Vplyv zdrojov dusíka a pH na fyziológiu a vývoj *Trichoderma atroviride*

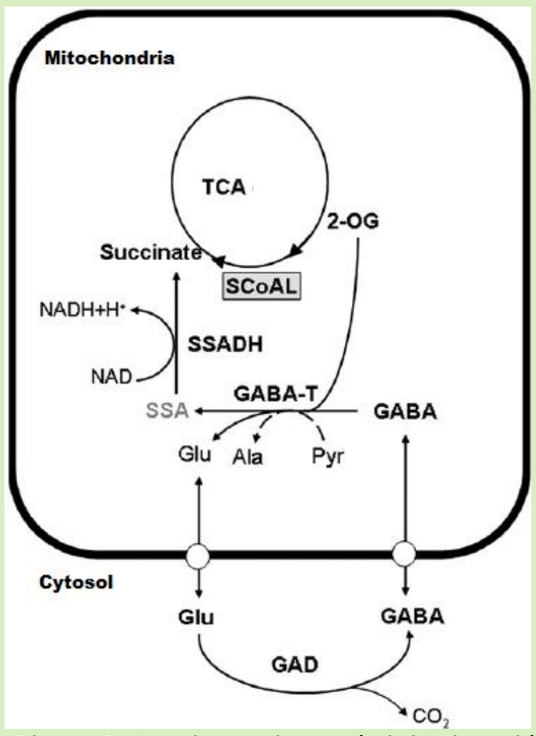
Noémi Molnárová [1] Svetlana Kryštofová [1]

[1]Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav biochémie a mikrobiológie, Bratislava, Slovenská republika

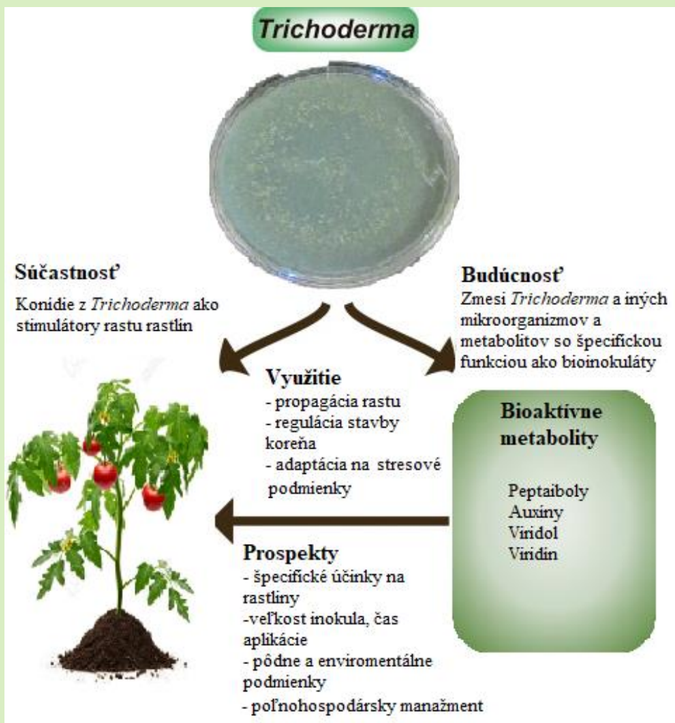
Úvod

Trichoderma spp. je vláknitá huba so širokým využitím od poľnohospodárstva až po medicínu. Využíva sa najmä ako prostriedok biologickej ochrany rastlín, a to vďaka mykoparazitickým vlastnostiam a schopnosti tvoriť rastlinné auxíny a stimulácii obrany rastlín voči patogénom. Dôležitým predpokladom pre jej využitie je tvorba asexuálnych spór (konídií). Konídiácia môže byť stimulovaná rôznymi enviromentálnymi faktormi, ako napr. svetlo, rôzne zdroje dusíka a uhlíka, hladovanie, pH okolia a podobne.

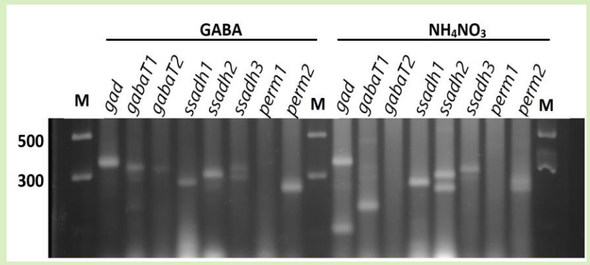
Významnú úlohu vo vývoji zhráva GABA skrat (Obr. 1), ktorý obchádza niektoré kroky TCA cyklu. GABA skrat zohráva významnú úlohu pri prepojení uhlíkového a dusíkového metabolizmu. V GABA skrate sa využívajú 3 enzýmy: glutamátdekarboxyláza (GAD), GABA-transamináza (GABA-T) a sukcynilsemialdehyddehydrogenáza (SSADH). V našej práci sme sledovali vplyv rôznych zdrojov dusíka, uhlíka, a svetla na rast a konídiáciu *T. atroviride* F534 a jej mutantných kmeňov *Δgad10* a *Δgad21.*



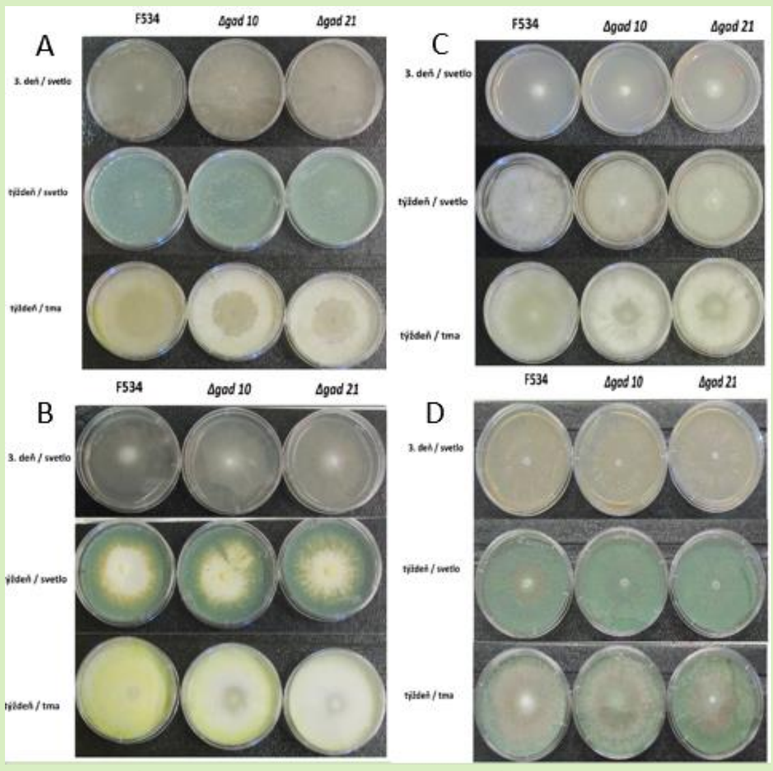
Obr. 1 GABA skrat. glutamátdekarboxyláza (GAD), GABA-transamináza (GABA-T) a sukcynilsemialdehyddehydrogenáza (SSADH), 2-oxoglutarát (2-OG) , sukcinyl-koenzýmA-ligáza (SCoAL)



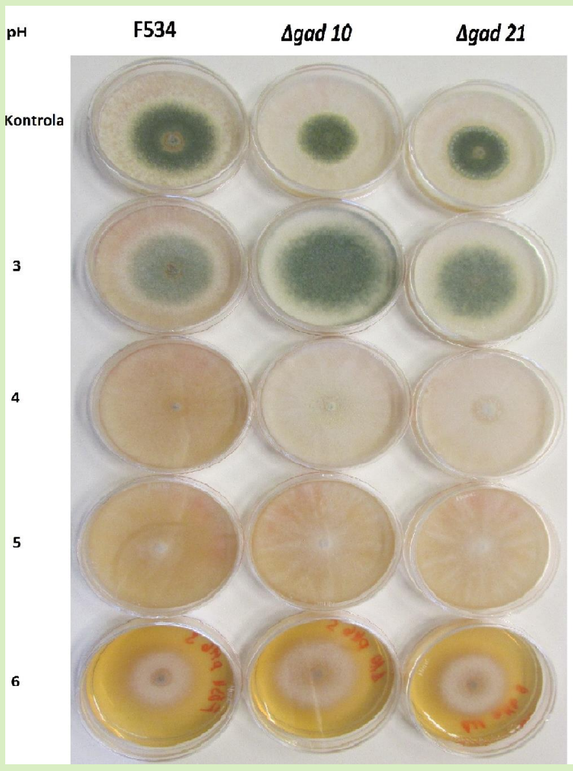
Obr. 2 Úrovne interakcií medzi *Trichoderma* spp. a rastlinou



Obr. 3 Analýza expresie hypotetických génov GABA skratu a permeáz z mycélií rastúcich na CzDA 2 (NH_4NO_3) a CzDA 4 (GABA) médiách. Gén kódujúci GAD – *gad*, 2 gény kódujúce GABA transaninázy – *gabaT1* a *gabaT2*, 3 gény kódujúce SSAD hydrogenázy – *ssadh1, ssadh2* a *ssadh3* a 2 gény kódujúce permeázy – *perm1* a *perm2*. Štandard molekulových hmotností je ozančný M.



Obr. 4 Vývoj *T.atroviride* pri kontinuálnom svetle, pH3 na médiách: A – PDA, B – CzDA 2, C – CzDA 3, D – CzDA 4. Rast a konídiácia v 3. deň a po týždni. F534 je rodičovský kmeň, *Δgad10* a *Δgad21* sú kmene mutantné v géne *gad.*



Obr. 5 Rast *T. atroviride* na PDA médiu pripravenom vo vode (kontrola) a v citrátovom tlmivom roztoku (pH 3-6). Kultivácia prebiehala pri svetle, 25°C, 4 dni. F534 je rodičovský kmeň, *Δgad10* a *Δgad21* sú kmene mutantné v géne *gad.*

Výsledky

Gén pre GAD v *T. atroviride* bol identifikovaný a charakterizovaný v predchádzajúcej práci od Nižňanský a kol., 2013. V našej práci sme identifikovali v genóme *T. atroviride* dva gény pre GABA-T, tri gény pre SSADH a dva gény pre GABA permeázy. Uskutočnili sme transkriptomickú analýzu týchto génov, ktorá ukázala zmeny ich transkripcie v závislosti od zdroja dusíka. (Obr. 3)

Počas fenotypovej analýzy sme sledovali vplyv rôznych zdrojov dusíka na rast a konídiáciu F534 a *gad* mutantných kmeňov pri rôznych kultivačných podmienkach. Vývoj konídií bol vo všetkých kmeňoch ovplyvnený zdrojom dusíka, pričom *gad* mutantné kmene rástli pomalšie, tvorili hustejšie vzdušné mycélium a sporulovali intenzívnejšie ako rodič. *T. atroviride* zvyčajne nie je schopná tvoriť konídie v tme. V našej práci sme ukázali, že v prítomnosti GABA ako jediného zdroja uhlíka sa tvorili konídie aj bez prítomnosti svetla (Obr. 4). Sledovali sme tiež úlohu GAD počas vývoja na PDA pri rôznych ambientných pH (Obr. 5). Naše výsledky ukázali, že kmene deficientné v GAD mali urýchlený asexuálny vývoj v porovnaní s rodičom.

Hypotéza

- Konštitutívna expresia GABA permeáz a génov pre GABA skrat v *T. atroviride* poukazuje na schopnosť transportu a utilizácie GABA aj v prítomnosti dusičnanu amónneho
- Fenotypová charakterizácia génu *gad* v *T. atroviride* naznačila potrebu GAD pre vyrovnaný asexuálny vývoj v reakcii na enviromentálne podnety.

Materiály a metódy

- Mikroorganizmy: T. atroviride CCM F534, Δgad10 a Δgad21
- Kultivačné médiá: Zemiakovo-Dextrózový agar (PDA)pripravené buď vo vode alebo citrátovom tlmivom roztoku pri pH 3-6, Czapek-Dox agar (CzDA) s dusičnanom amónnym ako zdrojom dusíka (CzDA 2), Czapek-Dox agar (CzDA) s dusičnanom amónnym a GABA ako zdrojmi dusíka (CzDA 3), Czapek-Dox agar (CzDA) s GABA ako zdrojom dusíka (CzDA 4)
- Kultivačné podmienky: povrchová kultivácia, svetlo alebo tma, 25°C
- RT-PCR: izolácia RNA prostredníctvom TRI-Reagent (Sigma) a pre RT-PCR bol použitý systém od Biotech Rabbit

Záver:

Pri pozorovaní vývoja *T.atroviride* F534 a jej mutantných kmeňov *Δgad10* a *Δgad21* sme zaznamenali, že pre mutantné kmene bola charakteristická skoršia tvorba vzdušných hýf a konídií. Najintenzívnejší rast a konídiáciu sme pozorovali na PDA médiu pri kontinuálnom svetle. Intenzita rastu a konidiácie na svetle bola vyššia ako v tme vo všetkých prípadoch okrem rastu na kombinovanom zdroji dusíka (NH_4NO_3 a GABA). Práca potvrdila súčinnosť dusíkatých zdrojov a svetla ako aj úlohu *gad* v asexuálnom vývoji. V budúcnosti bude potrebné charakterizovať ďalšie gény GABA skratu. Tento projekt bol podporený APVV-0719-12 and APVV-16-0216.