



**Modyfikacje induktorów odporności
roślin w celu zwiększenia ich
efektywności biologicznej**

Piotr Lewandowski

Praca wykonana w Pracowni Chemii i Technologii Polimerów Nieorganicznych

Wydziału Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza

pod kierunkiem prof. dra hab. inż. Hieronima Maciejewskiego
oraz dra hab. inż. Marcina Śmiłaka

celem uzyskania stopnia naukowego doktora chemii.

Poznań 2019

Podziękowania

W trakcie wykonywania badań realizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej współpracowałem w wieloma ludźmi i instytucjami, którym chciałbym z całego serca podziękować.

Dziękuję mojemu promotorowi, prof. drowi hab. inż. Hieronimowi Maciejewskiemu za kierowanie tokiem moich badań, zapewnienie miejsca w Pracowni Chemii i Technologii Polimerów Nieorganicznych oraz możliwość prowadzenia badań poza główną tematyką badawczą.

Dziękuję mojemu promotorowi pomocniczemu, drowi hab. inż. Marcinowi Śmigłakowi za pokazanie mi tematyki indukcji odporności u roślin, której poświęcona jest ta praca, zapewnienie wszystkich niezbędnych materiałów do badań oraz koordynowanie moich prac badawczych. Poza tym dziękuję za niesamowitą atmosferę w zespole, otwartość na nowe pomysły i przekazanie mi wielu umiejętności, dzięki którym mogłem sięgnąć po swoje pierwsze granty badawcze.

Dziękuję Patrycji Czerwoniec za przekazanie mi wiedzy i umiejętności związanych z pracą z roślinami w warunkach szklarniowych, wspólne planowanie badań, pomoc w pracy laboratoryjnej i edukowanie mnie z zakresu indukcji odporności u roślin od strony jego mechanizmu.

Dziękuję Rafałowi Kukawce, Oldze Stolarskiej, Annie Pawłowskiej, Jakubowi Hoppe, Andrei Szpecht, dr Joannie Szymkowiak i drowi Adrianowi Zającowi za wspaniałą atmosferę w laboratorium i cenne rady przy omawianiu wyników badań.

Dziękuję mojej koleżance, dr Małgorzacie Petryk, za wielokrotne konsultacje w sprawach mniej lub bardziej błahych z zakresu chemii organicznej.

Dziękuję mojej żonie, Katarzynie, za wiarę w moją osobę i wspieranie mnie na każdym kroku, co umożliwiło mi rozwój kariery naukowej.

Dziękuję moim rodzicom, Krystynie i Andrzejowi Lewandowskim, za umożliwienie mi podjęcia studiów chemicznych i bezwarunkowe wspieranie mnie w ich trakcie.

Podziękowania

Prace wykonywane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonywane były we współpracy z wieloma wspaniałymi naukowcami oraz instytucjami, którym również chciałbym podziękować.

Dziękuję serdecznie prof. drowi hab. Henrykowi Pospiesznemu, kierownikowi Zakładu Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu, za naukę prowadzenia badań na roślinach, przekazanie swojej wiedzy z zakresu fitopatologii oraz udostępnienie komory szklarniowej w Instytucie Ochrony Roślin.

Dziękuję prof. dr hab. Aleksandrze Obrępańskiej-Stęplowskiej za wykonanie badań z zakresu biologii molekularnej oraz drowi Krzysztofowi Krawczykowi za wspólne wykonywanie badań antybakteryjności wybranych pochodnych induktorów odporności u roślin.

Dziękuję prof. Stefanowi Stolte za umożliwienie odbycia stażu w swojej grupie badawczej (Center for Environmental Research and Sustainable Technology, Bremen University) i nauczanie mnie metod badawczych związanych z badaniami ekotoksykologicznymi induktorów odporności u roślin. Dziękuję akcji COST (European Cooperation in Science & Technology), która sfinansowała wyżej wymieniony staż w ramach programu STSM (Short Time Scientific Missions).

Dziękuję drowi Diego F. Quito-Avili z Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE Guayaquil, Ekwador) za otwartość na współpracę, możliwość aplikowania o projekt Etiuda oraz zapewnienie mi wszystkich materiałów potrzebnych do badań nad skutecznością induktorów odporności na roślinach strefy tropikalnej.

Dziękuję Narodowemu Centrum Nauki za finansowanie moich badań w ramach projektów Preludium oraz Etiuda, które umożliwiły mi znaczne poszerzenie ich zakresu, w tym odbycie stażu zagranicznego w Ekwadorze.

Dziękuję Fundacji Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu za włączenie mnie w poczet swoich stypendystów na rok akademicki 2018/2019.

Spis treści

1. Wstęp	15
1.1. Współczesne rolnictwo	15
1.1.1. Wyzwania prawne we współczesnym rolnictwie	15
1.1.2. Skutki zmian legislacyjnych dla rolnictwa.....	19
1.1.3. Indukcja odporności u roślin jako alternatywa	22
1.2. Choroby wirusowe roślin	23
1.3. Odporność roślin – rodzaje i mechanizmy	32
1.4. Endogenne induktory odporności u roślin i mechanizmy ich działania	36
1.4.1. Kwas salicylowy (SA) i salicylan metylu (MeSA)	36
1.4.2. Kwas jasmonowy (JA), jasmonian metylu (MeJA) i etylen (ET)	39
1.5. Wybrane chemiczne induktory egzogenne.....	42
1.5.1. BTH	42
1.5.2. Kwas β -aminomasłowy (BABA).	45
1.5.3. Sacharyna	46
1.5.4. Kwas 2,6-dichloroizonikotynowy (INA)	48
1.6. Modyfikacje chemiczne znanych induktorów odporności u roślin	49
1.6.1. Pochodne kwasu salicylowego	49
1.6.2. Pochodne kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego.....	54
1.6.3. Pochodne BTH	55
1.6.4. Jonowe induktory odporności roślin na bazie BTH	58
1.7. Wpływ podstawników halogenowych na aktywność związków aromatycznych	60
1.8. Cel rozprawy doktorskiej.....	62
2. Metodologia.....	63
2.1. Związki badane.....	63
2.1.1. Część syntetyczna	72
2.1.1.1. Synteza chlorku kwasowego kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego.....	72
2.1.1.2. Synteza amidów kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego (71-74).....	73
2.1.2. Dane NMR otrzymanych związków.	73
2.1.2.1. Amid <i>N,N</i> -Dibutylo-2,6-dichloroizonikotynowy (71)	73
2.1.2.2. Amid <i>N</i> -butylo- <i>N</i> -metylo-2,6-dichloroizonikotynowy (72).....	74
2.1.2.3. Amid <i>N</i> -benzylo- <i>N</i> -metylo-2,6-dichloroizonikotynowy (73).....	74
2.1.2.4. Amid <i>N,N</i> -di(2-hydroksyetylo)-2,6-dichloroizonikotynowy (74)	74
2.2. Badanie Indukcji SAR.....	75

2.2.1. Badania w układzie modelowym – tytoń inokulowany wirusem mozaiki tytoniowej	75
2.2.2. Badania bezpośredniego wpływu badanych związków na patogen wirusowy	77
2.2.3. Testy indukcji odporności u roślin ze strefy tropikalnej	77
2.2.4. Papaja porażona wirusem pierścieniowej plamistości papai (PRSV)	81
2.2.5. Kukurydza porażona chorobą wirusową MLND (Maize Lethal Necrosis Disease) .	82
2.2.5.1. Badania szklarniowe	82
2.2.5.2. Badania polowe	83
2.2.6. Babako porażone kompleksem wirusowym potexvirus i PRSV	84
2.3. Badanie działania antybakteryjnego	85
2.4. Badania ekotoksykologiczne	86
2.4.1. Badanie właściwości cytostatycznych na komórkach IPC-81	87
2.4.2. Badanie toksyczności w środowisku wodnym na <i>Daphnia magna</i>	88
2.4.3. Badanie podatności na biodegradację	88
3. Wyniki badań biologicznych pochodnych induktorów odporności u roślin i ich omówienie	90
3.1. Jonowe pochodne 7-tiokarboksybenzo[1.2.3]tiadiazolanu metylu	90
3.1.1. Wyniki badań indukcji SAR	90
3.1.2. Bezpośrednie działanie związków badanych na materiał wirusowy	93
3.1.3. Testy ekspresji genów połączonych z indukcją odporności u roślin	93
3.1.4. Badania antybakteryjne	96
3.1.5. Badania ekotoksykologiczne	102
3.2. Neutralne pochodne induktorów oporności u roślin o zmodyfikowanej strukturze	105
3.2.1. Wyniki testów indukcji oporności SAR	105
3.2.2. Bezpośrednie działanie związków badanych na materiał wirusowy	108
3.2.3. Korelacje wyników biologicznych ze strukturą chemiczną	109
3.2.3.1. Wpływ obecności chloru oraz położenia azotu w pierścieniu aromatycznym – pochodne izonikotynowe, nikotynowe i pikolinowe	109
3.2.3.2. Wpływ położenia azotu w pierścieniu aromatycznym oraz aromatyczności związków	111
3.2.3.3. Zmiana podstawnika chlorowego na grupę hydroksylową – pochodne nikotynowe i izonikotynowe	112
3.2.3.4. Obecność azotu bądź grupy karboksylowej w pierścieniu aromatycznym – pochodne nikotynowe i izonikotynowe	113
3.2.3.5. Amidowe pochodne kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego	114

3.2.3.6. Zmiana grupy hydroksylowej w kwasie salicylowym.....	116
3.2.3.7. Zmiana położenia grupy hydroksylowej oraz dodanie drugiej grupy hydroksylowej.....	119
3.2.3.8. Badania pochodnych kwasu benzoowego zawierających dwa podstawniki	120
3.2.3.9. Dodanie chloru do pierścienia aromatycznego kwasu salicylowego.....	122
3.2.3.10. Wpływ rodzaju halogenku wprowadzonego do kwasu salicylowego.....	123
3.2.3.11. Inne pochodne kwasu salicylowego, z podstawnikiem nitrowym, aminowym i sulfonowym	125
3.2.3.12. Badanie hybryd strukturalnych badanych induktorów odporności u roślin	127
3.2.3.13. Badanie pochodnych kwasu DL-2-aminomasłowego (BABA)	129
3.2.3.14. Badanie pochodnych sacharyny	131
3.3. Wyniki badań biologicznych na roślinach strefy tropikalnej.....	132
3.3.1. Badania wstępne na roślinach kukurydzy, papai i babako	132
3.3.2. Objawy choroby wirusowej widoczne na testowanych roślinach.....	134
3.3.3. Fitotoksyczność spowodowana zastosowaniem induktorów odporności u roślin	136
3.3.4. Dalsze badania induktorów SAR na roślinach kukurydzy	139
4. Podsumowanie.....	141
5. Streszczenie.....	146
6. Summary in English	148
7. Suplement 1 – Fotografie roślin ukazujące poziom indukcji SAR.....	150
8. Suplement 2 – przykłady fitotoksyczności halogenowanych pochodnych kwasu salicylowego w dawce 500 mg/l, po których zdecydowano o obniżeniu stężenia.....	161
9. Referencje.....	162

Spis rysunków:

Rys. 1 Udział poszczególnych środków ochrony roślin w Unii Europejskiej ¹	16
Rys. 2 Prognoza rynku ochrony roślin w Polsce po wycofaniu fungicydów wg. Rozporządzenia UE 2015/408 z dnia 11 marca 2015 r. ⁵	18
Rys. 3 Skutki ekonomiczne wprowadzanych zmian w ŚOR w uprawach ziemniaków według analizy Kleffmann Group ⁷	20
Rys. 4 Skutki ekonomiczne wprowadzanych zmian w ŚOR w uprawach pszenicy według analizy Kleffmann Group ⁷	20
Rys. 5 Rodzaje odporności u roślin.....	32
Rys. 6 Struktura kwasu salicylowego i salicylanu metylu.....	36
Rys. 7 Schemat oddziaływania kwasu salicylowego z białkiem NPR-1 ³⁴	37
Rys. 8 Struktura kwasu jasmonowego (JA), jasmonianu metylu (MeJA) i etylenu (ET) ³⁹	
Rys. 9 Struktura 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolo-S-metyl estru (BTH, ASM).....	42
Rys. 10 Struktura kwasu β-aminomasłowy (BABA).....	45
Rys. 11 Struktura sacharyny i jej pochodnej.....	46
Rys. 12 Struktura kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego (INA).....	48
Rys. 13 Zestryfikowane pochodne kwasu salicylowego ⁷⁸	53
Rys. 14 Struktura pochodnych kwasu salicylowego – NCI oraz NPSI.....	54
Rys. 15 Znane pochodne kwasu benzotiadiazolowego.....	55
Rys. 16 Efektywność indukcji SAR [%] nowych estrów na bazie BTH. ⁸⁷	57
Rys. 17 Sole kationowej i anionowej pochodnej BTH.....	59
Rys. 18 Struktury badanych pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego.....	66
Rys. 19 Struktury badanych pochodnych kwasu 3-aminomasłowego (BABA) oraz sacharyny.....	66
Rys. 20 Struktury badanych pochodnych kwasu salicylowego (28 - 55).....	67
Rys. 21 Struktury badanych pochodnych kwasu salicylowego (56 - 69) oraz jasmonianu metylu (70).....	68
Rys. 22 Amidy oparte na bazie kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego (71-74).....	69
Rys. 23 Neutralne pochodne BTH oraz zwitterjon.....	71
Rys. 24 Anionowe pochodne BTH (78-88).....	71
Rys. 25 Sole na bazie alkilowanych pochodnych BTH (89 - 101).....	72
Rys. 26 Ekspresja genu PR-1, wywołana aktywnością wybranych pochodnych BTH....	94
Rys. 27 Ekspresja genu PAL, wywołana aktywnością wybranych pochodnych BTH.....	95
Rys. 28 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu izonikotynowego, nikotynowego i pikolinowego podstawionych chlorem.....	109
Rys. 29 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu izonikotynowego – wpływ aromatyczności i położenia azotu w pierścieniu.....	111

Rys. 30 Wpływ zmiany podstawnika chlorowego na hydroksylowy w pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego.....	112
Rys. 31 Wpływ obecności azotu oraz grupy karboksylowej w pierścieniu aromatycznym na aktywność pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego	113
Rys. 32 Aktywność biologiczna amidów opartych na kwasie 2,6-dichloroizonikotynowym.....	114
Rys. 33 Wpływ zmiany grupy hydroksylowej w kwasie salicylowym	116
Rys. 34 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu salicylowego ze zmienionym położeniem grupy hydroksylowej lub dodaną drugą grupą hydroksylową.....	119
Rys. 35 Wyniki aktywności biologicznej pochodnych kwasu benzoowego z dwoma podstawnikami.....	120
Rys. 36 Aktywność biologiczna z pochodnymi kwasu salicylowego, z podstawnikiem chlorowym	122
Rys. 37 Wyniki aktywności biologicznej badanych halogenowanych pochodnych kwasu salicylowego	123
Rys. 38 Wyniki aktywności biologicznej pochodnych kwasu salicylowego, z podstawnikiem nitrowym, aminowym i sulfonowym	125
Rys. 39 Aktywność biologiczna hybryd kwasu salicylowego i nikotynowego.....	127
Rys. 40 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu 3-aminomasłowego (BABA)	129
Rys. 41 Aktywność biologiczna pochodnych sacharyny	131

Spis tabel:

Tab. 1 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu salicylowego ⁷⁷	50
Tab. 2 Wyniki indukcji SAR dla jonowych pochodnych BTH	90
Tab. 3 Wyniki badań ekspresji genu PR-1, wywołanej przez wybrane pochodne BTH..	94
Tab. 4 Ekspresja genu PAL, wywołana aktywnością wybranych pochodnych BTH.....	94
Tab. 5 Wartości MIC I MBC {mg/L} dla testowanych soli opartych na kationowej pochodnej BTH.....	97
Tab. 6 Wartości MIC I MBC {mg/L} dla testowanych soli opartych na anionowej pochodnej BTH.....	99
Tab. 7 Badania ekotoksykologiczne wybranych pochodnych BTH	102
Tab. 8 Aktywność biologiczna neutralnych pochodnych kwasu salicylowego, 2,6-dichloroizonikotynowego, 3-aminomasłowego i sacharyny jako induktorów odporności u roślin.....	106

Spis fotografii:

Fot. 1 Struktura wirusa TMV ¹¹	23
Fot. 2 Skutki infekcji wirusa CMV na pomidorze.....	25
Fot. 3 Skutki infekcji wirusa brązowej plamistości (TSWV) na pomidorze	26
Fot. 4 Zniekształcenie liści pomidora spowodowane przez wirus PVY.....	27
Fot. 5 Żółknięcie liści spowodowane chorobą MLND.....	28
Fot. 6 Prawidłowo wykształcona kolba kukurydzy (po lewej) w stosunku do kolb zniekształconych przez chorobę MLND	29
Fot. 7 Objawy infekcji papai przez wirus PRSV (plantacja firmy Green Garden, Ekwador)	30
Fot. 8 Komora szklarniowa w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu	75
Fot. 9 Tunel foliowy w CIBE (Guayaquil, Ekwador)	78
Fot. 10 Klimatyzowana komora znajdująca się w tunelu foliowym	79
Fot. 11 Przygotowanie do badań polowych na kukurydzy	83
Fot. 12 Widok na poletka testowe do badania indukcji SAR na kukurydzy przeciwko chorobie MLND.....	84
Fot. 13 Skutki choroby MLND na młodych roślinach kukurydzy w warunkach szklarniowych.....	134
Fot. 14 Widoczne przebarwienia młodych liści papai w wyniku infekcji wirusem PRSV... ..	135
Fot. 15 Zniekształcenia liści wierzchołkowych roślin babako, będące następstwem choroby wirusowej (po prawej) w porównaniu do liści roślin zdrowych (ten sam etap wzrostu)	136
Fot. 16 Widoczne lekkie żółknięcie liści oraz stymulacja wzrostu po zastosowaniu induktora odporności na roślinach kukurydzy (3 rośliny po prawej) w porównaniu do kontroli (3 rośliny po lewej).....	137
Fot. 17 Żółknięcie liści i inhibicja wzrostu roślin papai potraktowanych induktorami odporności (rzędy od frontu) w porównaniu do kontroli (rzędy tylne).....	138
Fot. 18 Skutek podania induktora odporności na rośliny babako	138

Użyte skróty:

AABA	kwasy α -aminomasłowe,
AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności (ang. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>),
ASM	tioester kwasu 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowego (ang. <i>acibenzolar S-methyl</i>),
BABA	kwasy β -aminomasłowe,
BABA-IR	odporność zależną od kwasu β -aminomasłowego (ang. <i>beta-aminobutyric acid induced resistance</i>),
BAC	chlerek benzalkoniowy [N1110BENZ][Cl],
BTH	tioester kwasu 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowego, benzotiadiazol,
BTHCOOH	kwasy 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowe,
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (Guayaquil, Ekwador),
CMV	wirus mozaiki ogórka (ang. <i>cucumber mosaic virus</i>),
COR	koronatywa,
EPS	egzopolisacharydy,
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral (Guayaquil, Ekwador),
ET	etylen,
ETI	efektoro-zależna odporność (ang. <i>effector-triggered immunity</i>),
GABA	kwasy γ -aminomasłowe,
GMO	organizm genetycznie modyfikowany (ang. <i>genetically modified organism</i>),
HR	reakcja nadwrażliwości (ang. <i>hypersensitive response</i>),
ICS	enzym syntazy izochoryzmianowej (ang. <i>isochorismate synthase</i>),
INA	kwasy 2,6-dichloroizonikotynowe,
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (Ekwador),
IOR-PIB	Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu,
ISR	indukowana odporność systemiczna (ang. <i>induced systemic resistance</i>),
JA	kwasy jasmonowe,
JA-Ile	koniugat kwasu jasmonowego i izoleucyny,
LOX-9	lipooksygenaza,
LPS	lipopolisacharydy,
MAMPs	wzorce molekularne związane z mikroorganizmami (ang. <i>microbe-associated molecular pattern</i>),
MBC	minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. <i>minimum bactericidal concentration</i>),
MCMoV	wirus chlorotycznej pstrości kukurydzy (ang. <i>maize chlorotic mottle virus</i>),
MDMV	wirus karłowej mozaiki kukurydzy (ang. <i>maize dwarf mosaic virus</i>),
MeJA	ester metylowy kwasu jasmonowego,
MeSA	ester metylowy kwasu salicylowego,
MIC	minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimum inhibitory concentration</i>),
MLND	ang. <i>maize lethal necrosis disease</i> ,
NCI	N-cyjanometylo-2-chloroizonikotynamid,
NPR-1	białko nieekspresjonujące PR-1 (ang. <i>non-expressor of PR-1</i>),
NPSI	N-fenylosulfono-2-chloroizonikotynamid,
PAL	amoniakoliza L-fenylalaninowa (ang. <i>phenylalanine ammonia lyase</i>),

<i>PAMPs</i>	wzorce molekularne związane z patogenami (ang. <i>pathogen associated molecular patterns</i>),
<i>PCD</i>	programowana śmierć komórki (ang. <i>programmed cell death</i>),
<i>PR</i>	białka "R" (ang. <i>proteins „R”</i>),
<i>PR-1</i>	białko zależne od patogenezы (ang. <i>pathogenesis related proteins</i>),
<i>PRRs</i>	receptory rozpoznające wzorce/patogeny (ang. <i>pattern/pathogen recognition receptors</i>),
<i>PRSV</i>	wirus pierścieniowej plamistości papai (ang. <i>papaya ringspot virus</i>),
<i>PTI</i>	patogeno-zależna odporność (ang. <i>pathogen/pattern-triggered immunity</i>),
<i>PVY</i>	wirus Y ziemniaka (ang. <i>potato virus Y</i>),
<i>RNA</i>	kwasy rybonukleinowe (ang. <i>ribonucleic acid</i>),
<i>SA</i>	kwasy salicylowe,
<i>SABP2</i>	białko wiążące kwas salicylowy (ang. <i>SA-binding protein 2</i>),
<i>SAR</i>	nabyta odporność systemiczna (ang. <i>systemic acquired resistance</i>),
<i>SCMV</i>	wirus mozaiki trzciny cukrowej (ang. <i>sugarcane mosaic virus</i>),
<i>ŚOR</i>	środki ochrony roślin,
<i>TMV</i>	wirus mozaiki tytoniu (ang. <i>tobacco mosaic virus</i>),
<i>TSWV</i>	wirus brązowej plamistości liści pomidora (ang. <i>tomato spotted wilt virus</i>),
<i>WSMV</i>	wirus smugowatej mozaiki pszenicy (ang. <i>wheat streak mosaic virus</i>).

1. Wstęp

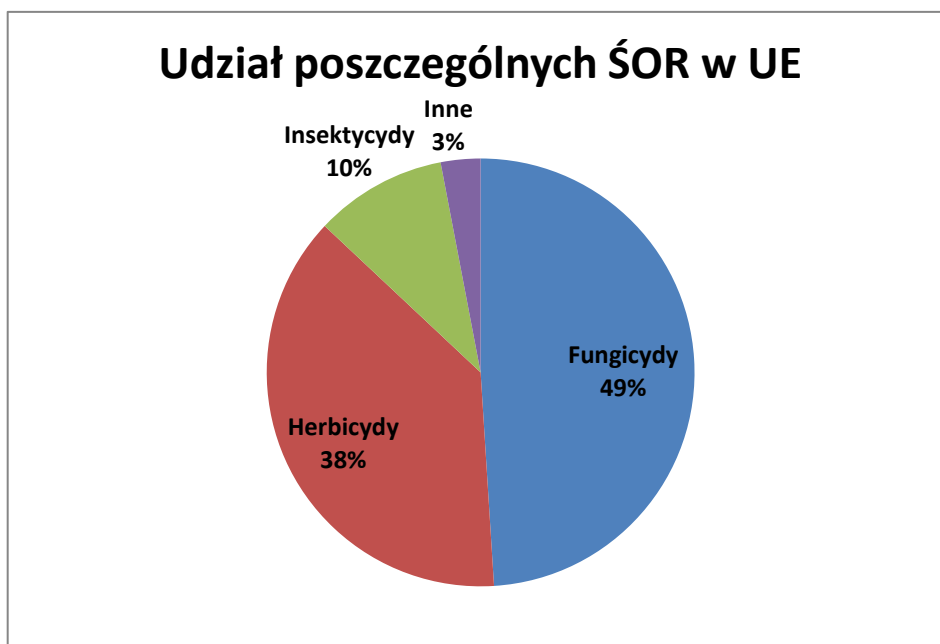
1.1. Współczesne rolnictwo

1.1.1. Wyzwania prawne we współczesnym rolnictwie

Stale rosnące zapotrzebowanie na żywność jest ważnym czynnikiem wymuszającym zwiększenie efektywności metod agrotechnicznych. Jednak nowoczesne i zintensyfikowane uprawy wielkopowierzchniowe często prowadzą do problemów związanych z ekspozycją roślin na czynniki drastycznie obniżające plony. Czynnikiem takimi są na przykład: patogeny, owady lub inne szkodniki oraz stres abiotyczny, m. in. susza czy ograniczony dostęp do składników odżywczych. Dlatego wyzwania, stojące przed nowoczesnym rolnictwem, wymagają nowych i bardziej wyrafinowanych metod ochrony roślin. Obecnie są zwykle ograniczone do poprawy wytrzymałości roślin poprzez ich nawożenie lub zapobieganie infekcji poprzez kontrolę zainfekowanych roślin lub zastosowanie związków działających bezpośrednio na patogeny, szkodniki lub niepożądane rośliny (chwasty).

Jak donosi Eurostat,¹ obecne stosowanie środków ochrony roślin (ŚOR) wynosi ~ 200 000-220 000 ton rocznie w samej Unii Europejskiej (UE). Ilość ta daje średnio w całej UE dawkę ŚOR na poziomie ~ 2,1-2,5 kg substancji czynnych na hektar z czego największy udział mają fungicydy (Rys. 1). Nie uwzględnia się tutaj środków chemicznych, stosowanych w uprawie winogron, w której średnio używa się 25-30 kg siarki nieorganicznej na hektar rocznie.

W wyniku rosnącej świadomości na temat ochrony upraw i zagrożeń, jakie niesie ona dla zdrowia ludzkiego i ekosystemu poszukuje się lepszych, a zarazem bezpieczniejszych dla środowiska i konsumentów metod ochrony roślin.



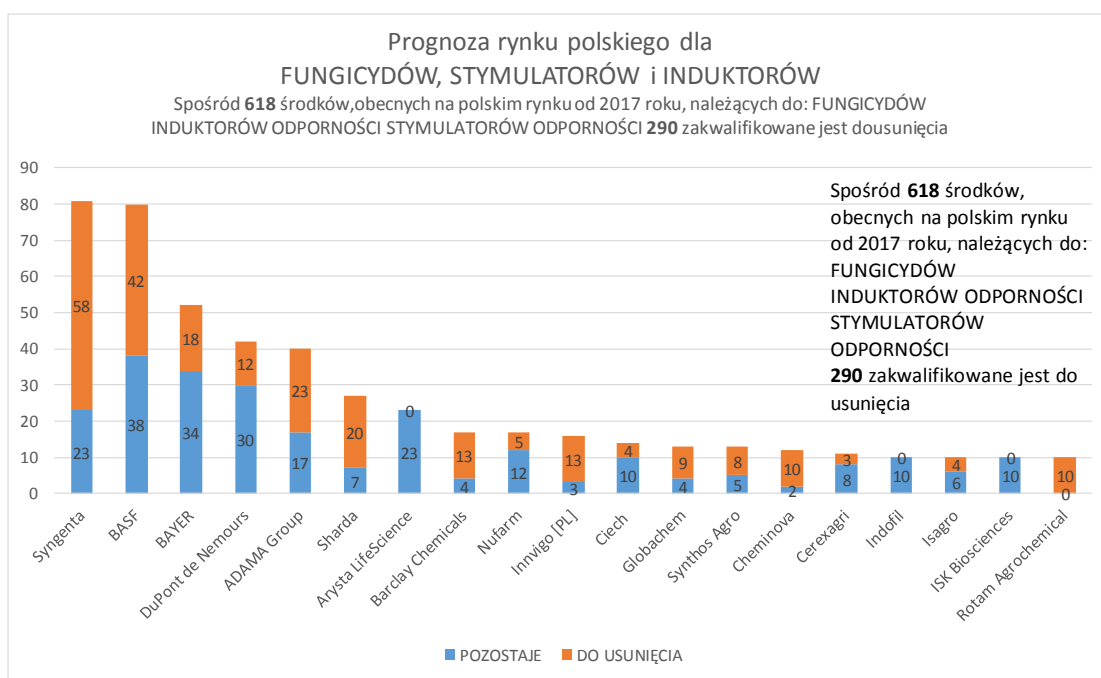
Rys. 1 Udział poszczególnych środków ochrony roślin w Unii Europejskiej¹

Z przyczyn, które wskazano powyżej, Unia Europejska jest ukierunkowana na jak najszybsze ograniczanie stosowania pestycydów. Krokiem do realizacji tego celu było uchwalenie Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009r.,² określającej założenia zrównoważonego stosowania pestycydów. Znaczna część obowiązków, nakładanych na Polskę postanowieniami dyrektywy 2009/128/WE, jest realizowana poprzez działania wynikające z prawnych rozwiązań legislacyjnych, określonych początkowo w ustawie z 1995r. o ochronie roślin uprawnych,³ a następnie w ustawie z dnia 18 grudnia 2003r. o ochronie roślin.⁴

Wspomniana dyrektywa UE ma za zadanie zachęcić do stosowania alternatywnych technik rolniczych w ochronie roślin przed zastosowaniem konwencjonalnych pestycydów. Podjęte kroki powinny doprowadzić do redukcji czynnika chorobotwórczego w taki sposób, aby użycie środków chemicznych i ich wpływ na środowisko były jak najniższe. Akt prawny definiuje, czym są preferowane jako zrównoważone „metody niechemiczne”. Są to m. in. (i) płodozmian, (ii) stosowanie właściwych technik uprawy, (iii) stosowanie odmian roślin odpornych/tolerancyjnych oraz materiału siewnego wolnego od patogenów, (iv) stosowanie środków higieny w stosunku do sprzętu w celu zapobiegania rozprzestrzeniania się czynników chorobotwórczych, (v) ochrona i stwarzanie warunków do występowania gatunków pożytecznych, regulujących populację/ilość patogenów oraz (vi) fizyczne, biologiczne lub mechaniczne metody zwalczania organizmów szkodliwych. Ponadto, wspomniany dokument nakłada zakaz dokonywania oprysków z powietrza, z powodu dużego rozproszenia cieczy roboczej i jej znoszenia spoza terenu oprysku. Co więcej, użyte pestycydy powinny być zastosowane w najniższej możliwej dawce, zredukowanej ilości powtórzeń oraz z zastosowaniem dawek dzielonych, jak również z możliwie największą rotacją składników aktywnych, aby nie doprowadzić do uodpornienia patogenów na stosowaną metodę zapobiegawczą.

W rezultacie dyrektywy opisanej powyżej, parlament UE stworzył Rozporządzenie UE 2015/408 z dnia 11 marca 2015 r.⁵ Wymienione są w nim konkretne substancje/preparaty, które powinny zostać usunięte z rynku i powody ich zakwalifikowania do usunięcia. Na tej liście znajdują się

m. in. dwa najbardziej rozpowszechnione fungicydy, bez których ochrona roślin będzie bardzo utrudniona – tebukonazol i propikonazol – będące głównymi substancjami aktywnymi w ponad 50 preparatach dostępnych na polskim rynku, np. Wirtuoz 250 EC (DuPont), Soligor 425 EC (Bayer Crop Science), Tern Premium 575 EC (Syngenta) lub Sarfun Pro 187.5 S.C. (Organika Sarzyna). Usunięcie preparatów zawierających wszystkie z wycofywanych substancji aktywnych będzie bardzo dotkliwe dla producentów środków ochrony roślin (Rys. 2).



Rys. 2 Prognoza rynku ochrony roślin w Polsce po wycofaniu fungicydów wg.

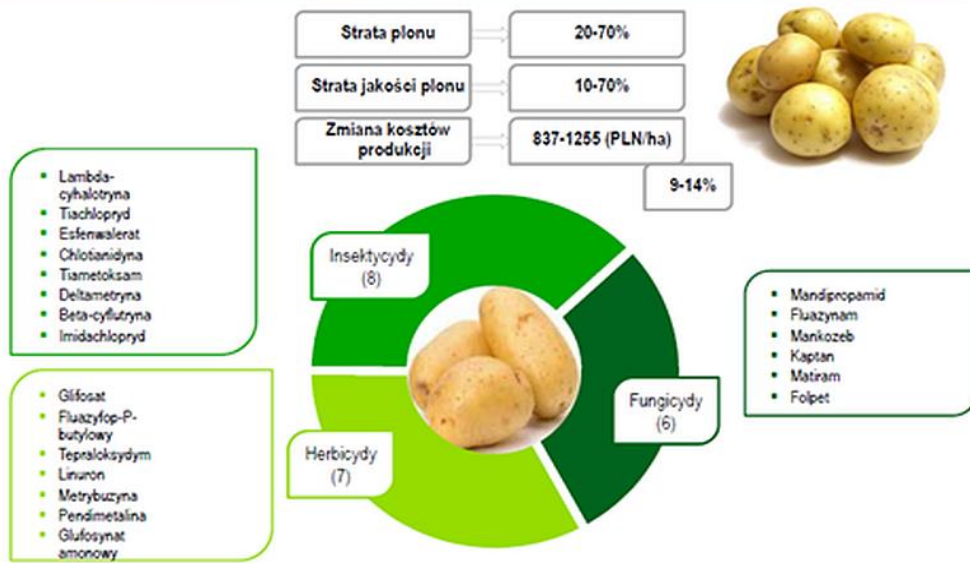
Rozporządzenia UE 2015/408 z dnia 11 marca 2015 r.⁵

1.1.2. Skutki zmian legislacyjnych dla rolnictwa

Na podstawie powyższych danych powstały raporty rynkowe opisujące prawdopodobne skutki (również ekonomiczne) planowanego wycofywania z rynku preparatów, o których mowa w powyższym rozporządzeniu. Dokument przygotowany przez firmę Bayer⁶ koncentruje się głównie na tematyce herbicydowej i wskazuje, że Unia Europejska planuje wycofanie 75 substancji czynnych spośród środków ochrony roślin. W warunkach Polski dotyczyć to będzie 54 związków, w tym 24 fungicydów, 18 herbicydów, 11 insektycydów i 1 regulatora wzrostu. Ilość preparatów, zawierających wspomniane substancje czynne, jest ogromna, a usunięcie samych triazoli wśród fungicydów (11 związków) spowoduje wycofanie aż 211 preparatów.

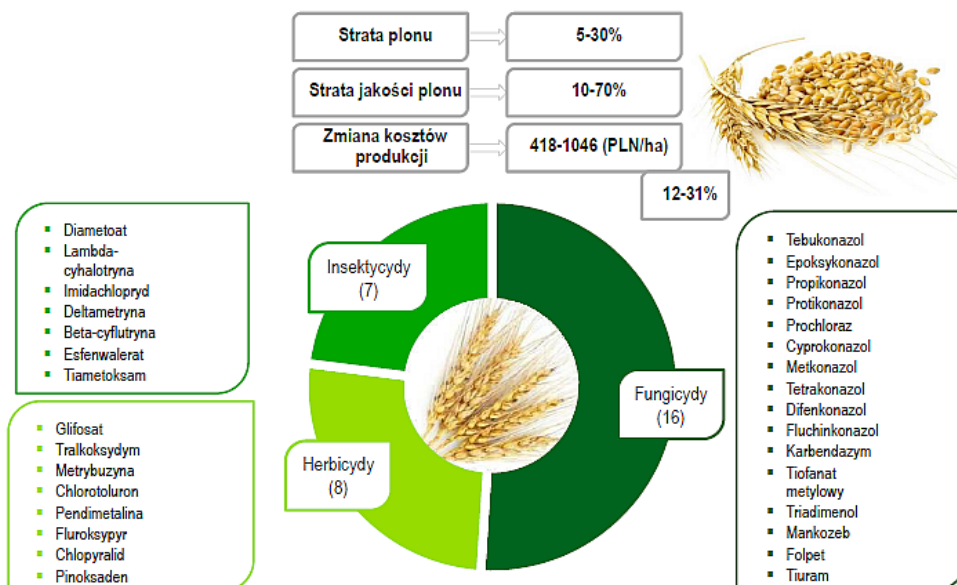
Kolejnym dokumentem, obrazującym problemy związane z ograniczeniem stosowania ŚOR, jest bardziej rozbudowany raport przygotowany w 2016 r. przez firmę Kleffmann Group (czołowego usługodawcę w dziedzinie badania rynku rolniczego) i wykonany na zlecenie Polskiego Stowarzyszenia Ochrony Roślin.⁷ Dotyczy on skutków potencjalnego wycofania poszczególnych ŚOR z rynku sektora rolniczego. Z opublikowanych danych wynika, że wycofanie wielu popularnych środków ochrony roślin spowoduje straty wielkości plonu, obniżenie jego jakości, a także zwiększenie kosztów produkcji rolniczej. Raport został przygotowany dla siedmiu upraw: jabłoni, czarnej porzeczki, rzepaku, buraka cukrowego, ziemniaka, pszenicy i kukurydzy. Poniżej przedstawiono prognozowany wpływ wycofania substancji czynnych na parametry jakościowe i ekonomiczne na przykładzie upraw ziemniaków i pszenicy (Rys. 3 i Rys. 4).

Skutki wycofania poszczególnych substancji czynnych
ZIEMNIAKI



Rys. 3 Skutki ekonomiczne wprowadzanych zmian w ŚOR w uprawach ziemniaków według analizy Kleffmann Group⁷

Skutki wycofania poszczególnych substancji czynnych
PSZENICA



Rys. 4 Skutki ekonomiczne wprowadzanych zmian w ŚOR w uprawach pszenicy według analizy Kleffmann Group⁷

Jak wynika z raportu w przypadku wycofania z rynku wybranych substancji czynnych należy oczekiwać wielu skutków o charakterze negatywnym. Cytując raport, do najważniejszych z nich można zaliczyć:

1. Wzrost odporności patogenów wynikający z mniejszej rotacji substancji czynnych w ochronie roślin, co przyczyni się między innymi do zwiększenia zagrożenia mykotoksynami.
2. Paradoksalnie, większe użycie środków ochrony roślin, w stosunku do obecnego, spowodowane zwiększoną liczbą zabiegów koniecznych do wykonania dla nowych substancji o niższej aktywności biologicznej. Czynnikiem ten będzie oddziaływać szczególnie silnie przy środkach owadobójczych, w przypadku definitywnego wycofania większości neonikotynoidów i braku zapraw nasiennych.
3. Zmniejszenie wielkości oraz jakości uzyskiwanego plonu w uprawach polowych i sadowniczych, wywołany mniejszą skutecznością chemicznej ochrony roślin.
4. Zwiększenie kosztów produkcji rolniczej wynikające ze stosowania większej liczby zabiegów oraz wyższych cen środków opierających się na alternatywnych (pozostających na rynku) substancjach czynnych.
5. Niższe dochody gospodarstw rolnych wywołane wyższymi kosztami ochrony oraz niższym plonowaniem i pogorszeniem jakości uzyskiwanych plonów.

6. Rosnące zagrożenie stosowania środków ochrony roślin niezgodnie z przeznaczeniem, czyli w uprawach, dla których nie mają one rejestracji i nie są do nich przeznaczone (np. stosowanie związków przystosowanych do upraw polowych w uprawach pod osłonami).

7. Wzrost zagrożeń związanych z nielegalnym importem środków ochrony roślin do Polski oraz wprowadzaniem produktów pochodzących z szarej strefy o nieznanym składzie i pochodzeniu.

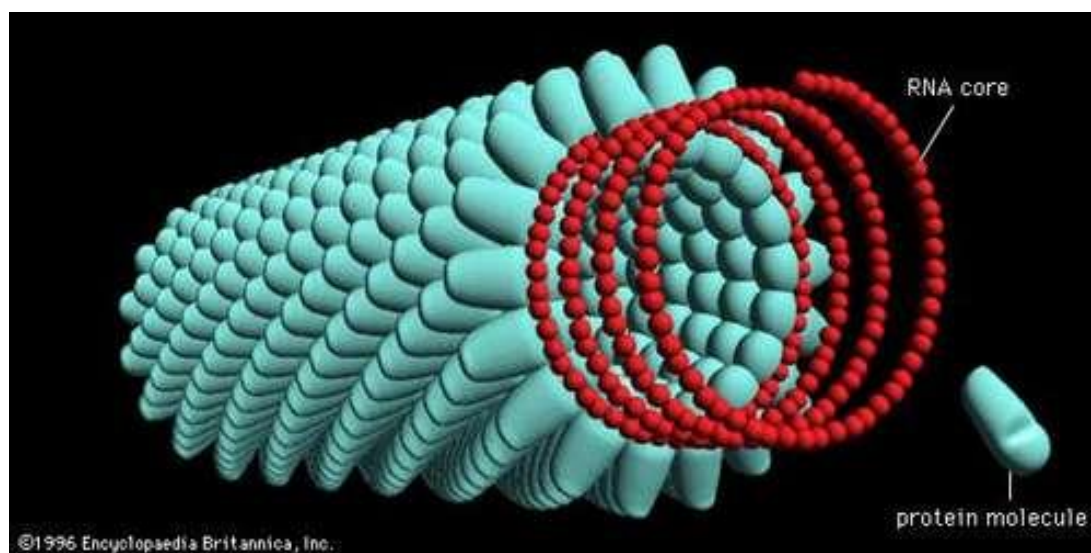
1.1.3. Indukcja odporności u roślin jako alternatywa

W świetle wprowadzanych w Unii Europejskiej przepisów, wykorzystanie zjawiska nabytej odporności systemicznej (SAR) może doprowadzić do uzyskania szeregu korzyści. SAR w roślinach to naturalny mechanizm wyzwalany w odpowiedzi na atak patogenu, owadów lub poprzez zastosowanie odpowiedniego czynnika chemicznego.⁸ Zaletami wykorzystania zjawiska SAR są jego wyjątkowe właściwości: (i) jest on bezpieczny dla środowiska, (ii) patogeny nie mogą rozwijać oporności przeciwko tej metodzie ochrony roślin, tak jak ma to miejsce w przypadku użycia konwencjonalnych ŚOR, (iii) działa przeciwko szerokiemu spektrum patogenów w tym samym czasie oraz (iv) może być alternatywą dla GMO (nieakceptowanego przez zdecydowaną większość społeczeństwa).⁹ Ponadto, induktory SAR nie działają bezpośrednio na patogeny, więc nie zabijają mikroorganizmów i owadów niezbędnych w środowisku. Należy również zauważyć, że konwencjonalne ŚOR są często stosowane przeciwko określonej grupie patogenów, podczas gdy aktywacja zjawiska SAR indukuje odporność na szerokie ich spektrum, w tym wirusy,

przeciw którym nie ma skutecznych metod ochrony roślin. Tak więc zjawisko indukcji odporności, oparte na solidnych podstawach naukowych, jest doskonałą metodą walki z chorobami roślin i potencjalnie może zrewolucjonizować rolnictwo w XXI wieku.

1.2. Choroby wirusowe roślin

Wirusy są wewnątrzkomórkowymi cząstkami patogennymi, zdolnymi do infekowania żywych organizmów. Chociaż wirusy kojarzone są z chorobami ludzi i zwierząt (np. ospa wietrzna, grypa czy AIDS), pierwszym opisanym wirusem był wirus mozaiki tytoniu (TMV), którego odkrycia dokonał Martinus W. Beijerinck w 1898 roku. Co ciekawe, termin „wirus” pochodzi od oryginalnego opisu czynnika chorobotwórczego TMV, który brzmiał "contagium vivum fluidum ", czyli „zakaźny płyn żyjący”.¹⁰



Fot. 1 Struktura wirusa TMV¹¹

Wirusy są zbudowane z materiału genetycznego, zazwyczaj RNA (w 80% przypadków), osłoniętego otoczką białkową, zwaną kapsydem (Fot. 1).¹¹ Wirusy są pasożytami obligatoryjnymi i poza organizmem

żywiciela nie są zdolne do poruszania się, replikacji, ani nie wytwarzają żadnych białek ani enzymów, przez co uważa się, że nie wykazują metabolizmu. Te cechy definiują wirusy jako materię nieożywioną. Aby doszło to infekcji wirus musi się przedostać do wnętrza komórki. Jako, że sam nie jest w stanie pokonać bariery ściany komórkowej u roślin, musi dojść do mechanicznego uszkodzenia tkanek, w trakcie których wirus może przeniknąć do ich wnętrza. Dzieje się tak m.in. w trakcie zabiegów agrotechnicznych czy bytowania na roślinie wektorów patogenów roślin, czyli głównie owadów bądź innych czynników przenoszących materiał wirusowy i uszkadzających strukturę rośliny, przez co możliwe jest rozpoczęcie infekcji (wektorów).

Po infekcji wirus uwalnia materiał genetyczny z kapsydu i rozpoczyna jego replikację oraz syntezę białek umożliwiającą korzystanie z procesów biochemicznych, zachodzących w komórce żywiciela. W tym czasie jest również w stanie przemieszczać się pomiędzy komórkami w roślinie, wykorzystując plazmodesmy oraz dalej poprzez łyko. Co ważne, replikacja uzależniona jest od dopasowania inżynierii molekularnej danej komórki i wirusa, przez co niektóre wirusy są w stanie infekować swoiste dla siebie gatunki roślin. Co więcej, sam proces replikacji może zachodzić bezobjawowo (w sposób latentny) i nie wpływać na wzrost czy plonowanie rośliny.

Na potrzeby krótkiego przedstawienia wyzwań, stojących przed współczesnym rolnictwem w świetle chorób wirusowych roślin, przybliżę metody ich zapobiegania według „*Metodyki Integrowanej Ochrony Pomidora*

pod *Ośłonami dla Doradców*”, wydanej przez Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach na zlecenie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi.¹² Dokument ten przedstawia metody prowadzenia danej uprawy, zagrożenia z nią związane oraz sposoby ich przeciwdziałania, zgodne z obowiązującymi zaleceniami dotyczącymi ochrony środowiska itp. W przypadku upraw pomidora w Polsce najgroźniejsze są trzy patogeny wirusowe. Jak przedstawiono poniżej nie istnieją skuteczne metody walki z tego typu chorobami roślin.

Pierwszym z patogenów jest wirus mozaiki ogórka na pomidorze (CMV - *Cucumber Mosaic Virus*). Wirus ten może pasożytować na wielu różnych roślinach uprawnych oraz chwastach i jest przenoszony przez mszyce (główny wektor) lub podczas prac pielęgnacyjnych na roślinach. Powoduje szerokie spektrum objawów, takich jak mozaika, nitkowatość, paprociowatość, smugowatość lub nekrozy na powierzchni liści oraz pierścieniowe plamy na owocach (Fot. 2).¹³ Poza przeciwdziałaniu wpływowi wektorów (za pomocą insektycydów), nie są znane skuteczne metody walki z tym wirusem.



Fot. 2 Skutki infekcji wirusa CMV na pomidorze

Kolejnym z patogenów jest wirus brązowej plamistości liści pomidora (TSWV - *Tomato Spotted Wilt Virus*). Jest on przenoszony wyłącznie przez cztery gatunki owadów (z rzędu wciornastków), a źródłem wirusa są chwasty (kilkaset gatunków). W tym przypadku infekcji towarzyszą bardziej ostre objawy, w tym ograniczenie zawiązania owoców lub ich deformacja, zahamowanie wzrostu, a nawet zamieranie roślin (Fot. 3).¹⁴ W przypadku infekcji na wczesnym etapie rozwoju rośliny w ogóle nie wydają plonu. Metody zapobiegania tej chorobie wirusowej również są oparte na zwalczaniu wektorów poprzez zastosowanie insektycydów, ograniczeniu ilości chwastów bądź izolacji upraw. Ostateczne wyeliminowanie tej choroby upatruje się w genetycznie zmodyfikowanych odmianach wykazujących wysoką odporność na ten wirus.



Fot. 3 Skutki infekcji wirusa brązowej plamistości (TSWV) na pomidorze

Trzecią z chorób wirusowych jest smugowatość ziemniaka na pomidorze wywołana przez wirus PVY (*Potato Virus Y*). Wirus ten atakuje głównie ziemniaki, ale obecny jest również na papryce, pomidorach czy tytoniu. Jak w poprzednich przypadkach jest przenoszony przez insekty (mszyce) lub w trakcie zabiegów agrotechnicznych. Powoduje szerokie spektrum objawów, w tym nekrozy liści (szczególnie na pędach wierzchołkowych), mocne zniekształcenie owoców i liści oraz zahamowanie wzrostu rośliny (Fot. 4).¹⁵ Profilaktyka w tym przypadku zakłada usuwanie porażonych roślin oraz izolacja od upraw ziemniaków. Powinno się również odkażać narzędzia stosowane do pielęgnacji roślin, używając podchlorynu sodu lub fosforanu trójsodowego.



Fot. 4 Zniekształcenie liści pomidora spowodowane przez wirus PVY

W świetle gospodarki światowej szczególnie dotkliwe są choroby wirusowe roślin w strefie tropikalnej. Tętejszy klimat zapewnia doskonały rozwój owadom, przez co presja środowiska ze strony wektorów przenoszących choroby wirusowe jest ogromna. Ponadto, niektóre choroby wirusowe roślin mogą być wywoływane przez symbiotyczne działanie dwóch lub więcej wirusów w tym samym czasie, co powoduje większe zagrożenie dla rośliny. Sztandarowym przykładem jest choroba MLND (Maize Lethal Necrosis Disease), występująca tylko w klimacie tropikalnym i spowodowana przez synergistyczne działanie dwóch wirusów: MCMoV (Maize Chlorotic Mottle Virus) oraz jednego z grupy Potyviridae: SCMV (Sugarcane Mosaic Virus), MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus) lub WSMV (Wheat Streak Mosaic Virus). Jest to jedna z najbardziej dotkliwych chorób wirusowych roślin, powodująca m.in. w 2013 roku w Kenii straty w wartości plonów kukurydzy na poziomie 52mln USD.¹⁶ Choroba ta powoduje stopniowe żółknięcie i wysychanie liści co prowadzi do przedwczesnej śmierci rośliny (Fot. 5).



Fot. 5 Żółknięcie liści spowodowane chorobą MLND

W wyniku tego nie dochodzi do prawidłowego wykształcenia kolb kukurydzy (Fot. 6).¹⁷



Fot. 6 Prawidłowo wykształcona kolba kukurydzy (po lewej) w stosunku do kolb zniekształconych przez chorobę MLND

Innym wirusem, będącym problemem dla gospodarki światowej, jest wirus pierścieniowej plamistości papai (PRSV – papaya ringspot virus) atakujący papaję.¹⁸ Papaja jest rośliną szybko rosnącą i plonującą (od nasiona do plonowania potrzeba jedynie 9-12 miesięcy). Po osiągnięciu dojrzałości plonuje w przeciągu całego roku przez okres nawet 10 lat. Wirus PRSV powoduje szereg objawów, między innymi pojawienie się pierścieniowych plam na powierzchni owoców, mozaiki i chlorozy na powierzchni blaszek liściowych oraz zniekształcenia młodych liści (Fot. 7). Finalnie, zainfekowane rośliny przestają wydawać plon po około 2-3 latach od infekcji, a jeżeli do infekcji dojdzie w okresie dwóch pierwszych miesięcy wzrostu, roślina nie plonuje wcale.



Fot. 7 Objawy infekcji papai przez wirus PRSV (plantacja firmy Green Garden, Ekwador)

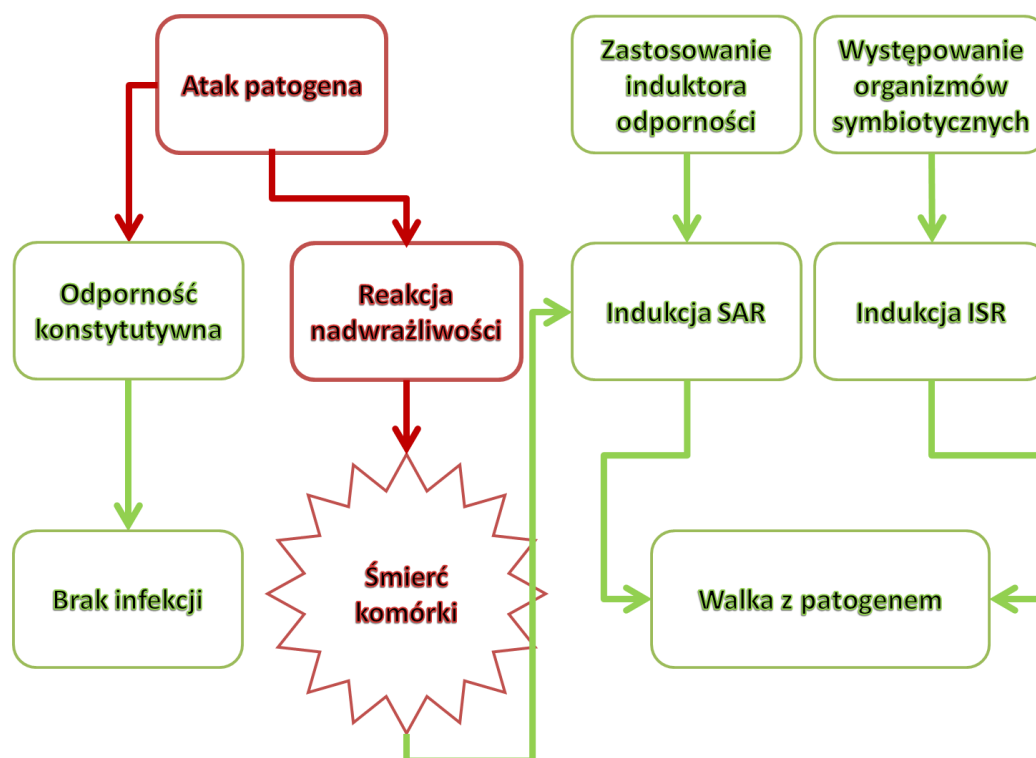
Wirus rozprzestrzeniany jest przez mszyce, ale pozostaje również w glebie, przez co pola uprawne muszą być przenoszone na nowe obszary. Pozostaje on również w nasionach z owoców roślin zainfekowanych, dlatego trzeba stale pozyskiwać nowy materiał siewny dla zakładania kolejnych plantacji. W uprawach prowadzonych w Brazylii walka z tym wirusem polegała na stałym przemieszczaniu plantacji. Na Tajwanie natomiast, z uwagi na ograniczenie areалу uprawnego, rok rocznie po plonowaniu rośliny usuwa się i nasadza kolejne, przez co pomimo występowania wirusa dochodzi do plonowania. Obecnie, jedyną skuteczną metodą walki z wirusem PRSV jest uprawa roślin genetycznie zmodyfikowanych, odpornych na atak tego patogenu. W ten sposób poradzono sobie ze skutkami ekonomicznymi tej choroby m.in. na Hawajach czy Brazylii. Niestety w krajach takich jak Ekwador, gdzie uprawa roślin genetycznie zmodyfikowanych jest zabroniona konstytucyjnie, jedyną metodą zapobiegania chorobie spowodowanej przez PRSV jest stosowanie insektycydów na ogromną skalę oraz stała migracja upraw.

Najważniejszym, w świetle niniejszej rozprawy doktorskiej, jest fakt, że wirusowe choroby roślin nie mogą być kontrolowane przez żadne konwencjonalne metody ochrony roślin. Wirusy poza organizmem żywiciela są bardzo trwałe i ewentualne działanie na nie środkami chemicznymi wymagałoby użycia związków o bardzo drastycznym działaniu, co spowodowałoby uśmiercenie innych organizmów w zasięgu aplikacji. Po dostaniu się wirusa do wnętrza rośliny nie ma już możliwości unicestwienia patogenu bez uszkodzenia rośliny z powodu bardzo bliskiego powiązania patogenu i żywiciela. Metodami stosowanymi w celu ochrony roślin przed chorobami wirusowymi są: ograniczenie wektorów, używając środków insektycydowych i pokrewnych; stosowanie odmian roślin odpornych na choroby wirusowe (zazwyczaj odmiany GMO) oraz zakup zweryfikowanego materiału nasiennego wolnego od wirusów, pochodzącego z banków nasion. W momencie odkrycia infekcji na roślinach zaleca się ich izolację od sąsiadujących upraw bądź likwidację (np. spalenie) w zależności od rodzaju infekcji.

Indukcja nabytej odporności systemicznej (SAR), możliwa do wzbudzenia poprzez użycie środków chemicznych, zwanych induktorami (elicytorami), jest w stanie zapobiegać rozwojowi choroby wirusowej w roślinie. Niniejsza rozprawa doktorska, omawiająca zależności pomiędzy strukturą chemiczną induktorów odporności roślin, a ich aktywnością biologiczną, rozpatruje badane związki jako jedną z niewielu skutecznych metod ochrony roślin przed chorobami wirusowymi.

1.3. Odporność roślin – rodzaje i mechanizmy

Fakt, że rośliny mogą nabyć systemową odporność w wyniku zlokalizowanej infekcji, jest znany od dawna.¹⁹ Doniesienia literaturowe, obejmujące badania fitopatologiczne, chemiczne i biochemiczne, genetyczne i genomowe, molekularne i agronomiczne, nieustannie dostarczają nowe informacje dotyczące tego zjawiska, określając je jako potencjalną metodę walki z patogenami w ochronie roślin. Modele, mające na celu zasugerowanie w jaki sposób proces SAR jest aktywowany w sposób naturalny, jak również po zastosowaniu środków chemicznych, były często publikowane.^{20,21,22,23} , Nowe doniesienia, oprócz sposobów działania testowanych laboratoryjnie, zajmują się również skutecznością indukowanej oporności w warunkach polowych.^{24,25,26}



Rys. 5 Rodzaje odporności u roślin

Roślina, oprócz odporności konstytutywnej, wynikającej z mechanicznej bariery ścian komórkowych czy wydzielania substancji o charakterze repelentnym, ma możliwość wzbudzenia innych mechanizmów odpornościowych na skutek działania patogenu bądź obecności specjalnych substancji chemicznych (induktorów). Ta odporność, zwana indukowaną, może być następnie podzielona na dwie główne grupy – odporność lokalną oraz systemiczną. Odporność lokalna jest związana z reakcją nadwrażliwości (HR) i wiąże się z programowaną śmiercią komórki oraz powstaniem nekroz (uniemożliwiających rozprzestrzenienie się patogenu). Jest to najprostszy z mechanizmów ochronnych rośliny, ale może prowadzić też do uruchomienia odporności systemicznej (Rys. 5).²⁷ Odporność systemiczna jest z drugiej strony nastawiona na walkę z patogenem, ale przy zachowaniu procesów fizjologicznych komórek i prowadzi do ekspresji genów i wytworzenia białek lub innych substancji umożliwiających walkę z patogenem.

Odporność systemiczna jest podzielona na trzy główne kategorie – nabytą odporność systemiczną (SAR – systemic acquired resistance), indukowaną odporność systemiczną (ISR – induced systemic resistance) oraz odporność zależną od kwasu β -aminomasłowego (BABA-IR – Beta-Aminobutyric Acid Induced Resistance).⁸ Wszystkie te procesy, ze względu na charakter systemiczny, wykorzystują związki sygnałne (zwane induktorami lub elicytorami), przenoszące informację o konieczności produkcji białek, związanych z odpornością, do wszystkich komórek w roślinie. SAR uruchamiany jest w momencie wykrycia przez roślinę infekcji, a cząsteczką sygnałną tego szlaku jest kwas salicylowy (SA) oraz jego ester metylowy

(MeSA). ISR jest natomiast wzbudzany przez niepatogeniczne organizmy symbiotyczne, np. grzyby mikoryzowe. Tutaj związkami sygnałnymi są kwas jasmonowy (JA), jego ester metylowy (MeJA) oraz etylen. Ostatni z mechanizmów został wyszczególniony w ostatnim dziesięcioleciu dzięki odkryciu, że zastosowanie BABA może aktywować wiele odpowiedzi immunologicznych poprzez wzmacnianie indukowalnych przez SA ścieżek i zainicjowaniu produkcji kalozy, niezależnie od kwasu salicylowego (SA) i jasmonowego (JA).²⁸

Pomimo szczegółowych badań prowadzonych nad zjawiskami indukowania odporności, podstawa molekularna SAR nie jest jeszcze jasno sformułowana. Liczba faktów, które pojawiają się w ostatnich dziesięcioleciach, pozwala na rozważenie SAR jako jednego z głównych mechanizmów w wieloaspektowym systemie obronnym roślin, indukowanym w roślinach poprzez różne ścieżki, charakteryzujące się własnymi sygnałami, metabolitami i genami. SAR jest wtedy definiowany jako szeroko pojęty proces zależny od bioakumulacji kwasu salicylowego i aktywujący białko transdukcyjne NPR-1, umożliwiając rozwinięcie odpowiedzi obronnej.

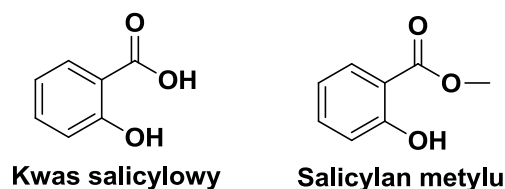
Aby wyjaśnić ogólny mechanizm nabytej odporności systemicznej, powstało kilka modeli zakładających, że wczesne (lub podstawowe) mechanizmy obronne roślin są uruchamiane przez odpowiednie receptory rozpoznające wzorce lub patogeny (pattern/pathogen recognition receptors (PRRs)), które identyfikują cząsteczki związane z patogenem/drobnoustrojem (pathogen/microbe-associated molecular patterns - PAMPs/MAMPs).²⁹ Odporność aktywowaną w ten sposób nazywamy PTI (pathogen-triggered

immunity albo pattern-triggered immunity). Ewolucja patogenów poszła w kierunku wytwarzania przez nie efektorów, tłumiących tak wygenerowaną odporność. Jako kontratak, rośliny wykształciły białka „R” (PR – eng. Proteins „R”), które rozpoznają specyficzne efekторы pochodzące od efektoro-zależnej odporności (effector-triggered immunity - ETI, dawniej nazywane odpornością opartą na genie R lub odpornością pionową). Wspomniany mechanizm kontrataku składa się na wzbudzenie SARu.³⁰ Odpowiedzi na atak patogenu mogą być preaktywowane lub regulowane za pomocą wielu sygnałów i wyzwalane przez endogenne lub syntetyczne induktory.

Wczesna odpowiedź roślin na patogeny wywołuje wiele reakcji, w tym powstawanie metabolitów i genów ściśle zaangażowanych w obronę. Związki o niskiej masie cząsteczkowej, które zazwyczaj gromadzą się w zainfekowanych tkankach (nazywane hormonami) są ogólnie klasyfikowane jako związki sygnałne (elicitory). Rosnąca liczba elicitorów, znanych w literaturze, czyni ich prawidłowe uszeregowanie bardzo trudnym zadaniem. Aby uniknąć arbitralności, najważniejsze z nich zostaną omówione w kolejności w jakiej zostały odkryte.

1.4. Endogenne induktory odporności u roślin i mechanizmy ich działania

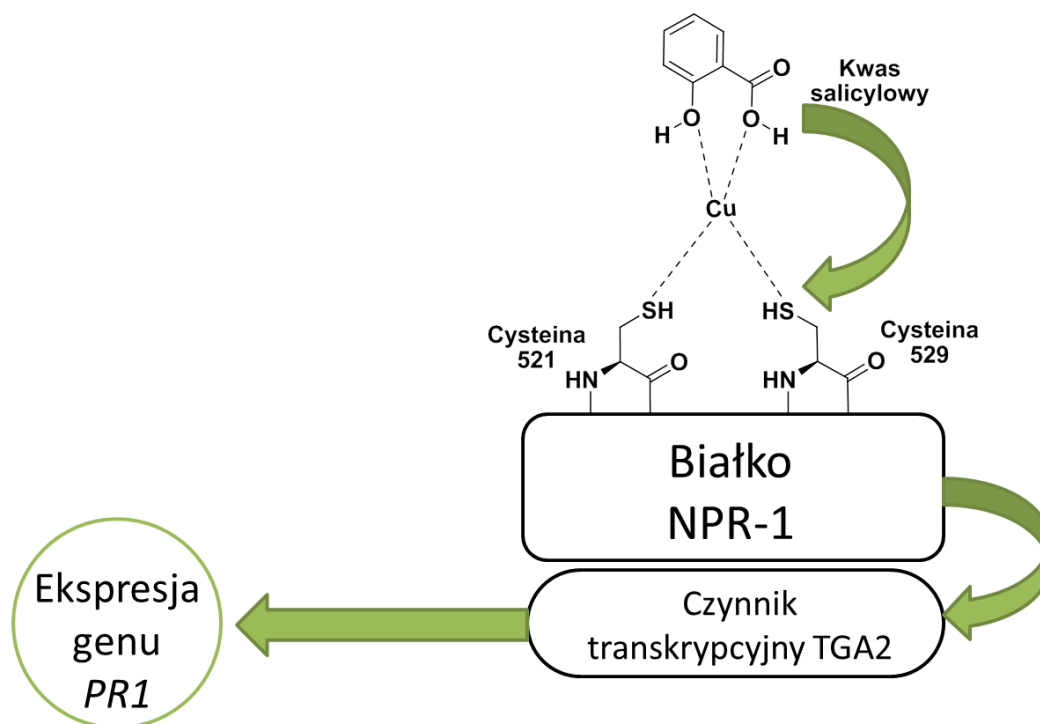
1.4.1. Kwas salicylowy (SA) i salicylan metylu (MeSA)



Rys. 6 Struktura kwasu salicylowego i salicylanu metylu

Kwas salicylowy jest najlepiej znanym sygnałem, którego obecność została udowodniona jako niezbędna do ekspresji zjawiska SAR u większości roślin, zarówno w inokulowanych przez patogeny liściach jak i odpowiedziach dystalnych, nawet jeśli wymagał translokacji w postaci estru metylowego.³¹ Synteza kwasu salicylowego na drodze hydroksylowania kwasu benzoesowego jest podejmowana przez enzym syntazy izochoryzmianowej (ICS – eng. isochorismate synthase) i następuje natychmiast po uruchomieniu odpowiedzi na stres wywołany przez infekcję. Właściwości chemiczne SA są odpowiednie, aby mógł odgrywać znaczącą rolę w wielu reakcjach i oddziaływaniach z cząsteczkami i enzymami uczestniczącymi w indukcji SAR.³² Jednakże jego główna funkcja polega na indukcji ekspresji genów PR-1, z udziałem niezbędnej mediacji białka NPR-1. Ostatnie badania wykazały, że oligomeryczna forma NPR-1, obecna w cytoplazmie, jest w obecności kwasu salicylowego rozdzielana na monomery i przenoszona do jądra komórki, gdzie jest w stanie zapoczątkować wydajną ekspresję genów obronnych (PR-1). Bez obecności kwasu salicylowego, podanego z zewnątrz lub zsyntezowanego endogennie w skutek działania patogenu, nie dochodzi do aktywacji białka NPR-1 ani ekspresji genów PR-1.³³

Najnowsze badania na temat mediacji białka NPR-1 wskazują, że NPR-1 wiąże się z SA poprzez koordynację z atomem miedzi tworząc kompleks, w którym ligandy to odpowiednio dwa atomy tlenu grupy hydroksylowej i karboksylowej kwasu salicylowego i dwa atomy siarki Cys521 i Cys529 białka (Rys. 7). Utworzony kompleks charakteryzuje się niską stałą dysocjacji $K_d = 1,4 \times 10^{-7} \text{ M}$ (140 nM). Wiązanie to wzmacnia podatność białka NPR-1 do oddziaływania z czynnikiem transkrypcyjnym TGA2, prowadzącym do ekspresji genów obronnych (PR-1).³⁴



Rys. 7 Schemat oddziaływania kwasu salicylowego z białkiem NPR-1³⁴

Oddziaływanie pomiędzy kwasem salicylowym a białkiem powoduje zmianę konformacyjną w dimerowej postaci NPR-1, co prowadzi do uwolnienia C-terminalnej domeny transaktywacyjnej, finalnie umożliwiając domenie transkrypcyjnej NPR-1 aktywowanie ekspresji genów PR-1.³⁴ Co ważne,

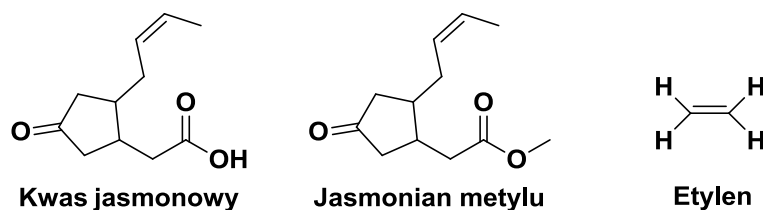
oddziaływania pomiędzy SA a NPR-1 nadal pozostają kwestią debaty i wymagają dalszych analiz strukturalnych, co niedawno zasugerował Fu i Dong.²⁶ Ostateczne potwierdzenie tego mechanizmu będzie miało miejsce po wykryciu białka NPR-1 oraz zbadaniu jego struktury krystalograficznej w stanie wolnym oraz w obecności kwasu salicylowego.

Jak wspomniano powyżej, NPR-1 jest przechowywany w cytoplazmie jako oligomer, aby zapobiec niepożądanemu aktywowaniu SAR w przypadku braku obecności patogenu. Inną funkcją oligomerów jest utrzymywanie homeostazy NPR-1, w trakcie transportowania monomerów do jądra podczas indukcji SAR i ich degradacji przez szlak proteasomu 26S.³⁵ Degradacja NPR-1 występuje zarówno w przypadku braku SA i/lub w obecności wysokich stężeń tego hormonu, czyli podczas ataku patogenu i odbywa się za pośrednictwem dwóch paralogów NPR-1: NPR-3 i NPR-4, które są receptorami SA o różnym powinowactwie do jego wiązania.^{36,37} SA promuje interakcję pomiędzy NPR-1 i NPR-3 oraz zaburza oddziaływanie pomiędzy NPR-4 i NPR-1, kontrolując w ten sposób stężenie NPR-1. Gdy poziomy SA są wysokie (tj. w komórce bezpośrednio kontaktowanej przez efektor patogenowy) NPR-3 pozostaje połączony z NPR-1 i kompleks jest następnie degradowany przez proteasom 26S, co prowadzi do programowanej śmierci komórki (PCD) i tym samym reakcji nadwrażliwości (HR), będącej odpornością zlokalizowaną i niesystemiczną. Ta degradacja musi mieć miejsce zanim NPR-1 zacznie regulować jego geny docelowe (PR-1). Przeciwnie, średnie stężenie SA (np. w sąsiednich komórkach) jest niewystarczające na stymulację wiązania NPR-1 – NPR-3, ale wysokie na tyle, że pozwala na oddzielenie się NPR-1 i NPR-4; przez co

wolny NPR-1 może oddziaływać z czynnikiem transkrypcyjnym TGA-2, promując transkrypcję genów PR i syntezę białek PR. To prowadzi do akumulacji NPR-1, co zapobiega śmierci komórki i pozwala uruchomić SAR.^{26,37}

Ester metylowy kwasu salicylowego MeSA jest metabolitem, którego funkcją jest przenoszenie sygnału przez łyko, powodując indukowanie SAR w komórkach dystalnych. Po dotarciu na miejsce jest on hydrolizowany za pomocą esterazy metylowej do SA. W tytoniu i *Arabidopsis* esteraza została scharakteryzowana w białku SABP2 (SA-binding protein 2).³⁸ Co ciekawe nadmierna ilość MeSA jest w stanie uwalniać się z rośliny i indukować odporność u sąsiednich roślin, nie porażonych jeszcze przez patogen.³⁹

1.4.2. Kwas jasmonowy (JA), jasmonian metylu (MeJA) i etylen (ET)



Rys. 8 Struktura kwasu jasmonowego (JA), jasmonianu metylu (MeJA) i etylenu (ET)

Kwas jasmonowy (JA) oraz jego ester metylowy (MeJA) są znane z pobudzania ścieżek odrębnych od tych związanych z akumulacją SA, jednak mogących z nią oddziaływać w sposób antagonistyczny, synergistyczny lub addytywny. JA jest cząsteczką sygnałną, produkowaną w wyniku reakcji rośliny na rany i szkody spowodowane przez organizmy

bytujące na tkankach roślinnych, analogicznie do tych wywołanych przez patogeny. Ponadto, JA i ET są indukowane przez symbiotyczne gatunki drobnoustrojów, takie jak bakterie kolonizujące korzenie, grzyby mikoryzowe, czy *Trichoderma spp.* Sama obecność tych organizmów na powierzchni rośliny, nie powodująca uszkodzeń tkanek, powoduje wzrost odporności u roślin. Ten rodzaj symbiotycznej korzyści, nazywany indukowaną opornością systemiczną (ISR), jest najprawdopodobniej wywołany przez substancje pochodzące od symbiontów, takie jak lipopolisacharydy (LPS) i egzopolisacharydy (EPS). Okazało się również, że inne czynniki, takie jak siderofory, antybiotyki, biosurfaktanty i różne metabolity organizmów symbiotycznych, również prowadzą do aktywacji odpowiedzi immunologicznej.⁴⁰ Interesującą cechą wielu z tych interakcji jest zależność ISR nie tylko od JA i ET, ale również od transkrypcji regulatora NPR-1. W rzeczywistości, było to często kluczowe w indukowaniu primingu do ekspresji genów zależnych od JA/ET i odkładaniu się kalozy w miejscu ataku patogenu. W obecnie wspomnianym mechanizmie odporności zakłada się, że NPR-1 odgrywa zupełnie inną funkcję, niż we wcześniej opisywanym mechanizmie zależnym od SA. W tym przypadku NPR-1 pełni rolę regulacyjną pomiędzy współistnieniem dróg indukcji zależnych od SA i JA.^{41,42} Oczywiście, jeśli obie drogi indukcji odporności odbywałyby się systemowo w tym samym czasie, mogłoby to być bardzo niebezpieczne dla rośliny.⁴² Aktualnie, wzajemny antagonizm szlaków zależnych od SA oraz JA u różnych gatunków roślin, jest przedmiotem badań.⁴³ Interakcje te rozszerzają się nawet na efekторы patogenów, które mogą być wykorzystywane do wzmocnienia ich zjadliwości. Koronatyna (COR) to efektor produkowany przez niektóre szczepy patogenów *Pseudomonas*

syringae. Jego najbardziej znaczącym działaniem jest naśladowanie koniugatu JA-izoleucyny (JA-Ile), który hamuje odpowiedź zależną od SA. COR działa więc jako silny agonista JA-Ile i silnie indukuje geny reagujące z kwasem jasmonowym. Jak wykazano, działając jako analog JA, pokonuje on mechanizmy obrony zależne od SA podczas infekcji bakteryjnej u *Arabidopsis thaliana*.^{44,45} Co ciekawe, COR jest również w stanie wywoływać otwarcie aparatów szparkowych, ułatwiając bakteriom penetrację do rośliny.⁴⁶

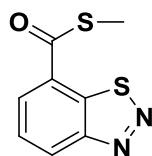
Ze względu na niższą wydajność mechanizmu ISR niż SAR oraz bardzo ograniczoną liczbę doniesień, dotyczących wzbudzenia tej drogi indukcji odporności przez induktory syntetyczne, w dalszej części pracy skupiono się wyłącznie na związkach będących analogami funkcjonalnymi kwasu salicylowego.

1.5. Wybrane chemiczne induktory egzogenne

Aktywacja naturalnych mechanizmów obronności u roślin, takich jak SAR, może być wzbudzana przez związki chemiczne, imitujące sygnały wysyłane naturalnie podczas pojawienia się uszkodzeń martwiczych, występujących tylko po ataku patogenu. Zabieg ten został po raz pierwszy zastosowany przez White'a, który zastosował egzogenną aplikację salicylanów w celu ochrony rośliny tytoniu przed różnymi patogenami.⁴⁷ White był zatem pionierem tego, co znane jest obecnie jako indukcja odporności.

Sukcesywne badania agrochemiczne, prowadzone głównie przez koncerny produkujące środki ochrony roślin, doprowadziły do odkrycia kilku niezwykle skutecznych, funkcjonalnych analogów SA, mogących mieć nawet silniejsze działanie od induktora endogennego. W niniejszym rozdziale zostaną przedstawione najważniejsze z syntetycznych induktorów odporności u roślin, których analogi są tematem niniejszej rozprawy doktorskiej.

1.5.1. BTH



7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolo-S-metyl ester

Rys. 9 Struktura 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolo-S-metyl estru (BTH, ASM)

Tioester metylowy kwasu 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowego (BTH), zidentyfikowany jako najbezpieczniejszy i najbardziej wydajny z serii analogów, został wprowadzony na rynek pod nazwą acibenzolar-S-methyl

(przez koncern Ciba-Geigy, w dalszych latach Novartis oraz Syngenta) w preparacie BION 50WG oraz Actigard 50WG.⁴⁸ Co ważne, na niektórych rynkach jest dostępny do dziś oraz sprzedawany jako fungicyd. Wykazano, że wchodzi w interakcję z białkiem NPR-1 poprzez wiązanie analogiczne do kwasu salicylowego, o podobnym lub nawet większym powinowactwie.³⁴ Efektem działania BTH jako induktora jest bezpośrednia aktywacja białek PR. Analiza działania BTH w roślinach pomidora wykazała, że związek ten jest szybko transportowany do liści wierzchołkowych oraz przekształca się w wolny kwas karboksylowy na drodze hydrolizy już po 3 dniach od aplikacji.³⁴

Początkowe badania przyniosły dowody na to, że w roślinach tytoniu BTH był w stanie wywołać odporność przeciwko biotroficznym grzybom patogennym, jak również *Pseudomonas syringae* i wirusowi mozaiki tytoniowej. Co ważne, nie zaobserwowano ochrony przed grzybami nekrotroficznymi.⁴⁸

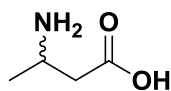
W kolejnych badaniach wykazano, że zastosowanie BTH w stężeniu 0,3-1 mM na roślinach *Arabidopsis* umożliwiło wykrycie maksymalnej ekspresji genów PR-1, PR-2 i PR-5 już w 1 dniu po aplikacji i wykazywało wysoką skuteczność przeciwko *Peronospora parasitica* i *Pseudomonas syringae*. Odporność za pomocą BTH była również indukowana w roślinach transgenicznym (NahC), niezdolnych do akumulacji kwasu salicylowego, wskazując, że BTH działa niezależnie od SA.⁴⁹

Badanie indukowanej odporności przeciwko mączniakowi prawdziwemu na jęczmieniu *Blumeria graminis*, wykazało skuteczność BTH w różnych

odstępach czasu od aplikacji induktora do inokulacji grzyba (nazwany czasem indukcji (IT – induction time)). Już po IT wynoszącym 3 dni infekcja na pierwotnym liściu została zmniejszona o 68,9%, natomiast, gdy IT został wydłużony do 5 dni, zakażone obszary zmniejszyły się o 77,2% w stosunku do kontroli. Podobną redukcję mierzono również we wtórnych, nietraktowanych induktorem liściach, gdy IT przedłużono do 10 dni.⁵⁰ Wpływ zastosowania BTH na roślinach soi przeciwko *Phytophthora sojae*, opisany przez innych autorów wykazuje, że ekspresja białek PR-1, PR-3a-b, PR-9 i PR-10 została aktywowana w różnych odstępach czasu i na różnych poziomach.⁵¹ Jak sugerują autorzy, ekspresja białek PR-1, PR-9 i PR-10 przyczynia się bezpośrednio do wzrostu odporności w komórkach soi, ale rola odgrywana przez PR-3a i PR-3b, kodujących białka wykazujące aktywność jako chitynazy, pozostaje niejasna, ponieważ gatunki *Phytophthora*, jak i *Oomycetes*, nie mają chityny w ścianach komórkowych.

Cząsteczkę BTH zastosowano również do ochrony soi przed zgnilizną hipokotylową, spowodowaną przez *Rhizoctonia solani*. Co ciekawe, testy *in vitro* wykazały, że rozrost grzybni tego patogenu został częściowo zahamowany (o 40%) w roztworze BTH o stężeniu 2,4 mM (mankozeb w 0,2 mM wykazywał 94% inhibicję). Jednak działanie to nie miało wpływu na wirulencję *Rhizoctonia solani*, którego inokulum, hodowane w roztworze BTH, było tak samo patogenne, jak to utrzymane w domyślnym medium. Z drugiej strony impregnacja nasion soi za pomocą BTH znacznie zmniejszyło objawy chorobowe hipokotyłu, powodowane przez patogen.⁵² Badania te potwierdzały wyłącznie systemiczny, a nie kontaktowy, charakter działania przeciwgrzybicznego.

1.5.2. Kwas β -aminomasłowy (BABA).



Kwas DL-
3-aminomasłowy

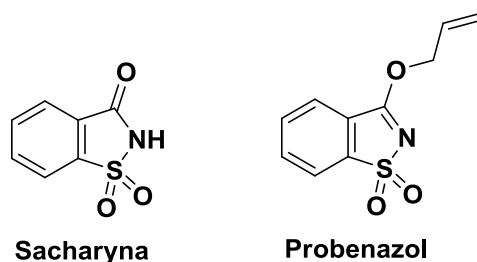
Rys. 10 Struktura kwasu β -aminomasłowy (BABA)

Kwas β -aminomasłowy stał się obiektem wielu badań, dotyczących indukcji odporności u roślin, po odkryciu, że jego zastosowanie poprzez podlewanie ochroniło rośliny grochu od zakażenia lęgniowcem (grzybopodobnym organizmem eukariotycznym) *Aphanomyces euteiches*.⁵³ Nowsze prace potwierdziły, że zastosowanie BABA powoduje szerokie spektrum działania indukcyjnego i chroni przed chorobami powodowanymi, m in. przez grzyby z grup mączniaków rzekomych, grzyby nekrotroficzne, a także patogeny bakteryjne i wirusowe. Udowodniono brak bezpośredniego działania tego kwasu na patogeny, co dowodzi jego działania systemicznego jako elicitora. Podczas gdy w roślinach pomidora był on w stanie indukować szybką akumulację białek PR-1, w przypadku tytoniu stwierdzono, że jego aplikacja rozwija również typowe objawy nadwrażliwości (HR) jeszcze przed wywołaniem akumulacji kwasu salicylowego.⁵⁴ Najnowsze badania dowodzą, że BABA jest w stanie indukować więcej niż jeden mechanizm odporności u roślin (w *Arabidopsis*). Jednym z nich jest odporność zależna od SA, o którym świadczy zwiększona ekspresja genu markerowego PR-1 po infekcji przez *Pseudomonas syringae* pv *tomato* lub *Botrytis cinerea*. Kolejnym z mechanizmów działania jest przygotowanie do odporności przez stymulację do wytwarzania kalozy (np. przeciwko *Hyaloperonospora parasitica* i nekrotroficznym patogenom *Alternaria brassicola*

i *Plectrosphaerella cucumerina*). Podczas infekcji kaloza uważana jest za fizyczną barierę tworzącą się w miejscach penetracji tkanki roślinnej przez grzyba.^{55,56} BABA ma również właściwość tłumienia odpowiedzi zależnej od kwasu jasmonowego, przez co skutecznie wspomaga wzrost ekspresji genów zależnych od kwasu salicylowego.⁵⁷

Gdy zastosowano kwas β -aminomasłowy w celu wywołania oporności u roślin *Vitis vinifera* przeciwko infekcji *Plasmopara viticola*, wpływ na zmniejszenie wzrostu grzybnii i sporulacji były związane z ekspresją genów markerowych dla SA (PR-1) i JA (PR-4 i LOX-9). Ścieżka JA wydawała się być szczególnie aktywna, prowadząc do początkowego odkładania się kalozy i ligniny wokół miejsc zainfekowanych. W rzeczywistości podobne efekty (nawet jeśli z niższą odpornością) były obserwowane przez egzogenne zastosowanie JA, podczas gdy BTH nie spowodował znacznego wzrostu odporności.⁵⁸

1.5.3. Sacharyna

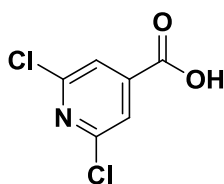


Rys. 11 Struktura sacharyny i jej pochodnej

Sacharyna, dobrze znana jako substancja słodząca, stosowana w żywności i napojach, jest również skutecznym czynnikiem wzbudzającym SAR, będącym w stanie indukować oporność przeciwko szerokiemu spektrum

patogenów zarówno zbóż, jak i roślin strączkowych.^{59,60,61,62,63} Odkrycie działania biologicznego u roślin zostało odkryte w następstwie badań nad probenazolem (którego sacharyna jest metabolitem) – fungicydem znanym również jako stymulator mechanizmów odporności w roślinach ryżu przeciwko porażeniu przez *Magnaporthe grisea* oraz bakterie *Xanthomonas oryzae*. W niektórych przypadkach podlewanie roślin roztworem sacharyny było bardziej skuteczne niż stosowanie dolistne, np. w ochronie soi przed rdzą. W najnowszej pracy Delgado *et al.* badał skuteczność sacharyny w ochronie fasoli przed rdzą wywołaną przez *Uromyces appendiculatus* (inokulowanie mechaniczne) oraz przeciwko rdzy w połączeniu z plamistością liści fasoli wywołaną przez *Phaeoisariopsis griseola* w naturalnie porażonych roślinach. W doświadczeniach w szklarniach fasola opryskana sacharyną (0,24 mg/ml) i inokulowana *Uromyces appendiculatus* 6 dni później wykazała zmniejszoną liczbę, rozmiar i sporulację nekroz. W trzech kolejnych eksperymentach po naturalnej infekcji fasola, opryskiwana roztworem sacharyny co 14 dni, była zdolna do obrony roślin przeciwko rdzy, jednak z niższą skutecznością przeciwko plamistości liści fasoli.

1.5.4. Kwas 2,6-dichloroizonikotynowy (INA)



Kwas 2,6-
dichloroizonikotynowy

Rys. 12 Struktura kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego (INA)

Kunz *et al.*, w patencie zgłoszonym przez koncern Ciba-Geigy, opisał badania screeningowe dużej liczby związków pod kątem potencjału do aktywacji odporności w ogórku (*Cucumis sativus*) przeciwko patogenowi grzybowemu *Colletotrichum lagenarium* i zidentyfikował kwas 2,6-dichloroizonikotynowy (INA) i jego pochodną estrową jako związki wykazujące bardzo wysoką skuteczność.⁶⁴ Wysoki poziom ochrony ogórka przed *C. lagenarium* osiągnięto przez aplikacje w postaci oprysku w dawce 104 μM (20 ppm), a także poprzez podlewanie w 10-krotnie niższych stężeniach. W warunkach polowych, INA zapewniała odporność przeciwko patogenom na roślinach gruszy, pieprzu i ryżu.^{65,66} W dalszych badaniach wykazano,^{67,68} że INA indukuje SAR w tytoniu i *Arabidopsis*, zapewniając znaczącą odporność roślin tytoniu przeciwko TMV, *Cercospora nicotianae*, *Peronospora tabacina*, *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* i *P. syringae* pv. *tabaci*. Jak dotąd INA była zastosowana na wielu gatunkach roślin i wykazała wysoką skuteczność w indukcji odporności przeciwko szerokiemu spektrum patogenów.^{69,70,71,72,73} Niestety, INA charakteryzuje się podwyższoną fitotoksycznością, przez co nie znalazła zastosowania w preparatach

komercyjnych.⁶⁰ Mimo to, INA jest induktorem wykorzystywanym do celów badawczych nad mechanizmami indukcji SAR.

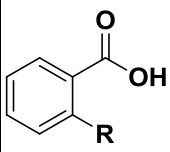
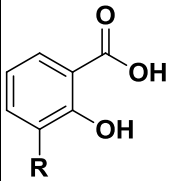
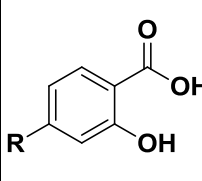
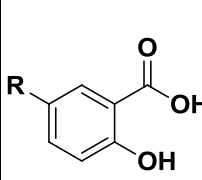
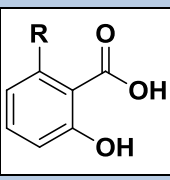
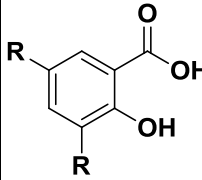
1.6. Modyfikacje chemiczne znanych induktorów odporności u roślin

1.6.1. Pochodne kwasu salicylowego

Oprócz funkcjonalnych analogów SA, które omówiono powyżej, testowano również pochodne chemiczne tego induktora. Wykazano, że kwas 3,5-dichlorosalicylowy, 4-chlorosalicylowy i 5-chlorosalicylowy, doskonale imitują działanie kwasu salicylowego, indukując ekspresję genu PR-1 i wzmacniając odporność na zakażenie TMV w tytoniu.^{74,70} Co ciekawe, inne analogi kwasu salicylowego, takie jak kwas benzoesowy, 2-aminobenzoesowy, 3-hydroksybenzoesowy, 4-hydroksybenzoesowy, 2,3-dihydroksybenzoesowy, 2,4-dihydroksybenzoesowy, 2,5-dihydroksybenzoesowy i 4-aminosalicylowy nie wykazywały aktywności jako induktory odporności.^{75,76}

Powyższe wyniki pokrywają się z najszerszym jak dotąd opracowaniem, dotyczącym wpływu struktury chemicznej na induktory odporności u roślin, którego wyniki przedstawiono poniżej (Tab. 1).⁷⁷ Badania indukcji SAR dla wymienionych związków zostały przeprowadzone na roślinach tytoniu, w których badano wzrost stężenia białek PR-1a. Wszystkie otrzymane wyniki przedstawiono w postaci względnej, gdzie jako „1” ustalono działanie kwasu salicylowego.

Tab. 1 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu salicylowego⁷⁷

Badana Substancja	Podstawnik	Względna indukcja SAR	Struktura
Kontrola		0.00	H ₂ O
Substytucja w Pozycji 2			
Kwas Salicylowy (SA)	-OH	1.00	
Kwas acetylosalicylowy	-OAc	1.10	
Kwas Benzoesowy	-H	0.00	
Kwas 2-fluorobenzoesowy	-F	0.06	
Kwas Tiosalicylowy	-SH	0.59	
Substytucja w Pozycji 3			
Kwas 3-aminosalicylowy	-NH ₂	0.54	
Kwas 3-chlorosalicylowy	-Cl	2.67	
Kwas 3-fluorosalicylowy	-F	2.13	
Kwas 3-formylosalicylowy	-CHO	0.06	
Kwas 3-hydroksyalicylowy	-OH	0.00	
Kwas 3-izopropylsalicylowy	-izopropylowy	0.00	
Kwas 3-metoksyalicylowy	-OCH ₃	0.49	
Kwas 3-metylosalicylowy	-CH ₃	0.22	
Kwas 3-nitrosalicylowy	-NO ₂	0.27	
Kwas 3-fenylsalicylowy	-fenylowy	0.00	
Substytucja w Pozycji 4			
Kwas 4-aminosalicylowy	-NH ₂	0.08	
Kwas 4-chlorosalicylowy	-Cl	0.32	
Kwas 4-fluorosalicylowy	-F	0.83	
Kwas 4-hydroksyalicylowy	-OH	0.00	
Kwas 4-metoksyalicylowy	-OCH ₃	0.17	
Kwas 4-metylosalicylowy	-CH ₃	0.05	
Substytucja w Pozycji 5			
Kwas 5-aminosalicylowy	-NH ₂	0.00	
Kwas 5-bromosalicylowy	-Br	0.41	
Kwas 5-chlorosalicylowy	-Cl	1.07	
Kwas 5-cyjanosalicylowy	-CN	0.85	
Kwas 5-fluorosalicylowy	-F	1.60	
Kwas 5-formylosalicylowy	-CHO	0.00	
Kwas 5-hydroksyalicylowy	-OH	0.00	
Kwas 5-jodosalicylowy	-I	0.00	
Kwas 5-metoksyalicylowy	-OCH ₃	0.12	
Kwas 5-metylosalicylowy	-CH ₃	0.00	
Kwas 5-nitrosalicylowy	-NO ₂	0.15	
Substytucja w Pozycji 6			
Kwas 6-fluorosalicylowy	-F	0.29	
Kwas 6-hydroksyalicylowy	-OH	0.86	
Kwas 6-metoksyalicylowy	-OCH ₃	0.31	
Kwas 6-metylosalicylowy	-CH ₃	0.16	
Substytucja w Pozycji 3 i 5			
Kwas 3,5-dibromosalicylowy	-Br, -Br	0.25	
Kwas 3,5-dichlorosalicylowy	-Cl, -Cl	1.81	
Kwas 3,5-difluorosalicylowy	-F, -F	3.83	
Kwas 3-chloro-5-fluorosalicylowy	-Cl, -F	1.70	
Kwas 3-fluoro-5-chlorosalicylowy	-F, -Cl	1.46	
Kwas 3,5-dinitrosalicylowy	-NO ₂ , -NO ₂	0.00	
Kwas 3-metoksy-5-chlorosalicylowy	-OMe, -Cl	0.15	

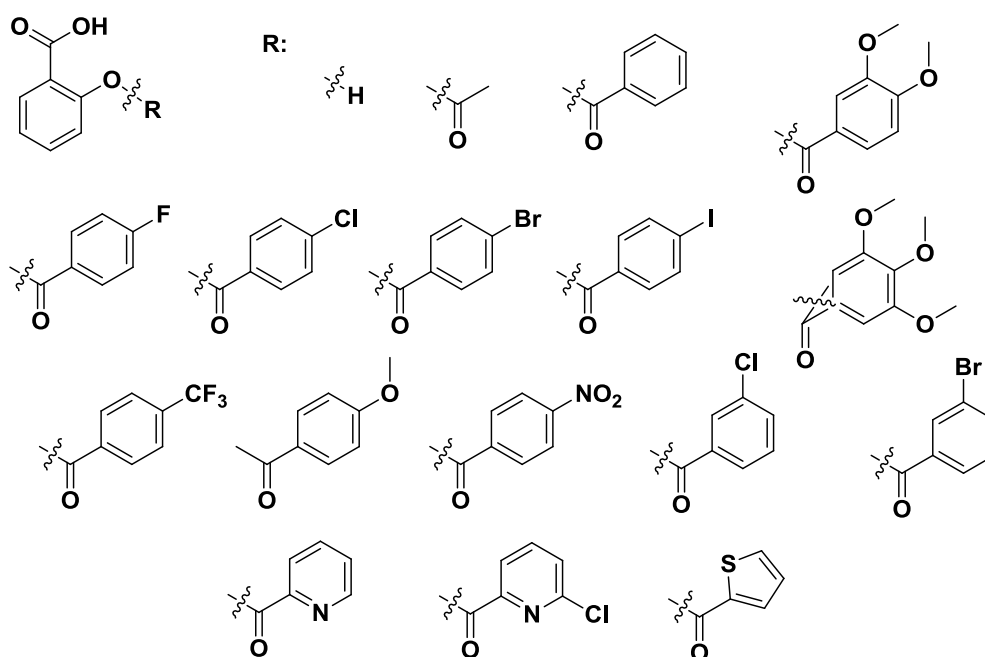
Substytucja w Pozycji 3, 5 i 6			
Kwas 3,5-dichloro-6-hydroksysalicylowy	-Cl, -Cl, -OH	1.41	
Kwas 3,5,6-trichlorosalicylowy	-Cl, -Cl, -Cl	0.25	

Związki badane podzielono na kilka grup, w zależności od umiejscowienia podstawnika w pierścieniu aromatycznym. W pierwszej grupie związków badano analogi kwasu salicylowego, różniące się podstawnikiem przy atomie węgla C2. Ustalono, że jedynymi analogami kwasu salicylowego o wysokiej skuteczności są kwas tiosalicylowy i acetylosalicylowy (aspiryna). Autorzy postanowili więc pozostać przy obecności grupy -OH w pozycji orto do grupy karboksylowej i skupić się na badaniu pochodnych, zawierających podstawniki przy atomach węgla C3, C4, C5 i C6 oraz zawierających więcej niż jeden podstawnik. Wśród związków z podstawnikiem w pozycji C3 bardzo dobrą skuteczność wykazały kwasy 3-chloro- i 3-fluorosalicylowy, znacznie przewyższające kwas salicylowy. Umiarkowaną aktywność wykazywały kwasy 3-amino- i 3-metoksylsalicylowy. Wprowadzenie innych podstawników, takich jak grupa formylowa, hydroksylowa, izopropylowa, metylowa, nitrowa czy fenylowa powodowały dezaktywację cząsteczki. Substytucja do węgla C4 powodowała generalny spadek właściwości indukujących SAR w otrzymanych związkach poniżej poziomu reprezentowanego przez SA, jednakże i tutaj najskuteczniejsze okazały się pochodne zawierające halogen, jak kwas 4-fluoro- i 4-chlorosalicylowy. Wprowadzenie innych grup funkcyjnych powodowało dezaktywację biologiczną substancji. Substytucja do atomu węgla C5 zaowocowała wysoką skutecznością, tak jak poprzednio związków z fluorem i chlorem

(odpowiednio skuteczność na poziomie 160% i 107% w stosunku do SA). Co ciekawe, inne halogeny, takie jak brom i jod, powodowały spadek aktywności cząsteczki lub jej kompletną dezaktywację. Substytucja w pozycję *orto*- do grupy karboksylowej i *meta*- do hydroksylowej spowodowała ponownie spadek ogólnej aktywności związków, gdzie najwydajniejszy okazał się kwas 6-hydroksysalicylowy (86% wydajności), a dopiero niżej uplasowały się pochodne zawierające inne grupy funkcyjne. Przyłączenie do pierścienia więcej niż jednej grupy funkcyjnej doprowadziło do otrzymania niezwykle skutecznych analogów kwasu salicylowego, w szczególności kwasów 3,5-difluoro- (383% skuteczności SA), 3,5-dichloro- (181%), 3-chloro-5-fluoro- (170%) oraz 3-fluoro-5-chlorosalicylowego (146%). Wprowadzenie innych grup funkcyjnych (np. nitrowych czy bromu), nawet w świetle tak obiecujących wyników dla związków podstawionych fluorem i chlorem, powodowało brak aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych. Ostatnia grupa badanych związków rozpatrywała pochodne podstawione 3 grupami dodatkowymi w pozycjach 3, 5 i 6. Jak się okazało, wysoką skutecznością wykazał się jedynie kwas 3,5-dichloro-6-hydroksysalicylowy (141%). Wprowadzenie trzeciego podstawnika chlorowego (kwas 3,5,6-trichlorosalicylowy) powodowało znaczny spadek aktywności biologicznej w stosunku do analogu 3,5-dichlorosalicylowego (ponad 10-krotny). Niestety, autorzy nie pokusili się o hipotezę tłumaczącą wykazane tendencje.

Inna metoda modyfikacji została zaproponowana w pracy S Kamathan *et al.*⁷⁸ Kwas salicylowy został tam przyłączony do zróżnicowanej grupy

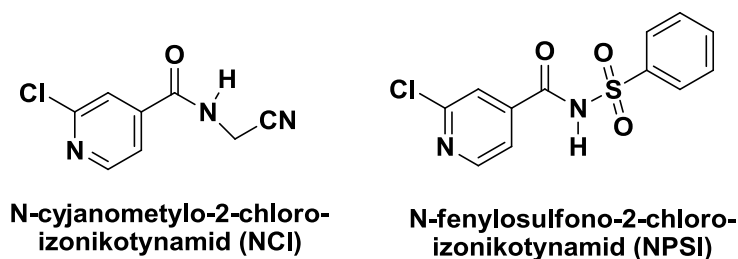
pochodnych kwasu benzoowego jako grupa estrowa (Rys. 13). Co ciekawe, wszystkie otrzymane związki charakteryzują się wyższą aktywnością w redukcji plam nekrotycznych na roślinach tytoniu w stosunku do samego kwasu salicylowego.



Rys. 13 Zestryfikowane pochodne kwasu salicylowego⁷⁸

Należy zwrócić uwagę na fakt, że testy prowadzone były w niestandardowy sposób, ponieważ inokulacja wirusa miała miejsce już 24 godziny po aplikacji induktorów. Weryfikacja ilości i wielkości plam nekrotycznych następowała po 72 godzinach od inokulacji. Standardowo, te odstępy czasowe wynoszą po 7 dni każdy. Z punktu widzenia innych doniesień naukowych, traktujących o testowaniu indukcji SAR na tytoniu porażonym TMV, 24 godziny to zbyt krótki okres czasu na wydajne uruchomienia mechanizmu SAR. Możliwe, że klimat prowadzenia badań (Indie) mógł mieć wpływ na zmianę parametrów przeprowadzania eksperymentów.

1.6.2. Pochodne kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego

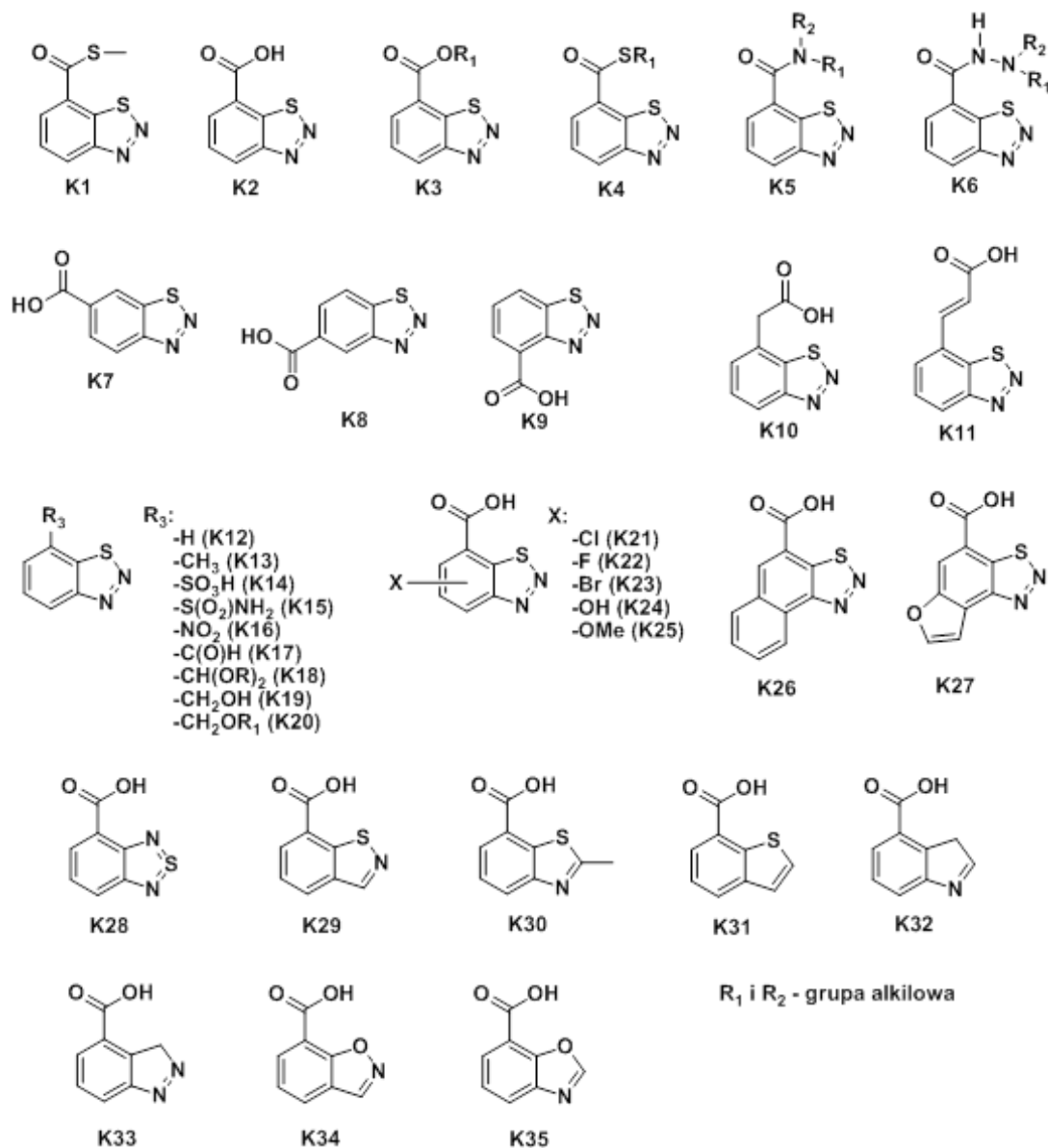


Rys. 14 Struktura pochodnych kwasu salicylowego – NCI oraz NPSI

Jednymi z pierwszych pochodnych INA o udowodnionym działaniu biologicznym były N-cyjanometylo-2-chloroizonikotynamid (NCI) oraz jego pochodna N-fenylosulfono-2-chloroizonikotynamid (NPSI). NCI wykazał jedną z najwyższych aktywności indukujących SAR w porównaniu do innych N-alkilo-2-chloroizonikotynoamidów.^{79,80,81} Nie wykazał działania przeciwgrzybiczego w stosunku do *Magnaporthe grisea* w testach *in vitro* przy stężeniach nawet 1100 μM (500 ppm). Jego aktywność jest długotrwała, chroniąc rośliny ryżu nawet do 30 dni po pojedynczym zastosowaniu. Te wyniki sugerują, że NCI skutecznie indukuje mechanizmy obronne u roślin. W tytoniu NCI może wywoływać SAR i pośredniczyć w ochronie przeciwko TMV, *Oidium lycopersici* i *P. syringae* pv. tabaci. Tutaj także indukuje ekspresję białek PR-1, PR-2 i PR-5, ale jest aktywny również w transgenicznym roślinach tytoniu typu *nahG*. To dowodzi, że nie wymaga obecności SA do aktywacji obrony.⁸² W *Arabidopsis* NCI redukuje wzrost *P. syringae* i indukuje odporność niezależnie od akumulacji SA, ET i JA, ale wymaga NPR-1. Tak więc, podobnie jak INA i BTH, NCI wydaje się oddziaływać ze ścieżką indukcji powiązaną z SA i NPR-1.^{83,84} Brakuje

doniesień na temat innych pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego testowanych pod kątem indukcji odporności.

1.6.3. Pochodne BTH



Rys. 15 Znane pochodne kwasu benzotiadiazolowego

Tioester metylowy benzo[1.2.3]tiadiazolu oraz kwas 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowy zostały wyłonione jako najbardziej efektywne oraz bezpieczne substancje w ramach badań screeningowych szerokiego spektrum substancji chemicznych, prowadzonych przez koncern

Ciba-Geigy (obecnie Syngenta).⁸⁵ Po opatentowaniu całej grupy związków zdecydowano się opublikować badania wskazujące metody syntezy oraz wpływ struktury chemicznej związków z grupy benzotiadiazoli na ich efektywność biologiczną.⁸⁶ Zaprezentowana grupa pochodnych (Oznaczona na potrzeby omawiania prezentowanych wyników jako K1 do K35) charakteryzuje się różnymi drogami modyfikacji cząsteczki (Rys. 15).

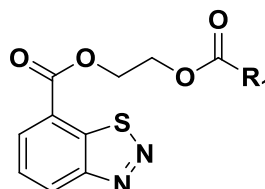
Pierwszą z nich było miejsce przyłączenia grupy karboksylowej do pierścienia (**K1, K7-K9**). Aktywnym biologicznie okazał się jedynie związek z grupą karboksylową, umieszczoną w pozycji C7 (**K1**). Aby utrzymać aktywność biologiczną grupa ta mogła być zamieniona na estrową (**K18, K20**), alkilohydroksylową (**K19**) i aldehydową (**K17**). Związki podstawione innymi grupami funkcyjnymi w tym miejscu okazały się nieaktywne. Następnie rozpatrzono wpływ drugiego podstawnika w pozycji C4, C5 lub C6. Jego wprowadzenie generalnie obniżało skuteczność biologiczną, jednakże związki podstawione fluorem (**K22**) odbiegały nieznacznie od najaktywniejszych substancji. Wprowadzenie chloru bądź bromu znacznie obniżało skuteczność induktorów, a związki podstawione grupami hydroksylowymi czy metoksyłowymi były kompletnie nieaktywne. Wprowadzenie pierścienia sprzężonego do pierścienia benzotiadiazolowego w pozycji C4-5 (związki **K26 i K27**) powodowało dezaktywację cząsteczki. Podobny efekt został uzyskany przy modyfikacjach układu heteroatomów w pierścieniu bicyklicznym (**K28-35**), z wyjątkiem pochodnej **K29** o umiarkowanej aktywności. Ostatecznie, modyfikacja grupy przyłączonej do grupy karboksylowej, która zaowocowała powstaniem estrów, tioestrów, amidów i hydrazyd pozwoliła utrzymać wysoką aktywność indukcji SAR.

Z tej grupy najmniej efektywne okazały się amidy. Co ważne, wpływ na działanie biologiczne miała również wielkość grup R_1 i R_2 w przyłączonych grupach – im dłuższy łańcuch, tym gorsza aktywność biologiczna.

Kolejną grupą pochodnych BTH została zaprezentowana w pracy Du *et al.* (Rys. 16).⁸⁷ Skupiono się tam na głównie na właściwościach biologicznych halogenowanych estrów kwasu 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowego w badaniach przesiewowych przeciwko *Erysiphe cichoracearum* i *Colletotrichum lagenarium* na ogórku. Wyniki testów terenowych wykazały, że dwa z testowanych estrów fluorowanych (**D3**, **D4**) były silniejsze niż BTH w stosunku do tych patogenów. Wyniki drugiej grupy związków charakteryzują się niestety dużym zróżnicowaniem skuteczności biologicznej, w której ciężko doszukać się prawidłowości.



R:
 -OCH₃ (**D1**) - 100%
 -SCH₃ (**D2**) - 100%
 -OCH₂CF₃ (**D3**) - 100%
 -OCH₂CF₂CF₃ (**D4**) - 99%



R:
 -C₆H₅ (**D5**) - 97%
 -C₆F₅ (**D6**) - 30%
 -2-ClC₆H₄ (**D7**) - 32%
 -2-OHC₆H₄ (**D8**) - 89%
 -2-FC₆H₄ (**D9**) - 14%
 -2-BrC₆H₄ (**D10**) - 72%
 -2-IC₆H₄ (**D11**) - 38%
 -4-FC₆H₄ (**D12**) - 62%
 -4-ClC₆H₄ (**D13**) - 42%
 -4-(NO₂)C₆H₄ (**D14**) - 43%
 -2-CH₃OC₆H₄ (**D15**) - 65%
 -2,4-Cl₂C₆H₃OCH₂ (**D16**) - 92%

Rys. 16 Efektywność indukcji SAR [%] nowych estrów na bazie BTH.⁸⁷

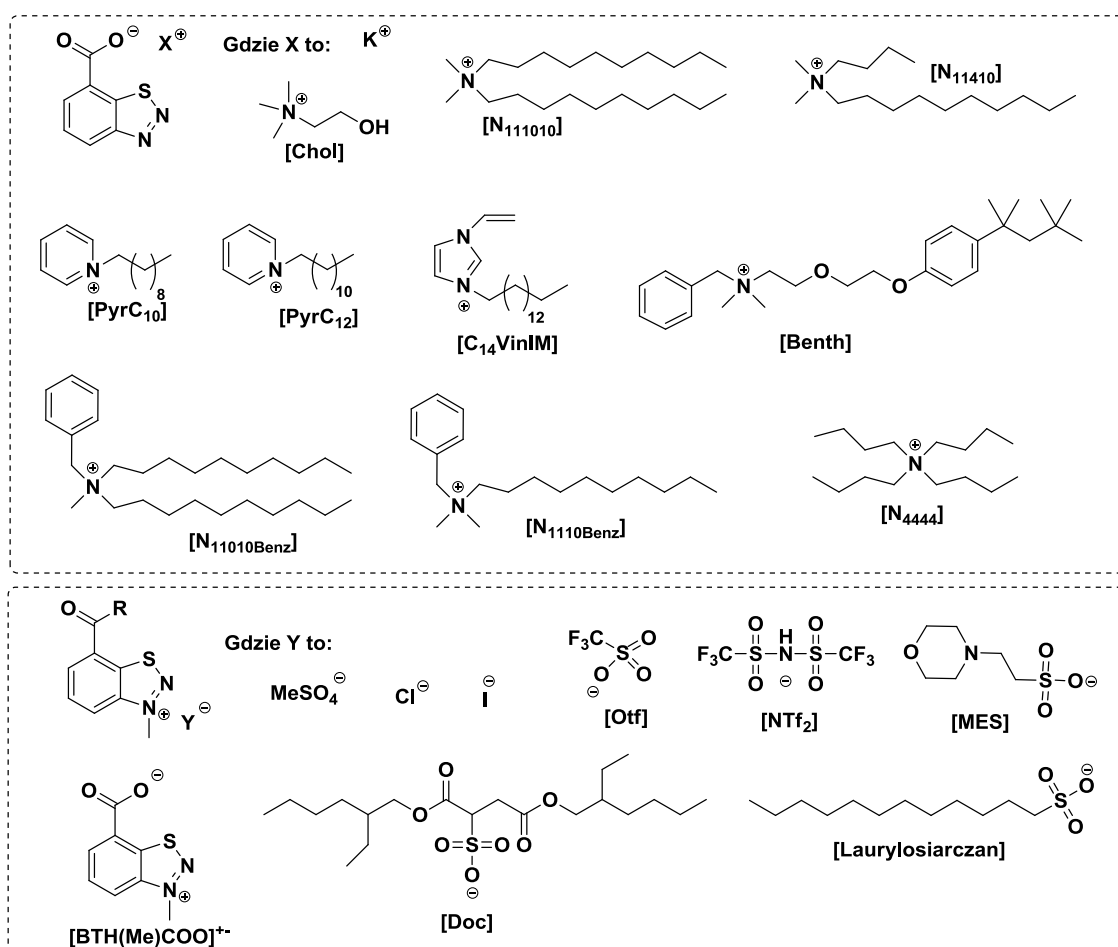
1.6.4. Jonowe induktory odporności roślin na bazie BTH

Badania nad induktorami odporności u roślin, prowadzone w grupie badawczej, której jestem członkiem, rozpoczęły się w 2013 roku. Ich celem była modyfikacja BTH do formy anionowej bądź kationowej oraz połączenia go w dwufunkcyjną sól. Prowadzone badania zaowocowały stworzeniem pierwszych znanych jonowych induktorów odporności roślin, wykazujących oczekiwaną aktywność biologiczną.^{88,89} Rozwinięcie tych badań opublikowano w ramach pracy magisterskiej mojego autorstwa (pochodne anionowe BTH)⁹⁰ oraz autorstwa mgr Rafała Kukawki (pochodne kationowe).⁹¹ Wyniki tych prac poszerzone o wyniki badań biologicznych na innych roślinach i patogenach były również podstawą do wniesienia czterech zgłoszeń patentowych do Polskiego Urzędu Patentowego prowadząc do uzyskania ochrony patentowej w każdej ze spraw.^{92,93,94,95}

Wyniki badań wykazały, że bardziej aktywną formą BTH był jego anion (w postaci zdeprotowanego kwasu karboksylowego), aniżeli pochodne kationowe ze zalkilowanym atomem azotu w pierścieniu tiadiazolowym. Właściwości przeciwjonu dołączonego do BTH można było zakwalifikować do dwóch kategorii – aktywnych biologicznie jonów antybakteryjnych (np. anion dokuzynianowy lub kation dimetylobutylodecyloamoniowy) oraz jonów nie wprowadzających nowej funkcji biologicznej, ale modyfikujących rozpuszczalność w wodzie (kation NTf_2 oraz anion potasowy i choliniowy). Wyniki badań dla wybranych soli wykazały dwufunkcyjność otrzymanych pochodnych oraz znaczny wzrost ich rozpuszczalności w wodzie, do około 10000 mg/L dla $[\text{Chol}][\text{BTHCOO}]$ (neutralny ASM wykazywał rozpuszczalność na poziomie 7 mg/L,

co powodowało problemy z dawkowaniem w uprawach polowych). Co więcej, pochodna anionowa [N₁₁₄₁₀][BTHCOO] oraz dwie pochodne kationowe [BTHMe][NTF₂] i [BTHMe][DOC] wykazywały temperaturę przemiany fazowej poniżej 100°C, co uczyniło je pierwszymi znanymi cieczami jonowymi o charakterze induktorów odporności u roślin.

W ramach tych prac zsyntezowano szereg soli (Rys. 17) oraz określono ich podstawowe parametry fizyczne, takie jak temperatura topnienia i stabilność termiczna. Wspólne badania doprowadziły też do syntezy i zbadania zwitterjonu – zalkilowanego 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolanu.



Rys. 17 Sole kationowej i anionowej pochodnej BTH

Rozwinięcie badań biologicznych nad związkami opracowanymi w tym czasie są jednym z elementów niniejszej rozprawy doktorskiej oraz zostały opublikowane w formie dwóch artykułów naukowych.^{96,97}

1.7. Wpływ podstawników halogenowych na aktywność związków aromatycznych

Jedną z najpopularniejszych metod modyfikacji związków biologicznie polega na wprowadzeniu do ich struktury atomu halogenku, w szczególności chloru. Wyjaśnienie tej tendencji, świetnie opisano w pracy przeglądowej autorstwa K. Neumanna.⁹⁸ Zwraca on uwagę na fakt, że wprowadzenie atomu chloru powoduje wzrost lipofilowości związku, a przez wysoką elektroujemność chloru – wysokie spolaryzowanie wiązania węgiel-chlor oraz możliwość występowania miejscowych elektrostatycznych oddziaływań z aminokwasami, znajdującymi się w białkach. Ponadto, wolne pary elektronowe, znajdujące się na atomie chloru, umożliwiają tworzenie wiązań wodorowych, stabilizujących oddziaływania z makromolekułami oraz możliwość stabilizowania oddziaływań mających udział w tworzeniu związków koordynacyjnych. Wszystkie te cechy biorą udział w często występującym podwyższeniu aktywności biologicznej związków zawierających w swojej strukturze atom chloru, w szczególności jeżeli ich działanie przebiega poprzez oddziaływanie z centrami aktywnymi białek.

Ekstrapolacja tych właściwości na pozostałe halogenki może sugerować, że wprowadzenie atomu fluoru może jeszcze bardziej zwiększyć aktywność biologiczną takich związków ze względu na silniejszą elektroujemność oraz mniejszy rozmiar, który powoduje jeszcze wyższą lipofilowość uzyskanej

struktury, silniejszą polaryzację wiązania z węglem oraz wyższe powinowactwo do tworzenia wiązań wodorowych. Wprowadzenie natomiast większych halogenków, czyli bromu i jodu skutkuje co prawda uzyskaniem właściwości o tym samym charakterze, jednakże są one coraz słabsze, a dodatkowo duża wielkość wprowadzonego podstawnika, który zaczyna stanowić zawadę steryczną, zaczyna dominować jako główny czynnik obniżający aktywność tak zmodyfikowanych pochodnych.

1.8. Cel rozprawy doktorskiej

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest określenie wpływu struktury chemicznej na aktywność biologiczną induktorów odporności u roślin, który jest przedstawiony w aspekcie wielowątkowym, jako badania:

- (i) soli opartych na kationowej oraz anionowej pochodnej znanego induktora odporności u roślin, 7-tiokarboksybenzo[1.2.3]tiadiazolanu metylu (BTH), z uwzględnieniem działania dwufunkcyjnego nie tylko jako induktorów odporności u roślin, ale również jako czynników antybakteryjnych,
- (ii) poziomu fitotoksyczności, cytotoksyczności i toksyczności w środowisku wodnym wybranych pochodnych BTH
- (iii) amidów opartych na kwasie 2,6-dichloroizonikotynowym w celu określenia wpływu podatności na hydrolizę na aktywność biologiczną induktorów oraz
- (iv) pochodnych strukturalnych induktorów odporności roślin w celu określenia wpływu modyfikacji „rdzenia” cząsteczki induktora, w szczególności obecności podstawników w pierścieniu aromatycznym na podatność cząsteczek do wzbudzenia indukcji u roślin.

Wyniki otrzymane w trakcie realizacji zadań badawczych może umożliwić w przyszłości świadome projektowanie nowych pochodnych induktorów odporności u roślin o wysokiej aktywności biologicznej.

2. Metodologia

2.1. Związki badane

Związki chemiczne badane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej i oznaczone numerami pomocniczymi (**numer**) zostały zakupione w:

SIGMA ALDRICH: **(1)** kwas izonikotynowy (CAS: 55-22-1, 99%), **(3)** kwas 2-chloroizonikotynowy (CAS: 6313-54-8, 97%), **(4)** kwas 2-hydroksyizonikotynowy (CAS: Brak, 97%), **(7)** kwas 2-chloro-3-hydroksyizonikotynowy (CAS: Brak, 97%), **(8)** 2,6-dichloropirydyna (CAS: 2402-78-0, 98%), **(10)** kwas DL-piperydino-3-karboksyłowy (CAS: 498-95-3, 98%), **(11)** kwas 2-chloronikotynowy (CAS: 2942-59-8, 99%), **(12)** kwas 2-hydroksynikotynowy (CAS: 609-71-2, 98%), **(13)** kwas 2,6-dichloronikotynowy (CAS: 38496-18-3, 97%), **(15)** kwas DL-pipekolowy (CAS: 535-75-1, 98%), **(17)** kwas 6-chloropikolinowy (CAS: 4684-94-0, 97%), **(18)** kwas 3-hydroksypikolinowy (CAS: 874-24-8, >99%), **(20)** kwas DL-3-aminomasłowy (CAS: 541-48-0, 97%), **(21)** kwas 4-aminomasłowy (CAS: 56-12-2, >99%), **(24)** sacharynian sodu jednowodny (CAS: 82385-42-0, >98%), **(25)** bezwodnik 2-sulfobenzoesowy (CAS: 81-08-3, 90%), **(26)** 3-sulfobenzoesan sodu (CAS: 17625-03-5, 97%), **(27)** 4-sulfobenzoesan potasu (CAS: 5399-63-3, 95%), **(32)** kwas 2-metoksybenzoesowy (CAS: 579-75-9, 99%), **(33)** kwas antranilowy (CAS: 118-92-3, 98%), **(34)** kwas acetylosalicyłowy (CAS: 50-78-2, >99%), **(38)** kwas ftalowy, (CAS: 88-99-3, >99,5%), **(39)** kwas 3-hydroksybenzoesowy (CAS: 99-06-9, 99%), **(40)** kwas 4-hydroksybenzoesowy (CAS: 99-96-7, 99%), **(41)** kwas 3-chlorobenzoesowy (CAS: 535-80-8, >99%), **(43)** kwas 2,6-dimetoksybenzoesowy (CAS: 1466-76-8, 98%), **(44)** kwas

2,3-dihydroksybenzoesowy (CAS: 303-38-8, 99%), **(45)** kwas
2,4-dihydroksybenzoesowy (CAS: 89-86-1, 97%), **(46)** kwas
2,5-dihydroksybenzoesowy (CAS: 490-79-9, 96%), **(49)** kwas
3,5-dichlorobenzoesowy (CAS: 51-36-5, 97%), **(50)** kwas
3,5-dimetoksybenzoesowy (CAS: 1132-21-4, 97%), **(51)** kwas
3,5-diaminobenzoesowy (CAS: 535-87-5, 98%), **(52)** kwas
3-chlorosalicylowy (CAS: 1829-32-9, 98%), **(53)** kwas 4-chlorosalicylowy
(CAS: 5106-98-9, 93%), **(54)** kwas 5-chlorosalicylowy (CAS: 321-14-2,
98%), **(55)** kwas 6-chlorosalicylowy (CAS: 56961-31-0, 97%), **(56)** kwas
3,5-dichlorosalicylowy (CAS: 320-72-9, 97%), **(57)** kwas 4-fluorosalicylowy
(CAS: 345-29-9, 96%), **(58)** kwas 5-fluorosalicylowy (CAS: 345-16-4, 97%),
(59) kwas 4-bromosalicylowy, (CAS: 1666-28-0, 97%), **(60)** kwas
5-bromosalicylowy (CAS: 89-55-4, 90%), **(61)** kwas 3,5-dibromosalicylowy
(CAS: 3147-55-5, 97%), **(62)** kwas 4-jodosalicylowy (CAS: 16870-28-3,
97%), **(63)** kwas 5-jodosalicylowy (CAS: 119-30-2, 90%), **(64)** kwas
3,5-dijodosalicylowy (CAS: 133-91-5, 99%), **(69)** kwas 4-aminosalicylowy
(CAS: 65-49-6, 99%), **(70)** jasmonian metylu (CAS: 39924-52-2, 95%);

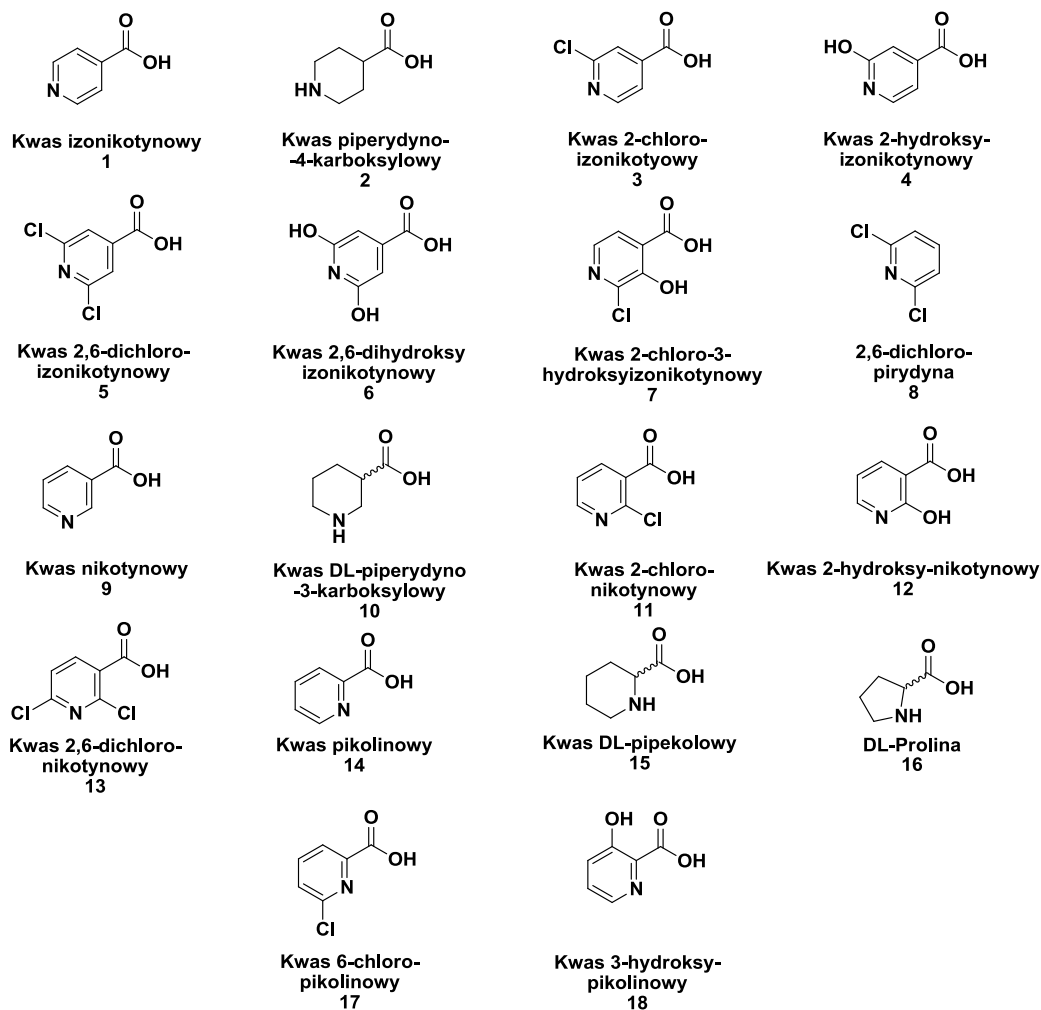
ABCR: **(2)** kwas piperidyno-4-karboksylowy (CAS: 498-94-2, 98%),
(5) kwas 2,6-dichloroizotonikotynowy (CAS: 5398-44-7, 97%), **(6)** kwas
2,6-dihydroksyizotonikotynowy (CAS: 99-11-6, 97%), **(9)** kwas nikotynowy
(CAS: 59-67-6, 99%), **(14)** kwas pikolinowy (CAS: 98-98-6, 99%), **(15)** kwas
DL-pipekolowy (CAS: 4043-87-2, 99% - co ciekawe, ten sam związek
sprzedawany przez firmę SIGMA ALDRICH jest oznaczony innym numerem
CAS), **(19)** kwas DL-2-aminomasłowy (CAS: 2835-81-6, 99%),
(22) β-Alanina (CAS: 107-95-9, 98%), **(23)** DL-Metionina (CAS: 59-51-8,

98%), **(29)** kwas cykloheksanokarboksylowy (CAS: 98-89-5, 97%), **(31)** kwas 2-chlorobenzoesowy (CAS: 118-91-2, 98%), **(35)** kwas 2-nitrobenzoesowy (CAS: 552-16-9, 98%), **(36)** kwas tiosalicylowy (CAS: 147-93-3, 98%), **(42)**, kwas 2,6-dichlorobenzoesowy (CAS: 50-30-6, 98%), **(47)** kwas 2,6-dihydroksybenzoesowy (CAS: 303-07-1, 98%), **(48)** kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy (CAS: 99-10-5, 98%);

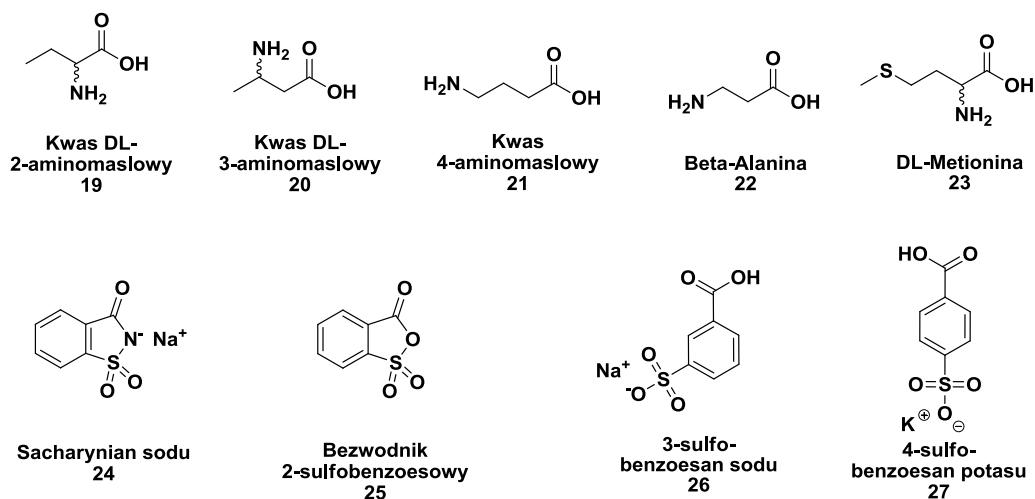
ROTH: **(16)** DL-Prolina (CAS: 609-36-9, >99%), **(28)** kwas benzoesowy (CAS: 65-85-0, >99,5%), **(30)** kwas salicylowy (CAS: 200-712-3, >99%).

Aktyn: **(68)** kwas 5-sulfosalicylowy dwuwodny, (CAS: 5965-83-3, cz.d.a.);

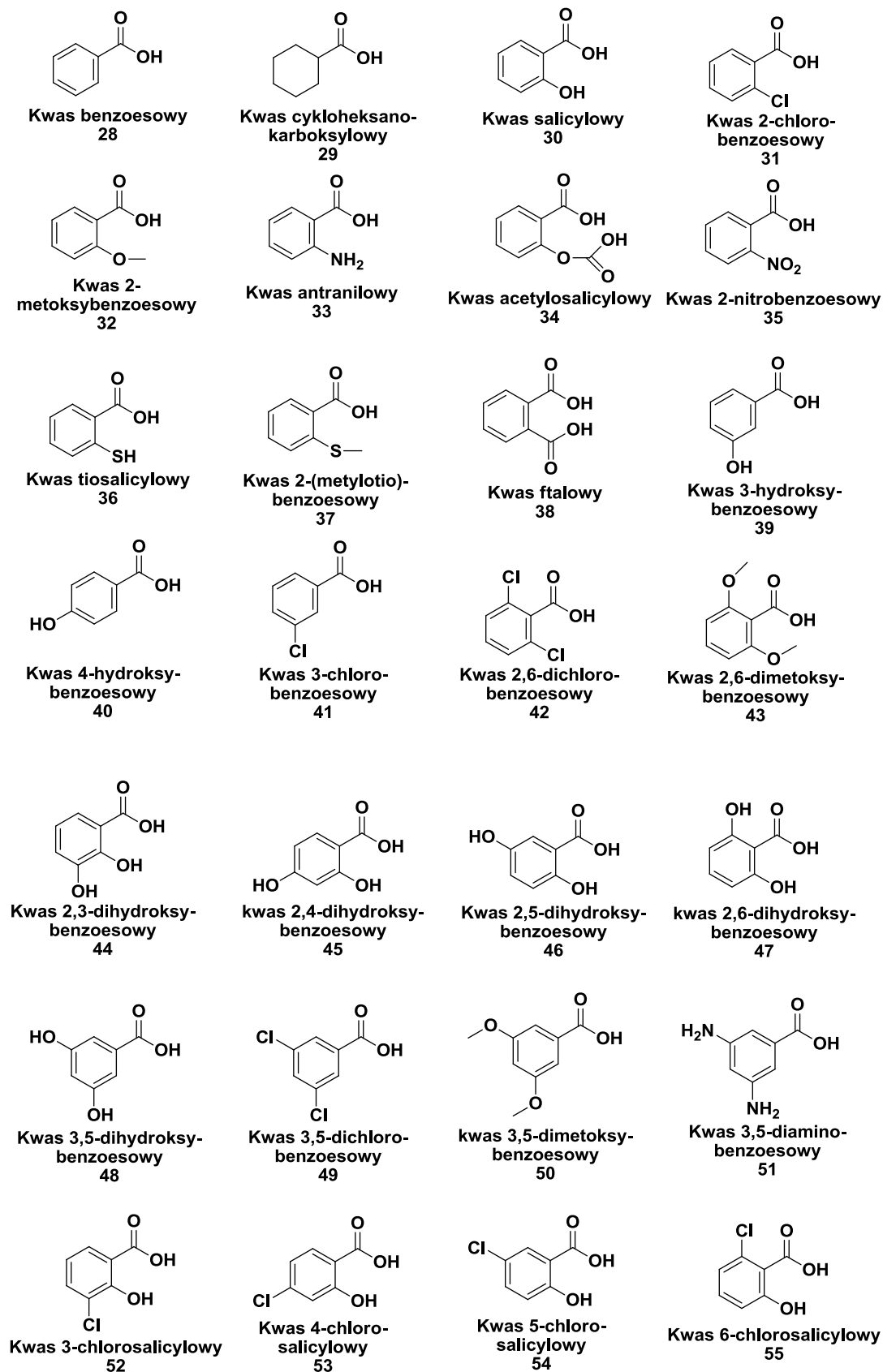
Związki: **(37)** kwas 2-(metylotio)benzoesowy, **(65)** kwas 3-nitrosalicylowy, **(66)** kwas 5-nitrosalicylowy, **(67)** kwas 3,5-dinitrosalicylowy zostały zsyntezowane znanymi metodami przez członków grupy badawczej, której jestem członkiem, w ramach innych projektów badawczych oraz zostały użyte na potrzeby badań biologicznych.



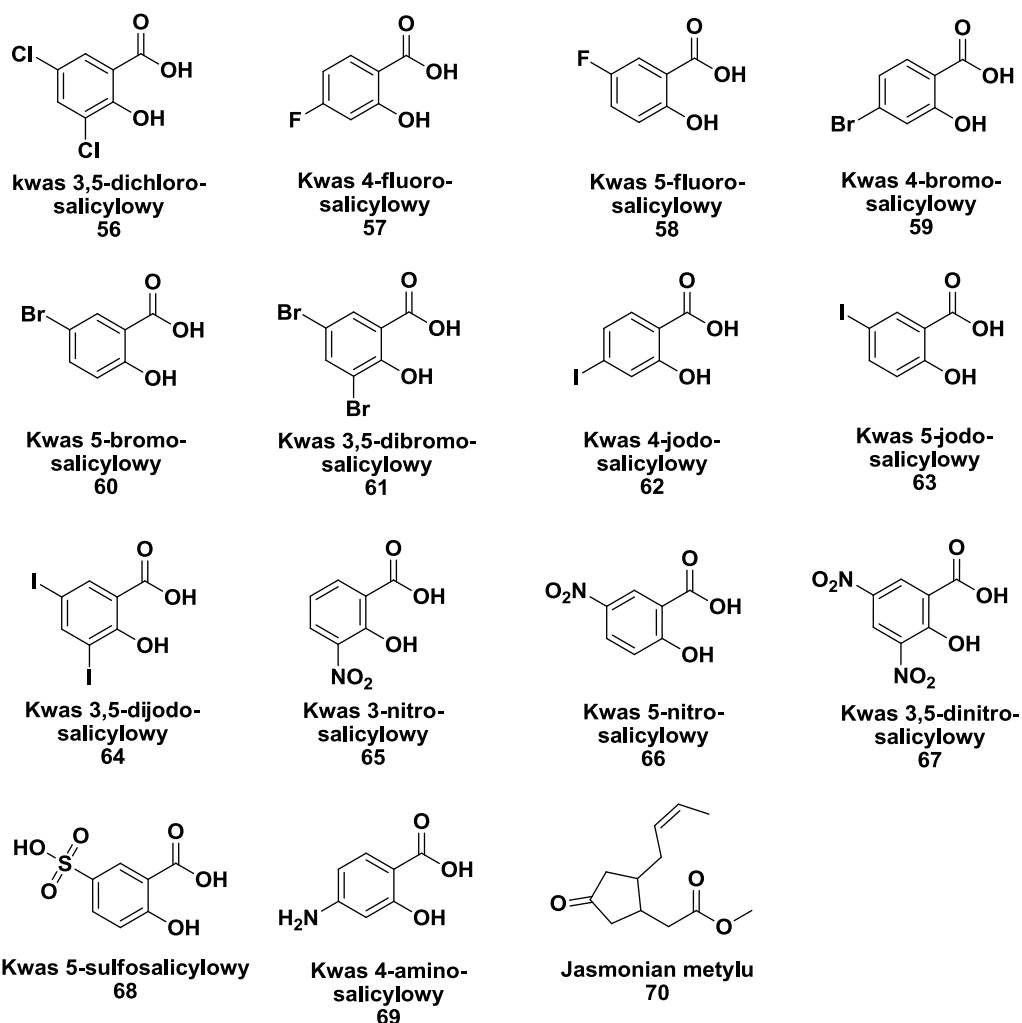
Rys. 18 Struktury badanych pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego



Rys. 19 Struktury badanych pochodnych kwasu 3-aminomasłowego (BABA) oraz sacharyny

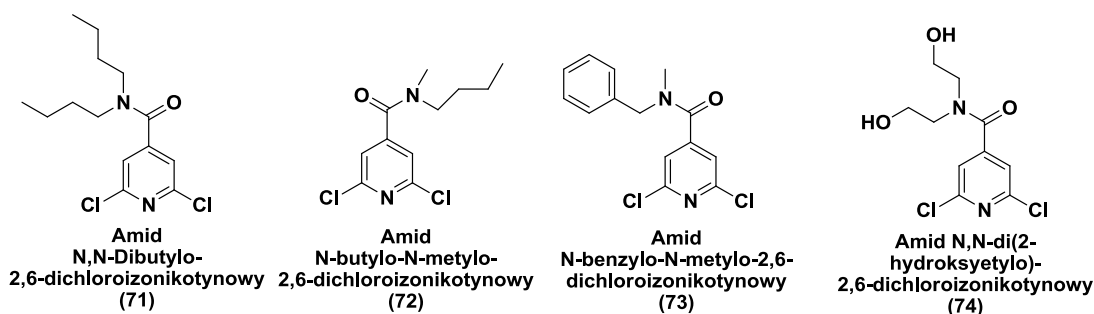


Rys. 20 Struktury badanych pochodnych kwasu salicylowego (28 - 55)



Rys. 21 Struktury badanych pochodnych kwasu salicylowego (56 - 69) oraz jasmonianu metylu (70)

Związki: amid *N,N*-Dibutylo-2,6-dichloroizonikotynowy (**71**), amid *N*-butylo-*N*-metylo-2,6-dichloroizonikotynowy (**72**), amid *N*-benzylo-*N*-metylo-2,6-dichloroizonikotynowy (**73**) i amid *N,N*-di(2-hydroksyetylo)-2,6-dichloroizonikotynowy (**74**) (Rys. 22) zostały zsyntezowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej według procedur opisanych poniżej.



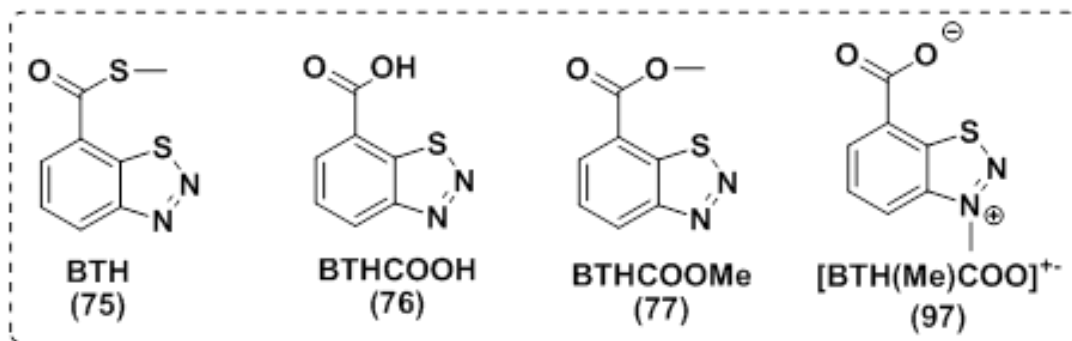
Rys. 22 Amidy oparte na bazie kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego (71-74)

Do syntez użyto rozpuszczalników dostępnych komercyjnie o czystości cz.d.a lub wyższej. Reagenty użyte w reakcji: N,N-dibutyloamina, N-butyllo-N-metyloamina, N-benzylo-N-metyloamina, N,N-di(2-hydroksyetylo)amina i chlorek tionylu zostały zakupione w firmie SIGMA ALDRICH.

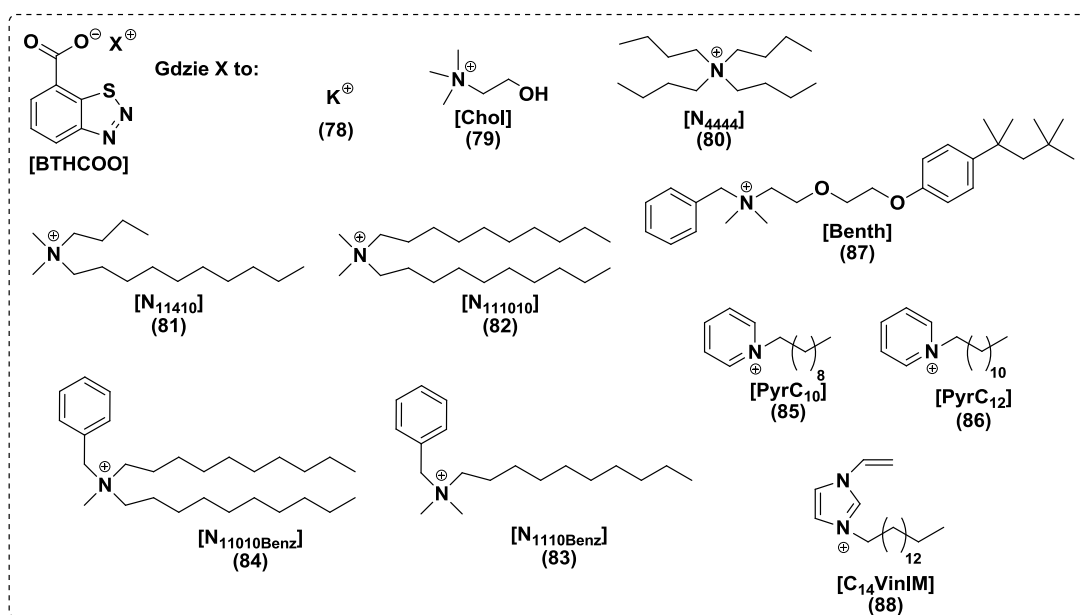
Związki będące pochodnymi BTH (Rys. 23, Rys. 24, Rys. 25) czyli 7-tiokarboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan metylu (BTH) **(75)**, Kwas 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowy (BTHCOOH) **(76)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan metylu (BTHCOOMe) **(77)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan potasu [K][BTHCOO] **(78)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan choliny [Chol][BTHCOO] **(79)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan tetrabutylloamoniowy [N₄₄₄₄][BTHCOO] **(80)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N-butyllo-N-decyloamoniowy [N₁₁₄₁₀][BTHCOO] **(81)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N,N-didecyloamoniowy [N₁₁₁₀₁₀][BTHCOO] **(82)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N-decylo-N-benzyloamoniowy [N_{1110Benz}][BTHCOO] **(83)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-metylo-N,N-didecylo-N-benzyloamoniowy [N_{11010Benz}][BTHCOO] **(84)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-decylopirydyniowy [PyrC₁₀][BTHCOO]

(85), 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-dodecylpirydyniowy
 [PyrC₁₂][BTHCOO] **(86)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan benzetoniowy
 [Benth][BTHCOO] **(87)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-tetradecylo-N-
 winyloimidazoliowy [C₁₄VinIM][BTHCOO] **(88)**, metylosiarczan
 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe]
 [MeSO₄] **(89)**, jodek 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-
 metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][I] **(90)**, trifluorometanosulfonian
 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe]
 [OTf] **(91)**, chlorek 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-
 metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][Cl]
(92), bis(trifluorometylo)sulfoimid 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-
 metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][NTf₂] **(93)**, dokuzynian
 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe]
 [Doc] **(94)**, 2-(N-morfolino)etanosulfonian 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-
 metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][MES] **(95)**, laurylosiarczan
 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][LS]
(96), zwitterjon 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolan
 [BTHCOO(Me)][±] **(97)**, metylosiarczan 7-karboksybenzo-N(3)-
 metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][MeSO₄] **(98)**, jodek
 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][I]
(99), 2-(N-morfolino)etanosulfonian 7-karboksybenzo-N(3)-
 metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][NTf₂] **(100)**, dokuzynian
 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][Doc]
(101) zostały po raz pierwszy zsyntezowane w ramach prac magisterskich
 mojego autorstwa oraz autorstwa mgr Rafała Kukawki i w ramach niniejszej

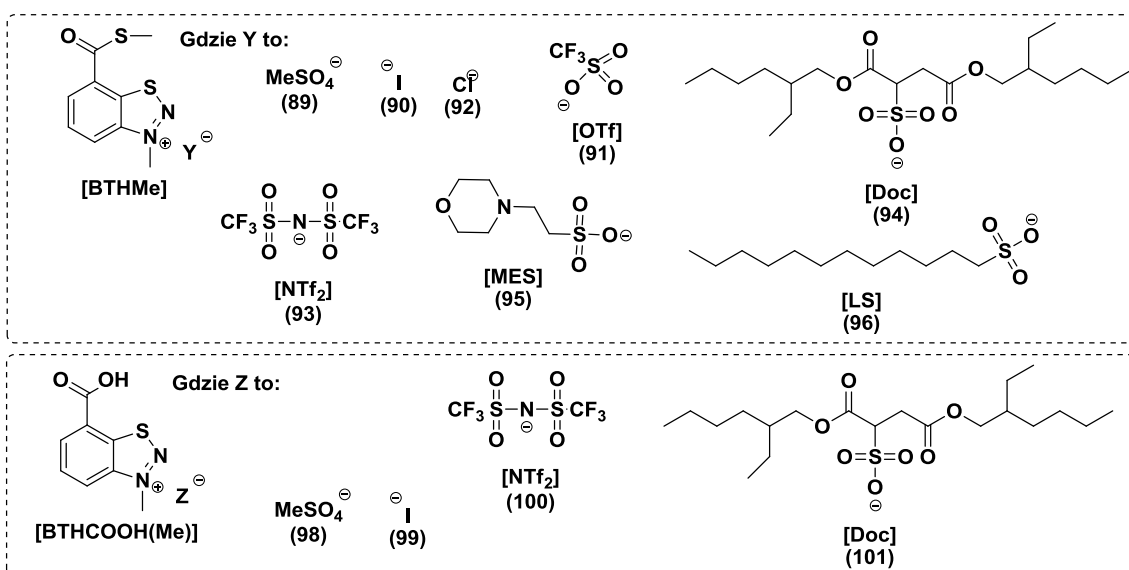
pracy doktorskiej zostały zsyntezowane ponownie używając metodyki opisanej oraz opublikowanej na łamach dwóch artykułów naukowych.^{96,97}



Rys. 23 Neutralne pochodne BTH oraz zwitterjon



Rys. 24 Anionowe pochodne BTH (78-88)



Rys. 25 Sole na bazie alkilowanych pochodnych BTH (89 - 101)

2.1.1. Część syntetyczna

2.1.1.1. Synteza chlorku kwasowego kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego

W próbówce ciśnieniowej, szklanej umieszczono 5,1 mmola kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego **(5)**, 68,9 mmola chlorku tionylu oraz mieszadełko magnetyczne. Probówkę szczelnie zakręcono i umieszczono w łaźni olejowej na mieszadle magnetycznym. Reakcję prowadzono przez 12 godzin w temperaturze 70°C. Po tym czasie probówkę ochłodzono do temperatury pokojowej i otwarto powoli pod wyciągiem. Zawartość przeniesiono do kolby jednoszyjnej oraz odgazowano, a następnie odparowano chlorek tionylu pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany osad wysuszono pod wysoką próżnią (0,01 milibara) przez 24 godziny. Otrzymano brązowy bezpostaciowy osad z wydajnością 99%, który bez oczyszczania użyto w kolejnych reakcjach.

2.1.1.2. Synteza amidów kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego (71-74)

W kolbie okrągłodennej z mieszadełkiem magnetycznym 4,4 mmola chlorku kwasowego kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego rozpuszczono w 20ml osuszonego chlorku metylenu. Następnie dodano do niego 4,4 mmola odpowiednio N,N-dibutyloaminy, N-butylo-N-metyloaminy, N-benzylo-N-metyloaminy lub N,N-di(2-hydroksyetanolo)aminy. Roztwór był następnie mieszany przez 72 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie rozpuszczalnik został odparowany pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość osuszona na wysokiej próżni (0,01 milibara) w temperaturze pokojowej przez 48 godzin). W przypadku wszystkich amidów otrzymano brązowy osad krystaliczny z wydajnością powyżej 97%. Czystość otrzymanych związków potwierdzono za pomocą analizy magnetycznego rezonansu jądrowego.

2.1.2. Dane NMR otrzymanych związków.

Analiza NMR została wykonana za pomocą spektrometru Bruker BioSpin (400MHz dla widm protonowych oraz 151 MHz dla widm węglowych) oraz Varian XL 300 NMR (300 MHz dla widm protonowych oraz 75 MHz dla widm węglowych). Jako rozpuszczalnika użyto deuterowanego DMSO (SIGMA ALDRICH) z tetrametylosilanem (TMS) jako standard wewnętrzny.

2.1.2.1. Amid N,N-Dibutylo-2,6-dichloroizonikotynowy (71)

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 25°C, TMS)); δ /ppm = 7.67 (2H, s, C₃, C₅), 2.93 (4H, dd, J = 51.9, 44.2 Hz, N-CH₂-), 1.56 (4H, dt, J = 15.4, 7.6 Hz, -CH₂-), 1.32 (4H, m, -CH₂-), 0.88 (6H, m, -CH₃);

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = \delta$ 164.60, 153.68, 149.65, 123.30, 46.83, 27.99, 19.78, 13.96.

2.1.2.2. Amid *N*-butylo-*N*-metylo-2,6-dichloroizonikotynowy (**72**)

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 25°C, TMS)); $\delta/\text{ppm} =$ 7.72 (2H, s, C₃, C₅), 2.86 (2H, dd, $J = 13.8, 6.4$ Hz, N-CH₂-), 2.51 (3H, s, N-CH₃), 1.55 (2H, m, -CH₂-), 1.32 (2H, ddd, $J = 32.4, 20.0, 12.7$ Hz, -CH₂-), 0.88 (3H, m, -CH₃);

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = \delta$ 164.69, 151.75, 149.87, 123.32, 48.32, 32.80, 27.89, 19.67, 13.95.

2.1.2.3. Amid *N*-benzylo-*N*-metylo-2,6-dichloroizonikotynowy (**73**)

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 25°C, TMS)); $\delta/\text{ppm} =$ 7.70 (2H, s, C₃, C₅), 7.51 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, C-H in benzyl), 7.49 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, C-H in benzyl), 7.41 (3H, m, C-H in benzyl), 4.13 (2H, s, N-CH₂-Benz), 2.56 (3H, s, N-CH₃);

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = \delta$ 164.69, 152.94, 149.73, 132.76, 130.24, 129.30, 129.15, 123.33, 51.66;

2.1.2.4. Amid *N,N*-di(2-hydroksyetylo)-2,6-dichloroizonikotynowy (**74**)

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 25°C, TMS)); $\delta/\text{ppm} =$ 7.67 (2H, s, C₃, C₅), 3.67 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, -N-CH₂-), 3.41 (2H, s (wide peak), -OH & H₂O), 3.03 (2H, t, $J = 8.1$ Hz, -CH₂-OH);

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) $\delta/\text{ppm} = \delta$ 164.90, 151.72, 149.52, 123.20, 57.99, 49.48.

2.2. Badanie Indukcji SAR

2.2.1. Badania w układzie modelowym – tytoń inokulowany wirusem mozaiki tytoniowej

Materiały użyte do badań biologicznych, takie jak inokulum wirusowe zawierające wirus mozaiki tytoniu (TMV) oraz rośliny tytoniu *Nicotiana Tabacum* var. Xanthi pochodzą z zasobów wewnętrznych Zakładu Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu (IOR-PIB). Badania biologiczne były również prowadzone w komorach szklarniowych, udostępnionych dzięki uprzejmości IOR-PIB. Komory szklarniowe są wyposażone w automatykę sterującą temperaturą (ogrzewanie/klimatyzacja), oświetleniem (blendy osłaniające przed nadmiernym oświetleniem i lampy przystosowane do doświetlania roślin) oraz wilgotnością powietrza, umożliwiając przeprowadzanie testów biologicznych w jednorodnych warunkach (Fot. 8).



Fot. 8 Komora szklarniowa w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu

Każda z roślin tytoniu odmiany *Nicotiana Tabacum* var. *Xanthi* w fazie wzrostu trzech rozwiniętych liści była opryskiwana 15 ml roztworu związku badanego. Roztwór ten był sporządzany poprzez rozpuszczenie substancji badanej w 10% roztworze metanolu (w celu podwyższenia rozpuszczalności w wodzie). Na każdy związek badany przeznaczano 3 rośliny. Rośliny kontrolne (3 rośliny) opryskiwane były 10% roztworem metanolu w wodzie. Po siedmiu dniach rośliny traktowane substancjami badanymi oraz kontrolę inokulowano wirusem w sposób mechaniczny. W tym celu na powierzchnię liści наносono minimalną ilość karborundu (opylanie za pomocą rozpylacza proszków DeVilbiss® DV-119), a następnie pocierano liście każdej z roślin ręką wcześniej zanurzoną w roztworze inokulum. Około 15 minut po zabiegu rośliny polewano wodą oraz osłaniano przed działaniem bezpośredniego światła przez okres 24 godzin. Po siedmiu dniach od inokulacji oceniano powierzchnię plam nekrotycznych, występujących na powierzchni liści i świadczących o stopniu infekcji wirusowej. Redukcja powierzchni plam nekrotycznych u roślin traktowanych badanymi substancjami w stosunku do kontroli świadczyła o stopniu indukcji odporności wywołanej badaną substancją. W celu dokumentacji prowadzonych badań oraz analizy otrzymanych wyników liście reprezentatywne dla danej próby fotografowano bądź skanowano w wysokiej rozdzielczości (suplement nr 1). Powierzchnia plam nekrotycznych była określana wizualnie w stosunku do kontroli. Ewentualną fitotoksyczność związków określano wizualnie na podstawie występowania przebarwień na powierzchni liści bądź nekroz.

W ramach tego eksperymentu przetestowano wszystkie z substancji prezentowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej (**1 – 101**). Testy prowadzono w okresie odpowiadającym najlepszym warunkom dla wegetacji roślin, to jest od kwietnia do końca września każdego roku.

2.2.2. Badania bezpośredniego wpływu badanych związków na patogen wirusowy

W celu określenia czy działanie substancji badanej polega na stymulowaniu mechanizmów immunologicznych rośliny, a nie bezpośrednio i kontaktowo niszczące materiał wirusowy przeprowadzono eksperyment, w którym związki badane rozpuszczono w wodzie z dodatkiem metanolu lub DMSO do stężenia 100 mg/L. Wirus TMV inkubowano w tak otrzymanym roztworze przez 30 minut, a następnie używano go do mechanicznego inokulowania roślin tytoniu *N. tabacum* var. *Xanthi*. W próbie kontrolnej liście tytoniu zainfekowano wirusem TMV, inkubowanym w wodzie destylowanej. 7 dni po zakażeniu określono stopień porażenia roślin przez chorobę wirusową na podstawie określenia ilości i powierzchni plam nekrotycznych na roślinach tytoniu. Występowanie nekroz świadczyło o braku bezpośredniego działania induktorów odporności u roślin na materiał wirusowy. W ten sposób przetestowano wszystkie ze związków będących przedmiotem rozprawy doktorskiej (**1-101**).

2.2.3. Testy indukcji odporności u roślin ze strefy tropikalnej

Testy aktywności indukcji SAR w warunkach szklarniowych prowadzono w tunelu foliowym (Fot. 9) należącym do CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador) wchodzącym w skład Uniwersytetu ESPOL

(Escuela Superior Politécnica del Litoral) znajdującym się w Guayaquil, w Ekwadorze. Warto nadmienić, że w Ekwadorze CIBE pełni rolę doradczą w sprawie identyfikacji chorób wirusowych roślin oraz metod ich zapobiegania oraz współpracuje z plantatorami i rolnikami w tym zakresie. Wszystkie z opisanych poniżej testów przeprowadzone zostały w trakcie mojego stażu zagranicznego w ramach projektu ETIUDA finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Opiekunem stażu był dr Diego Fernando Quito-Avila.



Fot. 9 Tunel foliowy w CIBE (Guayaquil, Ekwador)

Tunel foliowy podzielony był na komory (Fot. 10), w których prowadzono testy biologiczne. Każda z komór była niezależnie klimatyzowana, aby uzyskać jednorodne warunki prowadzenia eksperymentu oraz nie dopuścić do przegrzania roślin. Materiał wirusowy był pozyskiwany

z porażonych roślin należących do kolekcji własnej CIBE. Badane rośliny papai (Melonowiec właściwy (*Carica papaya L. var. Sunrise*)) pochodziły ze szkółki plantatorskiej firmy Green Garden znajdującej się w okolicy miejscowości Buena Fe (Ekwador), rośliny kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays var. Hercules*) były uprawiane na miejscu z certyfikowanego materiału nasiennego pochodzącego z Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Rośliny babako (*Carica pentagona*, inaczej *Vasconcellea xheilbornii*) pochodziły ze szkółki znajdującej się w górskiej części Ekwadoru, w miejscowości Paute. Wszystkie z wymienionych roślin były testowane przed rozpoczęciem testów pod kątem infekcji wirusowej i były wolne od chorób.



Fot. 10 Klimatyzowana komora znajdująca się w tunelu foliowym

W ramach tych testów zbadano aktywność biologiczną związków osiągających najwyższą skuteczność w trakcie badań prowadzonych w

Polsce, czyli: kwas 2-chloroizonikotyowy **(3)**, kwas 2,6-dichloroizonikotyowy **(5)**, kwas 2-chloro-3-hydroksyizonikotyowy **(7)**, kwas nikotyowy **(9)**, kwas 2-chloronikotyowy **(11)**, kwas 2,6-dichloronikotyowy **(13)**, kwas DL-2-aminomasłowy **(19)**, kwas DL-3-aminomasłowy **(20)**, β -Alanina **(22)**, kwas salicylowy **(30)**, kwas 3-chlorosalicylowy **(52)**, kwas 5-chlorosalicylowy **(54)**, kwas 3,5-dichlorosalicylowy **(56)**, kwas 5-fluorosalicylowy **(58)**, amid *N,N*-Dibutylo-2,6-dichloroizonikotyowy **(71)**, amid *N*-butylo-*N*-metylo-2,6-dichloroizonikotyowy **(72)**, amid *N*-benzylo-*N*-metylo-2,6-dichloroizonikotyowy **(73)**, amid *N,N*-di(2-hydroksyetylo)-2,6-dichloroizonikotyowy **(74)**, 7-tiokarboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan metylu (BTH) **(75)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan potasu [K][BTHCOO] **(78)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan choliny [Chol][BTHCOO] **(79)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan tetrabutylamoniowy [N₄₄₄₄][BTHCOO] **(80)**, 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan *N,N*-dimetylo-*N,N*-didecyloamoniowy [N₁₁₁₀₁₀][BTHCOO] **(82)** i dokuzynian 7-tiometylokarboksybenzo-*N*(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][Doc] **(94)**. Substancje były testowane w dawkach 250 i 500 mg/L, z wyjątkiem soli opartych o anionową bądź kationową pochodną BTH testowanych w stężeniach 20 i 50 mg/L **(75, 78, 79, 80, 82, 94)**.

Badania polowe na kukurydzy zostały przeprowadzone w ośrodku doświadczalnym, należącym do INIAP (Estación Experimental Portoviejo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) znajdującego się w okolicach miejscowości Portoviejo (Manabi, Ekwador). Certyfikowany materiał nasienny należał do zasobów INIAP.

2.2.4. Papaja porażona wirusem pierścieniowej plamistości papai (PRSV)

Rośliny papai (3 rośliny na 1 związek badany), mierzące około 30 cm wysokości, były opryskiwane 15 ml formulacji substancji badanej w postaci roztworu wodnego z dodatkiem 10% metanolu oraz 0,1% adjuwantu (Agral 90, Syngenta) lub podlewane 50 ml tej formulacji bez adjuwantu. Po siedmiu dniach rośliny traktowane substancjami badanymi oraz kontrolę inokulowano wirusem w sposób mechaniczny. W tym celu na powierzchnię liści наносzono minimalną ilość karborundu (opylanie za pomocą rozpylacza proszków DeVilbiss® DV-119), a następnie pocierano liście każdej z roślin ręką wcześniej zanurzoną w roztworze inokulum wirusowego. Inokulum przygotowywano poprzez roztarcie fragmentu liścia (około 5g) pochodzącego z już porażonej rośliny (na którym można było zaobserwować widoczne objawy choroby) w małej ilości (10ml) wodnego roztworu bufora fosforanowego (0,05M, pH = 7). Około 15 minut po zabiegu rośliny polewano wodą oraz osłaniano przed działaniem bezpośredniego światła przez okres 24 godzin. Po siedmiu dniach od inokulacji oceniano symptomy choroby wirusowej występujące na powierzchni liści i świadczące o stopniu infekcji wirusowej. W celu dokumentacji prowadzonych badań oraz analizy otrzymanych wyników liście reprezentatywne dla danej próby fotografowano.

2.2.5. Kukurydza porażona chorobą wirusową MLND (Maize Lethal Necrosis Disease)

2.2.5.1. Badania szklarniowe

Rośliny kukurydzy (3 rośliny na 1 związek badany), mierzące około 30 cm wysokości, były opryskiwane 15 ml formulacji substancji badanej w postaci roztworu wodnego z dodatkiem 10% metanolu oraz 0,1% adjuwantu (Agral 90, Syngenta) lub podlewane 50 ml tej formulacji bez adjuwantu. Po siedmiu dniach rośliny traktowane substancjami badanymi oraz kontrolę inokulowano wirusem w sposób mechaniczny. W tym celu na powierzchnię liści наносono minimalną ilość karborundu (opylanie za pomocą rozpylacza proszków DeVilbiss® DV-119), a następnie pocierano liście każdej z roślin ręką wcześniej zanurzoną w roztworze inokulum wirusowego. Inokulum przygotowano poprzez roztarcie fragmentu liścia (około 5g) pochodzącego z już porażonej rośliny (na którym można było zaobserwować widoczne objawy choroby) w małej ilości (10ml) wodnego roztworu bufora fosforanowego (0,05M, pH = 7). Około 15 minut po zabiegu rośliny polewano wodą oraz osłaniano przed działaniem bezpośredniego światła przez okres 24 godzin. Po siedmiu dniach od inokulacji oceniano symptomy choroby wirusowej, występujące na powierzchni liści i świadczące o stopniu infekcji wirusowej. W celu dokumentacji prowadzonych badań oraz analizy otrzymanych wyników liście reprezentatywne dla danej próby fotografowano.

2.2.5.2. Badania polowe

Rośliny kukurydzy były uprawiane na poletkach o wymiarach 3 x 5 metrów w rzędach (Fot. 11), utrzymując stałe odległości pomiędzy roślinami (Fot. 12). W momencie osiągnięcia przez rośliny wzrostu na poziomie 75 cm wysokości przeprowadzano oprysk formułkami substancji badanych, identycznymi jak przy testach szklarniowych. Zabieg powtarzano co 2 tygodnie przez okres 8 tygodni. W tym czasie oraz przez okres miesiąca po zakończeniu aplikacji związków obserwowano występowanie choroby MNLD na roślinach. Nie inokulowano roślin mechanicznie, a jedynie pozwalano działać insektom i naturalnej presji środowiska. Na poletkach na których testowano pochodne induktorów odporności nie stosowano insektycydów. Kontrolą była próba traktowana wyłącznie insektycydami, czyli standardowym zabiegiem agrotechnicznym stosowanym w Ekwadorze w celu zapobiegania występowaniu chorób wirusowych.



Fot. 11 Przygotowanie do badań polowych na kukurydzy



Fot. 12 Widok na poletka testowe do badania indukcji SAR na kukurydzy przeciwko chorobie MLND

2.2.6. Babako porażone kompleksem wirusowym potexvirus i PRSV

Rośliny babako (3 rośliny na 1 związek badany), mierzące około 30 cm wysokości i pochodzące z rozmnażania z różnych pędów, w tym wierzchołkowych, były opryskiwane 15 ml formułacji substancji badanej w postaci roztworu wodnego z dodatkiem 10% metanolu oraz 0,1% adjuwantu (Agral 90, Syngenta) lub podlewane 50 ml tej formułacji bez adjuwantu. Po siedmiu dniach rośliny traktowane substancjami badanymi oraz kontrolę inokulowano wirusem w sposób mechaniczny. W tym celu na powierzchnię liści наносono minimalną ilość karborundu (opylanie za pomocą rozpylacza proszków DeVilbiss® DV-119), a następnie pocierano liście każdej z roślin ręką wcześniej zanurzoną w roztworze

inokulum wirusowego. Inokulum przygotowywano poprzez roztarcie fragmentu liścia (około 5g) pochodzącego z już porażonej rośliny (na którym można było zaobserwować widoczne objawy choroby) w małej ilości (10ml) wodnego roztworu bufora fosforanowego (0,05M, pH = 7). Około 15 minut po zabiegu rośliny polewano wodą oraz osłaniano przed działaniem bezpośredniego światła przez okres 24 godzin. Po siedmiu dniach od inokulacji oceniano symptomy choroby wirusowej, występujące na powierzchni liści i świadczące o stopniu infekcji wirusowej. W celu dokumentacji prowadzonych badań oraz analizy otrzymanych wyników liście reprezentatywne dla danej próby fotografowano bądź skanowano w wysokiej rozdzielczości. Powierzchnia plam nekrotycznych była określana wizualnie w stosunku do kontroli.

2.3. Badanie działania antybakteryjnego

Testy przeprowadzono na mikroorganizmach referencyjnych ze szczepów: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* 23373, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 49134, *Pantoea ananatis* 33244, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus vulgaris* NCTC 4635 i *Serratia marcescens* ATCC 8100 dostarczonych przez Leibniz Institute (DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures); *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pectobacterium carotovorum* ATCC 15713 i *Pseudomonas syringae* ATCC 19508, zakupionych z American Type Culture Collection (ATCC); *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) i *Pseudomonas fluorescens* (Pfl), pochodzących z kolekcji własnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową określono metodą mikrorozcieńczeniową według standardu dla bakterii tlenowych (dokument CLSI M07-A9). Szczepy bakterii hodowano na bulionie Muellera-Hintona przez 24 godziny. Z każdej hodowli bakteryjnej przygotowano zawiesinę bakterii o stężeniu 10^6 cfu/cm³. Następnie każde z testowanych rozcieńczeń badanych soli inokulowano za pomocą zawiesiny bakterii w stosunku 1:1. Wzrost (lub jego brak) ilości mikroorganizmów określono wizualnie po inkubacji przez 24 godziny w temperaturze 37 °C dla *S. aureus* i *E. coli*, oraz w 27 °C dla pozostałych szczepów. Najniższe stężenie badanych substancji, przy których nie zaobserwowano widocznego wzrostu (zmętnienie), przyjęto jako MIC (minimalne stężenie hamujące). Następnie, próbkę pobraną z każdej probówki w pętli próbki hodowano w pożywce agarowej z inaktywacją (0,3% lecytyny, 3% polisorbata 80 i 0,1% L-cysteiny) i inkubowano przez 48 godzin w wyżej wymienionych temperaturach. Sole były testowane pod kątem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej i porównywane z referencją (Benzalkonium Chloride (BAC)). Sprawdzono wszystkie środki przeciwdrobnoustrojowe w serii dwukrotnych rozcieńczeń od 1000 do 1 mg/L.

W ramach badań aktywności antybakteryjnej przebadano wszystkie neutralne pochodne BTH (**75 - 77**) oraz pochodne oparte na anionowych i kationowych pochodnych BTH (**78 - 101**).

2.4. Badania ekotoksykologiczne

Ocena toksykologiczna związków o charakterze induktorów odporności u roślin składała się z testów opisanych poniżej. Badania zostały

przeprowadzone na następujących związkach: BTH **(75)**, [K][BTHCOO] **(78)**, [Chol][BTHCOO] **(79)**, [N₄₄₄₄][BTHCOO] **(80)**, [N₁₁₄₁₀][BTHCOO] **(81)**, [N_{11010Benz}][BTHCOO] **(84)**, [PyrC₁₀][BTHCOO] **(85)**, [PyrC₁₂][BTHCOO] **(86)**, [BTHMe][MeSO₄] **(89)**, [BTHMe][Cl] **(92)** i [BTHMe][LS] **(96)**.

2.4.1. Badanie właściwości cytostatycznych na komórkach IPC-81

Test cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z metodologią znaną w literaturze.⁹⁹ Żywotność komórek mierzono za pomocą testu kolorymetrycznego dla 96-studzienkowych płytek z odczynnikiem WST-1. Każda płytka zawierała ślepą próbę (bez komórek), kontrole (bez substancji toksycznych) i substancję w serii rozcieńczeń w której każda kolejne stężenie było dwukrotnym rozcieńczeniem poprzedniego. W celu przeprowadzenia testu komórki IPC-81 inkubowano przez 44 godziny na 96-studzienkowych płytkach w obecności substancji badanej i przez dodatkowe 4 godziny w obecności odczynnika WST-1. Żywotność komórek, mierzona jako zdolność do reakcji z odczynnikiem WST-1, obserwowano fotometrycznie w czytniku mikropłytek (długość fali - 450 nm). Cytotoksyczność związków wyrażono jako procent żywotności komórek zmierzony jako zmniejszenie WST-1 w porównaniu do kontroli. Każdą krzywą dawka-reakcja rejestrowano dla co najmniej 9 równoległych serii rozcieńczeń na trzech różnych 96-studzienkowych płytkach. Kontrola dodatnia z karbendazymem była kontrolowana w regularnych odstępach czasu.

2.4.2. Badanie toksyczności w środowisku wodnym na *Daphnia magna*

Test toksyczności w środowisku wodnym na rozwielitce *Daphnia magna* przeprowadzono za pomocą dostępnej w handlu Daphtoxkit F (MicroBioTest Incorporation, Gent, Belgia), opracowanej zgodnie z wytycznymi OECD 202. Zastosowano zarodki w wieku poniżej 24 godzin, uzyskane z wylęgania efipii. Test przeprowadzono w temperaturze 20°C w ciemności. Pięć wstępnie karmionych rozwielitek umieszczono w 10 ml roztworu substancji badanych zawierających pożywkę mineralną. Toksyczność substancji określano na podstawie obserwacji żywotności i ruchliwości rozwielitek po 24 i 48 godzinach. Względna toksyczność próbek wyrażono jako odsetek nietkniętych organizmów w porównaniu do kontroli. Dla każdej próby badano 5 różnych stężeń cieczy jonowych w 5 powtórzeniach i 5 kontrolach. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono co najmniej dwa razy.

2.4.3. Badanie podatności na biodegradację

Wybrane sole zostały również poddane badaniu podatności na biodegradację. Ocenę przeprowadzono przy użyciu zmodyfikowanej wersji wytycznych OECD 301D. Inokulum uzyskano z osadów dennych domowej oczyszczalni ścieków w Delmenhorst (Niemcy), które zostały przefiltrowane i napowietrzone przed użyciem. Do przesączu dodano pożywkę mineralną (pH 7,2). W teście zastosowano liczbę bakterii wynoszącą 10^6 komórek na litr (określoną przez Paddle-Tester, Hach Europe, Düsseldorf). Przygotowano próbki zawierające 100 μM substancji badanej, a także próbki ślepej próby (zaszczepione podłoża bez substancji badanej) i kontrole pozytywne (kwas benzoowy), każda w trzech powtórzeniach, umieszczano w naczyniach OxiTop control. Test polegał na

miarze biochemicznego zapotrzebowania tlenu odpowiadającego podatności na biodegradację substancji badanej. Test prowadzony był przez 20 dób, więc wyznaczona podatność na hydrolizę odpowiada parametrowi BZT₂₀.

3. Wyniki badań biologicznych pochodnych induktorów odporności u roślin i ich omówienie

3.1. Jonowe pochodne 7-tiokarboksybenzo[1.2.3]tiadiazolanu metylu

3.1.1. Wyniki badań indukcji SAR

Poniższe wyniki zostały uzyskane w ramach moich badań pod kierownictwem Prof. dra hab. Henryka Pospieszego w ramach projektu Homing Plus oraz opublikowane w formie dwóch artykułów naukowych^{96,97}

Sole oparte na anionowej oraz kationowej pochodnej BTH zostały przebadane pod kątem ich aktywności w indukcji SAR. Wyniki badań są zaprezentowane poniżej (Tab. 2).

Tab. 2 Wyniki indukcji SAR dla jonowych pochodnych BTH

Numer	Nazwa związku	Stężenie [mg/L]	Poziom indukcji SAR [%]	Fito-toksyczność
75	7-tiokarboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan metylu (BTH)	20	95 ¹	-
76	Kwas 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowy (BTHCOOH)	20	90	-
77	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan metylu (BTHCOOMe)	20	95	-
78	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan potasu [K][BTHCOO]	20	85 ¹	-
79	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan choliny [Chol][BTHCOO]	20	90 ¹	-
80	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan tetrabutylamoniowy [N ₄₄₄₄][BTHCOO]	20	100 ¹	-
81	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N-butylo-N-decyloamoniowy [N ₁₁₄₁₀][BTHCOO]	20	95 ¹	-
82	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N,N-didecyloamoniowy [N ₁₁₁₀₁₀][BTHCOO]	20	100 ¹	-
83	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N-decylo-N-benzyloamoniowy [N _{1110Benz}][BTHCOO]	20	54	+
84	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-metylo-N,N-didecylo-N-benzyloamoniowy [N _{11010Benz}][BTHCOO]	20	85	-
85	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-decylopirydyniowy [PyrC ₁₀][BTHCOO]	20	75 ¹	+
86	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-dodecylopirydyniowy [PyrC ₁₂][BTHCOO]	20	80	+
87	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan benzetoniowy [Benth][BTHCOO]	20	75 ¹	+
88	7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N-tetradecylo-N-winyloimidazoliowy [C ₁₄ VinIM][BTHCOO]	20	75	+
89	Metylosiarczan 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][MeSO ₄]	20	0	++

90	Jodek 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][I]	20	0	++
91	Trifluorometanosulfonian 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][OTf]	20	0	++
92	Chlorek 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][Cl]	20	0	++
93	bis(trifluorometylosulfono)imid 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][NTf ₂]	20	55 ²	+
94	Dokuzynian 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][Doc]	20	75 ²	+
95	2-(N-morfolino)etanosulfonian 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][MES]	20	0	++
96	Laurylosiarczan 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHMe][LS]	20	0	++
97	Zwitterjon 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolan [BTHCOO(Me)] [±]	20	0 ²	++
98	Metylosiarczan 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][MeSO ₄]	20	0	++
99	Jodek 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][I]	20	0	++
100	2-(N-morfolino)etanosulfonian 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][NTf ₂]	20	0	++
101	Dokuzynian 7-karboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy [BTHCOOH(Me)][Doc]	20	0 ²	++

„-” oznacza brak oznak fitotoksyczności zaobserwowanych na badanych roślinach; „+” oznacza delikatną fitotoksyczność objawiającą się w postaci nieznacznych przebarwień i plam na powierzchni liści; „++” oznacza znaczną fitotoksyczność badanych substancji w postaci przebarwień na liściach, przepaleń na powierzchni blaszki liściowej oraz inhibicji wzrostu roślin. 1,2 – wyniki wcześniej opublikowane^{90,91}

Prezentowane wyniki jasno pokazują, że wyższą aktywność biologiczną pod kątem indukcji SAR wykazują anionowe pochodne BTH w formie karboksylanów niż alkilowane pochodne czwartorzędowe w postaci zarówno metylowanego tioestru, jak również kwasu karboksylowego.

Wynika z tego, że czwartorzędowanie atomu azotu w pierścieniu tiadiazolowym wpływa negatywnie na aktywność biologiczną do indukcji odporności. Spośród wszystkich kationowych pochodnych BTH jedynymi aktywnymi związkami były bis(trifluorometylosulfono)imid 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy **(93)** i dokuzynian 7-tiometylokarboksybenzo-N(3)-metylo[1.2.3]tiadiazolanowy **(94)**, wykazujące odpowiednio indukcję odporności na poziomie 55 i 75%, co jest wynikiem gorszym od neutralnego BTH **(75)** wykazującego poziom

indukcji odporności na poziomie 95%. Daje to jednak informację, że kation [BTHMe]⁺ jest w stanie indukować odporność u roślin, jednak nie tak dobrze jak wyjściowe substancje neutralne (niejonowe). Jeszcze gorsze wyniki uzyskano, badając pochodne oparte na alkielowanym kwasie BTH, czyli [BTHCOOH(Me)]⁺, z których żadna pochodna nie wykazała zdolności do indukcji SAR, pomimo faktu, że neutralny kwas 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowy (**76**) indukuje odporność u roślin na poziomie 90%. Tak niska aktywność tej grupy pochodnych wynika głównie z faktu, że alkiłowany pierścień kwasu tiadiazolowego wywołuje u roślin dość wysoką fitotoksyczność (pomimo, że związki stosowane są w bardzo niskim stężeniu na poziomie 20 mg/L), przez co roślina najprawdopodobniej nie ma już zasobów energetycznych na indukcję odporności systemicznej.

Zdecydowanie wyższą aktywność biologiczną wykazują sole z anionową pochodną BTH, w formie karboksylanu. Co prawda pochodna potasowa (**78**) wykazuje delikatnie niższą aktywność (85%) niż wyjściowy kwas karboksylowy (90%), jednak kolejne badane sole, takie jak 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan choliny (**79**), zrównują się z nim aktywnością, a 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N-butylo-N-decyloamoniowy (**81**), 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan tetrabutylamoniowy (**80**) i 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N,N-didecyloamoniowy (**82**) ją przewyższają, wykazując odpowiednio 95% i 100% aktywności. Tym samym, dwie ostatnie pochodne są najskuteczniejszymi znanymi induktorami odporności u roślin. Analizując aktywności kolejnych pochodnych można zauważyć, że w solach,

do których wprowadzono kation zawierający strukturę pierścienia aromatycznego, obserwuje się delikatny spadek aktywności biologicznej. Najmniej aktywną solą spośród tej grupy testowanych pochodnych (na poziomie 54%) okazał się 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolan N,N-dimetylo-N-decylo-N-benzyloamoniowy **(83)**, który był również fitotoksyczny dla roślin. W tej grupie roślin badanych również aspekt fitotoksyczności redukował poziom indukcji odporności u roślin wywoływany przez badane substancje, ponieważ wszystkie z testowanych substancji, wykazujących aktywność równą bądź niższą od 75%, wykazywały również działanie fitotoksyczne.

3.1.2. Bezpośrednie działanie związków badanych na materiał wirusowy

Żadna z testowanych substancji nie wykazywała bezpośredniej aktywności przeciwko wirusom. Udowadnia to fakt, że mechanizm umożliwiający powstrzymanie choroby wirusowej przebiega z wykorzystaniem mechanizmów odpornościowych rośliny.

3.1.3. Testy ekspresji genów połączonych z indukcją odporności u roślin.

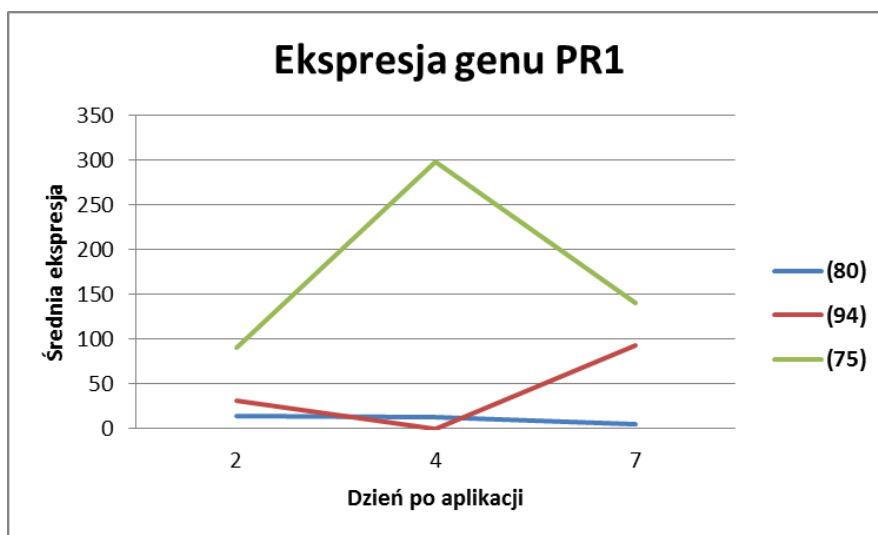
Poniższe wyniki zostały uzyskane przez zespół Prof. dr hab. Aleksandry Obrępańskiej-Stęplowskiej oraz dr Marty Budziszewskiej (IOR PIB) w ramach projektu Homing Plus oraz opublikowane w formie dwóch artykułów naukowych^{96,97}

Wyniki badań molekularnych dotyczących indukcji SAR pokazują ekspresję genu PR-1, odpowiedzialnego bezpośrednio za indukcję odporności u roślin

(Tab. 3, Rys. 26), oraz genu PAL związanego z akumulacją kwasu salicylowego (Tab. 4, Rys. 27).

Tab. 3 Wyniki badań ekspresji genu PR-1, wywołanej przez wybrane pochodne BTH

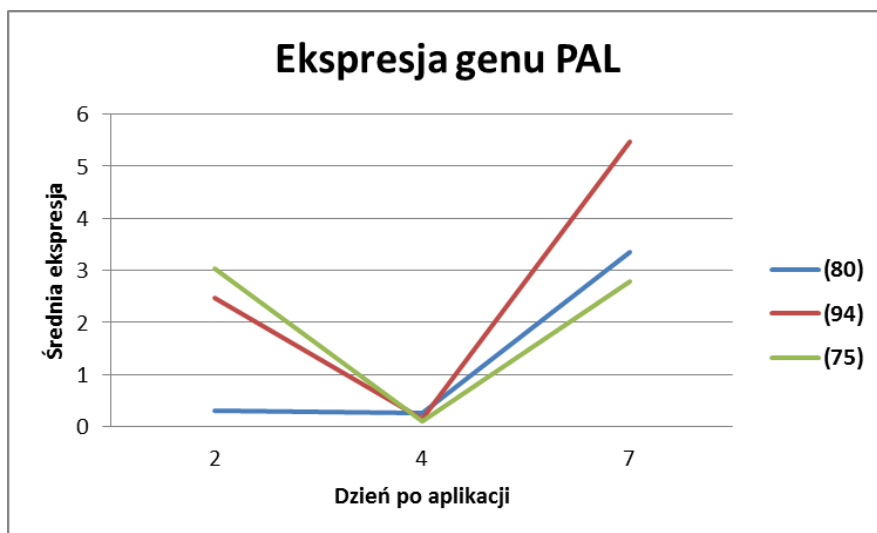
Dzień po aplikacji	2	4	7
Gen PR-1			
Średnia ekspresja wywołana [N ₄₄₄₄][BTHCOO] (80)	14,402	12,554	4,922
p-value	0,003	0	0,038
Średnia ekspresja wywołana [BTHMe][DOC] (94)	31,017	0,054	92,358
p-value	0,004	0,002	0,002
Średnia ekspresja wywołana przez BTH (75)	89,688	297,944	139,862
p-value	0	0	0



Rys. 26 Ekspresja genu PR-1, wywołana aktywnością wybranych pochodnych BTH

Tab. 4 Ekspresja genu PAL, wywołana aktywnością wybranych pochodnych BTH

Dzień po aplikacji	2	4	7
Gen PAL			
Średnia ekspresja wywołana [N ₄₄₄₄][BTHCOO] (80)	0,313	0,263	3,351
p-value	0,026	0,001	0,1
Średnia ekspresja wywołana [BTHMe][DOC] (94)	2,472	0,144	5,467
p-value	0,005	0,009	0,009
Średnia ekspresja wywołana przez BTH (75)	3,041	0,111	2,792
p-value	0,04	0,001	0,191



Rys. 27 Ekspresja genu PAL, wywołana aktywnością wybranych pochodnych BTH

W przypadku pierwszego z genów ekspresja jest najsilniej wzbudzona poprzez traktowanie roślin roztworem BTH i ma przebieg nieliniowy. Jej maksimum jest osiągnięte czwartego dnia po aplikacji, a następnie maleje. Niezwykle silne działania BTH jako induktora odporności u roślin wiązane jest głównie z tak wysoką ekspresją genów PR-1. W ramach badań zmierzono ekspresję tego genu w roślinach traktowanych solami zawierającymi zarówno anionową jak i kationową pochodną BTH, odpowiednio $[N_{4444}][BTHCOO]$ **(80)** i $[BTHMe][Doc]$ **(94)**. Wyniki otrzymane dla tych soli są co najmniej zaskakujące. Przede wszystkim krzywe poziomu ekspresji genów różnią się znacząco dla obu soli oraz w porównaniu do BTH. Dla pochodnej kationowej maksimum poziomu ekspresji występuje właściwie po 7 dniach od aplikacji, wcześniej będąc na bardzo niskim poziomie (praktycznie zerowym dnia czwartego). Może to być związane z wolniejszym wchłanianiem substancji aktywnej do wnętrza rośliny bądź koniecznością jej metabolizowania. W siódmym dniu poziom ekspresji dla pochodnej kationowej jest wysoki – bliski temu wywołanemu przez zastosowanie BTH. Pochodna anionowa natomiast

powoduje ekspresję genów PR-1 na niskim poziomie, jednak jednostajnym przez cały okres po aplikacji. W tym przypadku wydaje się, że sól posiadająca anionową pochodną BTH wywołała mniejszy stres dla rośliny, nie powodując gwałtownej ekspresji genów PR-1, przez co roślina miała większy zapas energii do przeciwdziałania chorobie wirusowej przy wystarczającym poziomie indukcji odporności.

Ekspresji genów PAL, związanych z kodowaniem enzymu prowadzącego do akumulacji kwasu salicylowego w roślinie, ma podobny przebieg dla wszystkich z badanych związków i jest na bardzo niskim poziomie. Bierze się to z faktu, że pochodne BTH indukują odporność u roślin, aktywując ekspresję genów PR-1, ale nie doprowadzają do akumulacji kwasu salicylowego w roślinie.

3.1.4. Badania antybakteryjne

Poniższe wyniki zostały uzyskane podczas moich badań w grupie dra Krzysztofa Krawczyka (IOR-PIB) w ramach projektu Homing Plus oraz opublikowane w formie dwóch artykułów naukowych^{96,97}

Pierwszymi związkami poddanymi testom aktywności antybakteryjnej były pochodne zawierające kationową pochodną BTH. W ramach testów ustalono, że wszystkie 12 z testowanych substancji wykazywało aktywność przeciwbakteryjną. Są to związki [BTHMe][MeSO₄] (**89**), [BTHMe][I] (**90**), [BTHMe][OTf] (**91**), [BTHMe][Cl] (**92**), [BTHMe][NTf₂] (**93**), [BTHMe][Doc] (**94**), [BTHMe][LS] (**96**), [BTHCOO(Me)]± (**97**), [BTHCOOH (Me)][MeSO₄] (**98**), [BTHCOOH(Me)][I] (**99**), [BTHCOOH(Me)][NTf₂] (**100**)

i [BTHCOOH(Me)][Doc] (**101**) (Tab. 5). Wyniki sugerują, że działanie antybakteryjne prezentowanych soli jest selektywne, a najskuteczniejszymi z nich są [BTHMe][MeSO₄] (**89**), [BTHMe][NTf₂] (**93**) i [BTHMe][Doc] (**94**). Sole [BTHMe][MeSO₄] (**89**) i [BTHMe][Doc] (**94**) były skuteczne przeciwko wszystkim badanym patogenom bakteryjnym (zarówno ludzkim jak i roślinnym), substancja [BTHMe][NTf₂] (**93**) była aktywna tylko przeciwko patogenowi roślinnemu *P. syringae* i wykazywała MIC przeciwko *S. aureus* i *P. carotovorum*, jednak nie zaobserwowano jej działania przeciwko bakteriom *E. coli*.

Tab. 5 Wartości MIC I MBC {mg/L} dla testowanych soli opartych na kationowej pochodnej BTH.

		89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
Ziarniaki:														
<i>S. aureus</i>	MIC	125	—	1000	1000	175	253	—	1013	673	—	—	—	997
	MBC	125	—	—	—	—	253	—	1013	673	—	—	—	997
Pałeczki:														
<i>E. coli</i>	MIC	667	—	—	—	—	675	—	—	—	—	—	—	—
	MBC	667	—	—	—	—	675	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. carotovorum</i>	MIC	500	—	—	—	175	253	—	—	—	—	—	—	—
	MBC	500	—	—	—	—	253	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. syringae</i>	MIC	125	1000	1000	1000	175	253	—	—	253	125	1000	80	997
	MBC	125	1000	1000	1000	175	253	—	—	253	125	1000	160	997

Symbol “—” oznacza, że najwyższe testowane stężenie soli (~1000 mg/l) nie wykazywało działania antybakteryjnego, przez co wyznaczenie parametru MIC I MBC nie było możliwe.

Z drugiej strony sole [BTHMe][OTf] (**91**), [BTHMe][Cl] (**92**), [BTHCOO(Me)] ± (**97**) i [BTHCOOH(Me)][Doc] (**101**) wykazywały selektywną aktywność tylko przeciwko ziarniakom (*S. aureus*) i pałeczkom (*P. syringae*). Sole [BTHMe][I] (**90**), [BTHCOOH(Me)][MeSO₄] (**98**), [BTHCOOH(Me)][I] (**99**) i [BTHCOOH(Me)][NTf₂] (**100**) wykazywały działanie selektywne tylko

przeciwko *P. syringae*, a substancja [BTHMe][LS] **(96)** była selektywna przeciwko *S. aureus*. Ze wszystkich testowanych soli jedynie [BTHMe][MES] **(95)** w ogóle nie wykazywał aktywności przeciwbakteryjnej.

Jak wynika z testów, najlepsze właściwości antybakteryjne były wyrażane przez sole z anionami [MeSO₄]⁻ i [Doc]⁻: [BTHMe][MeSO₄] **(89)** i [BTHMe][Doc] **(94)**. Takie wyniki nie są zaskoczeniem. Anion [MeSO₄]⁻ w roztworze wodnym może ulegać rozkładowi do MeOH i H₂SO₄ (oba są toksyczne dla organizmów, w tym bakterii), a anion dokuzynianowy jest znany z właściwości antybakteryjnych. Ciekawy jest fakt, że ponownie pochodne z kationem opartym na metylowanym kwasie okazywały się mniej aktywne biologicznie od pochodnych z zalkilowanym tioestrem. Sam kation w postaci alkilowanej pochodnej BTH lub kwasu BTHCOOH z przeciwjonem nieorganicznym, [BTHMe][I] **(90)**, [BTHMe][Cl] **(92)**, [BTHCOOH(Me)][I] **(99)**, wykazywał bardzo słabe właściwości antybakteryjne głównie przeciwko bakteriom *P. syringae*.

Zarówno MIC, jak i MBC w stosunku do wszystkich testowanych bakterii są osiągnane przy dość wysokich stężeniach badanych związków: 125 mg/L [BTHMe][MeSO₄] **(89)** i 253 mg/L dla substancji [BTHMe][Doc] **(94)**, kilkukrotnie wyższych niż te przy aplikacji wymaganej do indukcji SAR.

Tab. 6 Wartości MIC I MBC {mg/L} dla testowanych soli opartych na anionowej pochodnej BTH.

		BAC	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
<i>Clavibacter michiganensis</i> ss. <i>michiganensis</i>	MIC	60	-	-	-	-	-	-	250	2	60	30	120	60	16	250
	MBC	120	-	-	-	-	-	-	250	4	120	60	250	60	16	250
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MIC	60	-	-	-	-	-	-	250	2	60	8	120	60	16	120
	MBC	120	-	-	-	-	-	-	500	4	120	16	250	60	16	250
<i>Pantoea ananatis</i>	MIC	60	-	-	-	-	-	-	250	2	60	30	250	120	16	250
	MBC	120	-	-	-	-	-	-	500	4	120	60	250	250	16	250
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	MIC	60	-	-	-	-	-	-	250	4	120	60	250	60	16	250
	MBC	120	-	-	-	-	-	-	500	4	120	60	500	120	16	250
<i>Escherichia coli</i>	MIC	250	-	-	-	-	-	-	500	30	250	250	500	250	60	250
	MBC	250	-	-	-	-	-	-	500	60	250	500	500	250	120	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	120	-	-	-	-	-	-	250	16	120	16	250	120	60	250
	MBC	250	-	-	-	-	-	-	500	30	250	30	500	250	60	500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MIC	120	-	-	-	-	-	-	500	2	60	60	120	60	30	250
	MBC	120	-	-	-	-	-	-	500	2	120	60	250	60	30	250
<i>Serratia marescens</i>	MIC	250	-	-	-	-	-	-	500	8	250	250	500	120	60	250
	MBC	250	-	-	-	-	-	-	-	16	500	250	500	250	120	250
<i>Proteus vulgaris</i>	MIC	250	-	-	-	-	-	-	500	16	250	250	250	250	60	250
	MBC	250	-	-	-	-	-	-	500	16	250	500	500	250	60	250
<i>Bacillus subtilis</i>	MIC	120	-	-	-	-	-	-	500	8	250	250	250	120	30	250
	MBC	250	-	-	-	-	-	-	500	16	250	500	500	120	30	250

Symbol “—” oznacza, że najwyższe testowane stężenie soli (~1000 mg/l) nie wykazywało działania antybakteryjnego, przez co wyznaczenie parametru MIC I MBC nie było możliwe, “BAC” to substancja referencyjna - chlorek benzalkoniowy (BAC).

Bardziej rozbudowane testy antybakteryjne przeprowadzono dla pochodnych opartych na anionowej pochodnej BTH. Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) zostało wyznaczone dla większej ilości patogenów, które podano w tabeli (Tab. 6). W wyniku przeprowadzonych testów ustalono, że dziesięć analizowanych substancji wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową. Wszystkie testy przeprowadzono z użyciem chlorku benzalkoniowego (BAC) jako referencji.

Najsilniejszą aktywność przeciwbakteryjną odnotowano dla substancji [N₁₁₁₀₁₀][BTHCOO] (**82**), która hamuje wzrost wszystkich badanych bakterii przy bardzo niskich stężeniach w zakresie od 2 do 16 mg/L. Kolejną

substancją aktywnie hamującą wzrost bakterii jest [Benth][BTHCOO] **(87)**, która zwalcza wszystkie badane bakterie w niskich stężeniach w zakresie od 16 do 120 mg/L. Substancje: [N_{1110Benz}][BTHCOO] **(83)**, [N_{11010Benz}][BTHCOO] **(84)** i [PyrC₁₂][BTHCOO] **(86)** są również aktywne w tym samym zakresie stężeń, jednak tylko przeciwko bakteriom *C. michiganensis*, *S. epidermidis*, *P. ananatis*, *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*. Inne bakterie są hamowane przez wymienione substancje w stężeniach 250-500 mg/L. Substancje [N₁₁₄₁₀][BTHCOO] **(81)**, [PyrC₁₀][BTHCOO] **(85)** i [C₁₄VinIm][BTHCOO] **(88)** hamują wzrost wszystkich bakterii w stężeniu około 500 mg/L. Pozostałe badane substancje neutralne, czyli **(1)**, **(2)**, **(3)**, oraz sole zawierające jon potasowy **(4)**, choliniowy **(5)** i tetrabutylamoniowy **(6)** nie wykazały żadnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej nawet przy stężeniach tak wysokich jak 1000 mg/L.

Dla porównania, chlorek benzalkoniowy (BAC), stosowany jako referencja, hamuje wzrost wszystkich badanych szczepów bakteryjnych w zakresie stężeń 60-250 mg/L. Nie ma znaczącej różnicy w aktywności przeciwdrobnoustrojowej testowanych cieczy jonowych, gdy porównamy ich wpływ na bakterie atakujące ludzi (*E. coli*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*) i rośliny (*C. michiganensis*, *P. ananatis*, *E. diffcivens*) oraz w stosunku do bakterii niechorobotwórczych (gleba i woda) (*P. fluorescens*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*). Badane ciecze jonowe również nie wykazują selektywności w aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec bakterii Gram ujemnych lub Gram-dodatnich.

Przedstawione testy sugerują, że samo BTH w postaci kationowej wykazuje podobne działanie antybakteryjne co pochodna anionowa. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę sole jako całość i wpływ przeciwjonu, wyższą aktywność biologiczną wykazują pochodne z BTH w postaci anionu, gdzie efekt antybakteryjny jest wprost zależny od zastosowanego kationu. Istotny jest fakt, że najlepsze pochodne anionowe wykazują działanie antybakteryjne w stężeniu niższym, niż referencyjna substancja antybakteryjna (BAC). Jednocześnie, stężenie aktywne dla substancji $[N_{111010}][BTHCOO]$ **(82)**, $[Benth][BTHCOO]$ **(87)**, powodujące efekt antybakteryjny, jest zbieżne ze stężeniem odpowiednim dla wzbudzania SAR, przez co związki te są pierwszymi dwufunkcyjnymi solami łączącymi efekt indukcji odporności oraz antybakteryjność.

3.1.5. Badania ekotoksykologiczne

Wyniki toksykologiczne, osiągnięte na wybranych związkach, przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 7). Zebrane wyniki wykazały, że anionowe sole BTH z przeciwjonem cholinowym i tetrabutylamoniowym wykazują bardzo wysoką biodegradowalność, co jest związane z dobrym rozkładem biologicznie neutralnego przeciwjonu. Biodegradacja soli potasowej znacząco spada do 10%. Jest to niska wartość, jednak wystarczająca w połączeniu z bardzo niskimi dawkami w aplikacji (~ 8 g/ha) aby nie pozwolić na akumulację w środowisku. Niestety, dodanie antybakteryjnego przeciwjonu z długim łańcuchem alkilowym zahamowało biodegradację do 0%. Kationowe pochodne wykazują się brakiem podatności na biodegradację niezależnie od zastosowanego przeciwjonu, co świadczy nie tylko o trwałości struktury chemicznej ale również toksyczności względem bakterii.

Tab. 7 Badania ekotoksykologiczne wybranych pochodnych BTH

Związek	Biodegradacja	ICP-81 (EC ₅₀)		D. magna (EC ₅₀)	
BTH (75)	20%	-	-	-	-
[K][BTHCOO] (78)	10%	300 μM	0,0654 g/L	> 916 μM	> 0,2 g/L
[Chol][BTHCOO] (79)	70%	314 μM	0,0889 g/L	1764 μM	0,5 g/L
[N ₄₄₄₄][BTHCOO] (80)	70%	312 μM	0,1315 g/L	712 μM	0,3 g/L
[N ₁₁₄₁₀][BTHCOO] (81)	0%	18,5 μM	0,0078 g/L	-	-
[N _{11010Benz}][BTHCOO] (84)	0%	0,625 μM	0,0003 g/L	0,267 μM	0,00011 g/L
[PyrC ₁₀][BTHCOO] (85)	0%	29,6 μM	0,0118 g/L	< 0,600 μM	< 0,00024 g/L
[PyrC ₁₂][BTHCOO] (86)	0%	6,37 μM	0,0027 g/L	< 0,61 μM	< 0,00026 g/L
[BTHMe][MeSO ₄] (89)	0%	1902 μM	0,6398 g/L	2,97 μM	0,001 g/L
[BTHMe][Cl] (92)	0%	3193 μM	0,8327 g/L	53,69 μM	0,014 g/L
[BTHMe][LS] (96)	0%	631 μM	0,2995 g/L	1,68 μM	0,008 g/L

Wyniki różnych wykonanych badań toksyczności w postaci medialnego stężenia skutecznego (EC₅₀) dla wszystkich badanych związków przedstawiono w tabeli (Tab. 7). Badania cytotoxyczności dla szczurzych

linii komórkowych IPC-81 jest stosunkowo dobrym testem pokazującym ogólne właściwości toksyczne substancji. Zebrane wyniki pokazują, że najmniej toksycznymi związkami są, sole kationowej pochodnej ASM, z anionami [Cl]⁻ (**92**), [MeSO₄]⁻ (**89**) oraz [LS]⁻ (**96**) z EC₅₀, osiągniętymi w stężeniu na poziomie odpowiednio 3193, 1902 i 631 μM. Ostatnia wymieniona pochodna zawdzięcza wyższy poziom toksyczności długiemu łańcuchowi alkilowemu w przeciwjonie. Bardzo podobną toksyczność wykazują trzy sole anionowej pochodnej ASM w połączeniu z biologicznie neutralnym przeciwjonem ([K][BTHCOO] (**78**), [Chol][BTHCOO] (**79**) i [N₄₄₄₄][BTHCOO] (**80**)), co oznacza, że toksyczność EC₅₀ na poziomie około 300 μM jest spowodowana jedynie właściwościami samego anionu. Toksyczność innych związków (zaprojektowanych jako środki przeciwbakteryjne) jest wysoka i wynosi odpowiednio dla pochodnych pirydyniowych 29,6 μM [PyrC₁₀][BTHCOO] (**85**) i 6,37 μM [PyrC₁₂][BTHCOO] (**86**), oraz dla pochodnych amoniowych 18,5 μM [N₁₁₄₁₀][BTHCOO] (**81**) i 0,625 μM [N_{11010Benz}][BTHCOO] (**84**). Na wzrost toksyczności ma więc wpływ długość łańcucha alkilowego, ilość łańcuchów alkilowych oraz obecność grup benzyłowych w cząsteczce.

Wyniki testu ostrej immobilizacji u *D. magna* wykazują znacznie wyższą wrażliwość tych organizmów niż komórek użytych w poprzednim teście. Część wyników jest przeciwna do testu IPC. Pochodne anionowe BTH z przeciwjonem nieantybakteryjnym wykazują względnie niską toksyczność EC₅₀ dla [K][BTHCOO] (**78**) i [N₄₄₄₄][BTHCOO] (**80**), osiągniętą odpowiednio w stężeniu 916 μM i 712 μM. Zauważalny jest wpływ jonu cholinowego jako reduktora toksyczności, ponieważ sól ta wykazuje EC₅₀

w stężeniu 1764 μM . Sole oparte na kationowej pochodnej BTH okazały się o dwa rzędy wielkości bardziej toksyczne z wynikami EC50 na poziomach 53,69 μM dla [BTHMe][Cl] (**92**), 2,97 μM dla [BTHMe][MeSO₄] (**89**) i 1,68 μM dla [BTHMe][LS] (**96**). Niezwykle wysoką toksycznością wykazują się pochodne anionowe z jonem zawierającym długi łańcuch alkilowy, z wynikiem EC50 poniżej stężenia 1 μM , szczególnie [PyrC₁₀][BTHCOO] (**85**), [PyrC₁₂][BTHCOO] (**86**), wykazujące toksyczność na podobnym poziomie ($\sim 0,6$ μM) oraz najbardziej toksyczny z testowanych związków, [N_{11010Benz}][BTHCOO] (**84**), z EC50 na poziomie 0,267 μM . Te pochodne nie mogłyby być stosowane jako środki ochrony roślin, gdyż stanowiłyby zagrożenie dla organizmów wodnych.

3.2. Neutralne pochodne induktorów oporności u roślin o zmodyfikowanej strukturze

Główną częścią niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu struktury chemicznej induktorów odporności u roślin dla niejonowych pochodnych znanych induktorów odporności – kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego, salicylowego, 3-aminomasłowego oraz sacharyny. Wyniki tej części badań są przedstawione w kolejnych podrozdziałach

3.2.1. Wyniki testów indukcji oporności SAR

W trakcie badań realizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dokonano oceny aktywności biologicznej, pod kątem indukcji nabytej odporności systemicznej u roślin, 69 związków chemicznych, będących neutralnymi pochodnymi kwasu salicylowego **(30)**, kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego **(5)**, sacharyny oraz kwasu 3-aminomasłowego **(20)**. Wszystkie z wymienionych substancji były badane w ten sam sposób, przy zachowaniu kontrolowanych warunków oświetleniowych i termicznych podczas uprawy roślin. Aktywność indukcji SAR, oceniana na podstawie inhibicji infekcji wirusowej wirusa mozaiki tytoniu, weryfikowana była na tym samym inokulum wirusowym, stosowanym jednakowym stężeniu przez cały okres trwania badań. Każdy z wyników jest średnią z trzech prób (po 3 rośliny kontrolne każda). Liście tytoniu wybierane do skanowania bądź fotografowania były wybierane reprezentatywnie dla wszystkich prób.

Substancje aktywne stosowane były jako roztwory wodne (z dodatkiem 10% metanolu w celu podwyższenia rozpuszczalności badanych pochodnych) w stężeniu wyjściowym wynoszącym 500 mg/L lub 250 mg/L w przypadku wybranych związków, wykazujących zbyt wysoką aktywność, prowadzącą do fitotoksyczności (związki **52, 54, 56-58**). Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 8).

Tab. 8 Aktywność biologiczna neutralnych pochodnych kwasu salicylowego, 2,6-dichloroizonikotynowego, 3-aminomasłowego i sacharyny jako induktorów odporności u roślin

Nr	Nazwa Związku	Dawka [mg/L]	% SAR
1	Kwas izonikotynowy	500	0
2	Kwas piperydino-4-karboksylowy	500	0
3	Kwas 2-chloroizonikotynowy	500	80
4	Kwas 2-hydroksyizonikotynowy	500	0
5	Kwas 2,6-dichloroizonikotynowy	500	80
6	Kwas 2,6-dihydroksyizonikotynowy	500	0
7	Kwas 2-chloro-3-hydroksyizonikotynowy	500	100
8	2,6-dichloropirydyna	500	0
9	Kwas nikotynowy	500	40
10	Kwas DL-piperydino-3-karboksylowy	500	50
11	Kwas 2-chloronikotynowy	500	75
12	Kwas 2-hydroksynikotynowy	500	0
13	Kwas 2,6-dichloronikotynowy	500	75
14	Kwas pikolinowy	500	0
15	Kwas DL-pipekolowy	500	0
16	DL-Prolina	500	0
17	Kwas 6-chloropikolinowy	500	0
18	Kwas 3-hydroksypikolinowy	500	40
19	Kwas DL-2-aminomasłowy	500	95
20	Kwas DL-3-aminomasłowy	500	85
21	Kwas 4-aminomasłowy	500	0
22	β -Alanina	500	95
23	DL-Metionina	500	0
24	Sacharynian sodu jednowodny	500	55
25	Bezwodnik 2-sulfobenzoesowy	500	0
26	3-sulfobenzoesan sodu	500	0
27	4-sulfobenzoesan potasu	500	0
28	Kwas benzoesowy	500	0
29	Kwas cykloheksanokarboksylowy	500	0
30	Kwas salicylowy	500	80

31	Kwas 2-chlorobenzoesowy	500	0
32	Kwas 2-metoksybenzoesowy	500	0
33	Kwas antranilowy	500	0
34	Kwas acetylosalicylowy	500	70
35	Kwas 2-nitrobenzoesowy	500	0
36	Kwas tiosalicylowy	500	85
37	Kwas 2-(metylotio)benzoesowy	500	0
38	Kwas ftalowy	500	0
39	Kwas 3-hydroksybenzoesowy	500	0
40	Kwas 4-hydroksybenzoesowy	500	0
41	Kwas 3-chlorobenzoesowy	500	0
42	Kwas 2,6-dichlorobenzoesowy	500	0
43	Kwas 2,6-dimetoksybenzoesowy	500	0
44	Kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy	500	0
45	kwasy 2,4-dihydroksybenzoesowy	500	0
46	Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy	500	0
47	kwasy 2,6-dihydroksybenzoesowy	500	0
48	Kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy	500	0
49	Kwas 3,5-dichlorobenzoesowy	500	0
50	kwasy 3,5-dimetoksybenzoesowy	500	0
51	kwasy 3,5-diaminobenzoesowy	500	0
52	Kwas 3-chlorosalicylowy	250	95
53	Kwas 4-chlorosalicylowy	500	50
54	Kwas 5-chlorosalicylowy	250	85
55	Kwas 6-chlorosalicylowy	500	0
56	kwasy 3,5-dichlorosalicylowy	250	95
57	Kwas 4-fluorosalicylowy	250	75
58	Kwas 5-fluorosalicylowy	250	100
59	Kwas 4-bromosalicylowy	500	40
60	Kwas 5-bromosalicylowy	500	75
61	Kwas 3,5-dibromosalicylowy	500	75
62	Kwas 4-jodosalicylowy	500	0
63	Kwas 5-jodosalicylowy	500	50
64	Kwas 3,5-dijodosalicylowy	500	0
65	Kwas 3-nitrosalicylowy	500	0
66	Kwas 5-nitrosalicylowy	500	60
67	Kwas 3,5-dinitrosalicylowy	500	25
68	Kwas 5-sulfosalicylowy dwuwodny	500	60
69	Kwas 4-aminosalicylowy	500	0
70	Jasmonian metylu	500	0
71	Amid N,N-dibutylo-2,6-dichloroizotynowy	500	90
72	Amid N-butylo-N-metylo-2,6-dichloroizotynowy	500	90
73	Amid N-benzylo-N-metylo-2,6-dichloroizotynowy	500	70
74	Amid N,N-di(2-hydroksyetylo)-2,6-dichloroizotynowy	500	90

Stężenie i ilość związku badanego została dobrana tak, aby substancje wyjściowe znane obecnie ze swojej aktywności biologicznej, czyli kwas salicylowy **(30)** i 2,6-dichloroizonikotynowy **(5)** wykazywały aktywność indukcji SAR w testowanym układzie biologicznym na poziomie 80%.

Omówienie konkretnego wpływu podstawników na aktywność biologiczną pochodnych zostanie przedstawiona w następnym rozdziale.

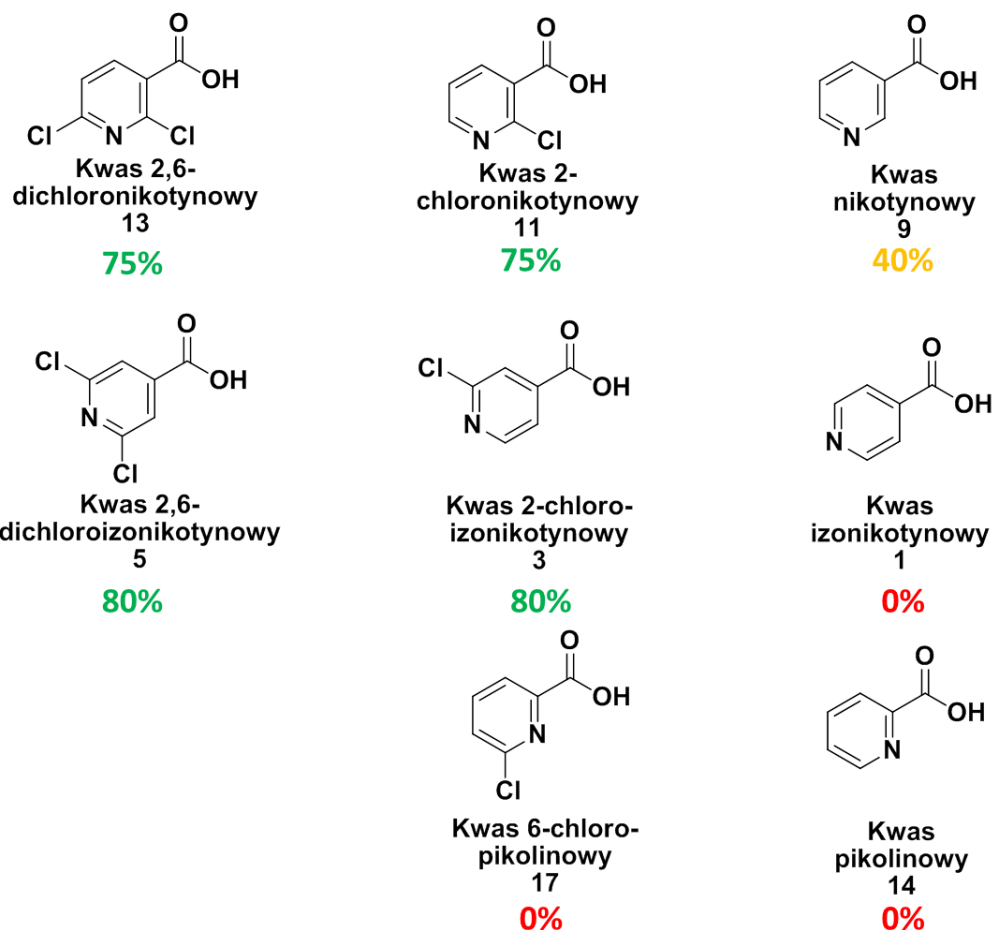
3.2.2. Bezpośrednie działanie związków badanych na materiał wirusowy

Podobnie jak w przypadku jonowych pochodnych BTH, żadna z testowanych substancji nie wykazywała bezpośredniej aktywności przeciwko wirusom. Ponownie udowadnia to fakt, że mechanizm umożliwiający powstrzymanie choroby wirusowej przebiega z wykorzystaniem mechanizmów odpornościowych rośliny, a nie ma charakteru kontaktowego.

3.2.3. Korelacje wyników biologicznych ze strukturą chemiczną

3.2.3.1. Wpływ obecności chloru oraz położenia azotu w pierścieniu aromatycznym – pochodne izonikotynowe, nikotynowe i pikolinowe

Poziom indukcji SAR:



Rys. 28 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu izonikotynowego, nikotynowego i pikolinowego podstawionych chlorem

Wśród pierwszej grupy pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego możemy wyróżnić 2 podstawowe rodzaje modyfikacji strukturalnych (Rys. 28). W pierwszej z nich w związku wyjściowym, czyli kwasie 2,6-dichloroizonikotynowym **(5)** zredukowano liczbę podstawników halogenkowych. Jak wykazano, wyjściowy kwas podstawiony dwoma atomami chloru w pozycjach 2 i 6 **(5)** jest tak samo aktywny jak kwas

2-chloroizonikotynowy (**3**) i indukuje SAR na poziomie 80% skuteczności. Usunięcie ostatniego chloru w przypadku kwasu izonikotynowego (**1**) doprowadziło do kompletnej dezaktywacji cząsteczki.

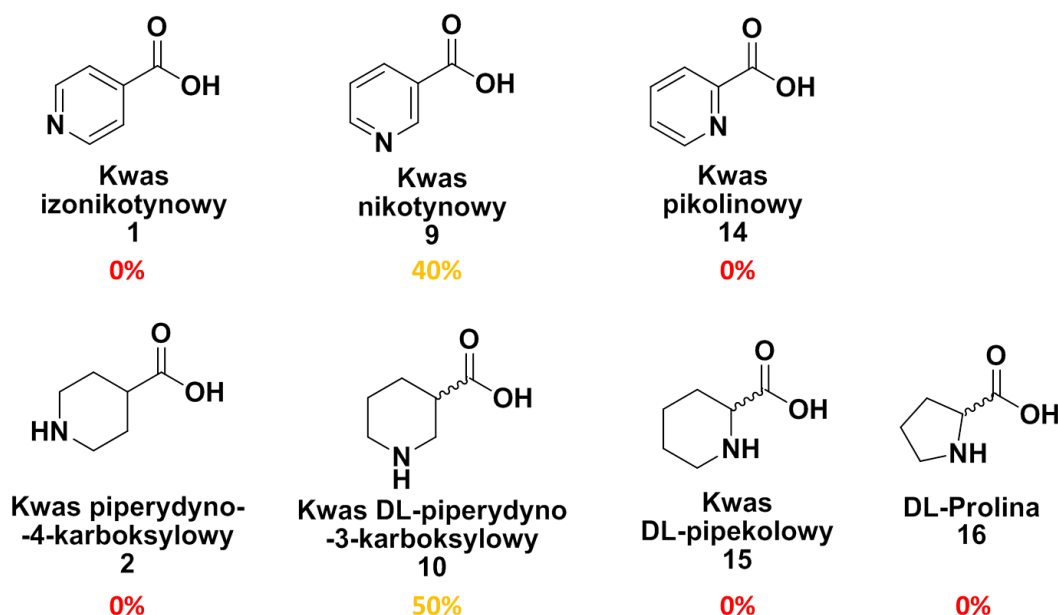
Drugą grupą pochodnych były związki ze zmienionym położeniem atomu azotu względem grupy karboksylowej w pierścieniu. Przetestowano więc pochodne nikotynowe oraz pikolinowe. Pochodne pikolinowe okazały się nieaktywne biologicznie, zarówno sam kwas pikolinowy (**14**) jak i 6-chloropikolinowy (**17**). Natomiast pochodne nikotynowe z azotem w położeniu meta w stosunku do podstawnika karboksylowego oraz podstawione chlorami – czyli kwas 2,6-dichloronikotynowy (**13**) i 2-chloronikotynowy (**11**) wykazały wysoką aktywność biologiczną (75%), bardzo podobną do analogów izonikotynowych (80%). Co ciekawe, w tym przypadku kwas nikotynowy (**9**) wykazał umiarkowaną aktywność biologiczną (40%).

Przedstawione dane wskazują, że aktywność biologiczna pochodnych kwasów izonikotynowego jest uwarunkowana przez obecność podstawników chlorowych w pozycjach *orto* do azotu. Równocześnie zmiana położenia azotu w pozycje *meta* względem grupy karbonylowej powoduje utrzymanie aktywności biologicznej, jednakże przesunięcie go jeszcze bliżej podstawnika karbonylowego (pozycja *orto*) prowadzi do dezaktywacji cząsteczki. Rozpatrując pochodne niepodstawione, kwas nikotynowy (**9**) ma wyższą aktywność biologiczną niż kwas izonikotynowy (**1**) co może świadczyć o preferencji tej właśnie struktury do wzbudzania indukcji SAR.

Jest to ważny wniosek, ponieważ pochodne nikotynowe nie były dotąd znane jako induktory odporności u roślin.

3.2.3.2. Wpływ położenia azotu w pierścieniu aromatycznym oraz aromatyczności związków

Poziom indukcji SAR:



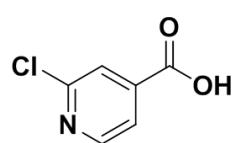
Rys. 29 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu izonikotynowego – wpływ aromatyczności i położenia azotu w pierścieniu

W badaniach indukcji SAR kolejnej grupy pochodnych określono wpływ występowania aromatyczności na aktywność biologiczną (Rys. 29). Pochodne w postaci kwasu piperydyno-4-karboksylowego (**2**), kwasu DL-pipecolowego (**15**) wykazały brak aktywności biologicznej, podobnie jak ich aromatyczne odpowiedniki – kwas izonikotynowy (**1**) oraz kwas pikolinowy (**14**). Redukcja wielkości pierścienia u DL-proliny (**16**) również nie spowodowała aktywacji cząsteczki. Jedyną pochodną niearomatyczną, zdolną do wzbudzania indukcji odporności u roślin, był kwas

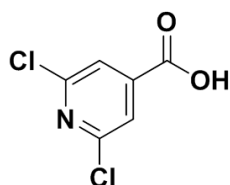
DL-piperydino-3-karboksylowy (**10**) wykazujący aktywność na poziomie 50%, co jest wynikiem nawet lepszym niż jego aromatyczny analog (**9**) (40%). Ponownie, najbardziej aktywna okazała się pochodna z atomem azotu w położeniu meta do podstawnika karboksylowego, co potwierdza wcześniejsze obserwacje. Warto zauważyć, że jest to pierwszy odkryty niearomatyczny induktor odporności u roślin oparty na pierścieniu heterocyklicznym.

3.2.3.3. Zmiana podstawnika chlorowego na grupę hydroksylową – pochodne nikotynowe i izonikotynowe

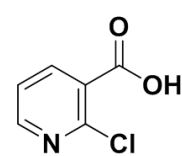
Poziom indukcji SAR:



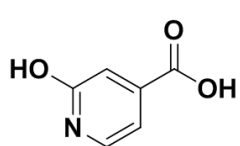
Kwas 2-chloro-
izonikotynowy
3
80%



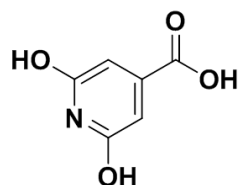
Kwas 2,6-
dichloroizonikotynowy
5
80%



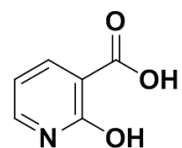
Kwas 2-
chloronikotynowy
11
75%



Kwas 2-
hydroxyizonikotynowy
4
0%



Kwas 2,6-
dihydroxyizonikotynowy
6
0%



Kwas 2-
hydroxynikotynowy
12
0%

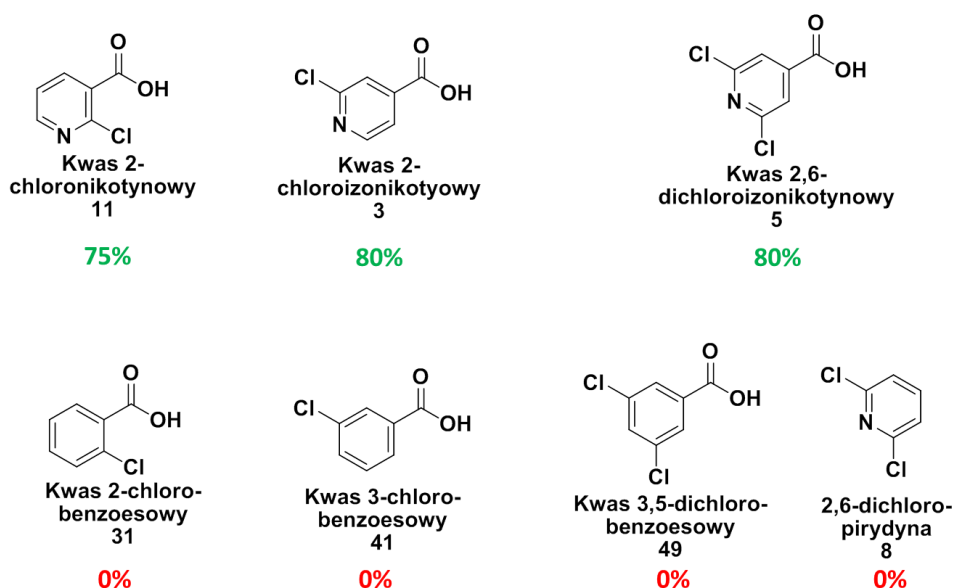
Rys. 30 Wpływ zmiany podstawnika chlorowego na hydroksylowy w pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego

Następną grupą związków przebadanych pod kątem indukcji odporności u roślin były pochodne najaktywniejszych halogenowanych induktorów nikotynowych oraz izonikotynowych (**3, 5, 11**) z grupą hydroksylową

w miejscu chloru – kwasy 2-hydroksyizonikotynowy **(4)**, 2,6-dihydroksyizonikotynowy **(6)** oraz 2-hydroksynikotynowy **(12)** (Rys. 30). Tego typu modyfikacja prowadzi do całkowitej dezaktywacji biologicznej cząsteczki we wszystkich przypadkach, nawet kwasu nikotynowego. Pomimo, że kwas 2-hydroksynikotynowy jest połączeniem strukturalnym kwasów nikotynowego (9) i salicylowego (30), nie wykazywał aktywności biologicznej (o czym później).

3.2.3.4. Obecność azotu bądź grupy karboksylowej w pierścieniu aromatycznym – pochodne nikotynowe i izonikotynowe

Poziom indukcji SAR:



Rys. 31 Wpływ obecności azotu oraz grupy karboksylowej w pierścieniu aromatycznym na aktywność pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego

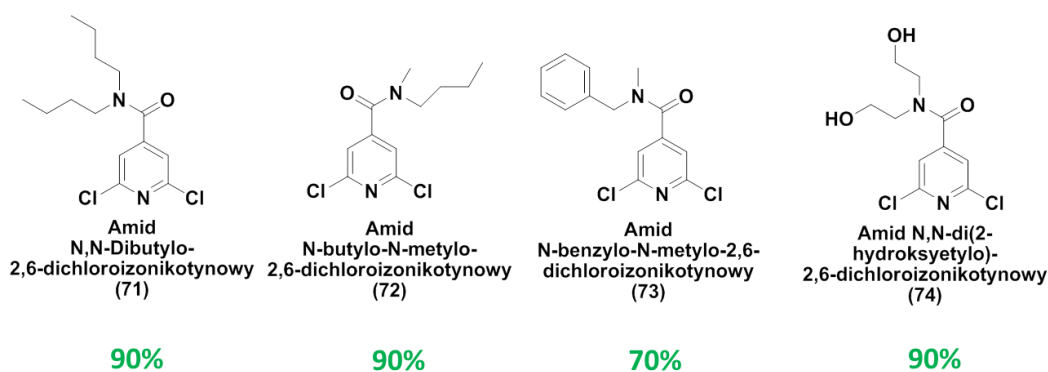
W kolejnym etapie badań przeanalizowano wpływ obecności azotu w pierścieniu aromatycznym induktora. W tym celu przebadano takie związki jak kwas 2-chlorobenzoesowy **(31)**, kwas 3-chlorobenzoesowy **(41)**

oraz kwas 3,5-dichlorobenzoesowy (**49**). W przypadku każdego z badanych związków brak obecności azotu w pierścieniu aromatycznym skutkowało całkowitą dezaktywacją biologiczną cząsteczki (Rys. 31).

Następnie, przeprowadzono badania biologiczne 2,6-dichloropirydyny (**8**), w celu określenia wpływu obecności grupy karboksylowej na aktywność biologiczną. Badania wykazały, że związek ten był również kompletnie nieaktywny biologicznie. Podsumowując, obecność atomu azotu w pierścieniu aromatycznym w pozycji *meta* i *para* w stosunku do grupy karboksylowej, jak i obecność samej grupy karboksylowej jest kluczowa dla podtrzymania funkcji aktywowania mechanizmów odpornościowych rośliny.

3.2.3.5. Amidowe pochodne kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego

Poziom indukcji SAR :



Rys. 32 Aktywność biologiczna amidów opartych na kwasie 2,6-dichloroizonikotynowym

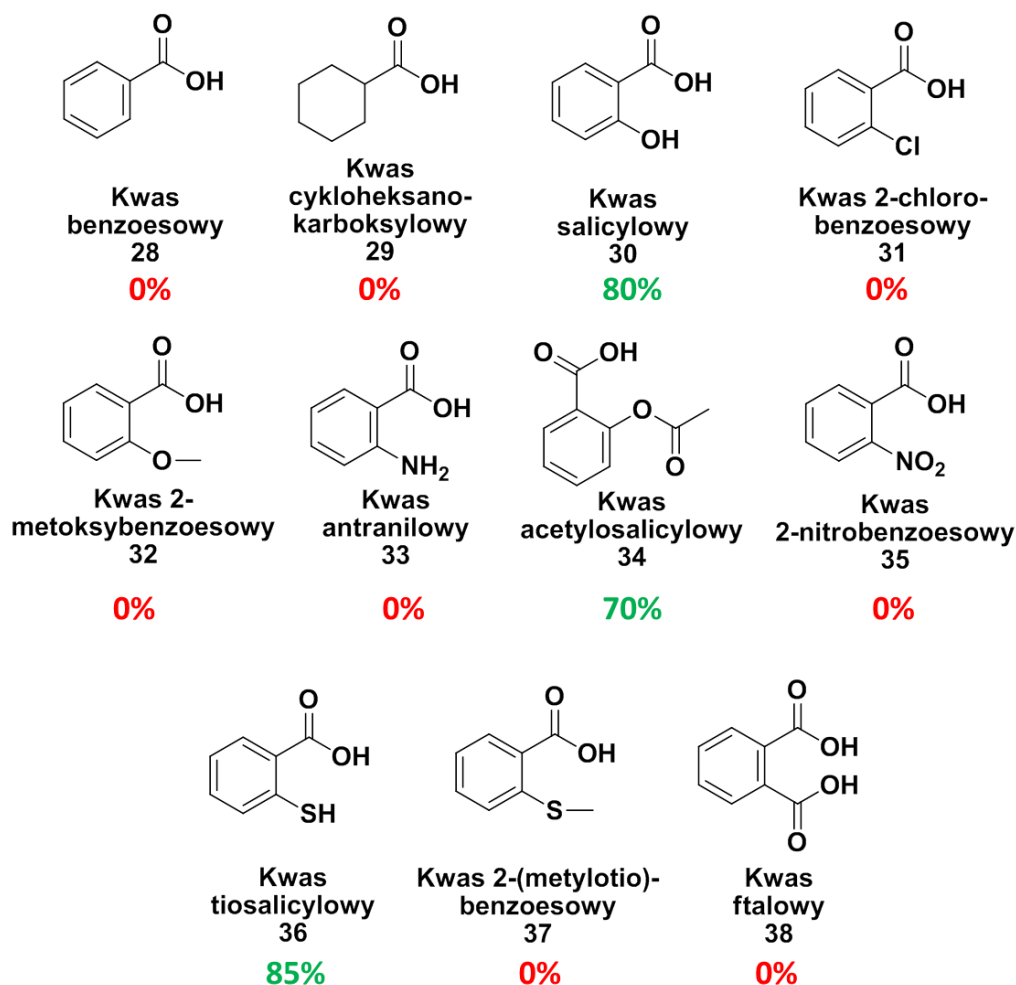
W ramach niniejszych badań zsyntezowano 4 pochodne amidowe kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego z grupą amidową różnej wielkości i o różnej podatności na hydrolizę (Rys. 32). Wyniki otrzymanych badań wskazują, że trzy z badanych amidów wykazywały wysoką aktywność biologiczną

na poziomie 90%, są to amid N,N-dibutylo-2,6-dichloroizonicotinowy **(71)**, N-butylo-N-metylo-2,6-dichloroizonicotinowy **(72)** i amid N,N-di(2-hydroksyetylo)-2,6-dichloroizonicotinowy **(74)**. Niższą skutecznością charakteryzował się amid N-benzylo-N-metylo-2,6-dichloroizonicotinowy **(73)**, indukując odporność na poziomie 70%, co jest wynikiem gorszym w porównaniu do wyjściowego kwasu 2,6-dichloroizonicotinowego **(5)**, wykazującego aktywność na poziomie 80%. Prawdopodobnie jest to związane z obecnością dużej sterycznej grupy benzylowej w strukturze induktora. Podatność na hydrolizę grup funkcyjnych wskazywałby, że najaktywniejsza powinna być pochodna z grupą N,N-dibutyloamidową. Natomiast najniższą aktywność powinien wykazywać związek z grupą N,N-dietanoloamidową. Brak różnic między tymi związkami wskazuje, że ten aspekt nie jest decydujący o aktywności biologicznej.

Otrzymane dane wskazują, że modyfikacja kwasu 2,6-dichloroizonicotinowego do formy amidowej wpłynęła pozytywnie na poziom wzbudzenia indukcji odporności SAR, jednak efektywność otrzymanych związków nie jest zależna od podatności na hydrolizę przyłączonej grupy, a bardziej jej struktury przestrzennej. Co ciekawe, wyniki te są sprzeczne z tymi, które można znaleźć w literaturze o pochodnych amidowych BTH.

3.2.3.6. Zmiana grupy hydroksylowej w kwasie salicylowym

Poziom indukcji SAR:



Rys. 33 Wpływ zmiany grupy hydroksylowej w kwasie salicylowym

Badania nad pochodnymi kwasu salicylowego rozpoczęto od analizy wpływu zamiany grupy hydroksylowej kwasu salicylowego (**30**) na inną grupę funkcyjną (Rys. 33). Sam kwas salicylowy w testowanym stężeniu osiągnął skuteczność indukcji SAR na poziomie 80%. Wśród przebadanych pochodnych aktywność biologiczną wykazały jedynie kwas acetylosalicylowy (**34**) oraz tiosalicylowy (**36**) na poziomie odpowiednio 70 oraz 85%. Prawdopodobnie zachowanie aktywności biologicznej kwasu tiosalicylowego wynika z faktu, że grupa tiolowa -SH jest analogiem

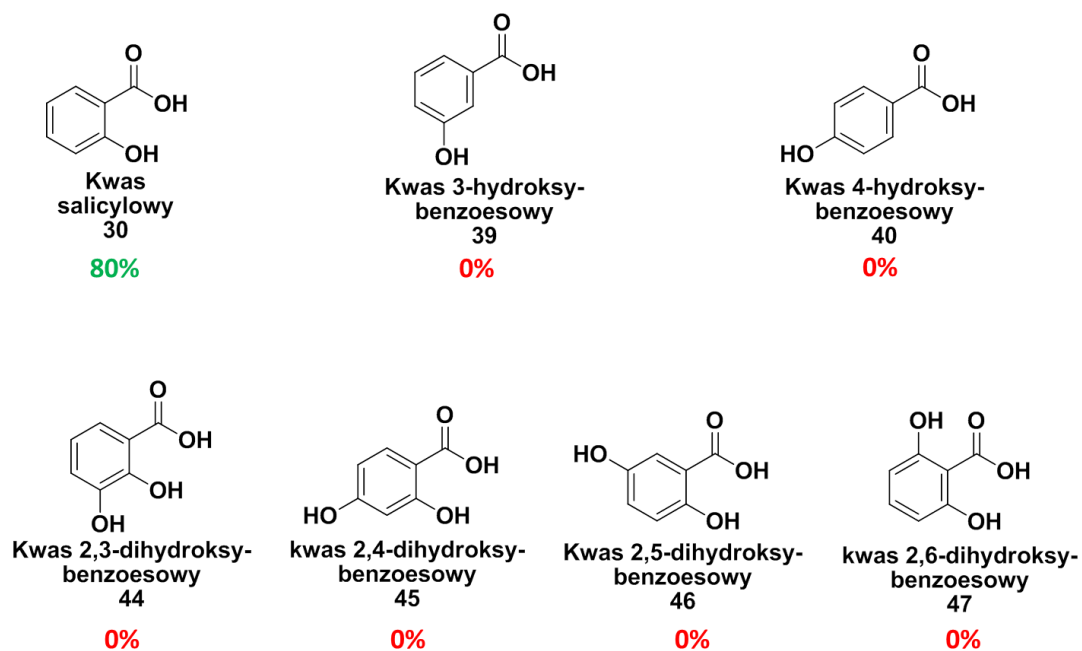
hydroksylowej pod względem charakteru hydrofilowego, elektronowego i zdolności do tworzenia wiązań wodorowych. Aktywność kwasu acetylosalicylowego jest najprawdopodobniej spowodowana jego wysokim powinowactwem do hydrolizy, przez co w organizmie roślinnym jest deestryfikowany z powrotem do kwasu salicylowego. To tłumaczyłoby również wysoką aktywność biologiczną zestryfikowanych pochodnych kwasu salicylowego, opisywanych we wstępie, posiadających bardzo duży sterycznie podstawnik (praca S Kamathan *et. al.*).

Pozostałe pochodne nie wykazywały aktywności biologicznej. Ponadto, charakter oddziaływań grupy hydroksylowej i tiolowej w pozycji 2 pierścienia kwasu benzoowego z układem immunologicznym rośliny musi być wysoce selektywny. Wynika to z faktu, że nieaktywnymi związkami okazały się kwasy 2-metoksybenzoowy **(32)** i 2-(metylotio)benzoowy **(37)**, co tłumaczy, że obecność atomów tlenu i siarki, posiadających wolne pary elektronowe, nie wystarczy do aktywacji działania biologicznego cząsteczek. Podobnie, zastąpienie tych atomów atomem azotu w postaci aminy (kwas antranilowy **(33)**) czy grupy nitrowej (kwas 2-nitrobenzoowy **(35)**) również nie powoduje indukcji odporności. Nieaktywny okazał się również kwas ftalowy **(38)**, w którym występuje układ dwóch grup karboksylowych, zdolnych do tworzenia wiązań koordynacyjnych. Ostatecznie, nieaktywną pochodną kwasu salicylowego jest również kwas 2-chlorobenzoowy **(31)**, w którym obecność halogenku nie pozwoliła na zachowanie aktywności. Kwas benzoowy **(28)**, a także niearomatyczna struktura kwasu cykloheksanokarboksylowego **(29)** też nie wykazywały aktywności biologicznej.

Według znanej literatury aktywność biologiczna induktorów odporności u roślin jest warunkowana przez ich podatność na wiązanie się do białka NPR-1. Zaproponowany tam mechanizm polega na wiązaniu się induktora poprzez tworzenie kompleksu czterokoordynacyjnego miedzi. W kompleksie tym dwa wiązania koordynacyjne pochodzą od atomów tlenu z grupy karbonylowej i hydroksylowej induktora, a kolejne dwa od atomów siarki z cystein pochodzących z białka. Wyniki moich badań mogą poddać w wątpliwość zaproponowaną tezę, ponieważ pochodne z grupami metoksyłową **(32)** i metylotiolową **(37)** powinny wykazywać chociażby umiarkowaną aktywność, ze względu na to, że również są zdolne do tworzenia wiązań koordynacyjnych. Wygląda więc na to, że indukcja odporności u roślin jest wzbudzana przez induktory na zasadzie jego oddziaływania z białkiem, ale na wyższym poziomie dopasowania, możliwe że z wykorzystaniem wiązań wodorowych. To tłumaczyłoby tak dobrą zgodność grup hydroksylowej i tiolowej w aktywowaniu działania biologicznego związków.

3.2.3.7. Zmiana położenia grupy hydroksylowej oraz dodanie drugiej grupy hydroksylowej

Poziom indukcji SAR:



Rys. 34 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu salicylowego ze zmienionym położeniem grupy hydroksylowej lub dodaną drugą grupą hydroksylową

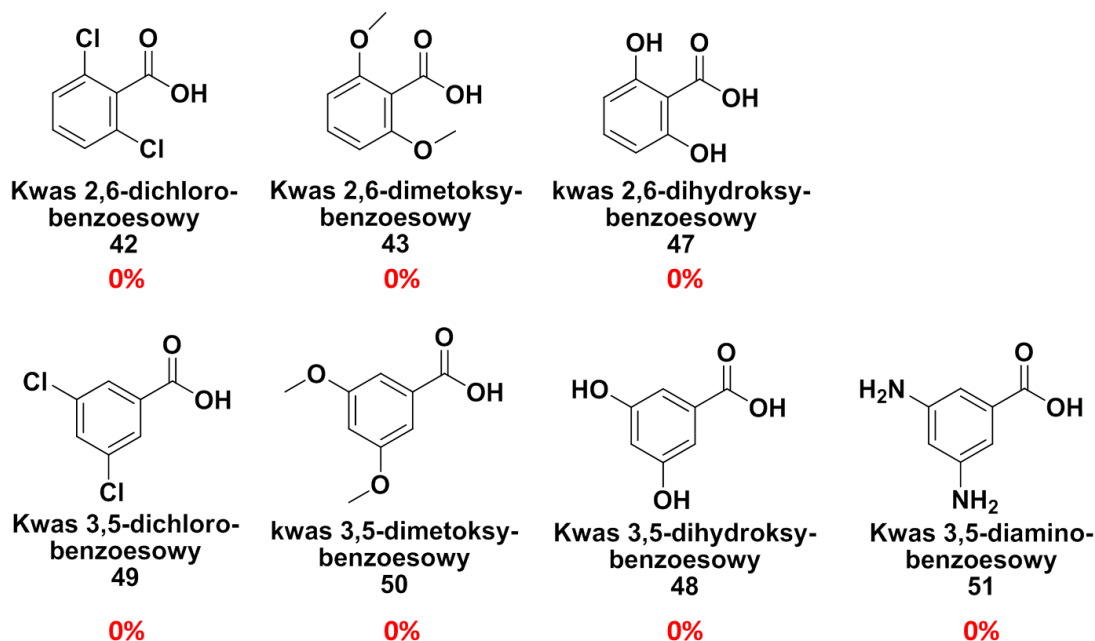
Po zaobserwowaniu, że grupa hydroksylowa w kwasie salicylowym ma kluczowe znaczenie w kontekście działania biologicznego zbadano wpływ jej położenia w pierścieniu względem grupy karboksylowej (Rys. 34). W tym celu przebadano kwas 3-hydroksybenzoesowy (**39**) oraz 4-hydroksybenzoesowy (**40**). Oba z kwasów okazały się nieaktywne biologicznie, co wskazuje, że pozycja grupy hydroksylowej w pozycji 2 jest kluczowa dla efektywności biologicznej.

Następne badania skupiły się na określeniu wpływu dodania drugiej grupy hydroksylowej do kwasu salicylowego (Rys. 34). W tym celu przebadano kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy (**44**), 2,4-dihydroksybenzoesowy (**45**), 2,5-dihydroksybenzoesowy (**46**) i 2,6-dihydroksybenzoesowy (**47**). Okazało

się, że żadna z testowanych pochodnych dihydroksylowych nie była aktywna biologicznie. Bardzo zastanawiający jest fakt, że kwas 2,6-dihydroksybenzoesowy nie wykazywał aktywności biologicznej, pomimo że jest symetryczny i obie grupy hydroksylowe są ułożone względem karboksylowej w sposób analogiczny jak w kwasie salicylowym. To sugeruje, że dopasowanie induktora odporności u roślin do białka bądź enzymu musi mieć charakter bardziej przestrzenny, obejmujący nie tylko kilka atomów w cząsteczce, ale całą strukturę.

3.2.3.8. Badania pochodnych kwasu benzoowego zawierających dwa podstawniki

Poziom indukcji SAR:



Rys. 35 Wyniki aktywności biologicznej pochodnych kwasu benzoowego z dwoma podstawnikami

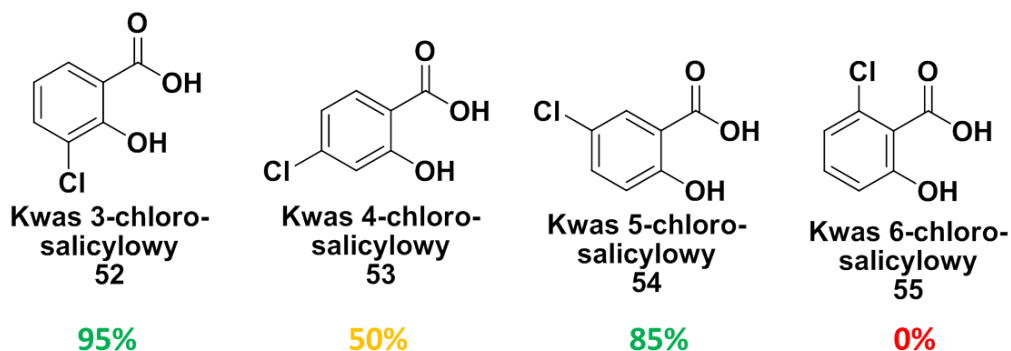
W tej części badań skupiono się na określeniu zdolności do indukcji SAR przez dwie grupy związków (Rys. 35). Pierwszą z nich były pochodne kwasu

salicylowego (a ostatecznie benzoesowego) posiadające podstawniki w pozycjach 2 i 6. Wybranie tej grupy związków do badań wynikało z faktu, że oczekiwano wysokiej aktywności indukcji SAR w testowanym układzie biologicznym przez kwas 2,6-dihydroksybenzoesowy **(47)**, a związki te badano równolegle jako jego analogi. Pochodne posiadające atomy chloru **(42)** bądź grupy metoksyłowe **(43)** w pozycjach 2 i 6 były również nieaktywne biologicznie (czego można było się spodziewać już z wyników badań kwasów 2-chlorobenzoesowego **(31)** oraz 2-metoksybenzoesowego **(32)**).

Drugą grupę związków wybrano do badań ze względu na podobieństwo kwasu 3,5-dichlorobenzoesowego do 2,6-dichloroizonikotynowego. Na etapie planowania badań założono, że pochodna bez atomu azotu będzie również, chociaż w pewnym stopniu, aktywna biologicznie. Niestety, wyniki wykazały, że żadna z badanych substancji nie wykazała wpływu na indukcję odporności u roślin.

3.2.3.9. Dodanie chloru do pierścienia aromatycznego kwasu salicylowego

Poziom indukcji SAR:



Rys. 36 Aktywność biologiczna z pochodnymi kwasu salicylowego, z podstawnikiem chlorowym

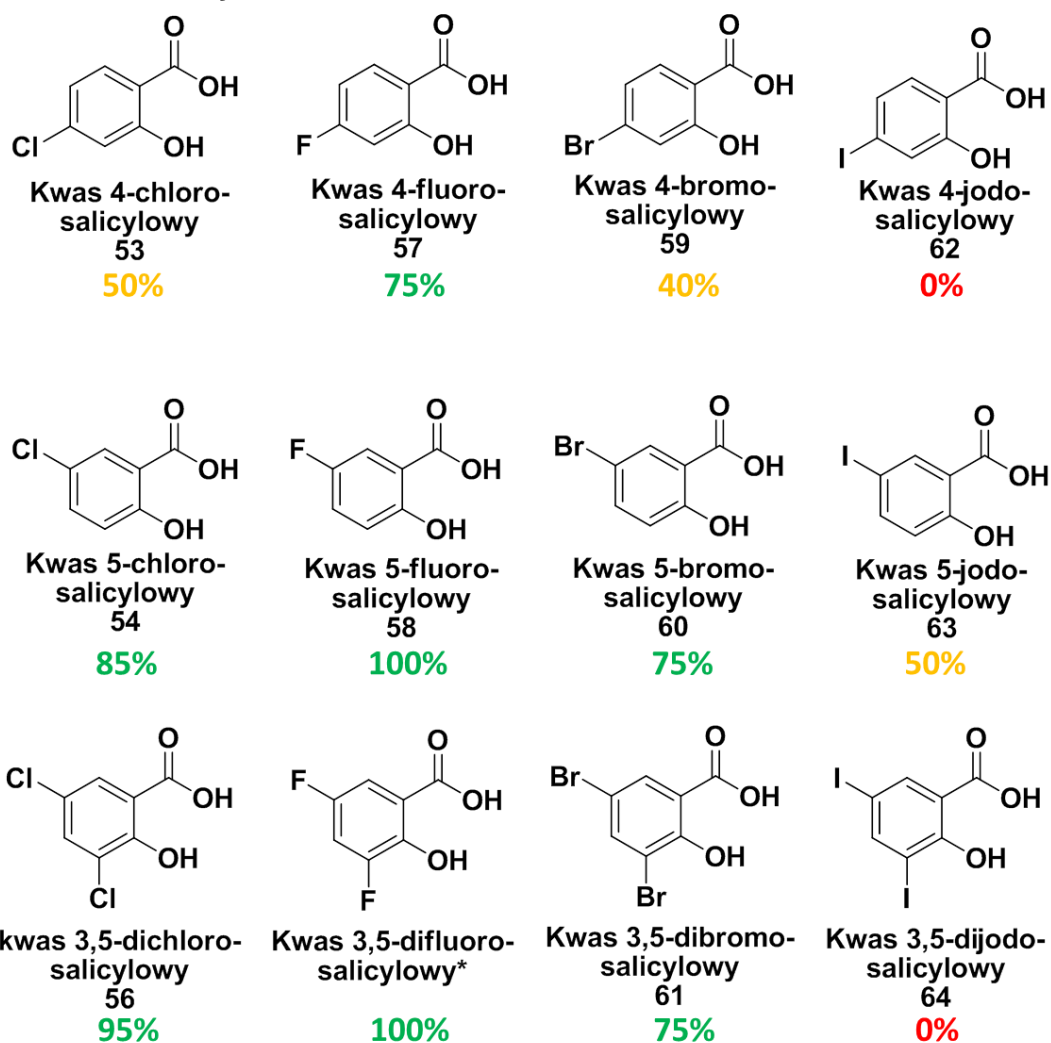
Następnym krokiem w badaniach nad pochodnymi indukcji SAR było zbadanie związków zawierających atom chloru, podstawiony w każdej z pozycji kwasu salicylowego (Rys. 36). Jak się okazało, tego typu modyfikacja może zarówno wzmocnić jak i osłabić działanie induktora. Miejscem podstawienia chloru umożliwiającym najwyższą skuteczność biologiczną w indukcji odporności jest pozycja 3, czyli w pozycji *orto* do grupy hydroksylowej i *meta* do grupy karboksylowej. Kwas 3-chlorosalicylowy (**52**) wykazał bardzo dużą aktywność biologiczną, indukując SAR na poziomie 95%. Bardzo zbliżony potencjał do indukcji SAR wykazał również kwas 5-chlorosalicylowy (**54**), redukując infekcję wirusową o 85% w stosunku do kontroli. Warto nadmienić, że pozycje podstawienia chloru w tych dwóch związkach względem grupy karboksylowej są identyczne jak w kwasie 2,6-dichloroizonikotynowym.

Umiarkowaną aktywność wykazał kwas 4-chlorosalicylowy (**53**), sugerując, że ta pozycja podstawienia chloru jest mniej korzystna. Kompletnie

nieaktywnym biologicznie związkiem okazał się kwas 6-chlorosalicylowy (55).

3.2.3.10. Wpływ rodzaju halogenku wprowadzonego do kwasu salicylowego

Poziom indukcji SAR:



Rys. 37 Wyniki aktywności biologicznej badanych halogenowanych pochodnych kwasu salicylowego

W kolejnym etapie badań skupiono się na określeniu wpływu rodzaju wprowadzonego do struktury kwasu salicylowego halogenku na aktywność biologiczną związków (Rys. 37). W tym celu przebadano pochodne

posiadające halogenek w pozycjach 4, 5 oraz dihalogenowe pochodne w pozycjach 3 i 5. Pierwszym z wniosków, jakie można wysnuć, jest stwierdzenie, że związki posiadające atom halogenka w pozycjach 5 lub 3 i 5 wykazują zdecydowanie wyższą aktywność biologiczną niż pochodne z halogenem w pozycji 4.

Porównując wpływ charakteru halogenka na aktywność biologiczną, można zauważyć, że w każdej z grup związków najwyższą efektywność wykazywała pochodna fluorowana – kwas 3,5-difluorosalicylowy (wynik ekstrapolowany z literatury) i 5-fluorosalicylowy **(58)** wykazujące 100% inhibicji choroby wirusowej oraz kwas 4-fluorosalicylowy **(57)** o skuteczności 75%. Drugą najbardziej efektywną grupą były chlorki omawiane w poprzednim podrozdziale, z których najwyższą efektywność na poziomie 95% wykazał kwas 3,5-dichlorosalicylowy **(56)**. Pochodne bromkowe wykazywały też silne działanie indukcji SAR, jednakże słabsze niż związki podstawione fluorem i chlorem. Była to indukcja SAR na poziomie 75% dla kwasów 3,5-dibromosalicylowego **(61)** i 5-bromosalicylowego **(60)** oraz 40% dla kwasu 4-bromosalicylowego **(59)**.

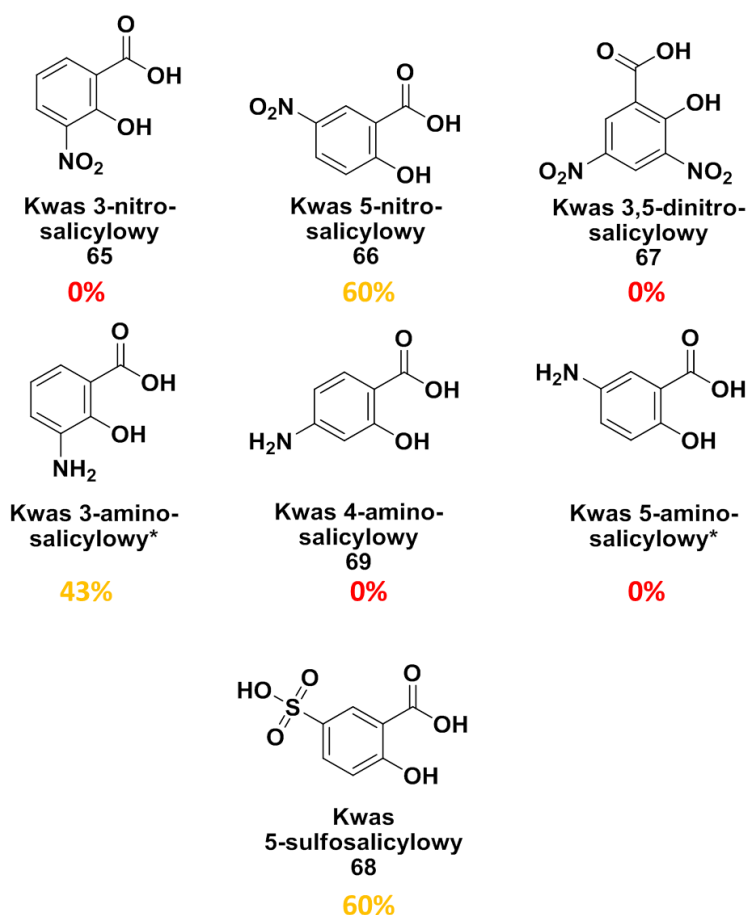
Najniższą aktywność biologiczną wykazywały pochodne z podstawnikami w postaci atomów jodu, które w pozycji 4 (kwas 4-jodosalicylowy **(62)**) oraz 3 i 5 (kwas 3,5-dijodosalicylowy **(64)**) były nieaktywne biologicznie, a w pozycji 5 (kwas 5-jodosalicylowy **(63)**) wykazywały umiarkowaną aktywność na poziomie 40%.

Wyniki pokazują, że zarówno położenie w pierścieniu jak i charakter podstawnika halogenowego ma znaczenie dla aktywności biologicznej.

Przede wszystkim aktywność biologiczna układu się zgodnie ze zmianą parametrów fizycznych w grupie 17 układu okresowego, gdzie najaktywniejsze są pochodne zawierające atom fluoru, który charakteryzuje się bardzo małą wielkością i niezwykle wysoką elektroujemnością, co jest najprawdopodobniej preferowane przez centrum aktywne białka z którym się łączy.

3.2.3.11. Inne pochodne kwasu salicylowego, z podstawnikami nitrowym, aminowym i sulfonowym

Poziom indukcji SAR:



Rys. 38 Wyniki aktywności biologicznej pochodnych kwasu salicylowego, z podstawnikami nitrowym, aminowym i sulfonowym

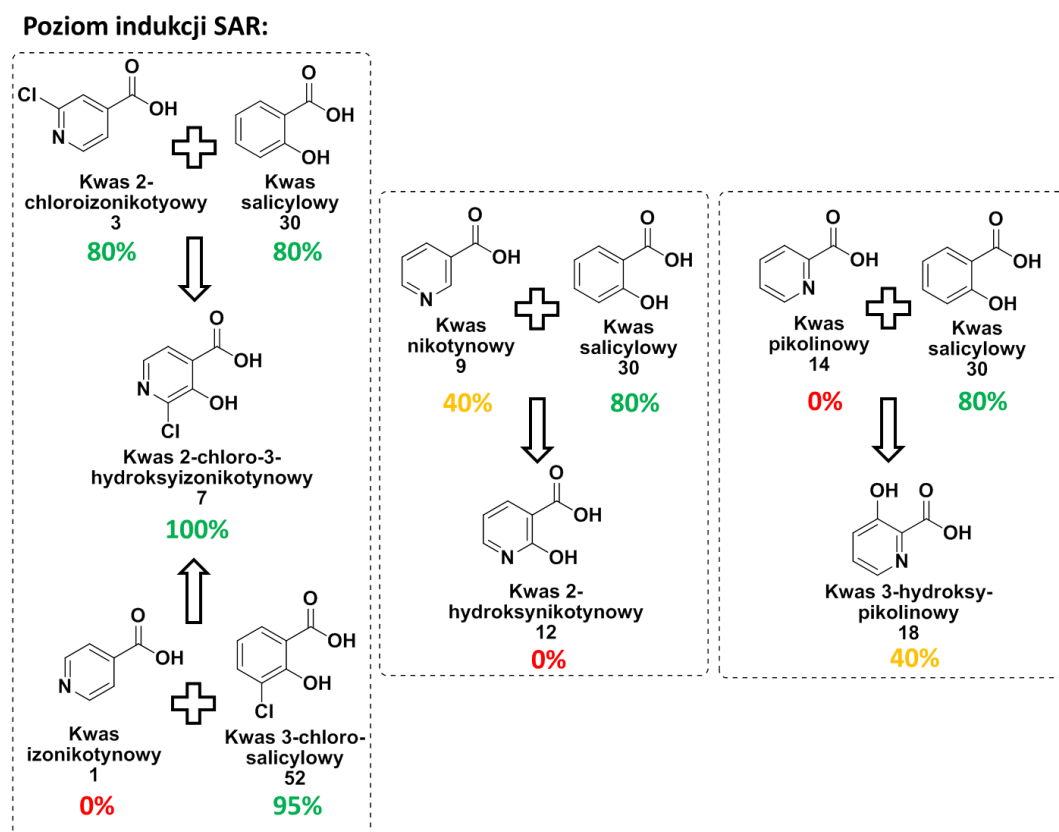
W tym etapie badań określono wpływ podstawnika nitrowego, aminowego i sulfonowego na aktywność biologiczną pochodnych kwasu salicylowego (Rys. 38). Pierwszą grupą związków są pochodne zawierające grupę nitrową, mianowicie kwas 3-nitrosalicylowy **(65)**, 3,5-dinitrosalicylowy **(67)** i 5-nitrosalicylowy **(66)**. Dwa pierwsze okazały się kompletnie nieaktywne biologicznie, natomiast ostatni ze związków wykazał umiarkowaną aktywność biologiczną na poziomie inhibicji choroby wirusowej równym 60%. Wynik ten sugeruje, że obecność tego podstawnika obniża aktywność części pochodzącej od kwasu salicylowego i w pozycji 3 stanowi większą zawadę steryczną w dopasowaniu do białek lub enzymów roślinnych niż w pozycji 5.

Odwrotną sytuację można zaobserwować wśród pochodnych aminowych, wśród których przebadano nieaktywny, jak się okazało, kwas 4-aminosalicylowy **(69)**. Do celów porównawczych użyto danych dostępnych w literaturze dla związków 3-aminosalicylowego i 5-aminosalicylowego (oznaczone gwiazdką). W tym przypadku, aktywność biologiczna została również osłabiona w stosunku do kwasu salicylowego, ale aktywnym związkiem pozostał kwas 3-aminosalicylowy.

Ostatnim testowanym w tej grupie związkiem był kwas 5-sulfosalicylowy **(68)**, wykazujący aktywność biologiczną na poziomie 60%. Jest to więc obniżenie aktywności w stosunku do kwasu salicylowego, jednak w stopniu umożliwiającym stosowanie tego związku jako induktora odporności u roślin. Jest to również pierwsza znana pochodna kwasu

salicylowego z podstawnikiem sulfonowym o udowodnionym działaniu indukcji SAR.

3.2.3.12. Badanie hybryd strukturalnych badanych induktorów odporności u roślin



Rys. 39 Aktywność biologiczna hybryd kwasu salicylowego i nikotynowego

Znając ogólne zasady aktywności biologicznej wśród pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego oraz salicylowego określono wpływ połączenia struktur odpowiadających za aktywność biologiczną w tych dwóch grupach pochodnych. W tym celu przebadano połączenie kwasu 2-chloroizonikotynowego (**3**), nikotynowego (**9**) oraz pikolinowego (**14**) z kwasem salicylowym (**30**) (Rys. 39).

W pierwszym przypadku badany związek, czyli kwas 2-chloro-3-hydroksyizonikotynowy (**7**), wykazał się aktywnością biologiczną na najwyższym poziomie spośród wszystkich pochodnych inhibując w 100% infekcję wirusową. Jak się okazało, połączenie strukturalne w tym przypadku ma charakter synergistyczny, ponieważ wyjściowe związki, czyli kwas 2-chloroizonikotynowy (**3**) i salicylowy (**30**) wykazywały aktywność na poziomie 80% każdy. Związek ten można jeszcze rozpatrywać w kontekście połączenia kwasu izonikotynowego (**1**) oraz 3-chlorosalicylowego (**52**). W tym przypadku również możemy mówić o synergizmie, ponieważ działanie kwasu 2-chlorosalicylowego (95% aktywności) zostało wzmocnione przez obecność azotu w pierścieniu w pozycji *para* do grupy karboksylowej, pomimo tego, że wyjściowy kwas nikotynowy był nieaktywny biologicznie (0% indukcji SAR).

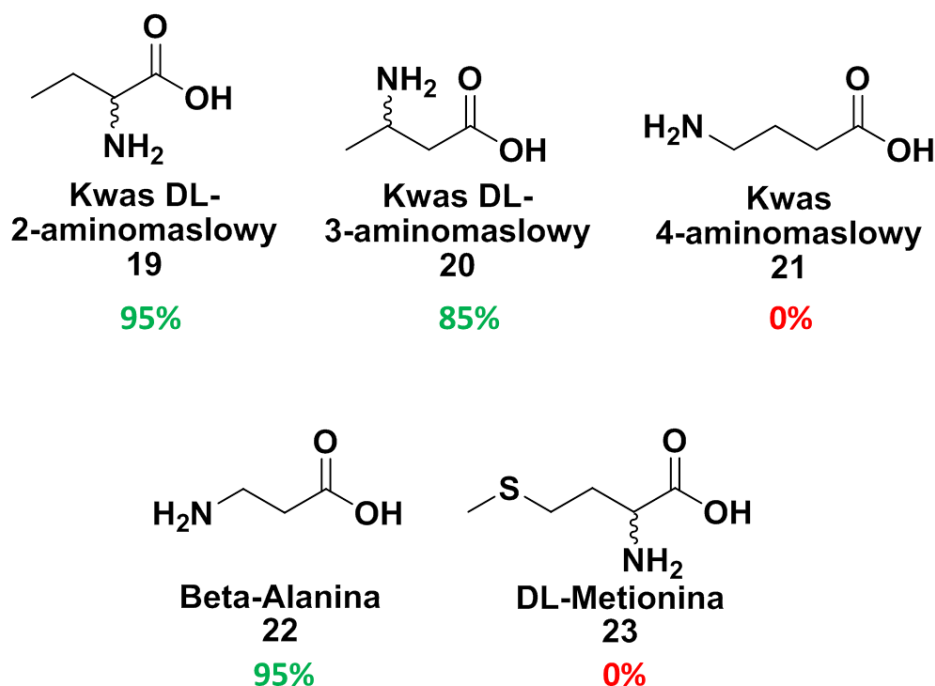
W drugim przypadku przedmiotem badań był kwas 2-hydroksynikotynowy (**12**), będący połączeniem kwasu nikotynowego (**9**), czyli jedyne niepodstawione induktora oparte na pierścieniu heterocyklicznym i wykazującego aktywność biologiczną (na poziomie 40%) oraz kwasu salicylowego (**30**) o aktywności 80% inhibicji choroby wirusowej. Niestety, pomimo wysokich oczekiwań badana struktura okazała się nieaktywna biologicznie. Może to świadczyć o tym, że obecność azotu w pierścieniu w pozycji *orto* do grupy hydroksylowej działa niekorzystnie na dopasowanie się induktora do centrum aktywnego enzymu lub białka.

Badania biologiczne kwasu 3-hydroksypikolinowego (**18**) wykazały aktywność biologiczną tego związku na poziomie 40%. Wiedząc, że znanym

induktorem odporności u roślin jest kwas salicylowy, badany związek jest jego modyfikacją poprzez wprowadzenie atomu azotu do struktury induktora w pozycję *orto* do grupy karboksylowej i *meta* w stosunku do hydroksylowej. Taka modyfikacja powoduje obniżenie aktywności biologicznej w stosunku do znanego induktora, choć nie tak znacznie jak całkowita dezaktywacja w przypadku kwasu 2-hydroksynikotynowego (**12**), omawianego w poprzednim akapicie. Z drugiej jednak strony badany związek jest pierwszą znaną pochodną kwasu pikolinowego o potwierdzonym działaniu jako induktor odporności u roślin.

3.2.3.13. Badanie pochodnych kwasu DL-2-aminomasłowego (BABA)

Poziom indukcji SAR:



Rys. 40 Aktywność biologiczna pochodnych kwasu 3-aminomasłowego (BABA)

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przebadano również na badania pochodne kwasu 3-aminomasłowego (**20**), znanego w literaturze dotyczącej

indukcji SAR jako BABA (czyli kwas β -aminomasłowy) (Rys. 40). Wszystkie badane związki, o ile występują w postaci enancjomerów, były badane w formie ich mieszaniny racemicznej.

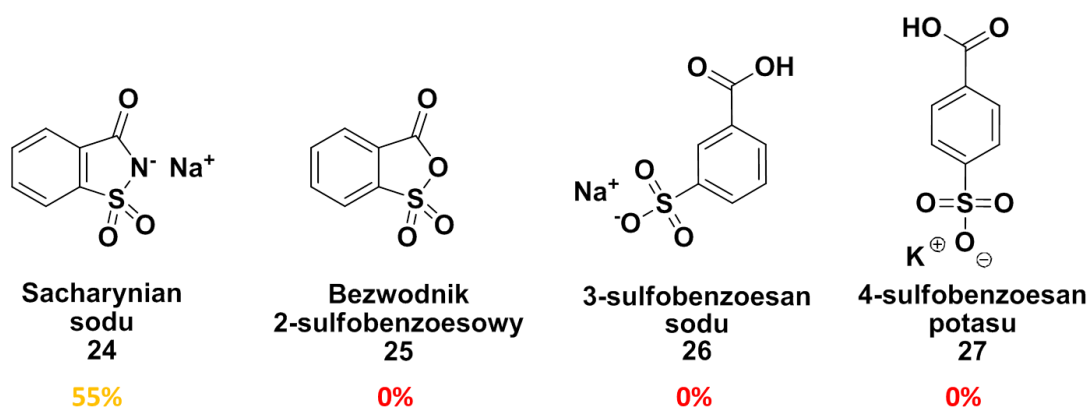
Wyniki aktywności biologicznej wykazały, że związek wyjściowy BABA (**20**) wykazywał wysoką aktywność biologiczną na poziomie 85%. Jego pochodna z przeniesionym podstawnikiem aminowym w pozycję α - kwas 2-aminomasłowy (**19** - inaczej α -aminomasłowy (AABA)) wykazał jeszcze wyższą aktywność biologiczną na poziomie 95%. Przesunięcie grupy aminowej w drugą stronę, czyli w pozycję γ w stosunku do grupy karboksylowej w kwasie 4-aminomasłowym (**21** - inaczej γ -aminomasłowy, (GABA)) spowodowało dezaktywację cząsteczki. Kluczowe dla aktywności biologicznej wydaje się więc położenie grupy aminowej $-NH_2$ w stosunku do karboksylowej, możliwie blisko niej w położeniach α i β . Dodatkowym aspektem decydującym o braku aktywności kwasu 4-aminomasłowego może być fakt, że grupa aminowa znajdująca się na końcu łańcucha alkilowego znacznie zwiększa rozmiar (długość) aminokwasu uniemożliwiająca poprawną interakcję z białkiem bądź enzymem roślinnym.

Na potwierdzenie tej tezy przebadano metioninę (**23**), pochodną najbardziej efektywnego aminokwasu 2-aminomasłowego, ale z przyłączoną w pozycji gamma grupą tiometylową. Związek ten okazał się nieaktywny, co wskazuje na fakt, że pomimo najbardziej efektywnego biologicznie układu grupy aminowej względem karbonylowej zawada steryczna tworzona przez grupę tiometylową jest zbyt duża i uniemożliwia dopasowanie do mechanizmów roślinnych.

Ostatnią z pochodnych przebadanych w kontekście pochodnych BABA była β -alanina (**22**), czyli kwas β -aminomasłowy ze skróconym łańcuchem alkilowym w którym grupa aminowa zajmuje pozycję terminalną. Ten związek również wykazał niezwykle wysoki poziom indukcji SAR w postaci 95% inhibicji choroby wirusowej w badanym układzie. Wynik ten ponownie potwierdza, że związek posiadający mniejszą długość wykazuje wyższą aktywność biologiczną.

3.2.3.14. Badanie pochodnych sacharyny

Poziom indukcji SAR:



Rys. 41 Aktywność biologiczna pochodnych sacharyny

Kolejną grupą związków badanych w ramach rozprawy doktorskiej były pochodne sacharyny (Rys. 41). Jej pochodna jonowa w postaci sacharynianu sodu (**24**), wykazała umiarkowaną aktywność biologiczną na poziomie 55%. Przebadano pochodną posiadającą atom tlenu w miejscu atomu azotu, czyli bezwodnik 2-sulfobenzoesowy (**25**). Związek okazał się nieaktywny biologicznie, co pokazuje, że atom azotu w tym układzie jest kluczowy do działania biologicznego cząsteczki. W tej grupie pochodnych przebadano również takie związki jak 3-sulfobenzoesan sodu (**26**) oraz

4-sulfobenzoesan potasu (**27**), które również okazały się nieaktywne biologicznie. Zakwalifikowanie tych związków do badań wiązało się z tym, że na etapie planowania eksperymentów założono aktywność biologiczną bezwodnika 2-sulfobenzoesowego. Chciano więc wykazać wpływ położenia grupy sulfonowej w pierścieniu na zdolność związków do indukcji SAR. Niestety wszystkie te pochodne okazały się nieaktywne.

3.3. Wyniki badań biologicznych na roślinach strefy tropikalnej

Wyjazd do Ekwadoru w celu przeprowadzenia badań induktorów odporności na roślinach strefy tropikalnej przeciwko chorobom tam występującym traktowałem jako wielką szansę na otrzymanie unikalnych wyników badań. W literaturze brak jest doniesień na temat indukcji SAR na roślinach papai i babako w celu zapobiegania rozwojowi infekcji wirusowej. To samo tyczy się sposobów powstrzymywania choroby MLND na kukurydzy, która jest bardzo dotkliwa dla rolników, powodując znaczną redukcję plonów. Do badań w ramach stażu wybrano wszystkie związki wykazujące najwyższe wartości inhibicji choroby wirusowej spośród substancji testowanych w Polsce na roślinach tytoniu.

3.3.1. Badania wstępne na roślinach kukurydzy, papai i babako

Badania wstępne przeprowadzono w dawkach 250 mg/L dla pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego, salicylowego i 3-aminomasłowego oraz 20 mg/L dla pochodnych BTH na roślinach kukurydzy, papai oraz babako. Pierwsze próby aplikacji pokazały, że liście tych roślin są stosunkowo hydrofobowe, przez co w celu prowadzenia oprysków konieczne jest zastosowanie adjuwanta. Tak przygotowane formułacje

aplikowano na rośliny, po czym standardowo po siedmiu dniach inokulowano wirusa, a po kolejnych 7 – 14 dniach (w zależności od badanej rośliny) oceniano występowanie widocznych śladów infekcji wirusowej.

Wyniki tych testów nie były zgodne z oczekiwaniami, ponieważ żaden z badanych związków nie wykazał jakiegokolwiek inhibicji choroby wirusowej na żadnym z testowanych gatunków roślin. Podniesiono więc dawki substancji badanych z 250 mg/L do 500 mg/L dla pochodnych kwasów INA, SA i BABA oraz z 20 mg/L do 50 mg/L dla pochodnych BTH. Po powtórzeniu eksperymentów wyniki były tożsame z poprzednio uzyskanymi – żadna z testowanych substancji nie wykazała aktywności biologicznej.

Następnie uznano, że barierą może być wchłanianie substancji poprzez powierzchnię liści. W celu weryfikacji wpływu metody aplikacji powtórzono testy indukcji SAR na badanych roślinach, ale podlewając je roztworem substancji badanej już w wyższym stężeniu (80 ml na roślinę). Ponownie zaobserwowano brak oznak inhibicji choroby wirusowej na roślinach traktowanych induktorami odporności.

3.3.2. Objawy choroby wirusowej widoczne na testowanych roślinach



Fot. 13 Skutki choroby MLND na młodych roślinach kukurydzy w warunkach szklarniowych

Na roślinach kukurydzy po około 7 dniach od inokulacji widoczne były delikatne żółte przebarwienia liści widoczne wzdłuż blaszki liściowej. W dalszym czasie (kolejne 7 dni) obserwowano żółknięcie całej powierzchni blaszki liściowej (Fot. 13), które skutkowało jej całkowitym obumarciem.

Na roślinach papai widoczne były mozaikowate przebarwienia młodych liści wierzchołkowych (Fot. 14 - początkowe stadium choroby), co dalej prowadziło do inhibicji ich wzrostu. Taka roślina w warunkach polowych nie wydałaby plonu bądź plon ten byłby mocno zredukowany.



Fot. 14 Widoczne przebarwienia młodych liści papai w wyniku infekcji wirusem PRSV

Na babako natomiast w efekcie choroby wirusowej dochodzi do zgrubienia i karłowacenia młodych liści wierzchołkowych oraz występowania przebarwień na ich powierzchni (Fot. 15). Prowadzi to do inhibicji wzrostu rośliny.



Fot. 15 Zniekształcenia liści wierzchołkowych roślin babako, będące następstwem choroby wirusowej (po prawej) w porównaniu do liści roślin zdrowych (ten sam etap wzrostu)

3.3.3. Fitotoksyczność spowodowana zastosowaniem induktorów odporności u roślin

Stosowanie induktorów odporności w dawkach początkowych, to jest 250 mg/L dla pochodnych kwasów INA, SA i BABA oraz 20 mg/L dla pochodnych BTH nie powodowało efektów fitotoksycznych na roślinach badanych. Niestety, podwojenie dawki każdego z induktorów wywołało już efekt fitotoksyczny różniący się między badanymi roślinami.

Induktory SAR zastosowane w wyższej dawce na roślinach kukurydzy spowodowały lekkie żółknięcie liści, jednak, co jest pewnym zaskoczeniem stymulowały wzrost roślin (Fot. 16). Na roślinach papai można było zauważyć natomiast inhibicję wzrostu roślin, karłowatość młodych liści wierzchołkowych oraz plamy nekrotyczne na powierzchni liści (Fot. 17). Bardzo ciekawe efekty fitotoksyczności zaobserwowano na babako. Zastosowanie induktora w wyższej dawce prowadzi tam do obumarcia młodych liści oraz ich opadnięcia (Fot. 18).



Fot. 16 Widoczne lekkie żółknięcie liści oraz stymulacja wzrostu po zastosowaniu induktora odporności na roślinach kukurydzy (3 rośliny po prawej) w porównaniu do kontroli (3 rośliny po lewej).



Fot. 18 Skutek podania induktora odporności na rośliny babako



Fot. 17 Żółknięcie liści i inhibicja wzrostu roślin papai potraktowanych induktorami odporności (rzędy od frontu) w porównaniu do kontroli (rzędy tylne).

3.3.4. Dalsze badania induktorów SAR na roślinach kukurydzy

Na tym etapie badań zdecydowano aby skupić się wyłącznie na roślinach kukurydzy, z uwagi na dużą dostępność materiału siewnego (po rośliny papai i babako zaopatrywano się w szkółkach plantatorskich, oddalonych od miejsca prowadzenia badań), który uprawiany był na miejscu i na nich spróbować zoptymalizować testy tak, aby osiągnąć cel w postaci inhibicji choroby wirusowej świadczącej o indukcji SAR.

Kolejnym z testów było określenie wpływu stężenia inokulum wirusowego na rozwój choroby wirusowej w roślinach wcześniej potraktowanych induktorami. W tym celu, 7 dni po aplikacji induktorów rośliny infekowano inokulum wyjściowym w serii rozcieńczeń pięciokrotnych, od stężenia wyjściowego do inokulum rozcieńczonego 625-krotnie. W wyniku testu zaobserwowano, że inokulum wirusowe prowadzi do infekcji wirusowej w rozcieńczeniach sięgających 125-krotnego, jednak sama choroba wirusowa w początkowym stadium przebiega wolniej. Jedynie roztwór rozcieńczony 625 razy okazał się już za mało wirulentny. Ponownie, nie było różnic pomiędzy roślinami kontrolnymi, a tymi traktowanymi induktorami odporności.

Dalej skupiono się na modyfikacji liczby aplikacji induktora odporności oraz czasu pomiędzy aplikacją a mechanicznym inokulowaniem wirusa. W pierwszym z wariantów testu rośliny kukurydzy były traktowane induktorem dwukrotnie co 7 dni, zarówno poprzez oprysk jak i podlewanie, a następnie inokulowane wirusem 7 dni po ostatniej aplikacji substancji badanej. W drugim wariacie induktory aplikowano raz, natomiast wirusa

inokulowano po 3, 5, 7, 9, 11, i 13 dniach po użyciu substancji aktywnej. W żadnym z testów nie osiągnięto pozytywnych rezultatów.

Ostatnim z badań były badania w warunkach polowych na kukurydzy. Naturalna presja środowiska i przenoszenie wirusa poprzez insekty żerujące na roślinach jest mniej wirulentne niż mechaniczne wcieranie inokulum wirusowego, co mogło dać pozytywne rezultaty. Dawka do badań została ustalona na poziomie 80 g/ha dla pochodnych INA, SAL i BABA oraz 8 g/ha dla pochodnych BTH i przeliczona na wielkość poletek doświadczalnych. Rośliny były opryskiwane roztworami substancji badanych w interwale dwutygodniowym przez okres 8 tygodni. W tym przypadku również nie uzyskano pozytywnych rezultatów – wszystkie poletka testowe wykazywały oznaki rozprzestrzenienia się choroby MLND, nawet kontrola na której stosowano insektycydy.

Wyniki otrzymanych badań są dwuznaczne. Pomimo tego, że żadna z chorób wirusowych w badanych układach biologicznych nie została zahamowana nie można jednoznacznie stwierdzić, czy do indukcji odporności nie doszło. Możliwe, że wzbudzona w roślinach indukcja okazała się po prostu niewystarczająca do powstrzymania choroby wirusowej, ponieważ czynnik chorobotwórczy był zbyt wirulentny. Aby to zweryfikować niezbędne byłoby wykonanie testów biologii molekularnej określających ekspresję genów PR-1 w testowanych roślinach, co niestety nie było możliwe. Pomimo tego, przetestowano wszystkie z zabranych tam substancji w szerokim spektrum zmiennych oraz określono wpływ działania induktora na fitotoksyczność względem badanych roślin.

4. Podsumowanie

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przebadano 101 związków chemicznych, będących pochodnymi induktorów odporności u roślin. Modyfikacje ich struktur obejmowały derywatyzację do formy jonowej (w przypadku zarówno anionowych jak i kationowych pochodnych BTH) z przeciwnem dodającym drugą funkcję biologiczną w postaci antybakteryjności, syntezę amidów opartych o kwas 2,6-dichloroizonikotynowy, analizowanie wpływu podstawników w pierścieniach kwasów izonikotynowego i salicylowego, położenie azotu w pierścieniu względem podstawnika karboksylowego w analogach kwasu izonikotynowego oraz drobnych zmian strukturalnych w pochodnych dwóch innych induktorów odporności – kwasie 3-aminomasłowym i sacharynie.

Wśród jonowych pochodnych BTH lepszą formą derywatywacji okazała się deprotonacja kwasu karboksylowego do anionu umożliwiając osiągnięcie indukcji SAR na poziomie nawet 100% inhibicji wirusa, aniżeli alkilowanie atomu azotu w pierścieniu tiadiazolowym i tworzenie kationowej pochodnej. Wprowadzenie przeciwnu a właściwościach biobójczych ma pozytywny wpływ na aktywność antybakteryjną i zależy bezpośrednio od rodzaju zastosowanego przeciwnu. Daje to jasny sygnał, że ta metoda modyfikacji związków biologicznie czynnych umożliwia stosunkowo łatwe otrzymywanie związków dwufunkcyjnych o szerokim spektrum działania.

Dodatkowo wykazano, że związki w formie karboksylanów wykazują wyższą biodegradowalność oraz niższą toksyczność w środowisku wodnym od

pochodnych kationowych. Z drugiej strony pochodne kationowe wykazują niższą cytotoxycywność.

Badania neutralnych pochodnych innych induktorów (SA, INA, BABA, SACH) doprowadziły do potwierdzenia aktywności biologicznej części z badanych struktur takich jak halogenowane pochodne kwasu salicylowego, szczególnie w pozycji 3 i 5, oraz kwasu acetylosalicylowego i tiosalicylowego (co jest potwierdzeniem wyników badań prezentowanych we wstępie (Silverman *et al.*)). Poza tym stwierdzono skuteczność wcześniej nie testowanych pochodnych, takich jak kwas 4-bromosalicylowy **(59)** i kwas 3-hydroksypikolinowy **(18)**.

W przypadku pochodnych kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego **(6)** wyłoniono 8 nowych struktur o wysokiej aktywności biologicznej: kwas 2-chloroizonikotynowy **(3)**, kwas nikotynowy **(9)**, kwas 2-chloronikotynowy **(11)**, kwas DL-piperydino-3-karboksylowy **(10)**, kwas 2,6-dichloronikotynowy **(13)** oraz kwas 2-chloro-3-hydroksyizonikotynowy **(7)**, będący hybrydą pomiędzy pochodną izonikotynową, a kwasem salicylowym.

Stwierdzono również, że pochodne amidowe kwasu 2,6-dichloroizonikotynowego wykazują wysoką aktywność biologiczną, jednak nie jest ona zależna od podatności na hydrolizę przyłączonej grupy funkcyjnej. Wynika to z faktu, że trzy z czterech amidów, różniących się przyłączoną grupą, wykazywały taką samą aktywność biologiczną pomimo zróżnicowania strukturalnego przyłączonej grupy funkcyjnej.

Wśród pochodnych kwasu 3-aminomasłowego **(20)** wyłoniono 2 nowe pochodne o wysokiej aktywności biologicznej – kwas 2-aminomasłowy **(19)** oraz β -alaninę **(22)**.

Określono, że praktycznie jedyną formą modyfikacji, która powoduje utrzymanie bądź nawet wzrost aktywności biologicznej, polega na wprowadzeniu atomów halogenka do pierścienia aromatycznego, w szczególności w pozycjach 3 i 5 dla pochodnych SA oraz 2 i 6 dla pochodnych kwasu izonikotynowego. Preferowanymi halogenkami są jedynie atomy fluoru oraz chloru. Wprowadzenie innych grup, takich jak nitrowe czy aminowe generalnie obniża aktywność biologiczną, a w przypadku hydroksylowej powoduje dezaktywację związku. W tym miejscu nasuwa się podstawowy wniosek, że istotną rolę odgrywa hydrofobowy charakter podstawnika, który dodatkowo ma możliwość oddziaływać elektrostatycznych oraz możliwość tworzenia wiązań wodorowych. Wygląda więc na to, że cząsteczka induktora powinna składać się z dwóch części, hydrofilowej obejmującej grupę karboksylową oraz podstawnik w pozycji *orto* oraz hydrofobowej, jednak zdolnej do tworzenia wiązań koordynacyjnych bądź wodorowych realizowanych przez obecność atomu azotu w pierścieniu w bądź podstawników, najlepiej halogenowych, w pozycjach *meta* i *para* w stosunku do grupy karboksylowej.

Wśród pochodnych kwasu salicylowego zastąpienie grupy hydroksylowej inną powoduje zanik aktywności biologicznej, z wyjątkiem grupy tiolowej (analogicznej chemicznie do grupy $-OH$) oraz acylowej (zdolnej do hydrolizy, w wyniku której otrzymujemy wyjściową grupę $-OH$).

Położenie tej grupy w pozycji 2 ma również kluczowe znaczenie dla aktywności biologicznej. Wśród pochodnych kwasu izonikotynowego obecność azotu w położeniu *para* bądź *meta* jest kluczowe dla aktywności biologicznej, która zostaje zahamowana przy umiejscowieniu atomu azotu w pozycji *orto* do węgla karbonylowego.

Wart podkreślenia jest fakt, że pochodną wykazującą jedną z najwyższych aktywności biologicznych był kwas 2-chloro-3-hydroksynikotynowy, będący właściwie hybrydą strukturalną kwasów INA i SA. Jego wysoka aktywność może potwierdzać tezę polegającą na preferowaniu podziału cząsteczki na część hydrofobową i hydrofilową oraz fakt, że oba z tych związków oddziałują na to samo centrum aktywne w białku NPR-1.

Niestety, skuteczność induktorów odporności u roślin w zapobieganiu chorobom roślin charakterystycznych dla strefy tropikalnej zakończyły się niepowodzeniem. Najprawdopodobniej było to spowodowane zbyt wysoką wirulentnością patogenów w badanych układach biologicznych. Konieczne jest przeprowadzenie większej ilości badań, w szczególności z zakresu biologii molekularnej, które pomogłyby zoptymalizować stosowanie elicytorów w tych układach.

Z drugiej strony, bardzo obiecujące wyniki badań biologicznych związków badanych w układzie modelowym, czyli tytoniu inokulowanym wirusem TMV oraz dane literaturowe dotyczące badań nad indukcją odporności u roślin na niezwykle szerokim spektrum badanych układów biologicznych, nie tylko uwzględniających choroby wirusowe, ale również bakteryjne i grzybicze roślin pozwalają przypuszczać, że ta grupa związków może być

w przyszłości ważnym ogniwem w ochronie roślin stosowanej w konwencjonalnym rolnictwie. Otrzymane wyniki wskazują możliwe trendy w modyfikacji neutralnych „rdzeni” induktorów odporności u roślin, które mogą w przyszłości posłużyć do uzyskania związków o jeszcze wyższej aktywności biologicznej. Dodatkowo, drobna modyfikacja tych związków do formy jonowej poprzez deprotonację, umożliwia ich połączenie z przeciwjonem o innych właściwościach biologicznych, przez co możliwe drogi modyfikacji są w praktyce nieskończone.

Takie modułowe podejście do projektowania związków aktywnych biologicznie świetnie wpisuje się również w nowe trendy w rolnictwie, wymuszone poprzez zmiany legislacyjne służące ochronie środowiska. Indukcja odporności, sama w sobie przebiegająca poprzez stymulowanie procesów fizjologicznych roślin i osiągając wysoką skuteczność przeciwko ich chorobom może być dodatkowo „wzbogacona” poprzez inne funkcje biologiczne. Daje to ogromne możliwości do rozwoju metod ochrony roślin idących w stronę rozwiązań mniej wpływających na środowisko naturalne.

5. Streszczenie

Rośliny na drodze ewolucji wykształciły naturalny system immunologiczny, wzbudzany dopiero po ataku patogenu i mający na celu ochronę rośliny przed jego rozprzestrzenianiem. W tym celu w roślinie wytwarzane są substancje, zwane induktorami odporności u roślin mające na celu transfer informacji o zagrożeniu i powodujące ekspresję genów odpowiedzialnych za wzrost odporności. Naturalnymi elicytorami endogennymi są kwas salicyłowy (SA) i jego ester metylowy. Na drodze badań odkryto również szereg innych substancji syntetycznych, zdolnych do indukcji oporności u roślin, takich jak kwas 2,6-dichloroizonikotynowy (INA) czy tioester kwasu 7-karboksybenzo[1.2.3]tiadiazolowego (BTH).

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest zbadanie wpływu modyfikacji struktury chemicznej induktorów odporności u roślin na ich aktywność biologiczną. W tym celu zmodyfikowano kwas salicyłowy, zmieniając podstawnik hydroksylowy w pozycji 2 na inny oraz wprowadzając inne podstawniki (m. in. halogenki, grupy hydroksylowe, aminowe czy nitrowe) w pozycje 3, 4, 5 i 6. W grupie pochodnych INA zbadano wpływ obecności podstawników chlorowych w pozycjach 2 i 6 oraz położenie azotu względem grupy karboksylowej. W Pochodnych BABA zbadano wpływ położenia grupy aminowej w stosunku do karboksylowej. Pochodne BTH, zmodyfikowane do formy jonowej, zarówno w postaci anionowej jak i kationowej i przeprowadzone do formy dwufunkcyjnej soli, zbadano pod kątem aktywności biologicznej jako induktory odporności oraz substancje biobójcze oraz określono również ich podatność na biodegradację, cytotoksyczność i toksyczność w stosunku do organizmów wodnych.

Wszystkie badania wstępne prowadzone były w warunkach szklarniowych w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu na układzie modelowym roślin tytoniu porażonego wirusem mozaiki tytoniu. Najbardziej efektywne z substancji zostały skierowane do badań na układach biologicznych występujących ze strefy tropikalnej, papai porażonej wirusem PRSV, kukurydzy porażonej chorobą MLND oraz babako porażonym kompleksem wirusowym z grupy potexvirus.

W trakcie badań wyłoniono szereg zależności strukturalnych u pochodnych kwasu salicylowego i wykazano, że na zachowanie aktywności biologicznej wpływa (i) obecność grupy hydroksylowej bądź jej analogu (grupy tiolowej) oraz acylowej (najprawdopodobniej hydrolizującej do hydroksylowej) w pozycji 2, (ii) wprowadzenie podstawnika w postaci chloru bądź fluoru, najlepiej w pozycje 3 i 5. Wśród pochodnych kwasu izonikotynowego określono, że obecność atomów chloru w pozycjach 2 i 6 jest kluczowa dla aktywności biologicznej, jak również obecność atomu azotu w pierścieniu heterocyklicznym. Samo położenie azotu względem grupy karboksylowej również odgrywa istotną rolę, ale jest możliwe jego przesunięcie pomiędzy pozycjami *meta* i *para* w stosunku do grupy karboksylowej. Modyfikacja BTH do formy jonowej w celu otrzymania dwufunkcyjnych soli zaowocowała powstaniem szeregu związków łączących funkcje indukcji SAR i antybakteryjne, gdzie preferowaną pod kątem indukcji odporności była derywatywacja do formy anionowej.

6. Summary in English

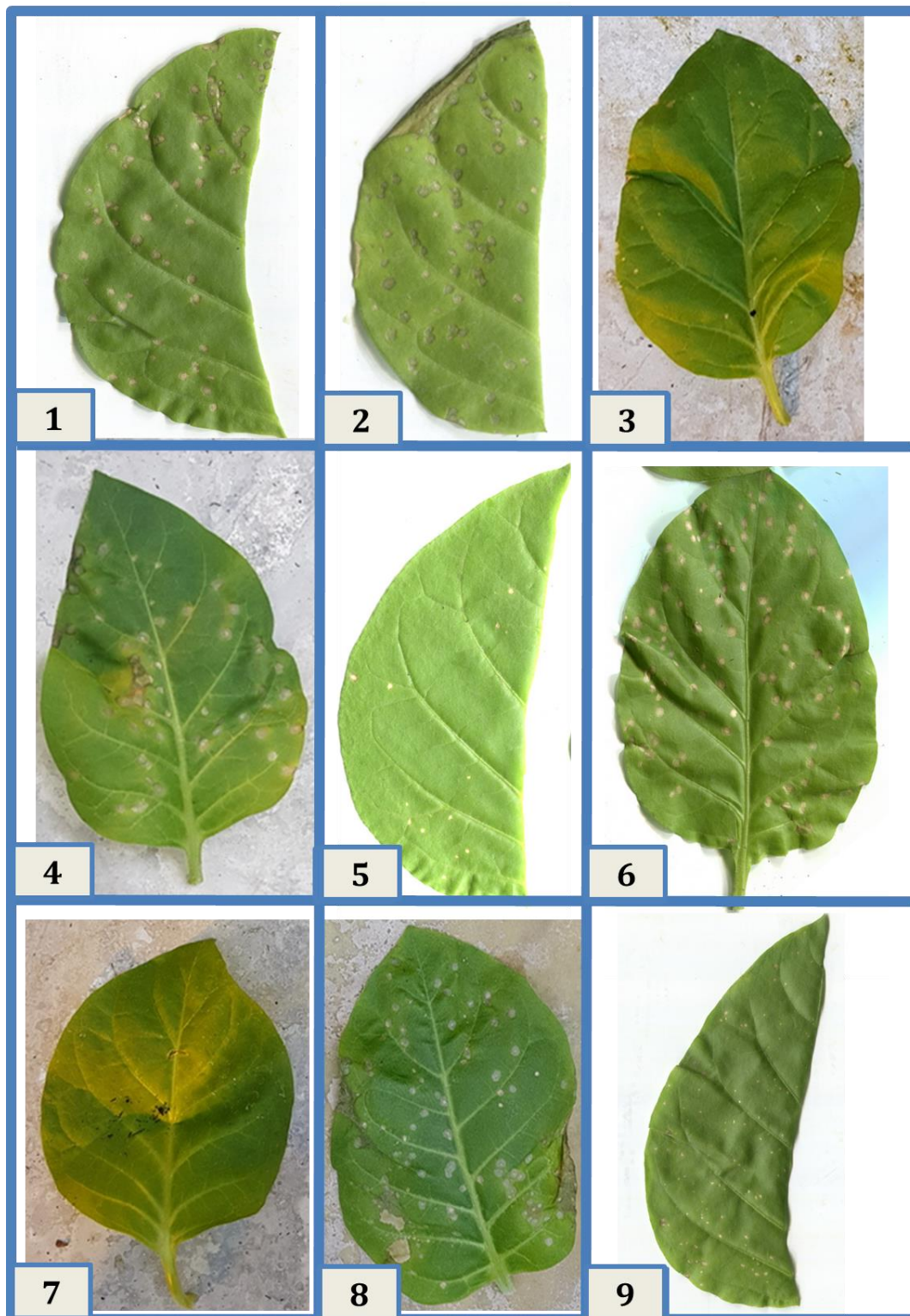
Plants during the evolution process have developed a natural immune system triggered after the attack of pathogen. The information about threat is transported by signaling compounds called plant resistance inducers or elicitors that lead to expression of genes responsible for the increase of immunity. The natural endogenous elicitors are salicylic acid (SA) and its methyl ester (MeSA). Nowadays plenty of other synthetic substances capable of inducing resistance in plants are discovered such as 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA), β -aminobutyric acid (BABA) or 7-thiocarboxybenzo[1.2.3]thiadiazole (BTH).

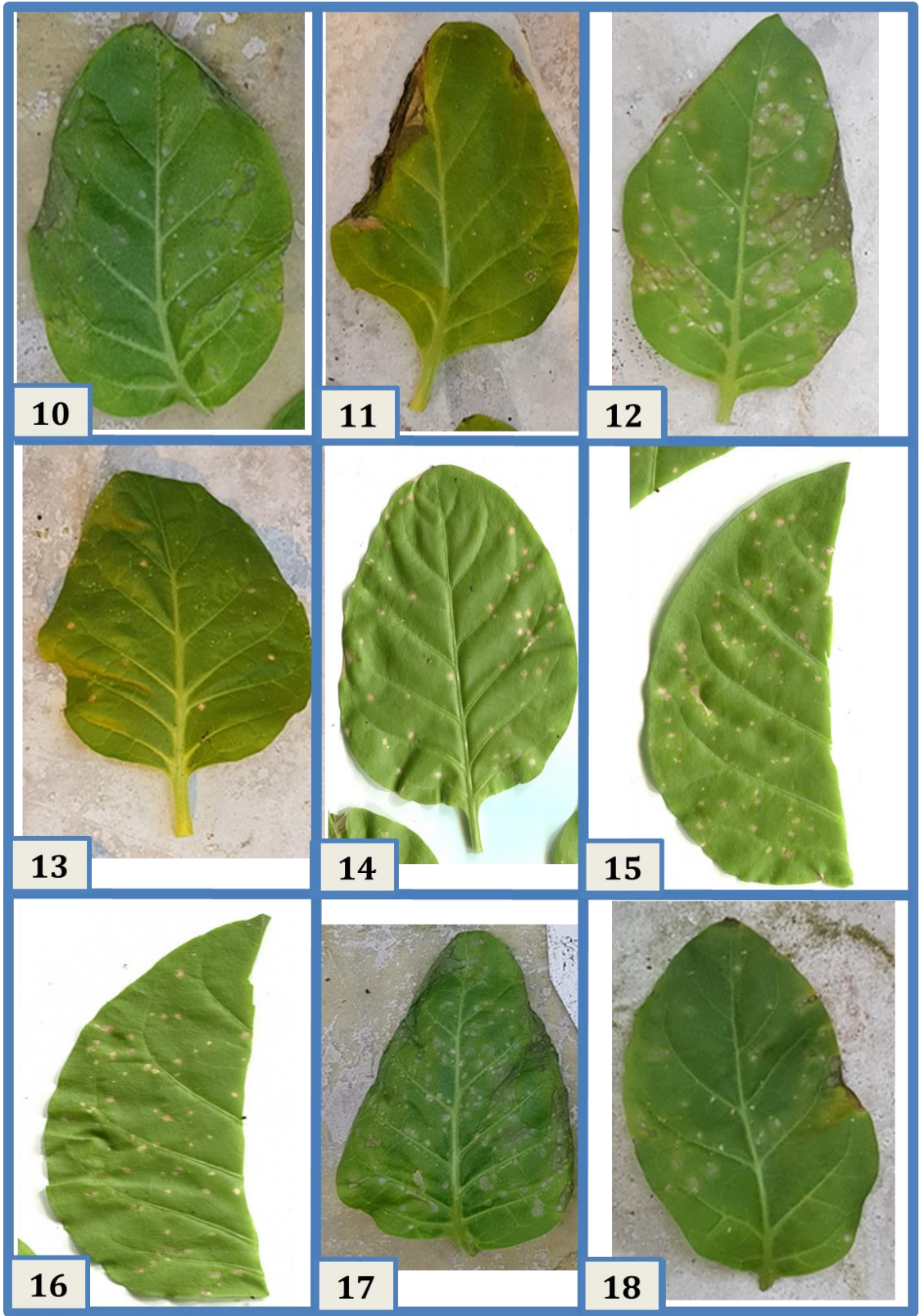
The goal of presented doctoral thesis is to examine the influence of chemical structure modifications of immunity inducers on their biological activity. The research includes modifications of the hydroxyl substituent in the 2-position or introducing other substituents (including halides, hydroxyl, amino or nitro groups) in positions 3, 4, 5 and 6 in salicylic acid as well as the investigation of the effect of presence of chlorine substituents at 2- and 6-positions and position of nitrogen relatively to the carboxylic substituent in the group of INA derivatives. The effect of the amino group on the carboxylic acid was examined in accordance to BABA derivatives. On the other hand BTH derivatives were modified to the bifunctional salts, both in anionic and cationic form and tested toward their biological activity as inducers of resistance as well as biocides. Moreover their biodegradability, cytotoxicity and toxicity to aquatic organisms were determined.

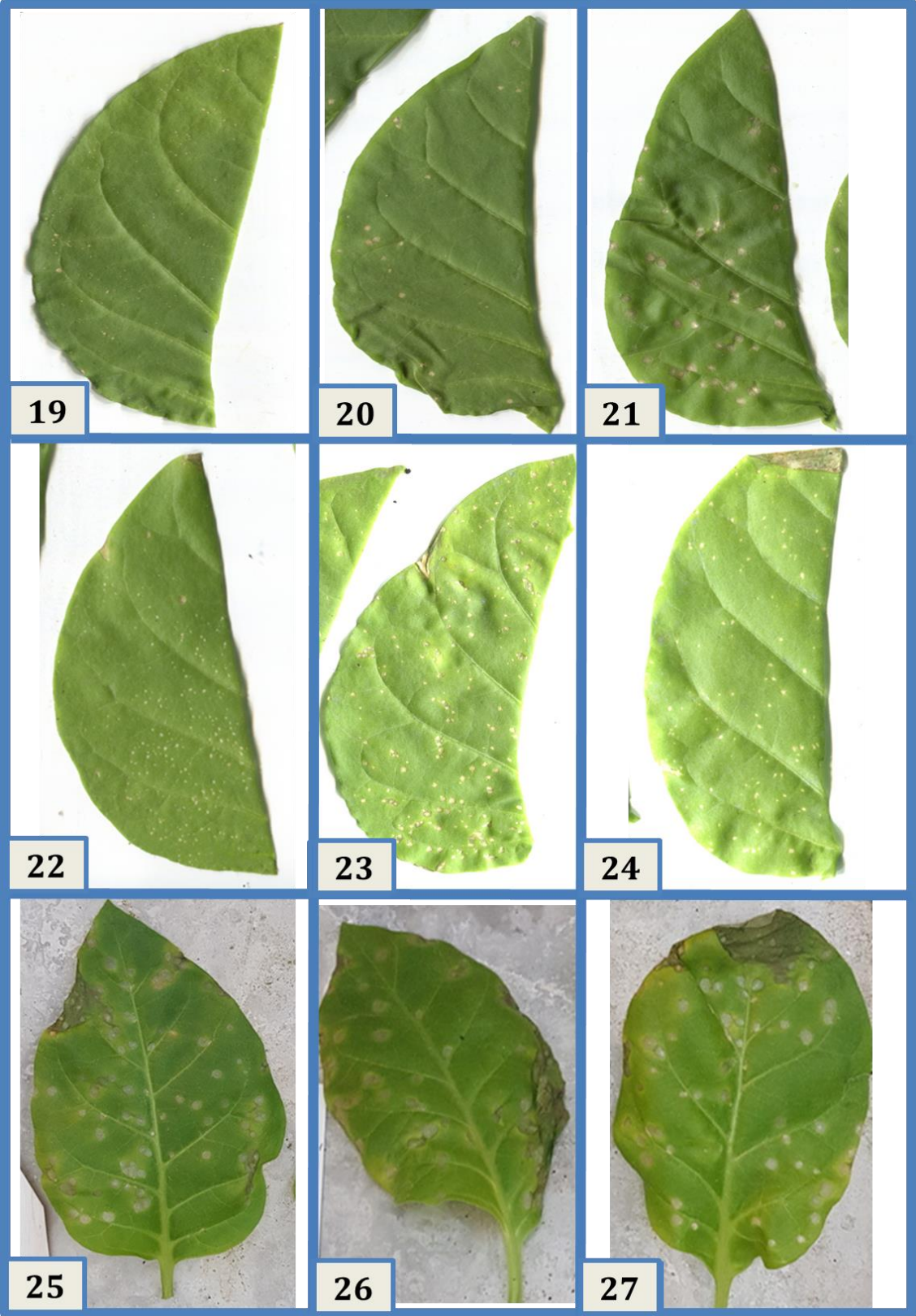
All preliminary tests were performed in greenhouse conditions at the Department of Virology and Bacteriology of the Institute of Plant Protection – National Research Institute in Poznań on the model system of tobacco plants infected with tobacco mosaic virus. The best-performing substances were qualified to research on plant/pathogen models from the equatorial region such as papaya infected by PRSV virus, maize infected by MLND disease and babaco infected by potexvirus complex.

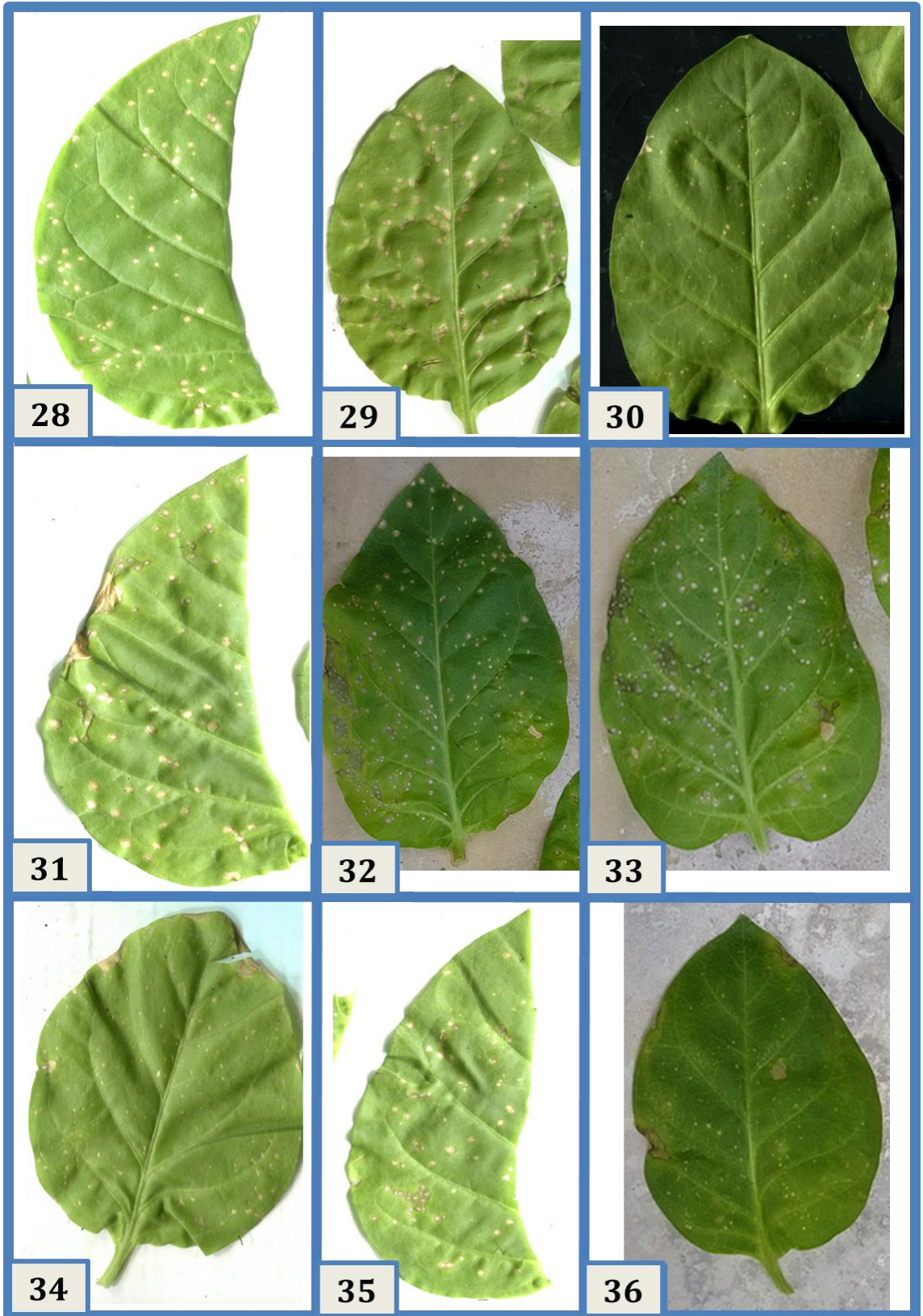
A number of structural relationships were determined as a result of presented studies. It was shown that the biological activity of salicylic acid derivatives is retained when (i) hydroxyl group or its analogue (thiol group) and acyl (most likely hydrolyzing to hydroxyl) is present in 2-position and (ii) the structure is substituted in positions 3 and 5 by small halogen atom – chlorine or fluorine. In the group of INA derivatives presence of chlorine atoms in positions 2 and 6 is crucial for biological activity as well as the presence of a nitrogen atom in heterocyclic ring. The location of nitrogen relatively to the carboxylic group also plays a significant role, but it is possible to move it between *meta* and *para* positions. The modification of BTH to the ionic form and finally bifunctional salts allows to combine the SAR induction and antibacterial properties, although better performance in biological activity was shown for anionic derivatives.

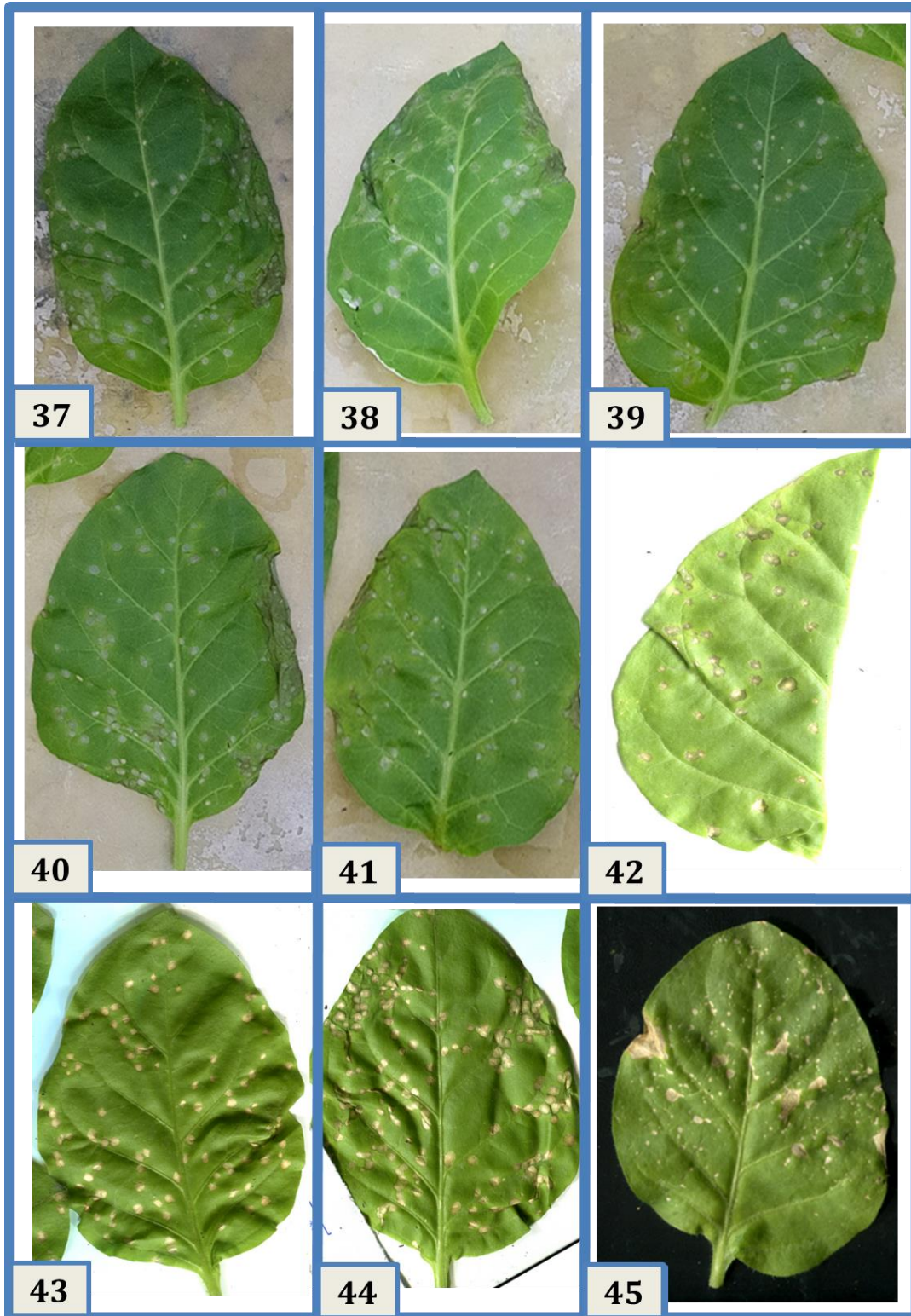
7. Suplement 1 – Fotografie rošlin ukazujúce pozioim indukci SAR

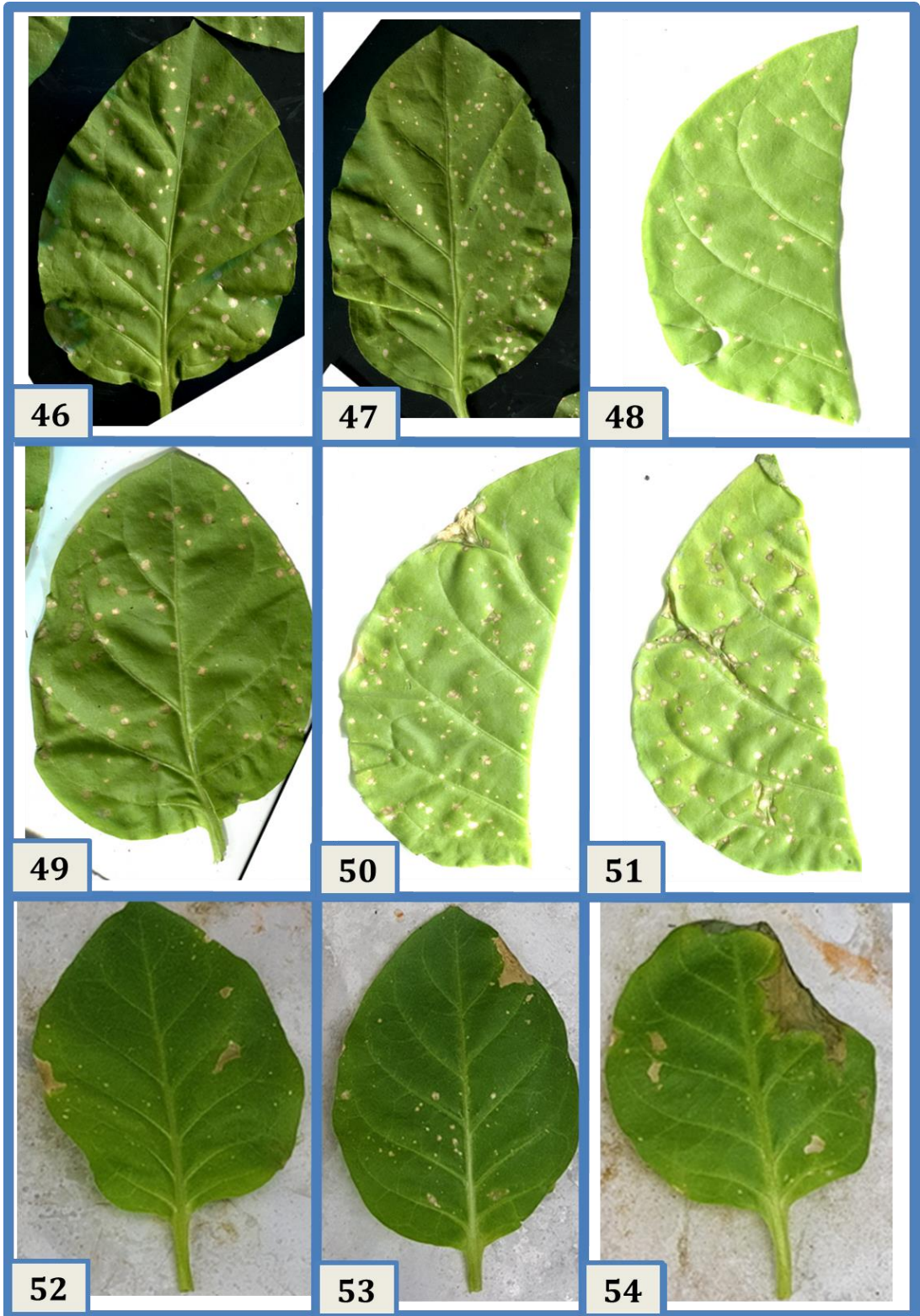


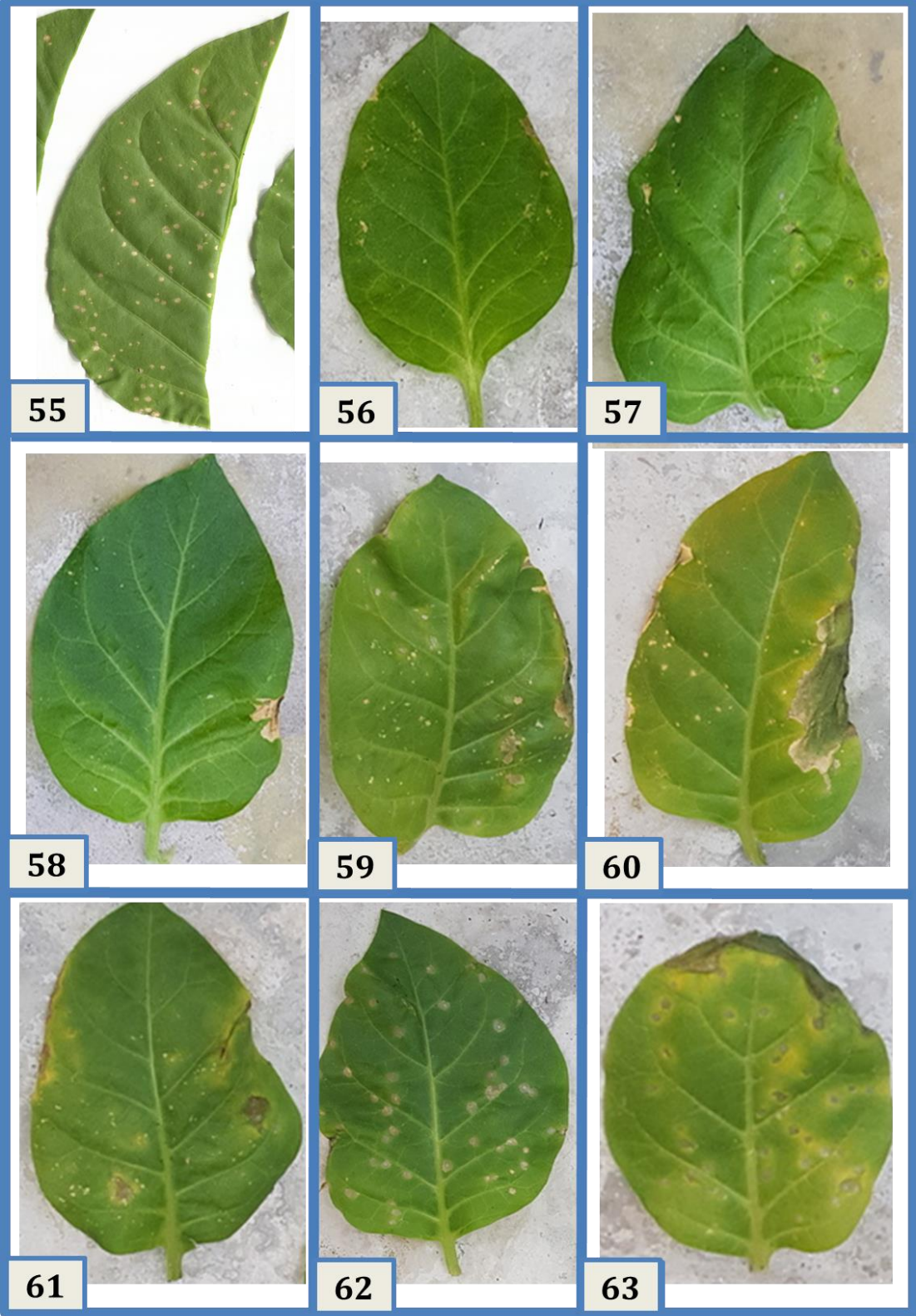


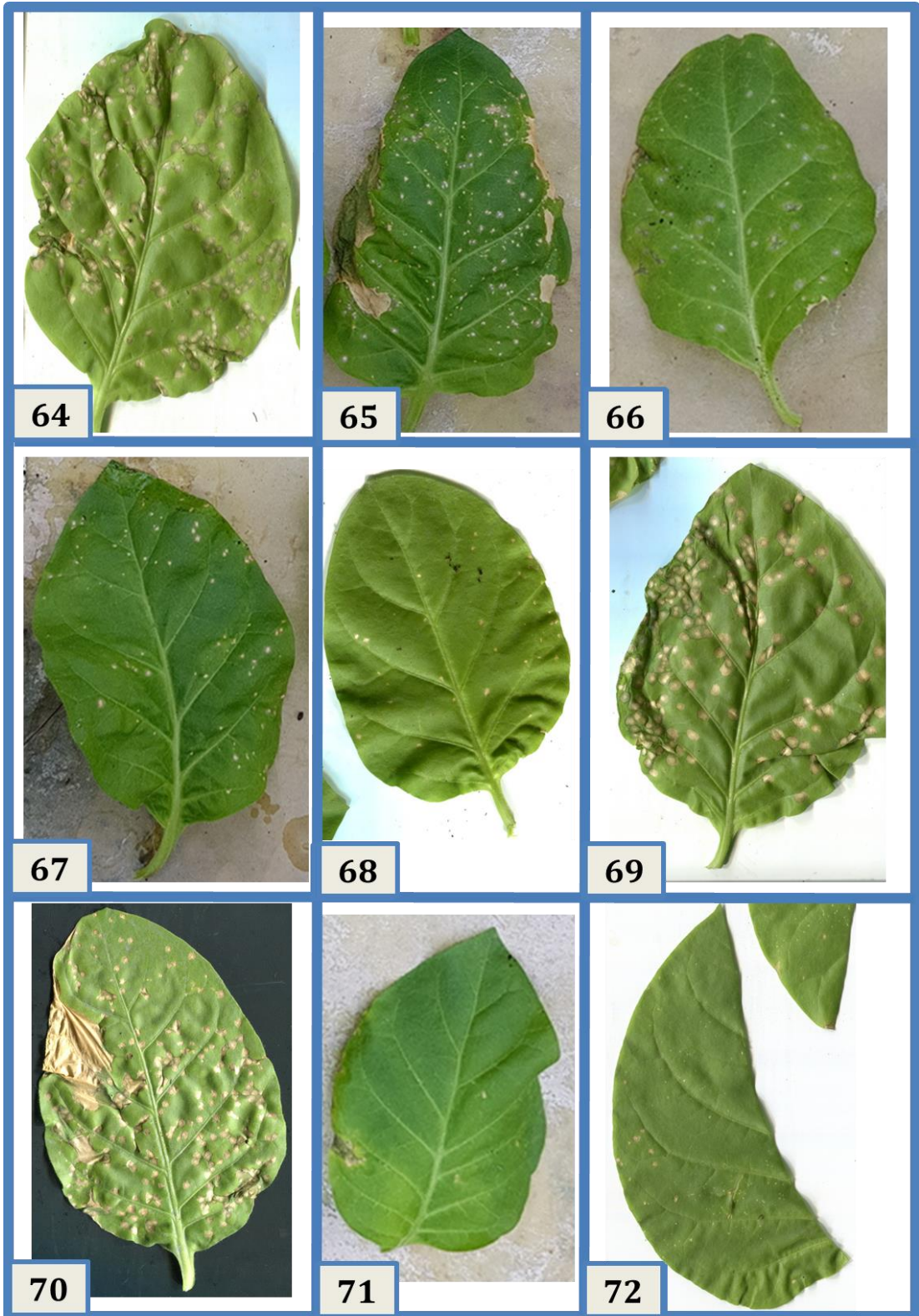


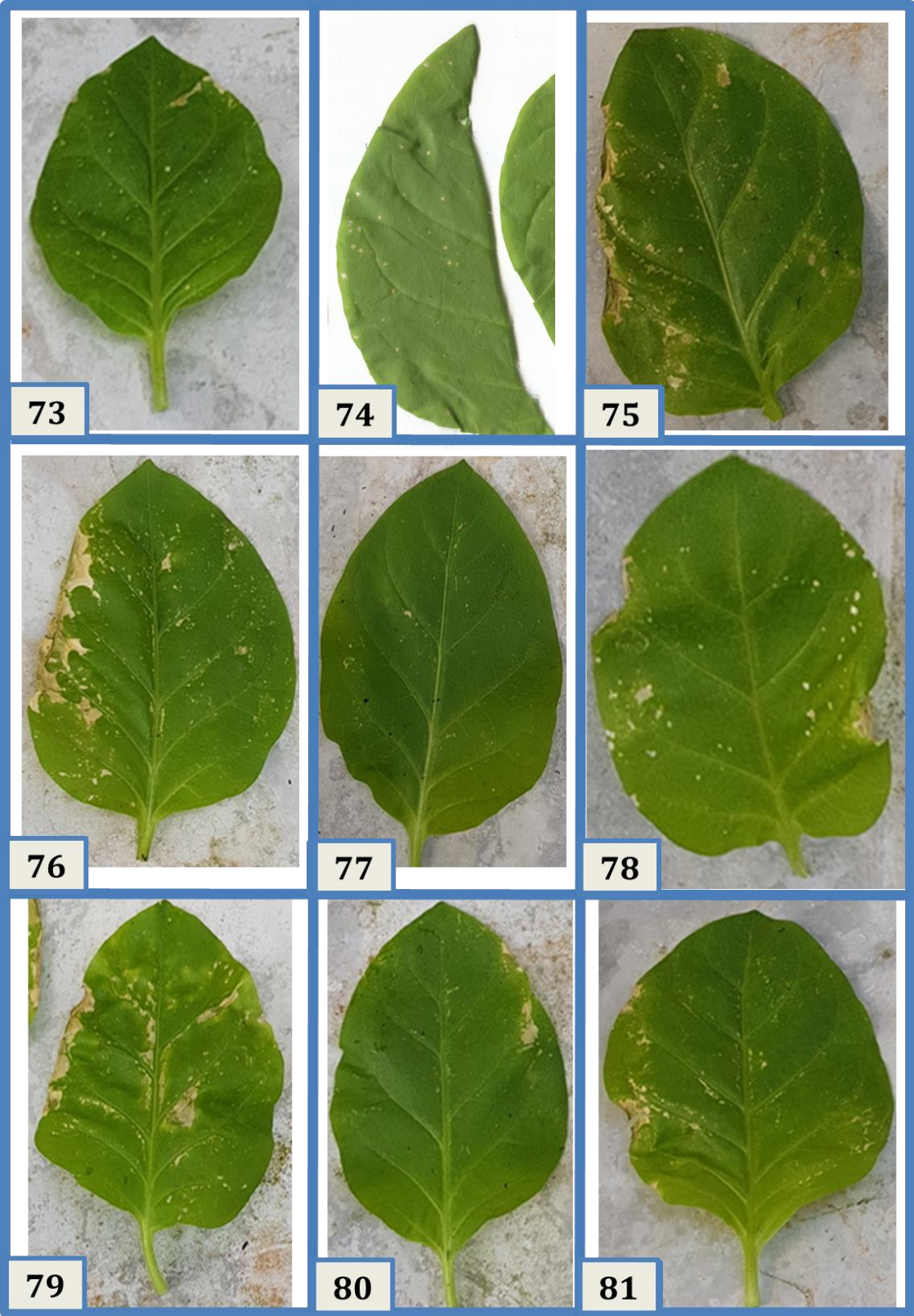


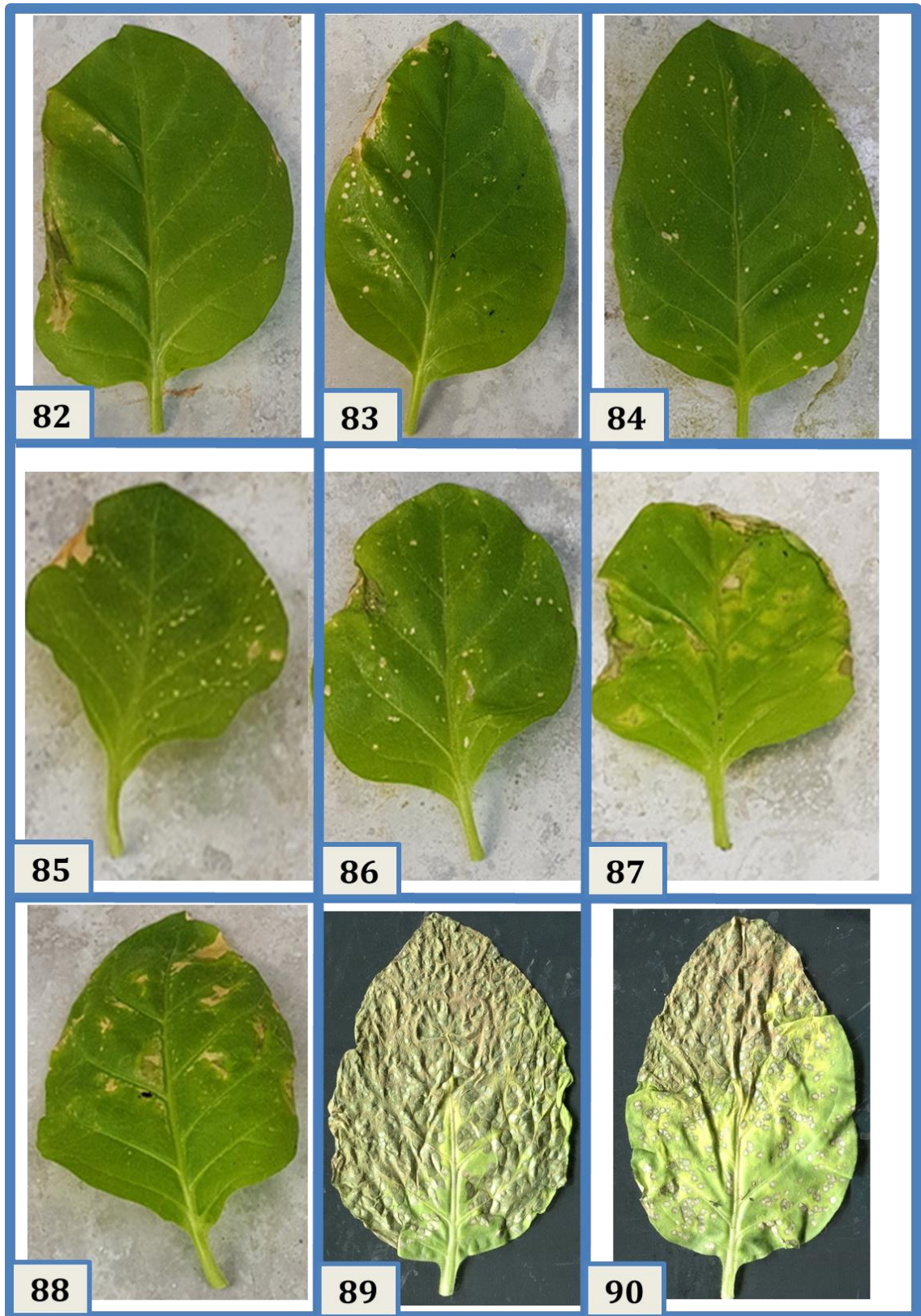














91



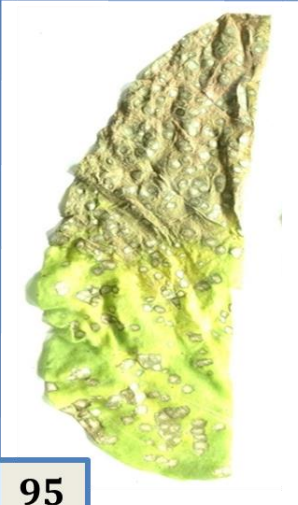
92



93



94



95



96



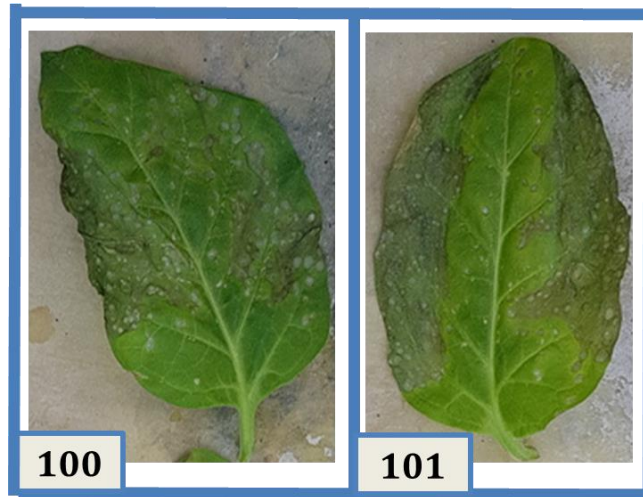
97



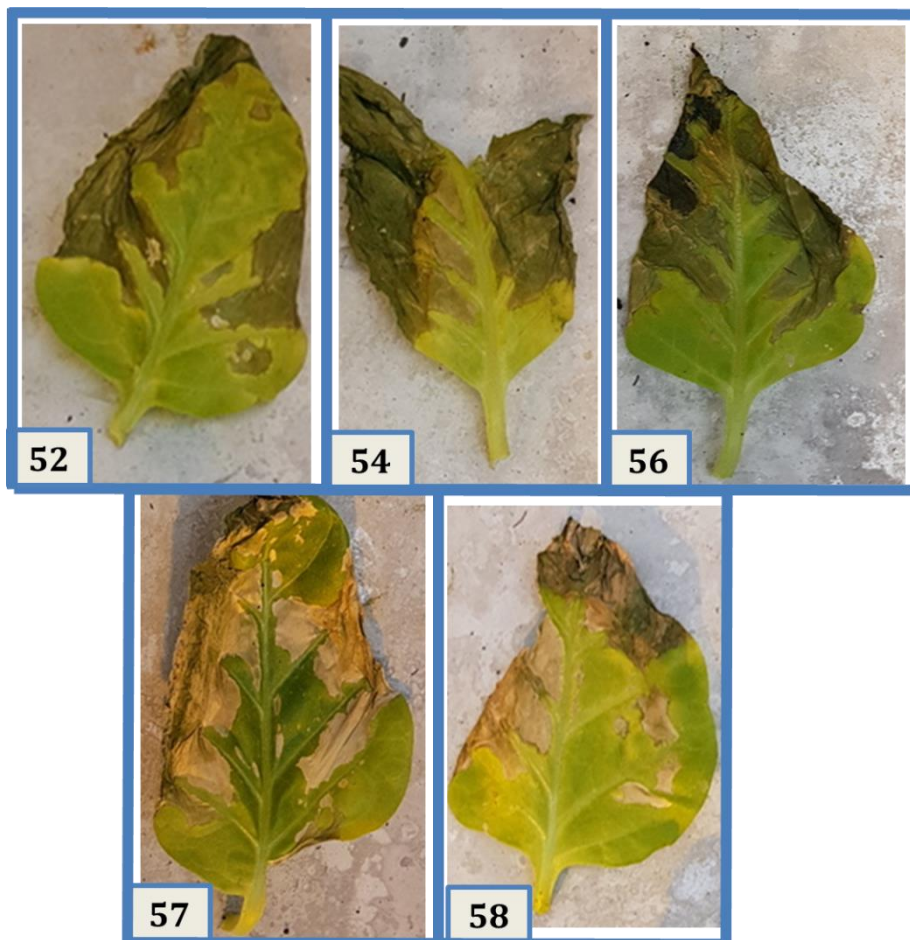
98



99



8. Suplement 2 – przykłady fitotoksyczności halogenowanych pochodnych kwasu salicylowego w dawce 500 mg/l, po których zdecydowano o obniżeniu stężenia.



9. Referencje

- 1 European Commission, Eurostat. 2007. Dostępne online: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-76-06-669/EN/KS-76-06-669-EN.PDF ostatnio 20.03.2014r.
- 2 Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów, Dostępna online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0128>, ostatnio 12.03.2019r.
- 3 Ustawa z dnia 12 lipca 1995 r. o ochronie roślin uprawnych, Dz.U. z 1995 r. Nr 90, poz. 446.
- 4 Ustawa z dnia 18 grudnia 2003r.o ochronie roślin, Dz.U. 2004 Nr 11 poz. 94
- 5 Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2015/408 z dnia 11 marca 2015 r. w sprawie wykonania art. 80 ust. 7 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 dotyczącego wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin oraz w sprawie ustalenia wykazu substancji kwalifikujących się do zastąpienia, Dostępne online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX%3A32015R0408>, ostatnio 12.03.2019r.
- 6 *Środki ochrony roślin dziś i w przyszłości*, dostępne online: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwi_xf_dzP3gAhUvpIsKHbv2DU4QFjAAegQIABAC&url=http%3A%2F%2Fwww.stc.pl%2Fdhttp.php%3Fco%3D2016_06_02_prochnicki.pdf&usg=AOvVaw2OQXyEYbJ62HmjGT7YxGFe, ostatnio 12.02.2019r.
- 7 Ekspertyza „Skutki potencjalnego wycofania wybranych substancji czynnych dla upraw polowych i sadowniczych w Polsce”, Poznań-Warszawa, styczeń 2016r. Dostępne online: http://psor.pl/wp-content/uploads/2016/01/Ekspertyza_final.pdf, ostatnio 12.03.2019r.
- 8 Gozzo, F.; Faoro F. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 12473–12491.
- 9 Pospieszny, H. *Progress in Plant Protection*, **2016**, 56 (4), 436-442.
- 10 Beijerinck, M. W. "Über ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter". *Verhandelingen der Koninklijke akademie van Wetenschappen te Amsterdam* (in German), **1898**.
- 11 Encyclopædia Britannica, Inc., 1996. Dostępne online: <https://www.britannica.com/science/tobacco-mosaic-virus>
- 12 *Metodyka integrowanej ochrony pomidora pod osłonami (materiały dla doradców)*, opracowanie zbiorowe pod redakcją dr hab. Czesława Ślusarskiego, ISBN 978-83-60573-87-7, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice 2013r. (aktualizacja 2016r.).

-
- 13 Dostępne online:
http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Cucurbitae/Cucurbitae_Cucumber_mosaic_virus_necrotic_strain/index.html
- 14 Dostępne online: <https://vegetableguide.usu.edu/diseases/tomato-pepper-eggplant/tomato-spotted-wilt-virus>
- 15 Fotografia L. Black, dostępne online:
http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/DiagnosticKeys/TomLeaf/PotVirusY_Tom.htm
- 16 Marenya P. P., Erenstein, O.; Prasanna, B.; Makumbi, D.; Jumbo, M.; Beyene, Y. *Agricultural systems*, 2018, 162, 220-228.
- 17 Flett, B.; Mashingaidze, K. "Maize Lethal Necrosis (MLN) disease", presentation to ARC's Executive Management Committee, 4.05.2015r. Dostępne online:
<https://www.grainsa.co.za/upload/files/ARC%20MLN%20Presentati on%20Slides.pdf>
- 18 Gonsalves, D. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1998**, 36, 415–37.
- 19 Ross, A. F. *Virology*, **1961**, 14, 340–358.
- 20 Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux, J. P. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **1997**, 35, 235–270.
- 21 Hammerschmidt, R. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **1999**, 55, 77–84.
- 22 Conrath, U. *Adv. Bot. Res.*, **2009**, 51, 361–395.
- 23 Schreiber, K.; Desveaux, D. *Plant Pathol.*, **2008**, 24 (3), 245–268.
- 24 Walters, D. R.; Fountaine, J. M. *J. Agric. Sci.*, **2009**, 147 (5), 523–535.
- 25 Walters, D. R.; Ratsep, J.; Havis, N. D. J. *Exp. Bot.*, **2013**, 64 (5), 1263–1280.
- 26 Fu, Z. Q.; Dong, X. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2013**, 64, 839–863.
- 27 Złotek, U. Rodzaje i możliwości zastosowania indukowanej odporności roślin, Dostępne online: <https://docplayer.pl/33327519-Rodzaje-i-mozliwosci-zastosowania-indukowanej-odpornosci-roslin.html>
- 28 Ton, J.; Mauch-Mani, B. *Plant J.*, **2004**, 38 (1), 119–130.
- 29 Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. *Nature*, **2006**, 444, 323–329.
- 30 Thomma, B. P.; Nürnberger, T.; Joosten, M. H. *Plant Cell*, **2011**, 23 (1), 4–15.
- 31 Pieterse, C. M.; Leon-Reyes, A.; Van der Ent, S.; Van Wees, S. C. *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, 5 (5), 308–316
- 32 Gozzo, F. J. *Agric. Food Chem.*, **2003**, 51 (16), 4487–4503.
- 33 MMukhtar, M. S.; Nishimura, M. T.; Dangl, J. *Cell*, **2009**, 137, 804–806.
- 34 Wu, Y.; Zhang, D.; Chu, J. Y.; Boyle, P.; Wang, Y.; Brindle, I. D.; De Luca, V.; Desprès, C. *Cell Rep.*, **2012**, 1 (6), 639–647.
- 35 Spoel, S. H.; Mou, Z.; Tada, Y.; Spivey, N. W.; Genschik, P.; Dong, X. *Cell*, **2009**, 137 (5), 860–872.
- 36 Zhang, Y.; Cheng, Y. T.; Qu, N.; Zhao, Q.; Bi, D.; Li, X. *Plant J.*, **2006**, 48, 647–656.

-
- 37 Fu, Z. Q.; Yan, S.; Saleh, A.; Wang, W.; Ruble, J.; Oka, N.; Mohan, R.; Spoel, S. H.; Tada, Y.; Zheng, N.; Dong, X. *Nature*, **2012**, 486, 228–232.
- 38 Manosalva, P. M.; Park, S. W.; Forouhar, F.; Tong, L.; Fry, W. E.; Klessig, D. F. *Mol Plant Microbe Interact.*, **2010**, 23 (9), 1151–1163.
- 39 Koo, Y. J.; Kim, M. A.; Kim, E. H.; Song, J. T.; Jung, C.; Moon, J. K.; Kim, J. H.; Seo, H. S.; Song, S. I.; Kim, J. K.; Lee, J. S.; Cheong, J. J.; Choi, Y. D. *Plant Mol. Biol.*, **2007**, 64 (1-2), 1–15
- 40 Van Wess, S. C.; Van der Ent, S.; Pieterse, C. M. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2008**, 11 (4), 443–448.
- 41 Koornneef, A.; Pieterse, C. M. *Plant Physiol.*, **2008**, 146(3), 839–844
- 42 Spoel, S. H.; Johnson, J. S.; Dong, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104 (47), 18842–18847.
- 43 Thaler, J. S.; Humphrey, P. T.; Whiteman, N. K. *Trends Plant Sci.*, **2012**, 17 (5), 260–270.
- 44 Brooks, D. M.; Bender, C. L.; Kunkel, B. N. *Mol. Plant Pathol.*, **2005**, 6 (6), 629–639.
- 45 Katsir, L.; Schillmiller, A. L.; Staswick, P. E.; He, S. Y.; Howe, G. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105 (19), 7100–7105.
- 46 Zheng, X. Y.; Spivey, N. W.; Zeng, W.; Liu, P. P.; Fu, Z. Q.; Klessig, D. F.; He, S. Y.; Dong, X. *Cell Host Microbe*, **2012**, 11 (6), 587–596
- 47 White, R. F. *Virology*, **1979**, 99 (2), 410–417.
- 48 Friedrich, L.; Lawton, K.; Ruess, W.; Friedrich, L.; Lawton, K.; Ruess, W.; Masner, P.; Specker, N.; Rella, M. G.; Meier, B.; Dincher, S.; Staub, T.; Uknes, S.; Métraux, J. P.; Kessmann, H.; Ryals, J. *Plant J.*, **1996**, 10 (1), 61–70.
- 49 Lawton, K. A.; Friedrich, L.; Hunt, M.; Weymann, K.; Delaney, T.; Kessmann, H.; Staub, T.; Ryals, J. *Plant J.*, **1996**, 10 (1), 71–82.
- 50 Faoro, F.; Maffi, D.; Cantu, D.; Iriti, M. *BioControl*, **2008**, 53, 387–401.
- 51 Han, Q.; Feng, H.; Zhao, H.; Huang, L.; Wang, X.; Wang, X.; Kang, Z. *Protoplasma*, **2013**, 250 (2), 471–481.
- 52 Faessel, L.; Nassr, N.; Lebeau, T.; Walter, B. *Phytopathol.*, **2008**, 156, 236–242.
- 53 Papavizas, G. C. *Plant Dis. Rep.*, **1964**, 48 (7), 537–541.
- 54 Cohen, Y.; Niderman, T.; Mosinger, E.; Fluhr, R. *Plant Physiol.*, **1994**, 104 (1), 59–66.
- 55 Ton, J.; Jakab, G.; Toquin, V.; Flors, V.; Iavicoli, A.; Maeder, M. N.; Métraux, J. P.; Mauch-Mani, B. *Plant Cell*, **2005**, 17 (3), 987–999.
- 56 Flors, V.; Ton, J.; van Doorn, R.; Jakab, G.; Garcia-Augustin, P.; Mauch-Mani, B. *Plant J.*, **2008**, 54 (1), 81–92
- 57 Tsai, C. H.; Singh, P.; Chen, C. W.; Thomas, J.; Weber, J.; Mauch-Mani, B.; Zimmerli, L. *Plant J.*, **2011**, 65 (3), 469–479.
- 58 Hamiduzzaman, M. M.; Jakab, G.; Barnavon, L.; Neuhaus, J. M.; Mauch-Mani, B. *Mol. Plant–Microbe Interact.*, **2005**, 18 (8), 819–829.

-
- 59 Siegrist, J.; Glenewinkel, D.; Kolle, C.; Schmidke, M. *J. Plant Dis. Prot.*, **1997**, 104 (6), 599–610.
- 60 Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Staub, T. *Eur. J. Plant Pathol.*, **2001**, 107 (1), 19–28.
- 61 Walters, D. R.; Paterson, L.; Walsh, D. J.; Havis, N. D. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **2009**, 73 (4-5), 95–100.
- 62 Boyle, C.; Walters, D. R. *Plant Pathol.*, **2006**, 55 (1), 82–91.
- 63 Srivastava, P.; George, S.; Marois, J. J.; Wright, D. L.; Walker, D. R. *Crop Prot.*, **2011**, 30 (6), 726–732.
- 64 Kunz, W., Staub, T., Metraux, J.P., Hoegerle, K., Nyfeler, R., Ahl, P. A. “*Method for protecting plants against diseases*”. European Patent, EP 0268775 A1 (1988)
- 65 Kuć, J. *BioScience*, **1982**, 32 (11), 854–860.
- 66 Metraux, J. P.; Ahlgoy, P.; Staub, T.; Speich, J.; Steinemann, A.; Ryals, J.; Ward, E. “Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens,” in *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol.1, eds. H. Hennecke and D. Verma (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers).
- 67 Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P.; Metraux, J. P.; Ryals J. A. *Plant Cell*, **1991**, 3 (10), 1085–1094.
- 68 Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D.; Slusarenko, A.; Ward, E.; Ryals, J. *Plant Cell*, **1992**, 4 (6), 645–656.
- 69 Hijwegen, T., Verhaar, M. A. *Neth. J. Plant Pathol.*, **1993**, 99 (3), 103–107.
- 70 Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J. R., Klessig, D. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, 92 (16), 7143–7147.
- 71 Van Kan, J. A.; Cozijnsen, T.; Danhash, N.; De Wit, P. J. *Plant Mol. Biol.*, **1995**, 27 (6), 1205–1213.
- 72 Han, D. Y.; Coplin, D. L.; Bauer, W. D.; Hoitink, H. A. *Phytopathology*, **2000**, 90 (4), 327–332.
- 73 Lee, S.; Hong, J. C.; Jeon, W. B.; Chung, Y. S.; Sung, S.; Choi, D.; Joung, Y. H.; Oh, B. J.; *Plant Cell Rep.*, **2009**, 28 (10), 1573–1580.
- 74 Knoth, C.; Salus, M. S.; Girke, T.; Eulgem, T. *Plant Physiol.*, **2009**, 150 (1), 333–347.
- 75 Chen, Z.; Klessig, D. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1991**, 88 (18), 8179–8183.
- 76 Durner, J.; Klessig, D. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, 92, 11312–11316.
- 77 Silverman, F. P.; Petracek, P. D.; Heiman, D. F.; Fledderman, C. M.; Warrior, P. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (25), 9775–9780
- 78 Kamatham, S.; Pallu, R.; Pasupulati, A. K.; Singh, S. S.; Gudipalli, P. *Phytochemistry*, **2017**, 143, 160–169.

-
- 79 Yoshida, H.; Shimano, S.; Mochizuki, S.; Koike, K.; Nakagawa, T.; Konishi, K. "*N-Cyanoalkylisonicotinamide derivatives*". US Patent, US4804762A (1989).
- 80 Yoshida, H.; Konishi, K.; Koike, K.; Nakagawa, T.; Sekido, S.; Yamaguchi, I. *J. Pestic. Sci.*, **1990**, 15 (3), 413–417.
- 81 Yoshida, H.; Konishi, K.; Nakagawa, T.; Sekido, S.; Yamaguchi, I. *J. Pestic. Sci.*, **1990**, 15 (2), 199–203.
- 82 Nakashita, H.; Yasuda, M.; Nishioka, M.; Hasegawa, S.; Arai, Y.; Uramoto, M.; Yoshida, S.; Yamaguchi, I. *Plant Cell Physiol.*, **2002**, 43 (7), 823–831.
- 83 Yasuda, M.; Nakashita, H.; Hasegawa, S.; Nishioka, M.; Arai, Y.; Uramoto, M.; Yamaguchi, I.; Yoshida, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, 67 (2), 322–328.
- 84 Yasuda, M. *J. Pestic. Sci.*, **2007**, 32 (3), 281–282.
- 85 Schurter, R.; Kunz, W.; Nyfeler R. US Patent No. 5,190,928, Przyznany 02.03.1993
- 86 Kunz, W.; Schurter, R.; Maetzke, T. *Pestic. Sci.*, **1997**, 50 (4), 275–282.
- 87 Du, Q.; Zhu, W.; Zhao, Z.; Qian, X.; Xu, Y. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60, 346–353.
- 88 Smiglak, M.; Kukawka, R.; Lewandowski, P.; Pospieszny, H. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 (25), 3565–3568.
- 89 Lewandowski, P.; Kukawka, R.; Pospieszny, H.; Smiglak, M. *New J. Chem.*, **2014**, 38 (4), 1372–1375.
- 90 Lewandowski, P. *Właściwości biologiczne, chemiczne i fizyczne anionowych pochodnych induktora odporności roślin metyloestru kwasu benzo[1,2,3]tiadiazolo-7-karboksyłowego jako dwufunkcyjnych cieczy jonowych*, praca magisterska złożona na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- 91 Kukawka, R. *Biologiczne, chemiczne i fizyczne właściwości kationowych pochodnych induktora odporności roślin S-metyloestru kwasu 7-karboksybenzo[1,2,3]tiadiazolowego*, praca magisterska złożona na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- 92 Śmiglak M.; Pospieszny, H.; Lewandowski, P.; Kukawka, R.; Maciejewski, H. *Pochodne kwasu 7-karboksybenzo[1,2,3]tiadiazolowego*, Patent (tymczasowo brak numeru, decyzja o udzieleniu ochrony z dnia 22.03.2019r.) na podstawie Zgł Pat. PL P.405491 z dnia 30.09.2013.
- 93 Śmiglak M.; Pospieszny, H.; Lewandowski, P.; Kukawka, R.; Maciejewski, H. *Środek do ochrony roślin*, Patent nr 230659 na podstawie Zgł Pat. PL P.405492 z dnia 30.09.2013.
- 94 Śmiglak M.; Pospieszny, H.; Kukawka, R.; Lewandowski, P.; Maciejewski, H. *Pochodne S-metyloestru kwasu 7-karboksybenzo[1,2,3]tiadiazolowego*, Patent (tymczasowo brak

-
- numeru, decyzja o udzieleniu ochrony z dnia 22.03.2019r.) na podstawie Zgł Pat. PL P.405507 z dnia 01.10.2013.
- 95 Śmiglak M.; Pospieszny, H.; Kukawka, R.; Lewandowski, P.; Maciejewski, H. *Środek do ochrony roślin*, Patent nr 231217 na podstawie Zgł Pat. PL P.405509 z dnia 01.10.2013.
- 96 Smiglak, M.; Kukawka, R.; Lewandowski, P.; Budziszewska, M.; Obrepalska-Stęplowska, A.; Krawczyk, K., Zwolińska, A., Pospieszny, H. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, 4, 3344–3351.
- 97 Smiglak, M.; Lewandowski, P.; Kukawka, R.; Budziszewska, M.; Krawczyk, K.; Obrepalska-Stęplowska, A.; Pospieszny, H. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, 5(5), 4197-4204.
- 98 Naumann K. *Pest. Manag. Sci.*, **2000**, 56, 3-21.
- 99 Ranke, J.; Mölter, K.; Stock, F.; Bottin-Weber, U.; Poczobutt, J.; Hoffmann, J.; Ondruschka, B.; Filser, J.; Jastorff, B. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2004**, 58, 396–404.