

MOŻLIWOŚĆ OGRANICZANIA WZROSTU GRZYBÓW PATOGENICZNYCH DLA LESZCZYNY PRZEZ BAKTERIE ANTAGONISTYCZNE

Ewa Król, Zofia Machowicz-Stefaniak, Ewa Zalewska

Streszczenie. Spośród 138 badanych izolatów bakterii epifitycznych pochodzących z liści leszczyny, 12 izolatów ograniczało *in vitro* wzrost kolonii *Botrytis cinerea*, 33 ograniczało wzrost *Cytospora corylicola*, 31 hamowało wzrost *Gloeosporium coryli*, a 36 wykazywało antagonistyczne oddziaływanie w stosunku do *Phomopsis* sp. Stwierdzono, że tylko 9 izolatów ograniczało wzrost kolonii wszystkich wymienionych patogenów, a 7 izolatów ograniczało wzrost przynajmniej 3 gatunków grzybów patogenicznych. Zdolność badanych izolatów bakterii do ograniczania wzrostu patogenów była większa po 4 dniach biotycznego oddziaływania, a po 8 dniach znacznie się zmniejszyła. Najefektywniejsze w ograniczaniu izolaty bakterii należały do rodzajów *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp., *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* lub *Erwinia cypripedii*.

Słowa kluczowe: leszczyna, bakterie antagonistyczne, *Botrytis cinerea*, *Cytospora corylicola*, *Gloeosporium coryli*, *Phomopsis* sp.

WSTĘP

W ostatnich latach zaobserwowano w Polsce południowo-wschodniej występowanie na nadziemnych organach leszczyny licznych gatunków grzybów patogenicznych. Obok najpowszechniej występującego patogenu *Monilia coryli* Schellenb., za szkodliwe uznano także *Botrytis cinerea* Pers., *Cytospora corylicola* Sacc., *Gloeosporium coryli* (Desm.) Sacc. i *Phomopsis* sp. [Machowicz-Stefaniak 1998, Zalewska 1999, Machowicz-Stefaniak i Zalewska 2000]. Wymienione patogeny zasiedlały najczęściej kwiatostany męskie i żeńskie, zawiązki owocowe oraz owoce przez cały okres wzrostu leszczyny, powodując nekrozę na zainfekowanych organach. W badaniach własnych ustalono, że różne fungicydy oraz antagonistyczne grzyby, zwłaszcza z rodzajów *Trichoderma* i *Gliocladium* ograniczają wzrost kolonii niektórych patogenów [Machowicz-Stefaniak 1998]. Zaobserwowano ponadto, że niektóre rodzaje bakterii pochodzące z fyllosfery leszczyny ograniczały wzrost *Monilia coryli* [Zalewska 1999]. Wobec braku w dostępnej literaturze informacji o oddziaływaniu takich bakterii na inne patogeniczne dla leszczyny grzyby wykonano badania z tego zakresu.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach uwzględniono szczepy patogenicznych grzybów: *Botrytis cinerea* L 1426, *Cytospora corylicola* L 1505, *Gloeosporium coryli* L 2127 i *Phomopsis* sp. 1277 pochodzące z różnych organów leszczyny oraz izolaty epifitycznych bakterii uzyskane z powierzchni liści leszczyny odmian Kataloński i Olbrzymi z Halle, uprawianych na plantacjach produkcyjnych w Felinie, Kraśniku i Motyczu. Bakterie wyosabniano wiosną i jesienią w ciągu dwu kolejnych lat, według metody Sobiczewskiego i in. [1996]. Do badań wybrano 138 izolatów bakterii zróżnicowanych morfologicznie i pochodzących ze wszystkich terminów izolacji. W laboratorium przetestowano ich antagonistyczne oddziaływanie na grzyby patogeniczne dla leszczyny, w sposób podany przez Sobiczewskiego i in. [1996], a dokładnie opisany przez Król [1998]. Ocenę antagonistycznego oddziaływania przeprowadzono na podstawie wielkości strefy hamowania mierzonej po 4 i 8 dniach wspólnego wzrostu bakterii i grzybów na pożywce PDA (Difco). Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu analizy wariancji i półprzedziałów ufności Tukeya. Dla przedstawienia liczebności izolatów bakterii aktywnych w ograniczaniu poszczególnych patogenów oraz siły ich antagonistycznego oddziaływania zakwalifikowano je do 5 grup, w zależności od szerokości tworzonej strefy zahamowania.

grupa	strefa zahamowania
I	≥ 20 mm
II	19,9–15 mm
III	14,9–10 mm
IV	9,9–5 mm
V	≤ 5 mm lub przerost grzybni patogenu przez linię wzrostu bakterii

Izolaty bakterii, które najsilniej ograniczały wzrost badanych patogenów oznaczono do rodzaju przy użyciu testów fizjologicznych i biochemicznych wg Bradbury [1988].

WYNIKI

Wykazano, że liczebność bakterii zasiedlających liście leszczyny była zróżnicowana w zależności od roku badań, terminu pobierania prób i odmiany (tab. 1).

Spośród wyselekcjonowanych do badań izolatów bakterii ponad 40% ograniczało wzrost przynajmniej jednego z badanych grzybów patogenicznych, co wyrażało się tworzeniem strefy zahamowania o zróżnicowanej szerokości przy wspólnym wzroście grzybów i bakterii. Okazało się, że 12 izolatów ograniczało wzrost kolonii *Botrytis cinerea*, 33 hamowało wzrost *Cytospora corylicola*, 31 wykazywało antagonistyczne oddziaływanie w stosunku do *Gloeosporium coryli*, a 36 ograniczało wzrost *Phomopsis* sp. (tab. 2).

Po 4 dniach wspólnego wzrostu bakterii z *B. cinerea* żaden z izolatów nie znalazł się w przedziale I, tj. nie tworzył strefy hamowania szerszej niż 20 mm, podczas gdy po tym czasie w przedziale I znalazło się 18 izolatów ograniczających wzrost *G. coryli*, 14 hamujących wzrost *Phomopsis* sp. i 7 izolatów ograniczających *C. corylicola* (tab. 2).

Tabela 1. Liczebność epifitycznej populacji bakterii przypadająca na 1 liść leszczyny odmiany 'Kataloński' (K) i 'Olbrzymi' z Halle (OH)

Table 1. Number of epiphytic bacteria population per 1 leaf of hazel cultivars Catalonian (C) and Hall's Gigant (OH)

Termin pobierania prób Date of samples collecting	Felin		Kraśnik		Motycz	
	K	OH	K	OH	K	OH
1996						
Czerwiec June	9,8·10 ²	7,4·10 ²	4,2·10 ²	9,4·10 ²	3,9·10 ²	6,8·10 ²
Wrzesień September	1,7·10 ⁵	6,3·10 ⁴	2·10 ⁵	2,5·10 ⁴	4,1·10 ⁴	4,3·10 ⁴
1997						
Czerwiec June	6,7·10 ⁴	1,3·10 ⁵	6,4·10 ⁴	2,6·10 ⁵	3·10 ⁶	1,1·10 ⁵
Wrzesień September	2·10 ⁵	1,3·10 ⁴	9,5·10 ³	1·10 ⁵	1,3·10 ⁴	9,3·10 ³

Tabela 2. Wspólny wzrost izolatów bakterii antagonistycznych i grzybów patogennych na pożywce PDA

Table 2. Dual growth of antagonistic isolates of bacteria and pathogenic fungi on PDA medium

Gatunek grzyba fungus species	Liczba izolatów hamujących wzrost przynajmniej jednego z badanych gatunków grzybów Number of bacteria isolates inhibiting the growth of at least one out of studied pathogens									
	Strefa zahamowania (mm) po 4 dniach Inhibition zone (mm) after 4 days					Strefa zahamowania (mm) po 8 dniach Inhibition zone (mm) after 8 days				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	0	2	5	4	1	0	2	1	4	5
<i>Cytospora corylicola</i> Sacc.	7	6	11	7	2	1	2	2	6	22
<i>Gloeosporium coryli</i> (Desm.) Sacc.	18	8	5	0	0	6	0	2	9	14
<i>Phomopsis</i> sp.	14	11	5	5	1	0	2	6	8	20
Razem – Total	39	27	26	16	4	7	6	11	27	61

Po 8 dniach wspólnego wzrostu zaobserwowano osłabienie antagonistycznego oddziaływania bakterii, na co wskazywało zmniejszanie się stref hamowania w odniesieniu do wszystkich badanych patogenów, a nawet przerastanie kolonii niektórych izolatów bakterii przez te grzyby (tab. 2). Tylko jeden izolat tworzył strefę hamowania szerszą niż 20 mm przy wspólnym wzroście z *C. corylicola* i sześć izolatów przy wspólnym wzroście z *G. coryli*. W pozostałych przypadkach znacznie zwiększała się liczba izolatów bakterii w przedziałach IV i V (tab. 2).

Po 4 dniach wspólnego wzrostu 9 izolatów bakterii ograniczało wzrost wszystkich patogennych grzybów, a 7 przynajmniej trzech gatunków (tab. 3).

Osiemnaście izolatów ograniczało co najmniej 2 patogeny, a 19 wykazywało antagonistyczne oddziaływanie tylko do jednego spośród 4 badanych grzybów. Wśród izolatów hamujących wzrost *B. cinerea* za najefektywniejsze należy uznać KK 21, MO 54, KK 71, FK 61 i KO 75, bowiem tworzyły one istotnie szerszą strefę hamowania niż

Tabela 3. Izolaty bakterii najefektywniej ograniczające wzrost kolonii grzybów patogenicznych po 4 dniach wspólnego wzrostu na pożywce PDA

Table 3. Isolates of bacteria the most effectively limiting the growth of pathogenic fungi colony after 4 days of dual growth on PDA medium

Nr izolatu bakterii Number of bacteria isolates	Strefa hamowania (mm) – Inhibition zone (mm)			
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Cytospora corylicola</i>	<i>Gloeosporium coryli</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
KK 21	17,3 a	15,3 bc	28,3 a	11,7 d
MO 54	16,3 ab	23,3 ab	23,3 a	16 d
MO 58	10 bc	6,0 d	28,0 a	17,3 cd
KK 69	7,7 cd	12,0 cd	20,7 a	14 d
KK 71	12,3 abc	12,3 cd	23,3 a	16 d
KK 72	10,0 bc	9 cd	23,7 a	17,7 cd
KO 73	7,7 cd	12 cd	25 a	18,0 cd
KO 74	9,3 cd	11,3 cd	22,3 a	17,3 cd
MO 98	9,0 cd	26,0 a	24 a	32,0 a
MO 10	3,0 d	24,0 ab		17,0 cd
FK 61	13,0 ab	21,3 ab	27,7 a	
FO 65		16,5 bc	28,3 a	17,0 cd
KK 70		18,7 abc	22,3 a	11,7 d
KO 75	12,7 ab	10,3 cd	22,0 a	
AKK 97		23,7 ab	26,0 a	23 bc
AKK 98		23,3 ab	28,0 a	26 ab
	NIR _{0,05} = 6,44	NIR _{0,05} = 8,87	NIR _{0,05} = 8,38	NIR _{0,05} = 6,03
	LSD _{0,05} = 6,44	LSD _{0,05} = 8,87	LSD _{0,05} = 8,33	LSD _{0,05} = 6,03

Tabela 4. Izolaty bakterii najefektywniej ograniczające wzrost kolonii grzybów patogenicznych po 8 dniach wspólnego wzrostu na pożywce PDA

Table 4. Isolates of bacteria the most effectively inhibiting the growth of pathogenic fungi colony after 8 days of dual growth on PDA medium

Nr izolatu bakterii Number of bacteria isolates	Strefa hamowania (w mm) – Inhibition zone (mm)			
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Cytospora corylicola</i>	<i>Gloeosporium coryli</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
KK 21	16,6 a	14,3 bc	26,3 ab	5,3 e
MO 54	16,3 a	20 ab	21,7 bc	15,3 bc
MO 58	5,5 c	3 d	20 c	10,3 d
KK 69	0 d	0 f	0 e	1,3 f
KK 71	5,7 c	7,7 de	0 e	11,3 cd
KK 72	1,8 cd	2 ef	5,3 de	11,3 cd
KO 73	1,7 cd	5,7 def	0 e	12,5 cd
KO 74	2 cd	4,7 def	0 e	10,7 d
MO 98	7,7 bc	21 a	21,3 bc	11,3 d
MO 10	0 d	23 a		14,3 bcd
FK 61	10,7 b	9 cd	20 c	
FO 65		7 de	0 e	17,0 b
KK 70		0	7 d	11,7 cd
KO 75	5,7 c	6,7 de	0 e	
AKK 97		4,7 def	26 ab	23,0 a
AKK 98		4,7 def	28 a	26 a
	NIR _{0,05} = 4,2	NIR _{0,05} = 6,1	NIR _{0,05} = 5,8	NIR _{0,05} = 3,9
	LSD _{0,05} = 4,2	LSD _{0,05} = 6,1	LSD _{0,05} = 5,8	LSD _{0,05} = 3,9

pozostałe izolaty bakterii (tab. 3). Niektóre z tych izolatów, np.: MO 54, FK 61 oraz MO 98, MO 10, KK 70, AKK 97 i AKK 98 tworzyły także istotnie szerszą strefę hamowania wzrostu *C. corylicola* w porównaniu do pozostałych bakterii. W ograniczaniu wzrostu *Phomopsis* sp. wyróżnił się szczep MO 98 i AKK 98. Wzrost *G. coryli* silnie ograniczały wszystkie izolaty, a szerokość tworzonych przez nie stref hamowania nie różniła się istotnie (tab. 3).

Po 8 dniach efektywność antagonistycznego oddziaływania bakterii była słabsza niż po 4 dniach. Okazało się jednak, że niektóre izolaty nadal tworzyły szeroką strefę hamowania w stosunku do większości badanych grzybów. Wśród nich znalazły się KK 21, MO 54, MO 98, FK 61, AKK 97 i AKK 98 (tab. 3, 4).

Wymienione izolaty, najczęściej ograniczające wzrost badanych gatunków grzybów, zakwalifikowano do różnych rodzajów. Trzy spośród nich – KK 21, AKK 97 i AKK 98 były Gram-ujemnymi pałeczkami, tworzyły barwnik fluoryzujący na pożywce King B, wytwarzały oksydazę w teście Kavacsa, kwas z glukozy tworzyły tylko w warunkach tlenowych, nie redukowały azotanów, nie powodowały dihydrolizy argininy i oznaczono je jako *Pseudomonas fluorescens*. Jeden z izolatów – FK 61 posiadał takie same właściwości jak wymienione wcześniej, przy czym nie tworzył barwnika fluoryzującego na pożywce King B i zakwalifikowano go do *Pseudomonas* sp. Kolejny izolat – MO 54 był również gram ujemną pałeczką, ale nie wytwarzał oksydazy, kwas z glukozy tworzył w warunkach tlenowych i beztlenowych, redukował azotany, powodował dihydrolizę argininy, nie wykazywał aktywności pektolitycznej. Powyższe właściwości pozwalają przypuszczać, że należał on do rodzaju *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* lub *Erwinia cypripedii*. Ostatni z sześciu izolatów efektywnych w ograniczaniu patogenów – MO 98 był Gram-dodatnią pałeczką i tworzył przetrwalniki, co pozwoliło uznać go za *Bacillus* sp.

DYSKUSJA

Uzyskane wyniki wskazały, że na liściach leszczyny występują powszechnie bakterie epifityczne, których liczebność często modyfikowana jest przez zmienne w poszczególnych latach badań warunki zewnętrzne [Fokkema 1993].

Wśród bakterii epifitycznych kolonizujących liście leszczyny znalazły się izolaty zdolne do ograniczania wzrostu badanych gatunków grzybów. Za szczególnie korzystne należy uznać występowanie izolatów bakterii aktywnych w ograniczaniu kilku fitopatogenów, na co wcześniej zwrócili uwagę inni autorzy [Podrzucki 1989, Pusey 1988]. Większość ocenianych izolatów bakterii ograniczała aktywnie wzrost czterech badanych gatunków grzybów już po czterech dniach wspólnego wzrostu. Wydaje się jednak, że silne ograniczanie wzrostu *G. coryli* przez większość izolatów bakterii mogło wynikać z powolniejszego tempa wzrostu tego grzyba w porównaniu do pozostałych gatunków. Uzyskane z liści leszczyny izolaty bakterii z rodzajów *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus* sp., uznane w literaturze za szczególnie aktywne antagonistycznie [Podrzucki 1989, Fokkema 1993, Markellou i in. 1995], okazały się mało wrażliwe na większość fungicydów stosowanych w ochronie tej rośliny [Machowicz-Stefaniak i in. 1998]. Zatem obecność tych bakterii w fyllosferze leszczyny może stwarzać niekorzystne warunki dla rozwoju patogenicznych gatunków grzybów, co jest zjawiskiem pozytywnym

w aspekcie integrowanej ochrony tej rośliny. Stwierdzony w naszych badaniach spadek aktywności antagonistycznej bakterii wraz z upływem czasu jest zjawiskiem często opisywanym w literaturze [Markellou i in. 1995, Fravel 1988, Król 1998, Zalewska 1999]. Wiadomo jednak, że brak inhibicji na pożywce nie zawsze świadczy o braku aktywności bezpośrednio na roślinie [Sobiczewski i Bryk 1995, Sobiczewski i in. 1996, Fokkema 1993, Król 1988, 2003]. Liczni autorzy podkreślają bowiem, że warunki występujące na powierzchni organów roślinnych mają istotny wpływ na aktywność mikrobiologiczną bakterii antagoni-
stycznych i modyfikują ich właściwości [Sobiczewski i in. 1996, Fokkema 1993].

PIŚMIENNICTWO

- Bradbury J. F., 1988. Identification of cultivable bacteria from plants and plant tissue cultures by use of simple classical methods. *Acta Hort.* (The Hague), 225, 27–37.
- Fokkema N. J., 1993. Opportunities and Problems of Control of Foliar Pathogenes with Microorganisms. *Pestic. Sci.*, 411–416.
- Fravel D. R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 75–91.
- Król E., 1998. Epiphytic bacteria isolated from grape leaves and its effect on *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathol. Pol.* 16, 53–61.
- Król E., 2003. Oddziaływanie bakterii antagonistycznych uzyskanych z liści winorośli na *Phomopsis viticola* Sacc. *Acta Agrobotanica*, w druku.
- Machowicz-Stefaniak Z., 1988. Antagonistic activity of epiphytic fungi from grape-vine against *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathol. Pol.* 16, 45–52.
- Machowicz-Stefaniak Z., Zalewska E., Król E., 1998. Susceptibility of antagonistic microorganism to some fungicides. *Ann. Agricult. Scie. s. E – Plant Protection*, vol. 27, 1/2, 91–97.
- Machowicz-Stefaniak Z., Zalewska E., 2000. Grzyby występujące na nadziemnych organach leszczyny. [w:] *Monitoring Grzybów*. M. Lisiewska i M. Ławrynowicz (red.), Sekcja Mikologiczna PTB, Poznań-Łódź 2000, 153–166.
- Markellou E., Malathrakis N. E., Walker R., Edwards S. G., Powell A. A., Seddon B., 1995. Characterisation of bacterial antagonists to *Botrytis cinerea* from the biotic environment and its importance with respect to *Bacillus* species and biocontrol considerations. [In:] *Environmental biotic factors in integrated plant disease control. Proceedings of the 3rd Conference of European Foundation for Plant Pathology, Poznań, Poland, September 5–9, 1994*. Ed. M. Mańka. *Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne, Poznań*, 385–389.
- Podrucki W., 1989. Antagonistic bacteria against *Pseudomonas syringae* and *Erwinia amylovora* from wild growing plants. In: *Plant Pathogenic bacteria. Proc. 7th Int. Conf. Plant Path. Bact., Budapest, Hungary, 1989*. Ed. Z. Klement., Budapest, 193–199.
- Pusey P. L., 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pestic. Sci.* 27, 133–140.
- Sobiczewski P., Bryk H., 1995. Bacteria for biocontrol of postharvest disease of fruit. In: *Environmental biotic factors in integrated plant disease control. Proceedings of the 3rd Conference of European Foundation for Plant Pathology, Poznań, Poland, September 5–9, 1994*. Ed. M. Mańka. *Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne, Poznań*, 105–111.
- Sobiczewski P., Bryk H., Berczyński S., 1996. Evaluation of epiphytic bacteria isolated from apple leaves in the control of postharvest apple diseases. *J. Fruit Orn. Plant Res.* 4, 1, 35–45.
- Zalewska E., 1999. Effect of phyllosphere microorganisms on the growth of *Monilia coryli*. *Phytopathol. Pol.* 18, 57–67.

THE POSSIBILITIES OF LIMITING SOME PATHOGENES OF HAZEL BY ANTAGONISTIC BACTERIA

Abstract. Amongst 138 epiphytic bacterial isolates originating from hazel leaves 12 isolates limited the growth of *B. cinerea*, 33 limited the growth of *C. corylicola*, 31 inhibited the growth of *G. coryli* and 36 isolates showed antagonistic activity against *Phomopsis* sp. *in-vitro*. It was found that 9 isolates limited the growth of all the pathogens tested and 7 isolates inhibited the growth of at least 3 out of them. The abilities of bacterial isolates tested to limit of the pathogens growth were higher after 4 days of the biotic influence than after 8 days. Isolates of bacteria with the highest inhibitory activity against the above – mentioned pathogens were identified as *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. and *Enterobacter*, *Citobacter*, *Klebsiella* or *Erwinia cypripedii*.

Key words: hazel, antagonistic bacteria, *Botrytis cinerea*, *Cytospora corylicola*, *Gloeosporium coryli*, *Phomopsis* sp.

Ewa Król, Zofia Machowicz-Stefaniak, Ewa Zalewska, Katedra Fitopatologii, Akademia Rolnicza w Lublinie, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, e-mail: tposlins@consus.ar.lublin.pl