

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Funkcje nadtlenoazotynu w odporności liści ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

W odpowiedzi na atak patogenicznego mikroorganizmu w komórkach roślinnych dochodzi m.in. do generowania tlenku azotu (NO), co może prowadzić do formowania innych reaktywnych form azotu (RFA), spośród których największe znaczenie biologiczne przypisywane jest nadtlenoazotynowi (ONOO^-). Wiedza dotycząca funkcjonalności tej pochodnej NO u roślin, szczególnie w interakcji roślina – patogen, pozostaje bardzo ograniczona, stąd nadrzędnym celem pracy doktorskiej było zweryfikowanie udziału nadtlenoazotynu oraz poznanie funkcjonalnych modyfikacji wywołanych za pośrednictwem tej reaktywnej formy azotu w odporności liści ziemniaka na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Doświadczenia prowadzono na liściach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) odmian skrajnie różniących się odpornością na *P. infestans*, lęgniowca będącego sprawcą zarazy ziemniaka. Układ badawczy pozwolił zatem określić, na ile zdarzenia metaboliczne zależne od ONOO^- towarzyszą aktywacji skutecznych odpowiedzi obronnych w odporności typu ETI indukowanej przez efekторы patogena (ang. *Effector-Triggered Immunity*), a na ile odpowiedziom obronnym w odporności określanej jako bazowa PTI (ang. *PAMP-Triggered Immunity*; *PAMP-Pathogen-Associated Molecular Patterns*), która zaangażowana jest w rozpoznawanie konserwatywnych czynników pochodzących od patogena.

Eksperymenty przeprowadzone w pierwszym etapie badań wykazały, że głównym źródłem biosyntezy NO w liściach ziemniaka jest reduktaza azotanowa (NR), a zależna od NR nadprodukcja NO wraz z akumulacją anionorodnika ponadtlenkowego prowadzi do formowania ONOO^- w odpowiedzi na *P. infestans*. Wykorzystując precyzyjne metody detekcji nadtlenoazotynu stwierdzono różnice międzyodmianowe w kinetyce generowanego ONOO^- . Odmiana odporna charakteryzowała się wczesnym i okresowym formowaniem tej RFA, natomiast w odmianie podatnej podwyższony poziom ONOO^- obserwowano zdecydowanie później tj. dopiero w pierwszej dobie po inokulacji. Poinfekcyjna akumulacja nadtlenoazotynu korelowała w czasie ze wzrostem ekspresji peroksydazy tioredoksyny (*TPx*), wskazując na potencjalne zaangażowanie produktu *TPx* w kontrolę endogennego poziomu ONOO^- u obu odmian ziemniaka.

W oparciu o sekwencyjne traktowanie liści odmiany podatnej donorem ONOO^- i *P. infestans* stwierdzono, że podwyższony poziom ONOO^- we wczesnych godzinach po inokulacji sprzyja ograniczeniu kolonizacji tkanek rośliny-gospodarza przez patogen m.in. na

drodze szybszej i bardziej efektywnej akumulacji mRNA dla *PR-1* oraz *PR-2*, uznawanych za kluczowe markery odpowiedzi obronnej rośliny na stres biotyczny.

Poinfekcyjny charakter generowania nadtlenoazotynu odzwierciedlał akumulację nitrowanych białek w liściach obu odmian ziemniaka. Stąd, w odmianie odpornej obserwowano wczesną i przejściową akumulację modyfikowanych *via* ONOO⁻ białek. Ponadto analizy nitroproteomu liści odmiany odpornej wykazały akumulację białek podobnych do subtylizyny (SBT5.3, SBT1.7) w komórkach otaczających strefę reakcji nadwrażliwości. W toku dalszych analiz nad poszukiwaniem związków modyfikowanych *via* ONOO⁻ wykazano, że inokulacja liści *P. infestans* prowadzi do nitrowania kwasów nukleinowych tj. RNA i mRNA. W oparciu o detekcję 8-nitroguaniny, po raz pierwszy w świecie roślin udokumentowano, obecność nitro-RNA oraz nitro-mRNA. Analiza porównawcza pomiędzy genotypem odpornym a podatnym wskazała na okresowy, istotnie wyższy poziom nitrowanego RNA oraz mRNA w inokulowanych liściach odmiany odpornej. Ponadto, zastosowanie zmiataczy endogennego ONOO⁻ prowadziło do obniżenia poziomu nitrowanego mRNA oraz ograniczenia liczby komórek wykazujących reakcję TUNEL-pozytywną.

Podsumowując uzyskane wyniki należy stwierdzić, iż wczesna i okresowa, akumulacja ONOO⁻ w liściach ziemniaka odgrywa istotną rolę w odporności na *P. infestans*, zarówno poprzez selektywne nitrowanie białek, jak i kwasów nukleinowych, zaangażowanych w regulację zasięgu programowanej śmierci komórek ziemniaka oraz ekspresji genów *PRs*.

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

Functions of peroxynitrite in resistance of potato leaves (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

As a reaction to the attack of pathogenic microorganism plant cells generate nitric oxide (NO), which may lead to the formation of other reactive nitrogen species (RNS), among which the greatest biological significance is attributed to peroxynitrite (ONOO⁻). As far as plants are concerned the knowledge related to the functionality of this NO-derivative, particularly during a plant-pathogen interaction remains very limited, hence, the overriding aim of the doctoral thesis was to verify participation of ONOO⁻ and the recognition of the functional modifications caused by the RNS in the resistance phenomenon of potato leaves to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Experiments were conducted on the potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves of cultivars, whose resistance radically differs to *P. infestans*, an oomycete pathogen causing late blight disease. Thus, the research system allowed to determine to what extent ONOO⁻-dependent metabolic events accompany effective defense responses in effector-triggered immunity (ETI) as well as the extent of the defense during pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that trigger immunity (PTI) which is involved in the recognition of conserved pathogen-derived factors.

Experiments carried out in the first stage of the study showed that nitrate reductase (NR) is the main source of NO biosynthesis in potato leaves. Moreover, NR-dependent NO overproduction together with the accumulation of superoxide anion leads to the formation of ONOO⁻ in response to *P. infestans*. The adoption of precise ONOO⁻ detection methods, has led to recognizing the contrasting kinetics of ONOO⁻ generation in both potato cultivars. The resistant genotype was characterized by the early and transient formation of ONOO⁻ whereas in the susceptible one, an elevated level of ONOO⁻ was observed much later, i.e. after the first 24 hours after the inoculation. The postinfectious ONOO⁻ accumulation was correlated in time with thioredoxin peroxidase (*TPx*) gene expression, potentially implicating TPx in the control of endogenous ONOO⁻ in both potato cultivars.

The next step of the study subjected the susceptible potato leaves to the sequential treatment with the ONOO⁻ donor and *P. infestans* it has revealed that an elevated level of ONOO⁻ in the early stages after inoculation is conducive to slowing down colonization of the host tissues by the pathogen, mainly *via* a faster and stronger up-regulation of *PR-1* and *PR-2* mRNA level, which are considered to be key markers of the plant's defense against the pathogen.

The post-infectious nature of the ONOO⁻ formation reflected the accumulation of nitrated proteins in the leaves of both potato cultivars. Hence, an early and transient accumulation of the ONOO⁻-modified proteins was observed in the resistant genotype. Moreover, the analyses of nitroproteome in leaves of the resistant cultivar have indicated the accumulation of subtilisin-like proteins (SBT5.3, SBT1.7) in the cells which surrounded the hypersensitive reaction zone. In the course of further analysis to find compounds modified *via* ONOO⁻, it was revealed that the inoculation of leaves by *P. infestans* leads to nucleic acids nitration, i.e. RNA and mRNA. Based on the 8-nitroguanine detection, the presence of nitro-RNA and nitro-mRNA was documented, for the first time, in plants. The comparative analysis has indicated a transient and significantly higher level of nitrated RNA and mRNA in the leaves of resistant genotype after inoculation. Furthermore, the use of endogenous ONOO⁻ scavengers has led to lowering the level of nitrated mRNA and reducing the number of cells exhibiting a TUNEL-positive reaction.

To summarise the obtained results, it should be noted that the early and transient accumulation of ONOO⁻ in the potato leaves plays a crucial role in the resistance to *P. infestans*, both by the selective nitration of proteins as well as nucleic acids involved in the regulation of the programmed cell death range and the expression of *PR* genes.