

# Nové způsoby řešení cercosporiové skvrnitosti řepy

NEW STRATEGIES IN DEALING WITH CERCOSPORA LEAF SPOT

Libuše Májková – Státní rostlinolékařská správa, Oblastní odbor Opava

Cercosporiová skvrnitost řepy je chorobou dospělé řepy, která je známá už od 19. století. V současné době je považována za neškodlivější chorobu cukrovky, která při silném napadení dokáže téměř zlikvidovat listový aparát cukrovky. Projevuje se na starších listech tvorbou drobných okrouhlých šedohnědých skvrn, které jsou přesně ohraničeny charakteristickým červenofialovým, hnědým až černým lemem. Při velmi silném napadení čepelí se vytváří velké množství skvrn, které postupně splývají, zasychají a list od okrajů odumírá (obr. 1.). Choroba snižuje nejvýrazněji výnos kořenů a cukernatost, zvyšuje se i obsah melasotvorných látek a tím i výtěžnost (1). Podle různých autorů snižuje primární infekce (v červnu) výnos kořene o 30 %, sekundární infekce (v červenci) o 20 % a terciární infekce (počátkem srpna) o 10 %. V našich podmínkách při epidemickém výskytu se ztráty na výnosu pohybují od 16 do 25 % a snížení cukernatosti je od 0,5 do 1 %, výjimečně i 2 %. Při retrovegetaci cukrovky se může cukernatost snížit i o 4 % (2). Cercosporiová skvrnitost řepy se stala trvalou hrozbou pro pěstitele cukrovky v ČR. Nezvládnutí ochrany proti houbě *Cercospora beticola* znamená pro pěstitele značné ztráty. Pro dokonalou ochranu je nutné zaujmout integrovaný přístup s poznáním biologie houby, vhodné metody prognózy výskytu a vývoje patogena a s volbou vhodného fungicidu a správného načasování aplikace dle průběhu počasí a citlivosti cukrovky vůči patogenu.

Cercosporiová skvrnitost řepy není problémem pouze v České republice. Tato choroba je velmi intenzivně řešena v USA, kde se cercosporiová skvrnitost řepy od počátku 80. let minulého století stala velmi závažným problémem pro americké pěstitele a začaly se hledat různé způsoby, jak tuto chorobu optimálně zvládnout. Jednalo se především o vytvoření prognostických modelů, které by umožňovaly správné načasování termínu aplikace fungicidů tak, aby se zabránilo šíření infekce v porostu a vzniku hospodářských ztrát zároveň při vynaložení co nejnižších nákladů na ošetření. I když fungicidy umožňují poměrně efektivně omezit šíření choroby, dochází postupně ke vzniku rezistence vůči používaným přípravkům. To byl také jeden z důvodů, proč vznikla snaha hledat jiné způsoby, jak omezit šíření cercosporiové skvrnitosti řepy.

## Současné cíle výzkumu v USA

Současné výzkumy v oblasti řešení cercosporiové skvrnitosti řepy v USA se soustřeďují zejména na vývoj efektivního systému biologické kontroly proti původci cercosporiové skvrnitosti řepy a na snížení závislosti na pesticidech, tedy snížení kontaminace povrchové a podzemní vody vlivem pesticidů. Výzkum je speciálně soustředěn na potenciální roli cercospori-

nu a beticolinu v obranných mechanismech houby a na hledání antagonistů, které by mohly odbourávat cercosporin a tím úspěšně zabránit patogenu v jeho destruktivní funkci. Jednu z cest, jak úspěšně řešit tento úkol, patrně našli pracovníci Výzkumné laboratoře v Sidney ve státě Montana (7).

## Role cercosporinu jako infekčního agens

Většina druhů rodu *Cercospora*, včetně druhu *Cercospora beticola*, je považována za nekrotrofní, produkující fytotoxiny a hydrolytické enzymy, které narušují rostlinné buňky ještě předtím, než dojde k růstu houby. Tento způsob působení nespécifického fotoaktivního toxinu cercosporinu je znám již více než 20 let. V současné době existuje předpoklad, že fytotoxin cercosporin produkovaný rodem *Cercospora* je faktorem virulence v infekčním cyklu patogena (3). Když jsou rostliny cukrovky napadené houbou *Cercospora beticola*, útočící houba produkuje toxin zvaný cercosporin. Cercosporin patří do skupiny fotoaktivních toxinů, které jsou toxické vůči rostlinám cestou tvorby aktivovaných forem kyslíku (obr. 2.). Podrobné studie toxinu cercosporinu produkovaného jednotlivými druhy rodu *Cercospora* potvrzují významnou roli tohoto toxinu v patogenezi hostitelských rostlin. Pokud je toxin vystaven účinkům světla, reaguje s kyslíkem a vytváří peroxidové anionty a jednoduchý kyslík známý také jako volné radikály. Tyto molekuly útočí na mastné kyseliny, které tvoří membrány rostlinných buněk (obr. 3.). U buněk vystavených účinkům cercosporinu dochází k narušení buněčné membrány a dojde k odumření rostlinné buňky. Předpokládá se, že při poškození membrány dochází k pronikání živin do mezibuněčných prostor listů, čímž je umožněn růst houby a sporulace. Pokud odumře dostatečné množství buněk, objevují se typické skvrny, které jsou ve skutečnosti koloniemi houby, parazitující na degradovaném rostlinném materiálu (7). Přitom existuje rezistence druhů *Cercospora* vůči toxickému efektu jejich vlastního toxinu, což umožňuje využití těchto organizmů jako modelu pro pochopení buněčné báze rezistence vůči volnému kyslíku a obecnému oxidačnímu stresu (5).

## Odbourávání cercosporinu s využitím enzymu laccase

Lartey a Ton That z Výzkumné laboratoře v Sidney našli použitelnou metodu ošetření cukrovky bez klasického využití fungicidů. Jedná se o odbourání cercosporinu s použitím enzymu laccase. Enzym laccase brání cercosporinu v produkci destruktivního peroxidu, a tím znemožní vznik skvrn na listech. Enzym laccase brání odumření buňky způsobuje oslabení

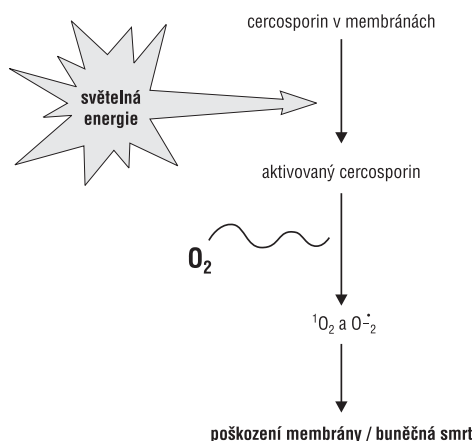
Obr. 1. List cukrové řepy napadené houbou *Cercospora beticola*

zdroje živin pro houbu a tím inhibuje její růst. Rovněž redukuje případné sekundární infekce patogenními bakteriemi, které mohou napadat listy cukrovky (4).

Toxin cercosporin je polyaromatická sloučenina, která je příbuzná s jiným produktem hub – hypericinem, který je rovněž znám jako cyclosan. Cercosporin není rozpustný ve vodě a mnoha organických rozpouštědlech. Obvykle se extrahuje v pyridinu a zásaditých organických rozpouštědlech. Na povrchu rostliny probíhající reakce způsobují nekrózy, vyvolané rozpadem buněčné membrány. Houby produkující cercosporin se živí epitelem odumřelých listových buněk a způsobují další poškození rostliny trávicími enzymy, které působí rozpad složek buněčných stěn a bílkovin.

Laccase patří do rozmanité skupiny enzymů označovaných jako oxidoreduktázy. Mají nízkou specifičnost ve vztahu k substrátu a vyžadují měď jako spoluúčinkující látku. V labo-

Obr. 2. Buňky hostitelské rostliny jsou poškozovány produkcí aktivních kyslíkových radikálů (5)



ratorních podmínkách byl enzym laccase izolován z různých druhů hub (*Laetisaria arvalis*, *Coprinus cinereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Lentinula edodes*, *Melanocarpa allomyces*, *Phanerochaete flavidolor* a *Trametes versicolor*). Jeffrey F. D. Dean z Univerzity v Georgii izoloval čtyři genově příbuzné skupiny laccase z rodu *Arabidopsis* a předpokládá se výskyt i u dalších rostlin.

V laboratorních podmínkách Lartey a jeho tým inhibovali cercosporin jednoduše postřikem listů roztokem laccase. Laccase použitý v této studii byl extrahován z půdní houby *Laetisaria arvalis*. Larteyho tým v současné době provádí skleníkové pokusy a bude se věnovat polním pokusům, aby vyhodnotil efektivnost použití laccase v porovnání s fungicidním ošetřením. Lartey podporuje aplikaci laccase pro ošetření proti cercosporiové skvrnitosti řepy jako způsob odbourání účinku cercosporinu na rostliny vzhledem k tomu, že se jedná o strategii šetrnou vůči životnímu prostředí (4).

#### Studium mechanismu účinku fytotoxinu cercosporinu

Margaret Daub z Univerzity v Severní Karolíně začala řešit metabolické strategie, jak zabudovat do rostliny rezistenci vůči patogenu způsobujícímu cercosporiovou skvrnitost řepy. Ve své výzkumné činnosti se laboratoř soustředila na izolaci genů houby, zodpovědných za rezistenci vůči toxinu a dále na izolaci a charakteristiku genů z bakterií, které mají zakódovanou schopnost rozkladu toxinu cercosporinu. Výzkumy na téma cercosporinu stále pokračují a studii na toto téma se stále zabývají výzkumní pracovníci z univerzit v Severní Karolíně a na Floridě (6). Jejich cílem je vytvořit strategii pro vyšlechtění geneticky modifikovaných rostlin, které by měly zabudovaný gen rezistence vůči patogenu *Cercospora beticola*. Základem pro tyto strategie je právě pochopení mechanismu účinku fytotoxinu cercosporinu. Četné patogenní houby využívají k úspěšné patogenezí různé toxiny. Mimo jiné k nim patří druhy patogenních hub rodů *Alternaria*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Elsinoe* a *Hypocrella*. Biosyntézou a toxicitou cercosporinu se zabývají četné dlouholeté studie s cílem využití těchto poznatků k vyvinutí rostlin rezistentních vůči patogenu *Cercospora beticola*.

Cercosporin a jiné podobné perylenechinonové toxiny jsou fotoaktivní a svou toxicitu ztrácejí ve tmě. Na světle tyto látky pohlcují světelnou energii a přecházejí do energeticky aktivního stavu, jehož výsledkem je vznik aktivních forem kyslíku. Tyto vlastnosti řadí cercosporin do skupiny fotosenzitizérů. Tento pojem se začal používat začátkem 20. století a popisoval látky vyvolávající citlivost buněk vůči světlu ve viditelných vlnových délkách. Fotosenzitizéry jsou strukturou odlišné a patří k nim běžná barviva, jako např. metylénová modř, stejně jako přírodní produkty, jako např. chlorofyl, laviny a četné chinony. Toxicita těchto fotosenzitizérů vzniká v důsledku oxidativního poškození lipidů, bílkovin a nukleových kyselin. Cercosporin je membránový senzitivizér a potenciální producent aktivních forem kyslíku. V souvislosti s působením těchto aktivních forem

kyslíku dochází k narušení buněčné membrány a k odumření buňky. Předpokládá se, že poškození buněčné membrány umožní pronikání živin do mezibuněčných prostorů, což umožňuje následně růst houby a sporulaci (6).

### Nové přístupy k řešení rezistence vůči cercosporinu

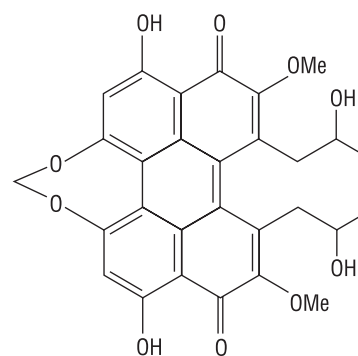
Při podrobném studiu významu cercosporinu ve vývoji choroby pro druhy rodu *Cercospora*, které produkují tento toxin, byly zvoleny různé přístupy. Cercosporin může být izolován z lezí na infikovaných rostlinách, které jsou důkazem tvorby cercosporinu během infekce. Ultrastrukturální studie rostlin cukrovky infikované patogenem *Cercospora beticola* dokazují poškození membrány jako primární symptom související s průběhem působení cercosporinu. V průběhu výzkumu četných hostitelských druhů patogena byla rovněž prokázána důležitost přítomnosti světla pro vývoj typických symptomů choroby (6).

Na základě prokázání významu cercosporinu v působení choroby byla vyvozena hypotéza, že obranný mechanismus houby, který je zaměřený proti cercosporinu možná nabídne další strategii pro vytvoření rezistence vůči tomuto významnému patogenu. V důsledku produkce aktivních forem kyslíku cercosporin vykazuje téměř universální toxicitu vůči buňkám, a to nejen u rostlin, nýbrž i u bakterií, četných hub i u myši. Jediné organismy, které vykazují tak vysokou úroveň rezistence vůči cercosporinu jsou druhy rodu *Cercospora* a některé další houby, které produkují perylenchinonové toxiny, jako např. rody *Alternaria* a *Cladosporium*. Již velmi nízké množství cercosporinu jako 1  $\mu\text{M}$  dokáže zabít buňky rostlin, kultury rodu *Cercospora* produkují cercosporin řádově v mM a kulturu to nepoškozují. Více výzkumných pracovišť se zabývalo studiem mechanismu, který houby rodu *Cercospora* využívají pro auto-rezistenci vůči cercosporinu s cílem využití genů rezistence houby jako nový zdroj rezistence u transgenních rostlin.

K určení genů zodpovědných za rezistenci byly použity různé postupy. Jednalo se např. o využití tzv. genu CFP, izolovaného z druhu *Cercospora kikuchii*, který chrání houbu před jejím vlastním toxinem. Greg Upchurch z Ministerstva zemědělství USA a Jon Duvick z firmy Pioneer identifikovali gen nazvaný CFP (cercosporin facilitator protein) prostřednictvím selekce genů, které jsou vysoce indukované světlem. Tento gen je pravděpodobně požadovaný pro nárůst cercosporinu. CFP protein se velmi podobá významnému genu MFS (major facilitator superfamily), který patří k transportérům buněčné membrány. Jakmile je cercosporin syntetizovaný, musí být vyexportovaný ven z mycelia houby, pravděpodobně prostřednictvím transportéru MFS. V průběhu této akce zde nebyl potvrzen gen CFP, ale předpokládá se, že hraje roli při tomto transportu. Greg Upchurch se svými spolupracovníky vytvořili strategii s využitím genetické modifikace vůči patogenu *Cercospora* u kukuřice, a to vložením genu CFP (cercosporin facilitator protein) z patogenu *Cercospora* do kukuřice a tabáku in vitro a oba systémy byly úspěšné.

Zvýšená rezistence byla zjištěna kmenů *Xanthomonas campestris patovar zinniae*, u kterých byla zjištěna schopnost rozkládat cercosporin na netoxické složky (6). Thomas Mitchel z Univerzity v Severní Karolíně zkoumal bakteriální izoláty, které jsou schopny rozkládat toxin cercosporin. Jeho výzkumný tým kultivoval různé druhy půdních bakterií po dobu 48 hodin na mediu obsahujícím cercosporin. Bakterie *Xanthomonas campestris pv. zinniae* a *X. campestris pv. pruni* se osvědčily jako

Obr. 3. Struktura cercosporinu, fotoaktivního toxinu produkovaného patogeny rodu *Cercospora* (5)



efektivní při snížení obsahu cercosporinu v mediu o 90 % za 48 hodin inkubace, rozklad byl indikován změnou barvy media z hnědé na zelenou. Konečným produktem rozkladu byla netoxická substance. Mitchel ve své studii necharakterizoval enzymové izoláty. Nicméně přiřadil degradaci cercosporinu k oxido-reduktáze v bakteriálním cytochromovém systému P 450 (4).

Jiná rezistence vůči cercosporinu byla zjištěna při podrobném zkoumání mutantů druhu *Cercospora nicotianae*, které jsou citlivé vůči cercosporinu. Tímto způsobem byly identifikovány tři geny, které hrají významnou roli v rezistenci vůči cercosporinu. U dvou z těchto genů se ukázalo, že kódují enzymy potřebné pro metabolismus vitamínu B6. Stanovení těchto genů jako významného prvku v souvislosti s rezistencí vůči cercosporinu u biosyntézou vytvořeného vitamínu B6 bylo zajímavým zjištěním, protože u tohoto vitamínu, na rozdíl od takových vitamínů, jako jsou vitamíny E a C, nebyla dosud známa jeho role jako antioxidantu v obranných mechanismech. Významná je spoluúčast vitamínu B6 při enzymatických reakcích, zejména při syntéze aminokyselin. Následně se prokázalo, že vitamín B6 potlačuje vznik singletního kyslíku a superoxidu a vykazuje antioxidační účinky, což vysvětluje jeho roli v ochranné aktivitě vůči cercosporinu (6).

### Závěr

Četné studie v posledních letech se zabývaly účinností výše popsaných mikrobiálních genů z hlediska využitelnosti pro vývoj transgenních rostlin. Dosud však všechny tyto studie prokázaly jen velmi malou úspěšnost.

Cercosporin hraje významnou roli v patogenitě rodu *Cercospora* u celé řady rostlinných druhů. Jakékoliv snížení toxicity cercosporinu může být využito pro zvládnutí choroby v zemědělské praxi na polích. Cercosporin je také vysoce toxický v důsledku tvorby aktivních forem kyslíku. Šlechtění na rezistenci vůči houbám rodu *Cercospora* je obtížné, protože cercosporin vykazuje obecnou toxicitu vůči buňkám. V průběhu zkoumání bylo zjištěno, že biosyntéza a regulace cercosporinu je velmi komplikovaný proces. Dalším problémem je, že mechanismus, který využívají houby rodu *Cercospora* k tomu, aby se bránily účinkům toxicity cercosporinu vůči sobě, zahrnuje mnohočetné faktory. Pokračující výzkum těchto obranných buněčných mechanismů a vývoj strategií k zabránění tvorby cercosporinu může vést k lepšímu zvládnutí chorob rodu *Cercospora* (6) v budoucnosti.

### Souhrn

V článku jsou řešeny možnosti vývoje efektivního systému biologické ochrany proti původci cercosporiové skvrnitosti řepy. Výzkum je soustředěn na potencionální roli fotoaktivního toxinu cercosporinu, který je produkovaný rodem *Cercospora* a který je faktorem virulence v infekčním cyklu patogena. V článku jsou popsány způsoby, jak lze odbourat škodlivé účinky fytotoxinu cercosporinu. Jednou z možností ošetření cukrovky bez klasického využití fungicidů je odbourání cercosporinu s použitím enzymu laccase, který brání cercosporinu v produkci destruktivního peroxidu a tím znemožní vznik skvrn na listech. Další z možností je vytvoření strategie pro vyšlechtění geneticky modifikovaných rostlin, které by měly zabudovaný gen rezistence vůči patogenu *Cercospora beticola*. Za tímto účelem se zkoumalo např. využití tzv. genu CFP z patogenu *Cercospora*, který chrání houbu před jejím vlastním toxinem cercosporinem. Zvýšená rezistence vůči cercosporinu byla zjištěna u kmenů bakterií *Xanthomonas campestris pv. zinniae* a *X. campestris pv. pruni*. Významné pro hledání rezistence vůči cercosporinu bylo rovněž zjištění antioxidačních účinků u biosyntézou vytvořených genů vitamínu B6.

### Literatura

1. BARTOŠ J. ET AL.: *Ochrana rostlin*. 2. rozšířené vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1968, 433 s.
2. BITTNER V.: Biotická poškození cukrovky (10. část) Skvrnatička řepná. *Agromanuál*, 2, 2007 (9/10), s. 28–29.
3. WEILAND J., KOCH G.: Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.) *Molecular Plant pathology*, 5, 2004 (3), s. 157–166.
4. SHMAEFSKY B. R.: *Laccase Transfection for Antifungal Properties in Crops*. 2003, [on-line] <<http://www.isb.vt.edu/news/2003/news03.aug.html#aug0305>>.
5. DAUB M. E.: *Molecular Plant-Pathogen Interactions*. 2004, [on-line] <<http://www.cals.ncsu.edu:8050/botany/faculty/mdaub/DaubLab/Pages/Overview.htm>>.

6. DAUB M. E., CHUNG K.-R.: *Cercosporin: A Photoactivated Toxin in Plant Disease*. 2007, [on-line] <<http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin/>>.
7. SPILLMAN A.: *Enzyme May Protect Sugarbeets From Leaf Spot Disease*. [on-line] <<http://www.esidney.com/farm/enzyme.html>>.

### Májková L.: New strategies in dealing with *Cercospora* Leaf Spot

This article summarizes new alternative ways for managing *Cercospora* Leaf Spot with the use of biological control. This research focuses on the role of cercosporin. Cercosporin is produced by the species *Cercospora* and plays a crucial role in the ability of *Cercospora* species to infect host plants. This article describes various means how to reduce the damaging effect of the toxin cercosporin. One of the possible ways is degradation of cercosporin by the enzyme laccase. This enzyme inhibites production of destructive superoxides and disables the fungi's ability to produce leaf spotting. Another possible strategy is generation of transgenic plants with gene-encoded resistance against *Cercospora* Leaf Spot. In order to achieve this, CFP (*Cercospora* facilitator protein), a gene that protects *Cercospora* against its own toxin, was utilized. In addition, an increased cercosporin resistance has been observed in some strains of bacteria such as *Xanthomonas campestris pv. zinniae* and *X. campestris pv. pruni*. The discovery of the vitamin B6 biosynthesis genes was also significant considering their important antioxidant activity.

**Key words:** biological control, cercosporin, *Cercospora* Leaf Spot, gene CFP, resistance.

---

### Kontaktní adresa – Contact address:

Ing. Libuše Májková, Státní rostlinolékařská správa, Oblastní odbor Opava, Jaselská 16, 746 82 Opava, Česká republika, e-mail: libuse.majkova@srs.cz