Streszczenie

Kiła kapusty jest chorobą występującą głównie u roślin z rodziny kapustowatych, na skutek infekcji przez biotroficznego pierwotniaka *Plasmodiophora brassicae*. Charakterystycznym symptomem rozwoju choroby jest powstawanie narośli na podziemnych organach roślin. Jako że, popularny gatunek modelowy – rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana* L.) również należy do rodziny kapustowatych, jest on porażany przez *P. brassicae* i stanowi doskonały obiekt do badań funkcjonalnych pozwalających na głębokie zrozumienie interakcji.

Narośl tworząca się na skutek rozwoju choroby stanowi silną niszę fizjologiczną zapewniającą odżywienie rozwijającemu się patogenowi. Do pewnego stopnia możliwe jest to dzięki silnemu przeprogramowaniu istniejących aktywności merystematycznych w tym rejonie, skutkującemu zwiększeniem ilości oraz rozmiarów komórek, a także zmianą wzorca różnicowania tkanek waskularnych. W rozwijających się naroślach dochodzi do supresji rozwoju ksylemu, podczas gdy komórki floemu silnie proliferują, co skutkuje zwiększeniem ich liczebności.

Pełne zrozumienie tego w jaki sposób infekcja roślin przez *P. brassicae* prowadzi do wyżej opisanego, charakterystycznego, przeprogramowania wymaga głębokich analiz funkcjonalnych i obserwacji anatomicznych. W tym celu niezbędne jest opracowanie standardowych metod eksperymentalnych, dzięki którym możliwe jest obserwowanie i śledzenie na poziomie komórkowym wewnętrznych zmian towarzyszących rozwojowi narośli. Dlatego właśnie pierwsze etapy pracy dotyczyły optymalizacji istniejących metod utrwalania oraz prześwietlania narośli, której celem było stworzenie powtarzalnej i skutecznej techniki pozwalającej na obserwację akumulacji białek, lub transkryptów z wykorzystaniem reporterowych genów kodujących białka fluorescencyjne. Procedurę również testowano pod kątem wykorzystania barwników fluorescencyjnych.

Dzięki opracowaniu metod wizualizacji możliwe było przejście do kolejnej części projektu dotyczącej zrozumienia roli czynników transkrypcyjnych PHLOEM EARLY DOF (PEAR) w, obserwowanej w naroślach, ektopicznej proliferacji floemu. W pracy skupiono się na trzech genach PEAR - *PEAR1*, *DOF6*, oraz *HIGH CAMBIAL ACTIVITY2* (*HCA2*), dla których stwierdzono nasiloną ekspresję podczas wcześniejszych eksperymentów transkryptomicznych. Obserwacje te potwierdzono w niniejszej pracy z wykorzystaniem linii reporterowych pozwalających na zbadanie aktywności promotorów wyżej wymienionych genów. Następnie przystąpiono do analizy efektu mutacji poszczególnych z badanych genów na możliwość

aktywacji proliferacji floemu w trakcie infekcji przez *P. brassicae*. W badaniach tych stwierdzono, że pomimo silnego wpływu na rozwój tkanki waskularnej, zarówno pojedyncze, jak i skumulowane mutacje nie prowadziły do supresji proliferacji floemu w rozwijających się naroślach. Wynik ten wskazuje na to, że obserwowane nasilenie aktywności badanych genów prawdopodobnie odzwierciedla zmiany w nadrzędnych szlakach regulatorowych. Uwzględniwszy to, że dotychczas potwierdzono wpływ cytokinin i auksyn na regulację aktywności genów *PEAR* w trakcie rozwoju tkanki waskularnej w korzeniach, w niniejszej pracy postanowiono przeanalizować wzorce aktywności markerów fluorescencyjnych, pozwalających na wizualizację obecności auksyny (*DR5*) oraz cytokininy (*TCS* oraz *ARR5*), oraz aktywacji kaskad sygnałowych dla tych fitohormonów. W ten sposób stwierdzono, ze w trakcie rozwoju narośli dochodzi do silnej indukcji odpowiedzi na auksynę, podczas gdy reakcja na cytokininę drastycznie spada. Następnie, w celu dalszego zrozumienia udziału auksyny w indukowanym przez patogen przeprogramowaniu rozwoju tkanki waskularnej, przeprowadzono eksperyment, w którym zastosowano inhibitory chemiczne pozwalające na zaburzenie homeostazy auksyny w trakcie rozwoju choroby. W tym celu jako obiekt do obserwacji wykorzystano linie transgeniczne rzodkiewnika z wprowadzonym markerem fluorescencyjnym dla aktywności genu *DOF6*, dla którego stwierdzono silną indukcję w trakcie rozwoju narośli. Pomimo tego, że zastosowanie inhibitorów skutkowało drastycznymi zaburzeniami rozwojowymi, u roślin zainfekowanych przez *P. brassicae* nadal obserwowano nasilenie ekspresji genu *DOF6*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że nasilenie ekspresji badanych genów *PEAR* nie stanowi mechanizmu w sposób bezpośredni prowadzącego do proliferacji floemu w trakcie rozwoju narośli indukowanej przez *P. brassicae*. Przeciwnie, przeprogramowanie aktywności transkrypcyjnej tychże genów następuje na skutek aktywacji nadrzędnych mechanizmów regulatorowych prowadzącej do kumulacji efektów rozwojowych, wynikających z zaburzenia losu komórek, które może mieć związek ze zmianą postępu cyklu komórkowego, wpływającą na wejście komórek na szlak różnicowania floemu.