Oddziaływanie epifitycznych bakterii z liści winorośli na *Phomopsis viticola* Sacc.

EWA KRÓL

Katedra Fitopatologii AR, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin,
Król E. (Department of Plant Pathology, University of Agriculture, Leszczyńskiego 7,
20-069 Lublin, Poland).

Influence of epiphytic bacteria from grapevine leaves on *Phomopsis viticola* Sacc.

(Otrzymano: 15.04.2003)

S u m m a r y

Out of 282 isolates of epiphytic bacteria population originating from grapevine leaves 15% inhibited growth of *Phomopsis viticola* on potato-dextrose agar. Protective activity of 16 isolates, representing different morphological groups was tested on one-year old of grapevine stems fragments. Majority of bacterial isolates which inhibited the fungus growth *in-vitro* provided no protection of stems fragments against *P. viticola*. The efficiency of protection activity of bacterial isolates tested decreased with time. The most effective isolates of bacteria in protection of grapevine stems were identified as *Bacillus* sp. and *Pseudomonas fluorescens*.

Key words: antagonistic bacteria, *Phomopsis viticola*, grapevine, biological control

WSTĘP

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że *P. viticola* izolowano powszechnie z owocujących krzewów i sadzonek winorośli z objawami nekrozy kory, w różnych rejonach Polski (Król – niepublikowane). Jako najlepszy sposób ograniczania rozwoju tego patogena uznaje się profilaktykę, a szczególnie stosowanie zdrowego materiału reprodukcyjnego (Hewitt i Pearson, 1988; Simon, 1993; Castillo-Pando i in., 1997; Scheper i in., 1997). Ochrona materiału szkółkarskiego przed tym grzybem opiera się przede wszystkim na stosowaniu fungicydów przed przechowywaniem łoży i przed wysadzeniem sztobrów. Szczególnie dobre wyniki uzyskano, gdy moczone i dezynfekowano sztobry przeznaczone na sadzonki w takich preparatach jak: siarczan 8-hydroksychinolin, benomyl, mancozeb, fluazian, folpet (Hewitt i Pearson, 1988; Castillo-Pando i in., 1997; Scheper i in., 1997).

Wyniki ostatnich badań wskazują, że niektóre mikroorganizmy, m.in. bakterie, mogą odegrać ważną rolę w ograniczaniu rozwoju grzybów chorobotwórczych dla jabłek i gruszek w czasie przechowywania (Wilson i Wiśniewski, 1989; Sobiczewski i Bryk, 1995). W literaturze nie znaleziono informacji na temat możliwości ograniczania rozwoju *P. viticola* przy pomocy bakterii antagonistycznych.

Celem przedstawionej pracy było wyizolowanie bakterii epifitycznych z liści winorośli oraz przebadanie ich oddziaływania na *Phomopsis viticola*.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach uwzględniono izolaty bakterii epifitycznych wyisobnionych z liści winorośli oraz szczep 197 *Phomopsis viticola*, uzyskany z chorych pędów winorośli i charakteryzujący się wysoką agresywnością w stosunku do organów, z których pochodził (Król – niepublikowane). Izolację bakterii z liści winorośli przeprowadzono w latach 1995-1997 wg metody przedstawionej przez Sobiczewskiego i in. (1996), a opisaną przez Król (1998). Do badań nad antagonistycznym oddziaływaniem bakterii na *P. viticola* wyselekcjonowano bakterie reprezentujące różne grupy morfologiczne.

Ocena antagonistycznego oddziaływania bakterii na *Phomopsis viticola* w warunkach *in-vitro*

Wybrane izolaty bakterii oceniono na podstawie wielkości strefy zahamowania wzrostu *Phomopsis viticola* mierzonej po 4 i 8 dniach wspólnego wzrostu grzyba i bakterii na pożywce PDA (Potato Dextrose Agar, bioMerioux) w sposób opisany przez Król (1998). Dla każdej kombinacji doświadczenia wykonano 3 powtórzenia. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu analizy wariancji i półprzedziałów ufności Tukey'a.

Ocena ochronnego oddziaływania bakterii przed infekcją pędów winorośli przez *P. viticola*

Do badań wytypowano 16 izolatów bakterii, które w różnym stopniu ograniczały wzrost *P. viticola in-vitro* i reprezentowały zróżnicowane grupy morfologiczne. Ocenę zdolności poszczególnych izolatów bakterii do ochrony pędów winorośli przed *P. viticola* wykonano na fragmentach pędów odm. 'Iza'. Jednoroczne pędy cięto wzdłuż rdzenia na około 6 cm długości odcinki, po czym dezynfekowano przez zanurzenie na 1 min. w 50% C_2H_5OH i płukano 3 krotnie po 3 minuty w sterylnej, destylowanej wodzie. Tak przygotowane pędy umieszczano w sterylnych komorach wilgotnościowych. Na wewnętrzną stronę pędu наносzono kroplę zawiesiny badanych izolatów bakterii antagonistycznych o objętości 0,1 ml i gęstości 10^8 jtk/ml (jednostek tworzących kulturę). Tej samej wielkości krople zawiesiny konidiów *P. viticola* o gęstości 10^6 jtk/ml наносzono na pędy po 24 godzinach (kombinacja I) i po 96 godzinach (kombinacja II) od zastosowania bakterii antagonistycznych. Dla każdej kombinacji doświadczenia i dla każdego badanego izolatu bakterii uwzględniono po 9 fragmentów pędów tj. 3 komory wilgotnościowe po 3 fragmenty. W kontroli uwzględniono

traktowanie pędów kroplą wody destylowanej i kroplą zawiesiny zarodników patogena (kontrola pozytywna) oraz nanoszenie tylko kropli wody destylowanej (kontrola negatywna I) i kropli wody destylowanej, a następnie zawiesiny każdego izolatu bakterii (kontrola negatywna II). Komory przetrzymywano w temp. 24°C przez 21 dni. Po tym czasie oceniono efektywność ochronnego oddziaływania bakterii na podstawie pozytywnych infekcji tj. występowania nekrozy pędów oraz obecności piknidów wraz z zarodnikami *P. viticola*. Wyniki poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu analizy wariancji i półprzedziałów ufności Tukey'a. Izolaty bakterii, które chroniły pędy najbardziej efektywnie oznaczono do rodzaju przy użyciu najważniejszych testów biochemicznych i fizjologicznych wg Bradbury (1988).

WYNIKI

Bakterie epifityczne izolowano z liści winorośli przez cały okres trwania badań. Ich liczebność była zmienna w zależności od odmiany i roku i kształtowała się od $2,5 \times 10^2$ na odmianie 'Skarb Panonii' w październiku 1995 roku do 3×10^6 na odmianie 'Iza' w czerwcu tego samego roku (tab. 1).

Tabela 1
Liczebność bakterii epifitycznych na liściach winorośli
Table 1
Number of epiphytic bacteria on grapevine leaves

rok Year miesiąc Month	1995		1996		1997	
	Iza	Skarb Panonii Pannonia Kincse	Iza	Skarb Panonii Pannonia Kincse	Iza	Skarb Panonii Pannonia Kincse
czerwiec June	3×10^6	$1,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	5×10^3	$2,9 \times 10^3$
lipiec July	$9,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	4×10^3	$2,7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$
sierpień August	$2,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	8×10^2	$4,7 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$
wrzesień September	$5,3 \times 10^6$	$7,5 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$4,1 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
październik October	5×10^3	$2,5 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$	$8,8 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$

Spośród populacji bakterii epifitycznych występujących na powierzchni liści wyselekcjonowano do dalszych badań 282 izolaty, reprezentujące różne grupy morfologiczne. Wśród nich 53 izolaty w różnym stopniu hamowały wzrost *P. viticola* na pożywce PDA (tab. 2, Fot. 1).

Tabela 2

Oddziaływanie bakterii na wzrost grzyba w warunkach *in-vitro*

Table 2

Influence of bacteria on the fungus growth under *in-vitro* conditions

Nr izolatów Isolate code	Strefa zahamowania po 4 dniach wspólnego wzrostu Inhibition zone after 4 days of dual growth	Nr izolatu Isolate code	Strefa zahamowania po 8 dniach wspólnego wzrostu Inhibition zone after 8 days of dual growth
35	25 a	21 a	21,7 a
1; 54	24 ab	4 a	20,7 a
15; 21a; 60; 66	23,5 abc	54; 35	19,2 a
16; 45		40	17 ab
4a; 24; 56	22,4 a-d	30	16,3 abc
22a ; 28a; 30	21,4 a-e	102	11 bcd
40; 42; 97	20,5 a-f	103; 107	10,7 bcd
79	19,7 a-g	99; 22 a; 66	9,6 cd
93; 100; 102	18,5 b-h	18; 106; 28 a	8,6 d
12; 99	18,0 b-i	24	8 de
18; 33; 69; 86	17,5 b-j	1	7,7 de
103		15; 104	5,5 def
39; 81; 85	16,5 c-j	60; 100	4,2 def
107; 58	16,0 d-j	90	3,7 def
31; 38; 104	15,6 d-j	79; 97	3 def
106	15,0 e-j	69	1,7 ef
57; 75	14,3 f-k	12; 16; 19; 33; 39;	0 f
29; 71	13,5 g-k	42; 45; 81; 93; 101	
48; 101; 105	12,2 h-k	29; 31; 38; 46; 48; 51;	przerost
19; 51; 61; 84; 90	11,5 ijk	56; 57; 58; 61; 71; 75;	
46; 87	11,0 jk	84; 85; 86; 87; 96;	overgrowth
96	8,0 k	105	

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie

Means followed by the same letter(s) do not differ significantly.

$NUR_{0,05} = 6,82$

$LSD_{0,05} = 6,82$

Strefy zahamowania wzrostu *P. viticola* przez bakterie na pożywce PDA
Zones of inhibition of the *P. viticola* growth by bacteria on PDA medium

Fot. 1. Wspólny wzrost *Phomopsis viticola* i wybranych izolatów bakterii

a – izolat 1 c – izolat 21a
b – izolat 4a d – kontrola

Fig. 1. Dual growth of *Phomopsis viticola* and individual isolates of bacteria

a – isolate 1 c – isolate 21a
b – isolate 4a d – control

Po 4 dniach wspólnego wzrostu strefa zahamowania wzrostu *P. viticola* przez bakterie wynosiła od 8 do 25,5 mm w zależności od izolatu. Po 8 dniach strefę taką tworzyły tylko niektóre izolaty i wynosiła ona od 1,7 do 21,7 mm. U 10 izolatów strefa zahamowania całkowicie zanikła, a w przypadku 18 innych izolatów grzybnia patogena przerastała przez linię wzrostu bakterii (tab. 2).

Stwierdzono ponadto, że po 4 dniach wspólnego wzrostu 18 izolatów tworzyło strefę zahamowania wzrostu grzyba szerszą niż 20 mm, a po 8 dniach tylko dwa izolaty (tab. 2). Okazało się, że większość izolatów bakterii, które tworzyły szeroką strefę hamowania grzyba po 4 dniach, skutecznie hamowała jego wzrost także po 8 dniach. Szczególnie silne działanie hamujące wykazały izolaty 21a i 4a, które w obu terminach obserwacji tworzyły tę strefę szerszą niż 20 mm (tabela 2). Izolaty bakterii 16 i 56 nie ograniczały wzrostu patogena po 8 dniach, a grzybnia przerastała nawet rysę bakterii, mimo, że po 4 dniach wspólnego wzrostu strefa zahamowania była szersza niż 20 mm (tab. 2).

Żaden spośród badanych izolatów nie chronił w pełni fragmentów pędów winorośli przed infekcją przez *P. viticola*. Po 3 tygodniach trwania doświadczenia na większości chronionych pędów obserwowano nekrozę oraz zarodnikujące piknidia patogena, co świadczyło o pozytywnej infekcji (tab. 3).

Stwierdzono jednak, że w przypadku ochronnego działania izolatów oznaczonych numerami 1 i 28a, w pierwszej kombinacji doświadczenia, uzyskano tylko po jednej udanej infekcji, co nie różniło się istotnie od kontroli negatywnej (tab. 3).

Tabela 3

Efektywność ochronnego działania epifitycznych bakterii na pędach winorośli przed infekcją *Phomopsis viticola*

Table 3

Efficiency of protective activity of epiphytic bacteria on grapevine canes against *Phomopsis viticola* infection

Liczba pędów traktowanych bakteriami z objawami chorobowymi nekrozy kory Number of canes treated by bacteria with symptoms of bark necrosis			
inokulacja <i>P. viticola</i> po 24 godz. od zastosowania bakterii antagonistycznych (Kombinacja I) inoculation of <i>P. viticola</i> after 24 h than antagonistic bacteria were introduced (Combination I)		inokulacja <i>P. viticola</i> po 96 godz. od zastosowania bakterii antagonistycznych (Kombinacja II) inoculation of <i>P. viticola</i> after 96 h than antagonistic bacteria were introduced (Combination II)	
Kontrola negatywna negative control	0 a	Kontrola negatywna negative control	0 a
Izolaty bakterii: Isolates of bacteria:		Izolaty bakterii: Isolates of bacteria:	
1	1 ab	28 a	2 b
28a	1 ab	1	3 bc
40	2 bc	22 a	4 cd
45	2 bc	35	4 cd
15	2 bc	45	4 cd
22a	2 bc	40	5 de
35	2 bc	16	6 ef
66	3 cd	18	6 ef
16	4 de	56	6 ef
18	4 de	66	6 ef
21a	4 de	54	6 ef
54	4 de	4a	7 f
56	4 de	31	7 f
24	5 ef	21 a	7 f
31	5 ef	24	7 f
4a	6 fg	15	7 f
Kontrola pozytywna Positive control	7 g	Kontrola pozytywna Positive control	7 g

W każdej kombinacji doświadczenia uwzględniono 9 fragmentów pędów.

Nine stem fragments were tested in each combination of experiment.

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie.

Means followed by the same letter do not differ significantly.

$$NUR_{0.05} = 1,7$$

$$LSD_{0.05} = 1,7$$

$$NUR_{0.05} = 0,2$$

$$LSD_{0.05} = 0,2$$

Najslabsze działanie ochronne wykazał szczep 4a, ponieważ liczba chronionych przez niego pędów na których wystąpiły objawy chorobowe nie różniła się istotnie od kontroli pozytywnej. Zdolność ochronna bakterii w kombinacji II doświadczenia była niewielka, bowiem stwierdzono więcej pozytywnych infekcji *P. viticola* niż w kombinacji I. Ponadto 10 spośród testowanych izolatów bakterii, w kombinacji II, nie wykazywało zdolności ochronnych pędów winorośli, ponieważ liczba udanych infekcji pędów nie różniła się istotnie od kontroli pozytywnej (tab. 3). Najlepsze właściwości ochronne przed *P. viticola* wykazały 2 izolaty bakterii. Izolat numer 1 okazał się gram dodatnią pałeczką wytwarzającą przetrwalniki – zaliczono go do rodzaju *Bacillus*. Izolat 28a był gram ujemną pałeczką, tworzył barwnik fluorujący na podłożu King B, wytwarzał lewan, oksydazę i dyhydrolizę argininy, powodował hydrolizę żelatyny, redukował azotany – zidentyfikowano go jako *Pseudomonas fluorescens*.

DYSKUSJA

Badania wykazały, że na liściach winorośli rozwijają się bakterie epifityczne, które mogą ograniczać rozwój *P. viticola*. Bakterie takie izolowali z fylosfery różnych gatunków roślin także inni autorzy, którzy udowodnili ich aktywność w ograniczaniu różnych patogenów roślin (Redmond i in., 1989; Fravel, 1988; Wilson i Wiśniewski, 1989; Sobiczewski i in., 1996; Zalewska, 1999; Król, 2001).

Wydaje się, że wykorzystanie w biologicznej ochronie roślin naturalnie występujących na ich organach antagonistów jest uzasadnione i korzystne. Niektórzy autorzy donoszą o izolowaniu mikroorganizmów antagonistycznych i ponownym ich aplikowaniu jako efektywnych czynników biologicznej ochrony na tej samej roślinie (Wilson i Wiśniewski, 1989; Sobiczewski i in., 1996; Redmond i in., 1989; Król, 1998, 2001). Inni uważają, że pochodzenie takich mikroorganizmów nie ma znaczącego wpływu na skuteczność ich oddziaływania na patogeny. Niektóre mikroorganizmy antagonistyczne wykazują bowiem szerokie spektrum aktywności grzybobójczej i są efektywne w ograniczaniu wzrostu różnych grzybów patogenicznych (Podrzucki, 1989; Pusey, 1989).

Wyniki przedstawionych badań potwierdziły opinię, że tylko niektóre izolaty bakterii antagonistycznych efektywnie ograniczają rozwój patogena mimo upływu czasu od ich zastosowania. Stwierdzony spadek aktywności na sztucznym podłożu po 8 dniach, jak i słabszy efekt ochronny w II kombinacji doświadczenia, tj. kiedy inokulacja pędów przez *P. viticola* nastąpiła po 4 dniach od zastosowania bakterii, może wynikać ze zmniejszenia liczebności populacji antagonisty. Obserwuje się to często po kilku dniach od wprowadzenia bakterii na chronione organy (Sobiczewski i in., 1996; Zalewska, 1999).

Obecne badania potwierdziły także wcześniejsze doniesienia o braku zależności między aktywnością antagonisty w ograniczaniu wzrostu patogena na sztucznym podłożu i jego efektywnością ochronną na roślinie (Fravel, 1988; Sobiczewski i Bryk, 1995; Sobiczewski i in., 1996; Bryk i in., 1998). Okazało się bowiem,

że większość izolatów wykazujących dużą aktywność *in-vitro*, słabo chroniło pędy winorośli przed infekcją przez *P. viticola*. Z badań Tuke y (1971) wynika, że aktywność bakterii kolonizujących organy roślin zależy od substancji wydzielanych przez te organy. Stwierdzono bowiem, że nie tylko liście, ale i pędy roślin drzewiastych „tracą” składniki organiczne i nieorganiczne, które mogą oddziaływać stymulującą na mikroorganizmy fylosferowe zarówno w czasie wzrostu, jak i spoczynku.

Przeprowadzone badania wykazały, że 2 izolaty bakterii tj. *Bacillus* sp. i *Pseudomonas fluorescens*, które najskuteczniej chroniły pędy winorośli przed infekcją *P. viticola*, efektywnie chroniły także winogrona przed porażeniem przez *B. cinerea* (Król, 1998). Reprezentują one rodzaje bakterii znane z antagonistycznych właściwości i powszechnego występowania w fylosferze roślin uprawnych (Podrzucki, 1989; Pusey, 1989).

LITERATURA

- 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.
- Bryk H., Dyki B., Sobiczewski P., 1998. Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on in vitro spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *BioControl*, 43: 97-106.
- Castillo-Pando M. S., Nair N. G., Emmett R. W., Wicks T. J., 1997. Inhibition in pycnidial viability of *Phomopsis viticola* on canes in situ as an aid to reducing inoculum potential of cane and leaf blight disease of grapevine. *Australian Plant Pathology*, 26: 21-25.
- Fravel D. R., 1988: Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 75-91.
- Hewitt W. B., Pearson R. C., 1988. *Phomopsis* Cane and leaf Spot. In: *Compendium of Grape Diseases*. Eds. Pearson R. C., Goheen A. C., APS PRESS, The American Phytopathological Society: 16-18.
- Król E., 1998. Epiphytic bacteria isolated from grape leaves and its effect on *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathol. Pol.*, 16: 53-61.
- Król E., 2001. Estimation of epiphytic bacteria isolated from orchard plants leaves in the limitation of some pathogenic fungi. „Zaščita Rastenij na Rubeže XXI veka”, Mińsk, Mat. Konferencji Naukowej poświęconej 30 leciu Biel. N.I.I.Z.R.: 394-395.
- Podrzucki 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.
- Redmond J. C., Marois J. J., MacDonald J. D., 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant Disease*, 71: 799-802.
- Sobiczewski P., Bryk H., 1995. Bacteria for biocontrol of postharvest diseases 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.
- Simon J. L., 1993. Mesures d'hygiène lors du greffage de la vigne. *Revue Suisse de viticulture, arboriculture, horticulture*, 25(1): 53-54.
- Scheper R. W. A., Whisson D. L., Scott E. S., 1997. Revised disease cycles of the two types of *Phomopsis* on grapevine. *Grapegrower and Winemaker*, 9: 41-44.
- Tukey H. B., 1971. Leaching of Substances from Plants. In: *Ecology of Leaf Surface Microorganisms* (Eds. Preece T. F. and Dickinson C. H.). Academic Press, London, New York: 67-79.
- Wilson C. L., Wiśniewski M. E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 27: 425-441.
- Zalewska E., 1999. Effect of phyllosphere microorganisms on the growth of *Monilia coryli*. *Phytopathol. Pol.*, 18: 57-67.

Streszczenie

Spośród 282 izolatów epifitycznych bakterii uzyskanych z liści winorośli około 15% hamowało wzrost *Phomopsis viticola* na pożywce ziemniaczano-glukozowej. Ochronne zdolności 16 izolatów reprezentujących różne grupy morfologiczne sprawdzono na fragmentach 1-rocznych pędów inokulowanych *P. viticola*. Większość izolatów bakterii hamujących wzrost grzyba w warunkach *in-vitro* nie wykazywała zdolności ochronnych na pędach winorośli. Efektywność ochronnego oddziaływania badanych izolatów bakterii zmniejszała się wraz z upływem czasu od ich zastosowania. Dwa izolaty najlepiej chroniące pędy zostały zidentyfikowane jako *Bacillus* sp. i *Pseudomonas fluorescens*.