

## Indukovana otpornost biljaka

Katarina Gašić • Aleksa Obradović

received: 27 April 2012, accepted: 17 October 2012

© 2012 IFVC

doi:10.5937/ratpov49-1877

**Izvod:** Biljke poseduju različite odbrambene mehanizme kojima se štite od napada patogena. Oni se mogu podeliti na mehanizme pasivne i aktivne prirode, u zavisnosti da li su već prisutni u biljci ili se aktiviraju nakon infekcije. Jedan od vidova aktivne otpornosti je indukovana otpornost koja predstavlja fiziološko stanje povećane odbrambene sposobnosti biljke i može biti izazvana različitim biotskim ili abiotskim faktorima. Na osnovu razlike u signalnim putevima i efikasnosti, definisana su dva tipa indukovane otpornosti. Prvi tip predstavlja sistemsko stečena otpornost (*Systemic Acquired Resistance - SAR*) koja se ispoljava u svim delovima biljke kao posledica aktivacije odbrambenog mehanizma biljke u kontaktu sa organizmom koji je parazitira ili se hrani njenim delovima. Pri ovoj otpornosti dolazi do akumulacije salicilne kiseline kao signalnog molekula i povećane sinteze PR (*Pathogenicity Related*) proteina. Drugi tip, indukovanu sistemsku otpornost (*Induced Systemic Resistance - ISR*) izazivaju nepatogene rizosferne bakterije (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR*). Ovaj tip otpornosti je regulisan jasmonskom kiselinom i etilenom i pri njenom ispoljavanju ne dolazi do sinteze PR proteina. Oba tipa otpornosti zahtevaju funkciju regulatornog NPR1 proteina. Osim bioloških agenasa i neka hemijska jedinjenja mogu indukovati otpornost biljaka. Poslednjih godina evidentan je napredak u razumevanju mehanizma dejstva ovih tipova otpornosti što je dovelo do njihove komercijalne primene u zaštiti bilja.

**Gljučne reči:** indukovana sistemsko otpornost, ISR, otpornost biljaka, patogeni, pobuđivači, SAR, sistemsko stečena otpornost

### Uvod

Biljke su konstantno izložene dejstvu patogenih mikroorganizama. S obzirom da u biljkama postoji širok spektar odbrambenih mehanizama, samo mali procenat mikroorganizama uspeva da izvrši infekciju i prouzrokuje bolest. Odbrambeni mehanizmi biljke mogu biti pasivni i aktivni, u zavisnosti da li su u normalnim okolnostima prisutni u biljci ili se aktiviraju nakon infekcije patogenom. U pasivne mehanizme odbrane ubrajaju se kutikula, ćelijski zid i različita inhibitorna jedinjenja (anticipini), dok se pri prvom kontaktu biljke i patogena aktiviraju mehanizmi aktivne odbrane u vidu morfoloških barijera (zadebljanje ćelijskog zida), sekundarnih

metabolita (fitoaleksina) i sinteze odbrambenih proteina (Silvar et al. 2008).

Otpornost u širem smislu može se definisati kao sposobnost biljke da spreči ili uspori štetnu aktivnost patogena. Najrasprostranjeniji tip otpornosti ispoljava se između patogenog biološkog agensa i biljke koja nije njegov domaćin (*non-host resistance*). Ukoliko su pojedine individue unutar populacije osetljive prema nekim rasama patogena, a otporne prema drugim rasama istog patogena, interakcija se zasniva na konceptu „gen za gen”. U slučaju kompatibilne reakcije patogen može kolonizirati biljku i izazvati bolest. Međutim, pri inkompatibilnoj reakciji patogen započinje infektivni proces, ali ubrzo biva lokalizovan na mestu prodora. Ova

K. Gašić\* · A. Obradović  
University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6,  
11080 Beograd-Zemun, Serbia  
e-mail: gasickatarina@yahoo.com

Zahvalnica: Ovaj rad je rezultat aktivnosti u okviru projekta III46008 „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane”, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

otpornost, specifična prema rasi patogena, koja se još naziva „vertikalna otpornost“, regulisana je prisustvom *R* gena (geni rezistentnosti) u biljci i *Avr* gena (geni avirulentnosti) u patogenu. U biljkama koje poseduju otpornost specifičnu prema rasi patogena, *R* geni kodiraju sintezu proteina koji prepoznaju produkte odgovarajućih *Avr* gena u patogenu. U ovom slučaju veoma brzo dolazi do prepoznavanja i brze aktivacije odbrambenog mehanizma biljke koja se ispoljava u vidu hipersenzitivne reakcije (HR). Akumulacija antimikrobnih jedinjenja, zadebljanje ćelijskog zida i ekspresija određenih odbrambenih gena u okolnom tkivu zaustavljaju dalju kolonizaciju biljke od strane patogena.

Ukoliko patogen ne poseduje *Avr* gene koje bi biljka prepoznala, izostaje hipersenzitivna reakcija (Agrios 2005). U tom slučaju otpornost se postiže nespecifičnim mehanizmima biljke koji još uvek mogu obezbediti različit stepen zaštite. Ova otpornost naziva se „horizontalna otpornost“ i ispoljava se prema svim fiziološkim rasama jednog patogena (Babović, 2003). Bez obzira da li u biljci postoji vertikalna otpornost, horizontalna otpornost uvek funkcioniše i predstavlja sastavni deo svake biljke (Babović, 2003).

Nakon primarnog kontakta sa parazitom, osetljiva biljka može razviti povećanu otpornost prema svakom sledećem pokušaju prodora tog parazita (Kuć, 1982; Hammerschmidt, 2007; Pieterse & Van Loon, 2007). Ovaj fenomen poznat je kao indukovana otpornost. Van Loon et al. (1998) dali su definiciju po kojoj indukovana otpornost predstavlja fiziološko stanje povećane odbrambene sposobnosti biljke, koja može biti izazvana različitim biotskim ili abiotskim faktorima. Povećan nivo otpornosti ispoljava se prema širokom spektru parazita, uključujući gljive, bakterije, viruse, nematode, parazitne cvetnice, pa čak i insekte herbivore (Hammerschmidt & Kuć, 1995; Sticher et al., 1997; Van Loon et al., 1998; Kessler & Baldwin, 2002).

Važno je napomenuti da se u literaturi može naći više termina kojima se označava ovaj vid otpornosti. Tako se koriste nazivi kao što su imunizacija, indukovana otpornost (IR), indukovana sistemična otpornost (ISR) ili sistemično stečena otpornost (SAR) (Agrawal et al., 1999). Van Loon et al. (1998) definisali su dva tipa indukovane otpornosti: sistemično stečena otpornost (*Systemic Acquired Resistance - SAR*) i indukovana sistemična otpornost (*Induced*

*Systemic Resistance - ISR*) koje se razlikuju na osnovu prirode pobuđivača (elicitora) i signalnih puteva koji dovode do njihovog ispoljavanja. Ova definicija je u suprotnosti sa literaturom u kojoj se SAR i ISR koriste kao sinonimi (Kloepper et al., 1992; Hammerschmidt & Kuć, 1995).

#### Sistemično stečena otpornost (Systemic Acquired Resistance - SAR)

Otpornost biljaka na napad patogena, kao prirodni fenomen prvi put su uočili Beauvene (1899) i Ray (1901) proučavajući gljivu *Botrytis cinerea*, prouzrokovaca sive truleži (loc. cit. Percival 2001). Beauvene (1899) je primetio da virulentnost sojeva *B. cinerea* može varirati ukoliko se gljiva prethodno izloži dejstvu visokih ili niskih temperatura (loc. cit. Percival 2001). On je uspeo da izazove sistemičnu otpornost begonije (*Begonia* sp.) gajenjem biljaka u zemljištu koje je prethodno inokulisano sojevima patogena tretiranim visokom ili niskom temperaturom ili infiltriranjem inokuluma direktno u biljno tkivo. Bez obzira na tehniku inokulacije postignuta je otpornost biljke prema kasnijim infekcijama virulentnim sojevima istog patogena (Percival 2001). Prve eksperimente u kontrolisanim uslovima izveo je Ross (1961) koji je pokazao da inokulacija jednog lista duvana virusom mozaika duvana (*Tobacco mosaic virus - TMV*) smanjuje intenzitet kasnije infekcije ostalih listova iste biljke. On je prvi upotrebio naziv sistemično stečena otpornost za otpornost koja je ispoljena i u delovima biljke koji nisu prethodno inokulisani virusom mozaika duvana. Dalje proučavanje sistemično stečene otpornosti prema gljivama nastavili su Cruickshank & Mandryk (1960), pokazavši da se visok nivo rezistentnosti prema *Peronospora tabacina*, prouzrokovacu plamenjače duvana, može postići tri nedelje nakon infiltracije suspenzije spora iste gljive u biljno tkivo (loc. cit. Cohen & Kuć 1981). Tokom 80-ih godina prošlog veka model sistemično stečene otpornosti primenjen je i na druge biljke, kao što su krastavac, pasulj, pirinač i *Arabidopsis thaliana*, dokazujući da se SAR ispoljava u različitim familijama biljaka i da je efikasna protiv širokog spektra patogena kao što su bakterije, virusi i gljive (Sticher et al., 1997).

Sistemično stečena otpornost biljke može biti izazvana nepatogenim mikroorganizmom, avirulentnom formom patogena, inkompatibilnom rasom patogena, virulentnim patogenom u uslovima kada je infekcija sprečena usled nepovoljnih

uslova spoljne sredine ili određenim hemijskim jedinjenjima (Van Loon et al., 1998). Uopšteno, indukovana otpornost je sistemичne prirode s obzirom da je odbrambena sposobnost biljke povećana ne samo u delovima biljke gde je došlo do primarne infekcije već i u neinficiranim, udaljenim delovima. Međutim, indukovana otpornost ne mora uvek biti sistemična. Lokalno stečenom otpornošću biljke (*Localized acquired resistance - LAR*) označava se stanje kada nakon primarne infekcije patogenom, pojedina tkiva poseduju veću otpornost u odnosu na druga (Ross, 1961). SAR i LAR su slični po tome što ispoljavaju efikasnost prema različitim vrstama patogena. Međutim, signal koji se prenosi kroz celu biljku i omogućava povećanu otpornost biljke pri sistemično stečenoj otpornosti nedostaje u lokalno stečenoj otpornosti. Na primer, pri inokulaciji osetljive biljke domaćina virusom mozaika duvana, LAR se ispoljava u zoni 1 do 2 mm oko mesta infekcije. LAR se karakteriše odsustvom simptoma bolesti u blizini mesta primarne infekcije kao i njihovim slabijim ispoljavanjem u udaljenijim delovima biljke, kada se inokulacija izvede 2-3 dana nakon primarne infekcije (Agrios, 2005).

Nastanak SAR povezan je sa lokalnim i sistemičnim povećanjem nivoa salicilne kiseline kao i sa ekspresijom specifičnog seta gena koji kodiraju sintezu PR proteina (Van Loon, 1997). PR proteini predstavljaju proteine koje proizvodi biljka domaćin u stresnim uslovima. Na osnovu sekvenci i osobina aminokiseline koje ulaze u njihov sastav, PR proteini su podeljeni u 14 familija, označenih od PR-1 do PR-14 (Gozzo, 2003). Proteini familija od PR-2 do PR-14 smatraju se odgovornim za specifične funkcije ili enzimsku aktivnost uključujući na primer  $\beta$ -1,3-glukanaze (PR-2), hitinaze (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) i peroksidaze (PR-9) (Kessmann et al., 1994). PR-1 proteini su najznačajnija grupa i u velikoj količini se indukuju u paradajzu i duvanu. Iako njihova specifična funkcija još uvek nije dovoljno razjašnjena, dva PR-1 proteina izolovana iz navedenih biljaka ispoljila su jako fungicidno dejstvo protiv *Phytophthora infestans* inhibirajući klijanje zoospora u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Niderman et al., 1995). Akumulacija PR-1 proteina je najpouzdaniji biohemijski pokazatelj za nastanak sistemično stečene otpornosti (SAR) (Gozzo, 2003).

Veliki značaj i uska povezanost sinteze PR proteina i ispoljavanja SAR proučavana je na biljkama u čiji genom je ugrađen gen *nahG*. Ove biljke ne akumuliraju salicilnu kiselinu ili

PR proteine i ne indukuju SAR kao odgovor na napad patogena (Delaney et al., 1995; Gaffney et al., 1993). Naime, funkcija *nahG* gena ogleda se u kodiranju enzima salicilat-hidroksilaze koji hidrolizuje salicilnu kiselinu u katehol. Biljke koje poseduju ovaj gen ne mogu akumulirati salicilnu kiselinu i samim tim ne ispoljavaju SAR (Agrios, 2005). Eksperimenti sa *nahG* transformisanim biljkama pokazali su da je salicilna kiselina esencijalni signalni molekul koji omogućava ispoljavanje SAR nakon infekcije.

Pored bioloških agenasa, neka hemijska jedinjenja takođe mogu izazvati SAR. Na primer, salicilna kiselina (SA), 2,6-dihloroizonicotinska kiselina (INA) i benzotiadiazol (BTH) aktiviraju isti set PR gena koristeći iste signalne puteve kao i pri SAR izazvanoj biološkim agensima (Ward et al., 1991; Uknes et al., 1992; Lawton et al. 1996). Takođe, tretmani neproteinskom  $\beta$ -aminobuternom kiselinom (BABA) dovode do ispoljavanja otpornosti biljke prema različitim patogenima (Baysal et al., 2005).

#### **Indukovana sistemična otpornost (Induced Systemic Resistance - ISR)**

Rizosferne bakterije prisutne su u velikom broju na površini korena, gde se snabdevaju hranljivim materijama koje obezbeđuje biljka u vidu eksudata i lizata (Lynch & Whipps, 1991). Oko 25% bakterija u rizosferi pripadaju tzv. *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR), s obzirom da se njihovom aktivnošću stimuliše porast i povećava otpornost biljaka u stresnim uslovima (Lynch, 1976; Kloepper et al., 1980). Povećana produktivnost biljaka može biti posledica uticaja PGPR sojeva na štetne mikroorganizme i zemljišne patogene (Schippers et al., 1987). Fluorescentne *Pseudomonas* spp. su među najefikasnijim rizosfernim bakterijama koje utiču na smanjenje intenziteta bolesti izazvanih nekim zemljišnim patogenima (Weller, 1988). PGPR sojevi mogu ispoljiti korisne efekte pomoću različitih mehanizama koji obuhvataju: proizvodnju siderofora u uslovima nedostatka jedinjenja gvožđa, zatim stvaranje antibiotika kojima se suzbijaju kompetitivni mikroorganizmi, kao i aktivnošću enzima hitinaza i glukanaza kojima se liziraju ćelije patogena (Schippers, 1998).

Devedesetih godina prošlog veka, dve grupe istraživača nezavisno su saopštile da rizosferne bakterije *Pseudomonas* spp. imaju potencijal

da povećaju otpornost biljke u čijoj okolini žive (Van Peer et al., 1991; Wei et al., 1991). Tokom proučavanja kontrole *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, prouzrokovača fuzariozne uvelosti karanfila i *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, prouzrokovača fuzariozne uvelosti rotkve, kao mehanizam kontrole patogena primenjena je kompeticija za jedinjenja gvožđa korišćenjem soja WCS358 bakterije *Pseudomonas putida* (Lemanceau et al.; 1992, 1993; Duijff et al., 1994a). U uslovima nedostatka gvožđa u zemljištu, soj WCS358 izlučuje ploveridin-tip siderofore (pseudobaktin 358) koji reaguje sa jonima slabo dostupnog gvožđa gradeći gvožđe-siderofora kompleks, koji se zatim transportuje u bakterijsku ćeliju. Siderofore koje oslobađaju navedene *Fusarium* spp. u ovim uslovima su manje efikasne u odnosu na pseudobaktin 358, tako da u prisustvu soja WCS358, nedostatak gvožđa predstavlja ograničavajući faktor za razvoj ovih patogena. Kao posledica nedostatka gvožđa, inhibirano je klijanje spora gljive i zaustavljen porast hifa. Na ovaj način smanjuje se nivo inokuluma kao i mogućnost da biljka bude inficirana patogenom. U isto vreme, za razliku od navedenog patogena, biljke ne pate od nedostatka gvožđa (Duijff et al., 1994b).

Kasnijim eksperimentima pokazano je da soj bakterije *Pseudomonas fluorescens* WCS417 ispoljava dva puta veću efikasnost od *P. putida* soja WCS358 u suzbijanju fuzariozne uvelosti karanfila (Duijff et al., 1993). Naime, Van Peer et al. (1991) su utvrdili da kada se *P. fluorescens* soj WCS417 i *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* nanesu na različite delove biljke karanfila, odnosno kada se prvo tretira koren karanfila sojem bakterije, a nakon nedelju dana posle povređivanja stabla u njega unese patogena gljiva, dolazi do smanjenog ispoljavanja simptoma uvelosti. Pri ovakvom načinu inokulacije, soj bakterije i patogena gljiva ostaju prostorno razdvojeni što ukazuje na to da *P. fluorescens*, soj WCS417 štiti karanfil od *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* mehanizmom u koji je uključena sama biljka. Zaštitni efekat je uočen i ukoliko se soj bakterije WCS417 prethodno inaktivira toplotom, što opet ukazuje da otpornost prema patogenu potiče od same biljke. Slični rezultati postignuti su i tretiranjem vrha korena rotkve sojevima *P. fluorescens* WCS417 ili WCS374 i inokulisanjem osnove korena gljivom *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (Leeman et al., 1995a). Ovi eksperimenti su ukazali da sojevi nepatogenih bakterija u oblasti rizosfere mogu

sprečiti razvoj bolesti indukujući sistemičnu otpornost biljke.

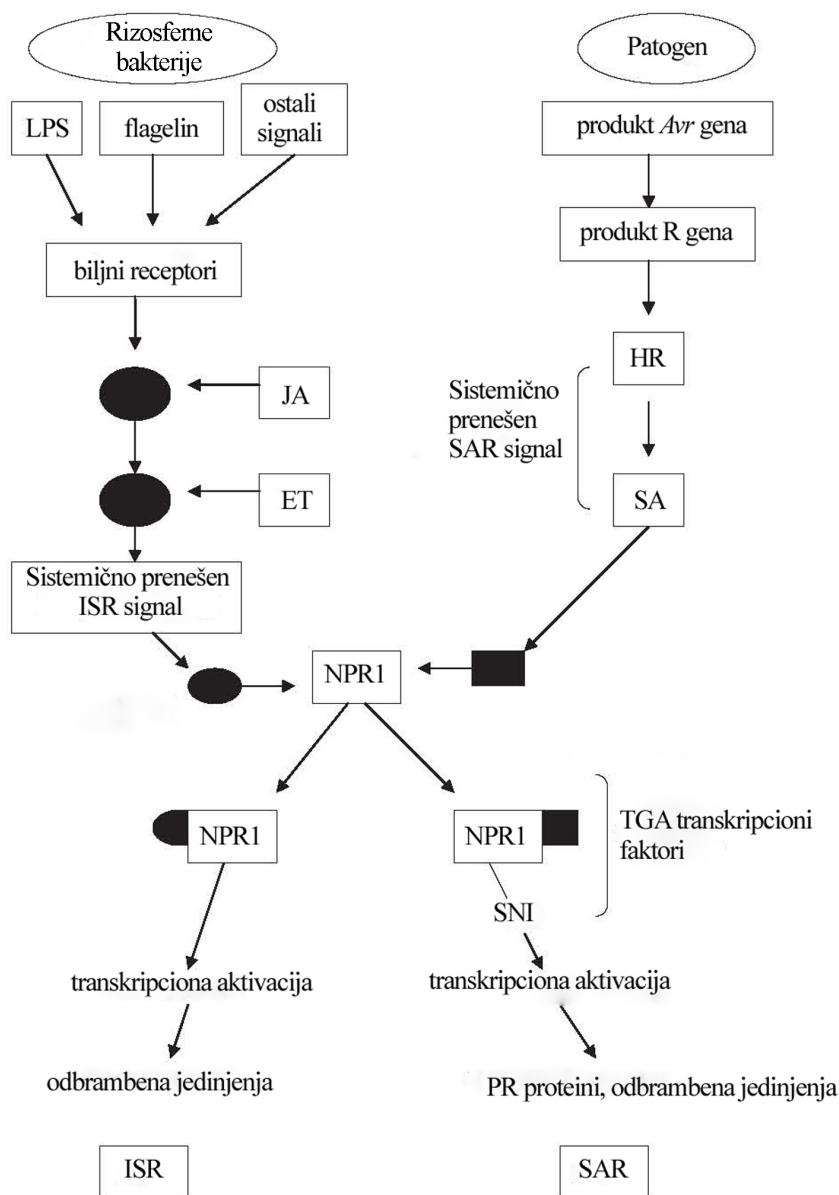
Utvrđeno je da različita strukturna i metabolička jedinjenja mogu izazvati ISR (Van Loon et al., 1998). Tako lipopolisaharidi spoljašnje membrane bakterijske ćelije (LPS), pseudobaktin-siderofore, antibiotici i flagele nekih nepatogenih *Pseudomonas* sojeva mogu indukovati ISR u pojedinim biljnim vrstama (Van Peer & Schippers, 1992; Leeman et al., 1995b; Van Wees et al., 1997; Iavicoli et al., 2003).

Za razliku od SAR koja je povezana sa akumulacijom salicilne kiseline i sinteze PR proteina, ISR je zavisna od etilena i jasmonske kiseline i ne dovodi do sinteze PR proteina (Pieterse et al., 1998). Ipak, ove dve forme otpornosti podudaraju se na molekularnom nivou, što je pokazano na primeru biljke *Arabidopsis thaliana* gde su obe otpornosti uslovljene funkcijom NPR1 gena (Šema 1) (Vallad & Goodman, 2004; Walters & Heil, 2007).

Indukovana sistemična otpornost (ISR) je fenotipski slična sistemično stečenoj otpornosti (SAR), jer se takođe ispoljava nespecifično prema taksonomski različitim patogenima (Van Loon, 1997). Na primer, nepatogeni soj *P. fluorescens* WCS417r može indukovati otpornost karanfila, rotkve, paradajza i *A. thaliana* prema patogenima. Kolonizacija korena *A. thaliana* pomenutim sojem doprinosi otpornosti prema bakterijama patogenima lista i gljivama patogenima korena (Pieterse et al., 1998). Ispoljavanje ISR zavisi od samog odnosa biljke i PGPR soja. Postoje primeri gde jedan soj bakterije može indukovati otpornost u *A. thaliana* ali ne i u rotkvi, dok s druge strane rotkva može ispoljiti ISR kao odgovor na dejstvo različitih sojeva PGPR koji kod *Arabidopsis*-a ne indukuju otpornost (Pieterse et al., 2001). Dok se SAR može ispoljiti u velikom broju dikotiledonih i monokotiledonih biljaka, ISR je ograničena na nekoliko biljnih vrsta. Zanimljivo je da ISR nije zabeležena kod monokotiledonih biljaka (Pieterse et al., 1998). Do pojave ISR dolazi samo kada populacija bakterija pređe određeni prag koncentracije, koji na primer u slučaju *P. fluorescens* sojeva WCS375 i WCS417 iznosi  $10^5$  CFU/g korena. Pri nižoj koncentraciji ne dolazi do ispoljavanja otpornosti (Raaijmakers et al., 1995). Iako ispoljavanje SAR nije uslovljeno nastankom hipersenzitivne reakcije, ono je najintenzivnije ukoliko patogen prouzrokuje nekrozu. Nasuprot SAR, PGPR sojevi ne izazivaju vidljive simptome na biljkama u čijem okruženju žive (Kloepper et al., 1980).

Šema 1. Prikaz prenosa signala uključenih u ispoljavanje ISR koju iniciraju PGPR sojevi i SAR koja je izazvana patogenim sojem u biljci *Arabidopsis thaliana*.

Figure 1. A model for the signal transduction network controlling ISR mediated by PGPR and pathogen-induced SAR in *Arabidopsis thaliana*.



LPS – lipopolisaharidi, PRs – proteini vezani za patogenezu, *Avr* – produkt *Avr* gena, *R* – produkt *R* gena, HR – hipersenzitivna reakcija, SA – salicilna kiselina, JA – jasmonska kiselina, ET – etilen, NPR1 – regulatorni protein, SNI – transkripcioni represor SAR gena, TGA – transkripcioni faktori (Walters & Heil, 2007) / LPS–liposaccharide; PRs–pathogenesis-related proteins; AVR–avirulence gene product; R–resistance gene product; HR–hypersensitive response; SA–salicylic acid; JA–jasmonic acid; ET–ethylene; NPR1–a regulatory protein involved in signalling in SAR and ISR in *A. thaliana*; SNI–transcriptional repressor of SAR genes; TGA transcription factors–family of transcription factors interacting with SA-induced NPR1 (Walters & Heil, 2007).



### Primena indukovane otpornosti u zaštiti bilja

Širok spektar dejstva prirodno izazvane SAR i ISR rezultirao je povećanjem interesovanja za razvoj agenasa koji bi imitirali dejstvo prirodnih izazivača otpornosti kao i dejstvo PGPR sojeva (Vallad & Goodman, 2004). Istraživanja pogodnih agenasa usmerena su na molekule pobuđivače koji se oslobađaju tokom interakcije biljke i patogena kao i na signalne puteve. Odavno je poznato da oligosaharidi, N-acetilhito-oligosaharidi i  $\beta$ -1,3 glukani aktiviraju odbrambene reakcije biljke (Reignault & Walters, 2007). Tako je npr. hitosan deacetilovan iz N-acetilhito-oligosaharida koji sadrži poli-D-glukozamin koji je pronađen u egzoskeletu insekata i u ćelijskom zidu gljiva (Hadwiger, 1999). Postoje brojni podaci o korisnom dejstvu ovog jedinjenja u sprečavanju infekcije patogenom (Reignault & Walters, 2007), a sada je i komercijalno dostupan za upotrebu u tretiranju različitih poljoprivrednih biljaka (Elexa, proizvođač SafeScience, Boston, SAD). Agensi koji poseduju sposobnost da imitiraju dejstvo salicilne kiseline su 2,6-dihlorizonikotinska kiselina (INA) i acibenzolar-S-metil (ASM). Oba jedinjenja aktiviraju istu grupu gena kao i neki biološki agensi ili salicilna kiselina. ASM je u SAD-u u komercijalnoj prodaji pod imenom Actigard, a u Evropi pod nazivom Bion.

Preparat Actigard primenjen je i kao jedan od tretmana u istraživanjima razvoja nove integralne strategije kontrole bakteriozne pegavosti paradajza (Jones et al., 2005; Milijašević & Obradović, 2005; Obradović et al., 2004, 2005, 2006, 2008). U cilju suzbijanja ovog oboljenja proučavana je efikasnost primene sojeva bakterija antagonista i stimulatora rasta biljaka (PGPR), bakteriofaga specifičnih prema prouzrokovaču bolesti, kao i aktivatora indukovane otpornosti biljaka, u uslovima veštačke inokulacije u staklari (Obradović et al., 2005). Efikasnost tretmana, primenjenih ponaosob ili u kombinaciji, proverena je u tri ogleđa sa ukupno 82 različita tretmana u 4 ponavljanja. Biljke paradajza sorte Florida 47 u fazi 4–6 razvijenih listova tretirane su komercijalno dostupnim aktivatorima otpornosti (SAR) biljaka: harpin protein (Messenger, Eden Bioscience Corp., 0,06%) i acibenzolar-S-metil (ASM, Actigard 50WG, Syngenta Crop Protection Inc., 0,006%). Osim navedenih aktivatora otpornosti, biljke su tretirane i suspenzijom bakterija ( $10^8$  CFU/ml) sojeva *Bacillus pumilus* B122 i *P. fluorescens*

B130 (potencijalni PGPR), *P. syringae* Cit7 i *P. putida* B56 (antagonisti), kao i suspenzijom 6 bakteriofaga (Agriphage, AgriPhi Inc., 1% v/v) specifičnih prema rasi T3 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Kao kontrola korišćene su biljke tretirane vodom ili bakar hidroksidom (Kocide 2000, Griffin Corp., 0,36%).

Sojevi bakterija stimulatora rasta (*B. pumilus* B122, *P. fluorescens* B130) i antagonisti (*P. syringae* Cit7 i *P. putida* B56) nisu ispoljili značajan efekat u zaštiti paradajza od *X. c. pv. vesicatoria*, prouzrokovača bakteriozne pegavosti u uslovima veštačke inokulacije u staklari. Ovakav rezultat ukazuje na ograničeni spektar aktivnosti i malu konkurentsku sposobnost ovih sojeva u navedenim uslovima. Primena bakteriofaga u kombinaciji sa aktivatorima otpornosti značajno je umanjila intenzitet bolesti ukazujući na mogućnost integrisane primene preparata Agriphage u suzbijanju prouzrokovača bakteriozne pegavosti. Primena harpin proteina nije aktivirala odbrambeni mehanizam paradajza prema patogenu ukazujući na zanemarljiv efekat ovog proizvoda na intenzitet oboljenja. Za razliku od ovih tretmana, ASM je efektno aktivirao otpornost tretiranih biljaka paradajza prema *X. c. pv. vesicatoria*, sprečavajući u potpunosti pojavu karakterističnih simptoma bolesti. Ovaj tretman, u kombinaciji sa bakteriofagima poslužio je kao osnova za razvoj buduće strategije integralne zaštite paradajza od prouzrokovača bakteriozne pegavosti u polju.

Pri eksperimentima u polju, sprovedenim tokom tri uzastopne godine, ASM primenjen samostalno ili u kombinaciji sa bakteriofagima značajno je smanjio intenzitet bakteriozne pegavosti paradajza u poređenju sa drugim proučavanim tretmanima (Obradović et al., 2004). Primena aktivatora sistemično stečene otpornosti (SAR) i njihova integracija sa biološkim agensima i konvencionalnim tretmanima obezbedila je nov kvalitet u zaštiti bilja (Obradović et al., 2008). Poseban kvalitet u primeni ASM je što se kod nekih biljaka može postići povećana otpornost prema više patogena.

Osim ovih, postoje saznanja i o brojnim drugim agensima koji indukuju rezistentnost, kao što su soli fosfata (Walters et al., 2005),  $\beta$ -aminobuterna kiselina (BABA) (Jakab et al., 2001) i sintetičko jedinjenje probenazol (Nakashita et al., 2002). Interesantno je da se probenazol već 20 godina koristi u Aziji za kontrolu bolesti pirinča koju prouzrokuje *Magnaporthe grisea* (Walters & Heil, 2007).

Veliki broj agenasa koji indukuju otpornost biljaka pokazalo se veoma efikasnim u kontrolisanim uslovima. U literaturi se mogu naći podaci da je efikasnost ASM u uslovima polja ista kao i efikasnost nekih standardnih fungicida (Reglinski et al., 2007). Nasuprot ovim, postoje i podaci koji govore o varijabilnoj efikasnosti ovih supstanci u polju. Većina studija je pokazala da se smanjenje intenziteta zaraze nakon tretmana ASM-om kreće od 4 do 80%, dok je u samo nekoliko istraživanja saopšteno da je smanjenje zaraze iznosilo više od 80% (Vallad & Goodman, 2004). Slična situacija je i sa korišćenjem PGPR sojeva u ispoljavanju ISR (Vallad & Goodman, 2004). Međutim, varijabilnost efikasnosti indukovane otpornosti je očekivana, s obzirom da se ispoljava kao odgovor biljke na pokušaj infekcije i da je uslovljena genotipom, fiziološkim statusom biljke i uslovima spoljne sredine.

## Zaključak

Postoje brojne prednosti upotrebe aktivatora otpornosti biljaka u zaštiti bilja u odnosu na hemijski sintetisana jedinjenja. Pre svega, aktivatori otpornosti nisu štetni po životnu sredinu i mogu se koristiti u organskoj proizvodnji. S obzirom na sistemčnu prirodu otpornosti, postiže se istovremena zaštita svih biljnih delova koja je aktivna i posle berbe i tokom skladištenja proizvoda. Omogućava se zaštita od patogena koji se ne mogu kontrolisati postojećima merama, posebno organizama rezistentnih na hemijska jedinjenja. Otpornost prema patogenima se postiže mehanizmima koje reguliše biljka, izbegavajući direktno dejstvo na patogen, čime se eliminiše potencijalno negativno dejstvo na korisne mikroorganizme. Obezbeđuje se otpornost prema širokom spektru štetnih organizama (mikroorganizama, insekata i nematoda). Tretmani se mogu izvoditi istovremeno sa ostalim merama zaštite i takođe geni koji se aktiviraju pri indukovanoj otpornosti mogu biti korisni u savlađivanju ostalih vidova stresa u polju – kao što su toplota, mraz, suša i oštećenja od UV svetla (Anderson et al., 2006).

Pored brojnih prednosti koje indukovana otpornost biljaka ima u odnosu na hemijske mere zaštite, Anderson et al. (2006) su ukazali i na moguće nedostatke. Naime, nakon primene aktivatora otpornosti potrebno je izvesno vreme da bi se postigao određeni nivo zaštite, posebno ako tretman nije primenjen na celu biljku; zatim,

uočena su variranja u nivou postignute otpornosti, posebno kada se kao tretmani koriste biološki agensi; aktivacija otpornosti prema jednom patogenu može povećati osetljivost prema drugim patogenima koji koriste drugačije mehanizme infekcije; za maksimalnu efikasnost treba pažljivo podesiti koncentraciju preparata, metod primene i vreme između tretmana; prekomerna ekspresija odbrambenih mehanizama biljke može dovesti do preopterećenja metabolizma biljke, zaostajanja u porastu i smanjene produktivnosti.

## Literatura

- Agrawal, A. A., Tuzun, S., & Bent, E. (1999). Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: *Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Agrios, N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.
- Anderson, A. J., Blee, K. A., & Kwang-Yeol, Y. (2006). Commercialization of Plant Systemic Defense Activation: Theory, Problems and Successes. In: T. Sadik & E. Bent (Eds.), *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* (386-414). Springer Science and Business Media, Inc.
- Babović, M. V. (2003). *Osnovi patologije biljaka*. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Baysal, Ö., Gürsoy, Y. Z., Örnek, H., & Duru, A. (2005). Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL- $\beta$ -amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 112, 361–369.
- Cohen, Y., & Kuć, J. J. (1981). Evaluation of systemic resistance to blue mold induced in tobacco leaves by prior stem inoculation with *Peronospora tabacina*. *Phytopathol.*, 71, 783–787.
- Delaney, T. P., Friedrich, L., & Ryals, J. A. (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 6602–6606.
- Duijff, B. J., Meijer, J. W., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1993). Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Neth. J. Plant Pathol.*, 99, 277–289.
- Duijff, B. J., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1994a). Ferric pseudobactin 358 as an iron source for carnation. *J. Plant Nutr.*, 17, 2069–2078.
- Duijff, B. J., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1994b). Suppression of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Sci. Technol.*, 4, 279–288.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261, 754–756.
- Gozzo, F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4487–4503.
- Hadwiger, L. A. (1999). Host–parasite interactions: elicitation of defence responses in plants with chitosan. In: P. Jolles & R. A. A. Muzzarelli (Eds.), *Chitin and chitinases* (185–200). Switzerland, Birkhauser Verlag.

- Hammerschmidt, R. (2007). Introduction: definitions and some history. In: D. Walters, A. Newton & G. Lyon (Eds.), *Induced resistance for plant disease control: a sustainable approach to crop protection* (1–8). Oxford, Blackwell Publishing.
- Hammerschmidt, R., & Kuć, J. (1995). Induced Resistance to Disease in Plants. *Kluwer Academic Publishers*, Boston.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., & Métraux J. P. (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 851–858.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J. P., & Mauch-Mani, B. (2001). Beta-aminobutyric acid - induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 29–37.
- Jones, J. B., Momol, M. T., Obradović, A., Balogh, B., & Olson, S. M. (2005). Bacterial spot management on tomatoes. 1<sup>st</sup> International Symposium on Tomato Diseases and 19<sup>th</sup> Annual Tomato Disease Workshop, Orlando, Florida, USA. *Acta Hort.*, 695, 119–124.
- Kessler, A., Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 299–328.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S., & Ryals, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 439–459.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885–886.
- Kloepper, J. W., Tuzun, S., & Kuć, J. A. (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2, 349–351.
- Kuć, J. (1982). Induced immunity to plant disease. *Bioscience*, 32, 854–860.
- Lawton, K. A., 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, 71–82.
- Leeman, M., Van Pelt, J. A., Den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1995a). Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.*, 101, 655–664.
- Leeman, M., Van Pelt, J. A., Den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1995b). Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathol.*, 85, 1021–1027.
- Lemanceau, P., Bakker, P. A. H. M., De Kogel, W. J., Alabouvette, C., & Schippers, B. (1992). Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2978–2982.
- Lemanceau, P., Bakker, P. A. H. M., De Kogel, W. J., Alabouvette, C., & Schippers, B. (1993). Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 74–82.
- Lynch, J. M. (1976). Products of soil microorganisms in relation to plant growth. *Crit. Rev. Microbiol.*, 5, 67–107.
- Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1991). Substrate flow in the rhizosphere. In: DL Keister and PB Cregan (eds.), *The Rhizosphere and Plant Growth* (15–24). Dordrecht, Kluwer.
- Milijašević, S., & Obradović, A. (2005). Control of bacterial speck and bacterial spot of tomato using alternative strategies under greenhouse conditions. Book of abstracts, 1<sup>st</sup> International Symposium on Biological Control of Bacterial Diseases, Darmstadt, Germany. *Reports from the Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry*, 128, 70–71.
- Nakashita, H., Yoshioka, K., Yasuda, M., Nitta, T., Arai, Y., Yoshida, S., & Yamaguchi, I. (2002). Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 61, 197–203.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., & Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-Kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 108, 17–27.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B., & Olson, S. M. (2004). Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Dis.* 88, 736–740.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Jackson, L. E., Balogh, B., Guven, K., & Iriarte, F. B. (2005). Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Dis.*, 89, 712–716.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Balogh, B., & Jackson, L. E. (2006). Integrated management of tomato bacterial spot in Florida. Proceedings 1<sup>st</sup> International Symposium on Biological Control of Bacterial Diseases, Darmstadt, Germany. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft.*, 408, 149–153.
- Obradović, A., Jones, J. B., Balogh, B., & Momol, M. T. (2008). Integrated management of tomato bacterial spot. In: A. Ciancio, & K. G. Mukerji (Eds.), *Integrated Management of Plant Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria* (211–223). Springer Science and Business Media B. V.
- Percival, G. C. (2001). Induction of systemic acquired disease resistance in plants: potential implications for disease management in urban forestry. *J. Arboric.*, 27, 181–192.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., & Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1571–1580.
- Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Van Wees, S. C. M., Ton, J., Leon-Kloosterziel, K., Keurentjes, J. J. B., Verhagen, B. W. M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P. A. H. M., & Van Loon, L. C. (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107: 51–61.
- Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2007). Signalling cascades involved in induced resistance. In: D. Walters, A. Newton & G. Lyon (Eds.), *Induced resistance for plant disease control: a sustainable approach to crop protection* (65–88). Oxford, Blackwell Publishing.
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., Van Oorschot, M. M. P., Van der Sluis, I., Schippers, B., & Bakker, P. A. H. M.



- (1995). Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.*, *85*, 1075-1081.
- Reglinski, T., Dann, E., & Deverall, B. (2007). Integration of induced resistance in crop production. In: D. Walters, A. Newton & G. Lyon (Eds.), *Induced resistance for plant disease control: a sustainable approach to crop protection* (201-228). Oxford, Blackwell Publishing.
- Reignault, P., & Walters, D. (2007). Topical induction of inducers for disease control. In: D. Walters, A. Newton & G. Lyon (Eds.), *Induced resistance for plant disease control: a sustainable approach to crop protection* (179-200). Oxford, Blackwell Publishing.
- Ross, A. F. (1961). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*, *14*, 329-339.
- Schippers, B. (1998). Biological control of pathogens with rhizobacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lon. (B)* *318*, 283-93.
- Schippers, B., Bakker, A. W., & Bakker, P. A. H. M. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *25*, 339-358.
- Silvar, C., Merino, F., & Diaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.*, *165*, 1120-1124.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., & Mettraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. (*Annu. Rev. Phytopathol.*, *35*, 235-270.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., & Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *4*, 645-656.
- Vallad, G. E., & Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.*, *44*, 1920-1934.
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of the pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.*, *103*, 753-765.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. (*Annu. Rev. Phytopathol.*, *36*, 453-483.
- Van Peer, R., Niemann, G. J., & Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathol.*, *91*, 728-734.
- Van Peer, R., & Schippers, B. (1992). Lipopolysaccharides of plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to fusarium wilt. *Neth. J. Plant Pathol.*, *98*, 129-139.
- Van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y. A. M., Hartog, F., & Van Loon, L. C. (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *10*, 716-724.
- Walters, D., & Heil, M. (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *71*, 3-17.
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., & Lyon, G. (2005). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathol.*, *95*, 1368-1373.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., M'ettraux, J. P., & Ryals, J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, *3*, 1085-1094.
- Wei, G., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol.*, *81*, 1508-1512.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *26*, 379-407.

## Induced Plant Resistance

Katarina Gašić • Aleksa Obradović

**Summary:** Plants have evolved different strategies to protect themselves against pathogen infections. These strategies are classified as either passive or active, depending on whether they are constitutive barriers or triggered upon pathogen attack. Induced plant resistance is a type of active resistance and is defined as a state of enhanced defensive capacity developed by a plant when appropriately stimulated by biological agents or environmental stress. Different types of induced resistance have been defined based on differences in signalling pathways and spectra of effectiveness. First type is Systemic Acquired Resistance (SAR) which occurs in plants following activation of defence mechanisms triggered by contact with a plant pathogenic or feeding agent. SAR requires accumulation of signal molecule salicylic acid and is associated with the induction of pathogenesis-related (PR) proteins. In contrast, second type - Induced Systemic Resistance (ISR) is induced by selected strains of non-pathogenic plant growth promoting bacteria (PGPR) and regulated by jasmonic acid and ethylene. Both SAR and ISR require the function of the regulatory protein NPR1. In addition to biological agents, some chemical compounds can induce resistance of plants as well. Great progress has been made in recent years in understanding the physiological and biochemical basis of SAR and ISR, which led to their commercial use in plant protection.

**Keywords:** elicitors, induced systemic resistance, ISR, pathogens, plant resistance, SAR, systemic acquired resistance