

STRESZCZENIE

Wyspecjalizowane metabolity pochodzące od tryptofanu stanowią jeden z centralnych komponentów odporności roślin Brassicaceae na infekcję, jednak nadal nie jest jasne, w jakim stopniu ich funkcja obronna zależy od aktywności biochemicznej, a nie od przestrzennego i czasowego kontekstu ich akumulacji. Aby odpowiedzieć na to pytanie, zrekonstruowano dwa szlaki biosyntezy fitoaleksyn indolowych w podatnym na infekcję potrójnym mutancie *Arabidopsis thaliana pen2 cyp71a12 cyp71a13*, który posiada defekt w biosyntezie kamaleksyny i pozbawiony jest przed-inwazyjnej gałęzi obrony opartej na glukozynolanach indolowych. Wprowadzone geny kodujące enzymy wybranych szlaków umieszczono pod kontrolą indukowalnych przez patogena, aktywnych w epidermie promotorów *PENETRATION 2 (PEN2)* oraz *CYP81F2*, a uzyskane linie poddano infekcji nekrotroficznym grzybem *Plectosphaerella cucumerina*.

W pierwszej kolejności przekonstruowano natywny szlak kamaleksyny aby zmienić jej komórkową lokalizację. Ekspresja samego genu *CYP71A13*, kodującego pierwszy enzym szlaku, wspierała jedynie niewielką akumulację kamaleksyny. Z kolei równoległa epidermalna ekspresja *CYP71A13* i *Phytoalexin Deficient 3*, kodującego ostatni enzym szlaku, wyraźnie poprawiała domknięcie szlaku w odpowiedzi na infekcję, co wskazuje, że pozostałe wymagane aktywności transferazy *S*-glutationowej oraz γ -glutamylowej peptydazy są indukowane lokalnie i mogą zostać wykorzystane bez dodatkowej inżynierii. Co istotne, ilość produktów hydroksylacji i glikozylacji kamaleksyny w liniach transgenicznym była wyraźnie zwiększona względem roślin typu dzikiego, co wskazuje, że przeniesienie tej fitoaleksyny do epidermy naraża ją na wyższą aktywność detoksykacyjną niż w natywnym miejscu biosyntezy w mezofilu. Pomimo tego częściowego przekierowania, zrekonstruowana gałąź istotnie ograniczała proliferację *P. cucumerina* w porównaniu z mutantem wyjściowym, wykazując, że kamaleksyna zachowuje swoją funkcję obronną w nienatywnym przedziale komórkowym.

Używając tego samego tła genetycznego wprowadzono do *A. thaliana* obcy szlak brassininy z *Brassica rapa*. Co ciekawe, sama ekspresja genu kodującego *S*-metylotransferazę ditiokarbaminianową z *B. rapa* była wystarczająca do wytworzenia brassininy w tle z aktywnym *PEN2*, co wskazuje, że zasadnicza droga od puli glukozynolanów indolowych do pośredniego ditiokarbaminianu jest zachowana między

tymi dwoma gatunkami i nie zależy bezwzględnie od swoistego dla *B. rapa* enzymu hydrolizującego glukozynolany. Ko-ekspresja genu kodującego β -tioglukozydową glukohydrolazę związana z brassiną w *B. rapa* (BABG) dodatkowo zwiększała akumulację brassininy, wskazując, że enzym ten wydajniej uczestniczy w tworzeniu indol-3-ylometylo-ditiokarbaminianu niż natywne enzymy *A. thaliana*. W otrzymanych liniach transgeniczných brassinina była dalej przetwarzana przez natywne enzymy katalizujące hydroksylację i glikozylację. Z kolei tworzenie cyklobraassininy i spirobraassininy wymagało dodatkowej ekspresji odpowiednio *CYP71CR1* i *CYP71CR2* z *B. rapa*. Podobnie jak w przypadku kamaleksyny, linie produkujące brassininę wykazywały istotne ograniczenie proliferacji *P. cucumerina*.

Łącznie wyniki te pokazują, że zarówno natywna, jak i obca indolowa fitoaleksyna mogą zostać funkcjonalnie odtworzone w poddanych infekcji komórkach epidermy podatnego tła *A. thaliana*, gdzie w znaczący sposób ograniczają proliferację patogenu. Wspiera to interpretację, że funkcja odpornościowa metabolitów pochodzących od tryptofanu jest kształtowana głównie przez ich aktywność biochemiczną, a nie przez komórkową lokalizację ich wytwarzania. Dodatkowo nasze wyniki wskazują na BABG jako szczególnie efektywny enzym hydrolizujący glukozynolany do zastosowań w inżynierii fitoaleksyn indolowych u *A. thaliana*.