Wpływ syntetycznych induktorów odporności nabytej na hamowanie rozwoju szarej pleśni u pelargonii i poinsecji

JOLANTA FLORYSZAK-WIECZOREK, BEATA KULEK

Katedra Fizjologii Roślin, Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego,
Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Floryszak-Wieczorek J., Kulek B. (Department of Plant Physiology, Agricultural University of Poznań,
Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland). The effect of synthetic inducers of systemic resistance
in inhibiting grey mold development on geranium and poinsettia.

(Otrzymano dn. 10 czerwca 2002)

Summary

Several chemical activators of resistance were tested to evaluate their efficiency in restricting development caused by *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on geranium and poinsettia leaves. The used signal pathway inducers of salicylic acid, such as DL- α -aminobutyric acid (BABA), γ -aminobutyric acid (GABA) and benzothiadiazole (BTH), at the applied rates markedly inhibited the development of grey mould in the both plant species. The mentioned inducers showed no toxic or restricting effect on the fungus growth and development under *in vitro* conditions. Only methyl jasmonate (Me-JA), a potential activator of independent signal transduction pathway, at the applied quantities ($0.1-1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), noticeably enhanced the disease spot development probably through stimulation of ethylene synthesis in plant. Me-JA added to medium with *B. cinerea* showed a strong antifungal action, whereas ethylene significantly stimulated mycelium growth in the *in vitro* cultures.

Key words: grey mould, inducers of systemic resistance, poinsettia, geranium.

WSTĘP

Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel, a właściwie jego anamorfa - *Botrytis cinerea* Pers., jako sprawca szarej pleśni powoduje ogromne straty na różnych etapach rozwoju roślin. Grzyb atakuje wiele organów rośliny, niszcząc liście, łodygi i kwiaty. Szczególnie dotkliwe szkody czyni wśród roślin ozdobnych, nie oszczędzając gatunków cieszących się tak wielką popularnością wśród nabywców, jak pelargonium (Uchneat i in., 1999) czy poinsecja (Pritchard i in., 1996). Szybki rozwój choroby uzależniony jest nie tylko od stopnia podatności odmian, ale i od sprzyjających warunków, m.in. od temperatury i wilgotności (Sirjusingh i Sutton, 1996) oraz od stężenia inokulum i wieku rośliny (Sirjusingh i in., 1996). Strategia ochrony roślin przed *B. cinerea* zakłada wprowadzanie genetycznej odporności względem patogena (Simps on, 1991, Uchneat i in., 1999), stosowanie fungicydów (Morman i Lease, 1992), regulację warunków zewnętrznych (Hauseck i in., 1996 a, 1996 b) oraz indukowanie odpowiedzi obronnych (Elad i Evensen, 1995).

Nabyta odporność systemiczna jest przykładem aktywacji wrodzonych mechanizmów obronnych. Czynnikiami wzmagającymi jej efektywność względem *B. cinerea*, obok spotykanej w przyrodzie słabej i lokalnej infekcji pierwotnej, mogą być czynniki abiotyczne takie, jak: m.in. wyciąg z drożdży (Reglinski i in., 1995), krótkotrwały szok cieplny (Elad i Volpin, 1991), biopreparaty (Khrantsov i Shukanov, 2000) oraz skuteczne induktory odporności nabytej (Chivasa i in., 1997).

W przedstawionej pracy zbadano i poddano dyskusji możliwość zastosowania wybranych induktorów szlaków kwasów salicylowego i jasmonowego, w podnoszeniu odporności przez podatne odmiany pelargonii i poinsejki na *B. cinerea*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Doświadczenia prowadzono na dwóch gatunkach roślin ozdobnych tj. na pelargonii bluszczolistnej (*Pelargonium peltatum* L.) - odmiany 'Shiva' - podatnej na *Botrytis cinerea* oraz poinsejki (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) - odmiany 'Malibu Red' - średnio podatnej na tego patogena. Rośliny uprawiano w pokoju hodowlanym, utrzymując stałą temperaturę $23 \pm 2^\circ\text{C}$ przy oświetleniu $120 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ przez 12 godzin dziennie aż do momentu, gdy rośliny rozwinęły około 10 liści. Rośliny rosły w doniczkach wypełnionych mieszanką korowo-torfową i podłożem kwiatowo-warzywnym wymieszanych w stosunku objętościowym 3:2, nawożono je raz w tygodniu nawozem wieloskładnikowym Peters Professional (Scotts).

Patogen

Botrytis cinerea Pers. (anamorfa grzyba *Botryotinia fuckeliana* [de Bary] Whetzel) - izolat 1072, pozyskany z pelargonii, otrzymano z Banku Patogenów Roślin Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu. Grzyba hodowano na pożywce ziemniaczano-

glukozowej zestalonej agarą z dodatkiem 2 % glukozy, przenosząc go na świeżą pożywkę przynajmniej raz w miesiącu. Zarodniki konidialne zbierano z 3-tygodniowej kultury grzyba. Otrzymaną zawiesinę zarodników *Botrytis cinerea* filtrowano przez sterylne sito, a stężenie zarodników konidialnych oceniano przy pomocy komory Bürkera. Do doświadczeń stosowano stężenie $7.5 \cdot 10^5$ zawiesiny zarodników konidialnych grzyba sporządzonej w roztworze 0.1 M glukozy oraz 0.05 M KH_2PO_4 .

Traktowanie induktorami, infekcja i ocena rozwoju choroby

Jako syntetyczne induktory testowano niezależnie: kwas DL- β -aminomasłowy (BABA) (Sigma) - w stężeniu $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, kwas γ -aminomasłowy (GABA) (Sigma) - w stężeniach $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ oraz $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, benzotiadiazol (BTH) wyprodukowany w postaci preparatu Bion® (Novartis) - w stężeniach 0.03 mM, 0.3 mM i 0.5 mM BTH oraz ester metylowy kwasu jasmonowego (Me-JA) (Sigma) - w stężeniach $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ oraz $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Powyższe induktory rozpuszczano w wodzie. Cztery dolne liście każdej rośliny opryskano roztworem induktora w odpowiednim stężeniu lub wodą (liście kontrolne), a następnie - 4 dni po indukcji - odcięto liście pochodzące z tej strefy oraz liście znajdujące się powyżej, umieszczając je na 0.4 % agarze z dodatkiem streptomycyny ($0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) w plastikowych kuwetach. Blaszki liściowe od strony górnej inokulowano punktowo, nanosząc na każdy liść pelargonii po trzy krople, a u poinsejii co drugi nerw po sześć kropli zawiesiny zarodników *Botrytis cinerea* o stężeniu $7.5 \cdot 10^5$ na ml. Następnie kuwety zamykano szklanymi pokrywami i przechowywano je w warunkach wysokiej wilgotności względnej powietrza w fitotronie. Dziesiątego dnia po inokulacji mierzono wielkość plam chorobowych (mm^2) na liściach. Analizowano po osiem liści w trzech niezależnych powtórzeniach, na każde stężenie induktora.

Efekt działania induktora na wzrost i rozwój *Botrytis cinerea* in vitro

Do sterylnej pożywki agarowo-ziemniaczanej z dodatkiem glukozy dodano przez aseptyczny sążek (o średnicy por $0.2 \mu\text{m}$) odpowiednią ilość roztworu danego induktora w celu otrzymania właściwych stężeń końcowych. Pożywkę kontrolną sporządzono bez dodatku induktora. Na każde stężenie badanego aktywatora przypadały po trzy powtórzenia (trzy płytki Petriego o średnicy 9 cm, zawierające po 25 ml pożywki). Grzybnie *Botrytis cinerea* wyszczepiano centralnie na pożywkę, a wzrost, rozwój i zarodnikowanie grzyba obserwowano przez dwa tygodnie. Stężenie zarodników liczono za pomocą hemocytometru czternastego dnia po naniesieniu grzybni *Botrytis cinerea* na pożywkę.

Procentową redukcję rozwoju choroby, określaną również jako hamowanie, obliczano ze wzoru $(a-b) \times 100/a$, gdzie wartość a oznacza rozwój choroby w nie traktowanej kontroli, a wartość b określa rozwój choroby po uprzednim potraktowaniu roślin odpowiednim induktorem.

WYNIKI

Badanymi induktorami potraktowano trzy liście dolne poinsecji i pelargonii, a cztery dni później odcięte liście strefy indukcji i liście znajdujące się powyżej poddano infekcji, jak to szczegółowo opisano w metodyce. Analizie podlegał rozwój choroby w liściach obu stref. W roślinach uprzednio traktowanych induktorami szlaku kwasu salicylowego - BABA, GABA i BTH liczba zainfekowanych liści oraz powierzchnia plam była mniejsza niż w roślinach wstępnie traktowanych wodą. Uzyskane wyniki przedstawione na ryc. 1 a i b, prowadzą do następujących spostrzeżeń. Efekt hamowania rozwoju szarej pleśni zależny był od stosowanego aktywatora odporności oraz gatunku rośliny, chociaż ogólne tendencje zmian były bardzo podobne, tak dla pelargonii, jak i poinsecji. Na liściach pelargonii odmiany 'Shiva' najbardziej skuteczny okazał się BABA ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) i BTH zwłaszcza w stężeniu 0.3 mM (ryc. 1 b), które zapewniły ponad 60 % ochronę przed szarą pleśnią. Na liściach poinsecji odmiany 'Malibu Red' stwierdzono ograniczenie rozwoju choroby średnio o 50-75% w efekcie wstępnego traktowania roślin wybranymi induktorami szlaku kwasu salicylowego (BABA i BTH) (ryc. 1 a). We wszystkich kombinacjach doświadczalnych nie zaobserwowano istotnych różnic w sposobie reagowania liści bezpośrednio traktowanych wybranym induktorem i liści pochodzących ze strefy powyżej.

Ryc. 1. Ochrona poinsejii ('Malibu Red') - a) i pelargonii ('Shiva') - b) przed szarą pleśnią w następstwie potraktowania roślin wybranym induktorem.

Fig. 1. Protection of poinsettia ('Malibu Red') - a) and pelargonium ('Shiva') - b) against grey mould in consequence of plant treatment with a selected inducer.

Odmienne wyniki uzyskano dla Me-JA (ryc.1 a i b). Zarówno u pelargonii jak i poinsejii stwierdzono silną stymulację rozwoju szarej pleśni na liściach bezpośrednio opryskanych tym związkiem w dawce 0.1-1.0 mg·ml⁻¹. Pojawiające się plamy szybko rozrastały się, stąd stopień porażenia liści był dużo większy niż liści kontrolnych traktowanych wodą, w obu badanych gatunkach roślin. Jedynie liście położone wyżej, a pochodzące z roślin indukowanych Me-JA, wykazywały podobne do kontroli lub słabsze porażenie patogenem.

Wyszczególnione związki - BABA, GABA i BTH, które jako induktory były stosowane na roślinach, w analogicznych dawkach nie działały hamująco na wzrost grzybni w warunkach *in vitro* (ryc. 2 A - C). Przeciwnie Me-JA dodany do pożywki *in vitro* wykazywał silne właściwości antygrzybowe we wszystkich przygotowanych stężeniach (ryc. 2 D).

Ryc. 2. Wpływ wybranego induktora na wzrost grzybnii *Botrytis cinerea* *in vitro*

Fig. 2. The effect of selected inducer on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* *in vitro*

DYSKUSJA

Publikowane doniesienia na temat nabywania odporności typu SAR w efekcie wstępnego traktowania roślin skutecznymi induktorami dotyczą prawie wyłącznie roślin uprawnych, tak jedno- jak i dwuliściennych (K u ć, 1995). Powszechnie uważa się, że rośliny wchodząc w fazę generatywną, w efekcie zmian hormonalnych tracą nabytą odporność systemiczną. Zanim jednak roślina zakwitnie, dużo wcześniej może być narażona na infekcję patogenicznymi mikroorganizmami, co uzasadnia celowość podejmowania badań nad uruchamianiem naturalnych mechanizmów obronnych również wśród roślin ozdobnych, w ich wcześniejszych fazach rozwoju. Do pionierskich prac opublikowanych sto lat temu przez R a y (1901) i B e a u v e r i e (1901) należy udana próba immunizacji begonii. Wymienieni badacze stosowali dogłębowo lub wprowadzali do roślin drogą iniekcji łagodne rasy *Botrytis cinerea*, uzyskując wzrost odporności liści begonii, po przeprowadzeniu infekcji właściwej wysoce wirulentną rasą tego grzyba.

Podwyższona temperatura jest jednym z czynników abiotycznych, którym można regulować poziom odporności roślin na szarą pleśń w układzie pelargonii/*B. cinerea* (S i r j u s i n g i S u t t o n, 1996) lub poinsecji/*B. cinerea* (P r i t c h a r d i in., 1996). Patrząc jednak na problem z praktycznego punktu widzenia należy zauważyć, że w walce z szarą pleśnią konkurencyjną metodą względem skutecznych fungicydów, czasem niepożądanych dla środowiska, mogą być jedynie syntetyczne induktory odporności systemicznej.

W prezentowanych badaniach wysoką (ponad 50 %) skutecznością w ograniczaniu rozwoju *Botrytis cinerea* na liściach pelargonii i poinsecji, odznaczały się induktory BABA i BTH (znany pod nazwą handlową preparat Bion). Wymienione

syntetyczne aktywatory w stosowanych ilościach nie wywoływały nekrotycznych plam na liściach oraz nie wykazywały toksyczności względem patogena rosnącego na pożywce agarowej *in vitro*.

Ponad 80 % redukcję choroby, po uprzednim traktowaniu roślin preparatem Bion, stwierdzili również inni badacze w układzie - tytoń/TMV, ogórek/*Colletotrichum lagenarium*, fasola/*Uromyces appendiculatus* (S i e g r i s t i in., 1998) oraz Arabidopsis/*Pseudomonas syringae* i *Peronospora parasitica* (L a w t o n i in., 1996). Nie brakuje również doniesień przeciwnych z których wynika, że BTH nie chroni tytoniu przed *Alternaria alternata* i *Botrytis cinerea* (F r i e d r i c h i in., 1996).

Kwas DL- β -aminomasłowy - jako aktywator, stosowany jest zazwyczaj w wyższych stężeniach niż BTH ze względu na jego słabszą translokację w roślinie (S i e g r i s t i in., 1998). Wysoką skuteczność tego induktora stwierdzono m.in. w ochronie pomidora (C o h e n i in., 1994) i papryki (S u n w o o i in., 1996) przed zarazą oraz tytoniu przed *Peronospora tabacina* (C o h e n, 1994).

Z niebiałkowych aminokwasów - kwas γ -aminomasłowy (GABA), wykazywał relatywnie niższą efektywność w stymulowaniu naturalnych mechanizmów obronnych, dając ochronę przed *B. cinerea* rzędu 15% u pelargonii oraz 25% u poinsecji. Zdaniem innych autorów, lokalne traktowanie papryki induktorem GABA nie chroniło roślin przed *Phytophthora infestans* (S a n w o o i in., 1996).

Z uzyskanych przez nas danych wynika, że kwas jasmonowy stosowany jako ester metylowy JA, nie ograniczał rozwoju szarej pleśni na pelargonii i poinsecji. Wręcz przeciwnie, powodował znaczący wzrost choroby. Szczególnie dotyczyło to liści bezpośrednio potraktowanych induktorem, które wykazywały dynamicznie rozwijające się plamy szarej pleśni. Prawdopodobnie egzogenne Me-JA stymulował w roślinach niezależny od kwasu salicylowego szlak sygnałowy, powiązany ze wzmoczoną syntezą etylenu (D o n g, 1998). Etylen, jak stwierdzili uprzednio E l a d i V o l p i n (1988) oraz E l a d (1990), wzmacnia podatność tkanki gospodarza na *B. cinerea*, a dodany do pożywki, w przeciwieństwie do inhibitorów syntezy etylenu stymulował zarodnikowanie grzyba *in vitro* (K ę p c z y ń s k a, 1998). Ponadto kwas jasmonowy w stężeniach powyżej 1 mg·ml⁻¹ wykazuje silne właściwości fitotoksyczne (C o h e n i in., 1993) oraz stwierdzone przez nas w stężeniach niższych toksyczne oddziaływanie względem patogena. Cechy te eliminują Me-JA z grona efektywnych stymulatorów odporności przydatnych do zwalczania szarej pleśni na pelargonii i poinsecji.

W podsumowaniu potwierdza się skuteczność dwóch przetestowanych aktywatorów tj. BABA i BTH w indukowaniu odporności pelargonii i poinsecji na szarą pleśń. Zastosowane stężenia induktorów nie były toksyczne dla roślin ani patogena, a wyjaśnienie fizjologiczno-biochemicznych przyczyn tego zjawiska wymaga kontynuacji badań.

LITERATURA

- Bauverie J., 1901. Essais d'immunization des vegetaux contre de maladies cryptogamiques. CR Acad. Sci. Paris. 133: 107-110.
- Chivasa S., Murphy A.M., Naylor M., Carr J.P., 1997. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. Plant Cell, 9: 547-557.
- Cohen Y., Gisi U., Niderman T., 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic acid methyl ester. Phytopathol. 83: 1054-1062.
- Cohen Y., Niderman T., Mosinger E., Fluhr R., 1994. b-Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. 104: 59-66.
- Dong X., 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. Current Opinion Plant Biol. 1: 316-323.
- Elad Y., 1990. Production of ethylene by tissues of tomato, pepper, French-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 36: 277-287.
- Elad Y., Evensen K., 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. Amer. Phytopathol. Soc. 85: 637-643.
- Elad Y., Volpin H., 1988. The involvement of ethylene and calcium in gray mold of pelargonium, ruscus and rose flowers. Phytoparasitica 16: 119-131.
- Friedrich L., Lawton K., Ruess W., Masner P., Specker N., Rella M.G., Meier B., Dincher S., Staub T., Uknes S., Metraux J-P., Kessmann H., Ryals J., 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. Plant J. 10 (1): 61-70.
- Hausbeck M.K., Pennypacker S.P., Stevenson R.E., 1996 a. The use of forced heated air to manage *Botrytis* stem blight of geranium stock plants in a commercial greenhouse. Plant Dis., 80 (8): 940-943.
- Hausbeck M.K., Pennypacker S.P., Stevenson R.E., 1996 b. The effect of plastic mulch and forced heated air on *Botrytis cinerea* on geranium plants in a research greenhouse. Plant Dis., 80 (2): 170-173.
- Kępczyńska E., 1989. Ethylene requirement during germination of *Botrytis cinerea* spores. Physiol. Plant. 77: 369-372.
- Khrantsov A.K., Shukanov A.S., 2000. „Trichodermin - BL” against two *Botrytis* species. 5th Congress of EFPP, Italy, Book Abstr., 403P, p. 81.
- Kuč J., 1995. Induced resistance to disease in plants. Eds. R. Hammerschmidt, J. Kuč. Kluwer, The Netherlands.
- Lawton K., Friedrich L., Hunt M., Weymann K., Delaney T., Kessmann H., Staub T., Ryals J., 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant J., 10 (1): 71-82.
- Moorman G.W., Lease R. J., 1996. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouse. Plant Dis. 76: 477-480.
- Pritchard P.M., Hausbeck M.K., Heins R.D., 1996. The influence of diurnal temperatures on the postharvest susceptibility of poinsettia to *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 80: 1011-1014.
- Ray J., 1901. Les maladies cryptogamiques des vegetaux. Res. Gen. Bot. 13: 145-151.

- Reglinski T., Lyon G.D., Newton A.C., 1995. The control of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce using elicitors extracted from yeast cell walls. J. Plant Dis. Protec. 102: 257-266.
- Sanwoo J.Y., Lee Y.K., Hwang K., 1996. Induced resistance against *Phytophthora capsici* in pepper plants in response to DL-b-amino-n-butyric acid. Europ. J. Plant Pathol. 102: 663-670.
- Siegrist J., Muchlenbeck S., Buchenaur H., 1998. Cultured parsley cells, a model system for the rapid testing of abiotic and natural substances as inducers of systemic acquired resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol. 53: 223-238.
- Sirjusingh C., Sutton J.C., 1996. Effect of wetness duration and temperature on infection of geranium by *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 80 (2): 160-165.
- Sirjusing C., Sutton J.C., Tsujita M.J., 1996. Effect of inoculum concentration and host age on infection of geranium by *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 80 (2): 154-158.
- Simpson D.W., 1991. Resistance to *Botrytis cinerea* in pistillate genotypes of the cultivated strawberry *Fragaria ananassa*. J. Hort. Sci. 66: 719-723.
- Uchneat M.S., Zhigilei A., Craig R., 1999. Differential response to foliar infection with *Botrytis cinerea* within the genus *Pelargonium*. Amer. Soc. Hort. Sci. 124 (1): 76-80.

Wpływ syntetycznych induktorów odporności nabytej na hamowanie rozwoju szarej pleśni u pelargonii i poinsecji

Streszczenie

Przetestowano kilka chemicznych aktywatorów odporności pod kątem oceny ich skuteczności w ograniczaniu rozwoju choroby powodowanej przez *Botrytis cinerea* na liściach pelargonii i poinsecji. Induktory szlaku sygnałowego kwasu salicylowego takie jak: kwas DL-b-aminomasłowy (BABA), kwas g-aminomasłowy (GABA) oraz benzotiadiazol (BTH) w zastosowanych dawkach istotnie hamowały, choć w różnym stopniu, rozwój szarej pleśni u obu gatunków roślin. Wymienione związki nie wykazywały toksycznego bądź ograniczającego wpływu na wzrost i rozwój grzyba w warunkach *in vitro*. Jedynie ester metylowy kwasu jasmonowego (Me-JA), potencjalny aktywator niezależnego szlaku przekazu sygnału, w zastosowanych ilościach (0.1-1.0 mg·ml⁻¹) wyraźnie wzmacniał rozwój plam chorobowych, prawdopodobnie poprzez stymulację syntezy etylenu w roślinie. Me-JA, dodany do pożywki z *B. cinerea* wykazywał silne działanie antygrzybowe.