chloroplastów i mógł być elementem sygnalizacji stresu biotycznego.
- 3. Na skutek infekcji *Pst* dochodziło do rearanżacji metabolizmu podstawowego u ogórka, polegającej na obniżeniu intensywności fotosyntezy i stymulacji oddychania mitochondrialnego:**
- rozwój choroby wywołanej przez *Pst* prowadził do obniżenia stopnia asymilacji CO₂ z udziałem RuBisCO, którą mógł rekompensować proces karboksylacji fosfoenolopirogronianu katalizowany przez PEPC;
 - obniżeniu wydajności reakcji fotochemicznych towarzyszyła stymulacja szlaku pentozofosforanowego, glikolizy oraz cyklu Krebsa.
- 4. Rearanżacja metaboliczna między fotosyntezą i oddychaniem mitochondrialnym oraz zmiany w puli cukrów i aminokwasów służyły dostosowaniu metabolicznemu do stresu wywołanego przez *Pst*:**
- przesunięcie równowagi między fotosyntezą i oddychaniem mitochondrialnym kształtowało stosunki redoks [NADH]/[NAD⁺] i [NADPH]/[NADP⁺]. Zmiany w puli NAD(P)H mogły regulować wydajność mechanizmów obronnych, m.in. związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych oraz być źródłem sygnałów redoks kształtujących odpowiedź ogórka na infekcję *Pst*;
 - zmiany w intensywności fotosyntezy i oddychania mitochondrialnego powodowały obniżenie stężenia D-glukozy i sacharozy oraz wzrost zawartości D-fruktozy, trehalozy i rafinozy. Poinfekcyjne przesunięcie równowagi między cukrami pozostawało pod kontrolą enzymów: HK, G6PDH i RuBisCO, które mogły uczestniczyć w regulacji sygnałów metabolicznych zależnych od cukrów i ich pochodnych (np. G6PDH);
 - poinfekcyjne zmiany zawartości L-MA, kwasu szczawiooctowego oraz aktywności L-MDH, fumarazy i poziomu ekspresji genów kodujących te enzymy potwierdzały intensyfikację procesów oddechowych i służyły akumulacji zredukowanych dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych;
 - podwyższenie zawartości aminokwasów: Gly, L-Ser, L-Glu i L-Gln w liściach Z3 mogło wynikać z poinfekcyjnej intensyfikacji rozpadu białek lub przemodelowania metabolizmu azotu (np. cyklu GS-GOGAT i fotooddychania) oraz sprzyjało biosyntezie metabolitów ważnych z punktu widzenia reakcji obronnych (np. GSH).
- 5. Zaburzenia przepływu elektronów w fotosyntetycznym łańcuchu transportu, poinfekcyjne zmiany profilu antyoksydantów: AA i GSH oraz aktywności enzymów: APX, DHAR, MDHAR, GR i SOD w chloroplastach, a także akumulacja aminokwasów będących reagentami fotooddychania i zmiany aktywności**

enzymów mitochondrialnych: fumarazy i dekarboksylazy glicyny świadczyły o koordynacji metabolicznej chloroplastów i mitochondriów, ich roli w sygnalizacji stresu oraz udziale w indukcji lokalnej i systemicznej odpowiedzi ogórka na infekcję *PsI*.

6. Mechanizmy dostosowawcze w liściu Z5 na poziomie metabolicznym, enzymatycznym i transkryptomicznym były w pewnym zakresie tożsame ze stwierdzonymi w liściach Z3, co mogło mieć znaczenie w strategii aklimatyzacyjnej rośliny oraz sprzyjać zachowaniu równowagi między procesami wzrostu i obrony przed stresem biotycznym.

8. LITERATURA

1. Ádám A.L., Bestwick C.S., Barna B., Mansfield J.W. Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta*, 1995, 197: 240-249
2. Ali S., Ganai B.A., Kamili A.N., Bhat A.A., Mir Z.A., Bhat J.A., Tyagi A., Islam S.T., Mushtaq M., Yadav P., Rawat S., Grover A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 2018, 212-213: 29-37
3. Allahverdiyeva Y., Battchikova N., Brosché M., Fujii H., Kangasjärvi S., Mulo P., Mähönen A.P., Nieminen K., Overmyer K., Salojärvi J., Wrzaczek M. Integration of photosynthesis, development and stress as an opportunity for plant biology. *New Phytologist Trust*, 2015, 208: 647-655
4. Anioł A., Bielecki S., Twardowski T. Genetycznie zmodyfikowane organizmy. *Nauka*, 2008, 1: 63–84
5. Arrigoni O., Dipierro S., Borraccino G. Ascorbate free radical reductase a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters*, 1981, 125: 242–245
6. Arrigoni O., De Tullio M.C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1569(1-3): 1-9
7. Asahi T., Nishimura M. Regulatory function of malate dehydrogenase isoenzymes in the cotyledons of mung bean. *Journal of Biochemistry*, 1973, 73: 217-225
8. Aviv D.H., Rustérucci C., Holt B.F. 3rd, Dietrich R.A., Parker J.E., Dangl J.L. Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *Isd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2002, 29: 381–391
9. Awad J., Stotz H.U., Fekete A., Krischke M., Engert C., Havaux M., Berger S., Mueller M.J. 2-Cysteine peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. *Plant Physiology*, 2015, 167: 1592–1603
10. Balasubramanian R., Karve A., Kandasamy M., Meagher R.B., Moore B.D. A role for F-Actin in hexokinase-mediated glucose signaling. *Plant Physiology*, 2007, 145: 1423-1434
11. Bayer R.G., Köstler T., Jain A., Stael S., Ebersberger I., Teige M. Higher plant proteins of cyanobacterial origin – are they or are they not preferentially targeted to chloroplasts? *Molecular Plant*, 2014, 7(12): 1797-1800
12. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44: 276–287

13. Bechtold U., Karpiński S., Mullineaux P.M. The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant–biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell and Environment*, 2005, 28: 1046-1055
14. Bechtold U., Richard O., Zamboni A., Gapper C., Geisler M., Pogson B., Karpinski S., Mullineaux P.M. Impact of chloroplastic- and extracellular-sourced ROS on high light-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59: 121-133
15. Begara-Morales J.C., Loake G.J. Protein denitrosylation in plant biology. [W:] Lamattina L., García-Mata C. (ed.) Signaling and communication in plants. Gasotransmitters in plants. The rise of a new paradigm in cell signaling. *Springer*, ISBN 978-3-319-40711-1, 2016: 201-215
16. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. [W:] Kruczyńska K., Mostowik K., Zienkiewicz I. (ed.) Biochemia. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, ISBN 978-83-01-14379-4, 2007
17. Bergmeyer H.U., Gawwehn K., Grass I.M. Enzymes as biochemical reagents. [W:] Bergmeyer H.U. (ed.) Methods of enzymatic analysis. *Academic Press*, ISBN 978-0-12-091302-2425–556, 1974: 425-556
18. Beutler E. Glutathione reductase. [W:] Red cells metabolism. *Grune & Stratton, Inc.* Orlando, ISBN: 978-1-4684-2457-7, 1975: 69-70
19. Bezruczyk M., Yang J., Eom J-S., Prior M., Sosso D., Hartwig T., Szurek B., Oliva R., Vera-Cruz C., White F.F., Yang B., Frommer W.B. Sugar flux and signaling in plant – microbe interactions. *The Plant Journal*, 2018, 93: 675-685
20. Bhagat K.P., Kumar R.A., Ratnakumar P., Kumar S., Bal S.K., Agrawal P.K. Photosynthesis and associated aspects under abiotic stresses environment. [W:] Gaur R.K., Sharma P. (ed.) Approaches to plant stress and their management. *Springer*, ISBN 978-81-322-1619-3, 2014: 191-205
21. Bhat N.A., Bhat K.A., Zargar M.Y., Teli M.A., Nazir M., Zargar S.M. Current status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) of cucumber: a review. *International Journal of Current Research*, 2010, 8: 1-11
22. Blanco N.E., Guinea-Díaz M., Whelan J., Strand Å. Interaction between plastid and mitochondrial retrograde signalling pathways during changes to plastid redox status. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2014, 369: 1-8
23. Bolouri-Moghaddam M.R., Le Roy K., Xiang L., Rolland F., van den Ende W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *The FEBS Journal*, 2010, 277: 2022-2037
24. Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in

- plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 1367-1376
25. Bonfig K.B., Schreiber U., Gabler A., Roitsch T., Berger S. (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*, 2006, 225: 1-12
 26. Borek M., Bączek-Kwinta R., Rapacz M. Chlorophyll fluorescence imaging of cadmium-treated white cabbage plants. *E3S Web of Conferences*, 2013, 1: 1-4
 27. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
 28. Brehe, J.E., Burch, H.B., Enzymatic assay for glutathione. *Analytical Biochemistry*, 1976, 74: 315–319.
 29. Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S., Neill S.J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 2006, 45: 113-122
 30. Buchanan B.B, Gruissem W., Jones R.L. (ed.). Biochemistry and molecular biology of plants. *Wiley Blackwell*, ISBN 978-0-470-71421-8, 2015
 31. Carmody M., Crisp P.A., d'Alessandro S., Ganguly D., Gordon M., Havaux M., Albrecht-Borth V., Pogson B.J. Uncoupling high light responses from singlet oxygen retrograde signaling and spatial-temporal systemic acquired acclimation. *Plant Physiology*, 2016, 171: 1734-1749
 32. Cecchini N.M., Monteoliva M.I., Alvarez M.E. Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2011, 155: 1947–1959
 33. Chaerle L., de Boever F., van Montagu M., van der Straeten D. Thermographic visualization of cell death in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 2001, 24: 15-25
 34. Chandra-Shekara A.C., Gupte M., Navarre D., Raina S., Raina R., Klessig D., Kachroo P. Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against Turnip crinkle virus in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2006, 45: 320-334
 35. Chen L.S., Lin Q., Nose A. A comparative study on diurnal changes in metabolite levels in the leaves of three crassulacean acid metabolism (CAM) species, *Ananas comosus*, *Kalanchoë daigremontiana* and *K. pinnata*. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 341-350
 36. Chen T.H., Murata N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, 2008, 13: 499-505
 37. Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 2006, 124: 803-814

38. Chojak-Koźniewska J., Kuźniak E., Linkiewicz A., Sowa S. Primary carbon metabolism-related changes in cucumber exposed to single and sequential treatments with salt stress and bacterial infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 123: 160-169
39. Christie J.M., Blackwood L.M., Petersen J., Sullivan S. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 56: 401-413
40. Ciarroni S., Clarke C.R., Liu H., Eckshtain-Levi N., Mazzaglia A., Balestra G.M., Vinatzer B.A. A recombinant flagellin fragment, which includes the epitopes flg22 and flgII-28, provides a useful tool to study flagellin-triggered immunity. *Journal of General Plant Pathology*, 2018, 84: 169-175
41. Ciereszko I. Regulacyjna rola cukrów. Percepcja cukrów i przekazywanie sygnału w komórkach roślinnych. *Postępy Biologii Komórki*, 2002, 29: 269-289
42. Corpas F.J., Barroso J.B. NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 2: 1-5
43. Crawford N.M., Guo F.Q. New insights in nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in Plant Science*, 2005, 10: 195-200
44. da-Silva W.S., Rezende G.L., Galina A. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52: 1191-1201
45. Dangl J.L., Jones J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 2001, 411: 826-833
46. Dat J.F., Inzé D., van Breusegem F. Catalase-deficient tobacco plants: tools for in planta studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Report*, 2001, 6: 37-42
47. del Pozo J.C. Reactive oxygen species: from harmful molecules to fine-tuning regulators of stem cell niche maintenance. *Plos Genetics*, 2016, 12: 1-4
48. Delprato M.L., Krapp A.R., Carrillo N. Green light to plant responses to pathogens: the role of chloroplast light-dependent signaling in biotic stress. *Photochemistry and Photobiology*, 2015, 91: 1004-1011
49. Dempsey R.W., Merchant A., Tausz M. Differences in ascorbate and glutathione levels as indicators of resistance and susceptibility in *Eucalyptus* trees infected with *Phytophthora cinnamomic*. *Tree Physiology*, 2012, 32: 1148-1160
50. Desikan R., Clarke A., Hancock J.T., Neill J. H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Biology*, 1999, 50: 1863-1866
51. Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P., Thorpe T.A. Leaf senescence: correlated with increased leaves of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased

- levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 1981, 32: 93–101
52. Dietz K.J., Efficient high light acclimation involves rapid processes at multiple mechanistic levels. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66: 2401-2414
53. Doubnerová V., Ryšlavá H. What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress? *Plant Science*, 2011, 180: 575-583
54. Elhefny A.A., Kuliyevev A.A., Gyulakhmedov S.G. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in plants. *International Journal of Plant Production*, 2011, 2: 949-957
55. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Sazonova O.V., Igamberdiev A.U. Light inhibition of fumarase in *Arabidopsis* leaves is phytochrome A-dependent and mediated by calcium. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 102: 161-166
56. Espinas N.A., Saze H., Saijo Y. Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1-7
57. Essmann J., Bones P., Weis E., Scharte J. Leaf carbohydrate metabolism during defense: intracellular sucrose-cleaving enzymes do not compensate repression of cell wall invertase. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3: 885-887
58. Estavillo G.M., Crisp P.A., Pornsiriwong W., Wirtz M., Collinge D., Carrie C., Giraud E., Whelan J., David P., Javot H., Brearley C., Hell R., Marin E., Pogson B.J. Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2011, 23: 3992-4012
59. Exposito-Rodriguez M., Laissue P.P., Yvon-Durocher G., Smirnoff N., Mullineaux P.M. Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nature Communications*, 2017, 8: 1-11
60. Flexas J., Bota J., Galmés J., Medrano H., Ribas-Carbo M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*, 2006, 127: 343-352
61. Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 1971, 9: 275-296
62. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 2003, 27, 442-446
63. Foyer C.H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 2018, 154: 134-142
64. Foyer C.H., Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 2003, 119: 355-364

65. Foyer C.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 2011, 155, 2-18
66. Foyer C.H., Ruban A.V., Noctor G. Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. *Biochemical Journal*, 2017, 474: 877-883
67. Fu Z.Q., Yan S., Saleh A., Wang W., Ruble J., Oka N., Mohan R., Spoel S.H., Tada Y., Zheng N., Dong X. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 2012, 486: 228-232
68. Gabara B., Kuźniak E., Skłodowska M., Surówka E., Miszański Z. Ultrastructural and metabolic modifications at the plant-pathogen interface in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, 2012, 77: 33-43
69. Gadjev I., Stone J.M., Gechev T.S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide, *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2008, 270: 87-144
70. Gallie D.R. L-Ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, 2013, 2013: 1-24
71. Gao Q.-M., Zhu S., Kachroo P., Kachroo A. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1-12
72. Gawroński P., Górecka M., Bederska M., Rusaczek A., Ślesak I., Kruk J., Karpiński S. Isochorismate synthase 1 is required for thylakoid organization, optimal plastoquinone redox status, and state transitions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64: 3669-3679
73. Ghanta S., Bhattacharyya D., Chattopadhyay S. Glutathione signaling acts through NPR1-dependent SA-mediated pathway to mitigate biotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6: 607-609
74. Gibon Y., Larher F., Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 1997, 251: 153-157
75. Gilroy S., Suzuki N., Miller G., Choi W.-G., Toyota M., Devireddy A.R., Mittler R. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signalling. *Trends in Plant Science*, 2014, 19: 623-630
76. Golan T., Müller-Moulé P., Niyogi K.K. Photoprotection mutants of *Arabidopsis thaliana* acclimate to high light by increasing photosynthesis and specific antioxidants. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29: 879-887
77. Gómez-Ariza J., Campo S., Rufat M., Estopà M., Messeguer J., San Segundo B., Coca M. Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad spectrum disease

- resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20: 832-842
78. Grun C., Berger S., Matthes D., Mueller M.J. Early accumulation of non-enzymatically synthesised oxylipins in *Arabidopsis thaliana* after infection with *Pseudomonas syringae*. *Functional Plant Biology*, 2007, 34: 65-71
 79. Häffner E., Konietzki S., Diederischen E. Keeping control: the role of senescence and development in plant pathogenesis and defense. *Plants*, 2015, 4: 449-488
 80. Han Y., Chaouch S., Mhamdi A., Queval G., Zechmann B., Noctor G. Functional analysis of *Arabidopsis* mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18: 2106-2121
 81. Hanower P., Brzozowska J. Effects of osmotic stress on composition of free amino acids in cotton leaves. *Phytochemistry*, 1975, 14: 1691-1694
 82. Hayes M.A., Feechan A., Dry I.B. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology*, 2010, 153: 211-221
 83. Heber U., Santarius K.A. Direct and indirect transfer of ATP and ADP across the chloroplast envelope. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 1970, 25b: 718-728
 84. Hernández J.A., Ferrer M.A., Jiménez A., Ros Barceló A., Sevilla F. Antioxidant systems and O₂^{•-}/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, 2001, 127: 817-831
 85. Hossain M.A., Asada K. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, 1984, 25: 1285-1295
 86. Hossain M.F., Hasan S.M.Z., Zaoti Z.F., Hasan M.F., Acharjee U.K., Islam M.A., Khalekuzzaman M., Sikdar B. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* from angular leaf spot disease of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and evaluation of its antibiotic sensitivity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2017, 6: 233-238
 87. Hothorn M., Wolf S., Aloy P., Greiner S., Scheffzek K. Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *The Plant Cell*, 2004, 16: 3437-3447
 88. Hu X., Neill S.J., Tang Z., Cai W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology*, 2005, 137: 663-670
 89. Hýsková V., Ryšlavá H. Tobacco hatch-slack enzymes are involved in both, abiotic and biotic stress response. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2013, 2: 145-147

90. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1042-1057
91. Ishiga Y., Ishiga T., Wangdi T., Mysore K.S., Uppalapati S.R. NTRC and chloroplast-generated reactive oxygen species regulate *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* disease development in tomato and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25: 294-306
92. Jackowski G., Ratajczak L., Rychter A. Współdziałanie organelli. [W:] *Biologia Komórki Roślinnej. Funkcja*. Wydawnictwo Naukowe PWN, ISBN 978-83-01-14869-0, 2007: 294-342
93. Jang J.-C., Leon P., Zhou L., Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell*, 1997, 9: 5-19
94. Jang J.-C., Sheen J. Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science*, 1997, 2: 208-214
95. Jarvis P., López-Juez E. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2013, 14: 787-803
96. Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323-329
97. Jung H.-S., Chory J. Signaling between chloroplasts and the nucleus: can a systems biology approach bring clarity to a complex and highly regulated pathway? *Plant Physiology*, 2010, 152: 453-459
98. Kampfenkel K., Vanmontagu M., Inzé D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 1995, 225: 165-167
99. Kangasjärvi S., Tikkanen M., Durian G., Aro E.M. Photosynthetic light reactions-an adjustable hub in basic production and plant immunity signaling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 81: 128-134
100. Kanwar P., Jha G. Alterations in plant sugar metabolism: signatory of pathogen attack. *Planta*, 2019, 249: 305-318
101. Karpiński S., Reynolds H., Karpińska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 284: 654-657
102. Karpiński S., Szechyńska-Hebda M. Cellular light memory, photo-electrochemical and redox retrograde signaling in plants. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 2012, 93: 27-39
103. Karpiński S., Szechyńska-Hebda M., Wituszyńska W., Burdiak P. Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36: 736-744

104. Kasimova M.R., Grigiene J., Krab K., Hagedorn P.H., Flyvbjerg H., Andersen P.E., Møllere I.M. The free NADH concentration is kept constant in plant mitochondria under different metabolic conditions. *The Plant Cell*, 2006, 18: 688-698
105. Kłosińska U., Kozik E.U., Nowakowska M. Ocena odporności wybranych linii ogórka na bakteryjną kanciastą plamistość (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). *Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa*, 2014, 22: 41-49
106. Kmiecik P., Leonardelli M., Teige M. Novel connections in plant organellar signalling link different stress responses and signalling pathways. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67: 3793-3807
107. Koch K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 509-540
108. Kopczewski T., Kuźniak E. Redox signals as a language of interorganellar communication in plant cells. *Central European Journal of Biology*, 2013, 8: 1153-1163
109. Kozłowska-Szerenos B., Ciereszko I. Udział askorbinianu w odpowiedzi roślin na niekorzystne czynniki środowiska. [W:] Ciereszko I., Bajguz A. (ed.) Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska. *Polskie Towarzystwo Botaniczne*, ISBN 978-83-62069-37-8, 2013: 69-82
110. Kuźniak E., Kopczewski T., Chojak-Koźniewska J. Ascorbate-glutathione cycle and biotic stress tolerance in plants. [W:] Hossain M.A., Munné-Bosch S., Burritt D.J., Díaz-Vivancos P., Fujita M., Lorence A. (ed.) Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance. *Springer*, ISBN 978-3-319-74056-0, 2017: 201-231
111. Kuźniak E., Kornaś A., Gabara B., Ullrich C., Skłodowska M., Miszański Z., Interaction of *Botrytis cinerea* with the intermediate C₃-CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 69: 137-147
112. Kuźniak E., Skłodowska M. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Science*, 2001, 160: 723-731
113. Kuźniak E., Skłodowska M. Differential implication of glutathione, glutathione-metabolizing enzymes and ascorbate in tomato resistance to *Pseudomonas syringae*. *Journal of Phytopathology*, 2004a, 152: 529-536
114. Kuźniak E., Skłodowska M. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, 2004b, 397: 605–612
115. Kuźniak, E., Skłodowska, M., Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta*, 2005, 222: 192-200

116. Lechowska K., Wojtyła Ł., Kubala S., Garnczarska M. Udział czynników transkrypcyjnych i mechanizmów epigenetycznych w odpowiedzi roślin na stres suszy. *Postępy Biologii Komórki*, 2014, 41: 463-490
117. Lee K.P., Kim C., Landgraf F., Apel K. EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104: 10270-10275
118. Li J., Cao L., Staiger C.J. Capping protein modulates actin remodeling in response to reactive oxygen species during plant innate immunity. *Plant Physiology*, 2017, 173: 1125-1136
119. Li P., Wind J.J., Shi X., Zhang H., Hanson J., Smeekens S.C., Teng S. Fructose sensitivity is suppressed in *Arabidopsis* by the transcription factor ANAC089 lacking the membrane-bound domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 3436–3441
120. Lindenthal M., Steiner U., Dehne H.W., Oerke E.C. Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology*, 2005, 95: 233-240
121. Linster C.L., Adler L.N., Webb K., Christensen K.C., Brenner C., Clarke S.G. A second GDP-L-galactose phosphorylase in *Arabidopsis* en route to vitamin C: covalent intermediate and substrate requirements for the conserved reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 18483-18492
122. Luna E., Ton J. The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7: 615-618
123. Malnoë M., Wang F., Girard-Bascou J., Wollman F.A., de Vitry C. Thylakoid FtsH protease contributes to photosystem II and cytochrome b₆f remodeling in *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions. *The Plant Cell*, 2014, 26: 373-390
124. Mano J., Belles-Boix E., Babychuk E., Inzé D., Torii Y., Hiraoka E., Takimoto K., Slooten L., Asada K., Kushnir S. Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxification of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiology*, 2005, 139: 1773-1783
125. Martin M.L., Lechner L., Zabaleta E.J., Salerno G.L. A mitochondrial alkaline/neutral invertase isoform (A/N-InvC) functions in developmental energy-demanding processes in *Arabidopsis*. *Planta*, 2013, 237: 813-822
126. Mateo A., Mühlenbock P., Rustérucci C., Chi-Chen C., Miszalski Z., Karpińska B., Parker J.E., Mullineaux P.M., Karpiński S. LESION SIMULATING DISEASE (LSD1)

- gene is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiology*, 2004, 136: 2818-3280
127. Matsunaga T.M., Ogawa D., Taguchi-Shiobara F., Ishimoto M., Matsunaga S., Habu Y. Direct quantitative evaluation of disease symptoms on living plant leaves growing under natural light. *Breeding Science*, 2017, 67: 316-319
 128. May M.J., Hammond-Kosack' K.E., Jones J.D.C. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the *Cf*-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiology*, 1996, 110:1367-1379
 129. McDonald K.L., Cahill D.M. Evidence for a transmissible factor that causes rapid stomatal closure in soybean at sites adjacent to and remote from hypersensitive cell death induced by *Phytophthora sojae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999, 55: 197-203
 130. Mezzari M., Walters K., Jelinkova M., Shih M.C., Just C.L., Schnoor J.L. Gene expression and microscopic analysis of *Arabidopsis* exposed to chloroacetanilide herbicides and explosive compounds. A phytoremediation approach. *Plant Physiology*, 2005, 138: 858–869
 131. Métraux J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, 107: 13-18
 132. Millar A.H., Mittova V., Kiddle G., Heazlewood J.L., Bartoli C.G., Theodoulou F.L., Foyer C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, 2003, 133: 443-447
 133. Miller R.N.G., Costa Alves G.S., van Sluys M.A. Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany*, 2017, 119: 681-687
 134. Mishina T.E., Zeier J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2007, 50: 500-513
 135. Mittler R. ROS are good. *Trends in Plant Science*, 2017, 22: 11-19
 136. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 2011, 16: 300-309
 137. Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 2003, 300: 332-336
 138. Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D.F. NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiologia Plantarum*, 2010, 138: 372-383

139. Mou Z., Fan W., Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 2003, 113, 935-944
140. Moulin M., McCormac A.C., Terry M.J., Smith A.G., Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 15178-15183
141. Möllering H. [W:] Bergmeyer H.U., Bergmeyer J., Grassl M. (ed.) Methods of Enzymatic Analysis. *Academic Press*, 1985: 39-47
142. Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52: 561-591
143. Munné-Bosch S., Alegre L. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21: 31-57
144. Mühlenbock P., Płaszczycza M., Mellerowicz E., Karpiński S. Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *The Plant Cell*, 2007, 19: 3819-3830
145. Mühlenbock P., Szechyńska-Hebda M., Płaszczycza M., Baudo M., Mateo A., Mullineaux P.M., Parker J.E., Karpińska B., Karpiński S. Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2008, 20: 2339-2356
146. Nakano Y., Asada K. Hydrogenperoxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 1981, 22: 867-880
147. Nawrocka J.D., Małolepsza U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 2013, 67: 149-156
148. Niki E. Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1987, 498: 186-199
149. Noctor G., Foyer C.H. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiology*, 2016, 171: 1581-1592
150. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35: 454-484
151. Nosek M., Kornaś A., Kuźniak E., Miszalski Z. Plastoquinone redox state modifies plant response to pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 96: 163-170
152. Nowicka B., Szymańska R., Kruk J. Chinony prenylowe – występowanie, biosynteza i funkcje. *Postępy Biochemii*, 2009, 55: 307-314

153. Nunes-Nesi A., Sulpice R., Gibon Y., Fernie A.R. The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59: 1675-1684
154. Oelze M.L., Kandlbinder A., Dietz K.J. Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: complexity in redox regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1780: 1261-1272
155. Olczak-Woltman H., Bartoszewski G, Madry W., Niemirowicz-Szczytt K. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) in cucumber and identification of molecular markers linked to resistance. *Plant Pathology*, 2009, 58: 145-151
156. Olczak-Woltman H., Masny A., Bartoszewski G., Płucienniczak A., Niemirowicz-Szczytt K. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathology*, 2007, 56: 373-382
157. Olczak-Woltman H., Schollenberger M., Niemirowicz-Szczytt K. Charakterystyka I metody identyfikacji fitopatogennych bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Postępy Nauk Rolniczych*, 2008, 1: 69-80
158. Parisy V, Poinssot B, Owsianowski L, Buchala A, Glazebrook J, Mauch F. Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 2007, 49: 159-172
159. Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J., Bernard S., Veljović-Jovanović S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H. Leaf vitamin C contents modulate plant defence transcripts and regulate genes controlling development through hormone signalling. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1212-1226
160. Pesaresi P., Schneider A., Kleine T., Leister D. Interorganellar communication. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10: 600-606
161. Pieterse C.M.J., van Loon L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7: 456-464
162. Pignocchi C., Fletcher J.M., Wilkinson J.E., Barnes J.D., Foyer C.H. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*, 2003, 132: 1631-1641
163. Pilon M., Ravet K., Tapken W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 2011, 1807: 989-998
164. Pinheiro C., Chaves M.M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62: 869-882
165. Pogson B.J., Woo N.S., Förster B., Small I.D. Plastid signaling to the nucleus and beyond. *Trends in Plant Science*, 2008, 13: 602-609

166. Rai V.K. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum*, 2002, 45: 481-487
167. Ramon M., Rolland F. Plant development: introducing trehalose metabolism. *Trends in Plant Science*, 2007, 12: 185-188
168. Ramon M., Rolland F., Sheen J. Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists*, 2008, 6: 1-22
169. Redondo-Gómez S. Abiotic and biotic stress tolerance in plants. [W:] Rout G.R., Das A.B. (ed.) *Molecular stress physiology of plants. Springer*, ISBN 978-81-322-0806-8. Springer, 2013: 1-20
170. Rejeb K.B., Abdelly C., Savoure A. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 80: 278-284
171. Rodermel S. Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends in Plant Science*, 2011, 6: 471-478
172. Rojas C.M., Senthil-Kumar M., Wang K., Ryu C.M., Kaundal A., Mysore K.S. Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2012, 24: 336-352
173. Rolfe S.A., Scholes J.D. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma*, 2010, 247: 163-175
174. Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Reviews of Plant Biology*, 2006, 57: 675-709.
175. Ros Barceló A., Gómez R.L. Reactive oxygen species in plant cell walls. [W:] del Río L.A., Puppo A. (ed.) *Signaling and communication in plants. Reactive oxygen species in plant signaling. Springer*, ISBN 978-3-642-00389-9, 2009: 73-93
176. Rouhier N., Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly, *New Phytologist*, 2010, 186: 365-372
177. Ruban A.V. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiology*, 2016, 170: 1903-1916
178. Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 2006, 141: 336-340
179. Sattler S.E., Cahoon E.B., Coughlan S.J., DellaPenna D. Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiology*, 2003, 132: 2184-2195

180. Scheibe R., Backhausen J.E., Emmerlich V., Holtgreffe S. Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56: 1481-1489
181. Schlaeppi K., Bodenhausen N., Buchala A., Mauch F., Reymond P. The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *The Plant Journal*, 2008, 55: 774-786
182. Schmitt F.J., Renger G., Friedrich T., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Los D.A., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1837: 835-848
183. Sgherri C., Quartacci M.F., Izzo R., Navari-Izzo F. Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40: 591-597
184. Shapiguzov A., Vainonen J.P., Wrzaczek M., Kangasjärvi J. ROS-talk how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 1-9
185. Shehzadi A., Abbas H.M.K., Ahmed Z., Saleem S. Effect plant disease resistance genes: recent applications and future perspectives. *Journal of Bio Innovation Research*, 2017, 1: 86-103
186. Shumbe L., Chevalier A., Legeret B., Taconnat L., Monnet F., Havaux M. Singlet oxygen-induced cell death in *Arabidopsis* under high-light stress is controlled by OX11 kinase. *Plant Physiology*, 2016, 170: 1757-1771
187. Simeonova E., Mostowska A. Biochemiczne i molekularne aspekty starzenia się liści. *Postępy Biologii Komórki*, 2001, 28: 17-32
188. Simon U.K., Polanschütz L.M., Koffler B.E., Zechmann B. High resolution imaging of temporal and spatial changes of subcellular ascorbate, glutathione and H₂O₂ distribution during *Botrytis cinerea* infection in *Arabidopsis*. *Plos One*, 2013, 8: 1-11
189. Singh R., Chandrawat K.S. Role of phytoalexins in plant disease resistance. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2017, 6: 125-129
190. Skłodowska M., Naliwajski M., Wielanek M., Gajewska E., Kuźniak E. Arbutin- and benzotriazole-mediated cucumber response to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* infection in carbohydrate metabolism. *Scientia Horticulturae*, 2015, 192: 200-210
191. Slukhai S.I., Shvedova O.E. Dynamics of free amino acid contents in maize plants in connection with soil water regimes. *Fiziol Biokhim Kul'trast*, 1972, 4: 151-156

192. Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16: 13561-13578
193. Sonnewald S., Priller J.P.R., Schuster J., Glickmann E., Hajirezaei M.R., Siebig S., Mudgett M.B., Sonnewald U. Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type three effectors. *Plos One*, 2012, 7: 1-16
194. Starck Z. Fizjologia roślin: jak było wczoraj, jak jest dziś, a co przyniesie jutro? *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2014, 63: 569-589
195. Stenbaek A., Jensen P.E. Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. *Phytochemistry*, 2010, 71: 853-859
196. Stoltzman C.A., Peterson C.W., Breen K.T., Muoio D.M., Billin A.N., Ayer D.E. Glucose sensing by MondoA:Mix complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 6912–6917
197. Ströher E., Millar A.H. The biological roles of glutaredoxins. *Biochemical Journal*, 2012, 446: 333-348
198. Sunkar R., Bartels D., Kirch H.H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal*, 2003, 35: 452–464
199. Sutton P.N., Gilbert M.J., Williams L.E., Hall J.L. Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiologia Plantarum*, 2007, 129: 787-795
200. Szechyńska-Hebda M., Karpiński S. Light intensity-dependent retrograde signalling in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170: 1501-1516
201. Szechyńska-Hebda M., Kruk J., Górecka M., Karpińska B., Karpiński S. Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2010, 22: 2201-2218
202. Szweykowska A. [W:] Kostecka E. (red.) Fizjologia roślin. *Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza*, ISBN 83-232-0815-8, 2002
203. Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 2008, 321: 952-956
204. Tauzin A.S., Giardina T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 1-8

205. Tian S., Wang X.B., Li P., Wang H., Ji H.T., Xie J.Y., Qiu Q.L., Shen D., Dong H.S. Plant aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways. *Plant Physiology*, 2016, 171: 1635-1650
206. Tognetti J.A., Pontis H.G., Martínez-Noël G.M.A. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8: 1-10
207. Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D.G. *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 517-522
208. Tovar-Méndez A., Matamoros M.A., Bustos-Sanmamed P., Dietz K.J., Cejudo F.J., Rouhier N., Sato S., Tabata S., Becana M. Peroxiredoxins and NADPH-dependent thioredoxin systems in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 2011, 156: 1535-1547
209. Tripathi B.N., Bhatt I., Dietz K.J., Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma*, 2009, 235, 3-15
210. Tronconi M.A., Wheeler M.C., Martinatto A., Zubimendi J.P., Andreo C.S., Drincovich M.F. Allosteric substrate inhibition of *Arabidopsis* NAD-dependent malic enzyme 1 is released by fumarate. *Phytochemistry*, 2015, 111: 37-47
211. Vallad G.E., Goodman R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 2004, 44: 1920-1934
212. Van Aken O., Whelan J. Comparison of transcriptional changes to chloroplast and mitochondrial perturbations reveals common and specific responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 1-18
213. Van den Dool H., Kratz P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1963, 11: 463-471
214. Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14: 6805-6847
215. Veljović-Jovanović S., Vidović M., Morina F. Ascorbate as a key player in plant abiotic stress response and tolerance. [W:] Hossain M.A., Munné-Bosch S., Burritt D.J., Díaz-Vivancos P., Fujita M., Lorence A. (red). Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance. *Springer*, ISBN 978-3-319-74056-0, 2017: 47-109
216. Vidhyasekaran P. [W:] František Baluška (red.) Signaling and communication in plants. PAMP signals in plant innate immunity. Signal perception and transduction. *Springer*, ISBN 978-94-007-7425-4. *Springer*, 2014

217. Voegelé R.T., Wirsel S., Moll U., Lechner M., Mendgen K. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 2006, 19: 625-634
218. Voothuluru P., Sharp R.E. Apoplastic hydrogen peroxide in the growth zone of the maize primary root under water stress. I. Increased levels are specific to the apical region of growth maintenance. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64: 1223-1233
219. Wahlefeld A.W. Oxaloacetate; UV spectrophotometric determination. [W:] Bergmeyer H.U. (red.) Methods of enzymatic analysis. *Academic Press*, ISBN 978-0-12-091302-2, 1974: 1604-1608
220. Wächter R., Langhans M., Aloni R., Götz S., Weilmünster A., Koops A., Temguia L., Mistrik I., Pavlovkin J., Rascher U., Schwalm K., Koch K.E., Ullrich C.I. Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 2003, 133: 1024-1037
221. Walczak F., Bandyk A., Jakubowska M., Roik K., Tratwal A., Wielkopolan B., Złotkowski J. Ocena uszkodzeń spowodowanych przez najważniejsze agrofagi głównych roślin uprawnych w Polsce w roku 2013. *Progress in Plant Protection*, 2014, 54: 491-514
222. Wang M., Ling N., Dong X., Zhu Y., Shen Q., Guo S. Thermographic visualization of leaf response in cucumber plants infected with the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 61: 153-161
223. Wang S.D., Zhu F., Yuan S., Yang H., Xu F., Shang J., Xu M.Y., Jia S.D., Zhang Z.W., Wang J.H., Xi D.H., Lin H.H. The roles of ascorbic acid and glutathione in symptom alleviation to SA-deficient plants infected with RNA viruses. *Planta*, 2011, 234: 171-181
224. Welham T., Pike J., Horst I., Flemetakis E., Katinakis P., Kaneko T., Sato S., Tabata S., Perry J., Parniske M., Wang T.L. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60, 3353-3365
225. Wheeler M.C.G., Arias C.L., Maurino V.G., Andreo C.S., Drincovich M.F. Identification of domains involved in the allosteric regulation of cytosolic *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzymes. *The FEBS Journal*, 2009, 276: 5665-5677
226. Wijekoon C.P., Goodwin P.H., Hsiang T. Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 74: 94-101
227. Woodson J.D., Chory J. Organelle signaling: how stressed chloroplasts communicate with the nucleus. *Current Biology*, 2012, 22: 690-692

228. Xiao W., Sheen J., Jang J.C. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44: 451-461
229. Xiao Y., Savchenko T., Baidoo E.E., Chehab W.E., Hayden D.M., Tolstikov V., Corwin J.A., Kliebenstein D.J., Keasling J.D., Dehesh K. Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*, 2012, 149: 1525-1535
230. Zaffagnini M., Bedhomme M., Marchand C.H., Morisse S., Trost P., Lemaire S.D. Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 16: 567-586
231. Zechmann B., Zellnig G., Urbanek-Krajnc A., Müller M. Artificial elevation of glutathione affects symptom development in ZYMV-infected *Cucurbita pepo* L. plants. *Archives of Virology*, 2007, 152: 747-762
232. Zhang Y. Biological role of ascorbate in plants. [W:] Zhang Y. (ed.) Ascorbic acid in plants. Biosynthesis, regulation and enhancement. *Springer*, ISBN 978-1-4614-4126-7, 2013: 7-33
233. Zou J.J., Rodriguez-Zas S., Aldea M., Li M., Zhu J., Gonzalez D.O., Vodkin L.O., DeLucia E., Clough S.J. Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18: 1161-1174
234. Zurbruggen M.D., Carrillo N., Tognetti V.B., Melzer M., Peisker M., Hause B. Hajirezaei M.R. Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *The Plant Journal*, 2009, 60: 962-973
235. Zwack P.J., de Clercq I., Howton T.C., Hallmark H.T., Hurny A., Keshishian E.A., Parish A.M., Benkova E., Mukhtar M.S., van Breusegem F., Rashotte A.M. Cytokinin response factor 6 represses cytokinin-associated genes during oxidative stress. *Plant Physiology*, 2016, 172: 1249-1258

ŹRÓDŁA FINANSOWANIA

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy były finansowane z:

1. Grantu Narodowego Centrum Nauki przyznanego w ramach konkursu Preludium 6 na realizację projektu pt.: „Udział chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi ogórka siewnego (*Cucumis sativus*) na infekcję *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*” (2013/11/N/NZ9/00116).



2. Dotacji celowej na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich przyznanej przez Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ w latach 2014, 2015 i 2016.

