

## **SISTEMIČNO AKTIVIRANA ODPORNOST - NOVA MOŽNOST ZA ZATIRANJE RASTLINSKIH BOLEZNI**

Jože Maček<sup>1</sup>

### **IZVLEČEK**

Natančnejši pregled zgodovine fitopatologije pokaže, da so že pred več kot sto leti povsem resno razmišljali o tem, kako bi rastline cepili proti določenim rastlinskim boleznim in bi bile tako obvarovane pred njimi oz. odporne proti njim, podobno kot je bilo tedaj že mogoče cepiti ljudi in živali in jih do smrti obvarovati pred raznimi nalezljivimi boleznimi. Vendar tega do nedavnega ni bilo mogoče ustvariti, čeprav je bila že znana lokalno aktivirana rezistenca (LAR = locally activated resistance), ki pa je ni bilo mogoče izrabiti za gospodarsko zatiranje rastlinskih bolezni.

V zadnjih letih pa so odkrili nov pojav in sicer sistemsko aktivirano rezistenco (SAR = systemic activated resistance), ki obeta, da bo nov pomemben korak pri zatiranju rastlinskih bolezni s snovmi, ki pri rastlinah nastajajo kot rezultat naravnih, lastnih obrambnih reakcij. Bistveno pa je, da se to dogaja popolnoma brez spremembe genoma in da popolnoma podobne obrambne mehanizme sistemsko aktivirane rezistence lahko izzovemo (inducirano) tudi z nekaterimi preprostimi kemičnimi snovmi, npr. s salicilno kislino (aspirinom). Ugotovili so namreč, da rastline po lokalni okužbi s paraziti in po indukciji sistemsko aktivirane rezistence same kopičijo v sebi salicilno kislino. Vprašanje je bilo, ali je endogena salicilna kislina endogeni rastlinski aktivator? Da bi to raziskali, so ustvarili transgene rastline, ki naj ne bi bile sposobne kopičiti salicilne kisline. V teh rastlinah pa res ni bilo mogoče inducirati sistemsko aktivirane rezistence. Zdaj sta znani še dve substanci, ki ustvarjata omenjeno odpornost in sicer diklorizonikotinska kislina in metilni ester benzodiazolkarbotioične kisline.

### **KURZFASSUNG**

#### **SYSTEMISCH AKTIVIERTE RESISTENZ - NEUE MÖGLICHKEIT ZUR BEKÄMPFUNG DER PFLANZENKRANKHEITEN**

Genauere Betrachtung der Geschichte der Phytopathologie zeigt, dass schon vor mehr als hundert Jahren ganz ernst darüber gedacht wurde, wie man die Pflanzen gegen bestimmte Krankheitserreger impfen könnte und so die Pflanzen gegen dieselbe geschützt bzw. widerstandsfähig wären, so wie man damals schon Menschen und Tiere impfen konnte und diese dann bis zum Lebensende immun waren. Dies konnte bisher nicht erreicht werden, obwohl die lokal aktivierte Resistenz (LAR = locally activated resistance) bekannt war, sie konnte aber zur wirtschaftlichen Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten nicht eingesetzt werden.

In den letzten Jahren wurde jedoch ein neues Phänomen, systemisch aktivierte Resistenz (SAR = systemically activated resistance) entdeckt, von der man erwartet, dass sie ein neuer bedeutender Schritt bei der Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten mit den körpereigenen Stoffen, die als Resultat eigener natürlicher Abwehrreaktionen entstehen sein wird. Wesentlich ist aber, dass dies vollkommen ohne Genomänderung geschieht und dass ganz ähnliche Abwehrreaktionen der systemisch aktivierten Resistenz auch mit einigen einfachen chemischen Stoffen, z.B. mit Salizylsäure (Aspirin) induziert bzw. ausgelöst werden können. Es wurde nämlich festgestellt, dass die Pflanzen nach lokaler Infektion mit Parasiten und nach Induktion systemisch aktivierter Resistenz selber Salizylsäure in ihrem Körper speichern. Die

<sup>1</sup> Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani

Frage war ob die endogene Salizylsäure endogener Pflanzenaktivator ist? Zur Untersuchung dieser Frage wurden transgene Pflanzen gezüchtet, die nicht fähig waren Salizylsäure zu speichern. In diesen Pflanzen konnte aber tatsächlich keine systemisch aktivierte Resistenz induziert werden. Bisher sind zusätzlich noch zwei Substanzen bekannt, die erwähnte Resistenz hervorrufen können und zwar Dichlorisonikotinsäure und Methylester der Benzodiazolcarbothiosäure.

Malo natančnejši pogled v zgodovino fitopatologije pokaže, da so že pred več kot sto leti resno razmišljali o tem, kako bi rastline cepili proti določenim rastlinskim boleznim in bi bile tako zavarovane pred njimi oz. odporne proti njim, podobno kot je mogoče ljudi in živali cepiti in jih za dolgo časa oz. do smrti zavarovati pred različnimi nalezljivimi boleznimi. Vendar je to tedaj bila le ideja, kajti o procesih, ki pri takem cepljenju potekajo, niso vedeli še nič. Fiziologija, biokemija, serologija in imunologija sta bili tedaj še povsem nerazviti.

Že zgodaj v tem stoletju pa se je izkazalo, da po poti cepljenja pri rastlinah odpornosti ni mogoče doseči, ker rastline nimajo krvi, ne pretočnega sistema, predvsem pa se v njih ne morejo tvoriti protitelesa kot odziv na antigene, ki bi bili lahko tudi povzročitelji rastlinskih bolezni. Pri rastlinah je sicer že dolgo znana neke vrste imunska reakcija, npr. pri koreninskem raku (*Agrobacterium tumefaciens*), kjer v okolici okuženega mesta - vendar pa le v območju nekaj milimetrov ali kvečjemu centimetrov - nove okužbe ne uspejo, toda tega ni mogoče izrabiti za ves sistem rastline, še manj pa to lastnost izrabiti v gospodarskem smislu. To dognanje pa je preusmerilo iskanje vnosa odpornosti od rastline oz. njenih tkiv na parazitsko glivo oz. njene organe (micelij, spore, havstorije in dr.), t. j. na področje sistemskih fungicidnih substanc, s katerimi bi te v rastline vnesli od zunaj, nato bi pa vsaj nekaj časa delovale od znotraj - torej endoterapevtsko. Tako so prišli do ideje sistemskih oz. pozneje kurativnih fungicidov. To možnost je raziskovalo več inštitutov po svetu, nam najbližji je bil Inštitut za fitopatologijo na Tehniški visoki šoli v Zürichu pod vodstvom prof. dr. Ernesta Gäumanna. Klasično žlahtnjenje na odpornost in zdajšnje gensko inženirstvo, s prenosom genov za odpornost, moramo v tej zvezi seveda pustiti v nemar.

Ključno vprašanje pri skriningu za sistemske fungicide je bilo, kako najti substance, ki bi bile strupene za glive, neškodljive pa za rastline in sicer za njihove najnežnejše organe in organele (protoplazmo, jedro, mitohondrije in dr.). Pri preventivnih ali protektivnih fungicidih pride rastlina z njimi v stik samo s svojimi sorazmerno odpornimi zunanjimi krovnimi tkivi (npr. s kutikulo, sestavljeno iz zapletenih polimerov), pa še pri teh so se ob neskrbnem delu ali prevelikih odmerkih dogajali ožigi. Pri sistemskih fungicidih mora biti kemoterapevtski indeks neprimerno ugodnejši. Težava pri iskanju je bila predvsem v tem, da sta tako gostiteljska rastlina kot parazitska gliva rastlini, z vsebinsko enakim ali zelo podobnim metabolizmom. Najti take diferencialne substance, ki bi bile strupene le za glive, ne pa za gostiteljske rastline, je bilo podobno iskanju šivanke v kupu sena in tudi neuspešno, dokler se niso spomnili na razliko v sestavi celične stene pri višjih rastlinah in pri višjih glivicah, ki je predvsem v tem, da membrane gliv vsebujejo hitin, ki je sicer sestavina nohtov, kopit, parkljev, torej sestavina toplokrvnih organizmov, za višje (zelene) rastline pa so tedaj menili, da ga nimajo. Hitin nastane iz predhodnih substanc - prekurzorjev -

sterolov. In tako je nastala velika skupina sistemskih fungicidov - tako imenovanih inhibitorjev sinteze sterola (kot so npr. benzimidazoli), pozneje tudi še drugih skupin.

Sistemski fungicidi pa učinkujejo na eno (one site) ali nekaj vozlišč v metabolnem krogu in se zato proti njim v številnih primerih sorazmerno hitro pojavi odpornost ali rezistenca. Da bi se izognili možnemu pojavu rezistence, ki nastane kot rezultat učinkovanja sistemskih fungicidov na glive, so se pri raziskavah, iz gliv kot parazitskih organizmov, preusmerili na višje rastline, kot gostiteljske rastline, da bi v njih inducirali (izzvali) rezistenco proti parazitom, podobno kot je bilo mišljeno pri vakcinaciji.

Rastline so v svojem filogenetskem razvoju skozi milijone let morale razviti obrambne mehanizme, tako pasivne (npr. debele celične stene, dlakavost, mikrobicidne substance) kot tudi aktivne, ki začnejo delovati šele ob dejansko izvršeni okužbi (histogene reakcije, pospešena tvorba oksidacijskih encimov, nastanek alkaloidov itn.). Ta aktivna odpornost lahko ostane omejena na ožjo okolico okuženega mesta in se potem imenuje lokalno aktivirana rezistenca LAR (Locally activated resistance, lokal induzierte Resistenz), ali se lahko razširi sistemsko po rastlini SAR (Systemic activated resistance, systemisch aktivierte Resistenz), kar je sorazmerno nov raziskovalni dosežek. Bistveno je, da se to dogaja popolnoma brez spremembe genoma. Ti sistemsko aktivirani obrambni mehanizmi rastline so doslej najboljše raziskani pri kumarah in tobaku in v nasprotju z zgledom pri koreninskem raku učinkujejo na široko proti številnim glivam, bakterijam in virusom. Spekter varstva in biokemični obrambni mehanizmi so značilni za vrsto gostiteljske rastline in niso odvisni od parazitske vrste, ki jo okužuje in ki izzove sistemsko aktivirano rezistenco.

V preglednici 1 je razviden spekter aktivnosti sistemsko aktivirane rezistence pri kumari po okužbi z glivo *Colletotrichum lagenarium* - kumarnim ožigom ali z virusom tobakove nekroze (Tobacco necrosis virus)

**Preglednica 1** Spekter aktivnosti sistemsko aktivirane rezistence pri kumari (*Cucumis sativus*), inducirane z glivo *Colletotrichum lagenarium* in virusom TNV

Bolezen	Povzročitelj
Kumarni ožig	<i>Colletotrichum lagenarium</i>
Kumarna krastavost	<i>Cladosporium cucumerinum</i>
Listna in stebelna pegavost	<i>Mycosphaerella melonis</i>
Fuzarijska uvelost	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>
Kumarna plesen	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>
Oglata bakterijska pegavost	<i>Pseudomonas lachrymans</i>
Bakterijska uvelost	<i>Erwinia tracheiphila</i>
Kumarni mozaik	Virus kumarnega mozaika
Tobakova virusna nekroza	Virus tobakove nekroze

L. 1979 je Ray White z Rothamsteadske poskusne postaje v Angliji dokazal, da zunanja aplikacija salicilne kisline ali aspirina povzroči nastanek PR (pathogenesis related) proteins, od patogeneze odvisnih proteinov, ki so zavarovali tobak pred tobakovim mozaičnim virusom. To dognanje dokazuje, da je mogoče inducirati sistemsko aktivirano rezistenco s preprostimi molekulami. Toda količina salicilne

kislina, ki se zahteva za učinkovito zatiranje je zelo velika, verjetno zato, ker se v rastlini hitro razkraja.

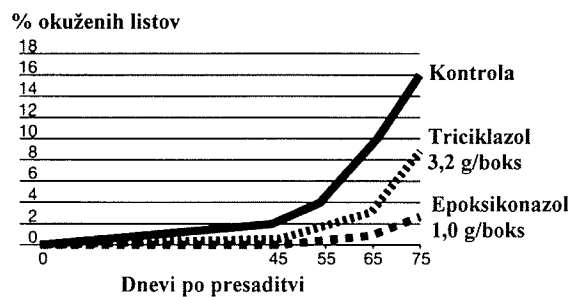
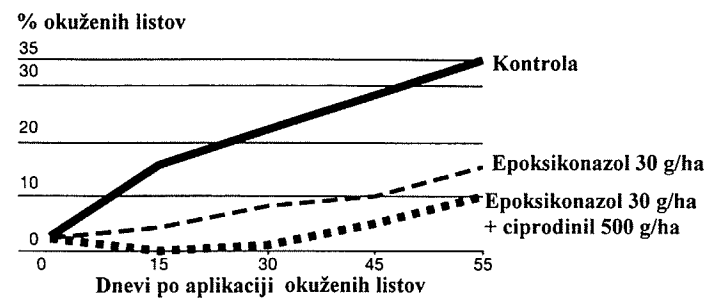
Zato je bilo veliko presenečenje, ko so v različnih laboratorijih neodvisno drug od drugega odkrili, da rastline same kopičijo salicilno kislino po indukciji sistemsko aktivirane rezistence po lokalni okužbi s paraziti. Ali je salicilna kislina naravni endogeni rastlinski aktivator? Da bi raziskali vlogo endogene salicilne kisline v tobaku so kreirali transgene rastline, ki naj ne bi bile sposobne kopičiti salicilne kisline. Resnično v teh rastlinah ni bilo mogoče inducirati sistemsko aktivirane rezistence. To dejstvo močno podpira domnevo, da je salicilna kislina resnično pomembna signalna molekula, ki vodi do sistemsko aktivirane rezistence oz. jo povzroča.

Za aplikativne namene pa je bistveno, da lahko iste mehanizme sistemsko inducirane rezistence izzovemo oz. povzročimo tudi z nekaterimi kemičnimi snovmi. Poleg salicilne kisline sta ugotovljeni še dve substanci, pri katerih so spremenili osnovni obroč omenjene kisline in sta nastali diklorizonikotinska kislina in metilni ester benzotiadiazolkarbotioične kisline, kar je aktivna snov rastlinskega aktivatorja Biona<sup>®</sup> koncerna CIBA-GEIGY. Precejšnja podobnost obeh s salicilno kislino je razvidna iz strukturnih formul (slika 1)



Slika 1: Dozdaj znani rastlinski aktivatorji

Že nekaj let raziskujejo tudi vpliv epoksikonazola - pripravka Opus in propikonazola - pripravka Tilt na indukcijo omenjene sistemsko aktivirane rezistence. Ta dva pripravka tudi lahko izzoveta sistemsko aktivirano rezistenco, vendar le proti glivičnim, ne pa proti bakterijskim in virusnim boleznim.



Slika 2: Dolgotrajna učinkovitost epoksikonazola

Zgoraj: Epoksikonazol in mešanico s ciprodinilom so na pšenico aplicirali enkrat v stadiju oblikovanja bili. Podatki so povprečje 5 poskusov v l. 1994.

Spodaj: Varstvo riža pred *Pyricularia oryzae* z enkratno aplikacijo. Podatki so povprečje 5 poskusov iz ravnih dob 1993/1994 na Japonskem.

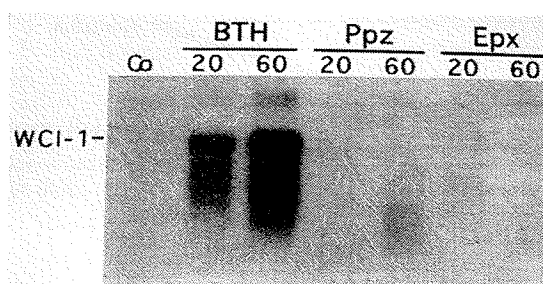
Kriteriji za uvrstitev med rastlinske aktivatorje so razvidni iz 2. preglednice.

**Preglednica 2: Kriteriji za rastlinske aktivatorje**

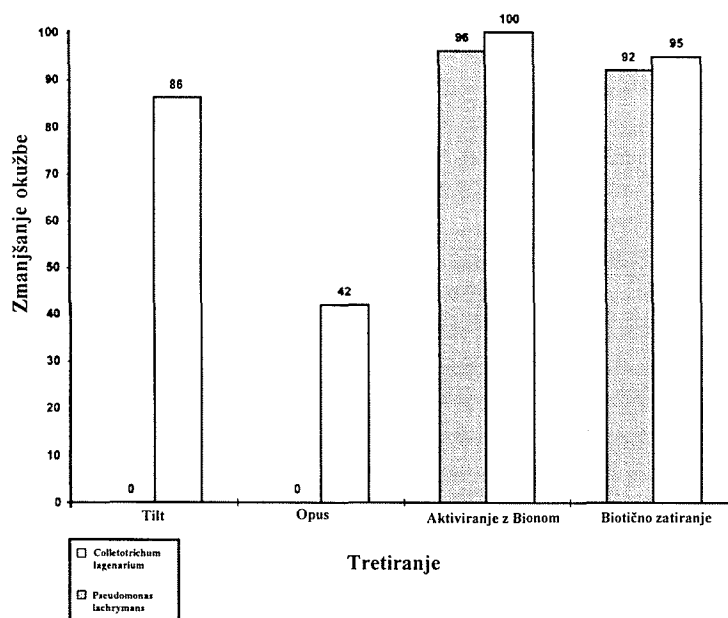
- Enak spekter učinkovanja kot v biotičnem modelu,
- Aktiviranje istih biokemičnih obrambnih mehanizmov kot v biotičnem modelu,
- Čas aktiviranja je med tretiranjem rastline in začetkom učinkovanja,
- Aktivna substanca ali njeni metaboliti ne smejo imeti nobenega direktnega učinka na bolezenske povzročitelje.

**Aktiviranje genov za sistemsko aktivirano rezistenco pri pšenici**

Pri enokaličnicah so naravni obrambni mehanizmi še sorazmerno malo raziskani in jih je v rastlinjakih težko opazovati. V teh razmerah so pri pšenici doslej ugotovili 5 genov (WCI = wheat chemically induced), ki so v tesni korelaciji s sistemsko aktivirano rezistenco. Indukcija genov je očitno tesno povezana z indukcijo sistemsko aktivirane rezistence in je zato zelo ustrezna za markerske gene. Biotična funkcija genov še ni povsem znana. Indukcijo 2 markerskih genov so skušali izzvati z Bionom<sup>®</sup>, Tiltom in Opusom (slika 3)



**Slika 3:** Indukcija pšeničnega gena WC-1 z rastlinskim aktivatorjem Bionom<sup>®</sup> (= benzotiadiazol-BTH) in s fungicidi epoksikonazolom (Epx) in propikonazolom (Ppz) pri pšenici. Od leve: Co je netretirana kontrola, BTH 20 in 60 ppm, Ppz 20 in 60 ppm, Epx 20 in 60 ppm. Indukcijo genov so določili 4 dni po listni aplikaciji z analizo RNK-gel blot. Medtem ko rastlinski aktivator Bionom<sup>®</sup> ekspresijo genov zelo močno poveča, te genske ekspresije pri aplikaciji z Epx in Ppz ni.

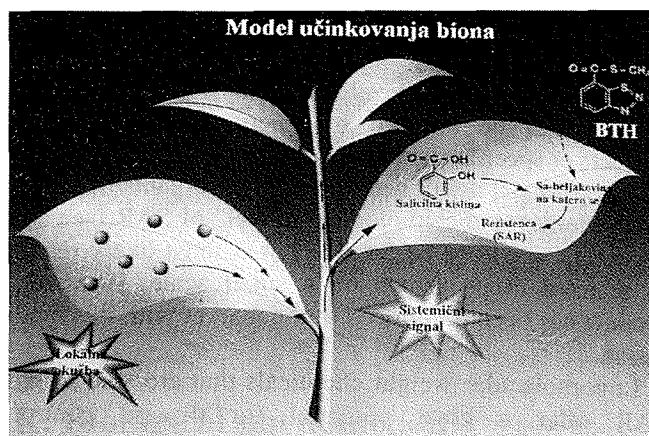


**Slika 4:** Učinek fungicidov epoksikonazola (Opus<sup>®</sup>) in propikonazola (Tilt<sup>®</sup>) na okužbo kumar (*Cucumis sativus* cv. Wisconsin) s *Colletotrichum lagenarium* in *Pseudomonas lachrymans*. Za primerjavo: zmanjšanje okužbe po aktiviranju rastlinskih odpornostnih mehanizmov s kemičnim (Bionom<sup>®</sup>) in biotičnim aktiviranjem. Biotično aktiviranje: 5-7 okuženih mest od *C. lagenarium* na 1. pravem listu. Fungicidi/Bionom<sup>®</sup>: 200 ppm aktivne snovi, aplikacija na liste. Inokulacija s patogeni: 4 dni po aplikaciji.

Fungicidi učinkujejo proti glivičnemu, ne pa proti bakterijskemu povzročitelju. Biotično aktiviranje odpornostnih mehanizmov pri kumarah in kemično aktiviranje z Bionom® varuje pred obema bolezenskima povzročiteljema.

Po tretiranju z Bionom® traja nekaj dni, da se obrambni mehanizem v celoti vzpostavi. Čas aktivacije med tretiranjem in varovalnim učinkom je nadaljnji kriterij za rastlinski aktivator (pregl. 2). Podobno kot cepivo pri toplokrvnih organizmih, ga je treba aplicirati pred okužbo, kar je nedvomno šibka točka, ker se s tem nekako vračamo nazaj v obdobje protektivnih fungicidov.

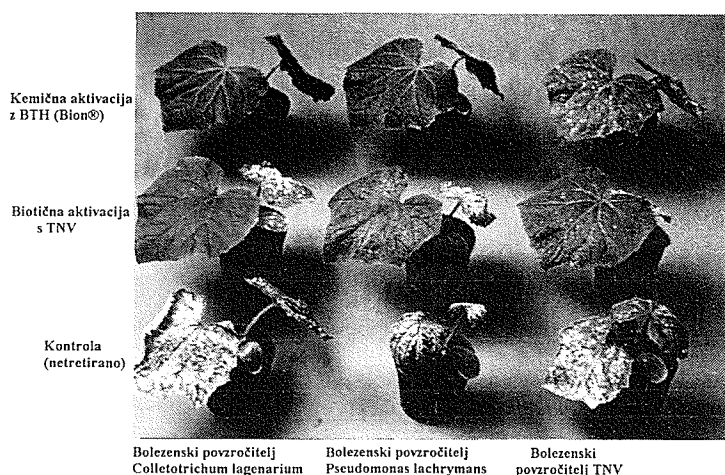
Verjetno mesto učinkovanja Biona® v signalni verigi sistemsko aktivirane rezistence je prikazano na sliki 4. Po primarni okužbi tvori rastlina dozdaj še neznan sistemski signal, ki se razširi po rastlini. Neokuženo tkivo spozna ta signal in v njem se inducirajo obrambni mehanizmi. Ta proces poteka v številnih rastlinah prek salicilne kisline. Bion® učinkuje analogno kot salicilna kislina in aktivira rastlino tudi brez okužbe s parazitom.



**Slika 5:** Shematični prikaz aktiviranja sistemsko aktivirane rezistence (SAR) in verjetno mesto učinkovanja Biona®. Okužba izzove lokalne in sistemske obrambne mehanizme. Za ta namen se po rastlini razdeli kemična signalna molekula. Neokuženo tkivo spozna ta signal in s tem se izzove SAR. Ta proces v številnih rastlinah posreduje salicilna kislina. Tukaj Bion® nadomesti salicilno kislino in izzove obrambne reakcije brez predhodne okužbe.

V nekem skringingu so našli redke mutante plevela *Arabidopsis thaliana*, katerih obrambne mehanizme s sistemsko aktivirano rezistenco ni bilo mogoče izzvati niti z okužbo s paraziti niti kemično z Bionom® ali s salicilno kislino. Te mutante so nadaljnji dokaz, da Bion® v rastlini izrablja isto signalno verigo kot biotična indukcija. Po drugi strani pa dokazujejo tudi, da Bion® učinkuje izključno prek rastline in nima nikaršnega neposrednega vpliva na parazita.

Zgled za učinkovanje SAR s širokim spektrom.



**Slika 6:** Spekter učinkovanja sistemsko aktivirane rezistence (SAR) pri kumari (*Cucumis sativus*) po biotični aktivaciji z virusom tobakove nekroze in kemično aktivacijo z rastlinskim aktivatorjem bionom® (CGA 245704). Netretirane kumare (prva vrsta) so okužili s kumarnim ožigom (*Colletotrichum lagenarium*) (levo) z bakterijo *Pseudomonas lachrymans* (v sredi) in z virusom tobakove nekroze-TNV (desno). Po okužbi prvega pravega lista s TNV je rastlina zavarovana proti kasnejšim okužbam (srednja vrsta). Po tretiranju z 200 ppm biona (zadnja vrsta) je rastlina zavarovana pred istim spektrom parazitov.

### Indukcija hitinaze in glukanaže pri pšenici

Kot smo že omenili, je indukcija sistemsko aktivirane rezistence v korelaciji s kopičenjem proteinov, ki so v zvezi s patogenozo (PR-proteins). Ti se prvenstveno kopičijo v intercelularnih prostorih, t. j. predvsem tam, kjer rastejo mikrobi, predno začnejo razkrajati celične stene. Med PR proteini sta rastlinska encima hitinaza in glukanaza, ki imata tako lastnost in jih zato jemljejo v poštev kot možne mehanizme rastlinskih obrambnih reakcij. Obstajajo konstitutivne, torej v rastlini trajno zastopane oblike encimov, in take, ki jih je mogoče inducirati. S protitelesci proti bazični tobakovi- $\beta$ -1,3-glukanazi in bazični tobakovi hitinazi so testirali, če je te encime mogoče inducirati tudi v pšenici. Ta protitelesca imajo navzkrižno reakcijo z ustreznimi pšeničnimi encimi. V poskusih ni bilo mogoče po enkratni lastni aplikaciji pri pšenici inducirati niti bazične  $\beta$ -1,3-glukanaze niti bazične hitinaze. Količine encimov v vzorcih so bile zelo majhne in na meji detekcije. To morda temelji na majhni specifičnosti uporabljenih protitelesc za pšenično hitinazo. Dodatno so aktivnost hitinaze merili tudi neposredno. Pri tem ni bilo mogoče niti po aplikaciji Biona® niti po škropljenju z obema fungicidoma ugotoviti povečane encimske aktivnosti. Indukcija hitinaze in  $\beta$ -1,3-glukanaze z epoksikonazolom pa je znana na celičnih kulturah sončnic in pri pšenici v hidrokulturi. Pri poskusih s pšenico so prav tako uporabljali protitelesca proti bazični tobakovi hitinazi in glukanazi, kot v obravnavanih poskusih. Zdi se, da indukcija encimov nastane le v posebnih poskusnih razmerah.

Indukcija rastlini lastnih obrambnih mehanizmov s fungicidom epoksikonazolom naj bi temeljila na zmanjšani tvorbi etilena. Etilen je pomembna regulacijska snov v



metabolizmu rastlin. Povezave med etilenom in sistemično aktivirano rezistenco pa doslej ni bilo mogoče dokazati.

Vedno znova opisujejo indukcijo rastlini lastnih obrambnih mehanizmov s fungicidi. V obravnavanih poskusih ni bilo nikakršnih znamenj da bi epoksikonazol in propikonazol vzpodbujala sistemično aktivirano rezistenco. Tudi ni bilo nobenih načelnih razlik med obema fungicidoma. Bion® pa nasprotno ima poseben mehanizem učinkovanja: aktivira namreč mehanizem sistemično aktivirane rezistence.

#### **Izraba sistemično aktivirane rezistence v praksi ?**

Bion® so razvili za uporabo pri pšenici, tobaku, rižu in drugih rastlinah. V pšenici naj bi pripravek uporabljali proti žitni pepelovki enkrat v stadiju razraščanja v odmerku 30 g/ha. Pšenica je zavarovana 50-60 dni.

Še boljši so učinki Biona® pri preprečevanju okužbe riža s *Pyricularia oryzae* z enkratno aplikacijo, kjer okužba na tako tretiranih boksih po 75 dneh doseže le nekaj nad 2%.

Zelo obetavna je uporaba Biona® za zatiranje tobakove plesni (*Peronospora tabacina*) v skrajno majhnih odmerkih 12,5-35 g/ha.

Dejstvo, da sistemično aktivirana rezistenca temelji na več mehanizmih, kaže, da je nevarnost, da bi nastali prek rastline za snov neobčutljivi paraziti, majhna. To pomaga, da se življenjska doba rezistentnih sort lahko podaljša, ker morebitna selekcija virulentnih sevov ali patotipov traja dlje časa.

#### **Literatura**

- Braun, H. (1965): Geschichte der Phytomedizin.- Paul Parey, Berlin und Hamburg, 140 str.
- Kessmann, H., Oostendorp, M. Ruess, W., Staub, T., Kunz, W and Ryals, J. (1996): Systemica Activated Resistance. A New Technology for Plant Disease Control.- Pesticide Outlook 7, 3, 10, 13.
- Oostendorp, M., H. Kessmann, L. Friderich, A. Geissmann, J. Görlach, G. Hengy, D. Nordmeyer, R. Reist, W. Ruess und T. Staub (1996): Einfluss des Pflanzenaktivators Bion® und von Triazol-Fungiziden auf pflanzliche Abwehrmechanismen.- Gesunde Pflanzen 48, 7, 260-264.