Artur Mikiciński[1], Joanna Puławska[1], Danuta Wójcik[1], Agnieszka Marasek-Ciołakowska[1], Rafał Kukawka[2,3], Maciej Spychalski[2], Marcin Śmiglak[2,3]

[1] Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
[2] Poznański Park Naukowo Technologiczny, Poznań,
[3] Innosil Sp. z o.o., Poznań

Poszukiwanie nowych, przyjaznych środowisku związków chemicznych do zwalczania zarazy ogniowej (*Erwinia amylovora*) na jabłoni

WSTĘP

Zaraza ogniowa powodowana przez bakterie *Erwinia amylovora* jest uciążliwą i trudną do zwalczania chorobą jabłoni. Podstawą jej zwalczania są preparaty bazujące na związkach miedzi, których stosowanie w najbliższych latach ma być znacząco ograniczone (Europejski Zielony Ład). Może to spowodować wytworzenie dużej luki w programie ochrony jabłoni przed tą groźna chorobą.

Celem pracy była ocena zdolności indukujących pochodnych kwasu salicylowego (kwas 3-chlorosalicylowy, kwas 3,5-dichlorosalicylowy, kwas 5-chlorosalicylowy) pod kątem przydatności w ochronie jabłoni przed zaraza ogniową. Doświadczenia przeprowadzono w warunkach szklarniowych na pędach jabłoni, które po dwóch zabiegach induktorami zakażano bakteriami *E. amylovora* (10^7 jtk/ml), a następnie szacowano procent znekrotyzowanych fragmentów pędów. Jako kontrolę porównawczą zastosowano Bion® 50 WP. Dodatkowo po elicytacji kwasem 3-chlorosalicylowym (jednokrotnie i dwukrotnie), w liściach, analizowano zmiany w ekspresji genów kodujących wybrane markery biochemiczne, takie jak: białka PR1 i PR2, amoniakoliazę L-fenyloalaninową (PAL), peroksydazę askorbinianową (APX) i peroksydazę glutationową (GPX). Oceniano również przeżywalność pyłku jabłoni po traktowaniu kwiatów badanymi związkami chemicznymi na podstawie kiełkowania ziaren na pożywce agarowej z 3% roztworem sacharozy oraz wpływ związków na gęstość i długość komórek szparkowych w skórce dolnej liścia.

MATERIAŁY I METODY

Doświadczenia na pędach jabłoni. Badania przeprowadzono w szklarni na drzewkach odmiany Idared, podatnej na zarazę ogniową, rosnących w pojemnikach, które umieszczono w odizolowanej kamerze. Dwukrotną elicytację induktorami wykonano podczas aktywnego wzrostu pędów. Do zakażeń użyto zawiesiny wysoko wirulentnego szczepu bakterii *Erwinia amylovora* o koncentracji 10^7 bakterii w mililitrze. Zawiesinę bakteryjną nanoszono odcinając końcówki pędów nożyczkami zanurzonymi w inokulum. W każdym terminie oceny odnotowywano ich liczbę z objawami chorobowymi oraz oceniano stopień nasilenia choroby przez porównanie długości znekrotyzowanej części pędu do całkowitej jej długości.

Badania molekularne. Drzewka jabłoni 'Idared' traktowano kwasem 3-chlorosalicylowym jeden raz lub dwukrotnie. Kontrolę stanowiły rośliny nietraktowane. W każdej kombinacji zbierano liście z 3 drzew. Badano poziom ekspresji 5 genów: *PR1a*, *PR2*, *PAL*, *APX* i *GPX*. Izolację RNA z pobranych liści wykonano przy pomocy komercyjnego zestawu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Całkowity RNA poddano trawieniu DNazą (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) w celu pozbycia się pozostałości DNA. RNA oczyszczono z mieszaniny reakcyjnej przy pomocy mieszaniny fenol : chloroform : alkohol izoamylowy (25:42:1). Preparaty całkowitego RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu odwrotnej transkryptazy M-MLV (Promega) i primera oligo dT_{15} (Promega). Uzyskany cDNA posłużył jako matryca w analizie ekspresji genów metodą real-time PCR z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green. Reakcje prowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu do qPCR (KAPA BIOSYSTEMS) w termocyklerze Rotorgene 6000. Względny poziom ekspresji badanych genów został oszacowany w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego kodującego aktynę. Analizy prowadzone były w trzech powtórzeniach technicznych i trzech powtórzeniach biologicznych, jedno powtórzenie biologiczne stanowiły liście zebrane z jednego drzewa.

PODSUMOWANIE

Ocena fenotypowa wykazała skuteczność badanych związków chemicznych w ochronie pędów, w zakresie od około 40 do 80%. Odnotowano wzrost poziomu ekspresji wszystkich badanych genów w porównaniu z kontrolą już po jednokrotnym traktowaniu induktorami, przy czym efekt ten słabł 4 dni po zabiegu. Natomiast dwukrotna elicytacja powodowała, że podwyższony poziom ekspresji obserwowano zarówno 1 dzień jak i 4 dni po traktowaniu.

Dwukrotną redukcję żywotności pyłku (średnia żywotność 23,3%) obserwowano po 72 godzinach po zabiegu (doświadczenie I). Po 7 dniach po zabiegu (doświadczenie II) odsetek kiełkujących ziaren pyłku wynosił 66%. Elicytacja kwasem 3-chlorosalicylowym (jednokrotnie i dwukrotnie) nie miała wpływu na długość komórek szparkowych natomiast zanotowano zmniejszenie gęstości aparatów szparkowych na mm^2 powierzchni liścia.

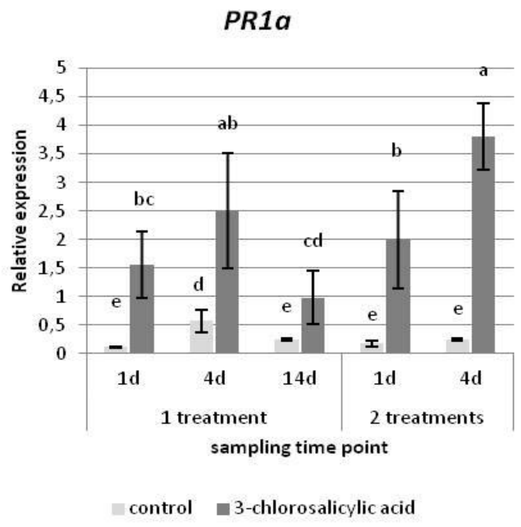
Przeprowadzone badania wykazały zadawalającą skuteczność w ochronie pędów jabłoni w ochronie przed zarazą ogniową. Wytypowane związki chemiczne mogłyby w przyszłości przyczynić się do ograniczenia chemii stosowanej w sadach uzupełniając asortyment preparatów do zwalczania tej groźnej choroby jabłoni.

WYNIKI

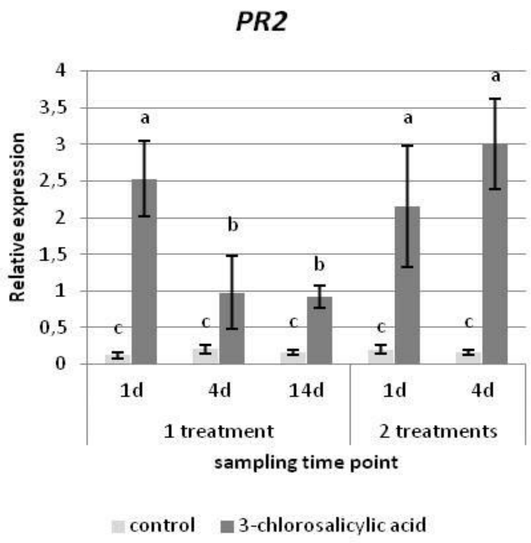
TAB. 1. Skuteczność induktorów odporności w zwalczaniu zarazy ogniowej na pędach jabłoni odm. Idared

KOMBINACJA	ŚREDNI PROCENT PORAŻENIA PĘDÓW 1-SZE DOŚWIADCZENIE			ŚREDNI PROCENT PORAŻENIA PĘDÓW 2-GIE DOŚWIADCZENIE		
	8*	13	28	9	16	29
KONTROLNA	55,3**c	58,9 c	63,0 b	64,0 c	75,2 c	79,0 c
KWAS 3-CHLORO-SALICYLOWY	5,6 a [89,9]***	12,0 a [79,6]	17,9 a [71,6]	6,8 a [89,4]	15,5 a[79,4]	22,3 ab [71,8]
KWAS 3,5-di CHLORO-SALICYLOWY	29,1 b [47,4]	34,4 b [41,6]	35,7 a [43,3]	16,7 b [73,9]	25,9 b[65,6]	32,5 b [58,9]
KWAS 5-CHLORO-SALICYLOWY	-	-	-	4,0 a [93,8]	10,4 a [86,2]	12,4 a [84,3]
BION® 50 WG	22,8 b [58,8]	28,0 ab [52,5]	32,7 a [48,1]	-	-	-

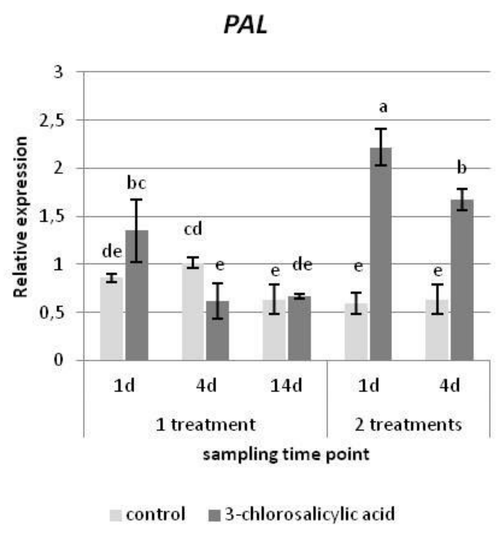
*liczba dni od zakażenia; **długość nekrozy pędu w stosunku do całkowitej jego długości (%);*** skuteczność w % (procent/stopień porażenia w stosunku do kontroli), wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji na danych nietransformowanych. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Newmana – Keuls'a przy poziomie istotności 5%.



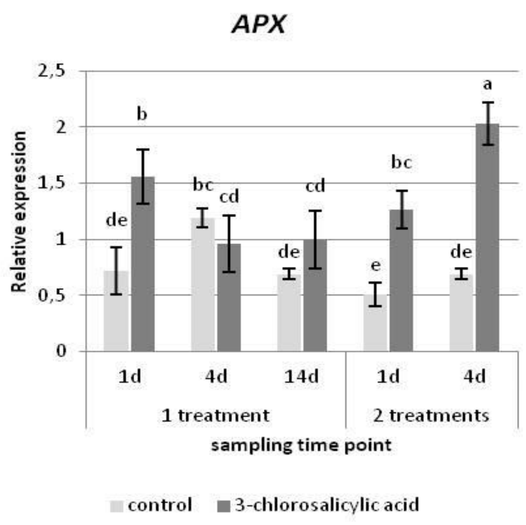
RYS. 1. Względna ekspresja genu *PR1a* w liściach jabłoni, traktowanych kwasem 3-chlorosalicylowym oraz w roślinach nietraktowanych (kontrola).



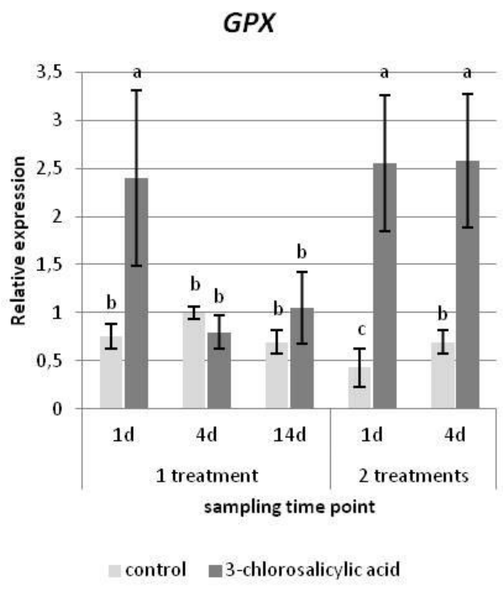
RYS. 2. Względna ekspresja genu *PR2* w liściach jabłoni, traktowanych kwasem 3-chlorosalicylowym oraz w roślinach nietraktowanych (kontrola).



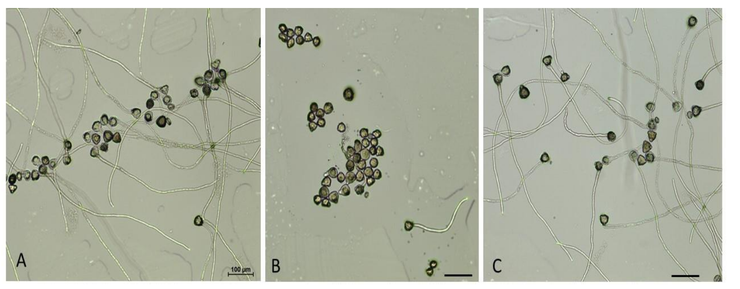
RYS. 3. Względna ekspresja genu *PAL* w liściach jabłoni, traktowanych kwasem 3-chlorosalicylowym oraz w roślinach nietraktowanych (kontrola).



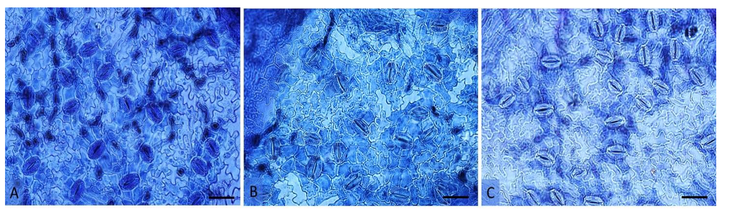
RYS. 4. Względna ekspresja genu *APX* w liściach jabłoni, traktowanych kwasem 3-chlorosalicylowym oraz w roślinach nietraktowanych (kontrola).



RYS. 5. Względna ekspresja genu *GPX* w liściach jabłoni, traktowanych kwasem 3-chlorosalicylowym oraz w roślinach nietraktowanych (kontrola).



RYS. 6. Żywotność pyłku jabłoni: (A) kontrola nie traktowana. (B) Miedzian 50WP. (C) Kwas 3-chlorosalicylowy.



RYS. 7. Dolna skórka liścia jabłoni: (A) Kontrola (B) Kwas 3-chlorosalicylowy (C) BION

Badania zrealizowano w ramach projektu **SONATA 18** finansowanego z Narodowego Centrum Nauki: „Poszukiwanie nowych związków chemicznych indukujących odporność jabłoni na choroby oraz określenie molekularnego mechanizmu ich działania". Umowa nr UMO-2022/47/D/NZ9/02327