STRESZCZENIE

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary jest organizmem grzybopodobnym należącym do gromady *Oomycota*. Jako sprawca zarazy ziemniaka, *P. infestans* jest jednym z najgroźniejszych patogenów tej rośliny uprawnej w skali globalnej, przyczyniającym się do strat w uprawach, szacowanych w skali światowej na około 6.5 miliardów $ rocznie. Sukces ekologiczny tego patogenicznego mikroorganizmu może wynikać m.in., ze sprawnego dostosowania metabolicznego na oddziałujące bodźce środowiskowe, takie jak niekorzystne czynniki abiotyczne lub organizm rośliny-gospodarza. Dotychczasowa wiedza na temat wpływu stresów abiotycznych i mikro-środowiska roślin żywicielskich na (pato)biologię fitopatogenów, w tym *P. infestans*, pozostaje jednak bardzo ograniczona.

Jedną z najwcześniejszych reakcji organizmu na działanie stresowych czynników środowiskowych jest wzmożone formowanie reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA), które prowadzi do zaburzenia równowagi redoks, czego efektem jest indukcja stresu nitro-oksydacyjnego. Należy zatem założyć, że podtrzymanie prawidłowego funkcjonowania komórki, przekładające się na adaptację do bytowania patogenicznego mikroorganizmu w niekorzystnych warunkach środowiska, jest możliwe dzięki przeprogramowaniu metabolicznemu, które prowadzi m.in. do efektywnego pomniejszania nadmiernej ilości RFT i RFA, a w konsekwencji utrzymania komórkowej homeostazy redoks. Powyższa sekwencja zdarzeń nie została, jak dotąd, rozpoznana u fitopatogenicznych lęgniowców. W związku z powyższym, nadrzędnym celem pracy doktorskiej była charakterystyka zmian metabolicznych u *P. infestans* w odpowiedzi na stres nitro-oksydacyjny indukowany podczas interakcji tego modelowego lęgniowca ze środowiskiem, tj., z mikro-środowiskiem rośliny-gospodarza i niezależnie środowiskiem wzbogaconym w metal ciężki. Doświadczenia prowadzono na strzępkach dwóch izolatów *P. infestans*, tj., awirulentnym (avr MP 946) i wirulentnym (vr MP 977) względem odmiany ziemniaka 'Sarpo Mira'. W celu indukcji stresu nitro-oksydacyjnego patogen wzrastał w obecności jonów kadmu (Cd), natomiast, aby zaindukować stres nitrozacyjny w warunkach *in vitro*, patogen egzystował w obecności związków donorowych RFA.

Pierwszy etap badań skoncentrowany był na określeniu wpływu jonów Cd na status nitro-oksydacyjny w strukturach vr *P. infestans*. Na podstawie wyznaczonego indeksu tolerancji względem jonów Cd do dalszych analiz wybrano dwa stężenia, tj., 5 i 12.5 mg/l, odzwierciedlające odpowiednio umiarkowany i subletalny stres kadmowy. Hamowanie

wzrostu *P. infestans* w warunkach *in vitro* było skorelowane ze wzmożonym generowaniem RFT i RFA w strukturach patogena oraz zmianami w puli nitro-oksydacyjnych modyfikacji kwasów nukleinowych i białek. Umiarkowany stres kadmowy (Cd 5 mg/l) prowadził do zwiększenia poziomu 8-nitroguaniny tylko w DNA oraz do zmniejszenia puli nitrowanych białek. Stres subletalny (Cd 12.5 mg/l) powodował z kolei wzrost poziomu 8-nitroguaniny zarówno w RNA, jak i DNA oraz odpowiadał za zwiększenie puli nitrowanych i oksydowanych białek. Dalsze analizy wykazały, że indukowany niższym stężeniem Cd stres nitro-oksydacyjny skutkował zwiększoną ekspresją genu dysmutazy ponadtlenkowej (*SOD*), która była skorelowana z indukcją aktywności enzymatycznej SOD. Wzrost aktywności enzymatycznej, w następstwie ekspozycji patogena na Cd, zanotowano także w przypadku katalazy (CAT), czemu towarzyszył modyfikowany przez Cd wzór izoenzymatyczny. Poszukując korelacji między zależnymi od Cd zmianami w statusie nitro-oksydacyjnym, a stopniem patogeniczności vr *P. infestans*, wykazano, że umiarkowany stres kadmowy znacząco zwiększył tempo rozwoju zarazy ziemniaka na liściach testowanych odmian.

W trakcie kolejnych etapów badań skupiono się na identyfikacji elementów systemu unieczynniającego RFA (systemu antynitrozacyjnego) w strukturach avr/vr *P. infestans* w środowisku farmakologicznie wzbogaconym w RFA oraz podczas kolonizacji tkanek rośliny-gospodarza. W pierwszym etapie tej części badań na podstawie tempa wzrostu kultury *in vitro* w obecności związków donorowych tlenku azotu (NO) i nadtlenoazotynu ($ONOO^-$), wyznaczony został próg tolerancji *P. infestans* względem RFA. Następnie, aby zweryfikować, czy i na ile *P. infestans* unieczynnia NO i $ONOO^-$, przeprowadzono analizy detoksyfikacji obu RFA. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że zarówno stres nitrozacyjny *in vitro*, jak i wzrost *in planta* wzmaga zdolność vr *P. infestans* do dekompozycji NO. W strukturach avr *P. infestans* w obecności donora $ONOO^-$ oraz podczas wzrostu *in planta* odnotowano natomiast zwiększoną zdolność do dekompozycji nadtlenoazotynu. W toku dalszych analiz wykazano, że do sensorów metabolicznych zaangażowanych w skuteczne unieczynnianie RFA w strukturach *P. infestans* należą reduktaza S-nitrozoglutationu (GSNOR), dioksygenaza NO (NOD) oraz peroksyredoksyna 2 (PRX2). Efektywność komponentów systemu antynitrozacyjnego była zależna od wzorca wirulencji patogena. U izolatu awirulentnego obserwowano wyższą ekspresję *PRX2*, a w warunkach *in planta* również wyższą ekspresję *Pi-NOD*. W strukturach vr *P. infestans* odnotowano wyższą aktywność GSNOR. Co istotne, po raz pierwszy u lęgniowców wykazano, że NOD jest jednym z elementów systemu antynitrozacyjnego, a jego funkcja

jest związana z kontrolą poziomu endogennego NO podczas procesów rozwojowych oraz wczesnych etapów infekcji.

Podsumowując wyniki uzyskane w ramach przedstawianej dysertacji, należy podkreślić wysoką plastyczność *P. infestans* i przystosowanie metaboliczne do bytowania w niesprzyjających warunkach nitro-oksydacyjnych. Wykazano, że indukcja systemów antyoksydacyjnych i antynitrozacyjnych, umożliwia patogenowi przetrwanie w otoczeniu wzbogaconym w Cd oraz w mikro-środowisku rośliny-gospodarza. Odnotowane zmiany mogą również wpływać na stopień patogeniczności *P. infestans*.

Słowa kluczowe: stres nitro-oksydacyjny, reaktywne formy tlenu i azotu, kadm, dioksygenaza tlenku azotu, *Phytophthora infestans*