

Zastosowanie arbutyny do poprawy kondycji roślin ogórka i ochrony przed chorobą bakteryjnej kanciastej plamistości

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie arbutyny do poprawy kondycji roślin ogórka i ochrony przed chorobą bakteryjnej kanciastej plamistości.

Stosowane w rolnictwie związki indukujące wzrost odporności ogórka na patogeny są efektywne, jednak ich użycie często prowadzi do słabszego wzrostu roślin i spadku plonowania. Z artykułu M. Heil Systemic acquired resistance: available information and open ecological questions znany jest preparat zawierający jako substancję czynną ester *S*-metylowy kwasu benzo-(1,2,3)-tiadiazolokarbotionowego (BTH), który wykazuje szerokie spektrum działania i wysoką efektywność w stosunku do patogenów bakteryjnych, grzybowych i wirusowych, zwiększa tolerancję roślin na abiotyczne czynniki środowiska, ale powoduje negatywne skutki w postaci zahamowania wzrostu roślin i spadku plonowania, zwłaszcza w uprawach pod osłonami.

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie arbutyny do poprawy kondycji roślin ogórka i ochrony przed chorobą bakteryjnej kanciastej plamistości.

Arbutynę stosuje się korzystnie w stężeniu od 0,1 do 4 mM.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że zastosowanie arbutyny (ARB) w uprawie hydroponicznej ogórka wywołuje efekt fitostymulujący na wzrost wegetatywny roślin. Zastosowanie według wynalazku polega na tym, że arbutyna korzystnie wpływa na procesy fotochemiczne fotosyntezy, nie zmienia dystrybucji cukrów, nie działa cytotoksycznie na rośliny ogórka, a jednocześnie ogranicza rozwój

kanciastej plamistości liści ogórka wywoływanej przez *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. ARB jest związkiem naturalnym, stąd jej stosowanie nie jest obciążeniem dla środowiska.

ARB nie była dotąd wykorzystywana jako fitostymulator i do ochrony roślin. Znane praktyczne zastosowanie tego związku to składnik biologicznie czynny (inhibitor tyrozynazy) w kremach wybielających stosowanych w dermatologii i kosmetyce, w terapii chorób infekcyjnych układu moczowego oraz nowotworowych układu pokarmowego.

Wynalazek zostanie bliżej opisany w przykładzie.

Przykład.

Stosowano następującą procedurę badania roztworu ARB dla określenia skuteczności fitostymulującej i stopnia ograniczenia rozwoju choroby bakteryjnej kanciastej plamistości liści ogórka. Sporządzono wodne roztwory, które podawano dolistnie roślinom ogórka. Skuteczność działania ARB w kierunku poprawy kondycji roślin i efektywności w ograniczeniu infekcji *P. syringae* pv. *lachrymans* porównywano z działaniem BTH (ester *S*-metylowy kwasu benzo-(1,2,3)-tiadiazolokarbotionowego). Zastosowane stężenie BTH wybrano na podstawie danych literaturowych, a następnie przetestowano. W przypadku ARB zarówno użyte stężenie jak i jego efektywność ustalono doświadczalnie.

Podawanie wodnego roztworu arbutyny (2,0 mM) i BTH (0,1 mM) na liście prowadzono przez oprysk górnej i dolnej powierzchni liści (30 cm³/24 rośliny) przy użyciu atomizera.

Rośliny ogórka (*Cucumis sativus* L. odmiana Polan) uprawiano hydroponicznie na pożywce o składzie: (mg/dm³): N – 224; P – 39; K – 312; Ca – 160; Mg – 33; S – 44; Fe – 0.84; Mo – 0.98; Cu – 0.84; Mn – 8.4; B – 4.2; Zn – 4.2 z wykorzystaniem podłoża inertnego (wełna mineralna). Rośliny użyte do eksperymentu rosły w warunkach boksu hodowlanego w temperaturze 24°C z 16-h fotoperiodem (174 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ PPFD). W celu ograniczenia wzrostu mikroorganizmów pożywkę zmieniano co 24 godziny. Rośliny wybierano losowo w modelu doświadczalnym z 6 powtórzeniami. Rośliny w wieku 3-tygodni podzielone na 3 grupy traktowano odpowiednio: ARB, BTH i wodą (kontrola, K). Materiał do analiz stanowiły liście 3. piętra (poddane w późniejszym czasie inokulacji) i 5. piętra (nie poddane inokulacji, tzw. systemiczne) ze wszystkich 3 grup roślin (kontrolne, traktowane ARB, traktowane BTH). Badania prowadzono 7 i 14 dni po traktowaniu ARB lub BTH. W trakcie badań oceniono: (a) powierzchnię i świeżą masę (św. m.) liści 3. i 5. piętra, (b) świeżą masę pędów, (c) maksymalną wydajność fotochemiczną PSII (Fv/Fm) i wydajność kwantową reakcji fotochemicznej w PSII (ΦPSII). Pod względem parametrów biochemicznych oznaczono: stężenie barwników fotosyntetycznych (chlorofil a, karotenoidy) metodą Wellburn (1994), stężenie glukozy i sacharozy przy użyciu komercyjnego testu enzymatycznego po uprzedniej ekstrakcji etanolem. Jako markery stresu oznaczano GST i LDH.

Część roślin z każdej z trzech wyszczególnionych wyżej grup 7 dni po traktowaniu zakażano bakterią *P. syringae* pv *lachrymans* (Bank Patogenów Roślin, Poznań; nr kolekcji IOR: 1990; Nr kolekcji belgijskiej: LMG 51172).

W badaniach jako inokulum zastosowano przygotowaną w 10 mM CaCl₂ zawiesinę o gęstości 10⁷-10⁹ komórek w cm³ określonej turbidymetrycznie ($\lambda=630$ nm), przygotowaną z hodowli bakterii prowadzonej na płynnym podłożu King B na wytrząsarce, w temperaturze 27°C przez 24 h. Inokulacja zawiesiną bakterii polegała na infiltracji inokulum do liści 3. piętra od spodniej strony blaszki liściowej za pomocą strzykawki bez igły. W przypadku roślin inokulowanych patogenem dokonano oceny rozwoju infekcji na podstawie pomiaru powierzchni blaszki liściowej objętej zmianami chorobowymi 7 dni po inokulacji *P. syringae* pv *lachrymans* (co czasowo odpowiada 14 dniom po traktowaniu ARB i BTH. W tym punkcie czasowym określono również liczbę bakterii w zakażonych liściach (jtk) metodą posiewu.

Tab. 1. Wpływ ARB i BTH na wielkość biomasy liści i pędów ogórka 14 dni po traktowaniu.

Wariant	Biomasa (g św. m.)		
	Liść 3	Liść 5	Pęd
Kontrola	2,9976 ± 0,4386	2,6084 ± 0,3797	25,0943 ± 1,2762
ARB	3,4873 ± 0,4835	2,9745 ± 0,2343	42,2837 ± 4,1374*
BTH	2,0161 ± 0,5197*	1,1127 ± 0,0995*	10,3916 ± 1,7112*

Wyniki prezentują średnią ± SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami Kontrola i ARB lub Kontrola i BTH (p<0,05).

Rośliny ogórka po traktowaniu ARB wykazują lepszy wzrost ponieważ zwiększyła się biomasa blaszek liściowych (około 15%) i pędów (około 70%) w stosunku do roślin kontrolnych, podczas gdy w roślinach traktowanych BTH wartości te były w przybliżeniu o 50% niższe niż w kontroli.

Tab. 2. Wpływ ARB i BTH na wielkość liści ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Powierzchnia blaszki liściowej (mm ²)			
	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	9753,9±1755,7	15124,6±5750,1	2622,3±742,7	11613,5±1277,5
ARB	12434,5±1492,1	17055,8±3752,3	3503,6±595,6*	16610,9±2657,6*
BTH	7540,71±1831,0*	11965,8±2351,7	2419,9±362,9	8631,3±1375,3

Wyniki prezentują średnią ± SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami Kontrola i ARB lub Kontrola i BTH (p<0,05)

Rośliny traktowane ARB charakteryzowały się większą powierzchnią blaszek liściowych. Szczególnie dobrze było to widoczne w przypadku blaszek liściowych 5. piętra, gdzie powierzchnia ta była średnio o 40% większa niż

powierzchnia liści kontrolnych z tego samego piętra. W przypadku roślin traktowanych BTH powierzchnia blaszek liściowych była niższa od wartości kontrolnych.

Tab. 3. Wpływ ARB i BTH na stężenie chlorofilu a w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Stężenie chlorofilu a (mg/g św.m.)			
	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	0.778±0.052	0.704±0.064	0.804±0.258	0.911±0.012
ARB	0.798±0.131	0.851±0.120	0.783±0.098	1.049±0.080 *
BTH	0.593±0.053*	0.395±0.118 *	0.653±0.137	0.868±0.036

Wyniki prezentują średnią ± SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami Kontrola i ARB lub Kontrola i BTH ($p < 0,05$)

Traktowanie roślin ogórka ARB w przeciwieństwie do traktowania BTH pozytywnie wpływało na stężenie barwników asymilacyjnych. Stężenie chlorofilu a w większości przypadków przekraczało wartości kontrolne w zakresie 10-20%, podczas gdy u roślin traktowanych BTH stężenie chlorofilu a było istotnie niższe w zakresie 30-50%.

Tab. 4. Wpływ ARB i BTH na stężenie karotenoidów w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Stężenie karotenoidów (mg/g św.m.)			
	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	0.189±0.016	0.165±0.022	0.200±0.070	0.239±0.016
ARB	0.187±0.021	0.191±0.016	0.183±0.021	0.257±0.030
BTH	0.154±0.023	0.118±0.032	0.113±0.022	0.205±0.007*

Wyniki prezentują średnią ± SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami Kontrola i BTH ($p < 0,05$)

Traktowanie roślin ogórka ARB pozytywnie wpływało na stężenie karotenoidów. Natomiast u roślin traktowanych BTH stężenie karotenoidów było istotnie niższe.

Tab. 5. Wpływ ARB i BTH na maksymalną wydajność PSII (Fv/Fm) w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Fv/Fm

	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	0,79±0,01	0,74±0,04	0,80±0,01	0,78±0,04
ARB	0,77±0,03	0,80±0,01	0,80±0,03	0,81±0,01
BTH	0,78±0,01	0,75±0,02	0,80±0,02	0,79±0,02

Wyniki prezentują średnią ± SD

Tab. 6. Wpływ ARB i BTH na wydajność kwantową reakcji fotochemicznej w PSII (Φ PSII) w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Φ PSII			
	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	0,46±0,01	0,42±0,06	0,45 ±0,01	0,43±0,06
ARB	0,42±0,02	0,41±0,02	0,49±0,02*	0,47±0,02*
BTH	0,49±0,02*	0,36±0,03*	0,30±0,03*	0,53±0,02*

Wyniki prezentują średnią \pm SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami Kontrola i ARB lub Kontrola i BTH ($p < 0,05$)

ARB i BTH nie wpływały na maksymalną wydajność PSII (F_v/F_m) (Tab. 5), jednak traktowanie roślin ARB wywołało stabilny wzrost wydajności kwantowej reakcji fotochemicznej w PSII (Φ_{PSII}) w liściach 5. piętra (Tab. 6). BTH spowodował fluktuacje wydajności kwantowej reakcji fotochemicznej w PSII (Φ_{PSII}).

Tab. 7. Wpływ ARB i BTH na stężenie glukozy w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Stężenie glukozy ($\mu\text{g}/\text{mg}$ białka)			
	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	12,18 \pm 1,98	17,03 \pm 2,83	13,06 \pm 2,78	19,07 \pm 4,16
ARB	16,51 \pm 3,12	18,85 \pm 4,87	16,15 \pm 4,03	19,29 \pm 5,84
BTH	17,41 \pm 2,56	31,23 \pm 6,70 *	23,98 \pm 2,88	22,96 \pm 5,40

Wyniki prezentują średnią \pm SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami Kontrola i BTH ($p < 0,05$)

Tab. 8. Wpływ ARB i BTH na stężenie sacharozy w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Stężenie sacharozy ($\mu\text{g}/\text{mg}$ białka)			
	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	$36,37 \pm 5,91$	$43,84 \pm 5,95$	$40,60 \pm 5,18$	$42,50 \pm 2,97$
ARB	$38,92 \pm 5,12$	$54,98 \pm 4,62 *$	$39,34 \pm 4,03$	$52,90 \pm 5,84$
BTH	$31,95 \pm 4,08$	$93,37 \pm 8,08 *$	$42,25 \pm 5,72$	$66,62 \pm 4,36 *$

Wyniki prezentują średnią \pm SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami Kontrola i ARB lub Kontrola i BTH ($p < 0,05$)

ARB i BTH spowodowały wzrost stężenia glukozy (Tab. 7) i sacharozy (Tab. 8) w liściach ogórka. Jednak w przypadku ARB następowała dystrybucja cukrów do innych części rośliny, czego efektem końcowym był wzrost biomasy liści i pędów, natomiast w liściach traktowanych BTH następowała kumulacja cukrów, głównie w starszych liściach, i obniżenie biomasy liści i pędów w stosunku do kontroli (Tab. 1).

Tab. 9. Wpływ ARB i BTH na aktywność transferazy glutationowej (GST) w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Aktywność GST (j.e./mg białka)			
	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	20,94 ± 4,84	23,13 ± 5,61	20,27 ± 3,80	21,96 ± 2,50
ARB	23,97 ± 1,94	30,35 ± 6,13	21,38 ± 2,49	24,39 ± 4,54
BTH	41,78 ± 6,88*	40,44 ± 6,27 *	54,66 ± 6,70 *	39,16 ± 5,27 *

Wyniki prezentują średnią ± SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami lub Kontrola i BTH ($p < 0,05$)

Podwyższona aktywność GST (75-170% powyżej odpowiednich wartości kontrolnych) w liściach roślin traktowanych BTH potwierdza jego cytotoksyczne działanie.

Tab. 10. Wpływ ARB i BTH na aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w liściach ogórka 7 (7d) i 14 (14d) dni po traktowaniu.

Wariant	Aktywność LDH (j.e./mg białka)
---------	--------------------------------

	Liść 3		Liść 5	
	7 d	14 d	7 d	14 d
Kontrola	20,94 ± 3,56	26,14 ± 4,88	16,03 ± 3,01	23,20 ± 3,44
ARB	20,62 ± 3,12	25,43 ± 8,39	19,92 ± 2,62	21,41 ± 3,54
BTH	35,11 ± 4,41*	23,42 ± 6,65	28,05 ± 3,09*	24,26 ± 4,07

Wyniki prezentują średnią ± SD, * oznacza istotne statystycznie różnice między grupami lub Kontrola i BTH ($p < 0,05$)

Podwyższona aktywność LDH w liściach roślin traktowanych BTH potwierdza jego cytotoksyczne działanie.


Tab. 11. Zahamowanie rozwoju infekcji w 3. liściu roślin ogórka wcześniej traktowanych ARB lub BTH przedstawione jako % powierzchni zmienionej chorobowo oraz liczba bakterii w tkankach (jtk) w stosunku do roślin zakażonych.

Wariant	Powierzchnia zmieniona chorobowo (% Kontrola+Psl)	Liczba bakterii w jtk (% Kontrola+Psl)
Kontrola+Psl	100	100

ARB+Psl	52	6,5
BTH+Psl	66	25

Wcześniejsze (7 dni przed inokulacją patogenem) traktowanie roślin ogórka zarówno ARB jak i BTH ograniczało rozwój infekcji w liściach 3. piętra, przy czym ARB zdecydowanie silniej niż BTH ograniczała rozwój infekcji *P. syringae* pv. *lachrymans*.

RZECZNIK PATENTOWY
UNIwersytetu Łódzkiego


mgr inż. Wojciech Zajczkowski