

KYSELINA ŠŤAVELOVÁ AKO FAKTOR ROZVOJA PATOGÉNA *SCLEROTINIA* *SCLEROTIORUM*

DOMINIKA GAJDOVÁ
Katedra ochrany rastlín
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

ABSTRAKT

Huba *Sclerotinia sclerotiorum* potrebuje k efektívnej patogenéze vylučovanie kyseliny šťavelovej. Uskutočnili sa štúdie, ktorých úlohou bolo určiť, či oxalát napomáha patogénnej kompatibilite moduláciou oxidačného stresu hostiteľskej rastliny. Očkovanie tabakových listov s nepatogénnym mutantom *S. sclerotiorum* s nedostatkom oxalátu vyvolalo merateľné hodnoty oxidačnej biosyntézy, ale očkovanie kmeňom, ktorý oxalát vylučuje, takéto hodnoty nevykazoval. Oxalát inhiboval produkciu H₂O₂ v kultivovaných líniách buniek tabaku a sóje s priemernou inhibičnou koncentráciou asi 4 až 5 mM a koncentráciu nižšiu ako bola nameraná v preparátoch virulentnej huby. Niekoľko pozorovaní naznačuje, že inhibičný efekt kyseliny šťavelovej je z veľkej časti nezávislý ako od jej kyslosti, tak aj od jej podobnosti s Ca²⁺. Tieto a ďalšie údaje dokazujú, že kyselina šťavelová môže na jednej strane inhibovať signalizáciu pri tvorbe oxidázy, a na druhej strane aktivovať príjem Ca²⁺ do rastlinných buniek.

Úvod

Sclerotinia sclerotiorum je všadeprítomná fytopatogénna huba z kmeňa *Ascomycota* schopná infikovať široký okruh rastlín (Boland, Hall, 1994; Bolton et al., 2006). Táto huba patrí medzi najviac ničujúcich a kozmopolitných rastlinných patogénov, pričom existuje viac ako 60 názvov používaných pri opisovaní príznakov tohto patogénu, z ktorých najpoužívanejší názov je biela hniloba (Bolton et al., 2005).

Všeobecná neschopnosť ekonomicky dôležitých poľnohospodárskych plodín vyvinúť zárodočnú plazmu, ktorá by bola odolná voči tomuto patogénovi, zameriava pozornosť na potrebu podrobnejšieho pochopenia patogénnych faktorov, ktoré zapríčiňujú rozvoj ochorenia. Kyselina šťavelová vylučovaná rodom *Sclerotinia* sa javí ako základný determinant jej patogenity. Dôkazy pre tento vzťah sú založené na obnovovaní milimolárnych koncentrácií oxalátu z infikovaných pletív a na manuálnej injekcii kyselinou šťavelovou, alebo kultivačným filtrátom obsahujúcim oxalát, do rastlín, a následným pozorovaním rozvoja symptómov ochorenia nezávisle od patogéna (Davidson et al., 2016; Cessna et al., 2000).

Takýto korelačný dôkaz bol posilnený poznatkom, že mutanty *Sclerotinia*, ktoré nie sú schopné syntetizovať oxalát, sú nepatogénne, zatiaľ čo kmene, ktoré si oxalát dokážu tvoriť biosyntézou, vykazujú normálnu virulenciu. Dôležité je, že hlavným, ak nie jediným,

rozdielom medzi týmito kmeňmi je ich schopnosť syntetizovať a vylučovať kyselinu šťavelovú (Godoy et al., 1990).

Metodika práce

Pre vypracovanie predloženej semestrálnej práce boli použité materiály a výsledky z prác a štúdií, ktoré sú voľne dostupné na internete, pričom sa jednalo o vedecké články zahraničného pôvodu. K vyhľadávaniu sme využili Google Scholar a databázy dostupné na stránke SLPK. Získané údaje sme spracovali do predloženej práce, ktorá bola vypracovaná ako kompilát.

Výsledky práce

Súčasný výskum vplyvu kyseliny šťavelovej na podporu virulencie *S. sclerotiorum* sa zameriava na 3 hypotézy o účinku tejto kyseliny, pričom každá hypotéza má rovnako podporné dôkazy, ako aj protiargumenty:

1. Oxalát môže napomáhať virulencii posunom apoplastického pH na hodnoty, ktoré sú vhodnejšie pre enzymatickú degradáciu bunkovej steny rastlín. K tomuto názoru vedci dospeli na základe toho, že niektoré z hubových enzýmov, ktoré sú vylučované počas prieniku do rastlinných pletív, majú najväčšiu aktivitu pri nízkych hodnotách pH.
2. Kyselina šťavelová, podľa všetkého kvôli svojej kyslosti, môže byť priamo toxická pre hostiteľské rastliny. Sekrécia oxalátu má význam v oslabovaní hostiteľskej rastliny, v dôsledku čoho sa uľahčuje samotné preniknutie patogénom do rastliny.
3. Vylučovanie Ca^{2+} bunkovej steny oxalátovým aniónom bolo navrhnuté tak, aby narušilo funkciu obranných mechanizmov závislých od Ca^{2+} a oslabilo tak rastlinnú bunkovú stenu (Cessna et al., 2000).

Jednou z najskorších odoziev na rezistenciu vložených infikovaných rastlinných pletív proti napádajúcemu mikróbu je jav, ktorý sa nazýva oxidačný stres (z ang. *oxidative burst*), teda včasnú reakciu spojenú s ochranou rastlín, ako vysvetľuje Chen et al. (2013). Oxidačný stres predstavuje riadené uvoľňovanie O_2 a H_2O_2 v mieste vniknutia patogénov. Predpokladá sa, že tento jav je potrebný na prejavenie sa niekoľkých následných obranných reakcií a je prirodzený pre väčšinu, ak nie pre všetky rastlinné druhy. Wojtaszek (1997) tvrdí, že aby oxalát potlačil túto odozvu, musel by buď priamo inhibovať oxidázu, ktorá aktivuje voľné radikály, alebo blokovať signalizačný krok vedúci k aktivácii oxidázy.

Oxidačný stres je potlačený pri nízkych hodnotách pH a vyžaduje zvýšenie cytosolického Ca^{2+} . Pretože uvoľňovanie oxalátu, vďaka svojej silnej kyslosti, by mohlo mať za následok zníženie pH (Xu et al., 2015) a vylučovanie kationov Ca^{2+} , predpokladáme, že kyselina šťavelová môže zvýšiť hubovú patogenitu inhibíciou oxidačného stresu hostiteľskej rastliny (Cessna et al., 2000).

Zistilo sa, že *Sclerotinia* dokáže meniť redoxné prostredie hostiteľskej rastliny tak, aby sa predišlo detekcii (Williams et al., 2011). Počas počiatočných štádií infekcie hubou *S. sclerotiorum* vytvára tento patogén pomocou kyseliny šťavelovej redukujúce prostredie v hostiteľských bunkách, ktoré potláča oxidačný stres. Akonáhle je vyvolaná infekcia, patogénom spustené reaktívne zmeny kyslíka (ROS) vedú k naprogramovanej smrti buniek (PCD), a mŕtve pletivá sú prínosom pre rast a vývoj huby počas nekrotického parazitizmu (Chen et al., 2013).

Skúmanie mechanizmu inhibície oxalátom

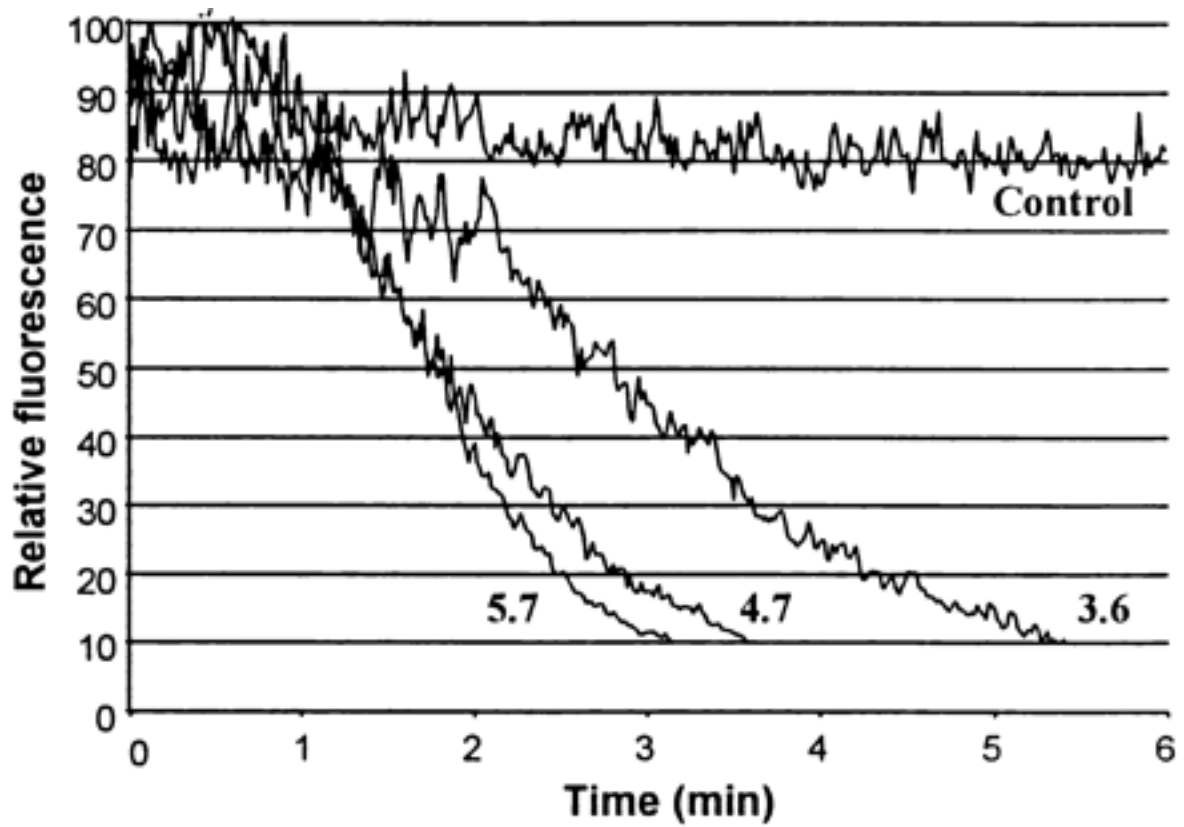
Hoci štúdie o zvyšovaní hubovej patogenity vplyvom kyseliny šťavelovej neboli presvedčivé, najviac hypotéz sa sústredilo na možný efekt kyseliny šťavelovej na rastlinné bunky s ich Ca^{2+} a apoplastické pH. V skutočnosti sa zistilo, že filtráty húb *Sclerotinia* kmeňov A-1 deficitným na oxalát a 1980, ktorý oxalát produkoval, mali pH 4,7 a 3,6 v tomto poradí, čo naznačuje, že akumulácia oxalátu mala očakávaný účinok na kyslosť filtrátov. Na to, aby sme mohli posúdiť, či veľkosť tejto zmeny pH je dostatočná na ovplyvnenie aktivity oxidačného stresu, znížili sme pH suspenzií tabakových buniek a porovnali rýchlosti ich biosyntézy H_2O_2 s kontrolnými suspenziami pri normálnom pH 5,7. Ako je znázornené na obrázku č. 1, znižovanie pH média na 3,6 skutočne viedlo k väčšej inhibícii aktivity oxidačného stresu než môžeme vidieť pri pH média 4,7. Avšak ani pH nebolo takým silným inhibítorom ako podávanie oxalátu, a či sa tak nízke hodnoty pH môžu naozaj nachádzať na rastlinných pletivách je tiež neurčité. Pretože oxalát zostáva silným supresorom oxidačného stresu dokonca aj pri vyšších hodnotách pH, musia byť rozhodujúce ďalšie mechanizmy inhibície ako acidifikácia apoplastu (Cessna et al., 2000).

Zdá sa, že *Sclerotinia* si vylučovaním kyseliny šťavelovej zabezpečuje dve protichodné funkcie. Počas počiatočných štádií infekcie redukčné podmienky sú indikátorom, že môže byť potlačený oxidačný stres, obrana hostiteľa, a možno aj ďalšie procesy hostiteľskej rastliny. Avšak akonáhle sa začne infekcia, vzniknú podmienky pre oxidáciu ako odpoveď na infekciu hubou, a nastáva smrť buniek. Týmto spôsobom využíva *Sclerotinia* kyselinu šťavelovú ako signalizačnú molekulu pre riadenie smeru redoxného prostredia hostiteľa, obranných reakcií rastliny a tiež ciest k smrti buniek (Williams et al., 2011).

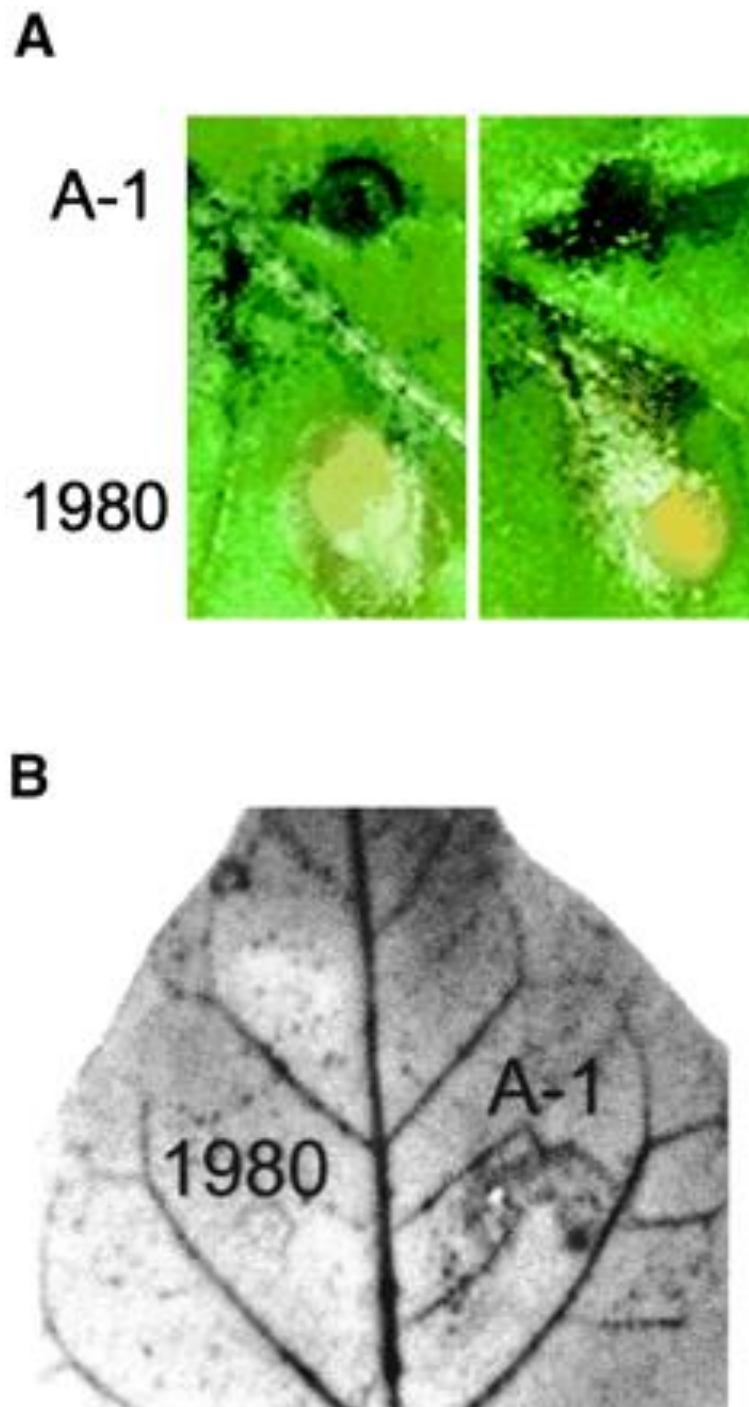
Použitá literatúra

1. BOLAND, G. J. – HALL, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. In *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. 1994. [cit. 2017-10-18] 2017. Dostupné na <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060669409500766?journalCode=tcjp20> internete:
2. BOLTON, M. D. et al. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. In *Molecular Plant Pathology* [online]. 2006, 7: 1–16. [cit. 2017-10-20]. Dostupné na internete: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x/full>
3. CESSNA, S. G. et al. 2000. Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of Host Plant. In *The Plant Cell* [online]. 2000, vol. 12, 2191 – 2199. [cit. 2017-10-18] Dostupné na internete: <http://www.plantcell.org/content/plantcell/12/11/2191.full.pdf>
4. CHEN, X. et al. 2013. Overexpression of *AtWRKY28* and *AtWRKY75* in *Arabidopsis* enhances resistance to oxalic acid and *Sclerotinia sclerotiorum*. In *Plant Cell Rep* [online]. 2013, vol. 32, issue 10, pp. 1589 – 1599. [cit. 2017-10-23] Dostupné na internete: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-013-1469-3#citeas>

5. DAVIDSON, A. L. et al. 2016. *Histopathology of Sclerotinia sclerotiorum infection and oxalic acid function in susceptible and resistant soybean* [online]. 2016 [cit. 2017-10-20] Dostupné na internete: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12514/pdf>
6. GODOY, G. et al. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. In *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1990, vol. 37, s. 179–191.
7. SIMMONDS, J. et al. 2004. Oxalate oxidase: a novel reporter gene for monocot and dicot transformations. In *Molecular Breeding* [online]. 2004, vol. 13, s. 79 – 91. [cit. 2017-10-20] Dostupné na internete: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FB%3AMOLB.0000012877.45556.09.pdf>
8. WILLIAMS, B. et al. 2011. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment [online]. 2011. [cit. 2017-10-24] Dostupné na internete: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002107>
9. WOJTASZEK, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. In *Biochemical Journal*, 1997. vol. 322, č. 3, s. 681 – 692
10. XU, L. et al. 2015. pH dependency of sclerotial development and pathogenicity revealed by using genetically defined oxalate-minus mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* [online]. 2015, *Environmental Microbiology* 17, 2896–2909. [2017-24-10] Dostupné na internete: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.12818/full>



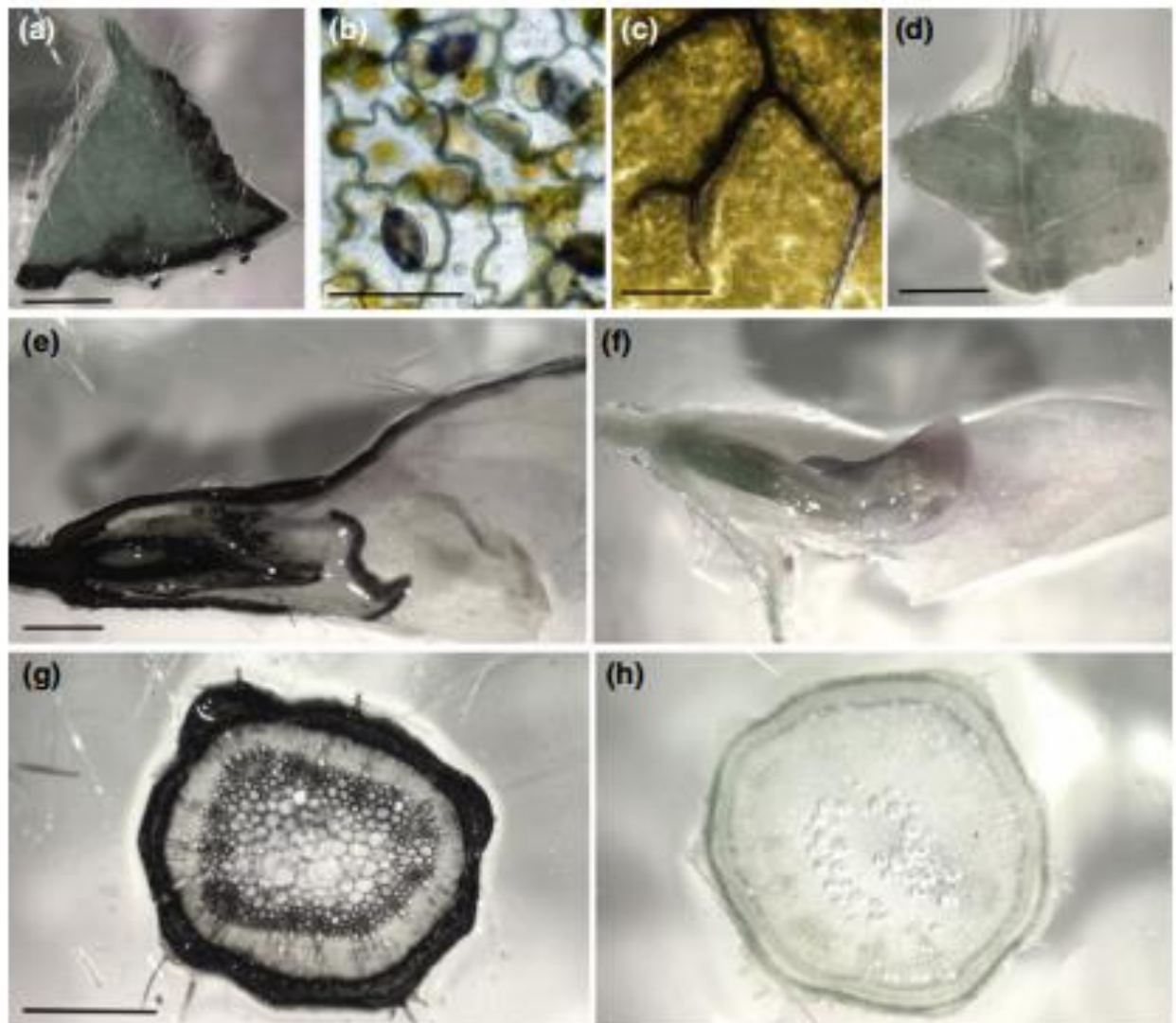
Obrázok č. 1: Efekt znižovania pH média na elicitorom vyvolaný oxidačný stres (Cessna et al., 2000)



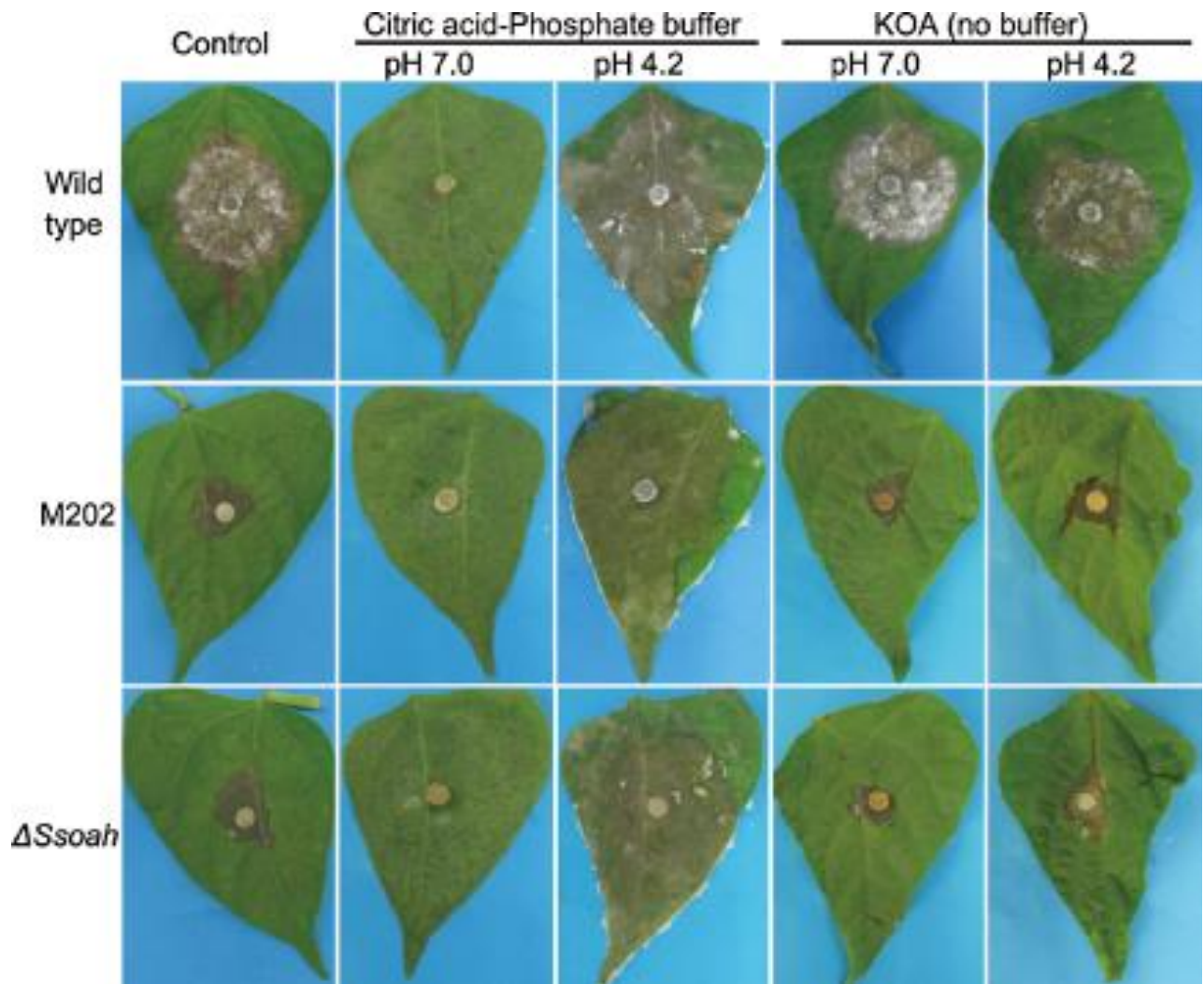
Obrázok č. 2: Odlišná akumulácia oxidantov v infikovaných listoch kmeňmi patogénnej huby *Sclerotinia*, ktoré produkujú oxalát (1980) a kmeňmi deficitnými na oxalát (A-1).

(A) Tabakové listy ošetrované NTB boli infikované mutantom *Sclerotinia* A-1 a divým typom 1980 z oboch strán ich primárnych listových žilnatín.

(B) Tabakový list inokulovaný ako v prípade (A) sa premyl etanolom, aby sa odstránil chlorofyl a následne sa odfotografoval, pričom etanol zmyl všetok hubový materiál (Cessna et al., 2000).



Obrázok č. 3: Listové, stonkové a kvetové pletivá OxO – OE a WT rastlín sóje farbené použitím 4-chlór-1naftol. Oblasti tmavo purpurového zafarbenia indikujú aktivitu OxO. (a) Časť listu s OxO – OE vykazuje aktivitu OxO na odtrhnutých okrajoch; (b) zafarbenie transdermálnej sekcii listu OxO – OE prezrádza aktivitu OxO v bunkových stenách, prieduchoch a (c) v cievnych zväzkoch. (d) Pri časti WT listu testovacieho roztoku chýba aktivita OxO; (e) Pozdĺžne narezané OxO – OE kvety vykazujú OxO aktivitu na všetkých hlavných pletivách a (f) absenciu aktivity OxO v pletivách WT kvetov. Priečne rezané kmeňové pletivá OxO – OE kvetov (g) a WT kvetov (h) v testovacom roztoku odhalili špecifickú aktivitu OxO. (g) Kmene OxO – OE mali aktivitu OxO v bunkových stenách všetkých pletív. (h) Kmene WT vykazovali slabé nešpecifické zafarbenie kambia a floému. Stupnica: 10 mm pre (a), (d), (g) a (h); 20 mm pre (b); 2 mm pre (c); 1 mm pre (e) a (f) (Davidson, A.L. et al., 2016).



Obrázok č. 4: Závislosť virulencie *S. sclerotiorum* od nízkeho pH, ale nie od oxalátu. Okyseľovanie hostiteľských pletív zvyšuje virulenciu mutantov *S. sclerotiorum*, zatiaľ čo dopĺňovanie oxalátu toto nespôsobuje (Xu et al., 2015).