

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin



ROZPRAWA DOKTORSKA

Karolina Kułak

**Metabolizm wtórny w odpowiedzi immunologicznej wybranych
gatunków Brassicaceae**

Promotor

Dr hab. Paweł Bednarek, prof. IChB PAN

Poznań 2017

Dziękuję mojemu promotorowi
Dr. hab. Pawłowi Bednarkowi
za wszelką pomoc, liczne wskazówki oraz cierpliwość i wyrozumiałość
w trakcie realizacji i redagowania pracy.

Dziękuję także **Prof. dr. hab. Maciejowi Stobieckiemu**
za pomoc w zrozumieniu tajników spektrometrii mas i wsparcie

Serdecznie dziękuję Paniom
Danusi Ciesiołce i Małgosi Zielińskiej
za techniczną pomoc w laboratorium, rady i życzliwość.

Szczególne podziękowania kieruję do koleżanek i kolegów
z Zakładu Biochemii Produktów Naturalnych
Ani Wojakowskiej, Basi Swarcewicz,
Klaudii Chmielewskiej i Pawła Rodziewicza
za niezastąpioną atmosferę w pracy i po pracy.

Serdecznie dziękuję koleżankom i kolegom
z Zakładu Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin
Marioli Piślewskiej-Bednarek, Marcie Pastorczyk, Ani Piaseckiej,
Nicolasowi Jedrzejczak-Rey i Pawłowi Czerniawskiemu
za nieskończoną przyjemność wspólnej pracy.
Ani Piaseckiej również za pomoc w identyfikacji metabolitów.

Dziękuję również zespołowi zaprzyjaźnionego
Zakładu **Fizjologii Molekularnej Roślin.**

*Niniejszą pracę dedykuję moim **Rodzicom**
oraz Bliskim, którzy pytali „jak idzie”*

Przedłożona praca doktorska została współfinansowana z następujących źródeł:

- projekt badawczy EMBO Installation Grant: „Secondary metabolites in plant – microbe interactions”
- projekt badawczy NCN PRELUDIUM pt. „Ewolucja metabolitów wtórnych pełniących rolę w odporności roślin z rodziny Brassicaceae na infekcje”

Numer grantu: UMO-2013/09/N/NZ2/02080

Ponadto oświadczam, że jestem stypendystką programu specjalnych stypendiów naukowych finansowanych z dotacji podmiotowej w ramach Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego „Poznańskie Konsorcjum RNA” dla uczestników stacjonarnych studiów doktoranckich przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	8
I. WPROWADZENIE LITERATUROWE	12
1.1. Układ immunologiczny roślin	12
1.1.1. Interakcje roślina – mikroorganizm	12
1.1.2. Formy odporności	12
1.1.2.1. Konstrytywne bariery obronne	12
1.1.2.2. Odporność indukowana przez wzorce molekularne związane z mikroorganizmami...	13
1.1.2.3. Odporność indukowana przez efektory	14
1.1.2.4. Odporność systemiczna	15
1.2. Metabolity wtórne w odpowiedzi odpornościowej roślin.....	15
1.2.1. Systematyka metabolitów związanych z układem immunologicznym	17
1.2.1.1. Fitoantycypiny	17
1.2.1.1.1. Saponiny	18
1.2.1.1.2. Glukozynolany	18
1.2.1.1.3. Glukozydy benzoksazyonów	19
1.2.1.1.4. Glikozydy cyjanogenne	19
1.2.1.2. Fitoaleksyny	20
1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> i inne gatunki z rodziny Brassicaceae jako rośliny modelowe	24
1.3.1. Rozwój narzędzi molekularnych w badaniach <i>A. thaliana</i>	25
1.3.2. <i>A. thaliana</i> w rozwoju biologii roślin.....	26
1.3.2.1. <i>A. thaliana</i> w badaniach układu odpornościowego roślin.....	27
1.3.3. Inne gatunki modelowe w rodzinie Brassicaceae.....	28
1.4. Metabolity wtórne w odporności gatunków z rodziny Brassicaceae	31
1.4.1. Glukozynolany	31
1.4.1.1. Różnorodność strukturalna.....	31
1.4.1.2. Biosynteza	32
1.4.1.3. Regulacja biosyntezy.....	35
1.4.1.4. Hydroliza glukozynolanów	36
1.4.1.5. Metabolizm glukozynolanów w odpowiedzi odpornościowej	37
1.4.1.5.1. Zakonserwowanie szlaku PEN2	39
1.4.1.6. Mechanizmy działania glukozynolanów	40
1.4.2. Fitoaleksyny	41
1.4.2.1. Struktury chemiczne.....	41
1.4.2.2. Biosynteza	42

1.4.2.3. Regulacja biosyntezy kamaleksyny i kwasu indolilo-3-karboksylowego	44
1.4.2.4. Funkcja fitoaleksyn indolowych w odporności	45
1.4.4. Metabolity szlaku fenylopropanoidowego	46
1.4.4.1. Biosynteza fenylopropanoidów	46
1.4.4.3. Funkcja fenylopropanoidów w odporności	48
II. CEL PRACY	50
III. MATERIAŁY I METODY.....	51
3.1. Stosowane odczynniki	51
3.2. Przebieg eksperymentów	52
3.2.1. Hodowla roślin w ziemi i inokulacja sporami <i>P. cucumerina</i>	53
3.2.2. Hodowla roślin w warunkach <i>in vitro</i> i traktowanie wzorcem molekularnym flg22	54
3.2.3. Ekstrakcja metabolitów	55
3.2.4. Analizy ultrasprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fotodiodowym i spektrometrem masowym	55
3.2.5. Analiza danych i identyfikacja metabolitów	57
3.2.6. Izolacja genomowego DNA i analiza real-time PCR (qPCR).....	57
3.2.7. Analiza filogenetyczna i wybór genów do analiz ekspresji	59
3.2.8. Izolacja całkowitego RNA i analiza real-time PCR z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) .	60
IV. WYNIKI.....	67
4.1. Zdolność do kolonizacji badanych gatunków Brassicaceae przez <i>P. cucumerina</i>	67
4.2. Identyfikacja metabolitów, których akumulacja była indukowana podczas odpowiedzi immunologicznej badanych gatunków roślin	69
4.2.1. Klasyfikacja metabolitów na podstawie widm absorpcji UV	73
4.2.2. Identyfikacja metabolitów metodami spektrometrii mas	76
4.3. Zróżnicowanie w odpowiedzi metabolomicznej badanych gatunków Brassicaceae	88
4.3.1. Różnice w odpowiedzi na inokulację <i>P. cucumerina</i> lub rozpoznanie flg22.....	88
4.3.2. Zasięg filogenetyczny indukowanych metabolitów	89
4.3.3. Zmiany ilościowe w akumulacji metabolitów.....	90
4.4. Badania filogenetyczne i transkryptomiczne szlaków metabolicznych związanych z odpowiedzią odpornościową	103
V. Dyskusja	112
5.1. Metabolity indolowe w odpowiedzi na inokulację <i>P. cucumerina</i>.....	113
5.1.1. Glukozynolany indolowe i produkty ich metabolizmu	114
5.1.2. Fitoaleksyny	116
5.1.3. Inne związki indolowe	120
5.2. Metabolity szlaku fenylopropanoidowego w odpowiedzi na inokulację <i>P. cucumerina</i> ..	121

5.3. Inne metabolity	124
5.4. Porównanie zmian w akumulacji metabolitów po inokulacji patogenem i rozpoznaniu MAMP	125
5.5. Homologi genów związanych z metabolizmem wtórnym tryptofanu	128
5.6. Podsumowanie	128
VI. WNIOSKI.....	130
VII. STRESZCZENIE	132
VIII. LITERATURA	134

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 1MI3G – 1-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan (neoglukobrassycyna)
- 4CL – ligaza *p*-kumaroilo-koenzymu A (ang. *4-coumarate:coenzyme A ligase*)
- 4-OH-ICN – 4-hydroksy-indolilo-3-karboksynitryl
- 4MI3G – 4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan (4-metoksyglukobrassycyna)
- 4OGlcI3F – 4-*O*- β -D-glukozylo-indolilo-3-formamid
- 4OHI3G – 4-hydroksy-indolilo-3-metyloglukozynolan (4-hydroksyglukobrassycyna)
- 6-GlcO-ICOOGlc – glukozyd glukozo-6-hydroksy-indolilo-3-karboksyłanu
- 6-GlcO-ICOOH – glukozyd kwasu 6-hydroksyindolilo-3-karboksyłowego
- 6-HO-ICOOGlc - ester glukozyowy kwasu 6-hydroksyindolilo-3-karboksyłowego
- AAO1 – oksydaza indolilo-3-acetaldehydu (ang. *Arabidopsis aldehyde oxidase 1*)
- ACD6 – gen związany z przyspieszoną śmiercią komórek (ang. *accelerated cell death 6*)
- ACT- kumaroiltransferaza agmatyny (ang. *agmatine coumaroyl-transferase*)
- amu – jednostka masy atomowej (ang. *atomic mass unit*)
- BABG – glukozydazy brassininy (ang. *brassinin-associated β -glucosidase*)
- bHLH – czynniki transkrypcyjne posiadające domenę typu helisa – pętla – helisa (ang. *basic helix-loop-helix*)
- BLAST – narzędzie bioinformatyczne do porównywania sekwencji genów (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*)
- C4H – hydrolaza kwasu trans-cynamonowego (ang. *cinnamate 4-hydrolase*)
- CCR – reduktaza cynamoilo-koenzymu A (ang. *cinnamoyl-coenzyme A reductase*)
- cDNA – komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)
- CHS – syntaza chalconowa (ang. *chalcone synthase*)
- CID – kolizyjnie indukowana dysocjacja (ang. *collision induced dissociation*)
- CID MS/MS – tandemowa spektrometria mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją (ang. *tandem mass spectrometry with collision induced dissociation*)
- CYP – cytochromy P450
- DAMP – wzorec molekularny związany z uszkodzeniem tkanki roślinnej (ang. *damage-associated molecular pattern*)

DIBOA-Glc – glukozyd 2,4-dihydroksy-1,4-benzoksazyn-3-onu

DIMBOA-Glc – glukozyd 2,4-dihydroksy-7-metoksy-1,4-benzoksazyn-3-onu

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DTC-MT – S-metylotransferaza ditiokarbaminianu (ang. *dithiocarbamate S-methyltransferase*)

ESI – jonizacja przez elektrorozpraszanie (ang. *electrospray ionization*)

ESP – białko specyfikujące promujące powstawanie epitionitryli (ang. *epithionitrile specifier protein*)

ETI – odpowiedź odpornościowa związana z efektorami (ang. *effector-triggered immunity*)

flg22 – 22-aminokwasowy peptyd odpowiadający wysoko zakonserwowanej domenie białka flagelliny

FLS2 – receptor transbłonowy rozpoznający flagellinę (ang. *flagellin sensing 2*)

FOX1 – oksydoreduktaza zależna od flawiny (ang. *flavin-dependent oxidoreductase 1*)

FWHM – szerokość połówkowa (ang. *full width at half maximum*)

GGP – γ -glutamyllopeptydazy (ang. *gamma-glutamylpeptidase*)

GGT – γ -glutamylotranspeptydazy (ang. *gamma-glutamyltranspeptidase*)

GSH – glutation (ang. *glutathione*)

GST – S-transferazy glutationu (ang. *glutathione S-transferase*)

GWAS – badania asocjacyjne całego genomu (ang. *genome-wide association studies*)

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

HCN – cyjanowódór

HCT – transferaza hydroksycynamoilowa (ang. *hydroxycinnamoyl-transferase*)

HDMBOA-Glc – glukozyd 2-hydroksy-4,7-dimetoksy-1,4-benzoksazyn-3-onu

HR – reakcja nadwrażliwości (ang. *hypersensitivity reaction*)

I3A – indolilo-3-amina

I3G – indolilo-3-metyloglukozynolan (glukobrassycyna)

ICOOGlc – ester glukozowy kwasu indolilo-3-karboksylowego

ICOOH – kwas indolilo-3-karboksylowy

IGMT – O-metylotransferazy glukozynolanów indolowych (ang. *indole glucosinolate O-methyltransferase*)

ISCID – kolizyjnie indukowana dysocjacja w źródle (ang. *in source collision induced dissociation*)

LRR-RK – receptor transbłonowy zawierający domenę bogatą w reszty aminokwasu leucyny (ang. *leucine-rich repeat receptor kinase*)

MAMP – wzorec molekularny związany z mikroorganizmem (ang. *microbial-associated molecular pattern*)

MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

Met – metionina

MS – spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*)

MS/MS – tandemowa spektrometria mas (ang. *tandem mass spectrometry*)

MYB – rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. *myeloblastosis*)

MYC – rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. *myelocytomatosis*)

NB-LRR – receptor cytoplazmatyczny, zawierający domenę wiążącą nukleotydy oraz bogatą w reszty aminokwasu leucyny (ang. *nucleotide-binding leucine rich repeat*)

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*)

NSP – białko specyfikujące promujące powstawanie nitryli (ang. *nitrile specifier protein*)

PAD3 – enzym katalizujący przekształcenie kwasu dihydrokamaleksynowego w kamaleksynę (ang. *phytoalexin deficient 3*)

PAL – amoniakoliza fenyloalaniny (ang. *phenylalanine ammonia lyase*)

Pc2127 – *Plectosphaerella cucumerina* szczep 2127

PcBMM – *Plectosphaerella cucumerina* szczep BMM

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PDA – detektor fotodiodowy (ang. *photodiode-array detector*)

PEN2 – myrozynaza związana z hydrolizą glukozyolanów w wyniku rozpoznania patogenu (ang. *penetration 2*)

PEN3 – białko transporterowe związane z odpowiedzią odpornościową po rozpoznaniu patogenu (ang. *penetration 3*)

Phe – fenyloalanina

plazmid Ti – plazmid bakteryjny powodujący powstawanie guzów (ang. *tumor-inducing plasmid*)

ppm – liczba części na milion (ang. *parts per million*)

PR – białka związane z patogenezą (ang. *pathogenesis-related*)

PRR – receptory transmembranowe rozpoznające wzorce (ang. *pattern recognition receptor*)

PTI – odporność indukowana przez wzorce (ang. *pattern-triggered immunity*)

qPCR – ilościowy PCR (ang. *quantitative PCR*)

Qq-ToF – analizator hybrydowy typu podwójny kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu (ang. *quadrupole quadrupole-time of flight*)

QTL – locus cechy ilościowej (ang. *quantitative trait loci*)

RA – kwas raphanusamowy (ang. *raphanusamic acid*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RPM – ilość obrotów na minutę (ang. *revolutions per minute*)

RT-qPCR – ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją (ang. *quantitative reverse transcription PCR*)

SAR – systemiczna odporność nabyta (ang. *systemic acquired resistance*)

SOT – sulfotransferazy (ang. *sulphotransferase*)

SUR1 – liaza typu C-S (ang. *superroot 1*)

T-DNA – transformujący DNA (ang. *transforming DNA*)

TGG – hydrolazy glukozynolanów (ang. *thioglucoside glucohydrolase*)

Trp – tryptofan

TSP – białko specyfikujące promujące powstawanie tiocyjanianów (ang. *thiocyanate specifier protein*)

UGT – glukozylotransferazy (ang. *UDP-glycosyltransferase*)

UPLC – ultrasprawną chromatografię cieczową (ang. *ultra performance liquid chromatography*)

UV – promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet*)

WRKY33 – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny WRKY

I. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1. Układ immunologiczny roślin

1.1.1. Interakcje roślina – mikroorganizm

Rośliny w środowisku naturalnym są w stałym kontakcie fizycznym z licznymi mikroorganizmami, z którymi mogą wchodzić w interakcje o charakterze mutualistycznym lub antagonistycznym. Wśród oddziaływań mutualistycznych wyróżnić można symbiozę, która charakteryzuje się tym, że roślina i mikroorganizm są od siebie wzajemnie uzależnione i niezbędne sobie do rozwoju. Wśród mikroorganizmów mających antagonistyczny wpływ na rozwój roślin występują grzyby, lęgniowce (Oomycetes), pierwotniaki, bakterie, fitoplazmy, wirusy oraz wiroidy. Wszystkie mikroorganizmy, które powodują infekcję i rozwój choroby roślin określa się mianem patogenów. Patogeny mogą powodować takie objawy chorobowe, jak: zmiany zabarwienia (białaczka, żółtaczka, chloroza), nekrozy (zgnilizny, zgorzele), więdnienie, zniekształcenia (m. in. skarłowacenie, dziwotwory, kędzierzowatość), narośle, czy zrakowacenia. Większość, bo około 98% chorób roślin powodują patogenne grzyby i lęgniowce (ponad 80 000 jednostek chorobowych opisanych w literaturze) [1]. Ze względu na przebieg infekcji, mikroorganizmy patogenne można podzielić na nekrotrofy, biotrofy i hemibiotrofy. Nekrotrofy uśmiercają zainfekowane komórki roślinne, by żywić się i rozwijać na martwej tkance. Z kolei biotrofy po zainfekowaniu rośliny odżywiają się i rozwijają na żywej tkance roślinnej. Hemibiotrofy w początkowej fazie infekcji zachowują się jak patogeny biotroficzne, by w późniejszym stadium rozwijać się w sposób typowy dla mikroorganizmów nekrotroficznych.

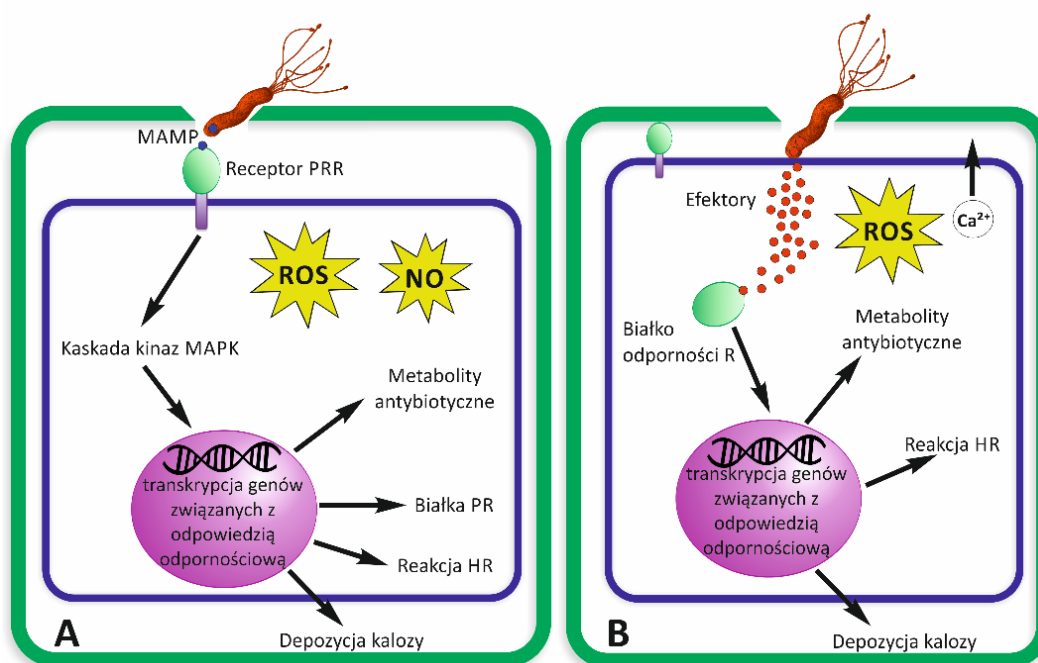
1.1.2. Formy odporności

W odróżnieniu od zwierząt kręgowych, u których można rozróżnić odporność wrodzoną (nieswoistą) i nabytą (swoistą), rośliny posiadają jedynie wrodzone mechanizmy odpornościowe. Rozpoznanie patogenu powoduje rozległe zmiany w transkrypcji genów roślinnych, w wyniku czego następuje wzmożona ekspresja genów związanych z odpowiedzią odpornościową oraz uruchomienie specyficznych szlaków sygnałowych związanych z fitohormonami, takimi jak kwas salicylowy, kwas jasmonowy czy etylen.

1.1.2.1. Konstrytywne bariery obronne

Pierwszą linię obrony roślin przed patogenami stanowią konstrytywne bariery ochronne, wśród których wyróżnia się bariery fizyczne – kutikula oraz ściana komórkowa [2], a także produkowane w sposób konstrytywny metabolity o charakterze antybiotycznym [3]. Kutikula

znajduje się w zewnętrznej warstwie epidermy wszystkich naziemnych organów roślinnych i składa się głównie z kutyny oraz wosków [4]. Z kolei ściana komórkowa otacza każdą komórkę roślinną i składa się z celulozy, hemicelulozy, pektyn, białek oraz lignin [5]. Te dwie struktury chronią rośliny zarówno przed patogenami i owadami, jak i przed stresami abiotycznymi. Stanowią barierę, której nie jest w stanie sforsować większość patogenów bakteryjnych, mogących przedostawać się do tkanek roślinnych głównie przez aparaty szparkowe lub poprzez zranienia. Patogeny grzybowe, lęgniowce, czy niektóre bakterie posiadają enzymy degradujące struktury ściany komórkowej i kutikuli. Dodatkowo grzyby i lęgniowce mają zdolność do mechanicznego uszkodzenia ściany komórkowej oraz warstwy kutikularnej przez rozwijające się na powierzchni rośliny strzępki grzybni, które penetrują komórki roślinne. [6].



Ryc. 1.1. Schemat przedstawiający roślina mechanizmy odpowiedzi odpornościowej
 A - odporność indukowana przez wzorce molekularne związane z mikroorganizmem (MAMP)
 B - odporność indukowana przez efekторы

1.1.2.2. Odporność indukowana przez wzorce molekularne związane z mikroorganizmami

Roślina mechanizmy odpornościowe mogą być uruchamiane jeszcze przed przedostaniem się potencjalnego patogenu do tkanki roślinnej. Ten typ odpowiedzi odpornościowej określa się jako tak zwana odporność indukowana przez wzorce (PTI; ang. *pattern-triggered immunity*), czyli odpowiedź odpornościowa, która jest uruchamiana po rozpoznaniu na powierzchni komórki wzorca

molekularnego związanego z mikroorganizmem (MAMP; ang. *microbial-associated molecular pattern*) [7] (Ryc. 1.1.A). Wzorce molekularne pochodzą z reguły od makrocząsteczek niezbędnych dla podstawowych funkcji życiowych mikroorganizmów, dlatego też są one zwykle szeroko zakonserwowane wśród potencjalnych patogenów [8]. MAMP są rozpoznawane przez wyspecjalizowane receptory transmembranowe PRR (ang. *pattern recognition receptor*), znajdujące się na powierzchni komórki roślinnej (Ryc. 1.1.A). Przyłączenie specyficznego wzorca do receptora PRR prowadzi do indukcji odpowiedzi odpornościowej typu PTI [9]. Mechanizm rozpoznania MAMP badany był na przykładzie receptora FLS2 (ang. *flagellin sensing 2*), z *Arabidopsis thaliana*. Jest to transbłonowy receptor typu LRR-RK (ang. *leucine-rich repeat receptor kinase*), który specyficznie rozpoznaje białko wici bakteryjnej flagelinę [10]. Kluczowa dla rozpoznania tego wzorca jest 22-aminokwasowa sekwencja znajdująca się na N-końcu łańcucha peptydowego, która jest wysoce zakonserwowana i stanowi epitop dla receptora FLS2. Dlatego też analogiczny 22-aminokwasowy peptyd (flg22), posiada zdolność do indukowania odpowiedzi odpornościowej PTI. Uruchomienie receptora PRR prowadzi do dalszego przekazywania sygnału do wnętrza komórki, poprzez specyficzne kaskady kinaz, co w efekcie powoduje zmianę w transkrypcji wielu genów związanych z odpowiedzią odpornościową. W *A. thaliana* liczba genów, które ulegają zmienionej transkrypcji wynosi nawet kilka tysięcy [11], a pierwsze zmiany w transkryptomie obserwuje się już po 15 minutach od traktowania flg22 [12]. Odpowiedź odpornościowa PTI obejmuje produkcję reaktywnych form tlenu (ROS; ang. *reactive oxygen species*) i azotu (np. tlenek azotu), biosyntezę metabolitów antybiotycznych oraz białek związanych z patogenezą (PR; ang. *pathogenesis-related*) [8]. W wyniku uruchomienia odpowiedzi odpornościowej PTI dochodzi także do zmian w budowie ściany komórkowej, które obejmują depozycję kalozy – polisacharydu zbudowanego z reszt glukozy połączonych wiązaniami β -1,3 (Ryc. 1.1.A).

1.1.2.3. Odporność indukowana przez efekторы

Odporność PTI może być przełamywana przez mikroorganizmy patogenne poprzez sekrecję efektorów bezpośrednio do cytoplazmy komórki gospodarza (Ryc. 1.1.B), co w konsekwencji prowadzi do wrażliwości indukowanej przez efekторы (ang. *effector-triggered susceptibility*) [13]. Szacuje się, że pojedynczy szczep mikroorganizmu patogenicznego może produkować około 20–30 różnych efektorów [14], które są zazwyczaj molekułami o charakterze białkowym. Efekторы mogą być rozpoznawane w roślinach przez kolejny rodzaj receptorów – wewnątrzkomórkowe białka odporności R (Ryc. 1.1.B) [15]. Białka odporności R są receptorami typu NB-LRR (ang. *nucleotide-binding leucine rich repeat*), które posiadają domenę wiążącą nukleotydy oraz domenę bogatą w reszty aminokwasu leucyny. Białka odporności R mogą rozpoznawać efekторы w sposób bezpośredni przez wiązanie efektora do białka R lub w sposób pośredni poprzez wiązanie efektora do białka pomocniczego będącego częścią kompleksu białka R [14]. Badania profili transkryptomu roślinnego

wykazały, że działanie białek R może powodować zmiany w transkrypcji od stu do tysiąca genów potencjalnie związanych z odpowiedzią odpornościową, wśród których znajduje się wiele genów związanych z przekazywaniem sygnałów lub kodujących czynniki transkrypcyjne [16-18].

Uruchomienie białek odporności R prowadzi do indukcji odpowiedzi odpornościowej związanej z efektorami – ETI (ang. *effector-triggered immunity*). Ponieważ dane białko R jest specyficzne dla konkretnego efektora, odpowiedź odpornościowa ETI jest określana jako odporność gen na gen [18, 19]. Uruchomienie odpowiedzi odpornościowej ETI, podobnie jak w przypadku PTI prowadzi do wielu zmian w zainfekowanej komórce roślinnej. Zalicza się do nich natychmiastowy wypływ jonów wapnia Ca^{2+} do cytoplazmy, tak zwany wybuch tlenowy, czyli nagłe uwolnienie reaktywnych form tlenu, aktywacja kinaz białkowych indukowanych mitogenem (MAPK; ang. *mitogen-activated protein kinase*), zmiany w ekspresji genów, czy depozycja kalozy w ścianie komórkowej (Ryc. 1.1.B) [14]. Ponadto, forma odporności ETI jest związana również z reakcją nadwrażliwości – HR (ang. *hypersensitivity reaction*) (Ryc. 1.1.B), która prowadzi do kontrolowanej apoptozy zainfekowanych komórek roślinnych, zapobiegając dalszemu rozwojowi infekcji.

1.1.2.4. Odporność systemiczna

Odpowiedź odpornościowa typu PTI, czy ETI ma charakter lokalny i jest ograniczona jedynie do komórek lub tkanek zainfekowanych przez mikroorganizm patogenny. Dodatkowo rośliny są zdolne do uruchamiania odpowiedzi odpornościowej, obejmującej cały organizm, tak zwanej systemicznej odporności nabytej (SAR; ang. *systemic acquired resistance*) lub systemicznej odporności indukowanej (ang. *induced systemic resistance*), które mogą być uruchamiane odpowiednio przez bakterie patogene kolonizujące części naziemne rośliny [20] lub kolonizujące korzenie bakterie endofityczne [21]. Odpowiedź odpornościowa SAR może być dziedziczona bezpośrednio w kolejnym pokoleniu roślin potomnych poprzez zmiany w strukturze chromatyny [22], a jej indukcja może zachodzić poprzez działanie szeregu różnych metabolitów, takich jak kwas salicylowy z jego metylovaną pochodną, czy fosforan-3-glicerolu [23].

1.2. Metabolity wtórne w odpowiedzi odpornościowej roślin

Metabolity wtórne są grupą niskocząsteczkowych związków chemicznych naturalnego pochodzenia. W przeciwieństwie do metabolitów pierwotnych (np. aminokwasy, cukry, tłuszcze) nie są one niezbędne dla podstawowych procesów życiowych, ale są wykorzystywane w kontakcie rośliny ze środowiskiem zewnętrznym, zarówno ożywionym, jak i nieożywionym [24]. Metabolity wtórne cechują się ogromnym zróżnicowaniem strukturalnym, a występowanie poszczególnych związków jest często ograniczone do małych grup filogenetycznych roślin, obejmujących najczęściej taksony należące do tej samej rodziny lub rodzaju [25, 26]. Pomimo tego, że zidentyfikowano dotąd już ponad

200 000 metabolitów wtórnych, to mechanizmy będące podstawą zdolności roślin do generowania zmienności chemicznej metabolitów pozostają dotąd nieznane [27].

Metabolity wtórne pełnią funkcje w kontakcie rośliny z mikroorganizmami, zarówno patogennymi, jak i symbiotycznymi. Mogą mieć działanie ochronne przed owadami roślinożernymi, a z drugiej strony mogą działać jako atraktanty dla owadów i zwierząt biorących udział w zapylaniu kwiatów, czy przenoszeniu nasion. Metabolity wtórne są również produkowane w odpowiedzi rośliny na niekorzystne warunki środowiskowe lub w ramach oddziaływań allelopatycznych z innymi roślinami. Poza licznymi funkcjami biologicznymi pełnionymi w roślinie związki te mogą być również wykorzystywane przez ludzi. Wśród metabolitów wtórnych występują związki o działaniu prozdrowotnym [28], które posiadają między innymi właściwości przeciwutleniające, obniżające ryzyko powstawania nowotworów [29], czy działanie przeciwwirusowe [30]. Roślinne metabolity wtórne oraz ich pochodne stanowią bazę w procesie projektowania leków, mogą być również wykorzystywane w produkcji środków zapachowych i barwników.

Biosynteza antybiotycznych metabolitów wtórnych jest jednym z istotnych i jednocześnie najdłużej badanych mechanizmów odpowiedzi odpornościowej roślin [31, 32]. Mechanizm ten jest powszechny w królestwie roślin, jednak wśród produkowanych metabolitów istnieje duże zróżnicowanie strukturalne. Biosynteza tych związków może być indukowana zarówno przez biotyczne, jak i abiotyczne czynniki stresowe. Wśród czynników biotycznych indukujących akumulację metabolitów występują owady roślinożerne, jak również mikroorganizmy patogene [33-35]. Akumulacja metabolitów wtórnych w odpowiedzi odpornościowej może być indukowana również na skutek wykrycia MAMP, jak w przypadku działania chityny, która powoduje indukcję biosyntezy metabolitów antybiotycznych w ryżu [36]. Wśród czynników abiotycznych powodujących zwiększenie biosyntezy metabolitów wtórnych wymienić można jony metali ciężkich, promieniowanie UV, czy nadtlenek wodoru [37, 38].

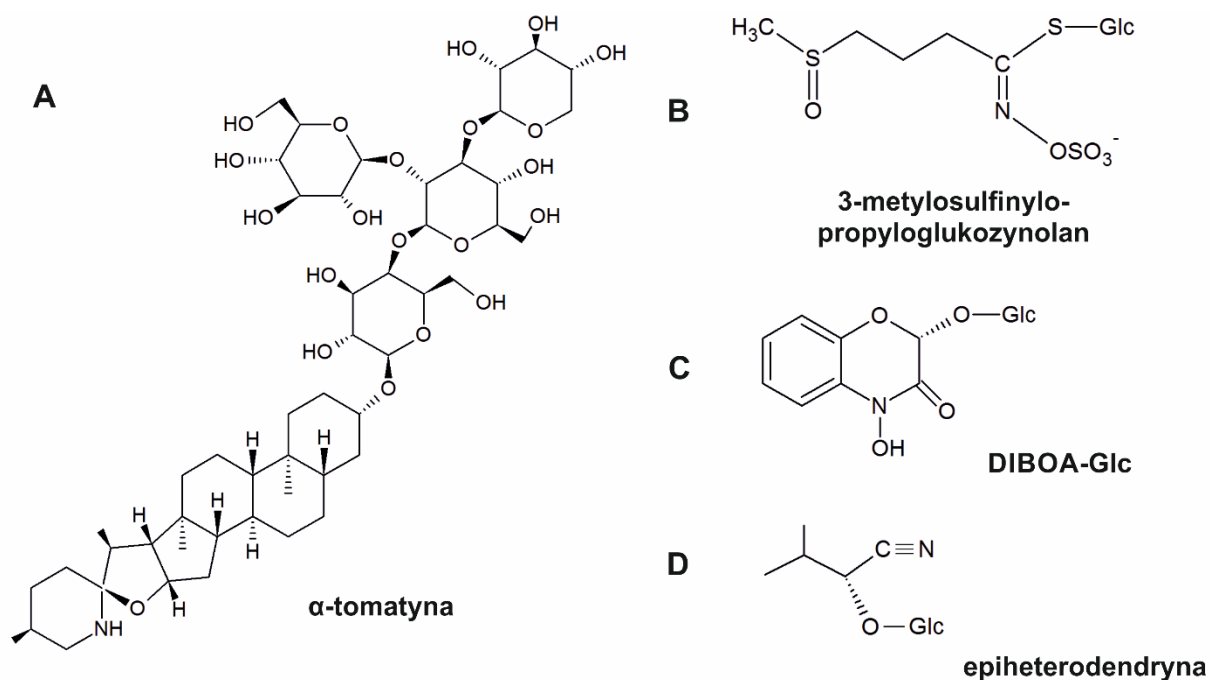
Znakomitą większość metabolitów wtórnych, które są produkowane w roślinach w odpowiedzi na infekcję zidentyfikowano w gatunkach użytecznych gospodarczo, takich jak zboża, rośliny warzywne, czy krzewy i drzewa owocowe, na których prowadzone są liczne badania mające na celu ciągle ulepszanie upraw i zwiększanie plonów. Badania, których celem jest poznanie funkcji metabolitów wtórnych prowadzone są na gatunkach modelowych, jak *A. thaliana*, dla których otrzymanie informacji o funkcji metabolitów w odporności może być łatwiejsze i szybsze ze względu na opracowane liczne narzędzia molekularne. Co istotne, uzyskana w ten sposób wiedza często może być przeniesiona na gatunki o znaczeniu gospodarczym.

1.2.1. Systematyka metabolitów związanych z układem immunologicznym

Metabolity pełniące funkcje w odpowiedzi odpornościowej mogą być klasyfikowane według kilku różnych kryteriów, do których zalicza się między innymi struktura związku, czy wspólny prekursor. Powszechnie stosowanym podziałem jest też sposób biosyntezy i akumulacji metabolitów, według którego dzieli się je na dwie grupy: fitoantycypiny oraz fitoaleksyny [39]. Fitoantycypiny stanowią grupę metabolitów syntetyzowanych konstytutywnie [39], z kolei fitoaleksyny (z gr. phyton- roślina, alexis- obrona) są metabolitami, które w warunkach normalnego wzrostu występują w znikomych ilościach, a ich stężenie wzrasta znacznie w odpowiedzi na działanie stresów biotycznych i abiotycznych [32]. Należy zaznaczyć jednak, że ten sam związek może mieć charakter fitoantycypiny lub fitoaleksyny w różnych gatunkach lub nawet w różnych organach tej samej rośliny. Przykładem takiego związku jest sakuranetyna – flawanon o charakterze antybiotycznym, który jest produkowany konstytutywnie między innymi w tkankach czarnej porzeczki (*Ribes nigrum*) [40], ale w liściach ryżu (*Oryza sativa*) jest biosyntetyzowany *de novo* w przypadku infekcji patogenem [41].

1.2.1.1. Fitoantycypiny

Fitoantycypiny, termin pierwszy raz użyty przez VanEttena i współpracowników [39], stanowią pierwszą linię obrony podczas inwazji rośliny przez patogeny. Są to niskocząsteczkowe metabolity o charakterze antybiotycznym, które są syntetyzowane konstytutywnie lub uwalniane z konstytutywnie obecnych prekursorów po rozpoznaniu obecności patogenu. Wiele fitoantycypin występuje w formie glikozydów i jest aktywowanych poprzez odłączenie reszty cukrowej przez odpowiednie glikozydazy [42]. Początkowo przypuszczano, że aktywacja fitoantycypin zachodzi w przypadku zniszczenia tkanki przez patogeny, jednak obecnie wiadomo, że pewne fitoantycypiny mogą być aktywowane jeszcze przed wtargnięciem patogenu do komórki, jako elementy tak zwanej przedinwazyjnej odpowiedzi odpornościowej [34, 43]. Fitoantycypiny są zróżnicowaną grupą metabolitów wtórnych, wśród dobrze zbadanych klas tych związków wyróżnić można między innymi saponiny, glukozynolany, glikozydy benzoksazyonów i glikozydy cyjanogenne (Ryc. 1.2).



Ryc. 1.2. Przykładowe struktury fitoantycypin należących do saponin (A), glukozynolanów (B), glikozydów benzoksazynonów (C) oraz glikozydów cyjanogennych (D)

1.2.1.1.1. Saponiny

Saponiny są to występujące w wielu gatunkach roślin glikozydy, które ze względu na strukturę chemiczną ich aglikonów, można podzielić na trzy główne grupy: triterpenoidy, steroidy i glikoalkaloidy steroidowe [44]. Działanie antybiotyczne saponin opiera się na zdolności do przerywania integralności błony komórkowej patogenu poprzez wiązanie do steroli błonowych [45]. Przykładem dobrze scharakteryzowanych pod względem funkcjonalnym saponin są triterpenoidowe awenacyny, występujące w korzeniach owsa [46]. Wykazano, że mutanty *sad* (ang. *saponin-deficient*), z defektem w biosyntezie awenacyń charakteryzowały się większą podatnością na patogeny grzybowe z rodzaju *Gaeumannomyces* i *Fusarium* [47]. Wśród saponin wymienić można również α -tomatynę (Ryc. 1.2.A) – związek z grupy glikoalkaloidów steroidowych, zidentyfikowany w tkankach pomidora. Działanie antybiotyczne α -tomatyny, oprócz działania na błonę komórkową patogenu, może opierać się na aktywacji kinazy fosfotyrozynowej, co prowadzi do uwolnienia dużej ilości reaktywnych form tlenu (wybuch tlenowy) i uruchomienia programowanej śmierci komórki patogenu [48].

1.2.1.1.2. Glukozynolany

Szeroko badaną grupą fitoantycypin są również glukozynolany (Ryc. 1.2.B), β -tioglikozydy będące pochodnymi różnych aminokwasów, zarówno alifatycznych (alanina, leucyna, izoleucyna,

walina i metionina), jak i aromatycznych (tryptofan, fenyloalanina i tyrozyna) [49]. Glukozynolany są produkowane głównie przez gatunki należące do rzędu Brassicales [50]. Związki te są nieaktywne biologicznie, jednak rozpoznanie przez roślinę potencjalnych patogenów może aktywować ich hydrolizę katalizowaną przez wyspecjalizowane enzymy – β -tioglukozydazy (myrozynazy). Na skutek tej reakcji powstają aktywne biologicznie produkty, wśród których wyróżnić można izotiocyjaniiny, charakteryzujące się wysoką reaktywnością chemiczną [51]. Związki te oprócz funkcji w odporności na infekcję mają działanie odstraszające owady [52].

1.2.1.1.3. Glukozydy benzoksazynonów

Kolejną grupą metabolitów wtórnych pełniących funkcje w odpowiedzi odpornościowej roślin są glukozydy benzoksazynonów (Ryc. 1.2.C), występujące głównie w gatunkach należących do rodziny traw (Poaceae), jak również w kilku gatunkach dwuliściennych [53]. Do głównych związków należących do tej grupy zaliczyć można glukozyd 2,4-dihydroksy-7-metoksy-1,4-benzoksazyn-3-onu (DIMBOA-Glc) i glukozyd 2,4-dihydroksy-1,4-benzoksazyn-3-onu 9 (DIBOA-Glc) (Ryc. 1.2.C). Związki te są biologicznie aktywne w formie aglikonów, dla których wykazano aktywność przeciwko patogenom grzybowym w warunkach *in vitro* [54]. Deglukozylacja benzoksazynonów jest katalizowana przez odpowiednie β -glukozydazy, które w warunkach normalnego wzrostu rośliny znajdują się w odmiennych kompartmentach komórki [42]. Istotną funkcję benzoksazynonów w odpowiedzi odpornościowej potwierdza fakt, że mutanty *bx1* (ang. *benzoxazineless1*) charakteryzujące się obniżonym poziomem biosyntezy tych związków wykazują dużo większą podatność na penetrację przez patogen grzybowy *Setosphaeria turcica* [34].

1.2.1.1.4. Glikozydy cyjanogenne

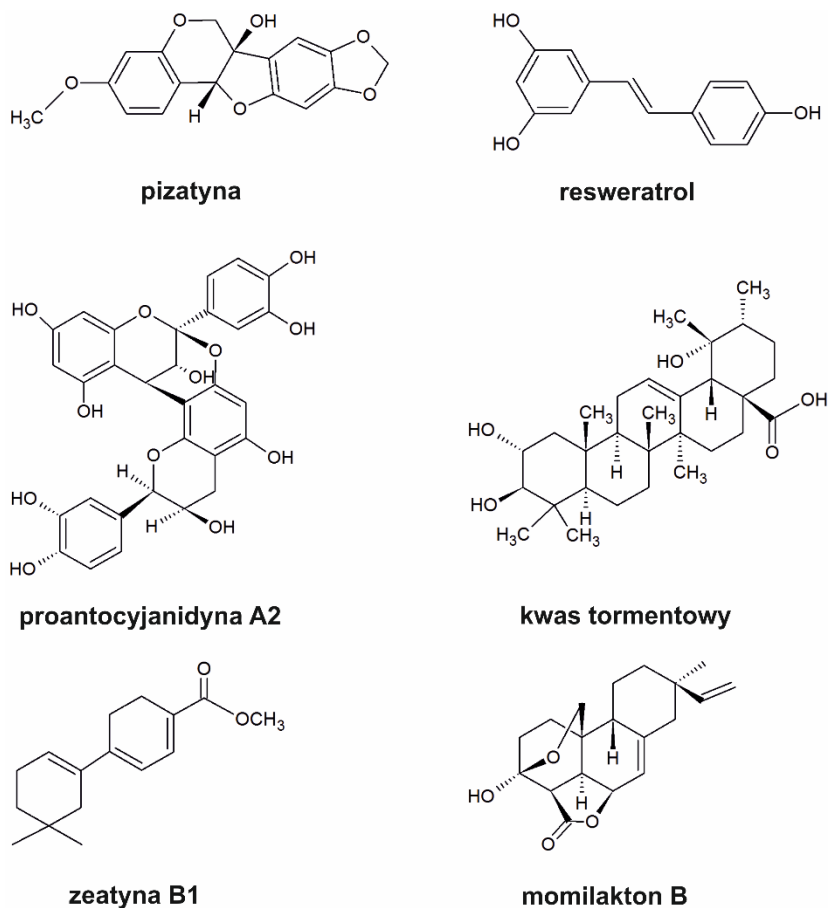
Grupą niskocząsteczkowych metabolitów, które mogą pełnić funkcje fitoantycypin są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin glikozydy cyjanogenne (Ryc. 1.2.D) [55]. Związki te są β -D-glikozydami α -hydroksynitryli, będących pochodnymi wybranych aminokwasów (tyrozyny, fenyloalaniny, waliny, leucyny i izoleucyny) i podobnie jak glukozynolany są nieaktywne biologicznie [56]. Biologicznie aktywnym produktem hydrolizy glikozydów cyjanogennych jest cyjanowodór (HCN). Wykazano, że metabolit ten pełni funkcję repelentu w interakcji rośliny z owadami, ale dotąd nie udowodniono jednoznacznie roli tego związku w odpowiedzi odpornościowej przeciwko mikroorganizmom patogennym [55]. W doświadczeniach, w których przeprowadzono komplementację szlaku hydrolizy glukozydu cyjanogennego u jęczmienia, obserwowano zahamowanie kolonizacji komórek przez *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, będącym obligatoryjnym mączniakiem właściwym tego gatunku [57]. Sugeruje to, że cyjanowodór powstały w wyniku hydrolizy glikozydów cyjanogennych może hamować rozwój patogenów biotroficznych.

1.2.1.2. Fitoaleksyny

Fitoaleksyny jako funkcjonalna grupa metabolitów są badane od ponad stu lat. Pierwszą wzmiankę dotyczącą fitoaleksyn datuje się na 1911 rok, kiedy to francuski botanik Noel Bernard odkrył, że rośliny produkują substancje antybiotyczne, występujące jedynie po zainfekowaniu ich przez patogeny grzybowe [58]. Określenie fitoaleksyna zostało użyte po raz pierwszy w 1940 roku przez Müllera i Börgera, którzy zdefiniowali fitoaleksyny jako związki chemiczne produkowane *de novo* przez żywe komórki na skutek inwazji pasożyta [32]. W miarę powiększania się zasobów wiedzy dotyczącej fitoaleksyn, ich definicja zmieniała się. Paxton w pracy przeglądowej z 1981 roku zdefiniował fitoaleksyny jako niskocząsteczkowe metabolity antybiotyczne, syntetyzowane i akumulowane w roślinie po jej ekspozycji na działanie mikroorganizmów patogennych [59].

Pierwszą zidentyfikowaną fitoaleksyną była pizatina (Ryc. 1.3), którą wyizolowano w 1960 roku z tkanek grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) po infekcji patogenem grzybowym *Sclerotinia fructicola* oraz siedmioma innymi patogenami roślin [60]. Od tamtego czasu zidentyfikowano ponad trzysta pięćdziesiąt fitoaleksyn w około stu gatunkach roślin należących do gromady nago- i okrytonasiennych [61, 62]. Poznane dotąd fitoaleksyny charakteryzują się wysoką heterogenicznością pod względem struktury chemicznej (Ryc. 1.3), co więcej, wykazują aktywność biologiczną *in vitro* przeciwko dużej liczbie mikroorganizmów patogennych. Uważa się je również za markery molekularne odpowiedzi odpornościowej roślin [63].

Fitoaleksyny są wysoce zróżnicowaną grupą metabolitów (Tabela 1.1) (Ryc. 1.3). Poszczególne klasy tych związków są charakterystyczne dla wąskich grup filogenetycznych roślin. Przykładowo rośliny należące do rzędu Brassicales produkują prawie wyłącznie fitoaleksyny należące do grupy alkaloidów, pochodnych tryptofanu [64]. W przeciwieństwie do roślin krzyżowych, których większość fitoaleksyn należy do jednej klasy związków, rośliny z rodziny wiechlinowatych (Poaceae) produkują związki antybiotyczne należące do kilku różnych grup, wśród których wymienić można flawonoidy, terpeny, czy fenyloamidy (Tabela 1.1).



Ryc. 1.3. Przykładowe struktury fitoaleksyn należących do różnych klas metabolitów wtórnych

Szczególną pod tym względem fitoaleksyną jest należący do stilbenów resweratrol (Ryc. 1.3), występujący w gatunkach, które nie są ze sobą blisko spokrewnione. Związek ten został opisany u przedstawicieli winoroślowatych (Vitaceae), motylkowatych (Fabaceae), w roślinach jagodowych i w pomidorze, a nawet w sosnowatych (Pinaceae), należących do roślin nagonasiennych [65, 66]. Obecność tego związku w wielu niespokrewnionych gatunkach wynika z faktu, że jego biosynteza wymaga tylko jednego enzymu – syntazy stilbenowej, który jest mutantem syntazy chalconowej, powszechnej w królestwie roślin. W związku ze stosunkowo prostym szlakiem biosyntezy resweratrol jest związkiem stosowanym w inżynierii metabolicznej. W badaniach funkcji *in planta* tego związku wykazano, że jego biosynteza w tytoniu, w którym nie występuje naturalnie, powodowała zwiększoną odporność na infekcję przez *Botrytis cinerea*, co dodatkowo podkreśla znaczenie resweratrolu w odpowiedzi odpornościowej roślin [67].

Tabela 1. Różnorodność fitoaleksyn indukowanych w roślinach na skutek działania biotycznych i abiotycznych czynników stresowych (częściowo na podstawie Ahuja & Kissen 2012 [63]); czynniki stresowe oznaczone odpowiednio: A – bakterie, B – grzyby, C – łęgniowce, D – wirusy, E – MAMP

Rodzina	Gatunek	Czynnik stresowy	Klasa związku	Fitoaleksyna
Brassicaceae (kapustowate)	<i>A. thaliana</i> (rzodkiewnik pospolity)	A, B, C, D, E	indolowy	kamaleksyna [68]
Cucurbitaceae (dyniowate)	<i>Cucumis sativus</i> (ogórek siewny)	B	flawonoidy	kukumeryna A i B [69]
Fabaceae (motylkowate)	<i>Medicago sativa</i> (lucerna siewna)	A, B	flawonoidy/ izoflawonoidy	medikarpina, westitol, westiton, satiwina
	<i>Medicago truncatula</i> (lucerna)	B		medikarpina
	<i>Cicer arietinum</i> (ciecierzyca pospolita)	E		medikarpina, maakianina
	<i>Pisum sativum</i> (groch zwyczajny)	B, E		pizatyna
	<i>Glycine max</i> (soja warzywna)	B	prenylowane pterokarpany	glyceolliny
	<i>Lupinus angustifolius</i> (łubin wąskolistny)	B		luteon, witeon
	<i>Phaseolus vulgaris</i> (fasola zwyczajna)	B		fazeolina [70]
	<i>Arachis hypogaea</i> (orzacha podziemna)	B		stilbeny

Pinaceae (sosnowate)	<i>Pinus resinosa</i> (sosna czerwona)	B	stilbeny	pinosylwina i jej pochodna eterowa [71]
	<i>Pinus taeda</i> (sosna taeda)			pinosylwina, resweratrol [71]
	<i>Pinus taeda</i> (sosna taeda)		flawonoidy	pinocembryna [72]
	<i>Pinus radiata</i> (sosna kalifornijska)		kwasy karboksylowe	kwask benzoesowy [73]
	<i>Pseudotsuga menziessi</i> (daglezja zielona)		flawonoidy	dihydroflawonol, dihydrokwercetyna, taksyfolina [74]
	<i>Picea abies</i> (świerk pospolity)		lignany	hydroksymatairesinol [75]
	<i>Cupressus sempervirens</i> (cyprys wiecznie zielony)		węglowodory aromatyczne	glikozydy tropolonów [76]
Poaceae (wiechlinowate)	<i>Zea mays</i> (kukurydza zwyczajna)	B	terpenoidy	kauraleksyny, zealeksyny
		B, E	benzoksazynony	HDMBOA-Glc [77]
	<i>Avena sativa</i> (owies zwyczajny)	B, E	fenolowe	awenantramidy
	<i>Oryza sativa</i> (ryż siewny)	B, E	diterpenoidy,	momilaktony A i B, fitokassany, oryzaleksyny
			flawonoidy	sakuranetyna
			fenyloamidy	N- <i>p</i> -kumaroylserotonina, N-feruloyltryptamina, N-feruloylserotonina [78]
<i>Sorghum bicolor</i> (sorgo dwubarwne)	B, E	flawonoidy	3-deoksyantocyjanidyny, luteolina, apigenina	
<i>Hordeum vulgare</i> (jęczmień zwyczajny)	B	flawonoidy	dihydrokwercetyna [79]	

Rosaceae (rózowate)	<i>Fragaria x ananassa</i> (poziomka truskawka)	B	polifenole	proantocyjanidyny [80]
			triterpeny	kwas euskafowy, tormentowy i myriantowy [81]
	<i>Malus domestica</i> (jabłoń domowa)	B	fenolowe	bifenyle, dibenzofurany [82]
Solanaceae (psiankowate)	<i>Nicotiana tabacum</i> (tytoń szlachetny)	B	bicykliczne seskwiterpeny,	kapsidiol,
			kumaryny	skopoletyna
	<i>Capsicum annuum</i> (papryka roczna)	E	bicykliczne seskwiterpeny	kapsidiol
	<i>Solanum tuberosum</i> (ziemniak)	B	alkaloidy	solanina [83]
seskwiterpeny			rizytyna [84]	
Vitaceae (winoroślowate)	<i>Vitis vinifera</i> (winorośl właściwa)	B	stilbeny	resweratrol i jego pochodne

1.3. *Arabidopsis thaliana* i inne gatunki z rodziny Brassicaceae jako rośliny modelowe

Arabidopsis thaliana (rzodkiewnik pospolity) jest powszechnie występującym gatunkiem rośliny zielnej z rodziny Brassicaceae (krzyżowe lub kapustowate), który można znaleźć na niemalże wszystkich kontynentach. Jest rośliną jednoroczną, kwitnie wiosną (kwiecień – maj), czasem drugi raz jesienią. Zajmuje siedliska mało wymagające, takie jak ugory, wysypiska, przydroża, ogrody, mury, skarpy. Nie jest rośliną użyteczną gospodarczo, jednak wśród gatunków blisko spokrewnionych z *A. thaliana* występują rośliny olejodajne (rzepak, rzepik), warzywa (kapusta, rzepa, kalafior, brokuł, rzodkiew), czy przyprawy (chrzan, gorczyca). Rzodkiewnik został wzięty pod uwagę jako gatunek modelowy w genetyce roślin po raz pierwszy w 1943 roku przez Friedricha Laibacha [85], który wcześniej opublikował informację dotyczącą liczby chromosomów tego gatunku [86], a także uzyskał szereg mutantów *A. thaliana*, wygenerowanych z użyciem promieniowania X. W latach 80. XX wieku genetycy roślin docenili takie cechy rzodkiewnika jak łatwość hodowli w warunkach laboratoryjnych, mały rozmiar, łatwość krzyżowania, czy krótki czas otrzymywania kolejnych generacji roślin [87]. Wszystkie te własności *A. thaliana* stanowiły od początku o dużej użyteczności tego gatunku w eksperymentach genetycznych, jednak przełomem w badaniach rzodkiewnika było

zsekwencjonowanie i publikacja jego kompletnego genomu w 2000 roku [88]. Należy zaznaczyć, że był to pierwszy całkowicie poznany genom roślinny i jeden z pierwszych genomów eukariotycznych.

1.3.1. Rozwój narzędzi molekularnych w badaniach *A. thaliana*

Istotnym dla badań *A. thaliana* było opracowanie niezwykle łatwej i efektywnej metody transformacji poprzez zanurzanie kwiatostanów w zawiesinie *Agrobacterium tumefaciens*, (ang. *floral dip*) [89]. Umożliwiło to nie tylko efektywne tworzenie linii transgenicznych, ale także opracowanie metody mutagenyzy insercyjnej opartej na losowym uszkodzeniu genów rzodkiewnika egzogennym DNA, co z kolei doprowadziło do utworzenia szeregu kolekcji mutantów T-DNA (transformujący DNA) [90]. Kolekcje te początkowo miały na celu uproszczenie eksperymentów klonowania zmutowanych genów w podejściu klasycznej genetyki (ang. *forward genetics*), które polega na definiowaniu genetycznych podstaw odpowiedzialnych za określony fenotyp. Kolekcje mutantów insercyjnych tworzone z użyciem odpowiednio zmodyfikowanego plazmidu Ti (ang. *tumor-inducing plasmid*) *A. tumefaciens* o znanej sekwencji, co umożliwiło szybką identyfikację miejsc insercji w genomie poprzez sekwencjonowanie, a nie w oparciu o fenotyp mutantu, który nie zawsze w sposób widoczny różni się od typu dzikiego. Było to pierwszym krokiem w badaniach wykorzystujących podejście odwrotnej genetyki (ang. *reverse genetics*), które polega na definiowaniu funkcji genów na podstawie efektów fenotypowych wynikających z ich specyficznego uszkodzenia. Warto również zaznaczyć, że metody mutagenyzy insercyjnej, opracowane dla rzodkiewnika, zostały w późniejszym czasie zastosowane do badań gatunków istotnych gospodarczo, takich jak ryż, czy kukurydza [91, 92].

Poznanie genomu *A. thaliana* umożliwiło rozwój wielu narzędzi bioinformatycznych, niezwykle przydatnych w badaniach dotyczących biologii roślin. Jednym z takich narzędzi jest serwis GENEVESTIGATOR, służący do analiz ekspresji genów w badaniach biologii roślin, jak również w eksperymentach biofarmaceutycznych i medycznych. Bazy danych tego serwisu zawierają wyniki otrzymane w eksperymentach mikromacierzowych oraz głębokiego sekwencjonowania RNA. Część dotycząca badań roślin obejmuje kilkanaście gatunków modelowych, jednak pod względem liczby dostępnych danych *A. thaliana* jest gatunkiem wyraźnie dominującym nad pozostałymi (Tabela 1.2.). Ogromna liczba dostępnych danych mikromacierzowych dla tego gatunku sprawia, że rzodkiewnik jest dobrym modelem do prowadzenia analiz koekspresji.

Tabela 1.2. Wybrane gatunki roślin i odpowiadające im zasoby danych dostępne w bazie serwisu GENEVESTIGATOR (https://genevestigator.com/gv/doc/intro_plant.jsp; dostęp: 19.09.2017)

Organizm	Liczba eksperymentów	Liczba prób	Liczba warunków	Liczba genotypów
Rzodkiewnik	667	11 790	1 847	1 161
Ryż	130	2 527	324	368
Pszenica	97	2 754	568	413
Lucerna	49	691	153	59
Pomidor	30	508	65	50
Tytoń	4	150	4	4

Poza licznymi narzędziami molekularnymi, poznanie genomu *A. thaliana* dało podstawy do zrealizowania kolejnych projektów dotyczących genetyki rzodkiewnika. Wśród nich wyróżnić należy projekt 1001 genomów, którego celem było zbadanie zmienności gatunkowej wśród 1001 linii wsobnych *A. thaliana*, wyprowadzonych poprzez naturalną selekcję, pochodzących z terenów Eurazji, Ameryki Północnej i północnej części Afryki. Aktualnie sfinalizowano pierwszą fazę badań, która zakończyła się publikacją szczegółowej analizy genomów 1135 linii *A. thaliana* [93]. Wyniki uzyskane w projekcie doprowadziły do poznania historii rozprzestrzeniania się tego gatunku i pokazały dystrybucję zmienności genetycznej poszczególnych linii rzodkiewnika, co dało podstawy do szerokich badań opartych na integracji genomu i epigenomu z fenotypem.

Projekt 1001 genomów przyczynił się do powstania i rozwoju wielu narzędzi bioinformatycznych i baz danych wykorzystujących coraz większy zasób wiedzy pozyskanej w badaniach *A. thaliana*. Jednym z takich narzędzi jest easyGWAS – platforma umożliwiająca prowadzenie badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS; ang. *genome-wide association studies*). Badania asocjacyjne polegają na równoczesnej analizie ogromnej liczby polimorfizmów genetycznych rozmieszczonych w całym genomie oraz określaniu ich wpływu na dane cechy fenotypowe. Rozwój badań GWAS zależy od znajomości jak największej liczby genotypów danego gatunku, a w przypadku *A. thaliana*, gdzie dostępnych jest ponad 1000 genomów różnych linii, badania te stają się dużo łatwiejsze i bardziej precyzyjne.

1.3.2. *A. thaliana* w rozwoju biologii roślin

Od czasu opublikowania genomu *A. thaliana*, badania z użyciem tego gatunku przyniosły ogromny rozwój wiedzy dotyczącej nie tylko genetyki, ale również wielu innych aspektów biologii

roślin, począwszy od biologii komórki i poznanych przy użyciu rzodkiewnika mechanizmów różnicowania komórek i kontroli podziałów komórkowych, poprzez funkcje i mechanizmy działania oraz szlaki biosyntezy fitohormonów [94], aż po wpływ środowiska zewnętrznego na rozwój roślin. *A. thaliana* jest modelem, dzięki któremu poznano także mechanizmy transdukcji sygnału, transportu wewnątrzkomórkowego i pomiędzy komórkami, jak również poszerzono zasoby wiedzy dotyczącej biologii ściany komórkowej, funkcji lignin, lipidów, czy molekularnych podstaw działania pomp, kanałów i transporterów. Dzięki badaniom rzodkiewnika uzyskano pierwsze znaczące informacje dotyczące roślinnych białek transporterowych [95]. Co może być nieco zaskakujące, rzodkiewnik jest również modelem stosowanym w badaniu powstawania drewna. Wykonane do tej pory doświadczenia wykazały, że istnieją regulacyjne mechanizmy molekularne związane z wytwarzaniem drewna, które są zakonserwowane pomiędzy drzewami a *A. thaliana* [96].

1.3.2.1. *A. thaliana* w badaniach układu odpornościowego roślin

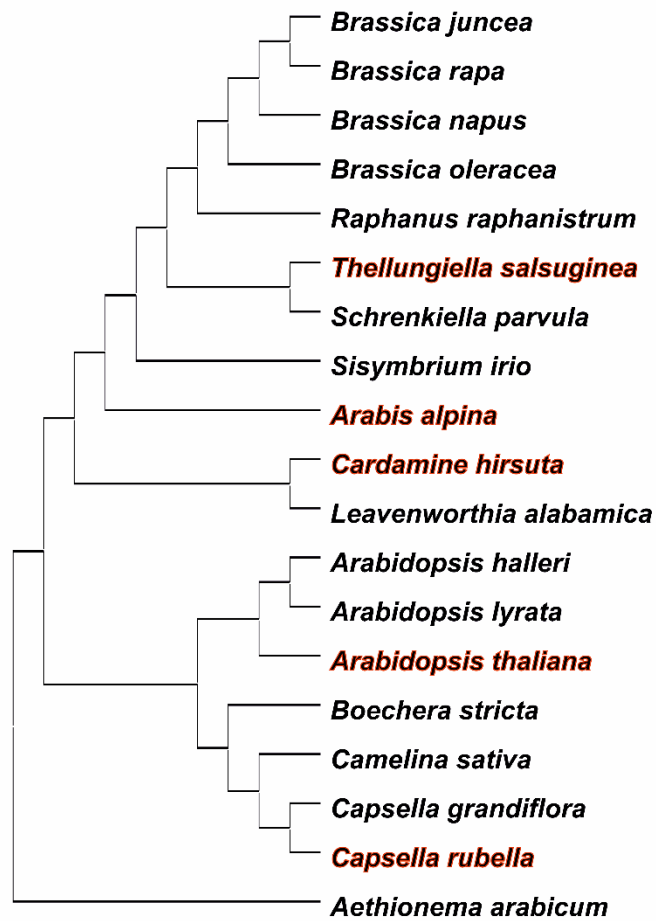
Pomimo stosowania *A. thaliana* jako modelu w wielu dziedzinach biologii roślin, początkowo gatunek ten nie był rozpatrywany jako model do badań interakcji roślina – patogen. Sądzone, że pospolity chwast bez znaczenia gospodarczego, o bardzo krótkim okresie wegetacyjnym, nie posiada specyficznych mikroorganizmów patogennych. Jednak już w latach 80. XX wieku udowodniono, że wirus mozaiki kalafiora i bakteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* mają zdolność do infekcji rzodkiewnika [97, 98]. Wkrótce potem opisano również patogeny, które mogą infekować *A. thaliana* w środowisku naturalnym [99]. W krótkim czasie rzodkiewnik okazał się być również dobrym modelem do testowania hipotez związanych z odpowiedzią odpornościową w innych gatunkach roślin, czego dobrym przykładem jest zastosowanie tego gatunku jako modelu w genomice funkcjonalnej pomidora [100].

Mimo początkowego sceptycyzmu, badania *A. thaliana* dotyczące odporności roślin okazały się przełomowe dla rozwoju wiedzy o roślinnym układzie immunologicznym i do dziś rzodkiewnik jest bardzo ważnym modelem w badaniach interakcji roślina – patogen [101]. Badania rzodkiewnika pozwoliły na ogromny rozwój wiedzy dotyczącej zarówno podstaw molekularnych układu odpornościowego roślin, jak i odpowiedzi roślin na organizmy roślinożerne. W latach 90. XX wieku opracowano pierwsze protokoły badań interakcji roślina – patogen z użyciem *A. thaliana*. Prowadzone od tego czasu doświadczenia z użyciem rzodkiewnika doprowadziły do zidentyfikowania wielu kluczowych elementów układu odpornościowego roślin [102], włączając rozpoznanie MAMP i odporność PTI [103-105] oraz możliwych szlaków transdukcji sygnału uruchamianych po rozpoznaniu wzorca molekularnego [106]. Ponadto, eksperymenty z użyciem rzodkiewnika przyniosły informacje dotyczące transportu efektorów wirulencji do komórki roślinnej, ich rozpoznania i odpowiedzi odpornościowej ETI [107, 108]. Dzięki zastosowaniu modelu *A. thaliana* poszerzono wiedzę dotyczącą funkcji metabolitów wtórnych w odpowiedzi odpornościowej [43] i pokazano

związki pomiędzy odpowiedzią odpornościową a szlakami sygnałowymi zależnymi od fitohormonów [109]. Badania asocjacyjne *A. thaliana* pozwoliły między innymi na identyfikację w genomie tego gatunku loci związanych z naturalną zmiennością w odpowiedzi rzodkiewnika na bakterię patogenną *Pseudomonas syringae* [110] i poszerzenie wiedzy dotyczącej funkcji znanych wcześniej genów, na przykład *ACD6* (ang. *accelerated cell death 6*) [111]. Z kolei badania ekspresji genów przyniosły istotne informacje dotyczące zmian w transkryptomie wywołanych wykryciem obecności patogenów [112, 113]. Oprócz typowych analiz ekspresji genów, z użyciem *A. thaliana* prowadzone są także analizy koekspresji, dzięki którym zidentyfikowano geny związane z odpowiedzią odpornościową roślin [113]. Analizy koekspresji umożliwiają tworzenie złożonych sieci powiązań pomiędzy genami, dzięki którym możliwe jest wyznaczanie genów o nieznanym dotąd funkcji, które mogą pełnić kluczowe funkcje w odpowiedzi odpornościowej [113, 114].

1.3.3. Inne gatunki modelowe w rodzinie Brassicaceae

Pomimo ogromu wiedzy, jaką posiadamy w wielu dziedzinach biologii roślin dzięki badaniom na modelu *A. thaliana*, wiele aspektów dotyczących rozwoju i kontaktu rośliny ze środowiskiem zewnętrznym nie może być badanych przy użyciu tego gatunku. Dlatego też w rodzinie Brassicaceae prowadzone są projekty sekwencjonowania innych gatunków i jak do tej pory opublikowano już siedemnaście pełnych genomów gatunków pokrewnych *A. thaliana* (Ryc. 1.4). Wszystkie gatunki, których genomy zostały zsekwencjonowane posiadają unikalne cechy, dzięki którym stały się modelami interesującymi dla badaczy. Ponadto, bliskie pokrewieństwo tych gatunków może ułatwić analizę funkcji ich genów poprzez transformację *A. thaliana*. Co więcej, znajomość kilkunastu genomów gatunków blisko spokrewnionych daje możliwości badania ewolucji i nabywania bądź utraty przez rośliny określonych cech fizjologicznych.



Ryc. 1.4. Drzewo filogenetyczne gatunków z rodziny Brassicaceae, z opublikowaną sekwencją genomu; drzewo wygenerowane na podstawie sekwencji genu kodującego 5.8S rybosomowe RNA metodą tzw. najbliższego sąsiada (ang. *neighbor joining*); czerwonym konturem zaznaczono gatunki, które użyte zostały w części eksperymentalnej niniejszej pracy

Jednym z gatunków Brassicaceae, którego genom został zsekwencjonowany jest *Arabidopsis halleri* (gęsiówka hallera) [115]. Gatunek ten charakteryzuje się zdolnością do adaptacji w warunkach wysokiego stężenia jonów metali ciężkich. Z tego względu jest bardzo dobrym modelem w badaniu tolerancji roślin na zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi, jak również w badaniu fitoremediacji i specjacji roślin w odpowiedzi na zmiany środowiskowe. Innym gatunkiem z rodzaju *Arabidopsis* o znanej sekwencji genomu jest *Arabidopsis lyrata*. Gatunek ten jest traktowany jako model w badaniach funkcjonalnych, ewolucyjnych i ekologicznych rodzaju *Arabidopsis*. Przy użyciu tego modelu w porównaniu do *A. thaliana* możliwe jest badanie podstaw nagłych zmian w rozmiarze genomu [116]. Jednymi z najbliższej spokrewnionych z rodzajem *Arabidopsis* gatunków, których genomy zostały zsekwencjonowane są *Capsella grandiflora* i *Capsella rubella*, a porównanie tych dwóch gatunków pozwoliło na badanie ewolucji samopylności [117].

Gatunkiem blisko spokrewnionym z rodzajem *Arabidopsis*, którego genom opublikowano jest również *Camelina sativa* (lnicznik siewny), gatunek uprawiany dawniej jako roślina oleista. *C. sativa* jest heksaploidem i z tego względu jest stosowany jako model w badaniach ewolucji poliploidów. Ponadto struktura genomu tego gatunku odzwierciedla genomy ważnych gospodarczo gatunków z rodzaju *Brassica* [118]. Wśród roślin z rodzaju *Brassica* zsekwencjonowane zostały genomy czterech gatunków: *Brassica rapa* (kapusta właściwa) [119], *Brassica juncea* (kapusta sitowata/gorczyca sarepska) [120], *Brassica napus* (kapusta rzepek) [121] i *Brassica oleracea* (kapusta warzywna) [122]. Dwa z nich – *B. rapa* i *B. oleracea* są gatunkami tak zwanego „Trójkąta U” (ang. *Triangle of U*). Teoria Trójkąta U jest teorią ewolucji i związków pomiędzy gatunkami z rodzaju *Brassica*, która mówi, że z trzech starych ewolucyjnie gatunków powstały trzy współczesne gatunki warzyw i roślin olejodajnych, a wśród nich *B. napus* i *B. juncea* [123, 124]. Dodatkowo znana jest sekwencja genomu gatunku *Raphanus raphanistrum* (rzodkiew świrzepa), który powstał z *B. rapa* w wyniku triplikacji genomu, co pozwala na szersze badania ewolucyjne dotyczące powstawania poliploidii. Ponadto gatunek ten może być modelem w badaniach dotyczących duplikacji genów [124].

Wśród gatunków Brassicaceae są również gatunki unikalne pod względem zdolności tolerancji stresów wysokiego zasolenia, chłodu, suszy, czy stresu oksydacyjnego: *Thellungiella salsuginea* (*Eutrema salsugineum*) i *Schrenkiella parvula* (*Eutrema parvulum*/*Thellungiella parvula*). Zsekwencjonowanie ich genomów [125-127] pozwala na użycie tych gatunków jako modeli w badaniach dotyczących tolerancji roślin na stropy abiotyczne. Poprzez badania porównawcze genomów gatunków blisko spokrewnionych możliwe jest również badanie ewolucji zróżnicowania morfologicznego. Z tego względu zsekwencjonowany został genom *Cardamine hirsuta* (rzeżucha włochata) [128], który może służyć jako model w badaniu genetycznego podłoża powstawania liścia złożonego. Sekwencjonowanie pełnego genomu kilku kolejnych gatunków z rodziny Brassicaceae: *Leavenworthia alabamica*, *Sisymbrium irio* (stulisz gładki), *Aethionema arabicum* [129], *Arabis alpina* (gęsiówka alpejska) [130] i *Boechera stricta* [131], pozwoliło na prowadzenie w szerszym zakresie badań ewolucyjnych, w tym badania roli niekodującego DNA w regulacji genów i w ewolucji [129], badania mechanizmów wyciszenia ekspresji genów i metylacji DNA [130] oraz badań porównawczych z *A. thaliana* [131].

Rodzina krzyżowych posiada aktualnie najwięcej gatunków o znanym genomie, a kolejne projekty sekwencjonowania genomów roślin Brassicaceae są w trakcie realizacji. Powiększanie puli znanych sekwencji genomowych gatunków pokrewnych sprawia, że *A. thaliana* wraz z innymi roślinami z rodziny Brassicaceae są bardzo dobrym obiektem dla badań porównawczych i ewolucyjnych [132]. Mimo, że poszczególne genomy sekwencjonowane były z reguły ze względu na szczególne cechy danej rośliny, to znajomość dokładnych sekwencji genomowych kilkunastu gatunków należących do jednej rodziny może być niezwykle użyteczna w badaniu zakonserwowania wielu różnych cech roślin, w tym układu immunologicznego czy biosyntezy metabolitów wtórnych.

Na przykład, badania porównawcze i ewolucyjne mogą umożliwić określenie stopnia zakonserwowania metabolitów wtórnych. Mogą również doprowadzić do poznania nieznanych dotąd mechanizmów różnicowania i powstawania nowych związków niskocząsteczkowych o właściwościach antybiotycznych.

1.4. Metabolity wtórne w odporności gatunków z rodziny Brassicaceae

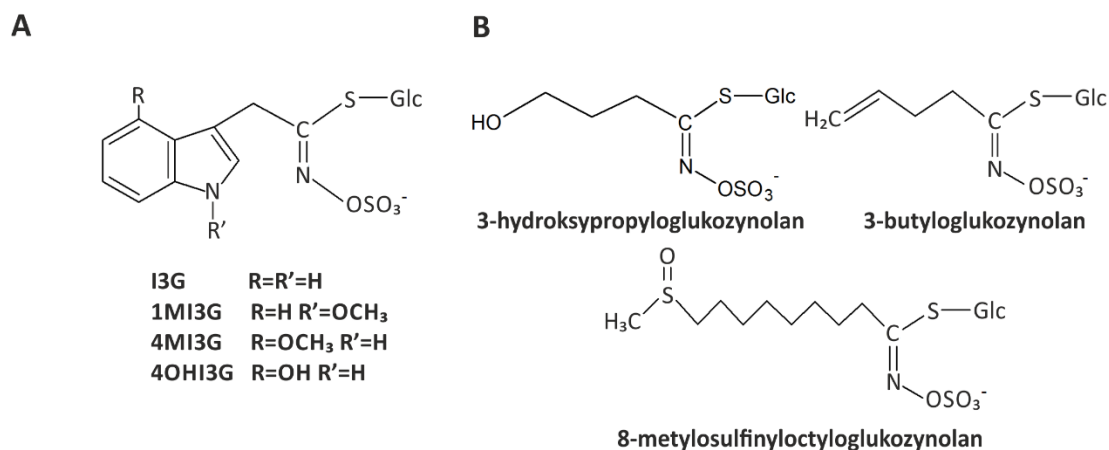
1.4.1. Glukozynolany

Glukozynolany są jedną z najlepiej zbadanych grup fitoantycypin. Związki te są β -tioglukozydami, które mogą być syntezowane z różnych aminokwasów, co przyczynia się do ich dużej różnorodności strukturalnej [49]. W strukturze glukozynolanów występują przynajmniej dwa atomy siarki, z których jeden tworzy wiązanie glukozydowe, a drugi wchodzi w skład grupy siarczanowej. Występowanie glukozynolanów jest w zasadzie ograniczone do gatunków należących do rzędu Brassicales (kapustowce) [50]. Literatura podaje, że w dotychczasowych badaniach scharakteryzowano około dwieście związków należących do tej grupy metabolitów [49, 133].

1.4.1.1. Różnorodność strukturalna

Najczęściej stosowanym kryterium podziału glukozynolanów jest rodzaj ich prekursora. Pod tym względem wśród glukozynolanów można wyróżnić grupę związków alifatycznych, które powstają z aminokwasów łańcuchowych: alaniny, izoleucyny, leucyny, metioniny i waliny oraz grupę glukozynolanów aromatycznych, wśród których wyróżnia się glukozynolany indolowe, pochodne tryptofanu oraz glukozynolany benzyłowe, pochodne fenyloalaniny i tyrozyny. Wśród możliwych prekursorów glukozynolanów wymieniany jest również kwas glutaminowy [49]. Występowanie poszczególnych klas glukozynolanów jest zróżnicowane na poziomie rzędu Brassicales, jedynie glukozynolany aromatyczne występują we wszystkich rodzinach, a obecność młodszych ewolucyjnie pochodnych metioniny ograniczona jest jedynie do rodzin Capparaceae (kaporowate), Cleomaceae i Brassicaceae [134].

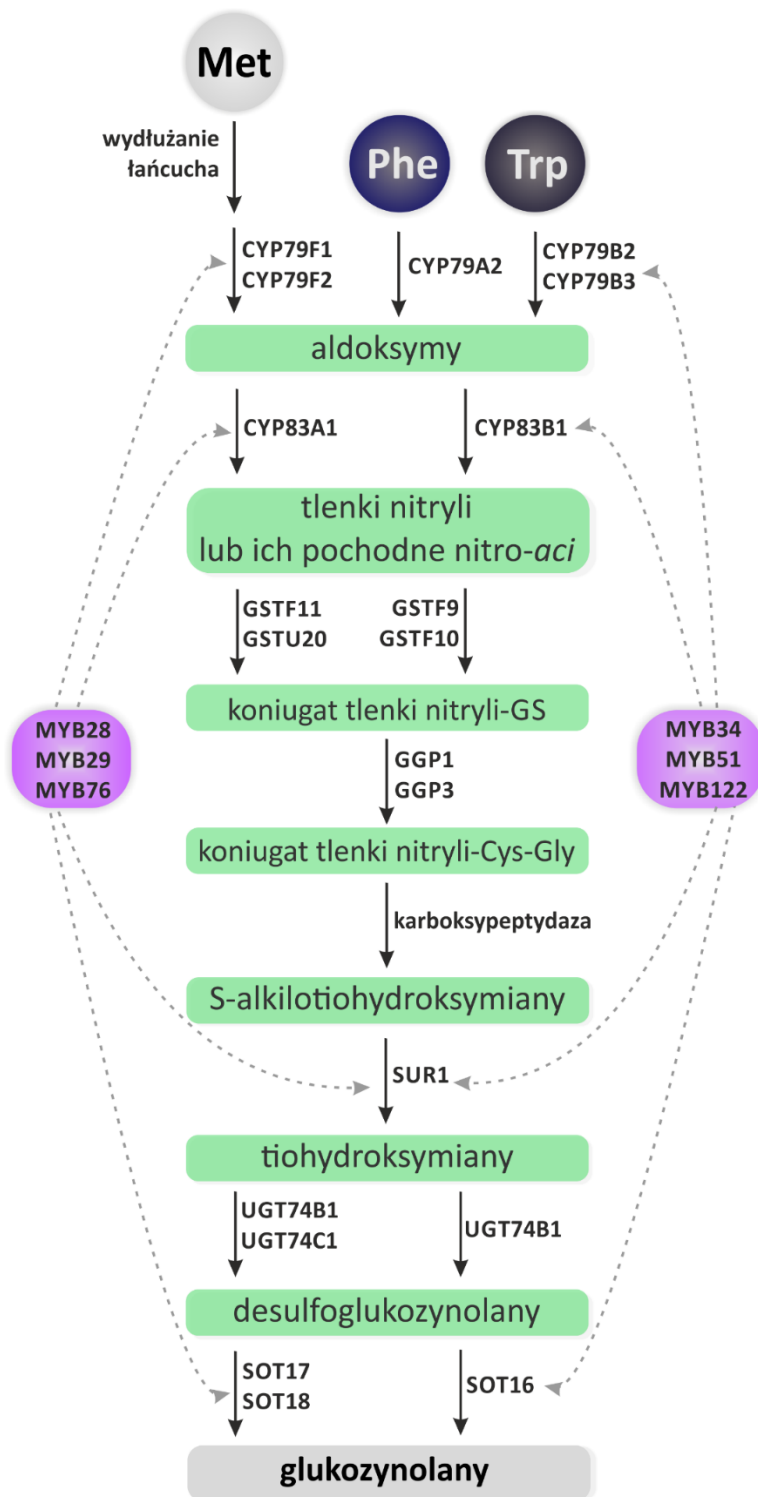
W przypadku pojedynczego gatunku występowanie poszczególnych glukozynolanów może być zróżnicowane pomiędzy różnymi ekotypami [135], a nawet między organami tej samej rośliny, jak w przypadku *A. thaliana* [136]. W tym gatunku zidentyfikowano dotąd około czterdzieści związków należących do grupy glukozynolanów alifatycznych (Ryc. 1.5B), m. in.: glukohirsutyna (8-metylosulfinylooctyloglukozynolan), glukonapina (3-butyloglukozynolan), sinigryna (2-fenyloetyloglukozynolan), czy glucoalissyna (5-metylosulfinylo-pentyloglukozynolan) oraz cztery glukozynolany indolowe (Ryc. 1.5A): glukobrassycyna (indolilo-3-metyloglukozynolan; I3G), neoglukobrassycyna (1-metoksy-I3G; 1MI3G), 4-metoksyglukobrassycyna (4-metoksy-I3G; 4MI3G) i 4-hydroksyglukobrassycyna (4OHI3G) [49].



Ryc. 1.5. Glukozynolany indolowe (A) i przykładowe glukozynolany alifatyczne (B) zidentyfikowane w *A. thaliana* i innych gatunkach Brassicaceae

1.4.1.2. Biosynteza

Dzięki badaniom prowadzonym na gatunku modelowym *A. thaliana* nie tylko zidentyfikowano szereg glukozynolanów, ale również poznano szlaki ich biosyntezy (Ryc. 1.6). Badania te były tak efektywne, że w przeciągu kilku lat zidentyfikowano ponad dwadzieścia genów związanych z biosyntezą tej grupy metabolitów [137] (Ryc. 1.6). Biosynteza glukozynolanów obejmuje trzy główne etapy: wydłużanie łańcucha aminokwasu prekursorowego, budowa podstawowej struktury glukozynolanu i wtórne modyfikacje aminokwasowego łańcucha bocznego. Właśnie ta kilkietapowa biosynteza jest źródłem dużej różnorodności strukturalnej glukozynolanów [137].



Ryc. 1.6. Szlak biosyntezy glukozytolanów

Pierwszym etapem w biosyntezie glukozynolanów alifatycznych jest wydłużanie łańcucha metioniny, które jest katalizowane przez enzymy należące do grupy aminotransferaz, izomeraz i dekarboksylaz [137]. Z kolei tryptofan, który jest prekursorem glukozynolanów indolowych, w przeciwieństwie do aminokwasów alifatycznych, nie ulega żadnym wstępnym przemianom (Ryc. 1.6). Kolejnym krokiem w biosyntezie glukozynolanów jest tworzenie ich podstawowej struktury. W pierwszej reakcji prekursor aminokwasowy przekształcane są w aldoksymy (Ryc. 1.6). Reakcja ta jest katalizowana przez enzymy należące do rodziny monooksygenaz cytochromu P450 (CYP; ang. *cytochrome P450*), stanowiących największą grupę enzymów związanych z metabolizmem wtórnym roślin. Enzymy CYP79B2 i CYP79B3 odpowiedzialne są za przekształcanie tryptofanu [138, 139], fenyloalanina jest substratem dla enzymu CYP79A2 [140], z kolei aminokwasy alifatyczne przekształcane są w aldoksymy w reakcji katalizowanej przez enzymy CYP79F1 i CYP79F2 [141, 142] (Ryc. 1.6). Powstałe aldoksymy są następnie utleniane przez enzymy z grupy CYP83. Enzym CYP83B1 jest katalizatorem reakcji utleniania produktów pochodzących z aminokwasów aromatycznych, z kolei produkty aminokwasów alifatycznych są utleniane w reakcji katalizowanej przez enzym CYP83A1 [143] (Ryc. 1.6). W kolejnych reakcjach do utlenionych aldoksymów włączany zostaje atom siarki. Początkowo sądzono, że donorem siarki w biosyntezie glukozynolanów jest wolny aminokwas cysteina, jednak przeprowadzone badania wskazują, że siarka wchodząca w skład struktury glukozynolanów pochodzi z glutationu (GSH) – tripeptydu zbudowanego z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny [144]. Przypuszcza się, że w szlaku biosyntezy glukozynolanów utlenione aldoksymy ulegają reakcji katalizowanej przez S-transferazy glutationu (GST; ang. *glutathione S-transferase*), w której do struktury aldoksymu dołączana jest grupa zawierająca siarkę. Zaproponowane enzymy katalizujące tę reakcję w szlaku biosyntezy glukozynolanów alifatycznych, to GSTF11 i GSTU20, a w szlaku biosyntezy glukozynolanów indolowych GSTF9 i GSTF10 [137] (Ryc. 1.6). Następnie γ -glutamyl-peptydazy (GGP; ang. *gamma-glutamylpeptidase*) 1 i 3 katalizują reakcję odłączenia reszty γ -kwasu glutaminowego [145] (Ryc. 1.6). Kolejnym produktem pośrednim w biosyntezie glukozynolanów są tiohydroksymiany powstające w reakcji katalizowanej przez liazę typu C-S SUR1 (ang. *superroot1*) [146] (Ryc. 1.6). Związki te są następnie przekształcane w desulfoglukozynolany w reakcji katalizowanej przez glukozylotransferazę (UGT; ang. *UDP-glycosyltransferase*) UGT74B1 [147] (Ryc. 1.6). Na podstawie badań koekspresji z genami kodującymi enzymy szlaku biosyntezy glukozynolanów alifatycznych przypuszcza się, że inna glukotransferaza – UGT74C1 może katalizować reakcję glukozylacji pochodnych metioniny [148]. Ostatnim etapem w biosyntezie glukozynolanów jest przyłączenie grupy sulfonowej katalizowane przez sulfotransferazy (SOT; ang. *sulphotransferase*) SOT16, SOT17 i SOT18 [149] (Ryc. 1.6).

Glukozynolany mogą ulegać wtórnym modyfikacjom, zachodzącym w obrębie reszty pochodzącej z aminokwasu. W przypadku glukozynolanów alifatycznych mogą to być reakcje utleniania, hydroksylacji, alkenylacji i benzylacji. Z kolei glukozynolany indolowe mogą podlegać

reakcjom hydroksylacji i metylacji [137]. Reakcje hydroksylacji glukozynolanów indolowych są katalizowane przez enzymy podrodziny CYP81F. Enzym CYP81F2 został zidentyfikowany w *A. thaliana*, jako odpowiedzialny za biosyntezę 4OH-I3G [43, 150, 151], który przekształcany jest następnie do 4MI3G przez *O*-metylotransferazy IGMT (ang. *indole glucosinolate methyltransferase*) 1 i 2 [152]. Oprócz CYP81F2, w biosyntezie 4OHI3G/4MI3G bierze udział również CYP81F3, a dla enzymu CYP81F4 wykazano funkcję w biosyntezie 1OHI3G/1MI3G [153]. Metylacja 1OH-I3G katalizowana jest przez IGMT5 [154].

1.4.1.3. Regulacja biosyntezy

W dotychczasowych badaniach gatunku modelowego *A. thaliana* zidentyfikowano grupę 6 czynników transkrypcyjnych, należących do rodziny R2R3-MYB (ang. *myeloblastosis*), związanych z regulacją biosyntezy glukozynolanów. Białka te można podzielić na dwa klady: pierwszy kład stanowią MYB34, MYB51 i MYB122, regulujące biosyntezę glukozynolanów indolowych [155, 156], z kolei w skład drugiego kladu wchodzi MYB28, MYB29 i MYB76, działające jako regulatory biosyntezy glukozynolanów alifatycznych [157-159] (Ryc. 1.6).

MYB34, 51 i 122 regulują cały szlak biosyntezy glukozynolanów indolowych, za wyjątkiem ekspresji genów odpowiedzialnych za wtórną modyfikację I3G [155, 160], ale ich wpływ na powstawanie tych związków nie jest jednakowy. Czynnikiem transkrypcyjnym MYB34 ma większy wpływ na regulację szlaku glukozynolanów indolowych w korzeniach, gdzie głównym glukozynolanem indolowym jest 1MI3G, z kolei MYB51 jest bardziej istotny w liściach, w których głównym modyfikowanym glukozynolanem indolowym jest 4MI3G [160]. Dla czynnika MYB51 wykazano również kluczową rolę w regulacji akumulacji glukozynolanów indolowych podczas odpowiedzi *A. thaliana* na infekcję przez grzybowy patogen nekrotroficzny *Plectosphaerella cucumerina* [161]. W przeciwieństwie do MYB34 i MYB51 białko MYB122 nie jest kluczowym w regulacji biosyntezy glukozynolanów indolowych i pełni jedynie funkcję dodatkowego czynnika transkrypcyjnego [161].

Funkcja czynników transkrypcyjnych MYB28, MYB29 i MYB76 w regulacji biosyntezy glukozynolanów alifatycznych została zaproponowana na podstawie wyników analiz loci cech ilościowych (QTL; ang. *quantitative trait loci*) i analiz koekspresji opartych na danych mikromacierzowych [159]. Analizy glukozynolanów w liniach z mutacjami w tych czynnikach transkrypcyjnych wykazały, że białka MYB28 i MYB29 związane są odpowiednio z biosyntezą glukozynolanów alifatycznych długo- i krótkołańcuchowych lub tylko krótkołańcuchowych, a białko MYB76 pełni funkcję dodatkową w regulacji biosyntezy glukozynolanów alifatycznych [158].

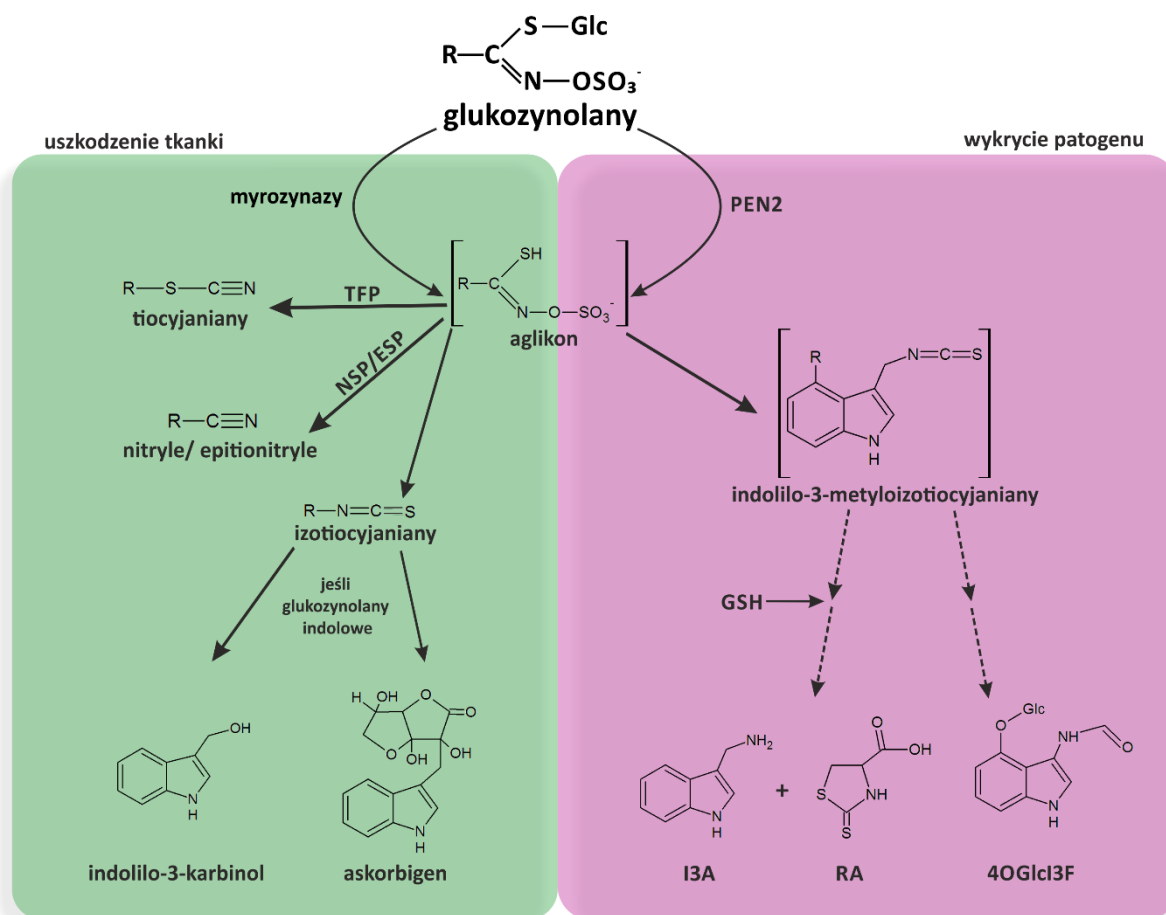
Czynnikiem transkrypcyjnym regulującym biosyntezę glukozynolanów są także białka MYC2, MYC3 i MYC4 (ang. *myelocytomatosis*), reprezentujące rodzinę białek bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*). Białka MYC pełnią funkcję regulacyjną poprzez tworzenie kompleksów

z opisanymi wcześniej czynnikami MYB, np. dla białka MYC3 wykazano interakcję z MYB51 [162]. Funkcję tych białek udowodniono w badaniach potrójnego mutantu *A. thaliana myc2 myc3 myc4*, który charakteryzował się zarówno obniżoną ekspresją genów związanych z biosyntezą glukozynolanów, jak i obniżoną akumulacją glukozynolanów alifatycznych i indolowych [163].

1.4.1.4. Hydroliza glukozynolanów

Glukozynolany w komórce roślinnej nienarażonej na działanie stresów są biologicznie nieaktywne [50]. Jednak utrata integralności błony komórkowej lub działanie czynników aktywujących odpowiedź odpornościową, może prowadzić do hydrolizy tych metabolitów (Ryc. 1.7). Reakcja ta jest katalizowana przez wyspecjalizowane β -tioglukozydazy, znane również jako myrozynazy, które należą do rodziny hydrolaz glikozydowych 1 [164] (Ryc. 1.7). Enzymy te mogą być zlokalizowane w wyspecjalizowanych komórkach parenchymy floemu [165] lub w komórkach szparkowych [166]. Glukozynolany z kolei znajdują się w odrębnych komórkach, co pozwala na fizyczną separację enzymów i substratów. Początkowo myrozynazy uważano za grupę hydrolaz glikozydowych 1, wyróżniającą się budową centrum katalitycznego enzymu, w którym zamiast dwóch reszt glutaminy, niezbędnych w przeprowadzaniu reakcji hydrolizy, występuje jedna reszta glutaminy i jedna kwasu glutaminowego [167]. Na tej podstawie w *A. thaliana* zidentyfikowano sześć enzymów, oznaczonych jako TGG (ang. *thioglucoside glucohydrolase*) [167]. Obecnie wiadomo, że aktywność myrozynazy mogą mieć również enzymy, których centrum katalityczne zbudowane jest z dwóch reszt kwasu glutaminowego. Takimi enzymami są między innymi zidentyfikowane w *A. thaliana* PEN2 i PYK10, dla których wykazano funkcję w hydrolizie glukozynolanów indolowych [43, 168].

W wyniku procesu hydrolizy glukozynolanów uwalniane są niestabilne aglikony, które przekształcane są w różnorodne produkty końcowe (Ryc. 1.7). Wśród produktów końcowych metabolizmu glukozynolanów wymienić można nityle, epitionityle, tiocyjaniany i izotiocyjaniany (Ryc. 1.7), z których te ostatnie charakteryzują się największą reaktywnością chemiczną i aktywnością biologiczną. Ze względu na te właściwości izotiocyjaniany odpowiadają za funkcje glukozynolanów alifatycznych, związane m. in. z odstraszeniem insektów. Izotiocyjaniany powstające w wyniku hydrolizy glukozynolanów indolowych są wysoce niestabilne chemicznie i są spontanicznie przekształcane w dalsze produkty takie jak: indolilo-3-karbinol, indolilo-3-acetonityl, 3,3'-dindolilo-metan, czy askorbigen [169] (Ryc. 1.7). Klasa powstających produktów hydrolizy glukozynolanów zależy od obecności oddziałujących z myrozynazami białek specyfikujących (ang. *specifier protein*), promujących przekształcanie glukozynolanów w epitionityle [170], proste nityle [171] oraz tiocyjaniany [172] (Ryc. 1.7). W przypadku braku obecności białek specyfikujących głównym produktem hydrolizy glukozynolanów są izotiocyjaniany (Ryc. 1.7).



Ryc. 1.7. Schemat hydrolizy glukozyzyny indukowanej przez uszkodzenie tkanki lub wykrycie patogenu. TFP, NSP i ESP- białka specyfikujące promujące przekształcanie glukozyzyny odpowiednio w tiocyjaniiny, nitryle i epitionitryle

1.4.1.5. Metabolizm glukozyzyny w odpowiedzi odpornościowej

Funkcję poszczególnych glukozyzyny w odporności na infekcję można zweryfikować dzięki dostępności mutantów *A. thaliana* z defektami w biosyntezie tych związków. Mutant *myb28 myb29* (*myb28/29*), który nie produkuje glukozyzyny alifatycznych [159] okazał się bardziej wrażliwy na *Sclerotinia sclerotiorum* i szczep *B. cinerea* B05.10 w porównaniu do roślin typu dzikiego [68, 173]. W przypadku pojedynczych mutantów *myb28* i *myb29* *S. sclerotiorum* wykazał większą wirulencję jedynie wobec pierwszego z nich, co sugeruje większy wpływ na odporność przeciwko *S. sclerotiorum* długołańcuchowych glukozyzyny alifatycznych [68]. Rolę glukozyzyny alifatycznych w odporności potwierdzono również w badaniach niezaadaptowanego szczepu bakterii *Pseudomonas syringae*, posiadającego defekt w operonie związanym z detoksyfikacją izotiocyjaniiny alifatycznych. Badany szczep cechował się zwiększoną wirulencją wobec mutantu *myb28/29* w porównaniu do roślin typu dzikiego, co pokazało istotny wpływ detoksyfikacji izotiocyjaniiny na jego zdolność do infekcji [174]. Powyższe wyniki pokazują, że pochodzące

z glukozynolanów alifatycznych izotiocyjaniany mogą pełnić funkcję w odporności skierowanej zarówno przeciwko mikroorganizmom grzybowym, jak i bakteryjnym.

U *A. thaliana* i innych gatunków Brassicaceae, wykrycie mikroorganizmu patogenego prowadzi do aktywacji metabolizmu glukozynolanów indolowych zależnego od myrozynazy PEN2 (ang. *penetration 2*) (Ryc. 1.7). Wykazano, że białko PEN2 jest związane z błonami peroksysomów i mitochondriów, a w przypadku wykrycia obecności patogenu mitochondria zawierające PEN2 są transportowane do miejsca penetracji [175, 176]. Analiza mutantu *pen2* *A. thaliana* wykazała, że charakteryzuje się on zwiększoną, w porównaniu do typu dzikiego, penetracją komórek epidermy przez szerokie spektrum mikroorganizmów patogennych, wśród których wymienić można zaadaptowane i niezaadaptowane lęgniowce [177], grzyby biotroficzne [178], hemibiotroficzne [175, 179] i nekrotroficzne [175, 180]. Wśród badanych patogenów nekrotroficznych na szczególną uwagę zasługuje gatunek *Plectosphaerella cucumerina*, należący do typu grzybów workowych, charakteryzujący się zdolnością do infekcji wielu gatunków roślin, w tym również *A. thaliana* [43, 175, 181]. Doświadczenia z zaadaptowanymi i niezaadaptowanymi na *A. thaliana* szczepami *P. cucumerina* pokazały, że mutant *pen2* charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością jedynie na szczep zaadaptowany tego patogenu [180].

Z metabolizmem glukozynolanów indolowych związane jest również białko PEN3, które zostało zidentyfikowane jako zlokalizowany w błonie komórkowej transporter ABC, który przemieszcza się po rozpoznaniu patogenu do miejsca penetracji [182]. Analiza mutantu *pen3* wykazała, że podobnie jak mutant *pen2*, charakteryzował się zwiększoną, w porównaniu do typu dzikiego, penetracją komórek rośliny przez patogeny, takie jak *Blumeria graminis* i *Erysiphe pisi* [182]. Na podstawie przeprowadzonych dotąd doświadczeń z użyciem pojedynczych mutantów *pen2* i *pen3* oraz podwójnego mutantu *pen2 pen3* wnioskować można, że te dwa białka działają w tym samym szlaku odpowiedzi odpornościowej [182].

Profilowanie metaboliczne mutantów *pen2* wykazało, że szlak PEN2 prowadzi do powstania innych produktów końcowych niż hydroliza glukozynolanów inicjowana uszkodzeniem komórki [43]. Linie *pen2* charakteryzowały się defektem w akumulacji dwóch metabolitów: kwasu raphanusamowego (RA) i indolilo-3-aminy (I3A) [43]. Struktury chemiczne RA i I3A sugerują odmienne prekursorzy biosyntezy tych związków – I3A posiada pierścień indolowy, z kolei struktura RA wskazuje, że jest to produkt metabolizmu cysteiny. Co ciekawe, powstawanie tych metabolitów jest uzależnione od obecności glutationu, co potwierdzono w badaniach mutantów *pad2* i *cad2*, posiadających defekt w biosyntezie tego tripeptydu [183, 184]. Obydwa mutanty charakteryzowały się zmniejszoną akumulacją RA, a także I3A w stosunku do typu dzikiego [43].

W liniach *pen2* inokulowanych *B. graminis* obserwowano zwiększoną w porównaniu do typu dzikiego akumulację 4MI3G, co pokazało, że w odpowiedzi odpornościowej biosynteza glukozynolanów indolowych jest przekierowana do 4MI3G. Ponadto, zasugerowało to, że białko PEN2 oprócz I3G może hydrolizować też 4MI3G [43]. Jako produkt końcowy tej reakcji

zidentyfikowany został 4-*O*- β -D-glukozylo-indolilo-3-formamid (4OGlcI3F), dla którego defekt w biosyntezie obserwowano w mutantach *pen2* i *cyp81f2* [185]. Doświadczenia przeprowadzone na mutancie *cyp81f2*, posiadającym defekt w biosyntezie 4MI3G, wykazały jego zwiększoną podatność na penetrację komórek epidermy przez takie patogeny, jak *B. graminis* i *E. pisi* [43, 175], *Colletotrichum gloeosporioides* [186], czy *Phytophthora brassicae* [177]. Badania podwójnego mutantu *pen2 cyp81f2* potwierdziły, że oba enzymy reprezentują ten sam mechanizm odpowiedzi odpornościowej oraz pokazały, że jedynie bioaktywne produkty hydrolizy 4MI3G pełnią funkcję w odporności przedinwazyjnej *A. thaliana* [43].

Oprócz PEN2 w *A. thaliana* zidentyfikowano szereg innych potencjalnych myrozynaz. Nie wiadomo jednak, czy któreś z tych enzymów, podobnie jak PEN2, są związane z metabolizmem glukozynolanów indolowych w odpowiedzi na infekcje. Glukozynolany indolowe mogą być, podobnie jak glukozynolany alifatyczne, metabolizowane przez myrozynazy TGG1 i TGG2 [166]. Jednak podwójny mutant *tgg1 tgg2* nie wykazywał większej wrażliwości na infekcję szczepem *B. cinerea* B05.10 w porównaniu do typu dzikiego [173], co może świadczyć o tym, że te myrozynazy nie pełnią funkcji w odpowiedzi odpornościowej. Ponieważ pozbawiony glukozynolanów indolowych potrójny mutant *myb34 myb51 myb122* i mutant *pen2* cechują się podobną wrażliwością na infekcję przez *P. cucumerina* przypuszcza się, że PEN2 jest główną myrozynazą związaną z funkcją odpornościową tych tioglukozydów [161]. Należy jednak zaznaczyć, że większość prowadzonych dotąd badań dotyczących funkcji glukozynolanów indolowych dotyczyła jedynie liści. Dlatego też możliwe, że w innych organach *A. thaliana* znajdują się enzymy pełniące podobne funkcje. W korzeniach rzodkiewnika infekowanych przez patogen grzybowy *Verticillium longisporum* zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu *PEN2-LIKE1*, który jest najbliższym homologiem *PEN2* [187], co może świadczyć o potencjalnym występowaniu innych myrozynaz pełniących funkcje podobne do PEN2. Zgodnie z tą hipotezą wykazano, że enzymy BABG (ang. *brassinin-associated β -glucosidase*) BABGa i BABG.b, będące bliskimi homologami *PEN2-LIKE1* z *B. rapa*, są odpowiedzialne za aktywację glukozynolanów indolowych w szlaku biosyntezy brassininy – jednej z fitoaleksyn *B. rapa* [188].

1.4.1.5.1. Zakonserwowanie szlaku PEN2

Biorąc pod uwagę ogromne zróżnicowanie metabolitów wtórnych oraz brak wcześniejszych doniesień o produktach szlaku PEN2 w gatunkach Brassicaceae poza *A. thaliana*, początkowo nie wiadomym było, czy szlak ten występuje również w pokrewnych gatunkach. Przekierowanie biosyntezy glukozynolanów indolowych do 4MI3G oraz ich hydrolizę do RA i I3A podczas odpowiedzi na inokulację *B. graminis* f. sp. *hordei*, potwierdzono również u *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis halleri*, *Olimarabidopsis pumila*, *Olimarabidopsis cabulica*, *Crucihimalaya lasiocarpa*, *Cardamine hirsuta*, *Sisymbrium irio*, *Thellungiella salsuginea* i *Arabis alpina* [189]. W przynajmniej pięciu z badanych gatunków zidentyfikowano potencjalne ortologi białka PEN2. W *A. lyrata*,

C. rubella, *B. rapa* i *A. alpina* (dostępne wówczas sekwencje genomów) poszukiwane były również ortologi genów *CYP81F2* i *PEN3*. Ortolog *PEN3* znaleziono we wszystkich badanych gatunkach, z kolei *CYP81F2* był nieobecny w blisko spokrewnionym z *A. thaliana* gatunku *C. rubella* [189]. W gatunku tym nie zidentyfikowano również ortologa *PEN2*, który razem z *CYP81F2* jest kluczowy dla biosyntezy i hydrolizy 4MI3G [189]. Utrata tych genów była skorelowana z brakiem glukozynolanów indolowych oraz RA i I3A w *C. rubella* [189]. Ogólnie wykazano, że mechanizm metabolizmu glukozynolanów indolowych przez białko *PEN2* jest ewolucyjnie stary i szeroko zakonserwowany wśród gatunków kapustowatych oraz, że podstawienie glukozynolanów indolowych w pozycji 4 może mieć istotne znaczenie w odpowiedzi odpornościowej [189].

1.4.1.6. Mechanizmy działania glukozynolanów

Funkcja glukozynolanów najczęściej wiązana jest z właściwościami antybiotycznymi izotiocyanianów, co obserwowano w badaniach aktywności biologicznej tych związków w warunkach *in vitro*. Izotiocyaniany alifatyczne mają działanie antybiotyczne przeciwko licznym bakteriom [190], jak również zdolność do hamowania wzrostu patogenów grzybowych, takich jak *Fusarium oxysporum* [191], *Alternaria brassicicola* [192], czy *S. sclerotiorum* [68]. Największą aktywność antybiotyczną przeciwko *S. sclerotiorum* wśród badanych związków stwierdzono dla izotiocyanianu pochodzącego od 8-metylosulfinylooctyloglukozynolanu [68]. Z kolei RA i I3A wykazywały toksyczność wobec sporów zaadaptowanych i niezaadaptowanych na *A. thaliana* szczepów *P. cucumerina* [180]. Jednak mutant *cyp81f2*, który w przeciwieństwie do mutantu *pen2* nie posiadał defektu w biosyntezie RA i I3A [43], charakteryzował się podobną do *pen2*, a zwiększoną w stosunku do typu dzikiego, wrażliwością na infekcję *P. cucumerina* [180]. Sugeruje to, że pomimo potencjalnych właściwości antybiotycznych RA i I3A nie pełnią *in planta* istotnej funkcji w odporności [180].

Wyniki przeprowadzonych dotąd eksperymentów wskazują, że produkty hydrolizy glukozynolanów charakteryzują się nie tylko właściwościami antybiotycznymi, ale również mogą być związane z innymi mechanizmami odpowiedzi odpornościowej. Doświadczenia na mutantach *pen2*, *pen3*, *myb28/29*, *tgg1 tgg2* i *pen2 pen3* wykazały potencjalną interakcję pomiędzy metabolizmem glukozynolanów a programowaną śmiercią komórki, uruchamianą podczas odpowiedzi odpornościowej. Mutanty *myb28/29* i *tgg1 tgg2* charakteryzowały się zahamowaniem programowanej śmierci komórki po inokulacji roślin niezaadaptowanymi szczepami bakterii *P. syringae* i mączniaka rzekomego *Hyaloperonospora arabidopsidis* [193]. Z kolei mutanty *pen2* i *pen3* charakteryzowały się defektem w uruchamianiu programowanej śmierci komórki po rozpoznaniu efektorów pochodzących z niekompatybilnych szczepów *H. arabidopsidis* bądź *P. syringae*. W podwójnym mutancie *pen2 pen3* efekt mutacji był addytywny, w wyniku czego obserwowano utratę odporności na awirulentne w stosunku do typu dzikiego *A. thaliana* szczepy *H. arabidopsidis* [194]. Ponieważ

programowana śmierć komórki jest ważnym elementem odporności ETI, uzyskane wyniki wskazują na powiązanie glukozytynolanów i produktów ich metabolizmu z odpowiedzią odpornościową indukowaną przez efekторы.

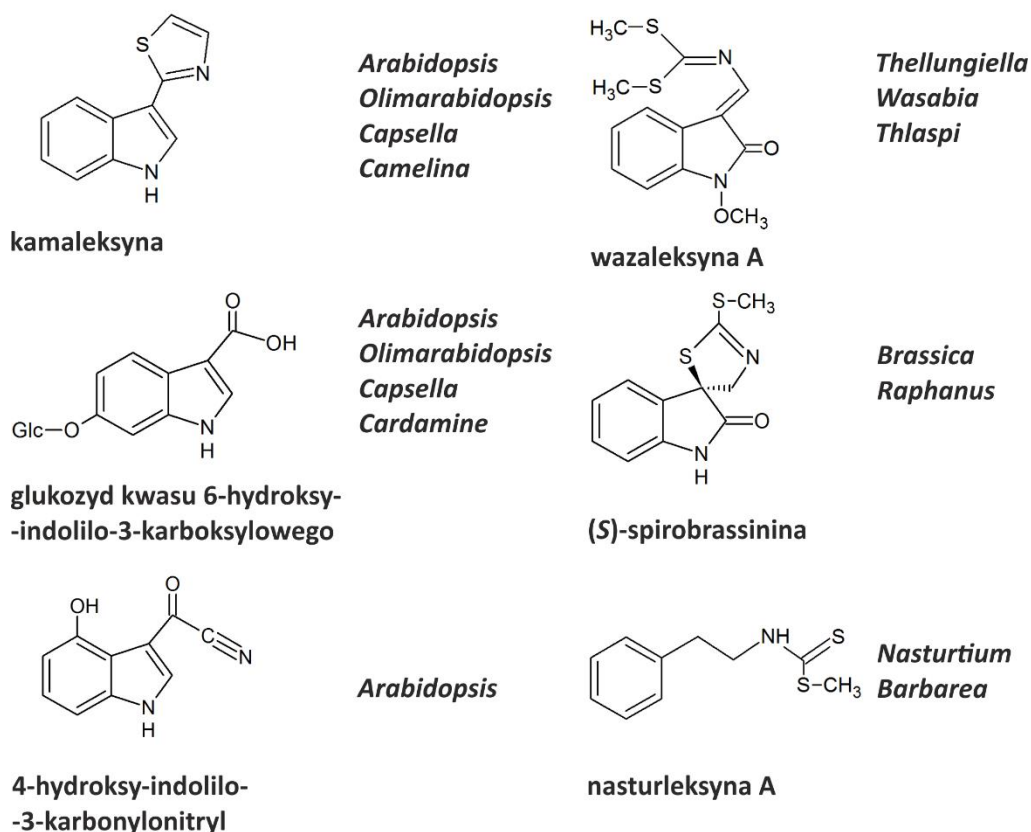
Przeprowadzone doświadczenia wskazały też, że mutanty z defektem w szlaku biosyntezy i metabolizmu 4MI3G (*myb51*, *cyp79b2* *cyp79b3*, *cyp83b1*, *ugt74b1*, *cyp81f2* i *pen2*) charakteryzują się mniejszą zdolnością do depozycji kalozy w odpowiedzi na wzorzec molekularny flg22 [150]. Na podstawie tych wyników przypuszcza się, że produkty metabolizmu 4MI3G powstające w szlaku PEN2 działają podczas odpowiedzi PTI jako związki sygnałowe inicjujące biosyntezę tego wzmacniającego ścianę komórkową polisacharydu.

1.4.2. Fitoaleksyny

1.4.2.1. Struktury chemiczne

Wśród gatunków z rodziny Brassicaceae zidentyfikowano dotąd ponad 40 fitoaleksyn należących do związków indolowych. Ze względu na ich strukturę, przypuszcza się, że metabolity te są pochodnymi tryptofanu, co wykazano dla części związków w badaniach z użyciem radioaktywnie znakowanego prekursora [64]. Związki te znaleziono w około 30 spośród ponad 3700 gatunków Brassicaceae (w większości w gatunkach z rodzaju *Brassica*) [64]. W gatunkach *Nasturtium officinale* (rukiew wodna), *Barbarea vulgaris* (gorczycznik pospolity), oraz *Barbarea verna* (gorczycznik wiosenny) zidentyfikowano również fitoaleksyny fenolowe - nasturleksyny [195].

Znane fitoaleksyny roślin z rodziny Brassicaceae podzielono na kilka grup według kryterium ich struktury [64]. Biorąc pod uwagę, że fitoaleksyny badane są w pojedynczych gatunkach Brassicaceae, najczęściej w tych o znaczeniu gospodarczym, nie można określić jednoznacznie zasięgu występowania tych metabolitów.



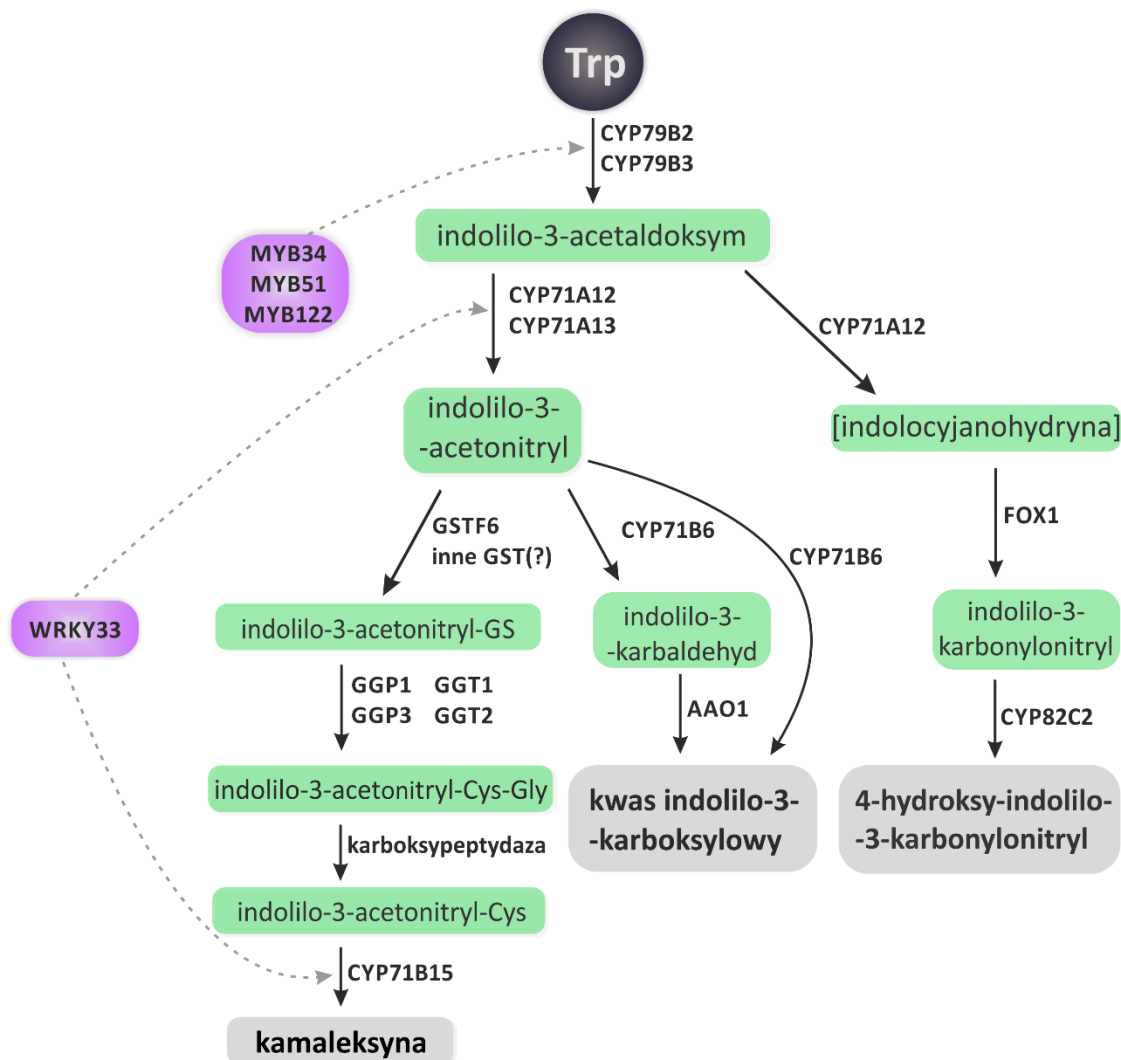
Ryc. 1.8. Występowanie wybranych fitoaleksyn zidentyfikowanych w rodzajach należących do rodziny Brassicaceae

1.4.2.2. Biosynteza

Mimo zidentyfikowanych licznych fitoaleksyn indolowych, dotąd niewiele wiadomo o szlakach ich biosyntezy i enzymach katalizujących odpowiednie reakcje oraz o produktach pośrednich. Jedną z nielicznych fitoaleksyn z roślin Brassicaceae, dla której znany jest szlak biosyntezy jest kamaleksyna (3-tiazol-2'-yl-indol) (Ryc. 1.9) – pierwsza zidentyfikowana fitoaleksyna *A. thaliana*, która pierwotnie została wyizolowana z innego gatunku z rodziny Brassicaceae – *Camelina sativa*, a występuje również w innych pokrewnych gatunkach, należących do trybu Camelinae [189].

Kamaleksyna pierwszy krok szlaku biosyntezy, którym jest oksydacyjna dekarboksylacja tryptofanu, katalizowana przez enzymy CYP79B2 i CYP79B3, dzieli z glukozynolanami indolowymi. W wyniku tej reakcji powstaje indolilo-3-acetaldoksym [196] (Ryc. 1.9). W kolejnym etapie powstały aldoksym jest przekształcany w indolilo-3-acetonitryl w reakcji katalizowanej przez enzymy CYP71A12 i CYP71A13 [197, 198] (Ryc. 1.9). W strukturze kamaleksyny występuje pierścień tiazolowy pochodzący z glutationu [183]. Reszta glutationu jest włączana do struktury kamaleksyny w reakcji katalizowanej między innymi przez transferazę glutationu GSTF6 [199] (Ryc. 1.9). Następnie γ -glutamyllopeptydazy (GGP) 1 i 3 [145] i γ -glutamylotranspeptydazy (GGT; ang. *gamma*-

glutamyltranspeptidase) 1 i 2 usuwają resztę kwasu glutaminowego z końca N- peptydu [199]. Reszta glicyny odłączana jest przez niezidentyfikowane karboksypeptydazy [145] (Ryc. 1.9). Enzymem, który katalizuje dwie ostatnie reakcje w szlaku biosyntezy kamaleksyny jest CYP71B15 (PAD3; ang. *phytoalexin deficient 3*) [200] (Ryc. 1.9).



Ryc. 1.9. Szlak biosyntezy kamaleksyny, kwasów indolilo-3-karboksylowych oraz indolilo-3-karbonylonitryli

Ze szlakiem biosyntezy kamaleksyny wiąże się częściowo biosynteza kwasu indolilo-3-karboksylowego i indolilo-3-karbonylonitryli. Produktem pośrednim w biosyntezie tych pierwszych jest indolilo-3-acetonitryl, który podobnie jak w szlaku biosyntezy kamaleksyny, powstaje z indolilo-3-acetaldotsymu w reakcji katalizowanej przez enzymy CYP71A12 i CYP71A13 (Ryc. 1.9). W testach *in vitro* pokazano, że enzym CYP71B6 przekształca indolilo-3-acetonitryl do indolilo-3-karbaldehydu i kwasu indolilo-3-karboksylowego, z kolei enzym AAO1 (ang. *Arabidopsis aldehyde oxidase 1*) katalizuje reakcję przekształcania indolilo-3-karbaldehydu do kwasu indolilo-3-karboksylowego [201] (Ryc. 1.9). CYP71A12 pełni funkcję również w szlaku

biosyntezy indolilo-3-karbonylonitryli [202], w którym kolejne reakcje katalizują enzymy FOX1 (ang. *flavin-dependent oxidoreductase 1*) i CYP82C2 [202] (Ryc. 1.9). Ze względu na szerszy zasięg występowania pochodnych kwasu indolilo-3-karboksyłowego w porównaniu do kamaleksyny przypuszcza się, że szlak biosyntezy tych pierwszych jest ewolucyjnie starszy [189].

Prowadzone badania wykazały, że prekursorami części fitoaleksyn rodziny Brassicaceae są glukozynolany indolowe. Doświadczenia, w których zastosowano znakowany radioaktywnie I3G pokazały, że związek ten może być substratem w biosyntezie wazaleksyn A i B, metoksybrasseniny i rapaleksyny A, produkowanych m. in. przez gatunek *T. salsuginea* [203] (Ryc. 1.8). I3G jest również prekursorem biosyntetycznie powiązanej z wazaleksynami brassininy, występującej w gatunku *B. rapa* [188, 204]. I3G jest aktywowany do biosyntezy brassininy na drodze hydrolizy katalizowanej przez myrozynazy BABG [188]. Z kolejnymi reakcjami związany jest enzym SUR1, który bierze udział w biosyntezie I3G [188]. W tym szlaku biosyntezy zidentyfikowano też *S*-metyltransferazę DTC-MT (ang. *dithiocarbamate S-methyltransferase*), która jest odpowiedzialna za przekształcanie ditiokarbaminianu (ostatniego produktu pośredniego) do brassininy [188]. Zidentyfikowano również dwie monooksygenazy cytochromu P450 CYP71CR1 i CYP71CR2, które katalizują reakcje przekształcania brassininy odpowiednio w cyklobrassininę i spirobrassininę [205]. Pomimo przynależności do odmiennych klas związków brassinina posiada cechy wspólne w strukturze z fitoaleksynami należącymi do grupy nasturleksyn (Ryc. 1.8). Dlatego przypuszcza się, że związki te są pochodnymi glukozynolanów benzyłowych [195].

1.4.2.3. Regulacja biosyntezy kamaleksyny i kwasu indolilo-3-karboksyłowego

Regulacja biosyntezy fitoaleksyn indolowych została dotąd częściowo poznana w przypadku kamaleksyny. W badaniach szlaku biosyntezy tej fitoaleksyny wykazano, że jej akumulacja jest zależna od kaskady kinaz MAPK3/MAPK6, która reguluje transkrypcję genów kodujących odpowiednie enzymy szlaku biosyntezy kamaleksyny [206]. Pomimo dość szerokiej wiedzy dotyczącej szlaku biosyntezy kamaleksyny, niewiele wiadomo o czynnikach transkrypcyjnych pełniących funkcje regulujące ten szlak. Wykazano dotąd, że czynnik transkrypcyjny WRKY33 przyłącza się do promotora genów *CYP71A13* i *CYP71B15*, wpływając tym samym na aktywację szlaku biosyntezy kamaleksyny i kwasu indolilo-3-karboksyłowego (Ryc. 1.9). Pewne jest jednak, że nie jest to jedyny regulator wpływający na biosyntezę tej fitoaleksyny, ponieważ defekt w jego biosyntezie powodował zmniejszoną akumulację kamaleksyny jedynie w początkowej fazie infekcji [207]. Ponieważ kamaleksyna i kwas indolilo-3-karboksyłowy dzielą pierwszy krok biosyntezy z glukozynolanami indolowymi, przypuszczano, że czynniki transkrypcyjne MYB34, MYB51 i MYB122, pełniące funkcje w regulacji biosyntezy tych związków, mogą odgrywać podobną rolę w biosyntezie fitoaleksyn. Stwierdzono, że czynniki MYB mają wpływ jedynie na biosyntezę

indolilo-3-acetaldoksymu, który jest wspólnym prekursorem wszystkich produktów metabolizmu tryptofanu, nie wykazano jednak wpływu tych czynników transkrypcyjnych na kolejne etapy biosyntezy kamaleksyny i kwasu indolilo-3-karboksyłowego [208] (Ryc. 1.9).

1.4.2.4. Funkcja fitoaleksyn indolowych w odporności

Jedyną fitoaleksyną Brassicaceae, dla której dotąd jednoznacznie udowodniono funkcję w odpowiedzi odpornościowej jest kamaleksyna. Co ciekawe, funkcja kamaleksyny w odporności przeciwko patogenom nie dotyczy wszystkich mikroorganizmów. W badaniach z użyciem mutantu *pad3* z defektem w biosyntezie kamaleksyny wykazano, że ten związek nie ogranicza wzrostu wirulentnych szczepów bakterii *P. syringae* [209], ale z drugiej strony mutant *pad3* charakteryzował się większą podatnością na zakażenia *B. cinerea* i *A. brassicicola* [197, 210]. Podwójny mutant *pen2 pad3* wykazywał zwiększoną wrażliwość na zaadaptowane, jak i na niezaadaptowane szczepy *P. cucumerina* [180]. Co więcej, fenotypy pojedynczych i podwójnego mutantu *pen2 pad3* po infekcji wykazały, że podczas gdy metabolizm glukozynolanów indolowych związany jest z kontrolą penetracji patogenów do komórek epidermy, kamaleksyna hamuje dalszy rozwój mikroorganizmów patogennych i ich rozprzestrzenianie się w innych komórkach [43, 177]. Wskazuje to, że pomimo wspólnego prekursora i początkowej części szlaku biosyntezy, glukozynolany indolowe i kamaleksyna odgrywają rolę w odpowiedzi odpornościowej na innych etapach rozwoju mikroorganizmu patogennego, pełniąc funkcje odpowiednio w odporności przed- i poinwazyjnej [43, 175]. Jeszcze większy niż w mutancie *pen2 pad3* defekt w odporności poinwazyjnej obserwowano w podwójnym mutancie *A. thaliana cyp79b2 cyp79b3*. Większą wrażliwość tej linii wykazano po infekcji przez zaadaptowane i niezaadaptowane szczepy *P. cucumerina* [180], czy *Phytophthora brassicae* [177]. Ponieważ mutant *cyp79b2 cyp79b3* charakteryzuje się dużo silniejszym fenotypem niż mutant *pen2 pad3*, można przypuszczać, że oprócz kamaleksyny muszą w *A. thaliana* występować inne pochodne tryptofanu pełniące funkcje w odporności poinwazyjnej. Możliwe, że funkcję tą pełnią pochodne kwasu indolilo-3-karboksyłowego oraz indolilo-3-karbonylonitryle. Funkcja pochodnych kwasu indolilo-3-karboksyłowego w odporności nie została dotąd poznana ze względu na brak specyficznych mutantów z defektem w ich biosyntezie. W przypadku indolilo-3-karbonylonitryli możliwe było uzyskanie mutantu *cyp82c2*, który charakteryzował się defektem w biosyntezie 4-hydroksy-indolilo-3-karbonylonitrylu (4-OH-ICN) [202]. Linia ta była bardziej wrażliwa w porównaniu do typu dzikiego *A. thaliana* na zakażenia szczepem *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Ponadto, mutant *cyp82c2* wykazywał zwiększoną wrażliwość na patogeny nekrotroficzne *A. brassicicola* i *B. cinerea*, ale nie na patogen biotroficzny *Golovinomyces orontii*, co może świadczyć o potencjalnej funkcji 4-OH-ICN w odpowiedzi odpornościowej [202].

Jak dotąd wiedza dotycząca aktywności biologicznej i mechanizmów działania fitoaleksyn Brassicaceae jest bardzo ograniczona. Wydaje się, że fitoaleksyny mogą działać na błony komórkowe

patogenów lub jako inhibitory procesów oddychania [211]. Fitoaleksyną, dla której wykazano działanie toksyczne na błony komórkowe jest kamaleksyna [212]. W badaniach *in vitro* wykazano działanie toksyczne kamaleksyny przeciwko niezaadaptowanym i zaadaptowanym na *A. thaliana* szczepom *P. cucumerina* [180], a także przeciwko *A. brassicicola* i *P. syringae* pv. *maculicola* [212, 213]. Działanie antybiotyczne *in vitro* wobec patogenów *A. brassicicola* i *B. cinerea* zbliżone do kamaleksyny wykazano również dla 4-OH-ICN [202].

1.4.4. Metabolity szlaku fenylopropanoidowego

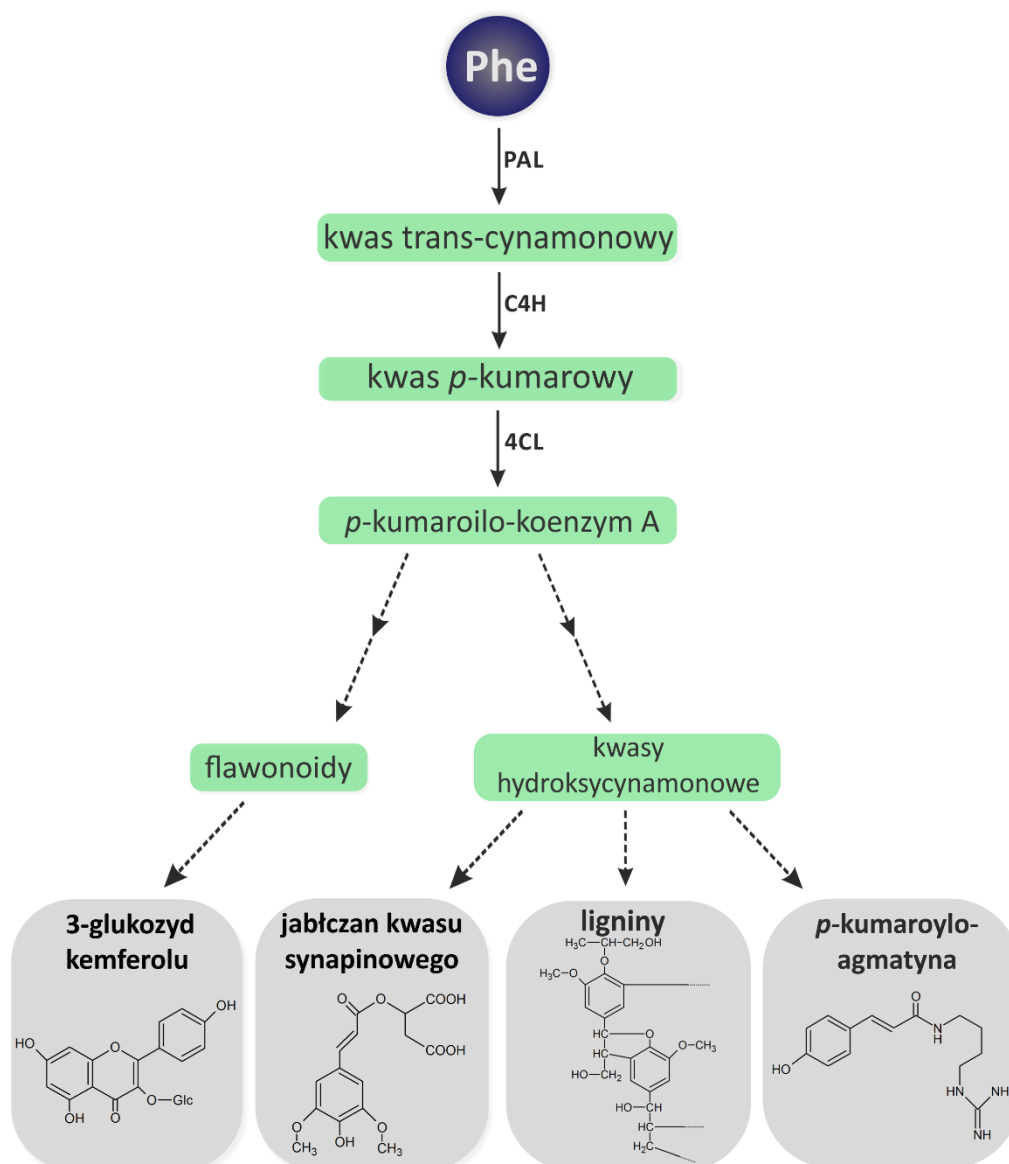
Fenylopropanoidy stanowią klasę związków fenolowych, pochodzących od aminokwasu aromatycznego fenyloalaniny. Związki te występują powszechnie w całym królestwie roślin, ale poszczególne metabolity z tej klasy są charakterystyczne dla mniejszych grup filogenetycznych. Związki fenylopropanoidowe można podzielić na kilka głównych grup: ligniny i lignany, flawonoidy, stilbeny, kumaryny oraz kwasy hydroksycynamonowe.

W dotychczasowych badaniach wykazano, że gatunek modelowy *A. thaliana* produkuje szereg pochodnych szlaku fenylopropanoidowego, wśród których występują zarówno metabolity cytoplazmatyczne, jak i wchodzące w skład ściany komórkowej [214]. Wśród fenylopropanoidów *A. thaliana* zidentyfikowano związki należące do grupy flawonoidów [215] oraz pochodnych kwasów hydroksycynamonowych, wśród których wyróżnia się glukozydy monolignoli, kumaryny, czy pochodne kwasu synapinowego [214-217]. Występowanie fenylopropanoidów w *A. thaliana* jest organospecyficzne – w liściach głównymi związkami są glikozydy flawonoli i estry kwasu synapinowego, z kolei w korzeniach – glukozydy monolignoli (koniferyna i syringina) oraz kumaryny (skopolina) [218].

1.4.4.1. Biosynteza fenylopropanoidów

Kilka pierwszych reakcji w szlaku fenylopropanoidowym jest wspólnych dla wszystkich rodzajów związków powstających w tym szlaku metabolicznym i nazywa się je centralnym szlakiem fenylopropanoidowym (Ryc. 1.10). Pierwszym etapem w metabolizmie fenylopropanoidów jest deaminacja fenyloalaniny z utworzeniem kwasu trans-cynamonowego, katalizowana przez amoniakoliazę fenyloalaniny (PAL; ang. *phenylalanine ammonia lyase*) (Ryc. 1.10). Rośliny mogą posiadać kilka izoform tego enzymu, przykładowo *A. thaliana* posiada cztery funkcjonalne izoformy PAL (1-4) [219]. W kolejnym etapie powstały kwas trans-cynamonowy jest przekształcany przez hydroksylazę kwasu cynamonowego (C4H; ang. *cinnamate 4-hydrolase*) do kwasu *p*-kumarowego (Ryc. 1.10). W następnej reakcji katalizowanej przez ligazę *p*-kumaroilo-koenzymu A (4CL; ang. *4-coumarate:coenzyme A ligase*) powstaje *p*-kumaroilo-koenzym A (Ryc. 1.10). Rola enzymów 4CL w metabolizmie wtórnym jest niezwykle istotna ze względu na produkt ich reakcji –

p-kumaroilo-koenzym A, który jest substratem we wszystkich dalszych reakcjach szlaku fenylopropanoidowego [220]. Metabolit ten jest następnie przekierowywany do szlaku biosyntezy pochodnych kwasów hydroksycynamonowych lub flawonoidów (Ryc. 1.10) i bierze udział w reakcjach katalizowanych odpowiednio przez reduktazę cynamoilo-koenzymu A (CCR; ang. *cinnamoyl-coenzyme A reductase*) i hydroksycynamoilo transferazę (HCT; ang. *hydroxycinnamoyl-transferase*) lub syntazę chalkonową (CHS; ang. *chalcone synthase*). Podobnie jak w przypadku PAL, *A. thaliana* posiada również cztery izoformy enzymu 4CL (1-4) [221]. 4CL1 i 4CL2 przypisuje się funkcję związaną z biosyntezą ligniny [222], a 4CL4 związany jest najprawdopodobniej ze szlakiem kwasu ferulowego i synapinowego [221]. Z kolei 4CL3 wiąże się z biosyntezą flawonoidów [222].



Ryc. 1.10. Uproszczony schemat biosyntezy metabolitów należących do szlaku fenylopropanoidowego, z zaznaczonymi enzymami katalizującymi reakcje tzw. centralnego szlaku fenylopropanoidowego; strzałkami przerywanymi oznaczono kilkietapowe części szlaku

1.4.4.3. Funkcja fenylopropanoidów w odporności

Wśród pochodnych fenylopropanoidowych badanych dotąd w kontekście potencjalnej funkcji w odporności *A. thaliana* występuje grupa pochodnych kwasów hydroksycynamonowych oraz flawonoidy. Wśród pochodnych kwasów hydroksycynamonowych zidentyfikowanych w *A. thaliana* obserwowano zarówno takie, których akumulacja była indukowana po infekcji patogenami – wchodzące w skład ściany komórkowej pochodne benzoesowe i cynamonowe [214, 223] lub takie, których ilość zmniejszała się w odpowiedzi na infekcję, np. jabłczan kwasu synapinowego w liściach [215], czy koniferyna, syringina i skopolina w korzeniach [218, 224]. Przypuszcza się, że trzy ostatnie związki pełnią funkcje prekursorów metabolitów istotnych w odpowiedzi odpornościowej, takich jak ligniny stanowiące barierę fizyczną oraz skopoletyna, będąca fitoaleksyną [224]. W *A. thaliana* zidentyfikowano również pochodne kwasów hydroksycynamonowych i poliamin, takie jak: *p*-kumaroiloagmatyna, feruloiloagmatyna, *p*-kumaroiloputrescyna i feruloiloputrescyna, które charakteryzowały się zwiększoną akumulacją po infekcji liści rzodkiewnika przez nekrotroficzny patogen grzybowy *A. brassicicola* [216]. W przeciwieństwie do pochodnych kwasów hydroksycynamonowych biosynteza flawonoidów w liściach *A. thaliana* infekowanych patogenem bakteryjnym *P. syringae* pv. tomato DC3000 nie zmieniała się [215].

Funkcję wybranych pochodnych fenylopropanoidowych w odporności *A. thaliana* badano dzięki dostępności mutantów z defektami w biosyntezie poszczególnych metabolitów. Jednym z takich mutantów był *fah1*, który nie posiada hydrolazy kwasu ferulowego, niezbędnej w biosyntezie kwasu synapinowego [225]. Wykazano, że odporność *A. thaliana* na infekcję *B. cinerea* może być zwiększona przez promieniowanie UV-B, a efekt ten jest zależny od obecności nieuszkodzonego allelu *FAH1* [225]. W *A. thaliana* zidentyfikowano również gen kodujący enzym kumaroilotransferazę agmatyny (ACT), związany z biosyntezą pochodnych kwasów hydroksycynamonowych i poliamin. Wygenerowany mutant *A. thaliana act* charakteryzował się znacznie większą wrażliwością na infekcję przez *A. brassicicola* w porównaniu do typu dzikiego, co pokazało, że te pochodne kwasów hydroksycynamonowych mogą pełnić funkcję w odpowiedzi odpornościowej rzodkiewnika [216]. Wśród mutantów rzodkiewnika z defektami w biosyntezie pochodnych fenylopropanoidowych wyizolowano także linie z defektami w szlaku biosyntezy fenylopropanoidów: *tt* (ang. *transparent testa*) oraz *ref* (ang. *reduced epidermal fluorescence*). Mutant *tt4*, który nie posiada funkcjonalnej syntazy chalkonowej – enzymu katalizującego pierwszy etap biosyntezy flawonoidów, charakteryzował się zaburzeniami we wzroście, rozwoju, czy odpowiedzi na stres oksydacyjny [226-228], ale nie wykazano dotąd zmian w fenotypie tego mutantu pod względem odpowiedzi odpornościowej przeciwko patogenom [215]. Również w przypadku linii *ref3* z mutacjami w genie

C4H, zaburzającymi funkcje tego enzymu, obserwowano jedynie anomalie związane ze wzrostem i rozwojem rośliny (m. in. karłowatość i sterylność osobników męskich) [229].

Dzięki przeprowadzonym dotąd licznym badaniom dotyczącym szlaku fenylopropanoidowego w *A. thaliana* poszerzono wiedzę dotyczącą m. in. biosyntezy lignin [230], czy szlaku biosyntezy flawonoidów [231]. Doświadczenia z *A. thaliana* wykazały również funkcję fenylopropanoidów w odporności na stresy abiotyczne, takie jak promieniowanie UVB [232], czy susza [233]. Jednak niewiele wykonanych dotąd badań wskazuje na istotną rolę tych metabolitów w odporności rzodkiewnika na mikroorganizmy patogenne. Być może związki te nie pełnią w *A. thaliana* tak ważnej roli jak glukozynolany, czy fitoaleksyny indolowe.

II. CEL PRACY

Celem pracy doktorskiej była charakterystyka zmian zachodzących w szlakach metabolicznych związanych z odpowiedzią odpornościową gatunków z rodziny Brassicaceae. Do realizacji eksperymentów wybrano pięć gatunków krzyżowych, wśród których występował gatunek modelowy *A. thaliana* oraz cztery inne gatunki – *C. rubella*, *C. hirsuta*, *T. salsuginea* i *A. alpina* (Ryc. 1.4). Wybrane rośliny należą do grupy 19 gatunków Brassicaceae, dla których poznano pełne sekwencje genomowe, co pozwala na ich badanie nie tylko na poziomie metabolomu, ale również na poziomie genomu i transkryptomu. Ponadto, wybrane gatunki są w różnym stopniu spokrewnione z *A. thaliana* i pokrywają większą część drzewa filogenetycznego roślin Brassicaceae o znanym genomie (Ryc. 1.4). Patogenem, którego użyto do inokulacji roślin był gatunek grzyba nekrotroficznego *P. cucumerina*, dla którego wykazano wcześniej zdolność do infekcji zarówno *A. thaliana*, jak i wielu innych gatunków roślin. Dowiedziono również, że *P. cucumerina* indukuje w *A. thaliana* biosyntezę metabolitów wtórnych pełniących funkcje w odporności tego gatunku modelowego. W celu uzyskania pełniejszego obrazu zmian zachodzących w metabolizmie wtórnym roślin podczas odpowiedzi odpornościowej, oprócz patogenu w doświadczeniach użyty został wzorzec molekularny związany z mikroorganizmem, którym był flg22. Ten 22-aminokwasowy peptyd został dotąd bardzo dobrze scharakteryzowany w kontekście uruchamiania odpowiedzi odpornościowej *A. thaliana*.

Cel pracy miał być osiągnięty poprzez wykonanie analiz metabolomu, transkryptomu i genomu wybranych gatunków Brassicaceae. W wykonanych eksperymentach przeprowadzono analizę niecelowaną metabolomu, w której poszukiwane były metabolity charakteryzujące się zwiększoną akumulacją po inokulacji patogenem lub w odpowiedzi na MAMP. Pozwoliło to na określenie filogenetycznego zasięgu występowania badanych związków oraz porównanie zmian w ich akumulacji pod wpływem dwóch różnych czynników biotycznych. W ramach pracy dokonano identyfikacji w genomach badanych gatunków potencjalnych ortologów oraz dalszych homologów genów związanych z metabolizmem wtórnym tryptofanu oraz fenyloalaniny w *A. thaliana*. Dla wybranych podczas analiz filogenetycznych genów wykonano analizy RT-qPCR, które pozwoliły określić wpływ badanych czynników biotycznych na ekspresję tych genów. W kolejnym kroku pozwoliło to na częściową korelację zmian zachodzących na poziomie transkryptomu i metabolomu.

Identyfikacja nowych związków pełniących funkcje w odpowiedzi odpornościowej oraz poznanie ich szlaków biosyntezy może prowadzić do poszerzenia wiedzy o układzie odpornościowym roślin oraz być podstawą do dalszych badań mających na celu określenie mechanizmu działania tych metabolitów w odpowiedzi odpornościowej. Ze względu na to, że w rodzinie Brassicaceae występują liczne gatunki uprawne, informacje uzyskane w badaniach z zastosowaniem gatunków modelowych mogą mieć znaczenie w badaniach roślin o znaczeniu gospodarczym.

III. MATERIAŁY I METODY

3.1. Stosowane odczynniki

Rozpuszczalniki używane do ekstrakcji metabolitów, izolacji kwasów nukleinowych oraz do analiz chromatograficznych:

- acetonitryl (czystość LC/MS): VWR, Prolabo Chemicals, Francja
- dimetylosulfotlenek (DMSO): BioShop, Kanada
- chloroform (czystość CZDA): POCH, Polska
- izopropanol (czystość CZDA): POCH, Polska
- etanol 96% (czystość CZDA): POCH, Polska
- woda dejonizowana w systemie Mili-Q Plus: Milipore, USA
- woda destylowana, autoklawowana o pH 8,7 (izolacja genomowego DNA)

Odczynniki do izolacji RNA, DNA, odwrotnej transkrypcji, real-time PCR i elektroforezy:

- kit do izolacji całkowitego RNA RNeasy Plant Mini Kit: Qiagen, Niemcy
- β -merkaptotanol: Fluka, Szwajcaria
- DNaza I (RNase-Free DNase): Qiagen, Niemcy
- zestaw do odwrotnej transkrypcji Omniscript RT kit: Qiagen, Niemcy
- inhibitor rybonukleaz (do odwrotnej transkrypcji) RNasin Plus RNase Inhibitor: Promega, USA
- Tris: BioShop, Kanada
- chlorek sodu (NaCl): CHEMPUR, Polska
- kwas wersenowy (EDTA): BioShop, Kanada
- dodecylosiarczan sodu (SDS): BioShop, Kanada
- kwas octowy: CHEMPUR, Polska
- kwas solny (HCl): POCH, Polska
- zestaw do real-time PCR iTaqTM Universal SYBR Green Supermix: Bio-Rad, USA

Pozostałe odczynniki:

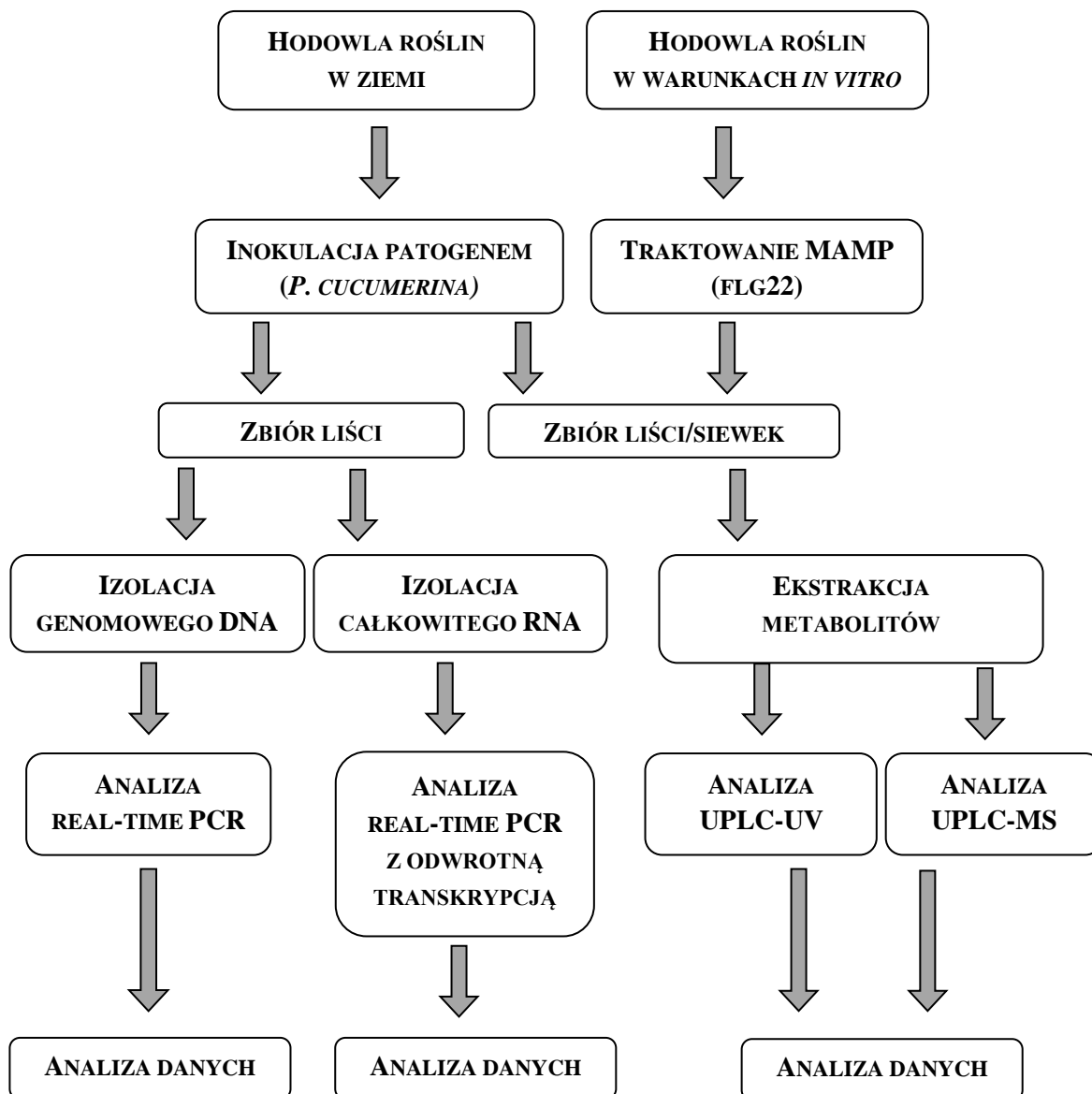
- kwas mrówkowy: Sigma-Aldrich, Polska – do analiz UPLC-UV i UPLC-MS
- pożywka PDA (ang. *potato dextrose agar*)
- pożywka MS (Muraschige & Skoog): Sigma, Polska
- jednowodny kwas 4-morfolinoetylosulfonowy (MES): MP Biomedicals, USA
- sacharoza (czystość CZDA): POCH, Polska

- podchloryn sodu: POCH, Polska
- wodorotlenek sodu (NaOH): CHEMPUR, Polska
- wodorotlenek potasu (KOH): CHEMPUR, Polska

Standardy wykorzystywane podczas analiz UPLC-UV i UPLC-MS:

- tryptofan, tyrozyna: Sigma-Aldrich, Polska
- 4-metoksy-indolilo-3-metyloglukozynolan (4MI3G) – otrzymany od Bednarka i współpracowników [43]
- kamaleksyna – otrzymany od Bednarka i współpracowników [43]
- kwas raphanusamowy: Fluka, Szwajcaria
- kwas indolilo-3-karboksylowy: Sigma-Aldrich, Polska

3.2. Przebieg eksperymentów



3.2.1. Hodowla roślin w ziemi i inokulacja sporami *P. cucumerina*

Do przeprowadzenia eksperymentów użyto następujących nasion:

- 1) *A. thaliana* – ekotyp Columbia-0,
- 2) *C. rubella* – ekotyp Monte Gargano, numer w zasobach NASC (ang. *Nottingham Arabidopsis Stock Center*): N22697,
- 3) *C. hirsuta* – ekotyp Oxford, nasiona otrzymane od grupy prof. M. Tsiantisa [128],
- 4) *T. salsuginea* – ekotyp Shandong, numer w zasobach NASC: N22504,
- 5) *A. alpina* – ekotyp Pajares, nasiona otrzymane od grupy prof. G. Couplanda [130],
- 6) podwójny mutant *A. thaliana cyp79b2 cyp79b3*, uzyskany od Zhao i współpracowników [234].

Hodowla roślin przebiegała według kolejnych etapów:

- 1) nasiona wybranych gatunków wysiane do doniczek z ziemią – umieszczone na 7 dni w ciemności, w 5°C, w celu wernalizacji nasion niezbędnej w przypadku *A. alpina*,
- 2) doniczki z nasionami przeniesione do komory hodowlanej, w warunkach stałej temperatury i wilgotności powietrza (22°C, wilgotność 60%) oraz w kontrolowanych warunkach naświetlania (10/14h dzień/noc); odpowiednia wilgotność podłoża była utrzymywana przez podlewanie wodą,
- 3) dwutygodniowe siewki były pojedynczo przenoszone do krążków torfowych Jiffy-7 o średnicy 44 mm (Jiffy, Niemcy) nawilżonych wodą z 0,1% (v/v) nawozem Wuxal® (Kazgod, Polska); odpowiednia wilgotność podłoża była utrzymywana przez podlewanie wodą,
- 4) rośliny wzrastały przez kolejne 2-3 tygodnie w komorze hodowlanej, w warunkach jak w punkcie 2.

Jako patogen użyto dwóch szczepów grzyba nekrotroficznego *Plectosphaerella cucumerina* BMM i 2127 (zaadaptowany i niezaadaptowany na *A. thaliana*), otrzymanych od grupy prof. Moliny [180]. Roztwór wodny sporów obydwu szczepów przygotowano poprzez wypłukiwanie sporów z grzybni hodowanych na podłożu PDA przy użyciu plastikowych głaszczek laboratoryjnych. Stężenie sporów było wyznaczone przy użyciu komory zliczeniowej Bürkera, a otrzymany roztwór był rozcieńczony do stężenia $1,25 \cdot 10^8$ sporów/ml i przechowywany w 20% roztworze glicerolu w temp. -80°C.

4 – 5 tygodniowe rośliny były spryskiwane roztworem sporów otrzymanym przez rozcieńczenie 1ml sporów o stężeniu $1,25 \cdot 10^8$ sporów/ml w 24 ml wody dejonizowanej, do otrzymania 25 ml roztworu sporów o ostatecznym stężeniu $5 \cdot 10^6$ sporów/ml. Równolegle rośliny

kontrolne były spryskane 25 ml wody dejonizowanej. Spryskane rośliny umieszczono w zamkniętych pojemnikach z przezroczystym wieczkiem w celu utrzymania wilgotności, w temperaturze pokojowej i przy naturalnym oświetleniu.

Zbierano trzy niezależne próby po 24 (do ekstrakcji całkowitego RNA), 48 i 72 godzinach (do ekstrakcji metabolitów) oraz po 5 dniach (do ekstrakcji genomowego DNA) od inokulacji. Na każdą próbę składały się liście, których masa sumaryczna wynosiła 50 – 70 mg (do ekstrakcji genomowego DNA i całkowitego RNA) lub 100 – 200 mg (do ekstrakcji metabolitów) świeżej masy. W każdej próbie znajdowały się liście zrywane z różnych roślin w celu zminimalizowania wpływu zmienności biologicznej. Próby natychmiast po zebraniu były zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane później w temperaturze -80°C , przed ekstrakcją były ponownie umieszczane w ciekłym azocie.

3.2.2. Hodowla roślin w warunkach *in vitro* i traktowanie wzorcem molekularnym flg22

Do hodowli roślin w warunkach *in vitro* użyto tych samych nasion roślin, co w przypadku hodowli prowadzonej w ziemi. Hodowla w warunkach *in vitro* była przygotowywana pod komorą z laminarnym przepływem powietrza w warunkach sterylnych w następujący sposób:

- 1) sterylizacja nasion wybranych gatunków: płukanie 30 sek. w 70% etanolu, płukanie 7 min w 1% roztworze podchlorynu sodu, płukanie w autoklawowanej wodzie dejonizowanej 1 min
- 2) przeniesienie sterylnych, wysuszonych nasion do płytek 24-dołkowych (ok. 6 – 8 nasion w jednym dołku) z 1,5 ml pożywki MS z 0,5% dodatkiem sacharozy i odczynnika MES, o pH 5,7 (ustalone przy użyciu 1M roztworu KOH)

Zamknięte sterylnie płytki były umieszczone w lodówce w 4°C przez 7 dni, po tym przeniesione do komory hodowlanej (temp. 23°C , naświetlanie 16/8h dzień/noc, bez kontroli wilgotności) na 13 dni.

Jako wzorzec molekularny związany z mikroorganizmem zastosowany został flg22 – 22-aminokwasowy peptyd, stanowiący fragment bakteryjnego białka flagelliny, otrzymany z Departamentu Plant – Microbe Interactions Instytutu Maxa Plancka w Kolonii. 15 μl roztworu flg22 o stężeniu 10 mM dodawano do płynnej pożywki, w której prowadzono hodowle roślin, do uzyskania ostatecznego stężenia 1 μM flg22 w każdym dołku płytki hodowlanej. Do dołków z roślinami stanowiącymi próbę kontrolną dodano taką samą objętość wody dejonizowanej. Po 24 godzinach od traktowania flg22 zbierane były trzy niezależne próby. Na każdą z nich składały się całe siewki z kilku dołków, których masa sumaryczna wynosiła 100 – 200 mg (świeżej masy). Próby tuż po zebraniu były zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane później w temperaturze -80°C . Przed ekstrakcją próby były ponownie umieszczone w ciekłym azocie.

3.2.3. Ekstrakcja metabolitów

Próby zamrożone w ciekłym azocie były poddawane homogenizacji przy użyciu młynka kulowego firmy Retch. Homogenizacja była prowadzona 2 x 30 sekund z częstotliwością wytrząsania 30 Hz. Rozpuszczalnikiem ekstraktu był 100% DMSO, dodawany w proporcji 2,5 µl DMSO na 1 mg świeżej masy próby. Po homogenizacji próby były wirowane 20 min, w temperaturze 4°C, z prędkością 15000 obrotów na minutę (RPM; ang. *revolutions per minute*). Otrzymany supernatant był następnie użyty w analizach chromatograficznych.

3.2.4. Analizy ultrasprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fotodiodowym i spektrometrem masowym

Analizy chromatograficzne były przeprowadzone przy użyciu aparatu Acquity do ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC), z detektorem fotodiodowym PDA (ang. *photodiode-array detector*) (UPLC-UV) i dodatkowo z detektorem fluorescencyjnym (Waters, USA). Analizy chromatograficzne były prowadzone w warunkach rozdziału opisanych w Tabelach 3.1 i 3.2.

Tabela 3.1. Warunki rozdziału chromatograficznego

	Chromatograf cieczowy Acquity (Waters)
Wprowadzanie próby	automatyczna komora nastrzyku
Kolumna	Acquity UPLC HSS T3
Wymiary kolumny	2,1 x 150 mm, średnica ziarna 1,8 µm
Temperatura kolumny	22°C
Objętość nastrzyku	10 µl
Przepływ	0,350 ml/min

Fazę ruchomą stanowiły rozpuszczalniki:

- faza A- 99,9% woda/ 0,1% kwas mrówkowy (v/v)
- faza B- 98% acetonitryl/ 1,9% woda/ 0,1% kwas mrówkowy (v/v)

Tabela 3.2. Stosowany gradient rozpuszczalników w rozdziale chromatograficznym

Czas [min]	% A	% B
0	100	0
0,5	100	0
22	75	25
29	20	80
30	0	100
35	0	100
36-55	100	0

Analizy chromatograficzne prowadzone w układzie Acquity były sprzężone dodatkowo ze spektrometrem masowym (UPLC-MS) micrOToF-Q II (Bruker Daltonics, Niemcy) z hybrydowym analizatorem typu kwadrupol – analizator czasu przelotu. Rozdział prowadzony był w tych samych warunkach, jak w przypadku analiz UPLC-UV. Widma masowe MS zarejestrowano w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Dla wybranych prób przeprowadzono analizy CID (ang. *Collision Induced Dissociation*) MS/MS i zarejestrowano widma fragmentacyjne MS² w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Wysoka rozdzielczość aparatu pozwoliła na określenie dokładnych mas cząsteczek protonowanych i deprotonowanych [M+H]⁺/ [M-H]⁻ z błędem poniżej 5 ppm. Parametry działania spektrometru masowego opisano w Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Parametry układu micrOToF-Q II

Źródło jonów	ESI (elektrozpraszanie)
Analizator	Qq-ToF
Napięcie w źródle jonów	+/- 4,5 kV
Temp. w źródle	220°C
Gaz nebulizujący	azot 0,4 bara (bezpośredni nastrzyk)
Przepływ gazu suszącego	4l/min (bezpośredni nastrzyk)
Gaz kolizyjny	argon
Energia kolizji	20 – 30 eV
ISCID	5 eV
Rozdzielczość układu	15 000 FWHM (przy 200 m/z)
Zakres rejestrowanych mas	100 – 1000 m/z
Kalibracja aparatu	wewnętrzna i zewnętrzna - klastrami mrówczanu sodu

3.2.5. Analiza danych i identyfikacja metabolitów

Dane uzyskane w analizach UPLC-UV były analizowane przy użyciu oprogramowania Empower 3.0 (Waters, USA). Dane uzyskane w analizach chromatograficznych sprzężonych z detektorem masowym były procesowane przy pomocy programu Data Analysis 4.0 (Bruker, Niemcy). Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Microsoft Office Excel oraz Prism 5.

Identyfikacja metabolitów była oparta na porównaniu czasów retencji i widm UV otrzymanych w analizach chromatograficznych z danymi uzyskanymi dla dostępnych standardów. Identyfikacja potencjalnych struktur poszczególnych metabolitów opierała się na analizie masowych widm fragmentacyjnych oraz na informacjach dostępnych w literaturze i bazach danych, wśród których korzystano z baz:

- 1) KNApSAcK: http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/top.html,
- 2) ChEBI: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/>,
- 3) METLIN: http://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage.

3.2.6. Izolacja genomowego DNA i analiza real-time PCR (qPCR)

Genomowe DNA było izolowane z liści wybranych gatunków zmodyfikowaną metodą Edwardsa. Izolacja przebiegała według kolejnych etapów:

- 1) homogenizacja materiału roślinnego z użyciem miniłuczek (Eppendorf,) w 300 µl buforu Edwardsa:
 - 200 mM Tris/HCl pH 7,5
 - 250 mM NaCl
 - 25 mM EDTA
 - 0,5% SDS
- 2) inkubacja otrzymanego homogenatu 10 min. w temperaturze 65°C z wytrząsaniem 500 rpm, następnie inkubacja 10 min na lodzie,
- 3) dodanie 200 µl zimnego chloroformu i krótkie wytrząsanie aż do połączenia faz,
- 4) wirowanie 5 min. w temperaturze 4°C z prędkością 15 000 rpm,
- 5) przeniesienie 200 µl supernatantu do nowej probówki i dodanie 200 µl zimnego izopropanolu; następnie delikatne mieszanie przez kilkukrotne odwracanie probówki
- 6) wirowanie (jak w punkcie 4)
- 7) zlanie supernatantu i płukanie otrzymanego osadu w zimnym 70% alkoholu etylowym przez dodanie 500 µl etanolu, wytrząsanie do momentu oderwania osadu od dna probówki,

- wirowanie 3 min. w temperaturze 4°C z prędkością 15 000 rpm i zlanie etanolu nad osadu; czynność powtarzano cztery razy,
- 8) uzyskany osad pozostawiono w temperaturze pokojowej do całkowitego odparowania resztek etanolu i następnie zawieszono w 50 µl wody destylowanej, autoklawowanej o pH 8,7,
 - 9) stężenie i czystość uzyskanego DNA sprawdzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

Genomowe DNA uzyskane z liści roślin inokulowanych patogenem służyło jako matryca do ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR* lub *qPCR*), w którym oznaczono względną ilość grzybowego genu β -tubuliny w zainfekowanej tkance roślinnej. Reakcję przeprowadzono z użyciem zestawu do real-time PCR iTaq™ Universal SYBR Green Supermix firmy BioRad. Do każdej reakcji dodano odpowiednią objętość roztworu DNA, w której znajdowało się 100 ng matrycy, specyficzne startery (1 µl każdy) (Tabela 3.4), objętość odczynnika Supermix według załączonego protokołu oraz woda dejonizowana do objętości reakcji 20 µl. Genem referencyjnym była roślinna aktyna.

Tabela 3.4. Sekwencje starterów użytych w reakcjach qPCR

Sekwencje starterów			
β-tubulina	F	CAAGTATGTTCCCCGAGCCGT	
	R	GAAGAGCTGACCGAAGGGACC	
aktyna	<i>A. thaliana</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG
	<i>C. rubella</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGTTCTGCTGTTG
	<i>C. hirsuta</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG
	<i>T. salsuginea</i>	F	CCGGTATCGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG
	<i>A. alpina</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCTCGCTCTGCTGTTG

Program qPCR	
Wstępna denaturacja	95°C, 3 min
Denaturacja	95°C, 30 sek
Przylączenie starterów	54°C, 30 sek
Wydlużanie starterów	72°C, 1 min

35x

3.2.7. Analiza filogenetyczna i wybór genów do analiz ekspresji

Przeprowadzona analiza filogenetyczna opierała się na wyznaczeniu w badanych gatunkach potencjalnych ortologów i dalszych homologów wybranych genów *A. thaliana*, związanych z metabolizmem tryptofanu oraz ortologów genów związanych ze szlakiem fenylopropanoidowym. Korzystano z sekwencji genów *A. thaliana* dostępnych w serwisie internetowym Phytozome 12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>). W zasobach tego serwisu znajdowały się również sekwencje genów *C. rubella* oraz *T. salsuginea*. Sekwencje kodujące genów *C. hirsuta* zostały udostępnione przez zespół prof. M. Tsantisa, który prowadził projekt sekwencjonowania genomu *C. hirsuta* [128]. W przypadku genomu *A. alpina*, dostępne są jedynie sekwencje poszczególnych chromosomów, bez anotowanych genów. Sekwencje homologów z *A. alpina* były wyznaczone poprzez analizę porównawczą sekwencji *A. thaliana* z użyciem narzędzia BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) zaimplementowanego w programie BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5. Struktury genów zostały wyznaczone poprzez analizę porównawczą z sekwencjami kodującymi genów *A. thaliana*.

Potencjalne ortologi genów *A. thaliana* w gatunkach *C. rubella* i *T. salsuginea* były wyszukiwane z użyciem narzędzia BLAST zaimplementowanego w serwisie Phytozome. Wybór genów był oparty na największym stopniu podobieństwa sekwencji nukleotydowych. W celu sprawdzenia, czy wybrane geny *C. rubella* i *T. salsuginea* są ortologami poszczególnych genów *A. thaliana* przeprowadzono odwrotną analizę BLAST w porównaniu do genomu *A. thaliana*. Potencjalne ortologi w gatunku *C. hirsuta* zostały wybrane na podstawie anotacji genomu tego gatunku udostępnionej przez zespół prof. M. Tsantisa.

Wybrane geny ze wszystkich badanych gatunków zostały wykorzystane do przeprowadzenia analizy filogenetycznej, która została wykonana na podstawie sekwencji aminokwasowych. Sekwencje aminokwasowe dla wszystkich genów uzyskano przez użycie funkcji translacji sekwencji nukleotydowych w programie BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5. Sekwencje aminokwasowe były następnie użyte w analizie dopasowania wielu sekwencji (MSA; ang. *multiple sequence alignment*), przeprowadzonej z użyciem narzędzia ClustalW Multiple Alignment zaimplementowanego w programie BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5. Uzyskane dane posłużyły do wygenerowania drzew filogenetycznych, przeprowadzonego w programie Mega 7.0.14 metodą tzw. najbliższego sąsiada (ang. *neighbor joining*).

3.2.8. Izolacja całkowitego RNA i analiza real-time PCR z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)

Izolacja całkowitego RNA z liści badanych gatunków była przeprowadzona zgodnie z procedurą opisaną w zestawie RNeasy Plant Mini Kit. Dodatkowo w procedurze użyto enzymu DNAza I w celu zapobiegnięcia zanieczyszczenia otrzymanego RNA genomowym DNA. Stężenie oraz czystość uzyskanego RNA sprawdzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, USA). Dodatkowo jakość uzyskanego RNA sprawdzono poprzez rozdział elektroforetyczny uzyskanego materiału na żelu agarozowym. Uzyskane całkowite RNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Wykonana analiza real-time PCR z odwrotną transkrypcją pozwoliła na sprawdzenie zmian w ekspresji wybranych genów po inokulacji patogenem. W celu wykonania analiz ekspresji wybranych genów wyizolowane całkowite RNA poddane było reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Omniscript RT, według załączonego protokołu. Dodatkowo, w celu ochrony RNA zastosowano inhibitor rybonukleaz RNasin Plus RNase Inhibitor. Do każdej reakcji dodano objętość RNA, w której znajdowały się 2 µg matrycy. Reakcja prowadzona była w objętości 20 µl. W wyniku przeprowadzonej reakcji odwrotnej transkrypcji powstał cDNA, który po przeprowadzonej reakcji został rozcieńczony cztery razy.

Otrzymane cDNA służyło jako matryca w reakcji real-time PCR, w której sprawdzono poziom ekspresji wybranych genów względem genu referencyjnego, którym była aktyna. Reakcje przeprowadzono z użyciem zestawu do real-time PCR iTaq™ Universal SYBR Green Supermix. Do każdej reakcji dodano 1 µl roztworu cDNA i po 1 µl roztworu starterów specyficznych dla poszczególnych genów wybranych na podstawie wykonanych analiz filogenetycznych (Tabela 3.5). Startery były zaprojektowane manualnie w regionach jak najbardziej specyficznych dla danego genu i sprawdzane przy użyciu narzędzia bioinformatycznego OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) lub projektowane były automatycznie przy użyciu narzędzia bioinformatycznego Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Reakcje były prowadzone w objętości 20 µl. Do oznaczeń ilościowych otrzymanych wyników użyto wartości względnej ekspresji wygenerowanych przez program Bio-Rad CFX Manager 3.1 (BioRad, USA).

Tabela 3.5. Sekwencje starterów specyficznych dla badanych genów

Sekwencje starterów			
aktyna	<i>A. thaliana</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG
	<i>C. rubella</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGTTCTGCTGTTG
	<i>C. hirsuta</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG
	<i>T. salsuginea</i>	F	CCGGTATCGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCCCGCTCTGCTGTTG
	<i>A. alpina</i>	F	CCGGTATTGTGCTGGATTCT
		R	AATTTCTCGCTCTGCTGTTG
CYP79B2	<i>At4g39950.1</i>	F	AACAAAAGAAACCGTATCTGCCAC
		R	TCCTAACTTCACGCATGCTATCTC
	<i>Carubv10004524</i>	F	AGTGCAAAGAAACCGTCTCTCCCGC
		R	TCCCAACCTCACGCAGGCTATCTC
	<i>CARHR246750</i>	F	AAAAGAAACTGTCTCTCCCGC
		R	TCCTAACTTCACGCATGCTATCTC
<i>Thhalv10024861m</i>	F	GATAAAAAGAAATTGTCTCTCCCGC	
	R	TCCTAGCCTCACGCAAGCTATCTC	
ortolog <i>A. alpina</i>	F	GACAAGAAGAAACTGTCTCTCCCTC	
	R	TCCTAGCCTCACGCAAGCTATCTC	
CYP79B3	<i>At2g22330.1</i>	F	CAAGTCAAGTCTCGGAATGTC
		R	GAGGATGCAACTTCTTGTTTCG
	<i>Carubv10025388</i>	F	CAAGTCTAGTCCCGGATCGTT
		R	GAGGATGCAACTTCTTGTTTCT
	<i>CARHR113560</i>	F	CAAGTCAAGTCTCGGAATGTC
		R	GAGGATGTAGCTTCTTGTTTTGTG
<i>Thhalv10000114</i>	F	CAAGTCTAGTCCCGGAAACGTC	
	R	GAGGATGCATCTTCTTGATTG	
ortolog <i>A. alpina</i>	F	CAAGTCTAGTCCCGAAACGTC	
	R	GAGGATGCAACTTCTTGTTTTG	
CYP83B1	<i>At4g31500.1</i>	F	GGCAACAAACCATGTCGTATCAAG
		R	CGTTGACTCTTCTTCTCTAACCG
	<i>Carubv10007516</i>	F	GGCAACAAACCATGTCGTATCAAG
		R	CTTTTACACTCTTCTTCTCTAACGG
	<i>CARHR034820</i>	F	GTCAACAAACGATGTCGTATCAAG
		R	CGGTTGCACTCTTCTTCTCTAA
	<i>Thhalv10004064</i>	F	GGCAACAAACCATGTCGTATCAAG
		R	CGTTGGCACTCTTCTTCTCTAACGG

	<i>ortolog A. alpina</i>	F GGCAACAAACCATGTCGTATCAAG R CGTTGGCACTCTTCCTCTCTTACGG
CYP81F2	<i>At5g57220.1</i>	F AACTAGACCAACCCAAGTATTACAG R GCTTTTGCCTTTTTCAACTTCAG
	<i>CARHR271010</i>	F AACTTGACCAACCCAAGTATTACAG R GCTTTCGCCTTTTTCAATACTTCAG
	<i>Thhalv10013359</i>	F AACAAGACCAACCCAAGTATTACAG R GCTTTGGCCTTTTTTCATCACTTCAG
	<i>ortolog A. alpina</i>	F AACAAGACCAACCCGAGTATTACAG R GCTTTCGCCTTTTTTAACACTTCAG
CYP71B15	<i>At3g26830.1</i>	F TCCAAAACCTCTGGGAAAACGCAG R GCCAATCCCCAATCGAAGAAGT
	<i>Carubv10011330</i>	F CCGGGAACCTACATCCCAGGAA R GCTCTCCACTCTTCACCGTTG
	<i>Carubv10017053</i>	F CGAAAGGCATTACATCCCAGGAA R AACTCCACTCGTCACCGAAT
CYP71A12	<i>At2g30750.1</i>	F CAGGATCAACGGTTTCAATGCTAG R ATACTCTTCTCGCTTTCGATTG
	<i>Carubv10023055</i>	F CAGGGTGATACCGCAAGGGAT R CCAGCCTGTAATCCGCTATCC
	<i>Carubv10023058</i>	F AGATGTTGATGTTTTCTCTGTGC R GTACTGGAGGCTGAGGGATCG
CYP71A13	<i>At2g30770.1</i>	F TGGGATCCGTGGTTTCAATAA R GAACTTGGAAATCCACTGTTCT
	<i>Carubv10023014</i>	F CAGGGTGATACCGCAAGGGAT R CCAGCCTGTAATCCGCTATCC
	<i>Carubv10024755</i>	F AGATGTTGATGTTTTCTCTGTGC R GTACTGGAGGCTGAGGGATCG
CYP71B6	<i>At2g24180.1</i>	F GCTTGGGCTATTGGACGTAA R ACTTCCTCAGTCGCTTTCCA
	<i>Carubv10023049</i>	F GACGGCGAAGATGGTCAAGTT R CCCTGGGAAAATATCCGCC
	<i>Carubv10023053</i>	F CAGCAAATGCTGATCAAGTT R GCTTGGGAATATATCGGCAGC
	<i>CARHR118020</i>	F TGTC AATACATGGGCGATTG R ACTTCCTCAGTCGCTTTCCA
CYP71B5	<i>ortolog A. alpina</i>	F CCGAGATGCTTCCATTTCCAT R TTCCGAGGAAGACGGTTATG
	<i>At3g53280.1</i>	F GCTCTTGAGACACCAACTTCAT R CATCACCGTGGAATGCTGAC

	<i>Carubv10018377</i>	F	GGCTTTTATCTTCGACAGAGA
		R	TTTGAGTACTTCCTCAGCTCCT
	<i>Carubv10018574</i>	F	AGCTCTTACCCTCGAAAAGGA
		R	CTTGAGCACTTCCTGAGCTC
	<i>CARHR163180</i>	F	CTAACGAGACACCAACCTCA
		R	ATGAAGCCTTGAATGCTGAC
<i>Thhalv10010307</i>	F	CAAGACGGTCGGAGCAAGGTT	
	R	TGATGATACCTTCTTGACCAACAC	
<i>Thhalv10010309</i>	F	TAAGACGGTCGGAACAGGGTT	
	R	GCTTTTGATACCTTCTTGACCAAC	
<i>ortolog A. alpina</i>	F	TCCAAAGAAGGAGCTGAGGA	
	R	TGAACAACACTTGGCTCTCG	
CYP71B7	<i>At1g13110.1</i>	F	TAGTCGCTGGTGTTCCTT
		R	GATTCTCCATCTTTCTCTTGCTTG
	<i>Carubv10015900</i>	F	GAAAGAGTCAGCTTTGACGCA
		R	CCAATCGCTGAGCAACTCAA
	<i>CARHR013480</i>	F	TGGTTGTGGAGCTTCTGAA
		R	CGTTTTCTCGTCGATGAAC
	<i>Thhalv10007425</i>	F	CTACCTCACACATGTTTGCGA
R		TCATTCTTGTAGCCACCGTCT	
<i>Thhalv10023132</i>	F	CTCTTCTTGAAAAAATCTCCGACC	
	R	ATTCCGAACCGGAGTAGCAT	
<i>Thhalv10007439</i>	F	CGATATCCACAAGTGCAAGTT	
	R	GGGATTAAGATGTTTCGTCGAG	
<i>ortolog A. alpina</i>	F	CGGATTTCTGGCCAGAACAA	
	R	GTCGTCTCCATCTTTCTCATGC	
CYP71B21	<i>At3g26190.1</i>	F	GAGAGCAAAGTCGGCTCTTTT
		R	GGATCACAAGCTTCAGGTAGTG
	<i>CARHR147220</i>	F	GCTATCTGCGACCAGTTTGT
R		CAGTCTACATAACAATACTAGCGGT	
<i>Thhalv10005677</i>	F	CGCGACCAGGTTGTTTTCTTA	
	R	GCGGATTTTCGAGAGTTTCTTG	
CYP71B22	<i>At3g26200.1</i>	F	GCTAACAGCGACCAAATTGTT
		R	CTCAGCAGATTTTCGAGAGTTT
	<i>CARHR147230</i>	F	CGGTTATCATCTCCACACGA
R		CATGTCACTCTCCTTCTCTAAT	
<i>Thhalv10004058</i>	F	TGCCTCCAGATTGTTTACTTAC	
	R	CCAGATTTAGTGAGTTTCTTGACG	
CYP71B23	<i>At3g26210.1</i>	F	GATTCAGGCGAAATTCGCTTTCT
		R	CCACAACATCTGGAGTCTCTAATA

	<i>Carubv10019518</i>	F	CTCTGAAGCTTCTCAGAAACA
		R	GGCCTGAATCTTTTCTGACCT
	<i>CARHR147240</i>	F	CGTTTTCTCGTCGATGAAC
		R	CGCCTGAATCTTTTCAGACC
<i>Thhalv10003650</i>	F	GGCTTTGAAGCAATCTCCAG	
	R	AACCATCCAAGACCAGCAAC	
<i>ortolog A. alpina</i>	F	AATCACTGGTCAAAGCAAGAGC	
	R	CATACCAGCAACGTGAACACA	
CYP71B38	<i>At3g44250.1</i>	F	CCCACAAAAGCTGATTTCGTT
		R	CACCATACCAATTTCAAGTACTC
homologi CYP71A12/ CYP71A13 w <i>C. hirsuta</i>	<i>CARHR056050</i>	F	TGGTCTAAAAACACGGAGAAGC
		R	CACCATAGAACTGGATTTTCGG
	<i>CARHR218850</i>	F	GCCGCAGTCTTAGGTGAAT
		R	CCCAGTCTTATCGCTTTGGAT
	<i>CARHR188470</i>	F	TATTCGTCGAGCTTGCAGG
		R	GCTCTTCTTCTGTCTTTCCAAGG
	<i>CARHR188490</i>	F	AAATCATGGAGCTTGCAGGT
		R	ATATGCTCTTGCACCACTTTATCC
	<i>CARHR256060</i>	F	CATCCTCTGAGTTCTTTGGCA
R		TGATGGCTCTTCGTGATC	
<i>CARHR157040</i>	F	TAGTGGGAAGAAAACACCTCC	
	R	AAGTCCGCGGAAGAGACTA	
<i>CARHR157050</i>	F	ATATTTTACGACGGGCGTGAT	
	R	ATCCGCCAAGATTTTCGCTTA	
<i>CARHR157060</i>	F	CCATAGTTCTTGTTTTGGGTTTCAG	
	R	CTTGAAGGTCTTCTTCTGATACTCT	
<i>CARHR157030</i>	F	GTACCAGCTGATTCAGGAACA	
	R	TCAGAGGAGTTTAGACCGGA	
PAL1	<i>At2g37040.1</i>	F	GTGATCAACGCGGAGGATC
		R	TGTCTCCGATAGCTCCACC
	<i>Carubv10022721</i>	F	AACATGGCGATCAACGAGG
		R	ACACCGTTACCAATGGTGG
	<i>CARHR131540</i>	F	TAAGGTCACGGTACTGGCT
R		GTCTCTGACAGCTCCTCCT	
<i>Thhalv10016314</i>	F	CAAGATGAACGGAGGAGAAGTG	
	R	CACTGGCTTCCTAAACTCCTC	
<i>ortolog A. alpina</i>	F	GTTAGCGGAGTAGCATCACAC	
	R	GAGTTTCACCTCCAAGATTCACC	
PAL2	<i>At3g53260.1</i>	F	GTGGCGGTTACTACGAAGAC
		R	CTTGAAGTCTCCGCTAACTCAA
	<i>Carubv10016752</i>	F	GCGGTGATGACAAAGACTGT
	R	AAGACTCAGCTAGCTCAACCT	

	<i>CARHR289320</i>	F	ATAACGAAGCATGTGGCGG
		R	GAAGACTCCGCTAGCTCAAC
	<i>Thhalv10010153</i>	F	TTCACCAAACGGCAAAATCG
		R	TACAGGTCTCCGATACTCCTC
	<i>ortolog A. alpina</i>	F	CCAAAACGGCAAAACCGAAG
		R	CAACGATGCTCCACCAAGATT
PAL3	<i>At5g04230.1</i>	F	GAACTCAGGCCTAAAGAAGGG
		R	GAAGCGGATCAATCTTGTGAA
	<i>At5g04230.2</i>	F	GAACTCAGGCCTAAAGAAGGG
		R	GCGTAACCAAGAACATACCGAT
PAL4	<i>At3g10340.1</i>	F	TCCTCCAAGTGGTTGACC
		R	CTATAGCCGATGTTCTCCTCCTC
	<i>Carubv10013086</i>	F	GAGCTTTGCAACCAAAACAACG
		R	CGTCAACGTCTCTCCTCCTAA
	<i>CARHR084820</i>	F	CTCTAGCGATCCATTGAACTGG
		R	CGGTTTATGCTCTCCATCA
	<i>Thhalv10020170</i>	F	AAGTTATGTCCGCGATGTTTCG
		R	CGCGTACCGATCTTGTTTAGG
	<i>Thhalv10020168</i>	F	AAGTTATGTCCGCGATGTTTCG
		R	CGTACCTGCAACGATCTTGTGTT
	<i>ortolog A. alpina</i>	F	TACAAGCAGAACAACAACCACG
		R	TCACTCCTCCGTTAGCCA
4CL1	<i>At1g51680.1</i>	F	GAACAAGCAGTTTCTCAGGTGA
		R	TAGGCAAGGCTTAGTGGC
	<i>Carubv10008746</i>	F	CCGCAAGAAGTGATGGAGAAA
		R	GGGAAATGACGTGGACGT
	<i>CARHR041840</i>	F	GGAGAAACAGAGCACCAACA
	R	TGAAAACCTGGCGGCGATT	
	<i>Thhalv10011357</i>	F	CTCCTCCGAGACAACATCC
		R	ACGTCACTACTGTTGCTGC
	<i>ortolog A. alpina</i>	F	GCCACAACAAGAAGCCATG
		R	CTGAGTAAGTGTACACGTGTCC
4CL2	<i>At3g21240.1</i>	F	GAAGAACCACGAGTGGACTC
		R	GAGACTACAGAGCATGATGGAG
	<i>Carubv10013386</i>	F	GCACAAGAAGTGATGATCGCT
		R	CGTAAGAGTATACCTCGCCG
	<i>CARHR097140.1</i>	F	GAGTTCGCCGCTAAACCAT
		R	AGTTATTGCGCCGATGAAGG
	<i>ortolog A. alpina</i>	F	CGAGGTATACTTACGCCG
		R	GGAAGCTTTGGCTTGTTTAGTG
4CL3	<i>At1g65060.1</i>	F	TGCAGCTCTACACGAACC
		R	ACAAGGCTTGTTCGGAAACA
	<i>Carubv10020070</i>	F	GATCACTGCAGCTATACACGAACC

	R	CGAGCCGACAATGAGACAA	
<i>CARHR056540.1</i>	F	GATAACCGCGGCTTTACATGA	
	R	AGCCAACGATTAGACAAGGC	
<i>Thhalv10022462</i>	F	ACCACAAATTCACAAAACGGC	
	R	TGTCTCTCCGTAGGTGTAGC	
<i>ortolog A. alpina</i>	F	TGCTCTACACGAACCTCAGAT	
	R	ATCCCACGATTAGGCAAGAC	
4CLA	<i>At3g21230.1</i>	F	GTGCTCCAACAACAAACGC
		R	GGTTGTTGAGGAATCTCCGTC
	<i>Carubv10013305</i>	F	GTGCTCCAACAACAAACGC
		R	AAGTGGAGTCACCCCTCTC
	<i>CARHR097130.1</i>	F	GGTGCTCCAACAACAAACAC
		R	CGTAAATAGACGACCAGTGGC
	<i>Thhalv10020403</i>	F	GACGTTGATGGTTGCGTG
		R	CCGGTGAAGTTGAGATTAGGG
	<i>Thhalv10020406</i>	F	TTGCTCTCTCCTTCCTTGC
		R	TCAGCTAACGAAACGCCG
	<i>Thhalv10020439</i>	F	ATTGAAGAAGGAGCTTGAAGACG
		R	CCTGTAATGGTATCGACCACTTT

Program qPCR	
Wstępna denaturacja	95°C, 3 min
Denaturacja	95°C, 30 sek
Przylączenie starterów	54°C*, 30 sek
Wydłużanie starterów	72°C, 1 min

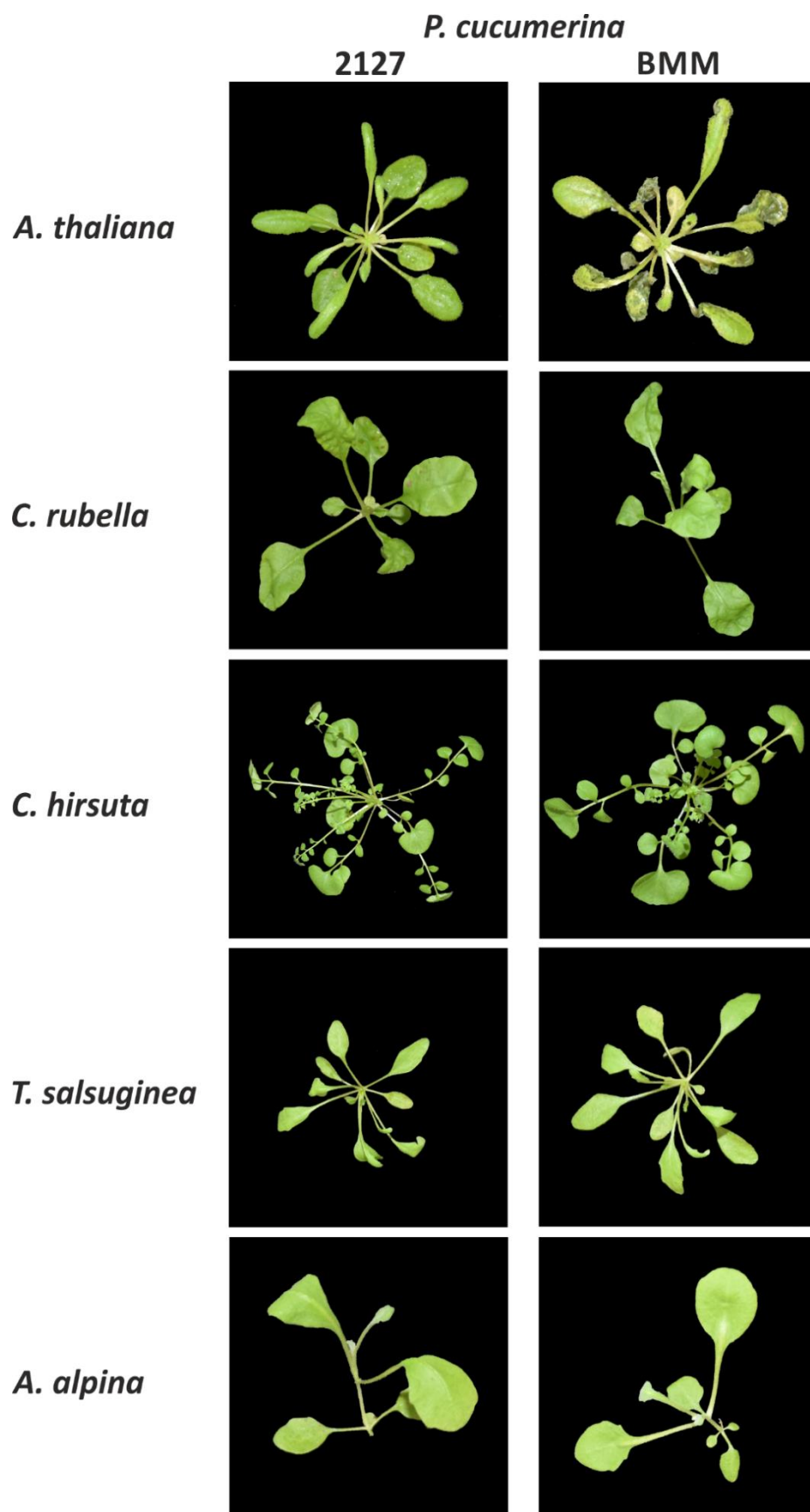
← 35x

*dla genów *PAL1* w *A. thaliana* i *C. hirsuta* oraz *PAL2* w *A. thaliana* temp. wynosiła 51°C

IV. WYNIKI

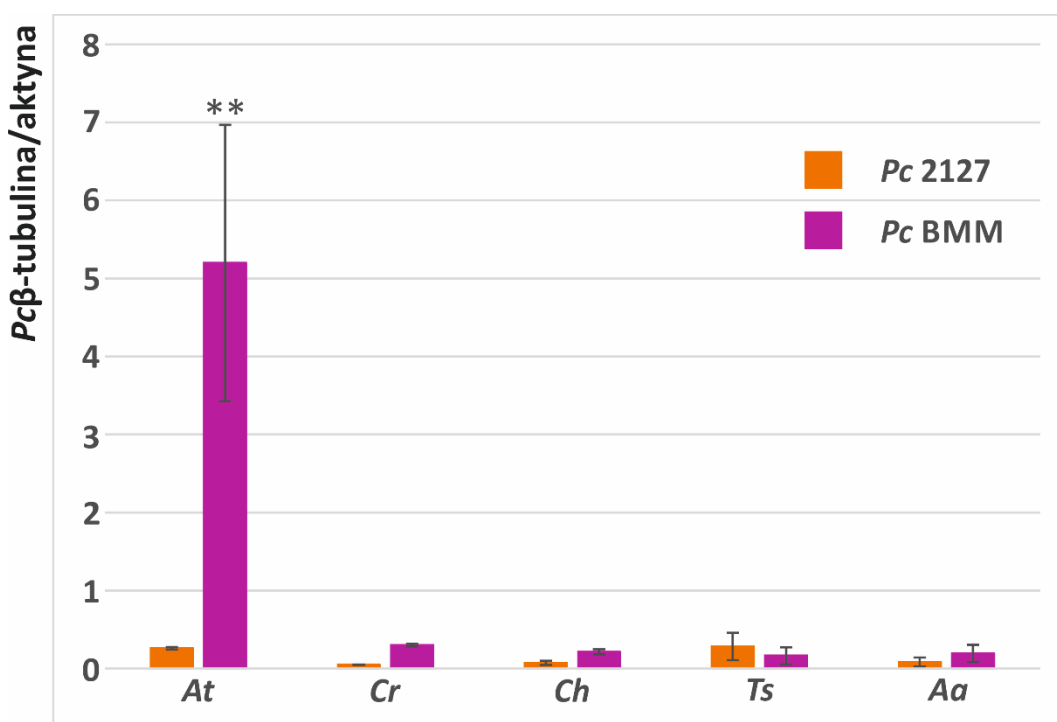
4.1. Zdolność do kolonizacji badanych gatunków Brassicaceae przez *P. cucumerina*

Wybrane do przeprowadzenia doświadczeń szczepy grzybowego patogenu nekrotroficznego *P. cucumerina* 2127 i BMM (*Pc*2127 i *Pc*BMM) są odpowiednio niezaadaptowane i zaadaptowane na *A. thaliana* [180, 235]. Określenie zdolności tych szczepów do kolonizacji pozostałych wybranych gatunków Brassicaceae było istotne dla poprawnej interpretacji zmian zachodzących w szlakach metabolicznych tych roślin w odpowiedzi na inokulację poszczególnymi szczepami. Poziom kolonizacji roślin określono wstępnie poprzez obserwację makroskopową rozwoju objawów chorobowych, a następnie oznaczono ilościowo biomasę patogenu w inokulowanych liściach. Obserwacje makroskopowe pokazały rozległą nekrozę tkanek jedynie w przypadku *A. thaliana* inokulowanego szczepem *Pc*BMM (Ryc. 4.1). W przypadku *C. rubella* obserwowano występowanie licznych plam nekrotycznych powstałych po inokulacji szczepem *Pc*2127. Pojedyncze plamy nekrotyczne były widoczne również po inokulacji *A. thaliana* szczepem *Pc*2127 i *C. hirsuta* szczepem *Pc*BMM (Ryc. 4.1). W przypadku *T. salsuginea* i *A. alpina* nie obserwowano żadnych makroskopowych objawów infekcji zarówno po inokulacji *Pc*2127, jak i *Pc*BMM (Ryc. 4.1).



Ryc. 4.1. Makroskopowe objawy kolonizacji wybranych gatunków Brassicaceae przez szczep 2127 i BMM patogenu nekrotroficznego *P. cucumerina*. Zdjęcia wykonane 5 dni po inokulacji

Biomasa patogenu została określona 5 dni po inokulacji roślin poprzez analizę qRT-PCR względnej ilości grzybowego genu β -tubuliny w zainfekowanej tkance roślinnej. Analiza ta pokazała znacznie większy, w porównaniu do szczepu Pc2127, rozwój szczepu PcBMM w *A. thaliana*, który jest prawdopodobnie jedynym żywicielem dla tego patogenu wśród badanych gatunków Brassicaceae (Ryc. 4.2). W przypadku pozostałych gatunków względna ilość genu β -tubuliny obu szczepów była nie większa niż w przypadku szczepu Pc2127 na *A. thaliana* (Ryc. 4.2). Analizy te wykazały, że względem pozostałych gatunków Brassicaceae oba szczepy (*Pc2127* i *PcBMM*) zachowują się jak szczepy niezaadaptowane.



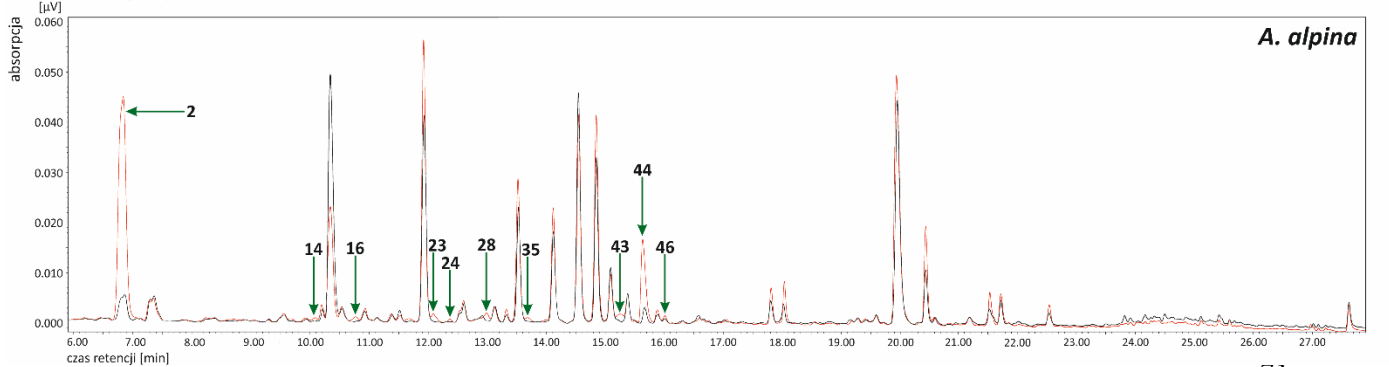
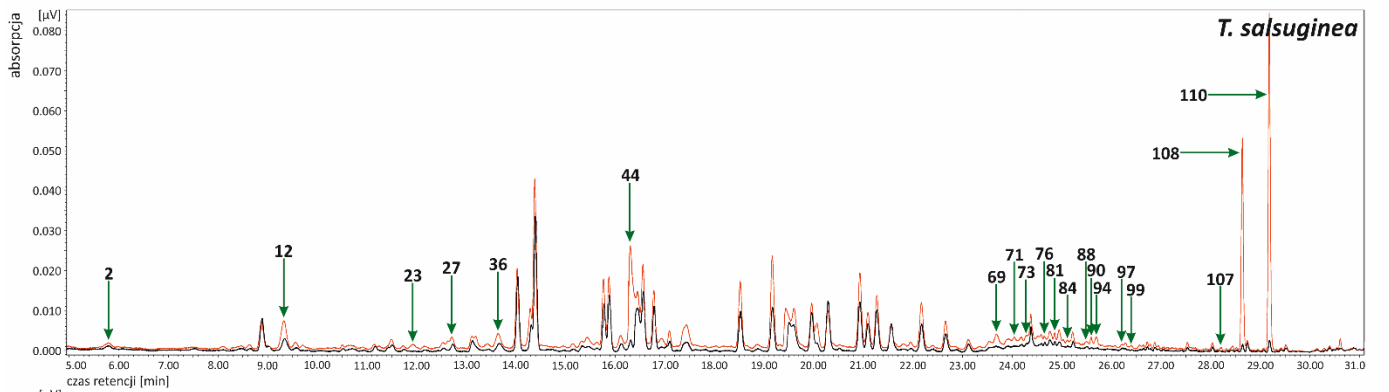
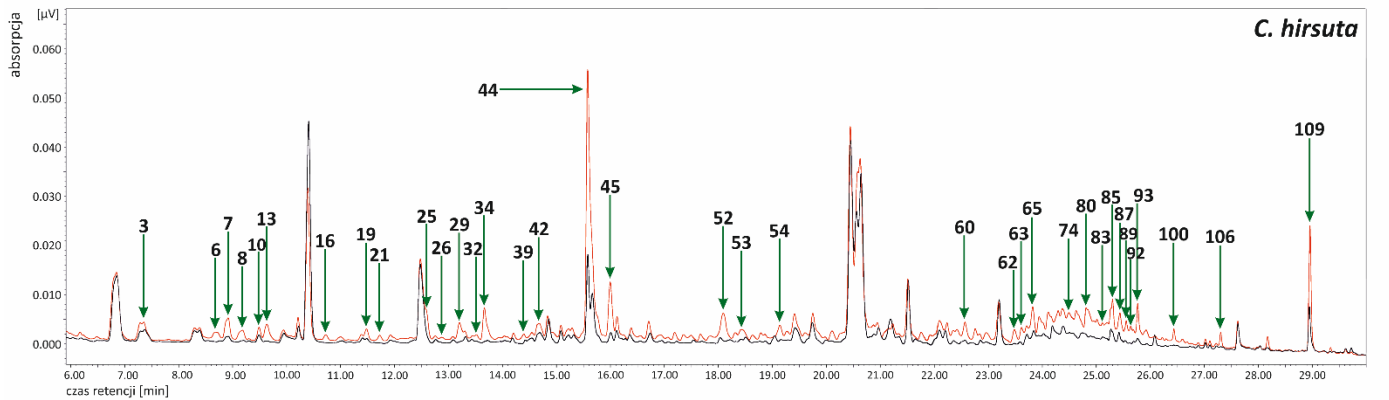
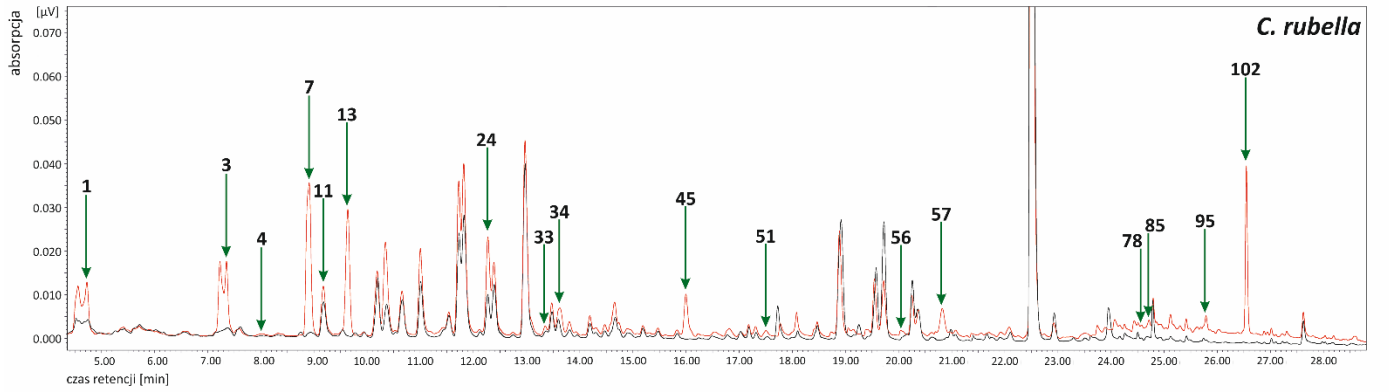
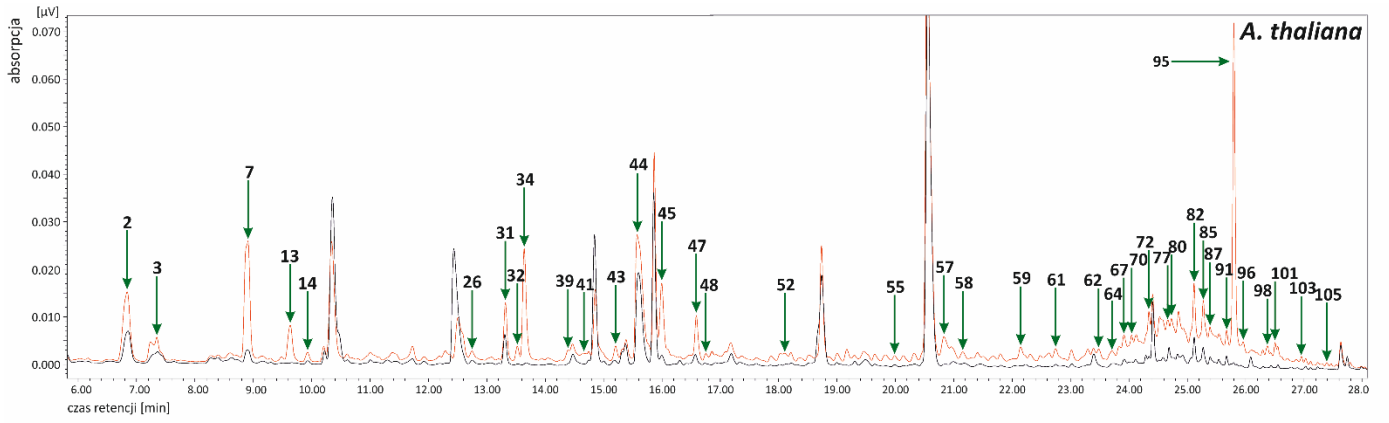
Ryc. 4.2. Względna ilość genu β -tubuliny *P. cucumerina* w stosunku do roślinnego genu aktyny, oznaczona w liściach 5 dni po inokulacji; At- *A. thaliana*, Cr- *C. rubella*, Ch- *C. hirsuta*, Ts- *T. salsuginea*, Aa- *A. alpina*; Wykres przedstawia reprezentatywne wyniki, uzyskane w jednym z dwóch niezależnych doświadczeń; ilość próbek n = 3; ** p < 0,01 (test t-Studenta)

4.2. Identyfikacja metabolitów, których akumulacja była indukowana podczas odpowiedzi immunologicznej badanych gatunków roślin

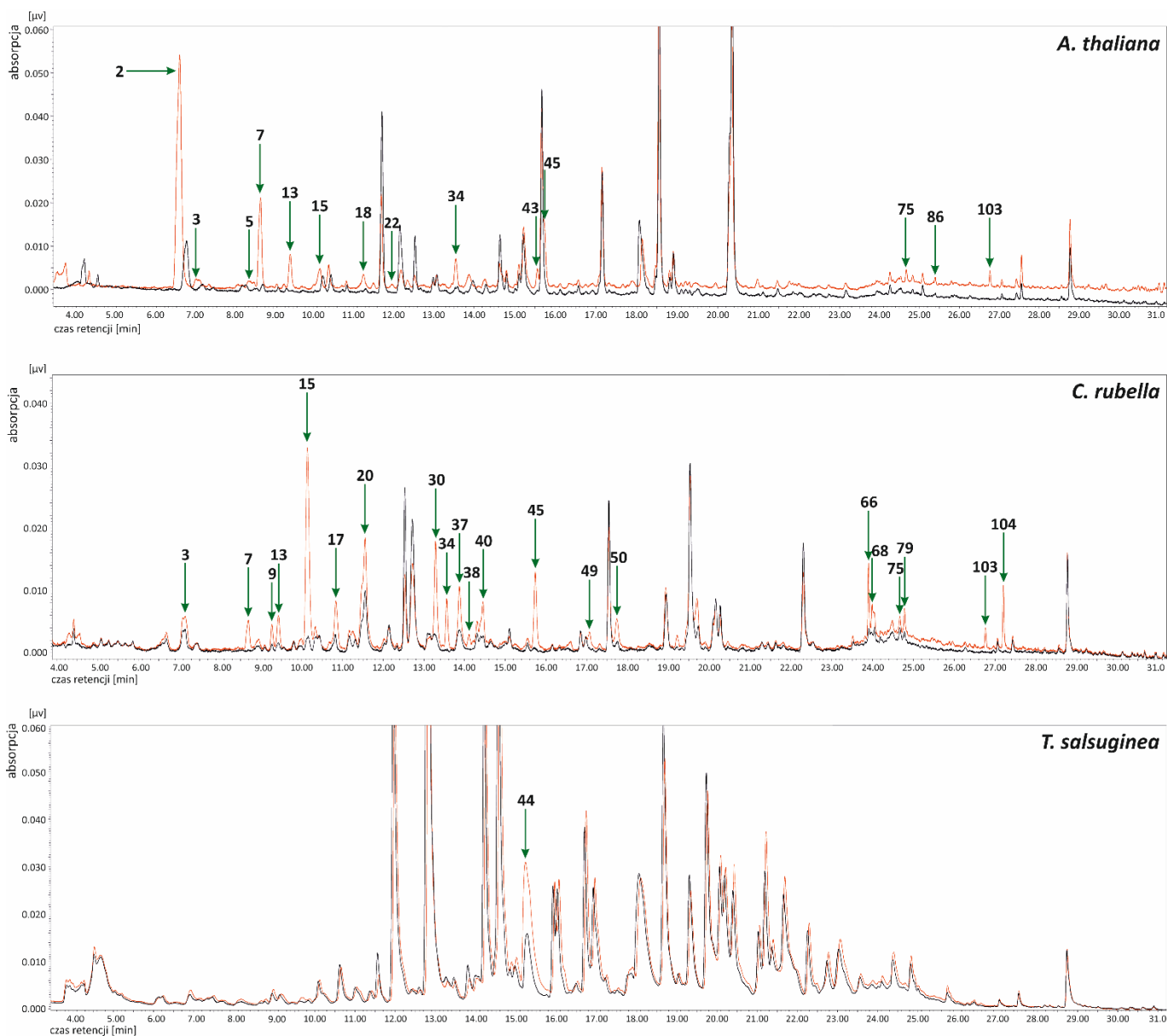
Podczas analiz UPLC-UV próbek ze wszystkich badanych gatunków zaobserwowano łącznie 158 pików, których powierzchnia na chromatogramach uzyskanych dla ekstraktów z liści roślin inokulowanych patogenem lub siewek traktowanych wzorcem molekularnym była istotnie większa w porównaniu do odpowiednich próbek kontrolnych. Na tej podstawie założono, że piki te reprezentują metabolity, których akumulacja była indukowana w odpowiedzi na *P. cucumerina* (122 piki) lub flg22 (36 pików) (Ryc. 4.3 i 4.4). Najwięcej pików reprezentujących metabolity

indukowane po inokulacji patogenem – 39, zaobserwowano w próbkach z *A. thaliana*, kolejno dla *C. hirsuta* takich pików było 36, dla *T. salsuginea* – 20, a dla *C. rubella* – 17 (Ryc.4.3). Gatunkiem, dla którego obserwowano najmniejszą ilość (10) pików reprezentujących metabolity indukowane po inokulacji *P. cucumerina* był *A. alpina* (Ryc. 4.3). Metabolity, których akumulacja wzrastała w odpowiedzi na flg22, obserwowano jedynie dla trzech z badanych gatunków Brassicaceae: *C. rubella* (21 pików), *A. thaliana* (14 pików) i *T. salsuginea* (1 pik) (Ryc. 4.4). Wśród tych gatunków *C. rubella* był jedynym, w którym flg22 wywoływał wzmożoną akumulację większej liczby metabolitów w porównaniu do inokulacji *P. cucumerina*.

Piki reprezentujące metabolity, których stężenia wzrastały w odpowiedzi na zastosowane czynniki biotyczne obserwowane były w całym zakresie chromatogramów. We wszystkich gatunkach po inokulacji patogenem oraz w trzech gatunkach traktowanych flg22 (*A. thaliana*, *C. rubella* i *T. salsuginea*) obserwowano zmiany akumulacji związków względnie bardziej hydrofilowych, które były wymywane z kolumny w początkowym etapie rozdziału z przeważającą zawartością fazy wodnej (Ryc. 4.3, 4.4). W próbkach z trzech gatunków inokulowanych *P. cucumerina* (*A. thaliana*, *C. hirsuta* i *T. salsuginea*) wzrost akumulacji obserwowano również dla kilkunastu metabolitów o bardziej hydrofobowych, obserwowanych w etapie rozdziału z przeważającą zawartością fazy organicznej (Ryc. 4.3). Z kolei rozpoznanie flg22 powodowało zwiększenie akumulacji tego rodzaju metabolitów jedynie w dwóch z badanych gatunków (*A. thaliana* i *C. rubella*) (Ryc. 4.4).



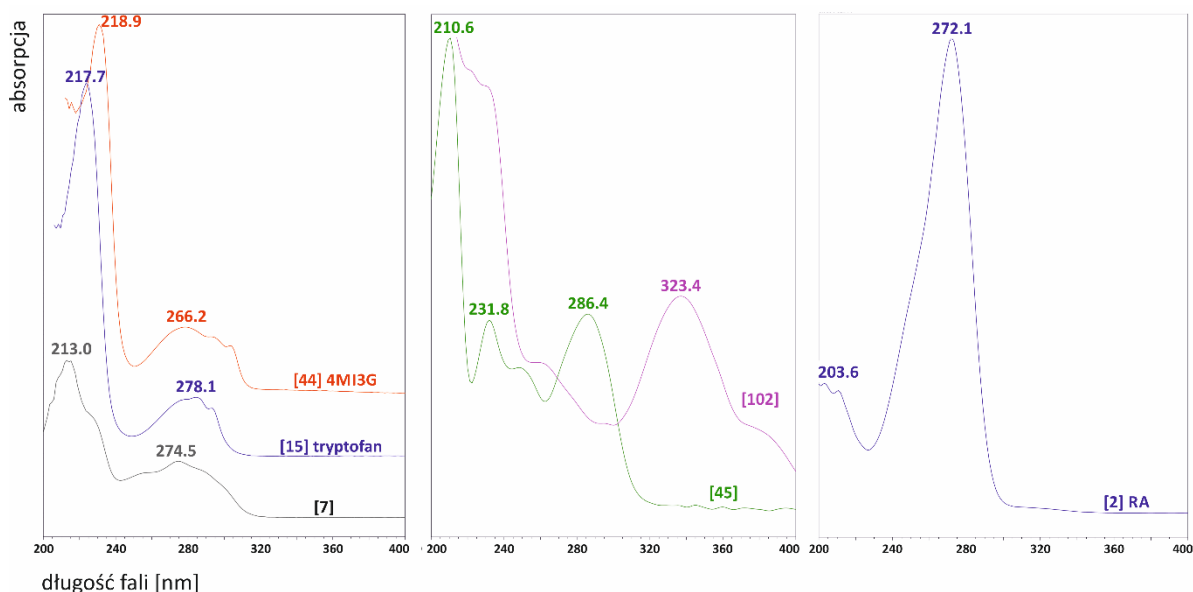
← Ryc. 4.3. Porównanie reprezentatywnych chromatogramów (273 nm) uzyskanych podczas analiz UPLC-UV ekstraktów metabolitów otrzymanych z liści roślin kontrolnych (kolor czarny) i inokulowanych *P. cucumerina*, 72 h po inokulacji (kolor czerwony); zaznaczone zostały piki, których powierzchnia w próbkach inokulowanych była znacząco większa w porównaniu do próbek kontrolnych



Ryc. 4.4. Porównanie reprezentatywnych chromatogramów (273 nm) uzyskanych podczas analiz UPLC-UV ekstraktów metabolitów otrzymanych z siewek roślin kontrolnych (kolor czarny) i traktowanych flg22, 24 h po traktowaniu (kolor czerwony); zaznaczone zostały piki, których powierzchnia w próbkach traktowanych była znacząco większa w porównaniu do próbek kontrolnych

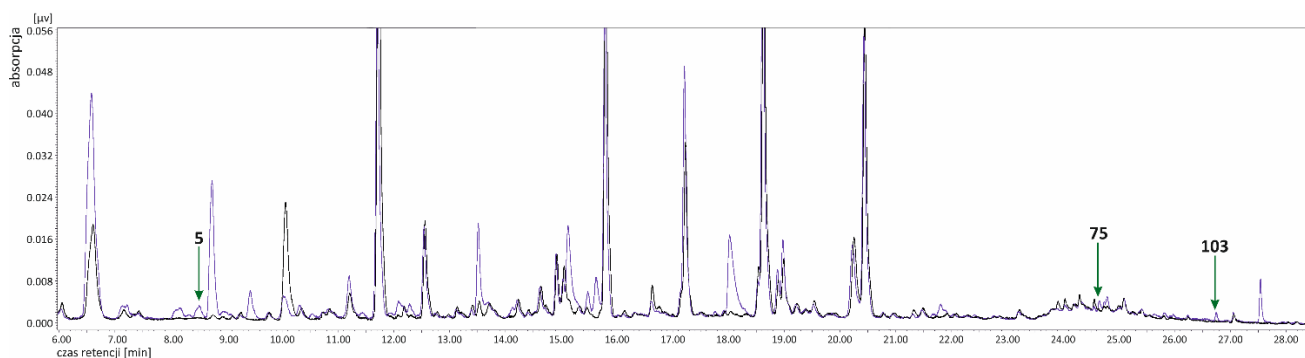
4.2.1. Klasyfikacja metabolitów na podstawie widm absorpcji UV

Wstępna identyfikacja metabolitów, polegająca na przypisaniu ich do odpowiednich klas związków została przeprowadzona na podstawie uzyskanych widm UV, poprzez porównanie ich widmami UV dostępnych standardów lub opublikowanymi w literaturze. Wśród indukowanych metabolitów na tej podstawie sklasyfikowano m.in. szereg związków indolowych, będących produktami metabolizmu tryptofanu (Ryc. 4.5). Na podstawie widma UV oraz czasu retencji zgodnego ze standardem zidentyfikowano wstępnie tryptofan (nr **15**) i 4MI3G (nr **44**). Podobieństwo widm UV metabolitów nr **3**, **5**, **7**, **13**, **41**, **43**, i **75** do powyższych standardów pozwoliło na wstępne ich przypisanie do klasy związków indolowych. Na podstawie widma UV i czasu retencji standardu zidentyfikowano również kamaleksynę (nr **95**), która jest związkiem indolowym, ale posiada charakterystyczne widmo różniące się od typowej pochodnej tryptofanu. Na podstawie podobieństwa do widma kamaleksyny zidentyfikowano wstępnie dwa metabolity (nr **48** i **102**), które mogą być pochodnymi tej fitoaleksyny. Podobieństwo metabolitu nr **45** do standardu kwasu indolilo-3-karboksyłowego wskazuje, że może być on pochodną tego związku. Na podstawie widma UV oraz czasu retencji zgodnego ze standardem zidentyfikowano również związek będący produktem ubocznym metabolizmu glukozyolanów – kwas raphanusamowy (nr **2**).



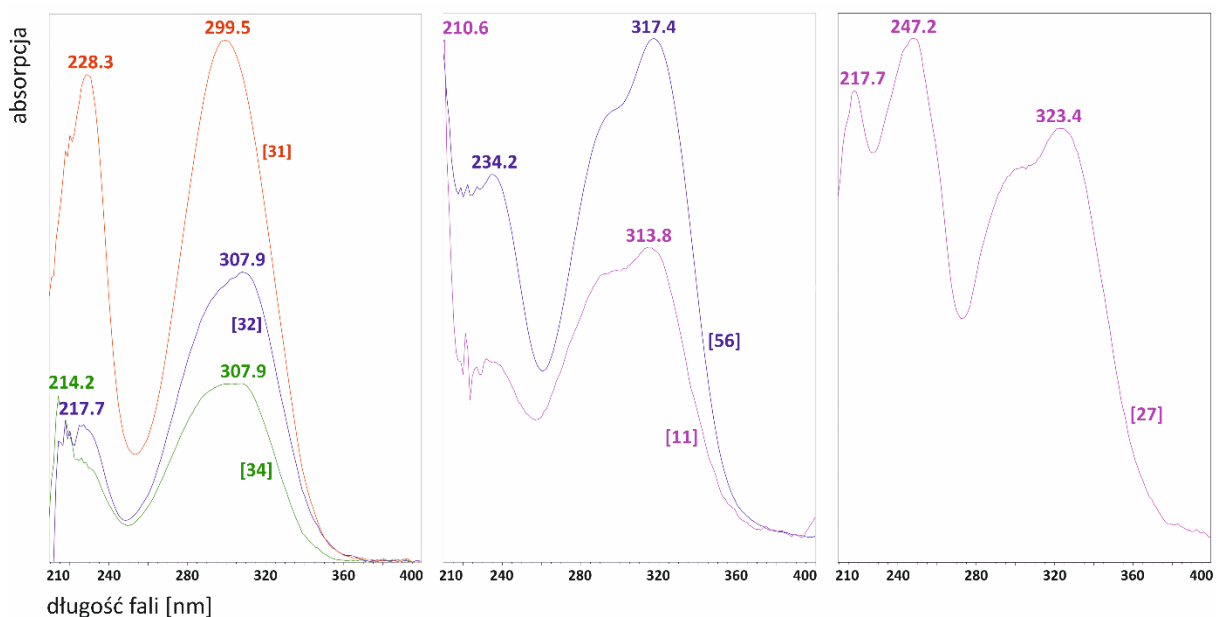
Ryc. 4.5. Przykładowe widma UV metabolitów, których akumulacja wzrastała po inokulacji *P. cucumerina* lub traktowaniu flg22, należących do klasy związków indolowych oraz kwas raphanusamowy; w nawiasach kwadratowych podano numery metabolitów według Ryc. 4.3 i 4.4; widma normalizowane względem osi Y

Wstępna identyfikacja metabolitów indolowych, oprócz obserwacji charakterystycznych widm UV, możliwa była również poprzez analizy UPLC-UV typu dzikiego i podwójnego mutantu *A. thaliana cyp79b2 cyp79b3* z defektem w szlaku biosyntezy pochodnych tryptofanu. Porównanie chromatogramów uzyskanych podczas analiz próbek z siewek typu dzikiego i linii *cyp79b2 cyp79b3* ujawniło wśród niesklasyfikowanych metabolitów trzy związki (nr **5**, **75** i **103**) charakteryzujące się zwiększoną akumulacją w odpowiedzi na flg22 w roślinach typu dzikiego, ale nieobecne w próbkach z mutantu (Ryc. 4.6). Brak tych metabolitów w ekstrakcie z liści *cyp79b2 cyp79b3* sugeruje, że są one pochodnymi tryptofanu.



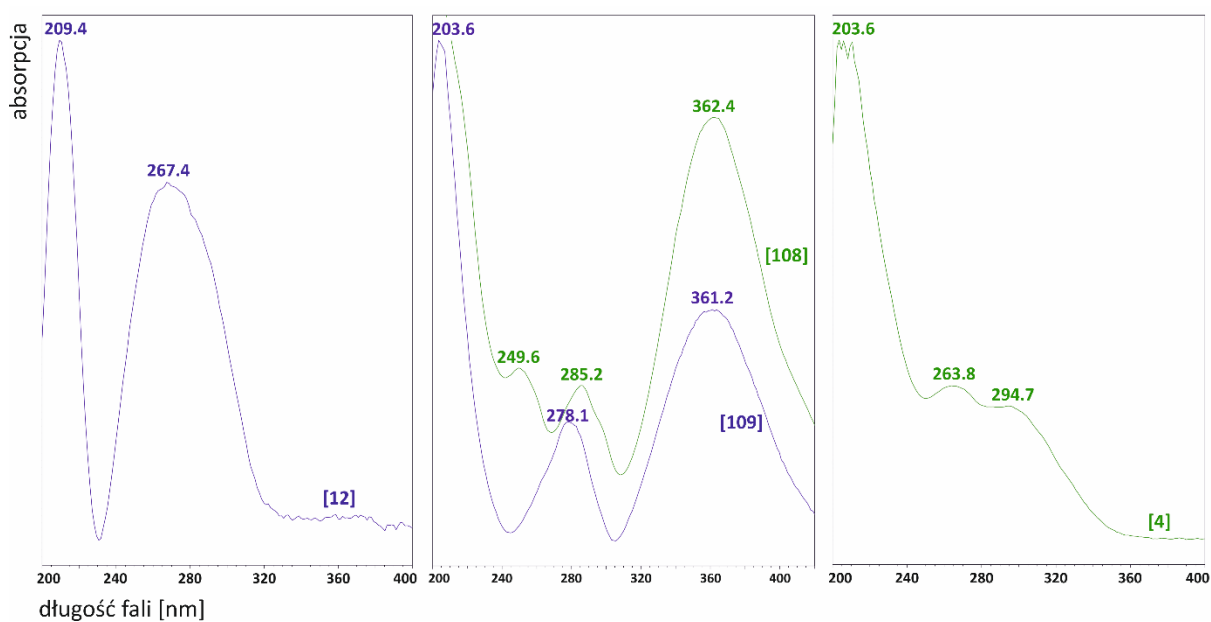
Ryc. 4.6. Porównanie reprezentatywnych chromatogramów (273 nm) uzyskanych podczas analiz UPLC-UV ekstraktów metabolitów otrzymanych z siewek *A. thaliana* traktowanych flg22 (kolor fioletowy – typ dziki, czarny – podwójny mutant *cyp79b2 cyp79b3*), 24 h po traktowaniu; zaznaczono piki reprezentujące niezidentyfikowane metabolity należące do grupy pochodnych tryptofanu

Na podstawie widm UV dostępnych w literaturze, wśród metabolitów indukowanych zidentyfikowano wstępnie również związki należące do grupy fenylopropanoidów (Ryc. 4.7). Metabolity będące pochodnymi kwasów hydroksycynamonowych posiadają charakterystyczne widma UV z maksimum absorpcji przy długości fali około 300/307/315/320 nm. Ze względu na podobieństwo do widm kwasów hydroksycynamonowych [236, 237], metabolity nr **11**, **16**, **17**, **20**, **24**, **27**, **30**, **31**, **32**, **34**, **37**, **42**, **56** i **70** zostały wstępnie zaklasyfikowane do grupy pochodnych tych związków (Ryc. 4.7).



Ryc. 4.7. Przykładowe widma UV metabolitów, których akumulacja zwiększała się po inokulacji *P. cucumerina* lub traktowaniu flg22, należących do grupy fenylopropanoidów; w nawiasach kwadratowych podano numery metabolitów według Ryc. 4.3 i 4.4; widma normalizowane względem osi Y

Duża część metabolitów indukowanych po inokulacji *P. cucumerina* lub traktowaniu flg22 posiadała widma UV, które różniły się od tych charakterystycznych dla pochodnych indolowych, czy fenylopropanoidów (Ryc. 4.8). Dodatkowo, dla wielu metabolitów ze względu na ich niskie stężenie w badanych próbkach nie uzyskano dobrej jakości widm UV, dlatego też ich klasyfikacja do odpowiedniej grupy związków na tej podstawie była niemożliwa.



Ryc. 4.8. Przykładowe widma UV metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją po inokulacji *P. cucumerina* lub traktowaniu flg22, których nie sklasyfikowano na podstawie widma UV; w nawiasach podano numery metabolitów według Ryc. 4.3 i 4.4; widma normalizowane względem osi Y

4.2.2. Identyfikacja metabolitów metodami spektrometrii mas

Identyfikacja części metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją po inokulacji *P. cucumerina* lub w odpowiedzi na flg22 była przeprowadzona poprzez sprzężenie UPLC z detektorem masowym. Zastosowanie wysokorozdzielczego spektrometru mas, w którym rejestrowane były widma masowe zarówno w trybie jonów dodatnich, jak i ujemnych (odpowiednio protonowanych $[M+H]^+$, sodowanych $[M+Na]^+$ i deprotonowanych $[M-H]^-$), a dokładność rejestrowanych jonów wynosiła poniżej 5 ppm, dało możliwość precyzyjnego określenia składów elementarnych poszczególnych metabolitów. Informacji o strukturze dostarczyły również analizy widm fragmentacyjnych MS². Identyfikacja metabolitów oprócz analizy widm fragmentacyjnych oparta była na informacjach dostępnych w bazach danych.

Spośród wszystkich metabolitów, których akumulacja była zwiększona na skutek inokulacji patogenem lub traktowania wzorcem molekularnym, zidentyfikowano 41 związków (Tab. 4.1). Najwięcej wśród zidentyfikowanych metabolitów było pochodnych szlaku metabolizmu tryptofanu (19 związków) oraz pochodnych szlaku fenylopropanoidowego (15 związków). Oprócz tryptofanu (nr 15), wśród zidentyfikowanych produktów metabolizmu tego aminokwasu występował 4MI3G należący do grupy glukozynolanów indolowych (nr 44), a także produkty metabolizmu tych glukozynolanów (nr 2, 41, 43), pochodne kwasu indolilo-3-karboksylowego (nr 3, 7, 13, 45), metabolity należące do grupy fitoaleksyn indolowych i ich pochodne (nr 48, 57, 67, 95, 102, 108, 109) oraz inne pochodne indolowe (nr 6, 8, 54) (Tab. 4.1). Wśród metabolitów szlaku fenylopropanoidowego zidentyfikowane zostały pochodne kwasu *p*-kumarowego (nr 17, 20, 24, 30, 34, 37), kwasu ferulowego i hydroksyferulowego (nr 11, 16, 42, 52, 56), synapinowego (nr 32, 70), kwasu kawowego (nr 27) oraz związek należący do grupy lignanów (nr 31) (Tab. 4.1).

Poza pochodnymi szlaku metabolizmu tryptofanu i szlaku fenylopropanoidowego, wśród metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją w odpowiedzi na inokulację *P. cucumerina* lub wykrycie flg22, zidentyfikowano również należącą do aminokwasów tyrozynę (nr 1) i ester glukozowy kwasu syringowego (nr 12), będący pochodną kwasu benzoowego oraz megastigmatrienon (nr 93), należący do terpenoidów (Tab. 4.1). Na podstawie widm fragmentacyjnych związki nr 4 i 58 sklasyfikowano odpowiednio, jako pochodną glukozydu kwasu pantotenowego i pochodną *N*-acetylo-feniloalaniny (Tab. 4.1). W czasie retencji odpowiadającym pikowi nr 85 i nr 9 zidentyfikowano jony charakterystyczne dla pochodnej kwasu tłuszczowego – malonylowanego estru glukozowego kwasu 9,10-dihydrojasmonowego oraz pochodnej glukozowej kwasu salicylowego (Tab. 4.1). Jednak widma UV metabolitów reprezentowanych przez te piki na chromatogramie uzyskanym w detektorze PDA różnią się od widm typowych dla kwasu jasmonowego i salicylowego, co wskazuje, że w czasach retencji odpowiadającym pikom 85 i 9 występują inne metabolity, dla których nie wyznaczono jonów molekularnych.

Tabela 4.1. Zidentyfikowane metabolity, których akumulacja była indukowana w badanych gatunkach Brassicaceae po inokulacji *P. cucumerina* lub traktowaniu flg22

Nr	Czas retencji [min]	Nazwa związku	Masa cząst.	Skład elementarny	Dokładna masa jonów				Błąd [ppm]	Wzór fragmentacji MS/MS	
					[M+H] ⁺		[M-H] ⁻			Jony dodatnie [M+H] ⁺	Jony ujemne [M-H] ⁻
					Obliczona	Obserwowana	Obliczona	Obserwowana			
1	4,70	tyrozyna	181	C ₉ H ₁₁ NO ₃			180,0672	180,0660	-3,4		180, 166
2	6,90	kwasy raphanusamowy (RA)	163	C ₄ H ₅ NO ₂ S ₂			161,9689	161,9692	-2,2		
3	7,20	glukozyd glukozo-6-hydroksy-indolilo-3-karboksylanu (6-GlcO-ICOOGlc)	501	C ₂₁ H ₂₇ NO ₁₃			500,1410	500,1417	-1,5		500, 440, 380, 278, 218, 176
4	7,55	pochodna glukozydu kwasu pantotenowego	676	C ₃₆ H ₄₁ N ₂ O ₁₁	677,2705	677,2712			-1,0	677, 526, 338, 176	
6	8,70	nitrofenilo-3H-indolilo-3-on	252	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₃	253,0608	253,0616			-3,3		
7	8,90	glukozyd kwasu 6-hydroksyindolilo-3-karboksylowego (6-GlcO-ICOOH)	339	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈			338,0881	338,0872	2,7		338, 203, 175, 132
8	9,15	indolilo-3-karboksyaldehid	147	C ₉ H ₇ NO			146,0600	146,0607	-4,2		146, 91, 85
9	9,30	glukozyd/ ester glukozy kwasu salicylowego	300	C ₁₃ H ₁₆ O ₈			299,0772	299,0779	-2,1		
11	9,55	N-feruloilospermidyna	321	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₃	322,2124	322,2125			0,3	322, 305, 177	
12	9,60	ester glukozy kwasu syryngowego	360	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀			359,0984	359,0984	-0,1		359, 197, 182, 138
13	9,60	ester glukozy kwasu 6-hydroksyindolilo-3-karboksylowego (6-HO-ICOOGlc)	339	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈			338,0881	338,0867	4,2		338, 278, 248, 176, 161, 158, 132
15	10,50	tryptofan	204	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂			203,0826	203,0827	-0,3		203, 202, 185, 142, 130, 116

16	10,75	di- <i>O</i> -glukozyd kwasu 5-hydroksyferulowego	534	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₅			533,1512	533,1507	1		533, 371, 191, 107
17	10,85	kwas <i>p</i> -kumaroilo-galaktarowy (izomer I)	356	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀			355,0671	355,0661	2,7		355, 209, 191, 163, 133
20	11,55	kwas <i>p</i> -kumaroilo-galaktarowy (izomer II)	356	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀			355,0671	355,0670	0,3		355, 209, 191, 163, 119, 85
24	12,35	kwas <i>p</i> -kumaroilo-glukuronowy	356	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀			355,0671	355,0667	1,1		355, 209, 191
27	12,75	kwas neochlorogenowy	354	C ₁₆ H ₁₈ O ₉			353,0878	353,0868	3		353, 191, 127, 65
30	13,25	ester glukozy kwasu <i>p</i> -kumarowego	326	C ₁₅ H ₁₈ O ₈			325,0929	325,0928	0,2		325, 186, 177, 163, 161, 158, 145, 117, 101
31	13,30	glukozyd 7-hydroksylaryciresinolu	536	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₂			537,1978	537,1988	-1,9		537, 375, 327
32	13,50	ester glukozy kwasu synapinowego	386	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀			385,1140	385,1135	1,2		385, 223
34	13,60	<i>p</i> -kumaroiloagmatyna	276	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	277,1659	277,1664			-1,6	277, 147, 119, 91	
37	13,85	glukozyd/ ester glukozy kwasu <i>p</i> -kumarowego	326	C ₁₅ H ₁₈ O ₈			325,0929	325,0915	4,2		325, 163, 145, 117, 89
41	14,65	glukozyd dihydroaskorbigenu	469	C ₂₁ H ₂₇ NO ₁₁			468,1511	468,1502	1,9		468, 348, 306, 247, 205, 116
42	14,68	feruloilocholina	280	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄	281,1627	281,1624			1,2		281, 119
43	15,40	glukozyd dihydroneoskorbigenu	499	C ₂₂ H ₂₉ NO ₁₂			498,1617	498,1605	2,3		498, 453, 440, 391, 385, 210, 179, 164, 155, 119, 116, 101
44	15,60	4-metoksy-indolilo-3-metylo glukozyolan (4MI3G)	478	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂			477,0643	477,0633	2		477, 316, 283, 259, 235, 97
45	15,90	ester glukozy kwasu indolilo-3-karboksylowego (ICOOGlc)	323	C ₁₅ H ₁₇ NO ₇			322,0932	322,0936	-1,2		322, 202, 160, 116
48	16,80	<i>O</i> -glukozyd hydroksykamaleksyny I	378	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆ S	379,0958	379,0969			-2,9	379, 217	

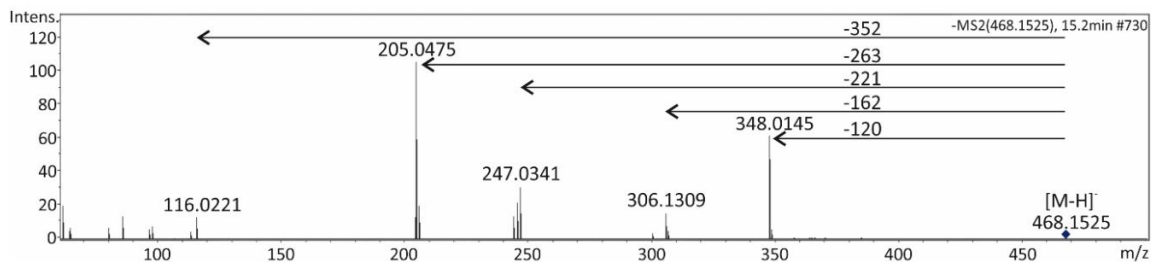
52	18,10	<i>O</i> -malonylowany kwas hydroksyferulowy	326	C ₁₄ H ₁₄ O ₉			325,0565	325,0559	1,7		
54	19,15	indolilo-3-acetaldehyd	159	C ₁₀ H ₉ NO	160,0757	160,0757			-0,3	160, 130, 90	
56	20,20	<i>N,N'</i> -diferuloilospermidyna	497	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₆	498,2599	498,2613			-2,8	322, 234, 177	
57	20,80	<i>O</i> -glukozyd hydroksykamaleksyny II	378	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆ S	379,0958	379,0964			-1,5	379, 217, 131	
58	21,15	pochodna <i>N</i> -acetylo-feniloalaniny	483	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₇	484,2078	484,2087			-1,8	484, 467, 448, 420, 277	
67	23,88	malonylowany <i>O</i> -glukozyd hydroksykamaleksyny	464	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₉ S	465,0962	465,0952			2,5	465, 379, 217	
70	24,00	pochodna glukozydu kwasu synapinowego	588	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₁			587,2498	587,2489	-2,5		587, 515, 385, 367, 301
85	25,20	malonylowany ester glukozy kwasu 9,10-dihydrojasmonowego	460	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₁	461,2017	461,2017			0,1	461, 417, 375, 357, 213	
93	25,75	megastigmatrienon	190	C ₁₃ H ₁₈ O	191,1430	191,1439			4,7	191, 144, 133, 105	
95	25,85	kamaleksyna	200	C ₁₁ H ₈ N ₂ S	201,0481	201,0480			0,6		
102	26,50	6-metoksykamaleksyna	230	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ OS	231,0587	231,0592			-2,4		
108	28,60	wazaleksyna B	294	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂	295,0569	295,0560			3	295, 249, 233, 217, 202, 162, 143, 115, 91	
109	29,30	wazaleksyna A	294	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂	295,0569	295,0573			-1,2	295, 249, 233, 217, 202, 192, 171, 162, 143, 130, 115, 91	

Numery związków odpowiadają numerom na Ryc. 4.3. i 4.4; masę cząsteczkową podano dla uproszczenia w zaokrągleniu do jednośc, a podany skład elementarny dotyczy cząsteczek poszczególnych metabolitów; błąd [ppm] pomiędzy masą obliczoną a obserwowaną został obliczony automatycznie w programie Data Analysis (Bruker, Niemcy);

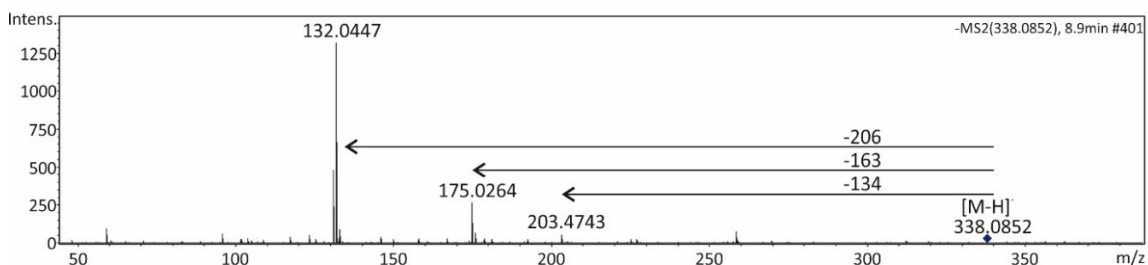
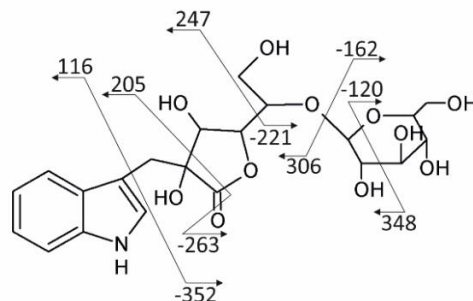
Identyfikacja metabolitów należących do klasy związków indolowych oparta była częściowo na danych literaturowych oraz dostępnych standardach glukozynolanów indolowych, kamaleksyny i jej pochodnych [200] oraz pochodnych kwasu indolilo-3-karboksylowego [201]. Uzyskane widma fragmentacyjne pozwoliły na potwierdzenie struktur takich związków, jak przykładowo 4MI3G (nr **44**). Wśród zidentyfikowanych metabolitów indolowych były również wazaleksyny A i B (nr **108, 109**), zidentyfikowane wcześniej w dwóch ekotypach *T. salsuginea* (wcześniej *T. halophila*) traktowanych CuCl_2 [203]. Na Ryc. 4.9 przedstawiono przykładowe schematy fragmentacji metabolitów indolowych, uzyskanych w jonizacji ujemnej (glukozyd dihydroaskorbigeny i 6-GlcO-ICOOH) lub dodatniej (*O*-glukozyd hydroksykamaleksyny II). Jon $[\text{M-H}]^-$ deprotonowanego glukozydu dihydroaskorbigeny posiada stosunek masy do ładunku m/z równy 468,1502 amu (ang. *atomic mass unit*) (Ryc. 4.9). We wzorze fragmentacji tego związku obserwowano jon $m/z = 306$, powstały w wyniku oderwania fragmentu o masie 162, odpowiadającemu cząsteczce dehydratowanej glukozy ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$). Obserwowano również jon $m/z = 116$, charakterystyczny dla deprotonowanego jonu indolu ($\text{C}_8\text{H}_6\text{N}$) (Ryc. 4.9). Powyższe dane oraz wygenerowany wzór sumaryczny dla danej masy ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$) z błędem 1,9 ppm, pozwala przypisać jon $m/z = 468$ właśnie do struktury glukozydu dihydroaskorbigeny (nr **41**).

Jon $[\text{M+H}]^+$ protonowanego *O*-glukozydu hydroksykamaleksyny II (nr **57**) posiada stosunek masy do ładunku $m/z = 379,0964$ amu. W widmie fragmentacyjnym tego związku obserwowano jon $m/z = 217$ amu, który powstał na skutek oderwania dehydratowanej cząsteczki glukozy i odpowiadał protonowanej cząsteczce hydroksykamaleksyny ($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{OS}$). Jon $m/z = 217$ amu charakteryzował się największą intensywnością, co wskazuje, że podczas fragmentacji tego związku wiązanie glikozydowe było rozrywane z wyraźnie największą częstotliwością (Ryc. 4.9).

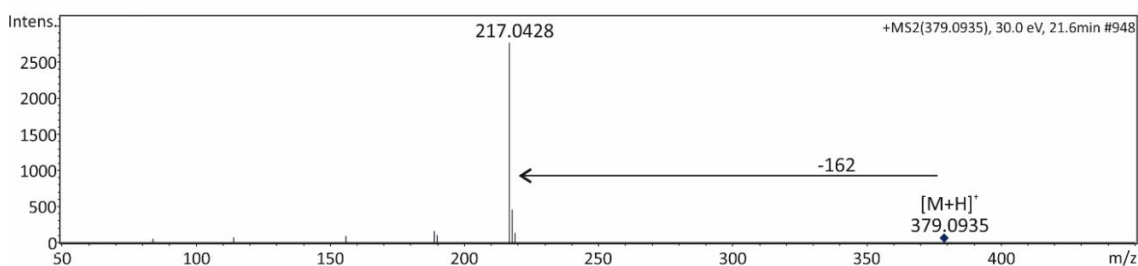
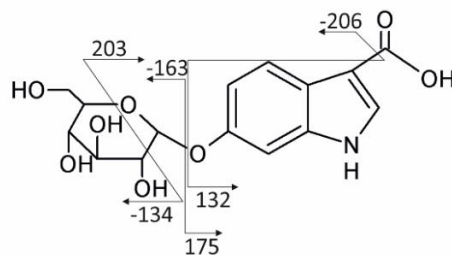
Dzięki otrzymanym widmom fragmentacyjnym możliwe było rozróżnienie estru glukozowego i glukozydu kwasu 6-hydroksy-indolilo-3-karboksylowego, posiadających tę samą masę cząsteczkową równą 339 amu (nr **7** i **13**). Na Ryc. 4.9 przedstawiono widmo fragmentacyjne glukozydu kwasu 6-hydroksy-indolilo-3-karboksylowego z charakterystycznymi jonami $m/z = 203$ amu i $m/z = 175$ amu, powstałymi po odłączeniu całej lub części dehydratowanej cząsteczki glukozy oraz jon o największej intensywności – $m/z = 132$ amu, reprezentujący deprotonowaną cząsteczkę hydroksyindolu ($\text{C}_8\text{H}_6\text{NO}$) (Ryc. 4.9).



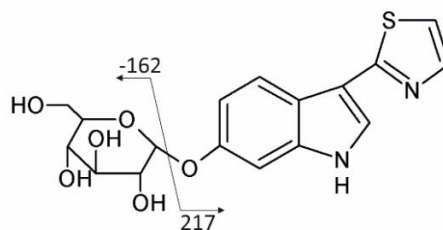
glukozyd dihydroaskorbigenu



6-GlcO-ICOOH



O-glukozyd hydroksykamaleksyny II

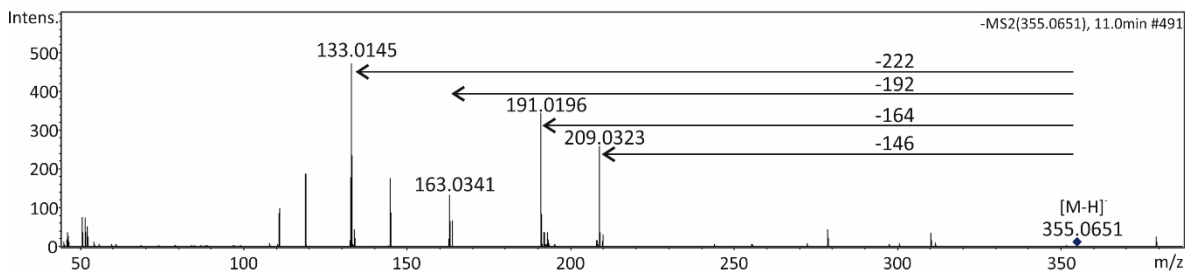


Ryc. 4.9. Schematy fragmentacji wybranych metabolitów indolowych, których akumulacja była indukowana w badanych gatunkach Brassicaceae w odpowiedzi na *P. cucumerina* lub flg22; masy cząsteczek obojętnych powstałych w wyniku fragmentacji jonów podano dla uproszczenia w zaokrągleniu do jedności

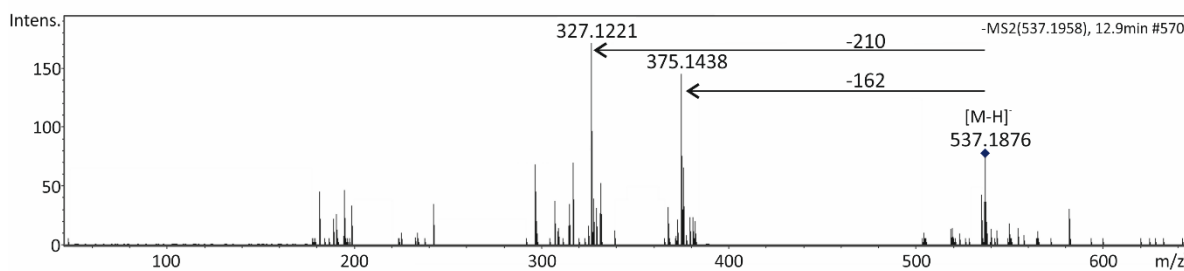
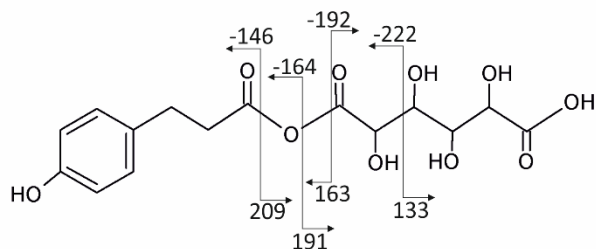
Identyfikacja metabolitów należących do szlaku fenylopropanoidowego opierała się głównie na danych literaturowych [238, 239] oraz dostępnych bazach danych. Większość zidentyfikowanych związków należących do klasy fenylopropanoidów była pochodnymi kwasów hydroksycynamonowych, które posiadają charakterystyczne schematy fragmentacji, w różnych połączeniach z glukozą, innymi kwasami, czy poliaminami. Dzięki otrzymanym widmom fragmentacyjnym w większości przypadków możliwe było określenie, czy metabolity, których częścią jest cząsteczka glukozy mają strukturę estru, czy glikozydu. Na Ryc. 4.10 przedstawiono przykładowe wzory fragmentacji zidentyfikowanych związków należących do szlaku fenylopropanoidowego. Pierwszy z przedstawionych metabolitów – kwas *p*-kumaroilo-galaktarowy I (jon deprotonowany o stosunku masy do ładunku $m/z = 355,0661$ amu) jest pochodną kwasu kumarowego i kwasu galaktarowego, dla których występują charakterystyczne jony fragmentacyjne odpowiednio $m/z = 163$ amu i $m/z = 209$ amu (Ryc. 4.10).

Jednym ze zidentyfikowanych metabolitów szlaku fenylopropanoidowego był należący do grupy lignanów – glikozyd 7-hydroksylaryciresinolu. Widmo masowe dla tego związku zarejestrowano w trybie jonów ujemnych, a w widmie fragmentacyjnym jednym z najbardziej intensywnych jonów był jon $m/z = 375$ amu, powstały na skutek oderwania obojętnej cząsteczki dehydratowanej glukozy o masie 162 amu, odpowiadający widmu masowemu hydroksylaryciresinolu [240] (Ryc. 4.10).

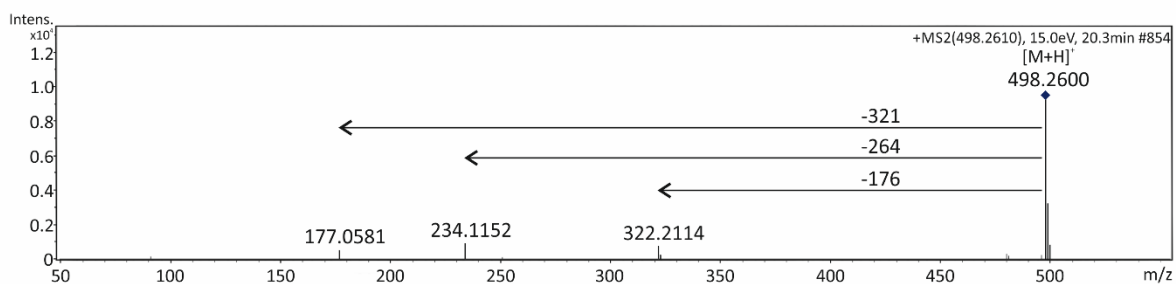
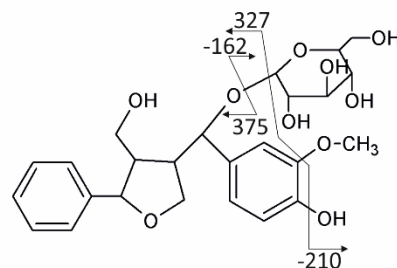
Wśród zidentyfikowanych metabolitów fenylopropanoidowych były również pochodne aminowe kwasu ferulowego. Jedną z nich była *N,N'*-diferuloilospermidyna, której widmo masowe zarejestrowano w trybie jonów dodatnich ($[M+H]^+ = 498,2613$ amu). W widmie fragmentacyjnym tego związku obserwowano jon protonowany $m/z = 177$ amu, charakterystyczny dla kwasu ferulowego, jon $m/z = 234$ amu, reprezentujący połączenie jednej cząsteczki kwasu ferulowego z cząsteczką spermidyny oraz jon $m/z = 322$ amu, który powstał poprzez oderwanie fragmentu o masie 176 amu, charakterystycznego dla kwasu ferulowego [241] (Ryc. 4.10).



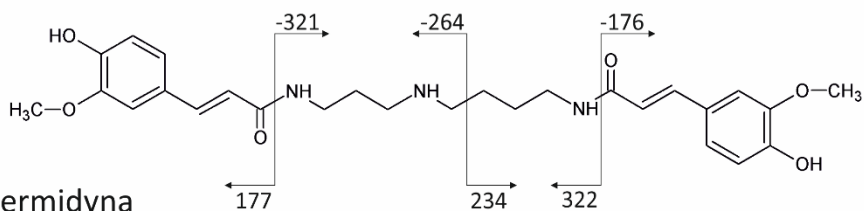
kwask *p*-kumaroilo-galaktarowy I



glukozyd 7-hidroksylaryciresinolu



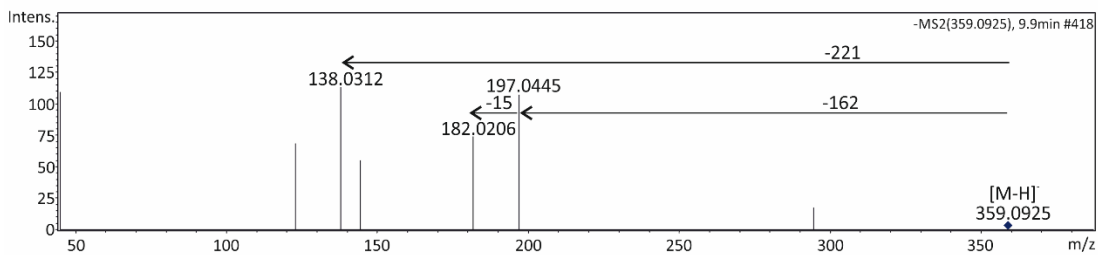
N,N'-diferuloilospemidyna



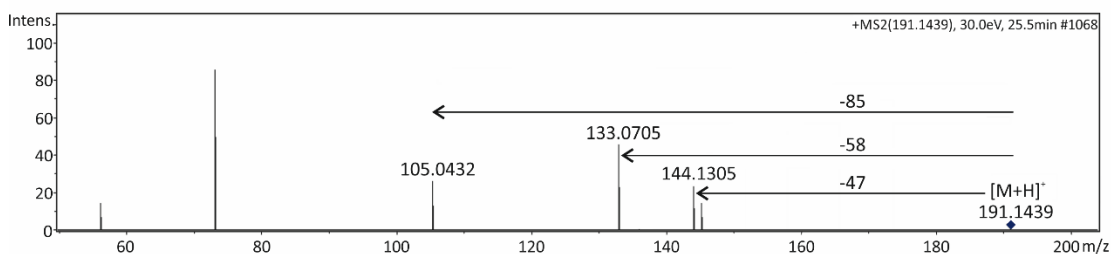
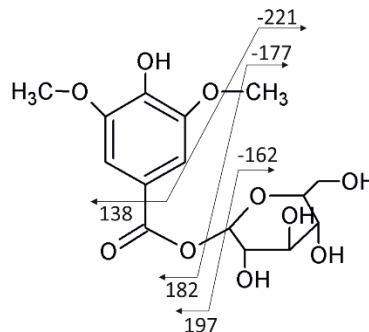
Ryc. 4.10. Schematy fragmentacji wybranych metabolitów szlaku fenylopropanoidowego, których akumulacja była indukowana w badanych gatunkach Brassicaceae w odpowiedzi na *P. cucumerina* lub flg22

Indukowane metabolity, należące do innych klas związków chemicznych, niż pochodne indolowe lub fenylopropanoidowe stanowiły najmniejszą grupę wśród wszystkich zidentyfikowanych metabolitów. Jednym z tych związków był ester glukozowy kwasu syringowego (Ryc. 4.11), reprezentowany przez jon deprotonowany $[M-H]^- = 359,0984$ amu. W widmie fragmentacyjnym tego związku obserwowano charakterystyczny dla deprotonowanego kwasu syringowego jon $m/z = 197$ amu ($C_9H_9O_5$), powstały w wyniku oderwania obojętnego fragmentu o masie 162 (dehydratowana glukoza) (Ryc. 4.11).

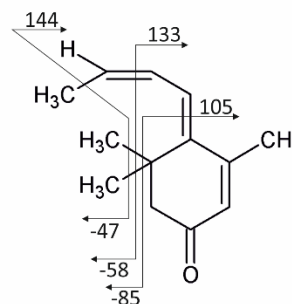
Jednym ze zidentyfikowanych metabolitów był również megastigmatrienon, należący do terpenoidów. Widmo masowe tego związku zarejestrowano w trybie jonów dodatnich i obserwowano jon protonowany $[M+H]^+ = 191,1439$ amu (Ryc. 4.10). W widmie fragmentacyjnym obserwowano jony $m/z = 144$ amu, $m/z = 133$ amu i $m/z = 105$ amu, które powstały poprzez oderwanie fragmentów łańcucha bocznego i grup CH_3 przyłączonych do pierścienia aromatycznego (Ryc. 4.11).



ester glukozowy kwasu syringowego



megastigmatrienon



Ryc. 4.11. Schematy fragmentacji wybranych metabolitów, zidentyfikowanych jako związki inne niż pochodne indolowe i fenylopropanoidy, których akumulacja była indukowana w badanych gatunkach Brassicaceae w odpowiedzi na *P. cucumerina* lub flg22

Widma masowe uzyskano również dla 55 z 71 pozostałych badanych metabolitów (Tab. 4.2). Mimo, że dla 15 z tych związków otrzymano również widma fragmentacyjne (Tab. 4.2), nie było to wystarczające do identyfikacji ich struktur. Przy użyciu oprogramowania Data Analysis, dla większości metabolitów, które były reprezentowane przez jony protonowane lub deprotonowane o stosunkowo niskich stosunkach masy do ładunku ($m/z < 500$), wyznaczono jedynie możliwe składy elementarne (Tab. 4.2).

Tabela 4.2. Zestawienie danych otrzymanych w analizach UPLC-UV i UPLC-MS, dotyczących metabolitów indukowanych, których struktury nie zostały zidentyfikowane

Nr związku	Czas retencji [min]	Masa jonu [M+H] ⁺	Masa jonu [M-H] ⁻	Widmo fragmentacyjne	Możliwy skład elementarny
5	8,50	550,1255			
10	9,45		484,1421		C ₂₈ H ₂₃ NO ₇
14	9,90	197,0973			C ₁₄ H ₁₂ O
18	11,20		583,2602 615,2122		
19	11,45	394,1365			
21	11,75	brak	brak		
22	11,95		327,1119		C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₄ C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₂
23	12,00		319,0911 625,1020	625, 447, 368, 243, 191, 97	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₆
25	12,55	448,1929		448, 332, 213	
26	12,75	474,1476 607,2762			
28	12,95		367,1129	367, 209, 191, 176, 161, 150, 119	
29	13,20	391,1916			C ₁₈ H ₃₀ O ₉
33	13,55	brak	brak		
35	13,65		367,1119		C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₈ C ₁₁ H ₂₀ N ₄ O ₁₀
36	13,65	brak	brak		
38	14,10	brak	brak		
39	14,15	440,2103		440, 337, 201	C ₁₈ H ₃₃ NO ₁₁ C ₂₆ H ₂₅ N ₅ O ₂
40	14,40	308,0906 478,1384 492,1205			
46	16,00	brak	brak		
47	16,50		513,2063	513, 448, 333, 307, 199, 128	
49	17,00		442,1166		
50	17,70	brak	brak		
51	17,70	brak	brak		
53	18,45	410,2164			C ₂₂ H ₂₇ N ₅ O ₃ C ₂₁ H ₃₁ NO ₇
55	20,15		393,1091		C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₆ C ₂₂ H ₁₄ N ₆ O ₂
59	22,20		223,0707		C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄

60	22,60		221,0689		$C_8H_{14}O_7$
61	22,75		431,1929		$C_{22}H_{24}N_8O_2$ $C_{21}H_{28}N_4O_6$ $C_{20}H_{32}O_{10}$
62	23,45	brak	brak		
63	23,65	191,1455		191, 150, 116, 89	$C_{13}H_{18}O$
64	23,70		819,3074		
65	23,80	brak	brak		
66	23,88	brak	brak		
68	23,90		319,0919 540,1673	540, 493, 473, 450, 420, 311, 200, 166	
69	23,98		805,3258		
70	24,02		587,2489		
71	24,05	377,0899			$C_{18}H_{16}O_9$
72	24,30	589,2668			
73	24,35	554,1364		554, 377, 290, 235, 145, 99	
74	24,50	385,1384			$C_{20}H_{20}N_2O_6$ $C_{21}H_{16}N_6O_2$ $C_{15}H_{20}N_4O_8$
75	24,65		162,0238 365,0807		$C_{19}H_{14}N_2O_6$
76	24,65	585,2678		585, 567, 543, 507, 494, 432, 420, 378, 299	
77	24,70	302,1067			$C_{10}H_{15}N_5O_6$
78	24,70	brak	brak		
79	24,75		249,0542 521,0557		
80	24,80		645,2517		
81	24,85		805,3266	805, 773, 682, 651, 599, 554, 459, 367, 277, 221	
82	25,10	563,3072			
83	25,10	461,1976			$C_{28}H_{28}O_6$
84	25,15		789,2973	789, 745, 459, 210, 135	
86	25,40		620,0988		
87	25,40	brak	brak		
88	25,45	561,1183		561, 412, 330, 299	
89	25,55	403,1488			$C_{20}H_{22}N_2O_7$
90	25,60	467,0752			$C_{18}H_{20}O_{13}$ $C_{16}H_{22}N_2O_{10}S_2$
91	25,65	603,2784	601,264	603, 555, 478, 450, 432, 388, 285	
92	25,65	191,1463			
94	25,75		709,4019		
96	25,90	573,2061			
97	26,20		643,2749		
98	26,35	brak	brak		
99	26,40	brak	brak		

100	26,45	brak	brak		
101	26,50	283,1463 353,1591			C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O ₃
103	26,75	525,2678			
104	27,20	brak	brak		
105	27,35	661,2556	637,2288		
106	27,35	573,2191			
107	27,90	245,0777			C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆
110	28,80	469,2793		469, 307, 97	C ₂₅ H ₄₀ O ₈
111	30,60	589,1064		589, 420, 389, 358, 333, 295, 247, 216, 146	

4.3. Zróżnicowanie w odpowiedzi metabolomicznej badanych gatunków Brassicaceae

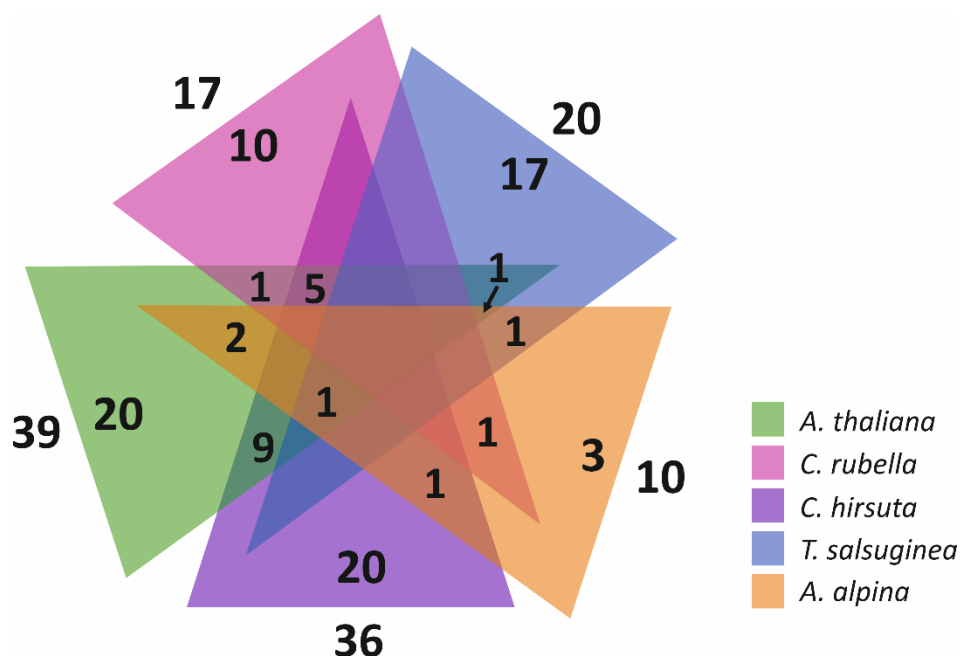
4.3.1. Różnice w odpowiedzi na inokulację *P. cucumerina* lub rozpoznanie flg22

Wykonane analizy UPLC-UV wykazały znaczne zróżnicowanie w liczbie metabolitów, których poziom akumulacji zwiększał się po inokulacji *P. cucumerina* lub traktowaniu flg22 (Ryc. 4.12). Najwięcej metabolitów indukowanych po inokulacji patogenem występowało w gatunkach *A. thaliana*, *C. hirsuta* i *T. halophila*. Z kolei metabolomiczna odpowiedź na flg22 była silniejsza w *A. thaliana* i *C. rubella* niż w przypadku pozostałych gatunków, zarówno pod względem ilości, jak i poziomu indukcji akumulacji metabolitów (Ryc. 4.12, 4.14). *C. rubella* był ponadto jedynym gatunkiem, w którym więcej metabolitów było indukowanych po traktowaniu flg22 niż po inokulacji *P. cucumerina* (Ryc. 4.12).

Metabolitami, których akumulacja była indukowana w zbliżonym stopniu zarówno w odpowiedzi na inokulację patogenem, jak i rozpoznanie flg22 były pochodne kwasu indolilo-3-karboxylowego i *p*-kumaroiloagmatyna, należąca do pochodnych kwasów hydroksycynamonowych (w gatunkach *A. thaliana* i *C. rubella*), 4MI3G (*T. halophila*) oraz glikozyd dihydroneoaskorbigeny (*A. thaliana*) (Ryc. 4.14). Biosynteza kamaleksyny i jej pochodnych oraz wazaleksyn była silnie indukowana po inokulacji patogenem, natomiast po traktowaniu flg22 zwiększenie akumulacji tych fitoaleksyn było tak niskie, że nie zostały one zarejestrowane w badanych próbkach przez detektor UV, a jedynie w przypadku kamaleksyny i 6-metoksykamaleksyny przez bardziej czuły detektor fluorescencyjny. Wyrażna różnica w indukcji akumulacji po inokulacji patogenem lub traktowaniu flg22 była obserwowana w grupie pochodnych kwasów hydroksycynamonowych. Indukcję akumulacji różnych pochodnych kwasu ferulowego, hydroksyferulowego, kumarowego, kawowego, czy synapinowego po inokulacji *P. cucumerina* obserwowano we wszystkich badanych gatunkach. W próbach roślin traktowanych flg22, wśród indukowanych metabolitów zidentyfikowano jedynie

pochodne kwasu kumarowego, które z jednym wyjątkiem występowały wyłącznie w gatunku *C. rubella*.

4.3.2. Zasięg filogenetyczny indukowanych metabolitów

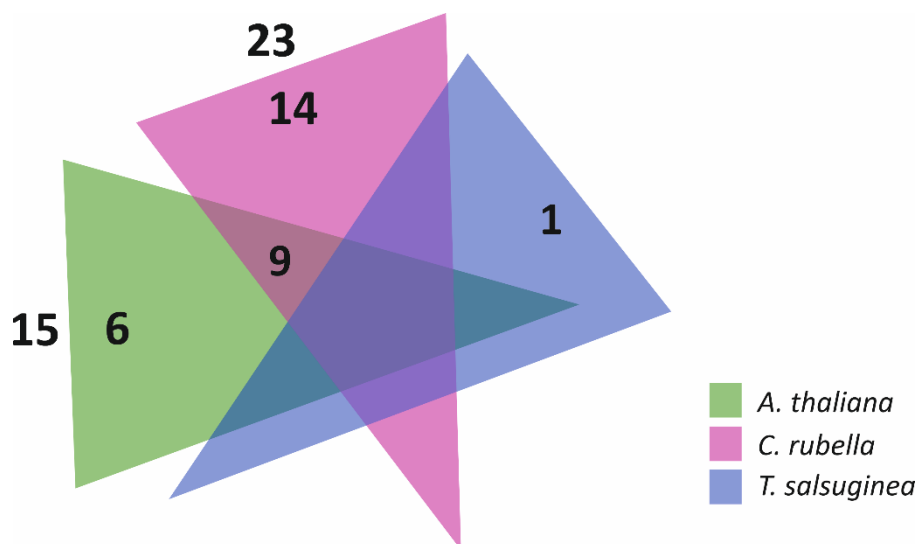


Ryc. 4.12. Diagram Venna przedstawiający specyficzność gatunkową metabolitów, charakteryzujących się zwiększoną akumulacją po inokulacji *P. cucumerina*. Liczby w odpowiednich podzbiorach pokazują ilość metabolitów specyficznych gatunkowo lub wspólnych dla kilku gatunków, wartości obok poszczególnych części diagramu oznaczają całkowitą liczbę metabolitów indukowanych w każdym gatunku

Na podstawie porównania czasów retencji, widm UV oraz MS stwierdzono, że obserwowany wzrost akumulacji większości metabolitów był specyficzny gatunkowo (Ryc. 4.12 i 4.13). Jedynie 22 związki z 93 indukowanych metabolitów, charakteryzowały się podwyższoną biosyntezą w przynajmniej dwóch z badanych gatunków. Jedynym metabolitem, który występował w czterech z pięciu badanych gatunków (z wyjątkiem *C. rubella*) i we wszystkich jego akumulacja zwiększała się po inokulacji *P. cucumerina* był 4MI3G (nr 44) (Ryc. 4.3). Siedem kolejnych metabolitów: RA (nr 2), 6-GlcO-ICOOGlc (nr 3), 6-GlcO-ICOOH (nr 7), 6-HO-ICOOGlc (nr 13), *p*-kumaroiloagmatyna (nr 34), ICOOGlc (nr 45) i niezidentyfikowany związek nr 85, charakteryzowało się wzmożoną biosyntezą w trzech z badanych gatunków. 14 metabolitów: di-*O*-glukozyd kwasu 5-hydroksyferulowego (nr 16), kwas *p*-kumaroilo-glukuronowy (nr 24), ester glukozyowy kwasu synapinowego (nr 32), glukozyd dihydroneoaskorbigeny (nr 43), *O*-malonylowany kwas hydroksyferulowy (nr 52), *O*-glukozyd hydroksykamaleksyny II (nr 57) i kamaleksyna (nr 95), a także niezidentyfikowane związki nr 14, 23, 26, 39, 62, 80 i 87 było indukowanych w dwóch z badanych gatunków Brassicaceae (Ryc. 4.3).

Metabolity indukowane specyficznie w *A. thaliana*, *C. rubella* i *C. hirsuta* stanowiły około 50% wszystkich metabolitów, których akumulacja była zwiększona w odpowiedzi na patogen lub MAMP w tych gatunkach. Największym odsetkiem związków indukowanych specyficznie gatunkowo cechował się *T. salsuginea* (85%), z drugiej strony u *A. alpina* metabolity specyficzne gatunkowo stanowiły jedynie 30% wszystkich związków indukowanych po inokulacji *P. cucumerina*. Najwięcej wspólnych metabolitów o powiększonej akumulacji, bo aż 15, miały gatunki *A. thaliana* i *C. hirsuta* (Ryc. 4.13). Z kolei *A. thaliana* z najbliższej z nim spokrewnionym *C. rubella* miały 6 wspólnych indukowanych metabolitów (Ryc. 4.13).

Rozpoznanie flg22 spowodowało zwiększenie akumulacji 8 metabolitów wspólnych dla *A. thaliana* i *C. rubella*, stanowiących odpowiednio 60 i 41% wszystkich metabolitów indukowanych, występujących w tych dwóch gatunkach (Ryc. 4.14). Wśród tych związków były pochodne kwasu indolilo-3-karboksyłowego (nr 3, 7, 13 i 45), *p*-kumaroiloagmatyna (nr 34), a także niezidentyfikowane metabolity nr 75 i 103. Jedyny związek indukowany po traktowaniu flg22 *T. salsuginea* był jednocześnie indukowany specyficznie tylko w tym gatunku (Ryc. 4.14).



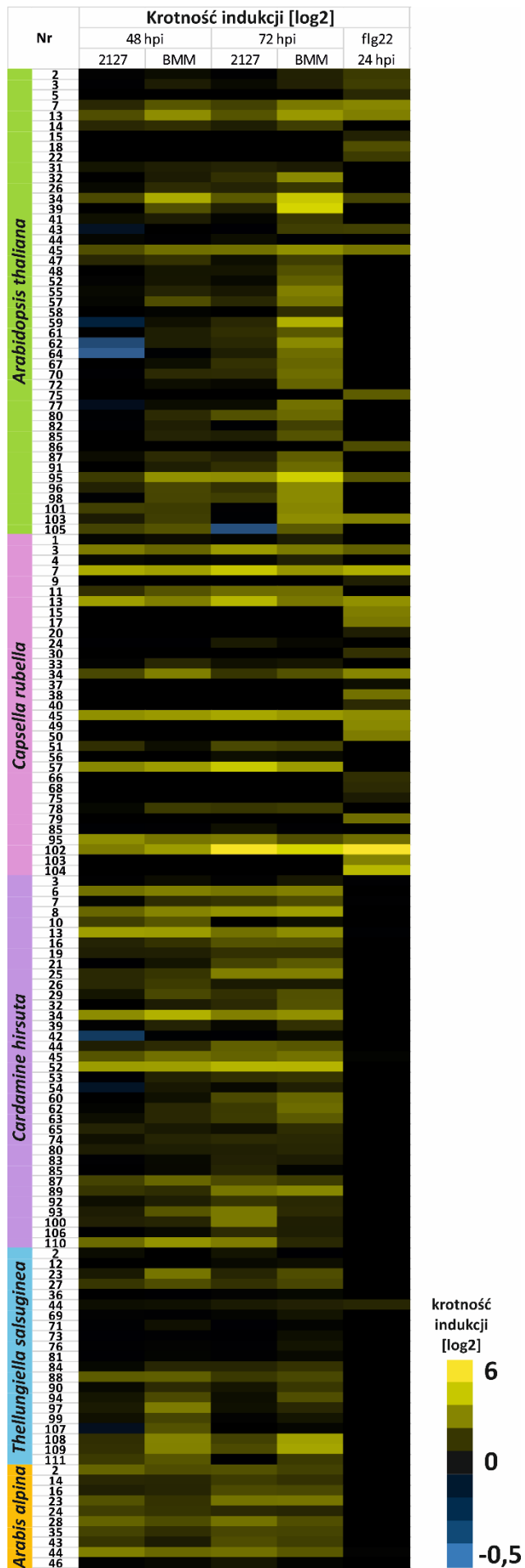
Ryc. 4.13. Diagram Venna przedstawiający specyficzność metabolitów, których akumulacja była indukowana w odpowiedzi na flg22. Liczby w odpowiednich podzbiorach pokazują ilość metabolitów specyficznych gatunkowo lub wspólnych dla kilku gatunków, wartości obok diagramów oznaczają całkowitą liczbę metabolitów indukowanych w każdym gatunku

4.3.3. Zmiany ilościowe w akumulacji metabolitów

We wszystkich badanych gatunkach obserwowano metabolity, których stężenie po inokulacji patogenem bądź traktowaniu flg22 wzrastało co najmniej 7-krotnie w porównaniu do warunków kontrolnych. Najwięcej takich związków - 6 było w *A. thaliana*. Oprócz szeregu metabolitów zidentyfikowanych w tym gatunku, 15 związków o nieznanym strukturach charakteryzowało się

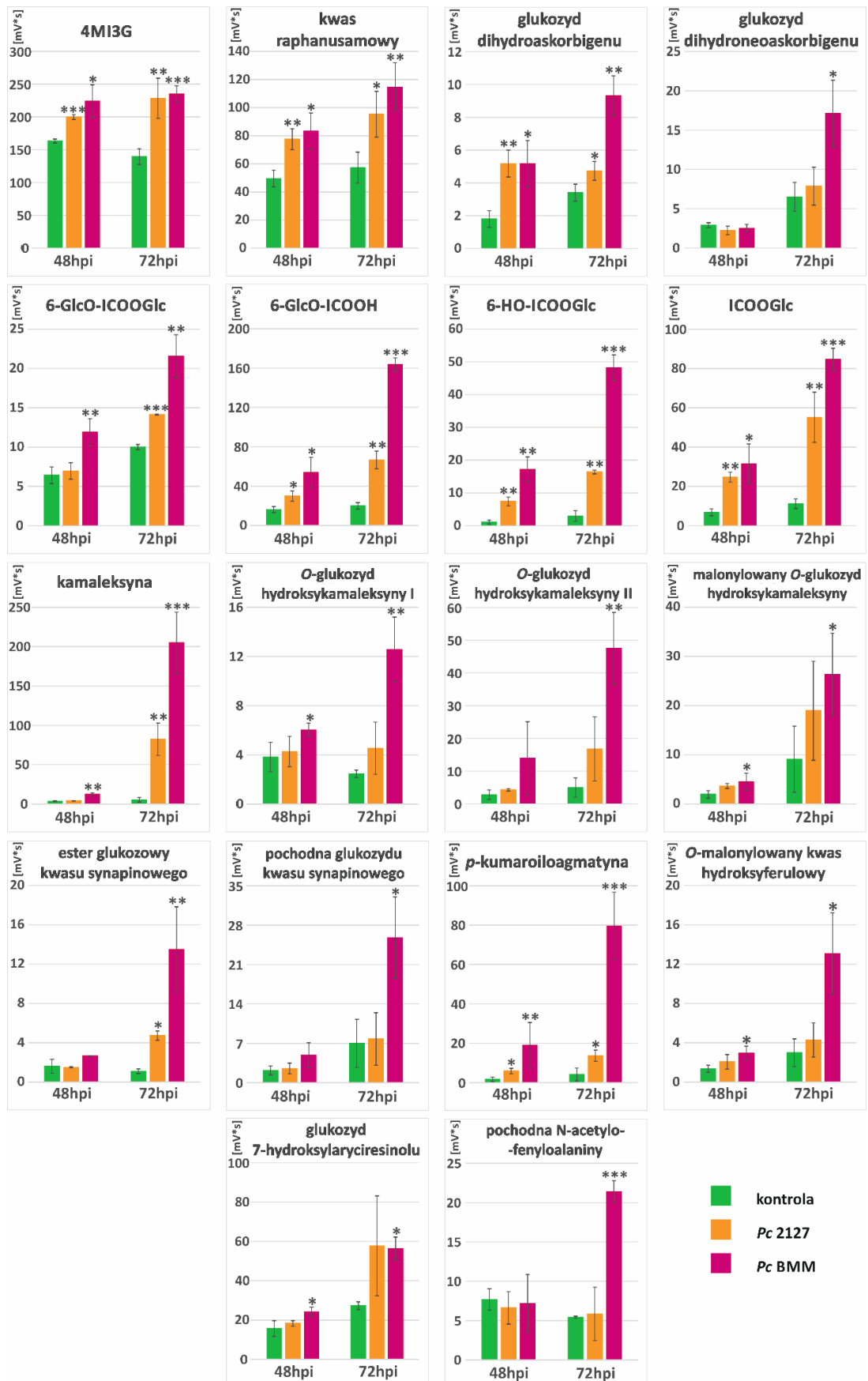
przynajmniej 3-krotnym wzrostem biosyntezy po inokulacji *P. cucumerina* lub traktowaniu flg22 (Ryc. 4.14). W pozostałych badanych gatunkach poza metabolitami zidentyfikowanymi również obserwowano od czterech (*A. alpina*) do dziesięciu (*C. hirsuta*) związków o nieznannej strukturze, które charakteryzowały się przynajmniej 3-krotną indukcją akumulacji po inokulacji *P. cucumerina* (Ryc. 4.14). Rozpoznanie flg22 powodowało wysoki, w porównaniu do innych gatunków, wzrost akumulacji metabolitów w gatunku *C. rubella* (Ryc. 4.14). Wśród tych metabolitów, oprócz związków zidentyfikowanych, co najmniej 3-krotny wzrost akumulacji obserwowano dla sześciu metabolitów o nieznannej strukturze (Ryc. 4.14).

Porównując zmiany zachodzące w profilach metabolitów po inokulacji roślin dwoma szczepami *P. cucumerina* (2127 i BMM) zaobserwowano, że akumulacja większości indukowanych związków w gatunku *A. thaliana* była wyższa w przypadku zaadaptowanego szczepu *PcBMM*, niż w przypadku szczepu niezaadaptowanego *Pc2127* w obu punktach czasowych (Ryc. 4.14). W gatunku *C. rubella*, przeciwnie do *A. thaliana*, akumulacja większości metabolitów była wyższa po inokulacji szczepem *Pc2127* w porównaniu do szczepu *PcBMM*. W przypadku pozostałych badanych gatunków Brassicaceae różnice w akumulacji metabolitów w odniesieniu do użytego szczepu patogenu występowały jedynie dla pojedynczych związków (Ryc. 4.14).



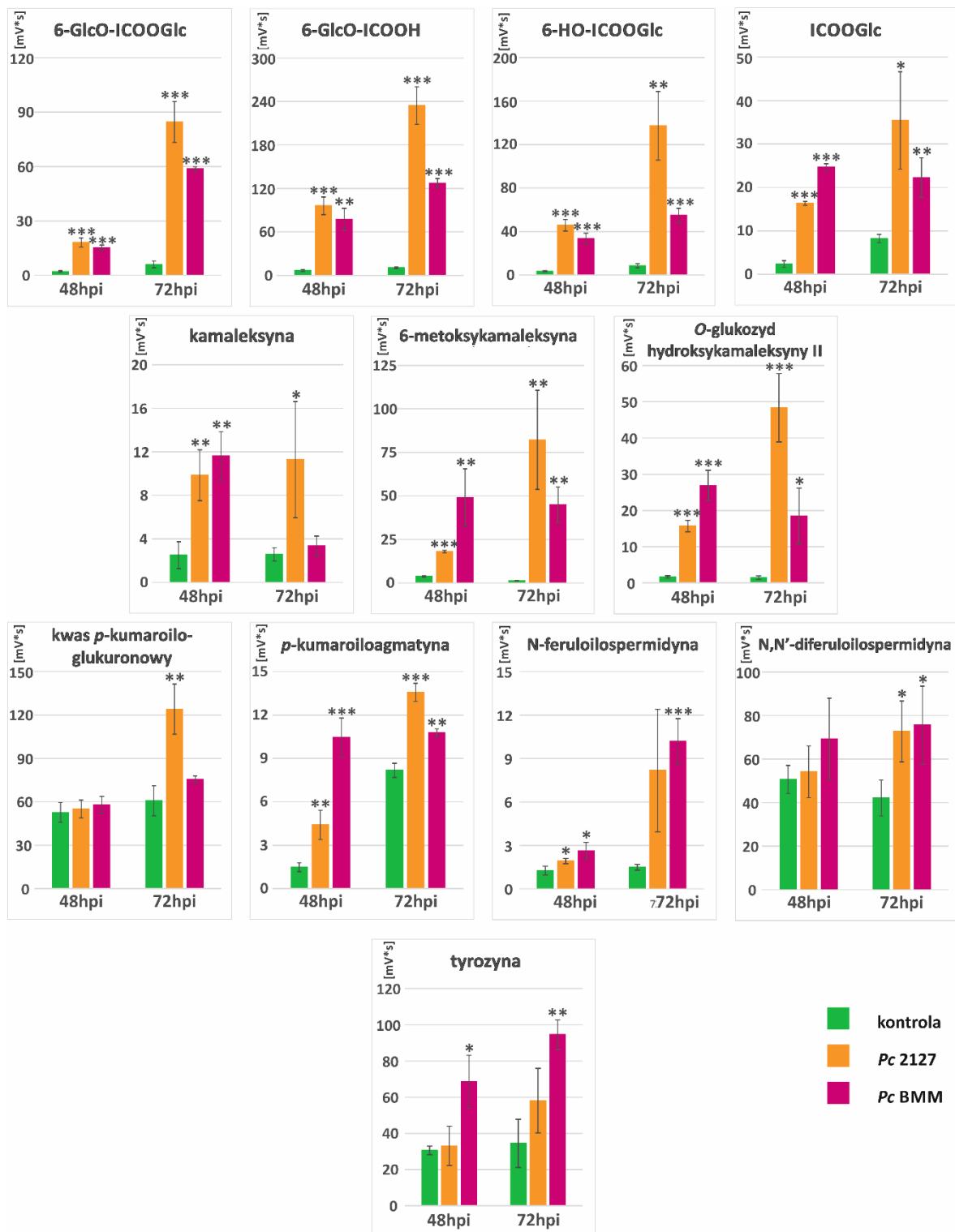
← Ryc. 4.14. Zmiany w akumulacji metabolitów określone krotnością różnicy pomiędzy powierzchnią pików reprezentujących poszczególne związki indukowane w badanych gatunkach Brassicaceae po inokulacji jednym z dwóch szczepów *P. cucumerina* (2127 lub BMM) lub traktowaniu flg22, odpowiednio 48 i 72h lub 24h po inokulacji/traktowaniu, w odniesieniu do prób kontrolnych; średnia z trzech niezależnych eksperymentów

Dla metabolitów, których struktury zostały zidentyfikowane, przeprowadzono szczegółową analizę ilościową zmian zachodzących w ich po inokulacji *P. cucumerina*. W *A. thaliana*, w którym zidentyfikowano 18 związków charakteryzujących się zwiększoną akumulacją po inokulacji patogenem, obserwowano wyraźne różnice w poziomie biosyntezy tych metabolitów ze względu na użyty szczep *P. cucumerina* (Ryc. 4.15). Prawie wszystkie zidentyfikowane produkty metabolizmu tryptofanu charakteryzowały się najwyższym poziomem akumulacji 72 h po inokulacji szczepem *PcBMM* (Ryc. 4.15). Wśród tych związków jedynie 4MI3G charakteryzował się zbliżoną indukcją akumulacji bez względu na użyty szczep patogenu i czas po inokulacji (Ryc. 4.15). Wśród zidentyfikowanych pochodnych tryptofanu inokulacja *PcBMM* powodowała największy, względny wzrost akumulacji kamaleksyny i 6-GlcO-ICOOH (Ryc. 4.15). RA, który jest produktem ubocznym szlaku PEN2 ulegał, podobnie jak 4MI3G, zwiększonej biosyntezie niezależnie od szczepu *P. cucumerina* (Ryc. 4.15). Prawie wszystkie zidentyfikowane pochodne fenylopropanoidowe, podobnie jak produkty metabolizmu tryptofanu, charakteryzowały się największą akumulacją 72 h po inokulacji *PcBMM* (Ryc. 4.15). Jedynym metabolitem, należącym do tej klasy związków, którego akumulacja była indukowana w równym stopniu przez oba szczepy *P. cucumerina* był glukozyd 7-hydroksylaryciresinolu (Ryc. 4.15). Ostatni zidentyfikowany metabolit, który został sklasyfikowany jako pochodna *N*-acetylofenyloalaniny, charakteryzował się zwiększoną akumulacją jedynie 72 h po inokulacji *PcBMM* (Ryc. 4.15).



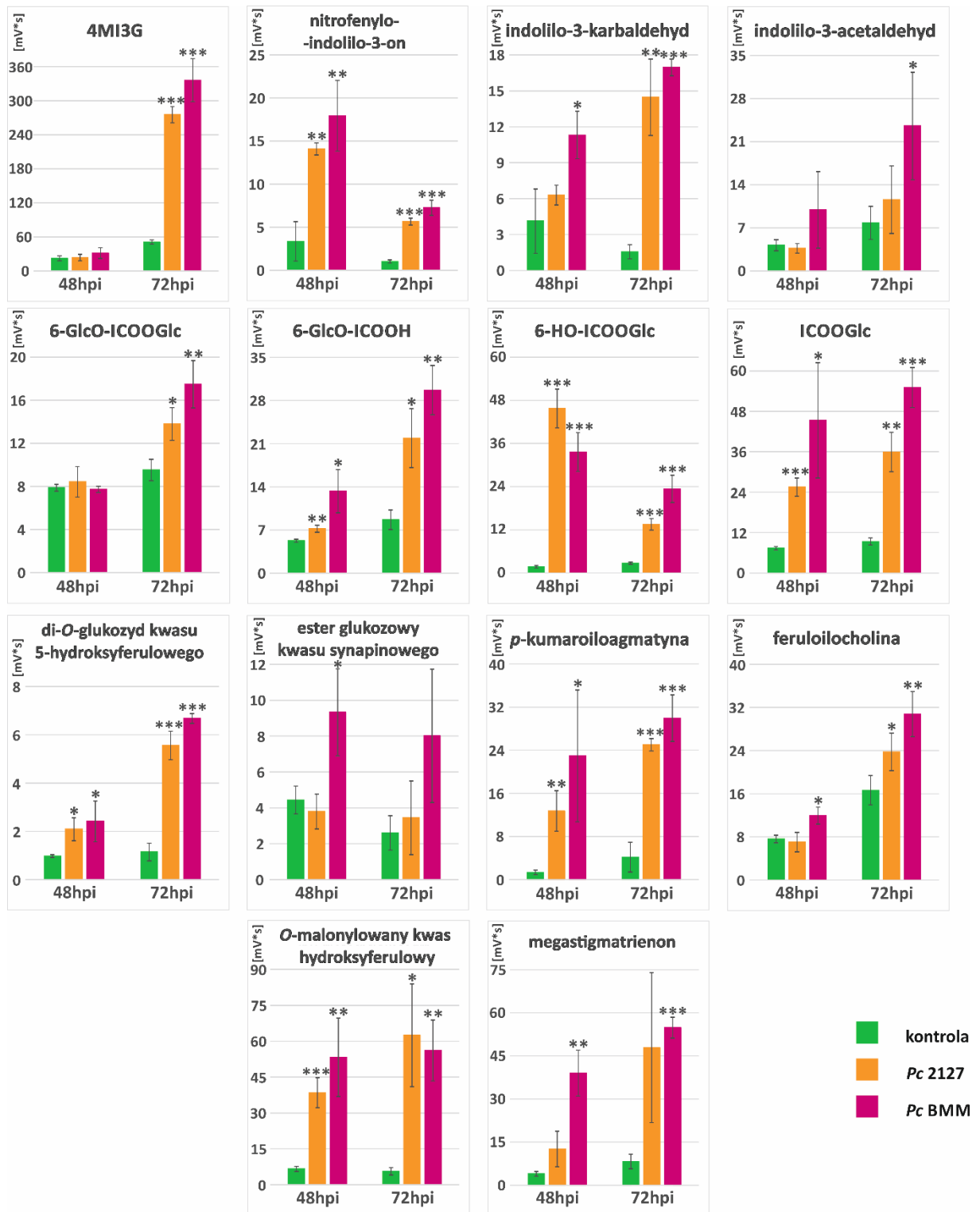
Ryc. 4.15. Akumulacja zidentyfikowanych metabolitów w kontrolnych i inokulowanych *P. cucurbitina* liściach *A. thaliana* 48 i 72 h po inokulacji. Ilość metabolitów przedstawiono jako powierzchnię pod pikiem zarejestrowaną przy długości fali 273 nm; przedstawiono reprezentatywne wyniki uzyskane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; n = 3, wartość p (test t-Studenta): * <math>< 0,05</math>, ** <math>< 0,01</math>, *** <math>< 0,001</math>

W *C. rubella* zidentyfikowano z jednym wyjątkiem wyłącznie metabolity należące do klasy związków indolowych i fenylopropanoidowych. W przeciwieństwie do *A. thaliana*, w tym gatunku akumulacja większości zidentyfikowanych metabolitów była indukowana silniej po inokulacji *Pc2127* (Ryc. 4.16). Najsilniej indukowanymi związkami były pochodne kwasu indolilo-3-karboksylowego i pochodne kamaleksyny (Ryc. 4.16). W tym gatunku obserwowano również zwiększenie akumulacji kamaleksyny, jednak stężenie tego metabolitu wyrażone powierzchnią pod pikiem nie było tak wysokie, jak w przypadku *A. thaliana* (Ryc. 4.15, 4.16). Wśród zidentyfikowanych pochodnych fenylopropanoidowych nie występowały tak duże różnice w ich akumulacji ze względu na użyty szczep *P. cucumerina*, jak w przypadku pochodnych indolowych (Ryc. 4.16). Jedynym zidentyfikowanym w *C. rubella* związkiem, którego akumulacja była indukowana w większym stopniu po inokulacji *PcBMM* była tyrozyna (Ryc. 4.16).



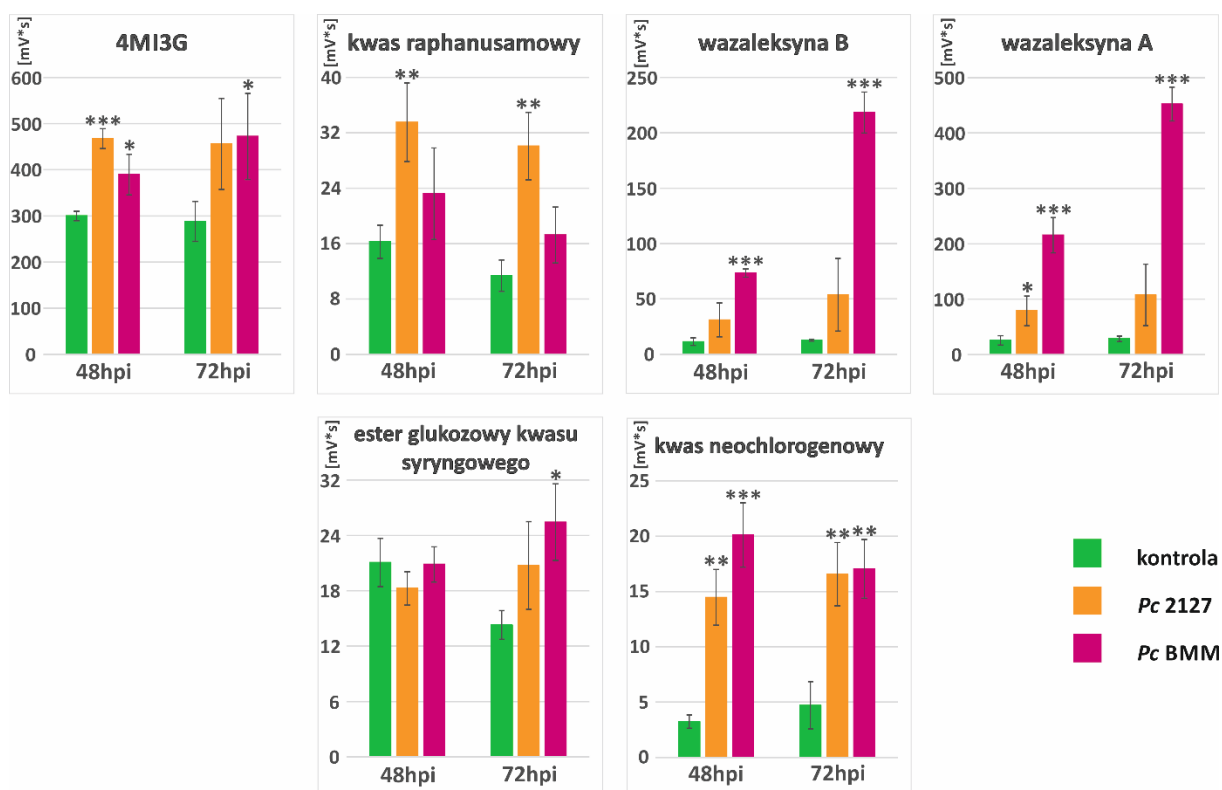
Ryc. 4.16. Akumulacja zidentyfikowanych metabolitów w kontrolnych i inokulowanych *P. cucumerina* liściach *C. rubella* 48 i 72 h po inokulacji. Ilość metabolitów przedstawiono jako powierzchnię pod pikiem zarejestrowaną przy długości fali 273 nm; przedstawiono reprezentatywne wyniki uzyskane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; n = 3, wartość p (test t-Studenta): * <0,05, **<0,01, ***<0,001

Drugim gatunkiem pod względem ilości metabolitów, których akumulacja była indukowana po inokulacji *P. cucumerina* był *C. hirsuta*. W tym gatunku zidentyfikowano 14 metabolitów, które z jednym wyjątkiem należały do klas związków indolowych i pochodnych szlaku fenylopropanoidowego (Ryc. 4.17). W odróżnieniu od dwóch poprzednich, w *C. hirsuta* nie obserwowano znacznych różnic w indukcji akumulacji ze względu na użyty szczep *P. cucumerina* (Ryc. 4.17). Unikalne dla *C. hirsuta*, w porównaniu do wszystkich gatunków, w których występował 4MI3G, było zwiększenie akumulacji tego glukozynolanu jedynie 72 h po inokulacji (Ryc. 4.17). W przeciwieństwie do *A. thaliana* i *C. rubella* w *C. hirsuta* nie zaobserwowano istotnych różnic w indukcji akumulacji pochodnych kwasu indolilo-3-karboksyłowego ze względu na użyty szczep *P. cucumerina* (Ryc. 4.17). W przypadku zidentyfikowanych pochodnych kwasów hydroksycynamonowych, inokulacja obydwoma szczepami *P. cucumerina* wywoływała zwiększenie akumulacji tych związków na podobnym poziomie (Ryc. 4.17). Jedynym wyjątkiem był ester glukozowy kwasu synapinowego, którego wzmożona biosynteza była obserwowana jedynie po inokulacji *PcBMM* (Ryc. 4.17).



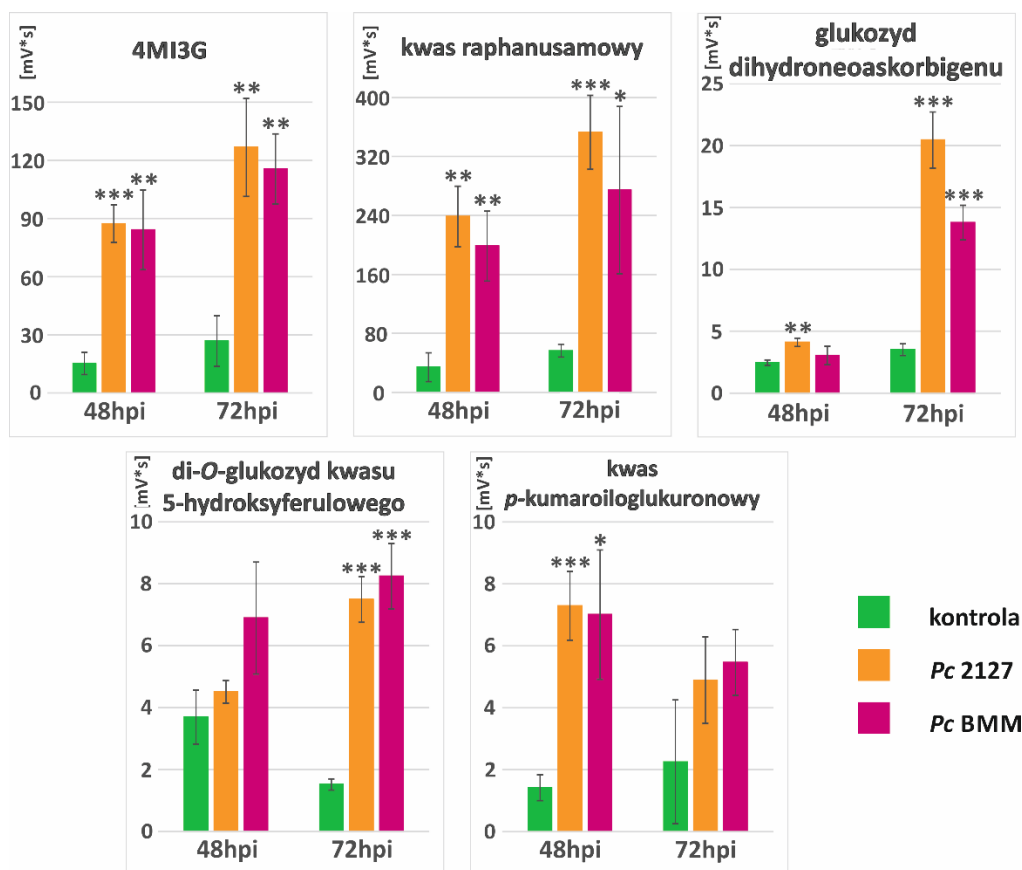
Ryc. 4.17. Akumulacja zidentyfikowanych metabolitów w kontrolnych i inokulowanych *P. cucumerina* liściach *C. hirsuta* 48 i 72 h po inokulacji. Ilość metabolitów przedstawiono jako powierzchnię pod pikiem zarejestrowaną przy długości fali 273 nm; przedstawiono reprezentatywne wyniki uzyskane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; n = 3, wartość p (test t-Studenta): * <math>p < 0,05</math>, ** <math>p < 0,01</math>, *** <math>p < 0,001</math>

Wśród metabolitów zidentyfikowanych w *T. salsuginea* były związki indolowe, pochodna szlaku fenylopropanoidowego oraz metabolit należący do grupy kwasów benzoesowych (Ryc. 4.18). W tym gatunku, w przypadku większości metabolitów, nie obserwowano istotnych różnic ze względu na inokulację poszczególnymi szczepami *P. cucumerina* (Ryc. 4.18). Wyjątkiem były wazaleksyny, które charakteryzowały się wyraźnie większą biosyntezą po inokulacji *PcBMM* (Ryc. 4.18). Wazaleksyny były jednocześnie metabolitami o największej indukcji akumulacji spośród wszystkich zidentyfikowanych w *T. salsuginea* (Ryc. 4.18). Z kolei kwas raphanusamowy był jedynym związkiem, który ulegał silniejszemu zwiększeniu akumulacji po inokulacji *Pc2127* (Ryc. 4.18). Jedyną zidentyfikowaną pochodną fenylopropanoidową był kwas neochlorogenowy, którego zawartość w inokulowanych liściach była zbliżona w przypadku obu użytych szczepów *P. cucumerina* (Ryc. 4.18). *PcBMM* wywoływał również zwiększenie akumulacji estru glukozowego kwasu syryngowego, 72 h po inokulacji (Ryc. 4.18).



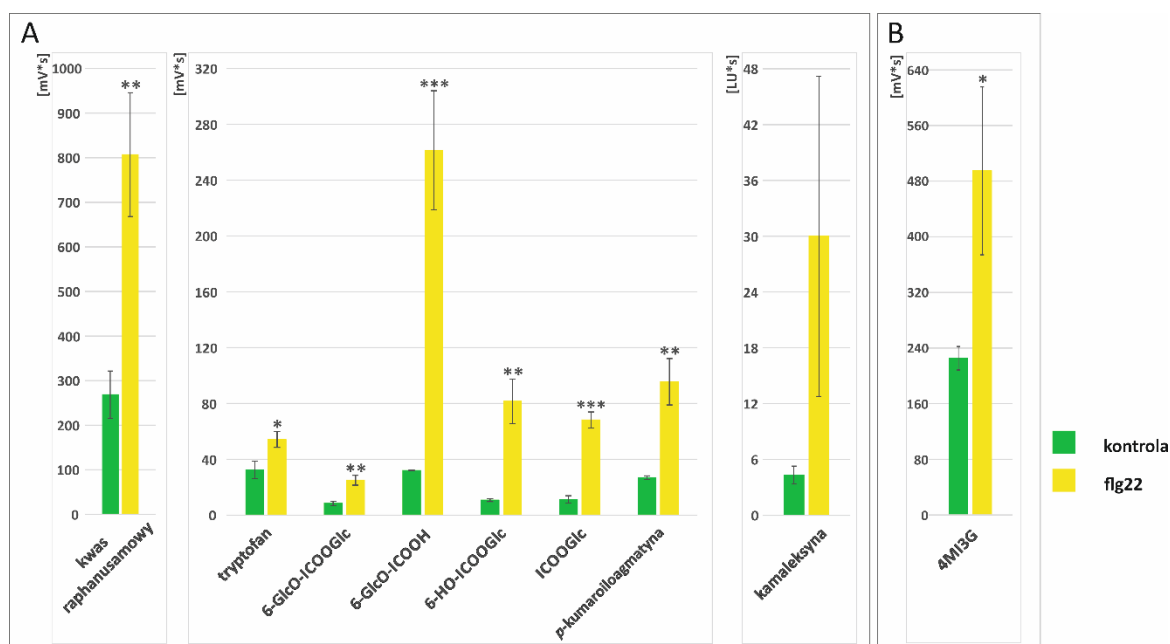
Ryc. 4.18. Akumulacja zidentyfikowanych metabolitów w kontrolnych i inokulowanych *P. cucumerina* liściach *T. salsuginea* 48 i 72 h po inokulacji. Ilość metabolitów przedstawiono jako powierzchnię pod pikiem zarejestrowaną przy długości fali 273 nm; przedstawiono reprezentatywne wyniki uzyskane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; n = 3, wartość p (test t-Studenta): * <0,05, **<0,01, ***<0,001

Zidentyfikowane metabolity, których akumulacja była indukowana w *A. alpina* należały do glukozyznanów indolowych i produktów ich metabolizmu oraz do związków fenylopropanoidowych (Ryc. 4.19). W tym gatunku, podobnie jak w *C. hirsuta* i *T. salsuginea*, dla większości związków nie obserwowano różnic w akumulacji ze względu na użyty szczep *P. cucumerina* (Ryc. 4.19). *A. alpina* charakteryzował się, w porównaniu do innych gatunków, największym nasileniem biosyntezy 4MI3G i kwasu raphanusamowego (Ryc. 4.19). Indukcja akumulacji pochodnych fenylopropanoidowych w *A. alpina* także różniła się od zmian w biosyntezie tych związków w innych gatunkach. Kwas *p*-kumaroiloglukuronowy w *A. alpina* ulegał wyraźnemu zwiększeniu biosyntezy 48 h po inokulacji (w *C. rubella* 72 h po inokulacji), z kolei di-*O*-glukozyd kwasu 5-hydroksyferulowego charakteryzował się w *A. alpina* wzmożoną biosyntezą jedynie 72 h po inokulacji (w *C. hirsuta* 48 i 72 h po inokulacji) (Ryc. 4.19).



Ryc. 4.19. Akumulacja zidentyfikowanych metabolitów w kontrolnych i inokulowanych *P. cucumerina* liściach *T. salsuginea* 48 i 72 h po inokulacji. Ilość metabolitów przedstawiono jako powierzchnię pod pikiem zarejestrowaną przy długości fali 273 nm; przedstawiono reprezentatywne wyniki uzyskane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; n = 3, wartość p (test t-Studenta): * <0,05, **<0,01, ***<0,001

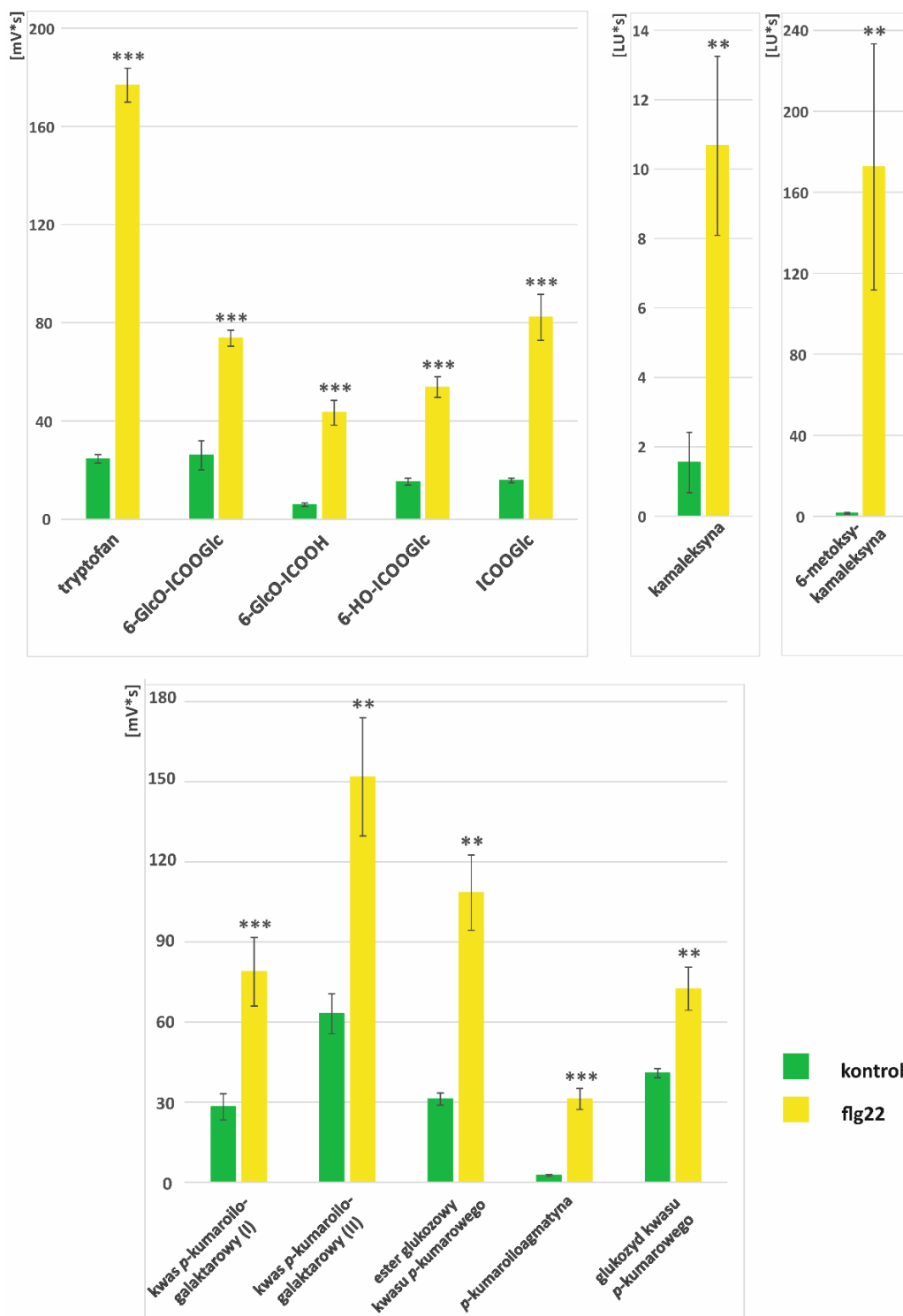
W przeciwieństwie do inokulacji *P. cucumerina*, zmiany w akumulacji metabolitów wywołane obecnością peptydu flg22 obserwowane były jedynie w trzech gatunkach: *A. thaliana*, *C. rubella* i *T. salsuginea* (Ryc. 4.20 i 4.21). Wśród metabolitów *A. thaliana*, charakteryzujących się zwiększoną akumulacją w odpowiedzi na wykrycie flg22 zidentyfikowano tryptofan i jego pochodne, wśród których występowała grupa pochodnych kwasu indolilo-3-karboksyłowego i kamaleksyna, a także kwas raphanusamowy związany z metabolizmem glukozyzolanów indolowych (Ryc. 4.20A). Zwiększona akumulacja tryptofanu była charakterystyczna dla odpowiedzi na zastosowany MAMP, ponieważ w próbach otrzymanych z roślin inokulowanych patogenem nie obserwowano indukcji biosyntezy tego aminokwasu. Zidentyfikowano również jedną pochodną fenylopropanoidową – *p*-kumaroiloagmatynę (Ryc. 4.20A). W *T. salsuginea* obserwowano tylko jeden metabolit charakteryzujący się podwyższoną akumulacją w odpowiedzi na flg22, którym był 4MI3G (Ryc. 4.20B). Co ciekawe, traktowanie flg22, w przeciwieństwie do inokulacji *P. cucumerina*, nie powodowało zwiększenia biosyntezy tego związku w pozostałych badanych gatunkach (Ryc. 4.20).



Ryc. 4.20. Akumulacja metabolitów, w kontrolnych i traktowanych flg22 siewkach *A. thaliana* (A) i *T. salsuginea* (B) 24 h po aplikacji flg22. Ilość metabolitów przedstawiona jako powierzchnia pod pikiem zarejestrowana przez detektor PDA przy długości fali 273 nm lub detektor fluorescencyjny (kamaleksyna); dane reprezentatywne uzyskane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; n = 3, wartość p (test t-Studenta): * - <0,05, **<0,01, ***<0,001

W odpowiedzi na wykrycie flg22 w siewkach *C. rubella* następowało zwiększenie akumulacji największej, w porównaniu do pozostałych gatunków, liczby metabolitów, wśród których zidentyfikowano pochodne indolowe, fenylopropanoidowe i jedną pochodną kwasu benzoowego (Ryc. 4.21). W tym gatunku obserwowano silną indukcję biosyntezy wszystkich pochodnych kwasu indolilo-3-karboksyłowego, kamaleksyny i 6-metoksykamaleksyny, a także tryptofanu, którego

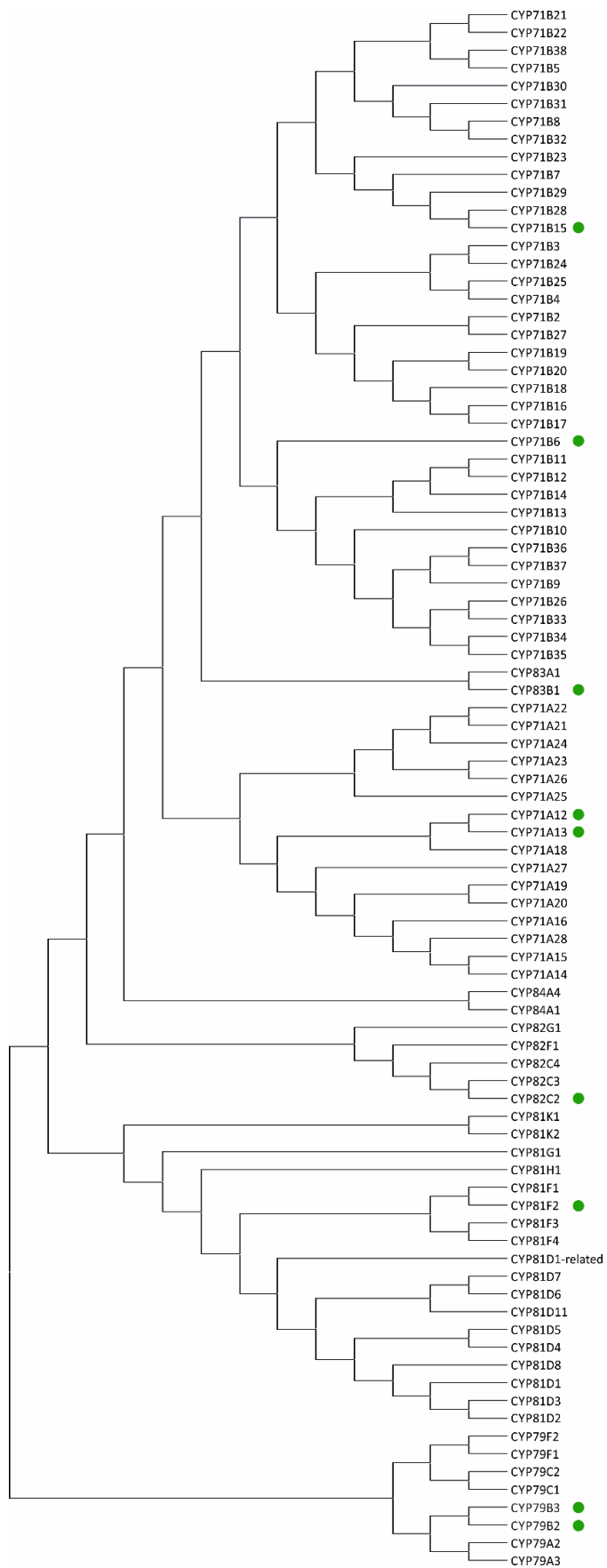
akumulacja była silniejsza niż w *A. thaliana*. Wszystkie zidentyfikowane metabolity fenylopropanoidowe były pochodnymi kwasu kumarowego (Ryc. 4.21).



Ryc. 4.21. Akumulacja metabolitów, w kontrolnych i traktowanych flg22 siewkach *C. rubella* 24 h po aplikacji flg22. Ilość metabolitów przedstawiona jako powierzchnia pod pikiem zarejestrowana przez detektor PDA przy długości fali 273 nm lub detektor fluorescencyjny (kamaleksyna i 6-metoksykamaleksyna); dane reprezentatywne uzyskane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; n = 3, wartość p (test t-Studenta): * - <0,05, **<0,01, ***<0,001

4.4. Badania filogenetyczne i transkryptomyczne szlaków metabolicznych związanych z odpowiedzią odpornościową

Przeprowadzone analizy filogenetyczne miały na celu wyznaczenie w badanych gatunkach ortologów genów związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych *A. thaliana*, pełniących funkcje w odpowiedzi odpornościowej tego gatunku. Cytochromy P450 (CYP), o aktywności monooksygenaz, stanowią jedną z największych rodzin enzymów związanych z metabolizmem wtórnym. W *A. thaliana* zidentyfikowano dotąd 246 genów kodujących enzymy należące do tej rodziny, podzielonych na 72 podgrupy (<http://www.p450.kvl.dk/p450.shtml>). Na Ryc. 4.22 przedstawiono drzewo filogenetyczne wybranych 17 podgrup monooksygenaz CYP *A. thaliana*, zawierających 89 monooksygenaz P450. Wyboru dokonano ze względu na przynależność do tych podgrup enzymów związanych ze szlakiem metabolizmu tryptofanu.

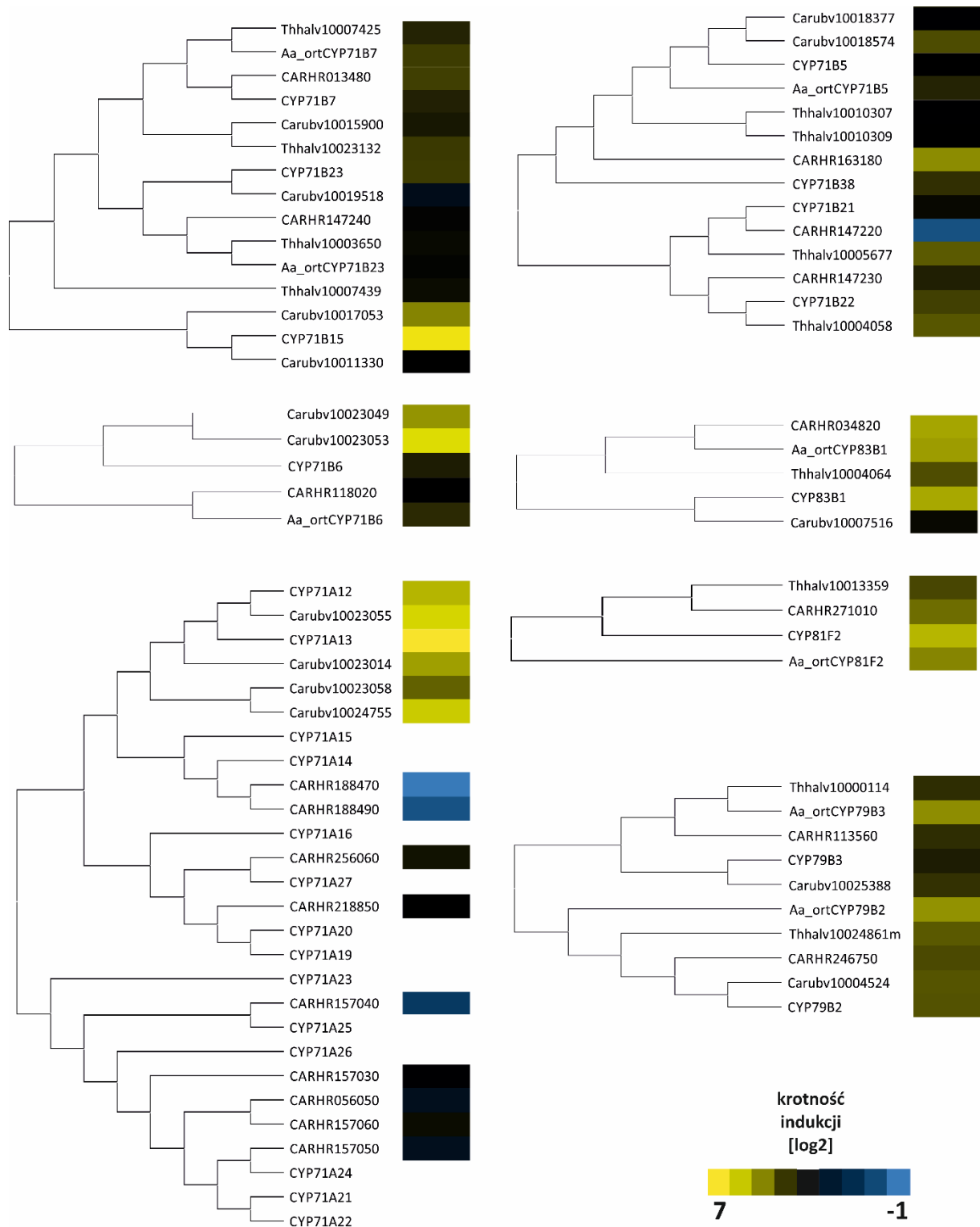


Ryc. 4.22. Drzewo filogenetyczne wybranych podgrup monooksygenaz cytochromu P450 zidentyfikowanych w *A. thaliana*, do których należą enzymy związane z metabolizmem tryptofanu (oznaczone zielonym punktem); drzewo wygenerowane na podstawie sekwencji aminokwasowych metodą tzw. najbliższego sąsiada (ang. neighbor joining)

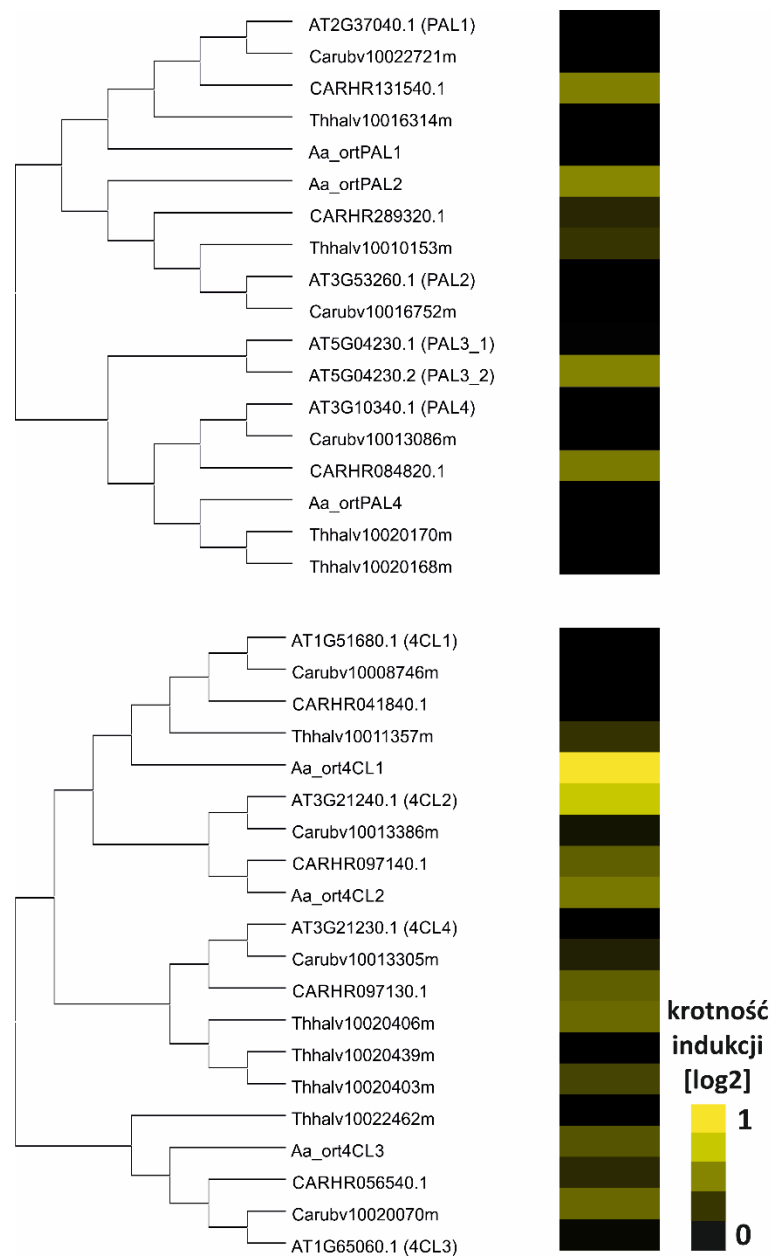
Aby zidentyfikować w badanych gatunkach potencjalne ortologi oraz dalsze homologii genów kodujących monoooksygenazy P450 związane z metabolizmem tryptofanu w *A. thaliana*, wykonano analizę porównawczą sekwencji aminokwasowych z użyciem narzędzia BLAST, a następnie dla wyznaczonych genów wygenerowano drzewa filogenetyczne (Ryc. 4.23). Tę samą analizę przeprowadzono również dla enzymów PAL (amoniakoliza fenylalaninowa) i 4CL (ligaza 4-kumaroilo-koenzymu A) z *A. thaliana*, które związane są ze szlakiem fenylpropanoidowym (Ryc. 4.24). W przeciwieństwie do *C. rubella*, *C. hirsuta* i *T. salsuginea* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>), geny *A. alpina*, nie posiadają dotąd nadanych anotacji, dlatego na potrzeby niniejszej pracy wybrane geny zostały anotowane jako *Aa_ort* (oznaczenie genu z *A. thaliana*). W tabeli 4.3 podano pozycje wybranych genów na odpowiednich chromosomach *A. alpina*, według bazy danych NCBI (National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 4.3. Geny *A. alpina* zidentyfikowane jako ortologi wybranych monoooksygenaz P450 *A. thaliana*

Gen	Oznaczenie chromosomu	Pozycja genu na chromosomie
<i>Aa_ortCYP71B5</i>	LT669792.1 (ch5)	18574844 – 18576582
<i>Aa_ortCYP71B6</i>	LT669793.1 (ch6)	25617861 – 25619378
<i>Aa_ortCYP71B7</i>	LT669788.1 (ch1)	10583459 – 10585019
<i>Aa_ortCYP71B23</i>	LT669792.1 (ch5)	2571367 – 2569330
<i>Aa_ortCYP79B2</i>	LT669794.1 (ch7)	1285375 – 1287416
<i>Aa_ortCYP79B3</i>	LT669793.1 (ch6)	16691307 – 16689165
<i>Aa_ortCYP81F2</i>	LT669795.1 (ch8)	39081315 – 39084161
<i>Aa_ortCYP83B1</i>	LT669794.1 (ch7)	25442483 – 25444117
<i>Aa_ortPAL1</i>	LT669791.1 (ch4)	42637525 – 42639276
<i>Aa_ortPAL2</i>	LT669792.1 (ch5)	18528090 – 18526351
<i>Aa_ortPAL4</i>	LT669795.1 (ch8)	2232896 – 2234576
<i>Aa_ort4CL1</i>	LT669791.1 (ch4)	5357557 – 5361113
<i>Aa_ort4CL2</i>	LT669790.1 (ch3)	23417396 – 23420877
<i>Aa_ort4CL3</i>	LT669789.1 (ch2)	26265226 – 26261308



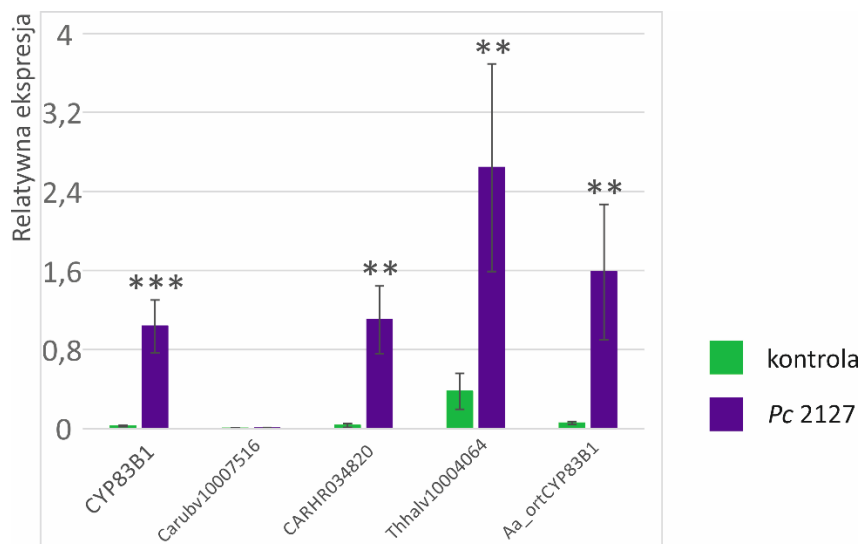
Ryc. 4.23. Drzewa filogenetyczne potencjalnych ortologów i dalszych homologów genów *CYP* związanych z metabolizmem tryptofanu w *A. thaliana* wygenerowane na podstawie sekwencji aminokwasowych metodą tzw. najbliższego sąsiada (ang. neighbor joining); załączone mapy ciepłe przedstawiają względną zmianę w ekspresji wybranych genów 24h po inokulacji roślin *P. cucumerina* 2127 określone na podstawie analiz RT-qPCR (średnia z trzech niezależnych eksperymentów, liczba próbek n = 9)



Ryc. 4.24. Drzewa filogenetyczne potencjalnych ortologów genów PAL i 4CL *A. thaliana*, wygenerowane na podstawie sekwencji aminokwasowych metodą tzw. najbliższego sąsiada (ang. neighbor joining); dołączone mapy ciepłe przedstawiają względne zmiany w ekspresji wybranych genów 24h po inokulacji roślin *P. cucumerina* 2127 określone na podstawie analiz RT-qPCR (średnia z trzech niezależnych eksperymentów, liczba próbek n = 9)

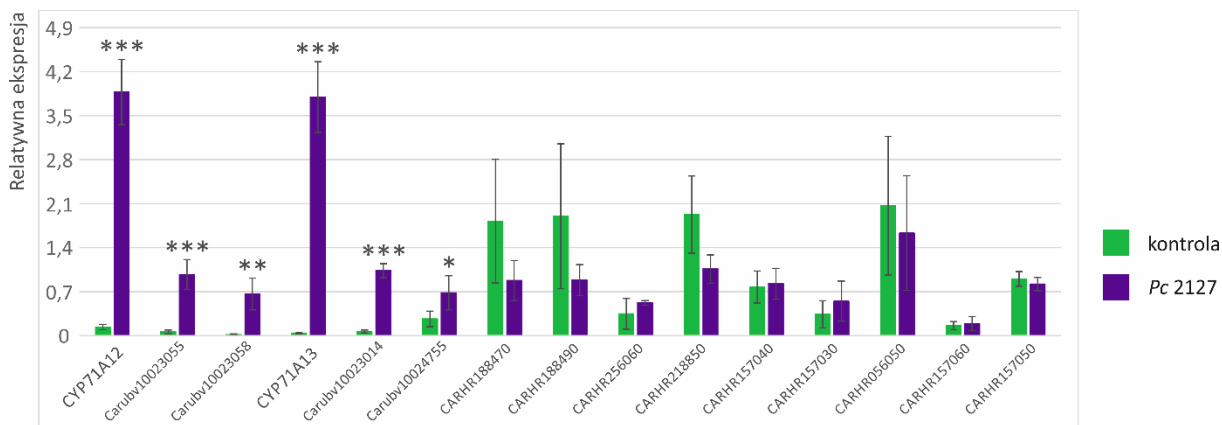
Dla wybranych genów sprawdzono jak ich ekspresja zmienia się po inokulacji roślin patogenem. Do tych eksperymentów użyty został szczep *P. cucumerina* 2127, ze względu na fakt, że w przeciwieństwie do szczepu *PcBMM*, był o niezaadaptowany na wszystkich gatunkach badanych roślin (Ryc. 4.1 – 2). Wyniki analiz wykonanych przy pomocy RT-qPCR pokazały, że ekspresja ortologów genów *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP81F2*, *CYP83B1*, *CYP71B6*, *CYP71B15*, *CYP71A12* i *CYP71A13* była indukowana po inokulacji patogenem (Ryc. 4.23). Jednym z genów, którego

ekspresja nie ulegała indukcji był *Carubv10007516* (*C. rubella*), będący ortologiem genu *CYP83B1* z *A. thaliana* (Ryc. 4.23). Co więcej, ekspresja tego genu była na granicy wykrywalności zarówno w próbach z roślin kontrolnych, jak i inokulowanych (Ryc. 4.25).



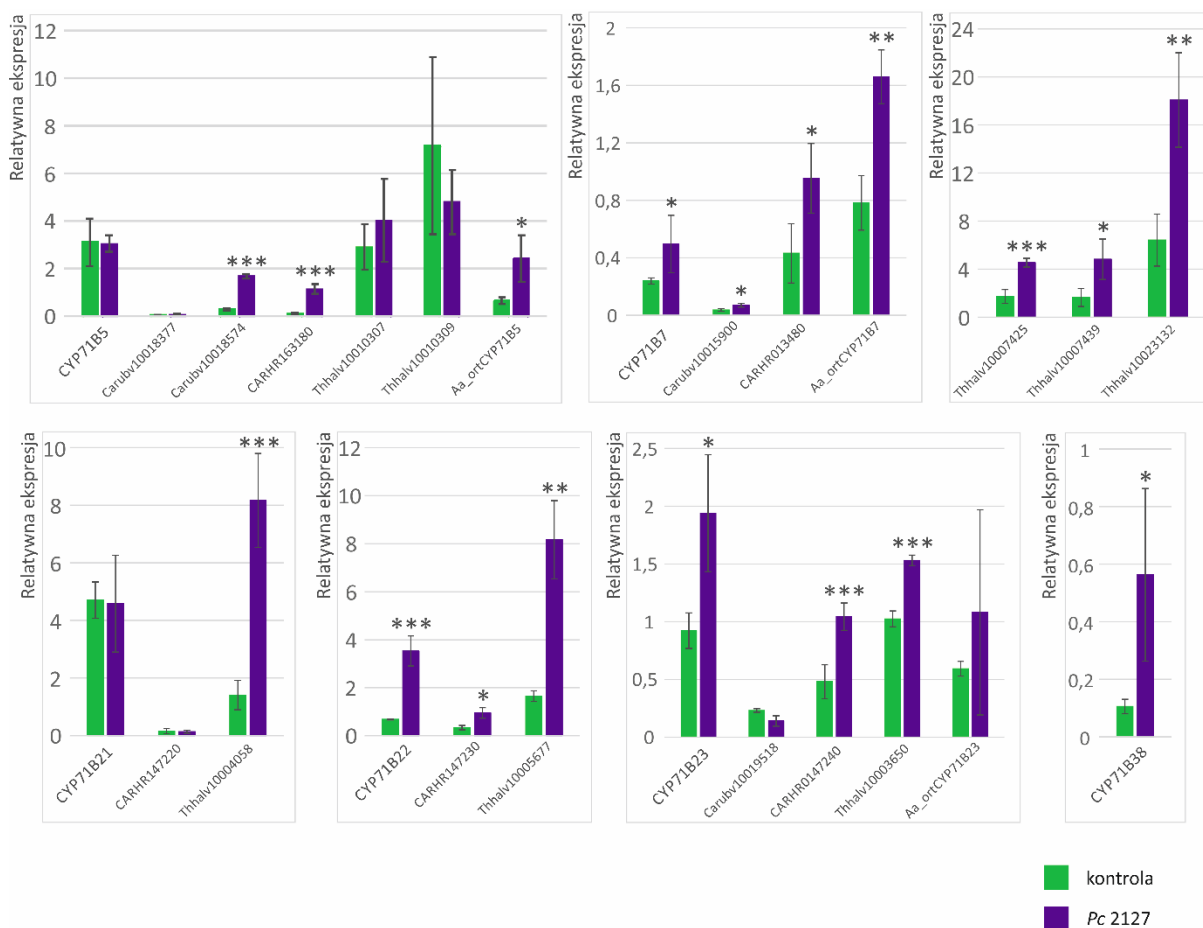
Ryc. 4.25. Relatywna ekspresja genu *CYP83B1* z *A. thaliana* i jego ortologów, zidentyfikowanych w pozostałych badanych gatunkach Brassicaceae (w kolejności: *C. rubella*, *C. hirsuta*, *T. salsuginea*, *A. alpina*). Analizę przeprowadzono dla prób liści roślin kontrolnych i inokulowanych *P. cucumerina* 2127 zebranych 24 h po inokulacji. Dane przedstawiają reprezentacyjne wyniki otrzymane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; wartość p (test t-Studenta): **<0,01, ***<0,001

W *C. hirsuta* obecne są pochodne kwasu indolilo-3-karboksylowego, jednak wykonane analizy filogenetyczne nie zidentyfikowały w tym gatunku ortologów genów *CYP71A12* i *CYP71A13*, które w *A. thaliana* kodują enzymy związane ze szlakiem biosyntezy tych pochodnych tryptofanu (Ryc. 4.23) [201]. Analizy ekspresji dalszych homologów *CYP71A12* i *CYP71A13* w *C. hirsuta*, wykazały, że żaden z wyznaczonych homologów *CYP71A12* i *CYP71A13* w tym gatunku nie ulegał zwiększonej ekspresji po inokulacji patogenem w takim stopniu, jak geny *CYP71A12* i *CYP71A13* w *A. thaliana* lub ich ortologi w *C. rubella* (Ryc. 4.23, 4.26). Ponadto, ekspresja badanych homologów w próbach kontrolnych *C. hirsuta* była w większości przypadków dużo wyższa niż *CYP71A12* i *CYP71A13* w *A. thaliana* i ich ortologów w *C. rubella* (Ryc. 4.26).



Ryc. 4.26. Relatywna ekspresja genów *CYP71A12* i *CYP71A13* *A. thaliana* i ich ortologów zidentyfikowanych w *C. rubella* oraz najbliższych homologów tych genów zidentyfikowanych w gatunku *C. hirsuta*, względem genu referencyjnego aktywy; analiza przeprowadzona dla liści roślin kontrolnych i inokulowanych *P. cucumerina* 2127; próby zbierane 24h po inokulacji; dane przedstawiają reprezentacyjne wyniki otrzymane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; wartość p (test t-Studenta): * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$

Analizy zmian w ekspresji genów wywołanych inokulacją patogenem wykonano również dla genów kodujących inne monooksygenazy P450 *A. thaliana* oraz ich potencjalnych ortologów wyznaczonych w pozostałych badanych gatunkach. Wśród tych genów były ortologi *CYP71B7*, *CYP71B23*, *CYP71B22*, *CYP71B21* i *CYP71B5* (Ryc. 4.23). Geny te oraz ich ortologi można podzielić na dwie grupy: geny, dla których ekspresja wszystkich (*CYP71B22*, *CYP71B7*) lub jedynie części (*CYP71B5*, *CYP71B23*) zidentyfikowanych ortologów była indukowana po inokulacji patogenem (Ryc. 4.27). Wśród genów kodujących monooksygenazy CYP zidentyfikowano unikalny dla *A. thaliana* *CYP71B38*, którego ekspresja była indukowana po inokulacji patogenem (Ryc. 4.23, 4.27).



Ryc. 4.27. Relatywna ekspresja wybranych homologów genów *CYP* związanych z metabolizmem tryptofanu w *A. thaliana* i ich ortologów, zidentyfikowanych w pozostałych badanych gatunkach Brassicaceae (Carubv- *C. rubella*, CARHR- *C. hirsuta*, Thhalv- *T. salsuginea*, Aa_ort- *A. alpina*), względem genu referencyjnego aktyny; analiza przeprowadzona dla liści roślin kontrolnych i inokulowanych *P. cucumerina* 2127; próby zbierane 24h po inokulacji; dane przedstawiają reprezentatywne wyniki otrzymane w jednym z trzech niezależnych eksperymentów; wartość p (test t-Studenta): * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001

Poza genami kodującymi monooksygenazy P450 sprawdzono również zmiany w ekspresji genów *PAL* i *4CL*, które katalizują pierwszą i ostatnią reakcję centralnego szlaku fenylopropanoidowego, związanego z biosyntezą wszystkich pochodnych fenylopropanoidowych. *A. thaliana* posiada po cztery izoformy enzymów kodowanych przez te geny. Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy filogenetyczne pokazały, że w pozostałych badanych gatunkach Brassicaceae, z wyjątkiem *T. salsuginea*, występują po trzy izoformy enzymu PAL, które są kodowane przez ortologi genów *PAL1*, *PAL2* i *PAL4*. *T. salsuginea* podobnie jak *A. thaliana* posiada cztery izoformy enzymu PAL, które są kodowane przez ortologi genów *PAL1* i *PAL2* oraz dwa ortologi genu *PAL4*. Z kolei gen *PAL3* w *A. thaliana* jest specyficzny dla tego gatunku. W przypadku genów kodujących enzymy 4CL w większości badanych gatunków wyznaczono potencjalne ortologi wszystkich izoform znanych z *A. thaliana*. Jedynym wyjątkiem był *T. salsuginea*, w którym nie

znaleziono ortologa genu *4CL2* (Ryc. 4.24). Wykonane analizy wykazały, że ekspresja genów *PAL* nie zmieniała się istotnie po inokulacji patogenem (Ryc. 4.24). Nieznaczny wzrost ekspresji obserwowano dla genów *CARHR131540.1*, *Aa_ortPAL2*, *PAL3_2* i *CARHR084820.1*, jednak zwiększenie ekspresji tych genów nie było istotne statystycznie. W przypadku genów *4CL*, tylko dwa z nich: *4CL2* i *Aa_ort4CL1* charakteryzowały się około dwukrotnie większą ekspresją po inokulacji badanych roślin patogenem. Dla ośmiu kolejnych genów, wśród których były: *CARHR097140.1*, *CARHR097130.1*, *CARRHR056540.1*, *Carubv10020070m*, *Thhalv10020406m*, *Thhalv10020403m*, *Aa_ort4CL2* i *Aa_ort4CL3* obserwowano nieznaczny wzrost ekspresji po inokulacji patogenem, jednak wartości tego wzrostu nie były istotne statystycznie w odniesieniu do wartości ekspresji roślin kontrolnych (Ryc. 4.24).

V. Dyskusja

Przedmiotem przedłożonej pracy doktorskiej była charakterystyka zmian, jakie zachodzą w szlakach metabolicznych związanych z odpowiedzią odpornościową gatunków modelowych z rodziny Brassicaceae. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów udało się zidentyfikować struktury 35 metabolitów, które w badanych gatunkach Brassicaceae charakteryzowały się zwiększoną akumulacją w odpowiedzi na inokulację *P. cucumerina* lub na rozpoznanie wzorca molekularnego związanego z patogenem. Zidentyfikowane metabolity należały w większości do związków indolowych i fenylopropanoidowych. Oprócz metabolitów należących do tych dwóch grup zidentyfikowano również pojedyncze związki należące do pochodnych kwasów benzoesowych i terpenoidów, a także aminokwasy i ich pochodne.

Identyfikację metabolitów prowadzono w oparciu o dane literaturowe, dostępne standardy i bazy danych przy użyciu metod UPLC-UV oraz UPLC-MS/MS. Pomimo użycia wysokorozdzielczych technik chromatograficznych z zastosowaniem detektorów fotodiodowego, fluorescencyjnego i wysokorozdzielczego spektrometru masowego, nie było możliwe rozwiązanie struktur wszystkich metabolitów, które ulegały w badanych gatunkach Brassicaceae zwiększonej akumulacji po inokulacji *P. cucumerina* lub w odpowiedzi na flg22. Biorąc pod uwagę, że jedna roślina może produkować nawet kilka tysięcy różnych metabolitów, przy zastosowaniu systemu chromatograficznego nawet o wysokiej rozdzielczości niemożliwe jest uniknięcie koelucji kilku lub nawet kilkunastu metabolitów. Tym samym niemożliwe jest uzyskanie miarodajnych widm UV, charakterystycznych dla pojedynczych związków i ich identyfikacja. Retencja kilku metabolitów w tym samym czasie uniemożliwia też wykonanie analizy ilościowej dla danego metabolitu na podstawie wielkości piku obserwowanego na chromatogramie otrzymanym w detektorze PDA. Trudności w rozwiązywaniu struktury metabolitów może powodować również zbyt niskie stężenie interesujących związków, które uniemożliwia otrzymanie dobrej jakości widm UV, jak również może ograniczać możliwości otrzymywania masowych widm fragmentacyjnych. Otrzymywanie widm fragmentacyjnych, które w wielu przypadkach są kluczowe dla wyznaczenia przypuszczalnych struktur związków, może być utrudnione także przez koelucję kilku metabolitów. Jeśli badany związek wymywa się z kolumny w tym samym czasie, co metabolit o znacznie większym stężeniu jest duże prawdopodobieństwo, że właśnie ten metabolit będzie ulegał fragmentacji w komorze kolizyjnej spektrometru masowego. Dla części metabolitów w niniejszej pracy nie udało się otrzymać także widm masowych, co może być spowodowane właściwościami tych związków, które uniemożliwiają lub znacznie utrudniają ich jonizację.

Wielu metabolitów nie udało się zidentyfikować ze względu na brak ich struktur i charakterystycznych jonów w bazach danych. Przykładowo w bazie KNApSACk (http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/top.html; dostęp: 18.09.2017) umieszczono dotąd struktury 626 metabolitów zidentyfikowanych w *A. thaliana*, a dla każdego z pozostałych badanych w niniejszej

pracy gatunków Brassicaceae liczba opublikowanych struktur metabolitów wynosi poniżej 10. Stanowi to jedynie niewielki ułamek szacowanej liczby związków chemicznych produkowanych przez te rośliny.

Jak wykazano w przeprowadzonych eksperymentach jedynie w przypadku około 24% związków obserwowano zwiększoną akumulację w przynajmniej dwóch z badanych gatunków. Pokazuje to ogromne zróżnicowanie produkowanych metabolitów, nawet wśród gatunków należących do tej samej rodziny i wskazuje na zachodzące procesy ewolucji odporności roślin związanej z akumulacją metabolitów. Śledzenie ewolucji metabolitów wtórnych umożliwia korelacja wyników uzyskanych na poziomie metabolomu, z wynikami na poziomie genomu i transkryptomu. Znajomość sekwencji ortologów genów związanych z biosyntezą określonej grupy metabolitów, zidentyfikowanych w wielu blisko spokrewnionych gatunkach oraz określenie zasięgu filogenetycznego występowania poszczególnych metabolitów może prowadzić do poznania mechanizmów ewolucji szlaków metabolicznych związanych z odpowiedzią odpornościową roślin na infekcje.

5.1. Metabolity indolowe w odpowiedzi na inokulację *P. cucumerina*

Pochodne indolowe stanowiły największą grupę zidentyfikowanych w niniejszej pracy metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją po inokulacji *P. cucumerina*. Identyfikacja tych związków była ułatwiona ze względu na dostępne standardy oraz liczne dane literaturowe obejmujące widma UV, czy widma masowe. W tej grupie metabolitów było też najwięcej związków, których biosynteza była indukowana w przynajmniej dwóch z badanych gatunków. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, metabolity indolowe są grupą związków rozpowszechnionych wśród roślin z rodziny Brassicaceae [64, 189].

W niniejszej pracy obserwowano zwiększoną ekspresję genów *CYP79B2* i *CYP79B3*, kodujących w *A. thaliana* enzymy katalizujące pierwszy krok biosyntezy wszystkich pochodnych Trp pełniących funkcję w odpowiedzi odpornościowej [138, 139]. Było to zgodne z danymi literaturowymi, według których indukcję ekspresji tych genów obserwowano w 5-tygodniowych liściach *A. thaliana* 24 h po inokulacji *P. cucumerina* [160]. W niniejszej pracy zidentyfikowano potencjalne ortologi *CYP79B2* i *CYP79B3* we wszystkich badanych gatunkach Brassicaceae. Podobnie jak w przypadku *CYP79B2* i *CYP79B3* z *A. thaliana*, geny te ulegały zwiększonej ekspresji po inokulacji patogenem, co wskazuje na zakonserwowanie ich funkcji w odpowiedzi odpornościowej wszystkich badanych gatunków.

5.1.1. Glukozynolany indolowe i produkty ich metabolizmu

4MI3G (nr 44) był w niniejszej pracy jedynym, spośród obecnych konstytutywnie w *A. thaliana* glukozynolanów indolowych, który ulegał zwiększonej akumulacji w odpowiedzi na infekcję. Zwiększenie biosyntezy tego związku obserwowano również w liściach *C. hirsuta*, *T. salsuginea* i *A. alpina*. *C. rubella* był jedynym wśród badanych gatunków, dla którego nie obserwowano zwiększonej biosyntezy 4MI3G, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami stwierdzającymi brak akumulacji glukozynolanów indolowych w tym gatunku [189]. W *C. hirsuta*, *T. salsuginea* i *A. alpina* wyznaczono potencjalne ortologi genów *CYP83B1* i *CYP81F2*, które wcześniej zostały zidentyfikowane w *A. thaliana* jako geny kodujące enzymy związane z biosyntezą 4MI3G [43, 137]. Zwiększona akumulacja 4MI3G korelowała ze wzrostem ekspresji tych genów oraz ich potencjalnych ortologów. Liście *T. salsuginea* charakteryzowały się niższą w porównaniu do innych indukcją ekspresji *CYP83B1* i *CYP81F2*, co może być przyczyną stosunkowo niskiej indukcji akumulacji 4MI3G w tym gatunku. Brak akumulacji 4MI3G w *C. rubella* korelował z kolei z brakiem potencjalnego ortologa genu *CYP81F2*. Mimo, że *C. rubella* nie produkuje glukozynolanów indolowych, w gatunku tym zidentyfikowano ortolog genu kodujący monooksygenazę *CYP83B1* – *Carubv10007516* (Ryc. 4.23). Analizy real-time PCR wykazały znikomą ekspresję tego genu zarówno w liściach roślin kontrolnych, jak i inokulowanych, co wydaje się koordynować z nieobecnością glukozynolanów indolowych w *C. rubella*. Należy jednak zaznaczyć, że znikoma ekspresja *CYP83B1* nie może być jedyną podstawą molekularną braku glukozynolanów indolowych. Można to wywnioskować z fenotypu mutantu *A. thaliana rnt1-1*, który pomimo defektu w genie *CYP83B1* wciąż akumulował te metabolity [242]. Fenotyp ten tłumaczy się przejściem funkcji *CYP83B1* przez monooksygenazę *CYP83A1*, która jest zdolna katalizować, chociaż z obniżoną wydajnością, odpowiednią reakcję [242].

Szereg mikroorganizmów patogennych, włącznie z zaadaptowanymi i niezaadaptowanymi szczepami *P. cucumerina* indukuje zwiększoną akumulację 4MI3G w *A. thaliana* [177, 180]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy, podobnie jak dane literaturowe wskazują, że akumulacja tego glukozynolanu nie jest zależna od użytego szczepu *P. cucumerina*. Wykonane wcześniej eksperymenty wskazują, że inokulacja patogenami *B. cinerea* i *B. graminis*, oprócz *A. thaliana*, powoduje zwiększoną produkcję 4MI3G również w innych gatunkach Brassicaceae [189]. Wyjątkiem był badany również w niniejszej pracy *T. salsuginea*, w którym inokulacja *B. graminis* po 16h nie powodowała zwiększonej akumulacji 4MI3G [189]. Co ciekawe gatunek ten charakteryzował się również najmniejszą zmianą w akumulacji tego glukozynolanu w odpowiedzi na *P. cucumerina*. Można więc przypuszczać, że generalnie w *T. salsuginea* wpływ infekcji na indukcję biosyntezy 4MI3G jest najślabszy wśród badanych gatunków. *C. hirsuta* był jedynym badanym gatunkiem, w którym nie obserwowano zwiększonej akumulacji 4MI3G 48 h po inokulacji, z kolei po 72 h

biosynteza tego związku była wyraźnie podwyższona w porównaniu do roślin kontrolnych. Dane literaturowe podają, że zwiększona akumulacja tego związku była obserwowana w *C. hirsuta* 16 h po inokulacji *B. graminis* i 40 h po inokulacji *B. cinerea* [189]. Należy zaznaczyć, że poziom akumulacji metabolitów zależy nie tylko od szybkości ich biosyntezy, ale również od tempa ich dalszych przemian. Stąd brak indukcji akumulacji 4MI3G w *C. hirsuta* 48 h po inokulacji może wynikać nie z braku zwiększonej biosyntezy, ale z jednoczesnego nasilonego metabolizmu tego glukozyolanu.

Podczas przeprowadzonych w niniejszej pracy eksperymentów w trzech z badanych gatunków (*A. thaliana*, *T. salsuginea* i *A. alpina*) obserwowano zwiększoną biosyntezę RA (nr 2) po inokulacji. *C. hirsuta* był jedynym gatunkiem wśród badanych, w którym obserwowano RA, ale jego biosynteza nie była indukowana. RA jest jednym z produktów szlaku metabolizmu glukozyolanów indolowych zależnego od myrozynazy PEN2. Jednak obecność RA w podwójnym mutancie *A. thaliana cyp79b2 cyp79b3* sugeruje, że metabolit ten może być również produktem metabolizmu innych związków, np. glukozyolanów alifatycznych. Przeprowadzone dotąd badania wskazywały, że w *A. thaliana* na skutek inokulacji zaadaptowanymi i niezaadaptowanymi szczepami *P. cucumerina* dochodzi do indukcji akumulacji tego metabolitu [180]. W przeciwieństwie do uzyskanych wyników, dane literaturowe wskazują, że akumulacja RA była indukowana także w *C. hirsuta* po inokulacji *B. graminis* i *B. cinerea*. Z kolei w *T. salsuginea* patogeny te nie powodowały zmian w biosyntezie RA [189]. Zróżnicowanie pomiędzy danymi literaturowymi a uzyskanymi w niniejszej pracy wynikami w akumulacji RA w *C. hirsuta* i *T. salsuginea* może być, tak jak w przypadku 4MI3G związane z różnicami w szybkości biosyntezy i dalszego metabolizmu tego związku.

W doświadczeniach przeprowadzonych w niniejszej pracy najwyższą wśród wszystkich badanych gatunków indukcję akumulacji 4MI3G i RA po inokulacji obserwowano w gatunku *A. alpina*. Z akumulacją tych metabolitów korelowała największa wśród badanych gatunków indukcja ekspresji zidentyfikowanych ortologów genów kodujących enzymy CYP79B2 i CYP79B3. Jednocześnie gatunek ten charakteryzował się najmniejszą liczbą metabolitów, których biosynteza zwiększała się po inokulacji patogenem. Podobne wyniki uzyskano w opublikowanych wcześniej badaniach, w których liście *A. alpina* infekowane były przez *B. graminis* i *B. cinerea* [189]. Budowa morfologiczna tego gatunku, różniąca się znacznie od pozostałych badanych roślin, może wskazywać na silniejsze konstytutywne bariery ochronne, które mogą wydajniej powstrzymać infekcję wielu mikroorganizmów patogennych. Dodatkowo duże zmiany w akumulacji 4MI3G i RA sugerują, że mechanizm przedinwazyjnej odpowiedzi odpornościowej związany ze szlakiem PEN2 w *A. alpina* jest bardziej efektywny w porównaniu do pozostałych badanych gatunków Brassicaceae. Można więc przypuszczać, że silne fizyczne bariery konstytutywne w połączeniu z efektywnym szlakiem PEN2 powstrzymują w *A. alpina* infekcję na jej bardzo wczesnych etapach i dlatego w tym gatunku nie dochodzi do indukcji akumulacji metabolitów, które mogą pełnić funkcje w odpowiedzi poinwazyjnej. Odwrotną korelację pomiędzy efektywnością odpowiedzi przedinwazyjnej a zwiększoną akumulacją metabolitów związanych z odpornością poinwazyjną potwierdzają badania mutantu *pen2*, którego

fenotyp wskazuje na wyższą akumulację kamaleksyny i 6-GlcO-ICOOH po infekcji, w porównaniu do typu dzikiego *A. thaliana* [43, 161].

Wśród pochodnych glukozydów indolowych zidentyfikowano również glukozyd dihydroaskorbigenu (nr **41**) i glukozyd dihydroneoaskorbigenu (nr **43**), których akumulacja była indukowana po inokulacji patogenem liści *A. thaliana* i *A. alpina*. Askorbigen i jego pochodne, a wśród nich heksozyd dihydroaskorbigenu, były raportowane wcześniej w rzodkiewniku [201]. Co więcej, wymieniona pochodna glikozydowa dihydroaskorbigenu ulegała zwiększonej akumulacji w *A. thaliana* 24 h po traktowaniu roślin roztworem azotanu srebra (AgNO_3) [201]. W dwóch innych gatunkach należących do rodziny Brassicaceae - *Cardamine diphylla* i *T. salsuginea* zidentyfikowano odpowiednio glukozyd dihydroaskorbigenu [243] i glukozyd dihydroneoaskorbigenu [244]. Glukozyd dihydroaskorbigenu pochodzący z tkanek *C. diphylla* był drugim przypadkiem identyfikacji glikozylowanej pochodnej indolowej askorbigenu, jednak akumulacja tego związku nie była związana z żadnym stresem biotycznym bądź abiotycznym [243]. Z kolei akumulacja glukozydu dihydroneoaskorbigenu zidentyfikowanego wcześniej w gatunku *T. salsuginea* związana była z poddaniem roślin stresowi promieniowania UV [244]. W przeprowadzonych w niniejszej pracy eksperymentach nie obserwowano zwiększonej akumulacji tego związku w *T. salsuginea*. Być może indukcja biosyntezy glukozydu dihydroaskorbigenu w tym gatunku związana jest jedynie z jego odpowiedzią na stropy abiotyczne. Dane literaturowe wskazują, że z odpowiedzią na inokulację patogenem w tym gatunku związany jest neoaskorbigen, który ulegał zwiększonej akumulacji dwa dni po inokulacji liści *T. salsuginea* przez patogen *Leptosphaeria maculans* [244]. Co więcej, askorbigen i neoaskorbigen były zidentyfikowane w kontrolnych i inokulowanych patogenem *Plasmodiophora brassicae* korzeniach 1-tygodniowych siewek *Brassica napus* [245]. Zwiększoną akumulację tych związków obserwowano w korzeniach *B. napus* trzy tygodnie po inokulacji i sklasyfikowano je jako fitoantycypiny [245]. Obserwowano dla nich również łagodne działanie ograniczające wzrost *in vitro* dwóch patogenów grzybowych *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum*.

5.1.2. Fitoaleksyny

W wykonanych w niniejszej pracy eksperymentach zidentyfikowano kilka z ponad 40 znanych metabolitów należących do grupy fitoaleksyn indolowych, charakterystycznych dla gatunków z rodziny Brassicaceae. Wśród tych związków była kamaleksyna (nr **95**) i jej pochodne: 6-metoksykamaleksyna (nr **102**), dwa *O*-glukozydy hydroksykamaleksyny (nr **48** i **57**) i malonylowany *O*-glukozyd hydroksykamaleksyny (nr **67**), a także wazaleksyny A (nr **109**) i B (nr **108**). Indukcję akumulacji kamaleksyny obserwowano w liściach *A. thaliana* i *C. rubella* po inokulacji przez oba szczepy *P. cucumerina*. Biosynteza tej fitoaleksyny zależna jest od zidentyfikowanych w *A. thaliana* genów *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP71A12*, *CYP71A13* i *CYP71B15*.

Przeprowadzone analizy filogenetyczne wskazały na istnienie dwóch potencjalnych ortologów genu *CYP71B15* oraz czterech potencjalnych ortologów genów *CYP71A12*, *CYP71A13* w *C. rubella*. Akumulacja kamaleksyny korelowała ze zwiększoną ekspresją wszystkich genów związanych z biosyntezą tego metabolitu w *A. thaliana*. W przypadku ortologów genu *CYP71B15* tylko jeden z nich – *Carubv10017053* ulegał zwiększonej ekspresji po inokulacji. Z kolei wśród potencjalnych ortologów *CYP71A12*, *CYP71A13* wszystkie charakteryzowały się znacznie wyższą ekspresją po inokulacji *P. cucumerina* w porównaniu do roślin kontrolnych. Występowanie dwóch potencjalnych ortologów *CYP71B15*, *CYP71A12* i *CYP71A13* w *C. rubella* jest prawdopodobnie wynikiem duplikacji tych genów. Brak zwiększonej ekspresji jednego z ortologów *CYP71B15* wskazuje, że gen ten stał się pseudogenem lub uległ neofunkcjonalizacji. Z kolei, zwiększona ekspresja wszystkich ortologów *CYP71A12* i *CYP71A13* świadczy o potencjalnej funkcji tych genów w odpowiedzi odpornościowej *C. rubella*. Możliwe, że po duplikacji powstałe geny nabyły inne funkcje, niż znana z *A. thaliana* rola w szlaku biosyntezy kamaleksyny i kwasu indolilo-3-karboksyłowego lub też powstałe zduplikowane geny mają tę samą funkcję.

Dane literaturowe podają, że biosynteza kamaleksyny w *A. thaliana* może być indukowana w niewielkim stopniu już 16 h po inokulacji liści rzodkiewnika sporami *B. graminis* [43, 189]. Zwiększona biosynteza kamaleksyny była obserwowana również 24 h po inokulacji tego gatunku przez zaadaptowane i niezaadaptowane szczepy *P. cucumerina* [180]. Akumulacja kamaleksyny 24 h po inokulacji *P. cucumerina* korelowała ze zwiększoną ekspresją genów *CYP71B15* i *CYP71A13*, obserwowaną w 5-tygodniowych liściach *A. thaliana* [161]. Zwiększoną ekspresję *CYP71B15*, *CYP71A12* i *CYP71A13* obserwowano również po infekcji 4 – 5 tygodniowych liści przez *P. syringae* [197]. W niniejszej pracy w *A. thaliana* oprócz znacznie zwiększonej ekspresji genów *CYP71B15* i *CYP71A13*, obserwowano również indukcję ekspresji *CYP71A12*. Wykonane eksperymenty wykazały, że poziom ekspresji *CYP71A12* po inokulacji jest zbliżony do *CYP71A13*, przeciwieństwie do danych literaturowych, które pokazywały niższy poziom ekspresji *CYP71A12* po infekcji *P. syringae*, w porównaniu do *CYP71A13* [197]. Sugeruje to, że poziom ekspresji *CYP71A12* jest zależny od rodzaju użytego patogenu i w przypadku patogenów grzybowych jest wyższy niż przy użyciu patogenu bakteryjnego.

W niniejszej pracy oprócz kamaleksyny obserwowano także 6-metoksykamaleksynę, dla której powierzchnia piku w *C. rubella* po inokulacji była wyższa w porównaniu do kamaleksyny. Podobnie, dane literaturowe podają, że akumulacja tego metabolitu była wyższa w porównaniu do kamaleksyny 16 h po inokulacji *C. rubella* sporami *B. graminis* [189]. Jednak 40 h po inokulacji tego gatunku sporami *B. cinerea* poziom akumulacji kamaleksyny i 6-metoksykamaleksyny był zbliżony. Sugeruje to, że w *C. rubella* to właśnie 6-metoksykamaleksyna jest kluczową fitoaleksyną. Inne pochodne kamaleksyny: dwa *O*-glukozydy hydroksykamaleksyny i malonylowany glukozyd hydroksykamaleksyny były w niniejszej pracy zidentyfikowane w liściach *A. thaliana* i *C. rubella* po inokulacji *P. cucumerina*. Związki te były zidentyfikowane wcześniej jedynie w liściach

rzodkiewnika traktowanych azotanem srebra (AgNO_3) [200]. Występowanie zmodyfikowanych form kamaleksyny może wpisywać się w teorię strategii obronnej roślin polegającej na produkowaniu zróżnicowanych strukturalnie metabolitów antybiotycznych. Formy glikozylowane pochodnych kamaleksyny, analogicznie do glukozynolanów, czy innych glikozylowanych metabolitów, mogą być nieaktywne biologicznie i stanowią zabezpieczenie rośliny przed zbyt dużym stężeniem związków potencjalnie toksycznych dla komórki roślinnej. Z drugiej strony formy glikozylowane mogą być produkowane w reakcji detoksyfikacji kamaleksyny przez patogen, co obserwowano wcześniej w eksperymentach z użyciem kultur patogenu grzybowego *Sclerotinia sclerotiorum*, hodowanego z dodatkiem kamaleksyny, w którym wykazano, że związek ten został całkowicie zmetabolizowany do kilku pochodnych [246]. We wcześniejszych badaniach w gatunku modelowym *A. thaliana* zidentyfikowano również inną fitoaleksynę indolową – rapaleksynę A [203], której nie obserwowano w niniejszej pracy, prawdopodobnie ze względu na zbyt niskie stężenie tego związku. Nie można też wykluczyć możliwości, że związek ten produkowany jest tylko w odpowiedzi na niektóre patogeny.

Na podstawie przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy analiz zidentyfikowano również kilka pochodnych kwasu indolilo-3-karboksylowego: 6-GlcO-ICOOH (nr 7), 6-HO-ICOOGlc (nr 13), 6-GlcO-ICOOGlc (nr 3) i ICOOGlc (nr 45). Metabolity te charakteryzowały się zwiększoną akumulacją w inokulowanych liściach *A. thaliana*, *C. rubella* i *C. hirsuta*. Część z tych związków zidentyfikowano wcześniej w tych trzech gatunkach [189]. W *A. thaliana* opisano ponadto częściowo szlak biosyntezy kwasu indolilo-3-karboksylowego (ICOOH) [201]. Stąd wiadomo, że biosyntetycznie ICOOH jest powiązany z kamaleksyną. Jednak biorąc pod uwagę, że pochodne ICOOH są akumulowane w gatunkach produkujących kamaleksynę oraz w przynajmniej jednym dodatkowym gatunku (*C. hirsuta*), można domniemać, że szlak biosyntezy ICOOH jest ewolucyjnie starszy od szlaku biosyntezy kamaleksyny. Wśród enzymów katalizujących reakcje biosyntezy tego związku oprócz CYP79B2 i CYP79B3 występują CYP71A12, CYP71A13 i CYP71B6. Jak wspomniano powyżej w niniejszej pracy zidentyfikowano po dwa potencjalne ortologi genów *CYP71A12* i *CYP71A13* w *C. rubella*, jednak w *C. hirsuta*, który podobnie jak *A. thaliana* i *C. rubella* produkował pochodne ICOOH, nie stwierdzono obecności ortologów tych genów. Ponadto, żaden z badanych bliskich homologów *CYP71A12* i *CYP71A13* w *C. hirsuta* nie ulegał zwiększonej ekspresji po inokulacji. Korelacja danych metabolomicznych i transkryptomicznych w tym przypadku wskazała, że w *C. hirsuta* może istnieć alternatywny szlak biosyntezy ICOOH.

W *C. rubella* zidentyfikowano dwa potencjalne ortologi genu *CYP71B6*, których ekspresja była silnie indukowana po inokulacji i korelowała ze zwiększeniem akumulacji pochodnych ICOOH w tym gatunku. Występowanie w *C. rubella* dwóch ortologów *CYP71B6*, podobnie jak *CYP71A12* i *CYP71A13*, może być spowodowane duplikacją, która doprowadziła do powstania dwóch funkcjonalnych genów. W przypadku *CYP71B6* w *A. thaliana* zmiany w ekspresji po inokulacji patogenem nie były tak wyraźne. Może to świadczyć o obecności innego genu, kodującego odmienny enzym pełniący funkcje w biosyntezie ICOOH. Sugerują to również doświadczenia z użyciem

mutanta *cyp71b6*, w którym nie stwierdzono całkowitego braku tego metabolitu [201]. Tezę tę może dodatkowo potwierdzać fakt, że ekspresja potencjalnego ortologa *CYP71B6* zidentyfikowanego w *C. hirsuta* nie zmieniała się po inokulacji, mimo, że w tym gatunku obserwowano indukcję akumulacji pochodnych ICOOH. Z drugiej strony, w gatunku *A. alpina*, który nie produkował tych związków obserwowano indukcję ekspresji zidentyfikowanego ortologa *CYP71B6*. Wskazuje to na istnienie alternatywnego szlaku metabolicznego, pełniącego funkcję w odpowiedzi *A. alpina* na inokulację patogenem, w który zaangażowany jest enzym CYP71B6.

W dotychczasowych badaniach wykazano, że infekcja *A. thaliana* przez mikroorganizmy patogeniczne powoduje indukcję akumulacji różnych pochodnych tego metabolitu [215, 218]. Zaadaptowane i niezaadaptowane szczepy *P. cucumerina* powodowały zwiększenie akumulacji 6-GlcO-ICOOH w *A. thaliana* [180]. Ponadto, związek ten oraz ICOOGlc były indukowane nie tylko w *A. thaliana*, ale również w *C. rubella* i *C. hirsuta* po infekcji liści sporami *B. cinerea* [189]. Dane literaturowe oraz wyniki otrzymane w niniejszej pracy pokazują, że akumulacja ICOOH i jego pochodnych może być wywołana zarówno przez różnorodne czynniki biotyczne, jak i abiotyczne. Związki te mogą pełnić funkcję w odporności badanych gatunków Brassicaceae, jednak ze względu na brak linii *A. thaliana* z defektem w biosyntezie tych metabolitów, określenie jednoznacznego ich wpływu na odporność było jak dotąd niemożliwe. Co ciekawe dane literaturowe wskazują, że w *A. thaliana* ICOOH jest też metabolitem wchodzącym w skład ściany komórkowej, a przeprowadzone badania wykazały, że akumulacja ICOOH związanego ze ścianą komórkową zwiększała się pod wpływem inokulacji liści tego gatunku szczepami bakterii *P. syringae* [215]. Jednak w celu uzyskania ekstraktów metabolitów związanych ze ścianą komórkową niezbędne jest przeprowadzenie ekstrakcji z użyciem enzymów rozkładających elementy ściany komórkowej lub hydrolizy zasadowej. Analiz takich nie wykonano w niniejszej pracy, dlatego też nie wiadomo czy ICOOH może też występować w postaci związanej ze ścianą komórkową w innych gatunkach Brassicaceae.

W liściach *C. hirsuta* inokulowanych *P. cucumerina* obserwowano również indukcję akumulacji indolilo-3-karbaldehydu (nr 8). Metabolit ten został już wcześniej zidentyfikowany w liściach *A. thaliana* traktowanych $AgNO_3$ i wykazano, że jest on produktem pośrednim w szlaku biosyntezy kwasów indolilo-3-karoksylowych [201]. Zidentyfikowano go również w korzeniach *Brassica napus* (kapusta rzepek) infekowanych *P. brassicae* [245]. W niniejszych badaniach *C. hirsuta* był jedynym spośród wszystkich gatunków produkujących pochodne kwasu indolilo-3-karboksyłowego, w którym obserwowano również zwiększoną akumulację indolilo-3-karbaldehydu.

Ze szlakiem biosyntezy kamaleksyny i kwasu indolilo-3-karboksyłowego łączy się również biosynteza indolilo-3-karbonylonitryli [202]. Jednym ze związków należących do tej grupy jest 4-hydroksyindolilo-3-karbonylonitryl (4-OH-ICN), którego szlak biosyntezy zidentyfikowano w *A. thaliana* [202]. Jednak ze względu na to, że metabolit ten jest nietrwały, w ekstraktach badanych siewek *A. thaliana* infekowanych *P. syringae* zidentyfikowano jedynie produkty jego katabolizmu

[202]. W analizach wykonanych w ramach niniejszej pracy nie zidentyfikowano żadnego tych produktów ani w ekstraktach z liści infekowanych *P. cucumerina*, ani z siewek traktowanych flg22. Sugeruje to, że biosynteza 4-OH-ICN może być indukowana przez specyficzne czynniki biotyczne i dodatkowo może zachodzić tylko w niektórych organach.

Wśród zidentyfikowanych w niniejszej pracy fitoaleksyn indolowych były również wazaleksyny A i B (nr 109 i 108), których zwiększoną biosyntezę obserwowano w liściach *T. salsuginea* inokulowanych *P. cucumerina*. Piki reprezentujące te dwie fitoaleksyny na chromatogramach uzyskanych w analizach chromatograficznych z detektorem PDA były jednocześnie największe pod względem powierzchni wśród wszystkich metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją w *T. salsuginea* po inokulacji patogenem. We wcześniejszych badaniach w tym gatunku obserwowano również kilka innych fitoaleksyn indolowych: biswazaleksyny A1 i A2, metoksybrasseninę B i rapaleksynę A [203], które jednak nie zostały zidentyfikowane w eksperymentach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy. Być może stężenie tych związków było poniżej poziomu detekcji użytej aparatury. Szlak biosyntezy wazaleksyn w *T. salsuginea* pozostaje dotąd nieznanym. Dane literaturowe wskazują, że z tym szlakiem mogą być związane geny, których ortologi są obecne również w innych gatunkach z rodziny Brassicaceae, ale nie w *A. thaliana* [203]. Dlatego badanie tylko jednego modelu – *A. thaliana* nie jest wystarczające dla uzyskania informacji prowadzących do poznania mechanizmów odpornościowych roślin z rodziny Brassicaceae.

C. hirsuta i *A. alpina* były w niniejszej pracy gatunkami, dla których nie zidentyfikowano żadnych fitoaleksyn indolowych. Trudności w identyfikacji fitoaleksyn charakterystycznych dla roślin z rodziny Brassicaceae są spowodowane obecnością w ich strukturze atomu siarki. Siarka, jako silny nukleofil może atakować centra elektrofilowe innych cząsteczek, np. karbonyli, czy nitryli. Duże cząsteczki mogą zawierać kilka centrów elektrofilowych, co prowadzi do tworzenia się dużej liczby izomerów i w konsekwencji prowadzi do dużej różnorodności strukturalnej związków zawierających atomy siarki. Brak zidentyfikowanych fitoaleksyn w tych dwóch gatunkach może wynikać również z ograniczeń aparatury analitycznej, co zaobserwowano m. in. w przypadku kamaleksyny i 6-metoksykamaleksyny. Pomimo względnie dużego stężenia tych związków i obserwowanych dużych pików reprezentujących te związki na chromatogramie otrzymanym w detektorze PDA, ich jonizacja w detektorze masowym była bardzo słaba, a widma masowe tych związków były na granicy detekcji.

5.1.3. Inne związki indolowe

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów zidentyfikowano również dwa inne związki indolowe, których akumulacja była indukowana w liściach *C. hirsuta* po inokulacji *P. cucumerina*:

nitrofenylo-indolilo-3-on (nr **6**) i indolilo-3-acetaldehyd (nr **54**). Do tej pory nie odnotowano w literaturze obecności w roślinach związków indolowych posiadających w swojej strukturze pierścień nitrofenolowy, jednak należy zaznaczyć, że struktura nitrofenylo-indolilo-3-onu jest jedynie hipotetyczna i powinna być potwierdzona poprzez wykonanie widma NMR tego związku. Z kolei indolilo-3-acetaldehyd do tej pory był opisywany głównie w kontekście biosyntezy kwasu indolilo-3-octowego, który należy do auksyn, hormonów roślinnych pełniących funkcje regulujące w embriogenezie, wzroście roślin, rozwoju kwiatu, czy powstawaniu owoców [247]. Nie ma jak dotąd w literaturze doniesień o potencjalnej roli tego związku w odpowiedzi odpornościowej roślin przeciwko mikroorganizmom patogennym. Być może zwiększona akumulacja tych związków związana jest z tym, że stanowią one produkty pośrednie w biosyntezie metabolitów o działaniu antybiotycznym.

5.2. Metabolity szlaku fenylopropanoidowego w odpowiedzi na inokulację *P. cucumerina*

Szlak fenylopropanoidowy jest szeroko rozpowszechniony w całym królestwie roślin, jednak poszczególne metabolity mogą być charakterystyczne dla mniejszych grup filogenetycznych. Przeprowadzone dotąd badania wskazują, że wiele tych związków pełni funkcję fitoaleksyn w licznych gatunkach roślin należących do rodzin dyniowatych, motylkowatych, sosnowatych, czy wiechlinowatych i winoroślowatych [63, 69, 72]. Jednak dotąd niewiele było doniesień o roli metabolitów fenylopropanoidowych w odpowiedzi odpornościowej gatunków z rodziny Brassicaceae.

W niniejszej pracy zidentyfikowano kilkanaście metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją po inokulacji *P. cucumerina*, należących do klasy kwasów hydroksycynamonowych i ich pochodnych, stanowiących dużą grupę związków fenylopropanoidowych. Związki te występują w przyrodzie w postaci wolnej lub związanej ze ścianą komórkową. Ze względu na zastosowaną w niniejszych badaniach metodę ekstrakcji, w otrzymanych ekstraktach występowały jedynie metabolity cytoplazmatyczne. Wśród zidentyfikowanych metabolitów były pochodne glukozowe kwasu synapinowego (nr **32** i **70**) występujące w liściach *A. thaliana* i *C. hirsuta* inokulowanych *P. cucumerina*. W pozostałych badanych gatunkach nie obserwowano zwiększonej akumulacji tych związków. Pochodne kwasu synapinowego zidentyfikowano wcześniej w gatunku *Brassica oleracea* (brokuł) oraz w innych liściastych gatunkach krzyżowych [248], łącznie z gatunkiem modelowym *A. thaliana*. Wykazano, że estry kwasu synapinowego pełnią w rzodkiewniku funkcje ochronne przed promieniowaniem UV [249] oraz pośrednio wpływają na odporność przeciwko *B. cinerea* [225]. O przypuszczalnej roli kwasu synapinowego w odporności roślin pisano wcześniej także w odniesieniu do odmian *Brassica rapa* odpornych i wrażliwych na zakażenia bakteriami *Xanthomonas campestris* [250].

W niniejszej pracy oprócz pochodnych kwasu synapinowego zidentyfikowano również pochodne kwasu hydroksyferulowego (nr **16**), ferulowego (nr **42**), kumarowego (nr **24** i **34**) i kawowego (nr **27**), których biosynteza była zwiększona po inokulacji roślin *P. cucumerina*. Związki te obserwowano we wszystkich badanych roślinach, jednak występowanie poszczególnych metabolitów było ograniczone do jednego lub dwóch gatunków. Część ze zidentyfikowanych metabolitów w tej grupie stanowiły pochodne glukozydowe – glukozydy lub estry glukozydowe., np. w liściach *C. hirsuta* i *A. alpina* inokulowanych *P. cucumerina* występował glukozyd kwasu 5-hydroksyferulowego (nr **16**). Literatura szeroko opisuje pochodne kwasów hydroksycynamonowych jako związki pełniące funkcje w odpowiedzi roślin zarówno na stesy biotyczne, jak i abiotyczne. Akumulacja tych związków może być indukowana w roślinach w odpowiedzi na wiele mikroorganizmów patogennych, mogą one także pełnić funkcje w reakcji nadwrażliwości generowanej przez infekcje patogenami [251]. Zwiększoną biosyntezę pochodnych kwasu ferulowego, czy 5-hydroksyferulowego, spowodowaną infekcją *Fusarium oxysporum* wykazano wcześniej m. in. w badaniach *B. rapa* [252]. Z kolei kontakt tego gatunku z patogennymi bakteriami powodował indukcję akumulacji jabłczanu kwasu kawowego [253]. Pomimo niezbyt dużej ilości badań dotyczących związków fenylopropanoidowych w gatunkach z rodziny Brassicaceae, wiele metabolitów należących do grupy pochodnych kwasów hydroksycynamonowych zidentyfikowano m. in. w liściach różnych odmian jęczmienia [238], co było pomocne w rozwiązywaniu struktur metabolitów w niniejszej pracy.

Jednym ze zidentyfikowanych w niniejszej pracy związków był kwas neochlorogenowy (nr **27**), którego biosynteza była indukowana w liściach *T. salsuginea* po inokulacji *P. cucumerina*. Metabolit ten jest izomerem kwasu chlorogenowego, należącego do grupy pochodnych kwasowych kwasów hydroksycynamonowych. Kwasy chlorogenowy i neochlorogenowy są estrami kwasu kawowego i chinowego. W literaturze nie ma doniesień dotyczących potencjalnej funkcji tego związku w odpowiedzi odpornościowej roślin. Do tej pory był on badany jedynie w kontekście potencjalnych właściwości antyoksydacyjnych w eksperymentach dotyczących żywności prozdrowotnej lub nutrifarmaceutyków [254, 255]. Inokulacja *P. cucumerina* powodowała zwiększenie biosyntezy również innej pochodnej kwasowej kwasów hydroksycynamonowych – kwasu *p*-kumaroiloglukuronowego (nr **24**), który zidentyfikowano w liściach *C. rubella* i *A. alpina*. Pochodne kwasu glukuronowego nie były wcześniej raportowane w kontekście ich potencjalnej funkcji w odpowiedzi odpornościowej. Literatura podaje jedynie, że kwas urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowy może być prekursorem pektyn, pełniących funkcje wzmacniające ściany komórkowej w przypadku wykrycia mikroorganizmu patogennego w *A. thaliana* [256], a wolny kwas glukuronowy może aktywować odporność systemiczną [257].

W niniejszej pracy zidentyfikowano również kilka amidów kwasów hydroksycynamonowych, będących pochodnymi poliamin, wśród których były *N*-feruloilospermidyna (nr **11**) i *N,N'*-diferuloilospermidyna (nr **56**) oraz *p*-kumaroilogmatyna (nr **34**), charakteryzujące się

zwiększoną akumulacją w liściach *C. rubella* po inokulacji *P. cucumerina*. Akumulacja *p*-kumaroiloagmatyny była indukowana również w liściach *C. hirsuta* i *A. thaliana* inokulowanych *P. cucumerina*. Grupa amidowych pochodnych kwasów hydroksycynamonowych jest szeroko opisywaną ze względu na funkcje w odpowiedzi odpornościowej roślin. Według danych literaturowych są one metabolitami o działaniu antybiotycznym, produkowane w odpowiedzi na infekcje mikroorganizmami patogennymi [258]. Wykazano, że akumulacja tych związków jest indukowana w liściach jęczmienia infekowanych *Blumeria graminis* [259], czy w liściach ziemniaka (*Solanum tuberosum*) infekowanych *Phytophthora infestans* [260]. Istotną funkcję amidów kwasów hydroksycynamonowych w odporności wykazano również w badaniach transgenicznego pomidora z nadekspresją enzymu kluczowego w biosyntezie tych związków, który wykazywał zwiększoną odporność na zakażenie bakteriami *P. syringae* [261]. Jak dotąd opublikowano tylko jedno doniesienie o potencjalnej funkcji amidów kwasów hydroksycynamonowych w odpowiedzi odpornościowej *A. thaliana* [216]. Wykonane eksperymenty z jednej strony pokazywały zwiększoną akumulację tych związków po inokulacji liści *A. brassicicola*, z drugiej, wskazywały na większą wrażliwość mutantu z defektem w biosyntezie amidów kwasów hydroksycynamonowych na infekcję [216]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pokazały, że metabolity te mogą brać udział nie tylko w odpowiedzi odpornościowej *A. thaliana*, ale również innych gatunków z rodziny Brassicaceae.

Na podstawie przeprowadzonych analiz zidentyfikowano także glikozyd 7-hydroksylaryciresinolu (nr **31**), ulegający zwiększonej biosyntezie w liściach *A. thaliana* inokulowanych *P. cucumerina*. Związek ten należy do jednej z grup pochodnych kwasów hydroksycynamonowych – lignanów. Pochodne glikozydowe hydroksylaryciresinolu zostały wcześniej zidentyfikowane w ekstraktach korzeni gatunku *Carex distachya* należącego do rodzaju turzyc [262]. Niewiele jest jednak doniesień dotyczących roli tych związków w odpowiedzi odpornościowej roślin przeciwko mikroorganizmom patogennym. Metabolity te są pochodnymi monolignoli, będących prekursorami lignin, stąd ich funkcja w odporności roślin może być związana ze wzmacnianiem ściany komórkowej.

Ostatnim zidentyfikowanym w niniejszej pracy metabolitem należącym do szlaku fenylopropanoidowego była feruloilocholina (nr **42**), która charakteryzowała się zwiększoną akumulacją w liściach *C. hirsuta* po inokulacji *P. cucumerina*. Estry związków fenolowych i choliny dotąd zidentyfikowane były jedynie w nasionach licznych gatunków należących do rodziny Brassicaceae i służyły jako narzędzie chemotaksonomiczne roślin krzyżowych [263]. Jednak do tej pory nie było doniesień o funkcji tych metabolitów w odpowiedzi odpornościowej roślin z rodziny Brassicaceae.

Wszystkie pochodne fenylopropanoidowe są produktami centralnego szlaku fenylopropanoidowego, którego pierwszą i ostatnią reakcją katalizują odpowiednio enzymy PAL i 4CL. W niniejszej pracy poprzez analizę filogenetyczną zidentyfikowano we wszystkich badanych gatunkach potencjalne ortologi genów kodujących enzymy PAL i 4CL, w *A. thaliana* (Ryc. 1.10).

Analiza transkryptomyczna genów *PAL* z *A. thaliana* i ich ortologów z pozostałych gatunków wykazała, że żaden z nich nie ulegał istotnym statystycznie zmianom w ekspresji po inokulacji *P. cucumerina*. Liczne badania wskazują, że ekspresja genów kodujących enzymy PAL może być zróżnicowana w poszczególnych tkankach roślinnych, a także może się zmieniać pod wpływem różnorodnych czynników środowiskowych. W przypadku odpowiedzi *A. thaliana* na obecność patogenu grzybowego *B. cinerea*, enzymy PAL nie pełnią istotnej funkcji, co udowodniono w badaniach podwójnych i poczwórnych mutantów *A. thaliana* (*pal1 pal2* i *pal1 pal2 pal3 pal4*) [264]. Jednak w przypadku wirulentnego szczepu bakterii *P. syringae*, mutanty te charakteryzowały się większymi objawami chorobowymi i wzrostem bakterii w porównaniu do typu dzikiego [264]. Ponadto, wykazano, że infekcja *P. syringae* powoduje zwiększenie w *A. thaliana* ekspresji *PAL1*, ale nie pozostałych genów *PAL*. W interakcji *A. thaliana* z łęgniowcem *Peronospora parasitica* obserwowano również aktywację promotora genu *PAL1* [265]. Różnice pomiędzy danymi literaturowymi, a otrzymanymi w trakcie realizacji niniejszej pracy mogą być spowodowane specyficzną odpowiedzią *A. thaliana* na różne mikroorganizmy patogenne. W przypadku genów *4CL* oraz ich ortologów ekspresja po infekcji zwiększała się jedynie dla dwóch: *4CL1* w *A. alpina* i *4CL2* w *A. thaliana*. Dane literaturowe wskazują, że zarówno enzym *4CL1*, jak i *4CL2* w *A. thaliana* związane są z biosyntezą lignin [266]. Zwiększona ekspresja genu *4CL1* w *A. alpina* wskazuje, że gatunek ten może charakteryzować się silną odpowiedzią odpornościową związaną z biosyntezą lignin tworzących fizyczną barierę, zabezpieczającą przed mikroorganizmami patogennymi. Pomimo braku istotnych zmian w ekspresji większości badanych ortologów PAL oraz *4CL* w przeprowadzonych w niniejszej pracy analizach zidentyfikowano kilkanaście pochodnych hydroksycynamonowych charakteryzujących się wzrostem akumulacji po inokulacji *P. cucumerina*. Może to być spowodowane faktem, że konstytutywna ekspresja tych genów jest wystarczająca dla zwiększonej biosyntezy metabolitów szlaku fenylopropanoidowego, a regulacja aktywności tych enzymów może zachodzić na poziomie potranslacyjnym.

W niniejszej pracy obserwowano również indukcję akumulacji pochodnej fenyloalaniny (pochodna N-acetylo-fenyloalaniny; nr **58**). Fenyloalanina jest prekursorem wszystkich metabolitów szlaku fenylopropanoidowego, jak dotąd nie ma jednak doniesień literaturowych dotyczących N-acetylo-fenyloalaniny lub jej pochodnych i ich funkcji w odporności roślin na zakażenia powodowane przez mikroorganizmy patogenne.

5.3. Inne metabolity

Wśród zidentyfikowanych metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją spowodowaną inokulacją *P. cucumerina* było również kilka związków należących do innych klas niż indolowe, czy fenylopropanoidowe. Jednym z takich związków był ester glukozowy kwasu syryngowego (nr **12**), występujący w liściach *T. salsuginea*. Kwas syryngowy został dotąd

zidentyfikowany w wielu gatunkach roślin, m. in. *Conyza canadensis* (konyza kanadyjska), *Castanea crenata* (kasztan japoński), czy *Polygonum bistorta* (rdest węzownik). Związek ten dotąd był badany ze względu na właściwości prozdrowotne oraz działanie antibakteryjne, czy przeciwutleniające. Ester glukozowy kwasu syryngowego został zidentyfikowany w tkankach *Bryophyllum pinnatum* (żyworódka pierzasta), gatunku używanego jako fitoterapeutyku [267]. Nie wykazano jednak dotąd funkcji kwasu syryngowego, bądź jego pochodnych w odporności roślin przeciwko mikroorganizmom patogennym, jednak jego właściwości antibakteryjne wskazują, że może mieć również działanie antybiotyczne na mikroorganizmy patogenne roślin.

Podobnie, zidentyfikowany w liściach *C. hirsuta*, inokulowanych sporami *P. cucumerina*, megastigmatrienon (nr 93), należący do grupy terpenoidów, nie był wcześniej opisywany w kontekście odpowiedzi odpornościowej roślin na zakażenia mikroorganizmami patogennymi. Jedyne doniesienia literaturowe dotyczące tego metabolitu dotyczą jego właściwości zapachowych [268, 269]. Terpenoidy są grupą związków chemicznych, których funkcje biologiczne nie zostały dotąd dokładnie opisane. Ze względu na ogromne zróżnicowanie strukturalne tej grupy metabolitów wtórnych funkcje te mogą charakteryzować się dużą różnorodnością.

W liściach *C. rubella* inokulowanych *P. cucumerina* częściowo zidentyfikowano również pochodną glikozydu kwasu pantotenowego (nr 3). Kwas pantotenowy jest jednym ze składników mieszaniny związków opisywanych jako witamina B₅ i jest szeroko opisywany ze względu na właściwości prozdrowotne tej witaminy. Niewiele jest doniesień dotyczących funkcji kwasu pantotenowego lub jego pochodnych w odpowiedzi odpornościowej roślin. Dane literaturowe podają, że kwas pantotenowy może być istotny w odpowiedzi buraka cukrowego (podgatunek buraka zwyczajnego – *Beta vulgaris*) na zakażenia patogenem grzybowym *Cercospora beticola* [270].

5.4. Porównanie zmian w akumulacji metabolitów po inokulacji patogenem i rozpoznaniu MAMP

Rozpoznanie flg22 powodowało silną odpowiedź związaną ze zwiększoną akumulacją metabolitów w dwóch z badanych gatunków: *A. thaliana* i *C. rubella*. W trzech pozostałych gatunkach Brassicaceae: *C. hirsuta*, *T. salsuginea* i *A. alpina*, w przeciwieństwie do odpowiedzi na inokulację *P. cucumerina*, nie zaobserwowano odpowiedzi na rozpoznanie flg22 na poziomie zmian w akumulacji metabolitów. Jedynym wyjątkiem był wzrost akumulacji 4MI3G w *T. salsuginea*. Wysokoprzepustowe analizy transkryptomyczne wykonane w Instytucie Maxa Plancka w Kolonii wskazywały, że w *A. alpina* nie następuje zmiana ekspresji żadnych genów w odpowiedzi na flg22. Sugeruje to, że ten gatunek nie rozpoznaje flg22 jako wzorca molekularnego związanego z patogenem (wyniki nieopublikowane). W przypadku *C. hirsuta* i *T. salsuginea* zmiany w ekspresji genów obserwowane były tylko godzinę po traktowaniu siewek flg22, w przeciwieństwie do *A. thaliana* i *C. rubella*, w których zmiany w ekspresji genów utrzymywały się również po 9 i 24 godzinach.

Sugeruje to, że jedynie krótkotrwałe zmiany w ekspresji genów w siewkach *C. hirsuta* i *T. salsuginea* mogą być niewystarczające dla uzyskania w procesie translacji odpowiedniej ilości enzymów i w konsekwencji do wystąpienia zmian w akumulacji metabolitów (wyniki nieopublikowane).

Zidentyfikowane metabolity, których akumulacja była zwiększona w siewkach *A. thaliana* i *C. rubella*, podobnie jak w przypadku inokulacji *P. cucumerina*, należały głównie do klas związków indolowych i fenylopropanoidowych, jednak końcowe produkty tych szlaków metabolizmu, dla których obserwowano zwiększoną akumulację po inokulacji patogenem różniły się od tych, których zwiększoną biosyntezę indukowało rozpoznanie flg22. W siewkach *A. thaliana* traktowanych wzorcem molekularnym, w przeciwieństwie do liści inokulowanych patogenem, nie obserwowano zwiększonej akumulacji 4MI3G, ale wykazano wzrost akumulacji produktu szlaku PEN2 – RA. Dane literaturowe, podobnie jak uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na zwiększoną biosyntezę RA w *A. thaliana* 24 h po traktowaniu siewek flg22 [161]. W przypadku 4MI3G dane literaturowe nie są spójne, ponieważ podają, że akumulacja tego metabolitu może być zwiększona w siewkach *A. thaliana* w wyniku rozpoznania flg22 [161] lub nie ulega zmianom [150]. Brak jednoznacznych zmian w akumulacji 4MI3G może wiązać się z różnorodną wydajnością metabolizmu tego glukozynolanu przez myrozynazę PEN2. Co istotne, proces ten jest nieodzowny dla depozycji kalozy indukowanej rozpoznaniem flg22 [150].

Metabolitami indolowymi, których akumulacja była indukowana zarówno po inokulacji patogenem, jak i po rozpoznaniu flg22 były kamaleksyna i 6-metoksykamaleksyna oraz pochodne kwasu indolilo-3-karboksyłowego. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, które podają, że biosynteza kamaleksyny może być indukowana nie tylko przez mikroorganizmy patogenne, ale także przez wzorce molekularne, jak flg22 [161], czy nawet czynniki abiotyczne, m. in. CuCl₂ [203]. Podobnie pochodne kwasu indolilo-3-karboksyłowego: 6-GlcO-ICOOH i ICOOGlc były wcześniej raportowane w *A. thaliana*, jako metabolity charakteryzujące się zwiększoną akumulacją po rozpoznaniu flg22 [161].

Wśród metabolitów szlaku fenylopropanoidowego występował tylko jeden, charakteryzujący się zwiększoną akumulacją zarówno po inokulacji patogenem, jak i po rozpoznaniu flg22 – *p*-kumaroiloagmatyna. W odróżnieniu od metabolitów indukowanych po inokulacji *P. cucumerina*, wśród których zidentyfikowano pochodne kilku różnych kwasów hydroksycynamonowych, rozpoznanie flg22 prowadziło do zwiększonej akumulacji jedynie pochodnych kwasu kumarowego i galaktarowego. Jak do tej pory brak jest doniesień literaturowych dotyczących pochodnych tych metabolitów w odpowiedzi odpornościowej gatunków Brassicaceae. Wyniki uzyskane dla innych gatunków dotyczą głównie funkcji tych związków w odpowiedzi odpornościowej na patogenne grzyby. Pochodne kwasu kumarowego zostały zidentyfikowane w kilku odmianach jęczmienia jako związki związane z odpornością przeciwko *Fusarium graminearum* [271]. W liściach borówki czarnej obserwowano zwiększoną akumulację pochodnych kwasu kumarowego po infekcji *B. cinerea* [272].

Z kolei, dla kwasu galaktarowego wykazano, że jego akumulacja może być indukowana w odmianie ryżu odpornej na zakażenie patogenem grzybowym *Rhizoctonia solani* [273].

Charakterystyczna dla rozpoznania flg22 była zwiększona akumulacja aminokwasów – tryptofanu (nr 15) i tyrozyny (nr 1), której nie obserwowano po inokulacji *A. thaliana* i *C. rubella* patogenem. Indukcję akumulacji tryptofanu, tyrozyny i innych aminokwasów aromatycznych obserwowano także we wcześniejszych badaniach w liściach *A. thaliana* traktowanych szczepem *P. syringae* DC3000 [274]. W *A. thaliana* obserwowano też zmiany w ekspresji genów związanych ze szlakami biosyntezy aminokwasów aromatycznych, powodowane infekcją *P. syringae* [275]. Może to sugerować, że odpowiedź związana ze zwiększeniem akumulacji tych metabolitów jest związana jedynie z odpowiedzią na mikroorganizmy bakteryjne.

Porównując zidentyfikowane metabolity, charakteryzujące się zwiększoną akumulacją po inokulacji patogenem lub traktowaniu MAMP stwierdzono, że te dwa czynniki biotyczne uruchamiają te same szlaki metaboliczne, jednak występują pewne różnice w końcowych produktach tych szlaków, ulegających zwiększonej akumulacji w odpowiedzi na patogen lub wzorzec molekularny. Akumulacja jedynie części związków była wzbudzona pod wpływem działania obu czynników biotycznych, a większość z nich była specyficzna dla jednego z czynników biotycznych. Rozpoznanie flg22 powodowało znacznie słabszą odpowiedź pod względem liczby metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją w *A. thaliana*, ale w przypadku *C. rubella* rozpoznanie flg22 powodowało wzrost akumulacji większej ilości związków niż inokulacja *P. cucumerina*. Różnicę w odpowiedzi roślin na inokulację patogenem i rozpoznanie flg22 było widać nie tylko w ilości akumulowanych metabolitów, ale także w poziomie ich indukcji, która dla *A. thaliana* była mniejsza w przypadku rozpoznania wzorca molekularnego niż po inokulacji patogenem. Porównanie *A. thaliana* i *C. rubella* sugeruje, że patogen posiadający wiele różnych cząsteczek, które mogą być rozpoznawane przez roślinę jako wzorce molekularne, czy efekторы, nie zawsze wywołuje silniejszą odpowiedź na poziomie metabolomu niż pojedynczy MAMP. Należy jednak zaznaczyć, że niektóre obserwowane różnice w akumulacji poszczególnych metabolitów pomiędzy roślinami traktowanym flg22 i infekowanymi *P. cucumerina* mogą wynikać także z różnic rozwojowych. Inokulację *P. cucumerina* przeprowadzano z użyciem 5-tygodniowych roślin, z kolei doświadczenia z flg22 przeprowadzano na 2-tygodniowych siewkach. Ponadto, różnice w profilach metabolitów mogą wynikać z uzyskiwania ekstraktów z różnych organów, co wykazano w badaniach dotyczących metabolitów liści i korzeni *A. thaliana* [214]. W niniejszej pracy ekstrakty metabolitów z roślin inokulowanych patogenem uzyskane były z liści, z kolei po traktowaniu siewek wzorcem molekularnym ekstrakty uzyskano z mieszaniny liści i korzeni.

5.5. Homologi genów związanych z metabolizmem wtórnym tryptofanu

W niniejszej pracy poszukiwano również dalszych homologów genów związanych z metabolizmem tryptofanu, znanych z *A. thaliana*: *CYP71B7*, *CYP71B23*, *CYP71B5*, *CYP71B21* i *CYP71B22*. W literaturze nie ma jak dotąd doniesień dotyczących funkcji enzymów kodowanych przez te geny w *A. thaliana*. Ortologi genu *CYP71B7* zidentyfikowano we wszystkich badanych gatunkach, a w *T. salsuginea* występowały dwa takie geny. Wszystkie te geny ulegały niewielkiemu wzrostowi ekspresji po inokulacji *P. cucumerina*. Również we wszystkich gatunkach zidentyfikowano ortologi genu *CYP71B5*, w tym w *C. rubella* i *T. salsuginea* występowały po dwa takie geny i wszystkie z nich ulegały niewielkiej indukcji ekspresji po inokulacji *P. cucumerina*. Z kolei bliski homolog genu *CYP71B5* – *CYP71B38* był specyficzny dla *A. thaliana* i w żadnym innym gatunku nie zidentyfikowano ortologa tego genu. Geny *CYP71B21* i *CYP71B22* *A. thaliana* miały swoje ortologi w dwóch z pozostałych gatunków: *C. hirsuta* i *T. salsuginea* i wszystkie te geny, z wyjątkiem ortologa *CYP71B21* w *C. hirsuta* ulegały zwiększonej ekspresji po inokulacji *P. cucumerina*. Zwiększona ekspresja tych genów w *A. thaliana* oraz pozostałych w pozostałych badanych gatunkach (Ryc. 4.23, 4.27) sugeruje, że mogą one pełnić funkcje w odpowiedzi odpornościowej, które są zakonserwowane wśród gatunków z rodziny Brassicaceae. W chwili obecnej trudno jest określić, z jakimi szlakami metabolicznym i związane są te geny, jedynie w przypadku *CYP71B7* analizy koekspresji w *A. thaliana* sugerują związek tego genu ze szlakiem PEN2 (Bednarek i współpracownicy, wyniki niepublikowane).

5.6. Podsumowanie

Analizy porównawcze kilku gatunków modelowych z rodziny Brassicaceae pokazały, że nawet wśród roślin blisko spokrewnionych występuje duża różnorodność metabolitów, których akumulacja jest indukowana po inokulacji patogenem bądź rozpoznaniu wzorca molekularnego. Wskazuje to na zachodzącą zmienność chemiczną oraz wpisuje się w strategię obronną roślin polegającą na wytwarzaniu zróżnicowanych strukturalnie metabolitów o działaniu antybiotycznym. Wiele z wyznaczonych w niniejszej pracy metabolitów nie zostało zidentyfikowanych ze względu na brak w literaturze i dostępnych bazach danych informacji dotyczących ich struktury. Pokazuje to, że pomimo intensywnych badań dotyczących metabolitów roślinnych, wciąż wiele związków pozostaje nieznanymi. W świetle przeprowadzonych w niniejszej pracy doświadczeń i uzyskanych wyników wydaje się, że przeprowadzenie dodatkowych analiz, na przykład z zastosowaniem techniki magnetycznego rezonansu jądrowego, mogłoby pozwolić na identyfikację struktur nieznanymi metabolitów charakteryzujących się zwiększoną akumulacją po inokulacji patogenem oraz uzyskanie pełniejszej informacji dotyczącej klas związków charakterystycznych dla roślin z rodziny Brassicaceae.

Kolejnym po identyfikacji metabolitów etapem jest poznanie szlaków metabolicznych, w których powstają. Wykonane w niniejszej pracy analizy ekspresji genów są pierwszym krokiem do poznania ich potencjalnej funkcji w biosyntezie metabolitów wtórnych. W przypadku *A. thaliana* przypisanie takich genów do poszczególnych szlaków metabolicznych jest w wielu przypadkach ułatwione dzięki analizom ko-ekspresji przeprowadzanej na podstawie dostępnych baz danych transkryptomycznych. Niestety takie narzędzia nie są obecnie dostępne dla innych gatunków Brassicaceae. W tym przypadku możliwe jest obecnie zastosowanie techniki CRISPR/Cas, która umożliwi otrzymanie mutantów z defektem w wybranym genie. Obserwacja fenotypu uzyskanych mutantów może wskazać szlak metaboliczny, z którym związany jest dany gen i dodatkowo zweryfikować funkcje tego szlaku w odporności na infekcję.

VI. WNIOSKI

1. Wyniki uzyskane dla użytych szczepów *P. cucumerina* pokazują, że stopień zaadaptowania patogenu nie wpływa na nasilenie odpowiedzi odpornościowej badanych gatunków Brassicaceae na poziomie metabolicznym. Może to być związane z faktem, iż zwiększona akumulacja metabolitów pełniących funkcje odpornościowe może być wywoływana przez samo wykrycie potencjalnego patogenu na powierzchni tkanki roślinnej.
2. Obserwowane zmiany w akumulacji metabolitów sugerują, że pochodne szlaku indolowego i fenylopropanoidowego pełnią istotną funkcję w odpowiedzi odpornościowej związanej z biosyntezą metabolitów we wszystkich badanych gatunkach Brassicaceae.
3. Duże zróżnicowanie strukturalne metabolitów, których akumulacja jest indukowana po inokulacji patogenem bądź po rozpoznaniu wzorca molekularnego występuje nawet wśród blisko spokrewnionych gatunków należących do tej samej rodziny.
4. Ilość wspólnych metabolitów, charakteryzujących się zwiększoną akumulacją w odpowiedzi odpornościowej na inokulację patogenem, pomiędzy dwoma gatunkami nie zawsze wiąże się ze stopniem pokrewieństwa, co widać na przykładzie *A. thaliana*, *C. rubella* i *C. hirsuta*.
5. Wszystkie geny związane z metabolizmem tryptofanu w *A. thaliana* posiadają przynajmniej w jednym z badanych gatunków ortologi, które zachowały swoją funkcję w odpowiedzi odpornościowej.
6. Duplikacja i neofunkcionalizacja oraz utrata zdolności ekspresji poszczególnych genów są prawdopodobnie głównymi mechanizmami prowadzącymi do dywersyfikacji metabolizmu wtórnego pomiędzy dwoma blisko spokrewnionymi gatunkami (*A. thaliana* i *C. rubella*).
7. Korelacja obserwowanych zmian w akumulacji pochodnych kwasu indolilo-3-karboksyłowego z informacją dotyczącą homologów genów związanych z biosyntezą tego metabolitu sugeruje, że związki te mogą powstawać w co najmniej dwóch alternatywnych szlakach biosyntezy.
8. Indukcja ekspresji genów kodujących monooksygenazy cytochromu P450 o nieznannej funkcji wskazuje na ich potencjalną rolę w powstawaniu metabolitów biorących udział w odpowiedzi odpornościowej.

9. Brak wyraźnych zmian w ekspresji genów związanych ze szlakiem fenylopropanoidywnom sugeruje, że w przeciwieństwie do metabolizmu tryptofanu szlak ten może być regulowany na poziomie potranslacyjnym.
10. Brak wpływu flg22 na akumulację metabolitów w *C. hirsuta* i *T. salsuginea* sugeruje, że biosynteza metabolitów wtórnych zależna jest nie tylko od stopnia, ale także od kinetyki indukcji odpowiednich genów.
11. Większa ilość rozpoznanych przez roślinę wzorców molekularnych, czy efektorów nie zawsze prowadzi do silniejszej odpowiedzi związanej ze zwiększoną akumulacją metabolitów, co widać w porównaniu odpowiedzi *A. thaliana* i *C. rubella* na inokulację *P. cucumerina* i rozpoznanie flg22.

VII. STRESZCZENIE

Nadrzędnym celem przedłożonej pracy doktorskiej była charakterystyka zmian, jakie zachodzą w szlakach metabolicznych wybranych gatunków z rodziny Brassicaceae w odpowiedzi odpornościowej na inokulację patogenem *Plectosphaerella cucumerina* lub rozpoznanie wzorca molekularnego związanego z mikroorganizmem flg22. Obiektem badań był gatunek modelowy *Arabidopsis thaliana* oraz cztery inne gatunki: *Capsella rubella*, *Cardamine hirsuta*, *Thellungiella salsuginea* i *Arabis alpina*, które pokrywają w dużej części drzewo filogenetyczne wszystkich gatunków Brassicaceae, posiadających zsekwencjonowany genom. Cel pracy miał być osiągnięty poprzez badania na poziomie metabolomu, genomu i transkryptomu.

Analizy metabolomu opierały się na identyfikacji metabolitów zawartych w liściach lub siewkach, które w badanych gatunkach ulegały zwiększonej akumulacji odpowiednio po inokulacji patogenem bądź traktowaniu wzorcem molekularnym. Identyfikacja została wykonana poprzez zastosowanie techniki ultrasprawnej chromatografii cieczonej (UPLC) z użyciem detektora fotodiodowego (PDA) i fluorescencyjnego (FLR), dzięki czemu wykonano badania ilościowe oraz dokonano wstępnej klasyfikacji części metabolitów. Dzięki sprzężeniu UPLC z wysokorozdzielczym spektrometrem mas możliwe było uzyskanie dokładniejszych danych strukturalnych oraz wyznaczenie potencjalnych struktur części metabolitów. Określono filogenetyczny zasięg występowania poszczególnych metabolitów oraz wykazano, że metabolity, których akumulacja była indukowana po inokulacji patogenem lub po traktowaniu wzorcem molekularnym, w dużej części były specyficzne gatunkowo. Jedynie około 20% z nich charakteryzowało się zwiększoną biosyntezą w przynajmniej dwóch z badanych gatunków Brassicaceae. Wśród tych metabolitów były grupy związków należących do pochodnych tryptofanu oraz fenyloalaniny, które były przynajmniej częściowo zakonserwowane w badanych gatunkach. Przeprowadzone eksperymenty wykazały również, że w wyniku odpowiedzi odpornościowej na patogen bądź wzorec molekularny, uruchamiane mogą być te same szlaki metaboliczne, jednak prowadzą do zwiększenia biosyntezy różnych produktów końcowych.

Występowanie poszczególnych metabolitów zależne jest od obecności w genomie oraz ekspresji genów związanych ze szlakami ich biosyntezy. Dlatego też w trakcie realizacji niniejszej pracy wykonano analizy filogenetyczne wybranych gatunków Brassicaceae mające na celu identyfikację ortologów i dalszych homologów genów związanych z metabolizmem tryptofanu i ze szlakiem fenylopropanoidowym *A. thaliana*. Następnie dla wybranych genów przeprowadzono analizę zmian ekspresji, zachodzących po inokulacji patogenem. Wyniki przeprowadzonych analiz pozwoliły na określenie filogenetycznego zasięgu występowania poszczególnych genów oraz wykazały, że większość z nich ulega zwiększonej ekspresji po inokulacji *P. cucumerina*, co wskazuje na potencjalną rolę tych genów w odpowiedzi odpornościowej.

Ostatnim etapem prac była korelacja wyników uzyskanych na poziomie metabolomu, genomu i transkryptomu. Korelacja ta była możliwa tylko częściowo i była skuteczna jedynie w przypadku metabolitów i szlaków ich biosyntezy opisanych wcześniej w gatunku modelowym *A. thaliana*. Przeprowadzone analizy wykazały, że we wszystkich badanych gatunkach Brassicaceae występują wciąż metabolity o nieznanym szlakach biosyntezy oraz geny, charakteryzujące się zwiększoną ekspresją po inokulacji patogenem, których funkcja jest dotąd niepoznana.

VIII. LITERATURA

1. **Borecki Z.**, *Nauka o chorobach roślin*, ed. M. Kręciszy i Z. Bujnowska. 2001, Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
2. **Bigeard J., Colcombet J. i Hirt H.** (2015) Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4): 521-539.
3. **Osbourn A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8(10): 1821-1831.
4. **Yeats T.H. i Rose J.K.C.** (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology*, 163(1): 5-20.
5. **Somerville C., Bauer S., Brininstool G. i in.** (2004) Toward a systems approach to understanding plant-cell walls. *Science*, 306(5705): 2206-2211.
6. **Rafiqi M., Ellis J.G., Ludowici V.A. i in.** (2012) Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4): 477-482.
7. **Nuhse T.S., Boller T. i Peck S.C.** (2003) A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46): 45248-45254.
8. **Newman M.A., Sundelin T., Nielsen J.T. i in.** (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4: 14.
9. **Zipfel C., Robatzek S., Navarro L. i in.** (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428(6984): 764-767.
10. **Zipfel C. i Felix G.** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4): 353-360.
11. **Denoux C., Galletti R., Mammarella N. i in.** (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular Plant*, 1(3): 423-445.
12. **Nomura H., Komori T., Uemura S. i in.** (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 3: 10.
13. **Gohre V. i Robatzek S.** (2008) Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*. Annual Reviews: Palo Alto: 189-215.
14. **Dodds P.N. i Rathjen J.P.** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant - pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8): 539-548.
15. **Ellis J., Dodds P. i Pryor T.** (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4): 278-284.
16. **Katagiri F.** (2004) A global view of defense gene expression regulation - a highly interconnected signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5): 506-511.

17. **Eulgem T.** (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, 10(2): 71-78.
18. **Jones J.D.G. i Dangl J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323-329.
19. **Flor H.H.** (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296.
20. **Kachroo A. i Robin G.P.** (2013) Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4): 527-533.
21. **Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Ton J. i in.** (2002) Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 4(5): 535-544.
22. **Luna E., Bruce T.J.A., Roberts M.R. i in.** (2012) Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 158(2): 844-853.
23. **Qing-Ming G., Shifeng Z., Kachroo P. i in.** (2015) Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6(228): 1-12.
24. **Fraenkel G.S.** (1959) The Raison d'Etire of Secondary Plant Substances. *Science*, 129(3361): 1466-1470.
25. **Weng J.K., Philippe R.N. i Noel J.P.** (2012) The Rise of Chemodiversity in Plants. *Science*, 336(6089): 1667-1670.
26. **Dixon R.A.** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839): 843-847.
27. **Kroymann J.** (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3): 246-251.
28. **Smoliga J.M., Baur J.A. i Hausenblas H.A.** (2011) Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(8): 1129-1141.
29. **Szwejdą-Grzybowska J.** (2011) Antykancerogenne składniki warzyw kapustnych i ich znaczenie w profilaktyce chorób nowotworowych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 4: 1039-1046.
30. **Kuo R.Y., Qian K.D., Morris-Natschke S.L. i in.** (2009) Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Natural Product Reports*, 26(10): 1321-1344.
31. **Link K.P., Angell H.R. i Walker J.C.** (1929) The isolation of protocatechuic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. *Journal of Biological Chemistry*, 81: 369-375.
32. **Mueller K.O. i Boerger H.** (1940) Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. *Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, 23: 189-231.
33. **Hopkins R.J., van Dam N.M. i van Loon J.J.A.** (2009) Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 54: 57-83.
34. **Ahmad S., Veyrat N., Gordon-Weeks R. i in.** (2011) Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant Physiology*, 157: 317-327.

35. **Zhou N., Tootle T.L. i Glazebrook J.** (1999) Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell*, 11(12): 2419-2428.
36. **Kishi-Kaboshi M., Okada K., Kurimoto L. i in.** (2010) A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant Journal*, 63(4): 599-612.
37. **Araceli A.C., Elda C.M., Edmundo L.G. i in.** (2007) Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1-3): 69-76.
38. **Mucha S., Walther D., Muller T.M. i in.** (2015) Substantial reprogramming of the *Eutrema salsugineum* (*Thellungiella salsuginea*) transcriptome in response to UV and silver nitrate challenge. *Bmc Plant Biology*, 15: 15.
39. **VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A. i in.** (1994) Two classes of plant antibiotics-phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell*, 6: 1191-1192.
40. **Atkinson P. i Blakeman J.P.** (1982) Seasonal occurrence of an antimicrobial flavanone, sacuranetin, associated with glands on lives of *Ribes nigrum*. *New Phytologist*, 92(1): 63-74.
41. **Kodama O., Miyakawa J., Akatsuka T. i in.** (1992) Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet - irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, 31(11): 3807-3809.
42. **Frey M., Schullehner K., Dick R. i in.** (2009) Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry*, 70: 1645-1651.
43. **Bednarek P., Piślewska-Bednarek M., Svatos A. i in.** (2009) A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science*, 323: 101-106.
44. **Osborn A., Goss R.J.M. i Field R.A.** (2011) The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Natural Product Reports*, 28: 1261-1268.
45. **Keukens E.A.J., de Vrije T., van den Boom C. i in.** (1995) Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1240: 216-228.
46. **Osborn A.E., Clarke B.R., Lunness P. i in.** (1994) An Oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45(6): 457-467.
47. **Papadopoulou K., Melton R.E., Leggett M. i in.** (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22): 12923-12928.
48. **Ito S.-i., Ihara T., Tamura H. i in.** (2016) α -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters*, 581(17): 3217-3222.
49. **Agerbirk N. i Olsen C.E.** (2012) Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, 77: 16-45.
50. **Halkier B.A. i Gershenzon J.** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 303-333.

51. **Bones A.M. i Rossiter J.T.** (2006) The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67(11): 1053-1067.
52. **Brown K.K. i Hampton M.B.** (2011) Biological targets of isothiocyanates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810: 888-894.
53. **Dick R., Rattei T., Haslbeck M. i in.** (2012) Comparative analysis of benzoxazinoid biosynthesis in monocots and dicots: independent recruitment of destabilization and activation functions. *Plant Cell*, 24: 915-928.
54. **Hashimoto Y. i Shudo K.** (1996) Chemistry of biologically active benzoxazinoids. *Phytochemistry*, 43: 551-559.
55. **Gleadow R.M. i Møller B.L.** (2014) Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 155-185.
56. **Piasecka A., Jedrzejczak-Rey N. i Bednarek P.** (2015) Secondary metabolites in plant innate immunity. *New Phytologist*, 206: 948-964.
57. **Nielsen K.A., Hrmova M., Nielsen J.N. i in.** (2006) Reconstitution of cyanogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus. *Planta*, 223(5): 1010-1023.
58. **Grayer R.J. i Kokubun T.** (2001) Plant-fungal Interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56: 253-263.
59. **Paxton J.D.** (1981) Phytoalexins - a working redefinition. *Phytopathologische Zeitschrift*, 101: 106-109.
60. **Cruickshank I.A.M. i Perrin D.R.** (1960) Isolation of phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature*, 197: 799-800.
61. **Ejike C.E.C.C.** (2013) Phytoalexins from the Poaceae: Biosynthesis, function and prospects in food preservation. *Food Research International*, 52: 167-177.
62. **Reichling J.** (2009) Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Annual Plant Reviews*, 39: 214-347.
63. **Ahuja I., Kissen R. i Bones A.M.** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 77(2): 73-90.
64. **Pedras M.S.C., Yaya E.E. i Glawischnig E.** (2011) The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: Chemistry and biology. *Natural Product Reports*, 28(8): 1381-1405.
65. **Ingham J.L.** (1976) 3,5,4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, 15(11): 1791-1793.
66. **Ragab A.S., Van Fleet J., Jankowski B. i in.** (2006) Detection and quantitation of resveratrol in tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19): 7175-7179.
67. **Hain R., Reif H.J., Krause E. i in.** (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361: 153-156.

68. **Stotz H.U., Sawada Y., Shimada Y. i in.** (2011) Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Journal*, 67(1): 81-93.
69. **McNally D.J., Wurms K.V., Labbe C. i in.** (2003) Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. *Journal of Natural Products*, 66(9): 1280-1283.
70. **Cruickshank I.A.M. i Perrin D.R.** (1963) Phytoalexins of the Leguminosae- phaseolin from *Phaseolus vulgaris* L. *Life Sciences*, (9): 680-682.
71. **Gottstein D. i Gross D.** (1992) Phytoalexins of woody-plants. *Trees-Structure and Function*, 6(2): 55-68.
72. **Shain L.** (1967) Resistance of sapwood in stems of loblolly pine to infection by *Fomes annosus*. *Phytopathology*, 57(10): 1034-1040.
73. **Franich R.A., Carson M.J. i Carson S.D.** (1986) Synthesis and accumulation of benzoic-acid in *Pinus radiata* needles in response to tissue-injury by dothistromin, and correlation with resistance of *Pinus radiata* families to *Dothistroma pini*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 28(2): 267-286.
74. **Barton G.M.** (1967) Differences in phenolic extracts from healthy Douglas-Fir roots and those infected with *Poria weirii*. *Canadian Journal of Botany*, 45(9): 1545-1552.
75. **Shain L. i Hillis W.E.** (1971) Phenolic extractives in norway spruce and their effects on *Fomes annosus*. *Phytopathology*, 61(7): 841-850.
76. **Madar Z., Gottlieb H.E., Cojocar M. i in.** (1995) Antifungal terpenoids produced by cypress after infection by *Diplodia pinea* F-sp. cupressi. *Phytochemistry*, 38(2): 351-354.
77. **Oikawa A., Ishihara A., Hasegawa M. i in.** (2001) Induced accumulation of 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside (HDMBOA-Glc) in maize leaves. *Phytochemistry*, 56(7): 669-675.
78. **Ishihara A., Hashimoto Y., Tanaka C. i in.** (2008) The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant Journal*, 54(3): 481-495.
79. **Skadhauge B., Thomsen K.K. i von Wettstein D.** (1997) The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas*, 126(2): 147-160.
80. **Hebert C., Charles M.T., Gauthier L. i in.** (2002) Strawberry proanthocyanidins: Biochemical markers for *Botrytis cinerea* resistance and shelf life predictability. *Proceedings of the Fourth International Strawberry Symposium, Vols 1 and 2*, T. Hietaranta, et al., Editors. International Society Horticultural Science: Leuven 1: 659-662.
81. **Hirai N., Sugie M., Wada M. i in.** (2000) Triterpene phytoalexins from strawberry fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64(8): 1707-1712.
82. **Chizzali C. i Beerhues L.** (2012) Phytoalexins of the Pyrinae: Biphenyls and dibenzofurans. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8: 613-620.
83. **Fewell A.M. i Roddick J.G.** (1993) Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine. *Phytochemistry*, 33(2): 323-328.

84. **Tomiyama K., Sakuma T., Ishizaka N. i in.** (1968) A new antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens. *Phytopathology*, 58(1): 115-120.
85. **Laibach F.** (1943) *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. als Object für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Botanisches Archiv*, 44: 439-455.
86. **Laibach F.** (1907) Zur Frage der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt*, 1(22): 191-210.
87. **Meyerowitz E.M. i Pruitt R.E.** (1985) *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science*, 229(4719): 1214-1218.
88. **The-Arabidopsis-Genome-Initiative.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.
89. **Clough S.J. i Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6): 735-743.
90. **Feldmann K.A. i Marks M.D.** (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating-seeds of *Arabidopsis thaliana* - a non-tissue culture approach. *Molecular & General Genetics*, 208(1-2): 1-9.
91. **Nannas N.J. i Dawe R.K.** (2015) Genetic and Genomic Toolbox of *Zea mays*. *Genetics*, 199(3): 655-669.
92. **Jung K.H., An G.H. i Ronald P.C.** (2008) Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nature Reviews Genetics*, 9(2): 91-101.
93. **The-1001-Genomes-Consortium.** (2016) 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 166(2): 481-491.
94. **Davies P.J.** (2004) Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! *Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.*
95. **Frommer W.B., Hummel S. i Riesmeier J.W.** (1993) Expression cloning in yeast of cDNA-encoding a broad-specificity amino-acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13): 5944-5948.
96. **Ilegems M., Douet V., Meylan-Bettex M. i in.** (2010) Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development*, 137(6): 975-984.
97. **Tsuji J. i Somerville S.C.** (1988) *Xanthomonas-Campestris* pathovar *campestris*-induced chlorosis in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service*, 26(1).
98. **Balazs E. i G. L.** (1981) *Arabidopsis* is a host of cauliflower mosaic virus. *Arabidopsis Newsletter*, 18: 130-134.
99. **Koch E. i Slusarenko A.** (1990) *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell*, 2(5): 437-445.
100. **Mysore K.S., Tuori R.P. i Martin G.B.** (2001) *Arabidopsis* genome sequence as a tool for functional genomics in tomato. *Genome Biology*, 2(1): 4.

101. **Nishimura M.T. i Dangl J.L.** (2010) *Arabidopsis* and the plant immune system. *The Plant Journal*, 61: 1053-1066.
102. **Glazebrook J., Rogers E.E. i Ausubel F.M.** (1997) Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics*, 31: 547-569.
103. **Gomez-Gomez L. i Boller T.** (2000) FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5(6): 1003-1011.
104. **Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D. i in.** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4): 749-760.
105. **Heese A., Hann D.R., Gimenez-Ibanez S. i in.** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29): 12217-12222.
106. **Asai T., Tena G., Plotnikova J. i in.** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875): 977-983.
107. **Mindrinis M., Katagiri F., Yu G.-L. i in.** (1994) The *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, 78: 1089-1099.
108. **Dodds P.N., Lawrence G.J., Catanzariti A.M. i in.** (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23): 8888-8893.
109. **Truman W., Bennett M.H., Kubigsteltig I. i in.** (2007) *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104(3): 1075-1080.
110. **Iakovidis M., Teixeira P., Exposito-Alonso M. i in.** (2016) Effector-Triggered Immune Response in *Arabidopsis thaliana* Is a Quantitative Trait. *Genetics*, 204(1): 337-353.
111. **Todesco M., Balasubramanian S., Hu T.T. i in.** (2010) Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 465(7298): 632-U129.
112. **Garner C.M., Kim S.H., Spears B.J. i in.** (2016) Express yourself: Transcriptional regulation of plant innate immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 56: 150–162.
113. **Jiang Z.H., Dong X.B., Li Z.G. i in.** (2016) Differential coexpression analysis reveals extensive rewiring of *Arabidopsis* gene coexpression in response to *Pseudomonas syringae* infection. *Scientific Reports*, 6: 13.
114. **Tully J.P., Hill A.E., Ahmed H.M. i in.** (2014) Expression-based network biology identifies immune-related functional modules involved in plant defense. *Bmc Genomics*: 421.
115. **Briskine R.V., Paape T., Shimizu-Inatsugi R. i in.** (2016) Genome assembly and annotation of *Arabidopsis halleri*, a model for heavy metal hyperaccumulation and evolutionary ecology. *Molecular Ecology Resources*.
116. **Hu T.T., Pattyn P., Bakker E.G. i in.** (2011) The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nature Genetics*, 43: 476-481.

117. **Slotte T., Hazzouri K.M., Agren J.A. i in.** (2013) The *Capsella rubella* genome and the genomic consequences of rapid mating system evolution. *Nature Genetics*, 45(7): 831-835.
118. **Kagale S., Koh C.S., Nixon J. i in.** (2014) The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nature Communications*, 5: 3706.
119. **The-Brassica-rapa-Genome-Sequencing-Project-Consortium.** (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43: 1035-1039.
120. **Yang J., Liu D., Wang X. i in.** (2016) The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection. *Nature Genetics*, 48: 1225-1232.
121. **Chalhoub B., Denoeud F., Liu S.Y. i in.** (2014) Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 345(6199): 950-953.
122. **Liu S.Y., Liu Y.M., Yang X.H. i in.** (2014) The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications*, 5: 11.
123. **Cheng F., Wu J. i Wang X.** (2014) Genome triplication drove the diversification of *Brassica* plants. *Horticulture Research*, 1: 14024.
124. **Moghe G.D., Hufnagel D.E., Tang H. i in.** (2014) Consequences of Whole-Genome Triplication as Revealed by Comparative Genomic Analyses of the Wild Radish *Raphanus raphanistrum* and Three Other Brassicaceae Species. *Plant Cell*, 26(5): 1925-1937.
125. **Dassanayake M., Oh D.H., Haas J.S. i in.** (2011) The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. *Nature Genetics*, 43(9): 913-U137.
126. **Wu H.J., Zhang Z.H., Wang J.Y. i in.** (2012) Insights into salt tolerance from the genome of *Thellungiella salsa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30): 12219-12224.
127. **Yang R.L., Jarvis D.E., Chen H. i in.** (2013) The reference genome of the halophytic plant *Eutrema salsugineum*. *Frontiers in Plant Science*, 4: 46.
128. **Gan X.C., Hay A., Kwantes M. i in.** (2016) The *Cardamine hirsuta* genome offers insight into the evolution of morphological diversity. *Nature Plants*, 2(10): 16167.
129. **Stinchcombe, Daniel J.S., Xiaowu W. i in.** (2013) An atlas of over 90,000 conserved noncoding sequences provides insight into crucifer regulatory regions. *Nature Genetics*, 45: 891-898.
130. **Willing E.M., Rawat V., Mandakova T. i in.** (2015) Genome expansion of *Arabis alpina* linked with retrotransposition and reduced symmetric DNA methylation. *Nature Plants*, 1(2): 1-7.
131. **Windsor A.J., Schranz M.E., Formanová N. i in.** (2006) Partial Shotgun Sequencing of the *Boechera stricta* Genome Reveals Extensive Microsynteny and Promoter Conservation with *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140(4): 1169-1182.
132. **Koenig D. i Weigel D.** (2015) Beyond the thale: comparative genomics and genetics of *Arabidopsis* relatives. *Nature Reviews Genetics*, 16(5): 285-298.
133. **Clarke D.B.** (2010) Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods*, 2(4): 310-325.

134. **Mithen R., Bennett R. i Marquez J.** (2010) Glucosinolate biochemical diversity and innovation in the Brassicales. *Phytochemistry*, 71(17-18): 2074-2086.
135. **Kliebenstein D.J., Kroymann J., Brown P. i in.** (2001) Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology*, 126(2): 811-825.
136. **Brown P.D., Tokuhisa J.G., Reichelt M. i in.** (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62(3): 471-481.
137. **Sonderby I.E., Geu-Flores F. i Halkier B.A.** (2010) Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5): 283-290.
138. **Mikkelsen M.D., Hansen C.H., Wittstock U. i in.** (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43): 33712-33717.
139. **Hull A.K., Vij R. i Celenza J.L.** (2000) *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5): 2379-2384.
140. **Wittstock U. i Halkier B.A.** (2000) Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19): 14659-14666.
141. **Hansen C.H., Wittstock U., Olsen C.E. i in.** (2001) Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14): 11078-11085.
142. **Chen S.X., Glawischnig E., Jorgensen K. i in.** (2003) CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 33(5): 923-937.
143. **Naur P., Petersen B.L., Mikkelsen M.D. i in.** (2003) CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(1): 63-72.
144. **Schlaeppli K., Bodenhausen N., Buchala A. i in.** (2008) The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant Journal*, 55(5): 774-786.
145. **Geu-Flores F., Møldrup M.E., Böttcher C. i in.** (2011) Cytosolic γ -Glutamyl Peptidases Process Glutathione Conjugates in the Biosynthesis of Glucosinolates and Camalexin in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23(6): 2456-2469.
146. **Mikkelsen M.D., Naur P. i Halkier B.A.** (2004) *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant Journal*, 37(5): 770-777.
147. **Grubb C.D., Zipp B.J., Ludwig-Muller J. i in.** (2004) *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant Journal*, 40(6): 893-908.

148. **Gachon C.M.M., Langlois-Meurinne M., Henry Y. i in.** (2005) Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis*: functional and evolutionary implications. *Plant Molecular Biology*, 58(2): 229-245.
149. **Piotrowski M., Schemenewitz A., Lopukhina A. i in.** (2004) Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49): 50717-50725.
150. **Clay N.K., Adio A.M., Denoux C. i in.** (2009) Glucosinolate Metabolites Required for an *Arabidopsis* Innate Immune Response. *Science*, 323: 95-101.
151. **Pfalz M., Vogel H. i Kroymann J.** (2009) The Gene Controlling the Indole Glucosinolate Modifier1 Quantitative Trait Locus Alters Indole Glucosinolate Structures and Aphid Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(3): 985-999.
152. **Pfalz M., Mikkelsen M.D., Bednarek P. i in.** (2011) Metabolic Engineering in *Nicotiana benthamiana* Reveals Key Enzyme Functions in *Arabidopsis* Indole Glucosinolate Modification. *Plant Cell*, 23(2): 716-729.
153. **Kai K., Takahashi H., Saga H. i in.** (2011) Metabolomic characterization of the possible involvement of a Cytochrome P450, CYP81F4, in the biosynthesis of indolic glucosinolate in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 28(4): 379-385.
154. **Pfalz M., Mukhaimar M., Perreau F. i in.** (2016) Methyl Transfer in Glucosinolate Biosynthesis Mediated by Indole Glucosinolate O-Methyltransferase 5. *Plant Physiology*, 172(4): 2190-2203.
155. **Gigolashvili T., Berger B., Mock H.P. i in.** (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 50(5): 886-901.
156. **Celenza J.L., Quiel J.A., Smolen G.A. i in.** (2005) The *Arabidopsis* ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiology*, 137(1): 253-262.
157. **Hirai M.Y., Sugiyama K., Sawada Y. i in.** (2007) Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15): 6478-6483.
158. **Gigolashvili T., Engqvist M., Yatusevich R. i in.** (2008) HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 177(3): 627-642.
159. **Sonderby I.E., Hansen B.G., Bjarnholt N. i in.** (2007) A Systems Biology Approach Identifies a R2R3 MYB Gene Subfamily with Distinct and Overlapping Functions in Regulation of Aliphatic Glucosinolates. *PLOS ONE*, 2(12): 16.
160. **Frerigmann H. i Gigolashvili T.** (2014) MYB34, MYB51, and MYB122 Distinctly Regulate Indolic Glucosinolate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 7(5): 814-828.
161. **Frerigmann H., Pislewska-Bednarek M., Sanchez-Vallet A. i in.** (2016) Regulation of Pathogen-Triggered Tryptophan Metabolism in *Arabidopsis thaliana* by MYB Transcription Factors and Indole Glucosinolate Conversion Products. *Molecular Plant*, 9(5): 682-695.
162. **Frerigmann H., Berger B. i Gigolashvili T.** (2014) bHLH05 is an interaction partner of MYB51 and a novel regulator of glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*.

163. **Schweizer F., Fernandez-Calvo P., Zander M. i in.** (2013) *Arabidopsis* Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors MYC2, MYC3, and MYC4 Regulate Glucosinolate Biosynthesis, Insect Performance, and Feeding Behavior. *Plant Cell*, 25(8): 3117-3132.
164. **Burmeister W.P., Cottaz S., Driguez H. i in.** (1997) The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure*, 5(5): 663-675.
165. **Andreasson E., Jorgensen L.B., Hoglund A.S. i in.** (2001) Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 127(4): 1750-1763.
166. **Barth C. i Jander G.** (2006) *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant Journal*, 46(4): 549-562.
167. **Xu Z.W., Escamilla-Trevino L.L., Zeng L.H. i in.** (2004) Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Molecular Biology*, 55(3): 343-367.
168. **Nakano R.T., Piślewska-Bednarek M., Yamada K. i in.** (2016) PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 89: 209-220.
169. **Agerbirk N., De Vos M., Kim J.H. i in.** (2009) Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews*, 8(1): 101-120.
170. **Tooke H.L.** (1973) Crambe thioglucoside glucohydrolase (EC3.2.3.1)- separation of a protein required for epithiobutane formation. *Canadian Journal of Biochemistry*, 51(12): 1654-1660.
171. **Kissen R. i Bones A.M.** (2009) Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18): 12057-12070.
172. **Kuchernig J.C., Backenkohler A., Lubbecke M. i in.** (2011) A thiocyanate-forming protein generates multiple products upon allylglucosinolate breakdown in *Thlaspi arvense*. *Phytochemistry*, 72(14-15): 1699-1709.
173. **Buxdorf K., Yaffe H., Barda O. i in.** (2013) The Effects of Glucosinolates and Their Breakdown Products on Necrotrophic Fungi. *PLOS ONE*, 8(8): 10.
174. **Fan J., Crooks C., Creissen G. i in.** (2011) *Pseudomonas sax* Genes Overcome Aliphatic Isothiocyanate-Mediated Non-Host Resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 331(6021): 1185-1188.
175. **Lipka V., Dittgen J., Bednarek P. i in.** (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 310(5751): 1180-1183.
176. **Fuchs R., Kopischke M., Klapprodt C. i in.** (2016) Immobilized Subpopulations of Leaf Epidermal Mitochondria Mediate PENETRATION2-Dependent Pathogen Entry Control in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28(1): 130-145.
177. **Schlaeppli K., Abou-Mansour E., Buchala A. i in.** (2010) Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *The Plant Journal*, 62(5): 840-851.

178. **Loehrer M., Langenbach C., Goellner K. i in.** (2008) Characterization of Nonhost Resistance of *Arabidopsis* to the Asian Soybean Rust. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(11): 1421-1430.
179. **Hiruma K., Fukunaga S., Bednarek P. i in.** (2013) Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23): 9589-9594.
180. **Sanchez-Vallet A., Ramos B., Bednarek P. i in.** (2010) Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi. *Plant Journal*, 63(1): 115-127.
181. **Carlucci A., Raimondo M., Santos J. i in.** (2012) *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia*, 28: 34-48.
182. **Stein M., Dittgen J., Sanchez-Rodriguez C. i in.** (2006) *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell*, 18(3): 731-746.
183. **Parisy V., Poinssot B., Owsianowski L. i in.** (2007) Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 49(1): 159-172.
184. **Howden R., Andersen C.R., Goldsbrough P.B. i in.** (1995) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 107(4): 1067-1073.
185. **Lu X.L., Dittgen J., Pislewska-Bednarek M. i in.** (2015) Mutant Allele-Specific Uncoupling of PENETRATION3 Functions Reveals Engagement of the ATP-Binding Cassette Transporter in Distinct Tryptophan Metabolic Pathways. *Plant Physiology*, 168(3): 814-827.
186. **Hiruma K., Onozawa-Komori M., Takahashi F. i in.** (2010) Entry Mode-Dependent Function of an Indole Glucosinolate Pathway in *Arabidopsis* for Nonhost Resistance against Anthracnose Pathogens. *Plant Cell*, 22(7): 2429-2443.
187. **Iven T., Konig S., Singh S. i in.** (2012) Transcriptional Activation and Production of Tryptophan-Derived Secondary Metabolites in *Arabidopsis* Roots Contributes to the Defense against the Fungal Vascular Pathogen *Verticillium longisporum*. *Molecular Plant*, 5(6): 1389-1402.
188. **Klein A.P. i Sattely E.S.** (2017) Biosynthesis of cabbage phytoalexins from indole glucosinolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*.
189. **Bednarek P., Piślewska-Bednarek M., Ver Loren van Themaat E. i in.** (2011) Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives. *New Phytologist*, 192: 713-726.
190. **Dufour V., Stahl M. i Baysse C.** (2015) The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology-Sgm*, 161: 229-243.
191. **Smolinska U., Morra M.J., Knudsen G.R. i in.** (2003) Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*, 87(4): 407-412.
192. **Calmes B., N'Guyen G., Dumur J. i in.** (2015) Glucosinolate-derived isothiocyanates impact mitochondrial function in fungal cells and elicit an oxidative stress response necessary for growth recovery. *Frontiers in Plant Science*, 6: 14.

193. **Andersson M.X., Nilsson A.K., Johansson O.N. i in.** (2015) Involvement of the electrophilic isothiocyanate sulforaphane in *Arabidopsis* local defense responses. *Plant Physiology*, 167(1): 251-261.
194. **Johansson O.N., Fantozzi E., Fahlberg P. i in.** (2014) Role of the penetration-resistance genes *PEN1*, *PEN2* and *PEN3* in the hypersensitive response and race-specific resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 79(3): 466-476.
195. **Pedras M.S.C., Alavi M. i To Q.H.** (2015) Expanding the nasturlexin family: Nasturlexins C and D and their sulfoxides are phytoalexins of the crucifers *Barbarea vulgaris* and *B. verna*. *Phytochemistry*, 118: 131-138.
196. **Glawischnig E., Hansen B.G., Olsen C.E. i in.** (2004) Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21): 8245-8250.
197. **Nafisi M., Goregaoker S., Botanga C.J. i in.** (2007) *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell*, 19(6): 2039-2052.
198. **Millet Y.A., Danna C.H., Clay N.K. i in.** (2010) Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell*, 22(3): 973-990.
199. **Su T., Xu J., Li Y. i in.** (2011) Glutathione-Indole-3-Acetonitrile Is Required for Camalexin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23(1): 364-380.
200. **Bottcher C., Westphal L., Schmotz C. i in.** (2009) The Multifunctional Enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) Converts Cysteine-Indole-3-Acetonitrile to Camalexin in the Indole-3-Acetonitrile Metabolic Network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21(6): 1830-1845.
201. **Bottcher C., Chapman A., Fellermeier F. i in.** (2014) The Biosynthetic Pathway of Indole-3-Carbaldehyde and Indole-3-Carboxylic Acid Derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 165(2): 841-853.
202. **Rajniak J., Barco B., Clay N.K. i in.** (2015) A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. *Nature*, 525(7569): 376-379.
203. **Pedras M.S.C. i Adio A.M.** (2008) Phytoalexins and phytoanticipins from the wild crucifers *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*: Rapalexin A, wasalexins and camalexin. *Phytochemistry*, 69(4): 889-893.
204. **Bednarek P.** (2012) Sulfur-Containing Secondary Metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with Function in Plant Immunity. *Chembiochem*, 13(13): 1846-1859.
205. **Klein N.P. i Sattely E.S.** (2015) Two cytochromes P450 catalyze S-heterocyclizations in cabbage phytoalexin biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 11(11): 837-842.
206. **Ren D.T., Liu Y.D., Yang K.Y. i in.** (2008) A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14): 5638-5643.
207. **Birkenbihl R.P., Diezel C. i Somssich I.E.** (2012) *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiology*, 159(1): 266-285.

208. **Frerigmann H., Glawischnig E. i Gigolashvili T.** (2015) The role of MYB34, MYB51 and MYB122 in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 6: 11.
209. **Glazebrook J. i Ausubel F.M.** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19): 8955-8959.
210. **Kliebenstein D.J., Rowe H.C. i Denby K.J.** (2005) Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant Journal*, 44(1): 25-36.
211. **Smith C.J.** (1996) Accumulation of phytoalexins: Defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist*, 132(1): 1-45.
212. **Rogers E.E., Glazebrook J. i Ausubel F.N.** (1996) Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in Arabidopsis-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(8): 748-757.
213. **Thomma B., Nelissen I., Eggermont K. i in.** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal*, 19(2): 163-171.
214. **Tan J.W., Bednarek P., Liu H.K. i in.** (2004) Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry*, 65(6): 691-699.
215. **Hagemeier J., Schneider B., Oldham N. i in.** (2001) Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2): 753-758.
216. **Muroi A., Ishihara A., Tanaka C. i in.** (2009) Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 230: 517-527.
217. **Vanholme R., Demedts B., Morreel K. i in.** (2010) Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153(3): 895-905.
218. **Bednarek P., Schneider B., Svatos A. i in.** (2005) Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 138(2): 1058-1070.
219. **Raes J., Rohde A., Christensen J.H. i in.** (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(3): 1051-71.
220. **Vogt T.** (2009) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1): 2-20.
221. **Hamberger B. i Hahlbrock K.** (2004) The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 101(7): 2209-2214.
222. **Ehltng J., Buttner D., Wang Q. i in.** (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *The Plant Journal*, 19(1): 9-20.

223. **Hahlbrock K., Bednarek P., Ciolkowski I. i in.** (2003) Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 14569-14576.
224. **Harborne J.B.** (1999) The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4): 335-367.
225. **Demkura P.V. i Ballare C.L.** (2012) UVR8 mediates UV-B-induced *Arabidopsis* defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation. *Molecular Plant*, 5(3): 642-652.
226. **An Y.Y., Feng X.X., Liu L.B. i in.** (2016) ALA-induced flavonols accumulation in guard cells is involved in scavenging H₂O₂ and inhibiting stomata closure in *Arabidopsis* cotyledons. *Frontiers in Plant Science*, 7: 13.
227. **Filkowski J., Kovalchuk O. i Kovalchuk I.** (2004) Genome stability of *vtc1*, *tt4*, and *tt5* *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in protection against oxidative stress. *Plant Journal*, 38(1): 60-69.
228. **Buer C.S. i Muday G.K.** (2004) The transparent *testa4* mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell*, 16(5): 1191-1205.
229. **Schilmiller A.L., Stout J., Weng J.K. i in.** (2009) Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 60(5): 771-782.
230. **Ehltng J., Mattheus N., Aeschliman D.S. i in.** (2005) Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *The Plant Journal*, 42(5): 618-640.
231. **Saito K., Yonekura-Sakakibara K., Nakabayashi R. i in.** (2013) The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72: 21-34.
232. **Bharti A.K. i Khurana J.P.** (1997) Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, 65(5): 765-776.
233. **Sperdouli I. i Moustakas M.** (2012) Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *J Plant Physiol*, 169(6): 577-585.
234. **Zhao Y.D., Hull A.K., Gupta N.R. i in.** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development*, 16(23): 3100-3112.
235. **Ton J. i Mauch-Mani B.** (2004) beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38(1): 119-130.
236. **Kowalski R. i Wolski T.** (2003) Evaluation of phenolic acid content in *Silphium perfoliatum* L. leaves, inflorescences and rhizomes. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series: Horticulture*, 6(1).

237. **Peng H., Yang T., Whitaker B.D. i in.** (2016) Characterization of spermidine hydroxycinnamoyl transferases from eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *Solanum richardii* Dunal. *Horticulture Research*, 3.
238. **Piasecka A., Sawikowska A., Krajewski P. i in.** (2015) Combined mass spectrometric and chromatographic methods for in-depth analysis of phenolic secondary metabolites in barley leaves. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(3): 513-532.
239. **Parveen I., Wilson T., Donnison I.S. i in.** (2013) Potential sources of high value chemicals from leaves, stems and flowers of *Miscanthus sinensis* 'Goliath' and *Miscanthus sacchariflorus*. *Phytochemistry*, 92: 160-167.
240. **Eklund P.C., Backman M.J., Kronberg L.A. i in.** (2008) Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(1): 97-107.
241. **Handrick V., Vogt T. i Frolov A.** (2010) Profiling of hydroxycinnamic acid amides in *Arabidopsis thaliana* pollen by tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(7-8): 2789-2801.
242. **Bak S., Tax F., E., Feldmann K.A. i in.** (2001) CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13(1): 101-111.
243. **Montaut S. i Bleeker R.S.** (2010) Isolation and structure elucidation of 5'-O- β -D-glucopyranosyl-dihydroascorbigen from *Cardamine diphylla* rhizome. *Carbohydrate Research*, 345(13): 1968-1970.
244. **Pedras M.S.C. i Zheng Q.A.** (2010) Metabolic responses of *Thellungiella halophila/salsuginea* to biotic and abiotic stresses: Metabolite profiles and quantitative analyses. *Phytochemistry*, 71: 581-589.
245. **Pedras M.S.C., Zheng Q.A. i Strelkov S.** (2008) Metabolic changes in roots of the oilseed canola infected with the biotroph *Plasmodiophora brassicae*: phytoalexins and phytoanticipins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9949-9961.
246. **Pedras M.S.C. i Ahiahonu P.W.K.** (2002) Probing the phytopathogenic stem rot fungus with phytoalexins and analogues: Unprecedented glucosylation of camalexin and 6-methoxycamalexin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(10): 3307-3312.
247. **Korasick D.A., Enders T.A. i Strader L.C.** (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64(9): 2541-2555.
248. **Stevanovic T., Diouf P.N. i Garcia-Perez M.E.** (2009) Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. *Current Nutrition & Food Science*, 5(4): 264-295.
249. **Landry L.G., Chapple C.C. i Last R.L.** (1995) *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology*, 109(4): 1159-66.
250. **Velasco P., Lema M., Francisco M. i in.** (2013) In Vivo and in Vitro Effects of Secondary Metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecules*, 18(9): 11131-11143.
251. **Macoy D.M., Kim W.Y., Lee S.Y. i in.** (2015) Biotic stress related functions of hydroxycinnamic acid amide in plants. *Journal of Plant Biology*, 58(3): 156-163.

252. **Abdel-Farid I.B., Jahangir M., van den Hondel C. i in.** (2009) Fungal infection-induced metabolites in *Brassica rapa*. *Plant Science*, 176(5): 608-615.
253. **Jahangir M., Kim H.K., Choi Y.H. i in.** (2008) Metabolomic response of *Brassica rapa* submitted to pre-harvest bacterial contamination. *Food Chemistry*, 107(1): 362-368.
254. **Mikulic-Petkovsek M., Krska B., Kiprovski B. i in.** (2017) Bioactive Components and Antioxidant Capacity of Fruits from Nine Sorbus Genotypes. *Journal of Food Science*, 82(3): 647-658.
255. **Blaszczak W., Amarowicz R. i Gorecki A.R.** (2017) Antioxidant capacity, phenolic composition and microbial stability of aronia juice subjected to high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39: 141-147.
256. **Bethke G., Thao A., Xiong G.Y. i in.** (2016) Pectin Biosynthesis Is Critical for Cell Wall Integrity and Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 28(2): 537-556.
257. **Fought L. i Kuc J.A.** (1996) Lack of specificity in plant extracts and chemicals as inducers of systemic resistance in cucumber plants to anthracnose. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 144(1): 1-6.
258. **Walters D.R.** (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64(1): 97-107.
259. **von Röpenack E., Parr A. i Schulze-Lefert P.** (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 9013-9022.
260. **Keller H., Hohlfield H., Wray V. i in.** (1996) Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 42(2): 389-396.
261. **Campos L., Lison P., Lopez-Gresa M.P. i in.** (2014) Transgenic Tomato Plants Overexpressing Tyramine N-Hydroxycinnamoyltransferase Exhibit Elevated Hydroxycinnamic Acid Amide Levels and Enhanced Resistance to *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10): 1159-1169.
262. **Ricci A., Fiorentino A., Piccolella S. i in.** (2010) Structural discrimination of isomeric tetrahydrofuran lignan glucosides by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(7): 979-985.
263. **Bouchereau A., Hamelin J., Lamour I. i in.** (1991) Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied genera. *Phytochemistry*, 30(6): 1873-1881.
264. **Huang J., Gu M., Lai Z. i in.** (2010) Functional Analysis of the Arabidopsis PAL Gene Family in Plant Growth, Development, and Response to Environmental Stress1[W][OA]. *Plant Physiology*, 153(4): 1526-1538.
265. **Mauch-Mani B. i Slusarenko A.J.** (1996) Production of Salicylic Acid Precursors Is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of Arabidopsis to Peronospora parasitica. *Plant Cell*, 8(2): 203-212.
266. **Li Y., Kim J.I., Pysh L. i in.** (2015) Four isoforms of *Arabidopsis* 4-coumarate: CoA ligase have overlapping yet distinct roles in phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiology*, 169(4): 2409-2421.

267. **Furer K., Raith M., Brenneisen R. i in.** (2013) Two New Flavonol Glycosides and a Metabolite Profile of *Bryophyllum pinnatum*, a Phytotherapeutic Used in Obstetrics and Gynaecology. *Planta Medica*, 79(16): 1565-1571.
268. **Yin F., Zhang X.M., Song S.Q. i in.** (2016) Identification of aroma types and their characteristic volatile compounds of Chinese faint-scent cigarettes based on descriptive sensory analysis and GC-MS and partial least squares regression. *European Food Research and Technology*, 242(6): 869-880.
269. **Anthony S.J., Zuchowski W. i Setzer W.N.** (2009) Composition of the Floral Essential Oil of *Brugmansia suaveolens*. *Records of Natural Products*, 3(2): 76-81.
270. **Arens N., Backhaus A., Doll S. i in.** (2016) Non-invasive presymptomatic detection of *Cercospora beticola* infection and identification of early metabolic responses in sugar beet. *Frontiers in Plant Science*, 7: 14.
271. **Bollina V., Kushalappa A.C., Choo T.M. i in.** (2011) Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry. *Plant Molecular Biology*, 77(4-5): 355-370.
272. **Koskimaki J.J., Hokkanen J., Jaakola L. i in.** (2009) Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4): 629-640.
273. **Suharti W.S., Nose A. i Zheng S.H.** (2016) Metabolomic study of two rice lines infected by *Rhizoctonia solani* in negative ion mode by CE/TOF-MS. *J Plant Physiol*, 206: 13-24.
274. **Ward J.L., Forcat S., Beckmann M. i in.** (2010) The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant Journal*, 63(3): 443-457.
275. **Truman W., Zabala M.T. i Grant M.** (2006) Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal*, 46(1): 14-33.