

BAKTERIE PATOGENICZNE DLA CEBULI JAKO POTENCJALNE ZAGROŻENIE DLA INNYCH GATUNKÓW WARZYW

ONION PATHOGENIC BACTERIA AS A POTENTIAL RISK FOR OTHER VEGETABLES

Beata Kowalska, Urszula Smolińska

Instytut Ogrodnictwa
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
Beata.Kowalska@inhort.pl

Abstract

The pathogenicity and virulence of *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas viridiflava* strains, obtained from diseased onion bulbs, were evaluated towards carrot, Chinese cabbage and cauliflower. The study was conducted under the laboratory conditions. The most pathogenic bacteria was *B. gladioli* which caused disease symptoms on all studied species of vegetables. *E. cloacae* isolates expressed aggressiveness only to Chinese cabbage. The most susceptible plant to all pathogens tested was Chinese cabbage.

Key words: soft rot, bacteria, pathogenicity, carrot, Chinese cabbage, cauliflower

WSTĘP

Choroby bakteryjne warzyw stanowią w Polsce bardzo poważny problem. Szczególnie niebezpieczną chorobą jest miękka zgnilizna, która występuje na warzywach w polu, a także podczas transportu i przechowywania. Gatunki bakterii, które wywołują mięką zgniliznę to głównie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas viridiflava* i *Burkholderia gladioli* (Agrios 2005; Schwartz i Mohan 2008).

Prawie wszystkie warzywa są narażone na mięką zgniliznę, która może rozwijać się bardzo szybko w przechowalni lub w obrocie towarowym. Choroba ta znacznie zmniejsza ilość i obniża jakość warzyw przeznaczonych na sprzedaż.

Początkowe objawy miękkiej zgnilizny to małe plamki wyglądające jak nasiąknięte wodą, które gwałtownie powiększają się i występują za-

równy na powierzchni, jak i w głębi penetrowanej tkanki. Tkanka w obrębie porażonego fragmentu przybiera barwę kremową, jest śluzowata i przekształca się w lekko ziarnistą masę. Powierzchnia porażonych organów może pozostać nieuszkodzona, podczas gdy wewnętrzne tkanki zmieniają się w mętną, półpłynną papkę. Z czasem cały organ może ulec przekształceniu w miękką, wodnistą, zgniłą masę. Z gnijących tkanek wydziela się odrażający odór. Często jest on wynikiem rozkładu tkanki przez wtórnie wnikające bakterie saprotroficzne.

Za rozwój tej choroby odpowiedzialne są m.in. enzymy pektolityczne, które odgrywają znaczącą rolę w patogenezie. Enzymy te rozkładają łańcuch pektynowy na krótsze elementy, aż do struktur zawierających kilka lub tylko jedną cząsteczkę kwasu galakturonowego. Aktywność enzymów prowadzi do rozkładu blaszki środkowej komórek roślinnych i powoduje macerację i dezintegrację tkanek, czemu towarzyszy plazmoliza i zamieranie komórek (Toth i in. 2003).

Pojawianie się nowych patogenów lub nowych chorób wywoływanych przez patogeny innych gospodarzy roślinnych staje się zjawiskiem coraz bardziej powszechnym. W Polsce i na świecie w ostatnich latach ukazuje się coraz więcej prac dotyczących nowych patogenów, wywołujących choroby roślin (Schollenberger i in. 2008). Schollenberger i Zamorski (2008) zaobserwowali w Polsce chorobę eustomy wywoływaną przez *Burkholderia gladioli*. Stoyanova i in. (2013) w latach 2006-2011 stwierdzili po raz pierwszy chorobę cebul śnieżycy białej, którą powodowały bakterie *Burkholderia gladioli* i *Pseudomonas marginalis*. Autorki prezentowanej pracy we wcześniejszych badaniach zdiagnozowały choroby cebuli (*Allium cepa* L.), których czynnikami sprawczymi były bakterie niewystępujące jako patogeny tego warzywa w Polsce (Kowalska 2010; Kowalska i in. 2015).

Wskutek globalizacji i intensywnej wymiany handlowej, patogeny rozprzestrzeniają się bardzo szybko. W świetle przedstawionej sytuacji nie można wykluczyć, że patogeny bakteryjne, intensywnie porażające cebulę w ostatnich latach, mogą stanowić zagrożenie dla innych gatunków roślin. Zatem celem niniejszej pracy było sprawdzenie w warunkach laboratoryjnych czy zidentyfikowane we wcześniejszych badaniach bakterie chorobotwórcze dla cebuli mogą wywoływać zmiany chorobowe także na innych gatunkach warzyw.

MATERIAL I METODY

W badaniach wykorzystano patogeniczne dla cebuli izolaty bakteryjne zdeponowane w Pracowni Mikrobiologii Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach – trzy izolaty *Burkholderia gladioli*: Bg 259, Bg 285, Bg 435; trzy izolaty *Enterobacter cloacae*: Ec 166, Ec 160, Ec 153; dwańście izolatów *Pseudomonas marginalis*: Pm 17, Pm 19, Pm 34, Pm 47, Pm 106, Pm 120, Pm 179, Pm 185, Pm 439, Pm 483, Pm 503, Pm 513; sześć izolatów *Pseudomonas viridiflava*: Pv 52, Pv 114, Pv 161, Pv 172, Pv 486, Pv 508. Dodatkowo wykorzystano także trzy izolaty uzyskane z Banku Mikroorganizmów w Belgii: *Burkholderia cepacia* LMG 6962, *Burkholderia gladioli* pv. *alliiicola* LMG 6979 i *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 1747. Wszystkie badane izolaty pochodziły z cebul z objawami chorobowymi. Potwierdzono ich patogeniczność według postulatów Kocha oraz przeprowadzono identyfikację za pomocą testów biochemicznych i molekularnych (Kowalska 2010; Kowalska i in. 2015).

W prezentowanych badaniach wykonano testy patogeniczności w warunkach laboratoryjnych, sprawdzając zdolność badanych izolatów do maceracji organów wybranych warzyw. Testy przeprowadzono wykorzystując róże kalafiora ('Fremont F₁') i liście kapusty pekińskiej ('Bilko F₁') z następującymi izolatami *B. gladioli* i *E. cloacae* oraz korzenie marchwi ('Nrec F₁') z izolatami *B. gladioli*, *E. cloacae*, *P. marginalis*, *P. viridiflava*, a także ze szczepami referencyjnymi wymienionymi powyżej. Doświadczenia zostały przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych zgodnie z metodyką testu patogeniczności opracowaną we wcześniejszych badaniach (Kowalska 2010).

Korzenie marchwi zostały obrane i pokrojone w plastry. Liście kapusty pekińskiej zostały pokrojone na fragmenty 4 × 4 cm. Kwiat kalafiora został podzielony na małe róże. Fragmenty te zostały przemyte w bieżącej wodzie, sterylizowane powierzchniowo w 70% etanolu przez 30 sekund i w 0,5% NaOCl przez 5 min, a następnie przepłukane dwukrotnie w sterylnej wodzie destylowanej.

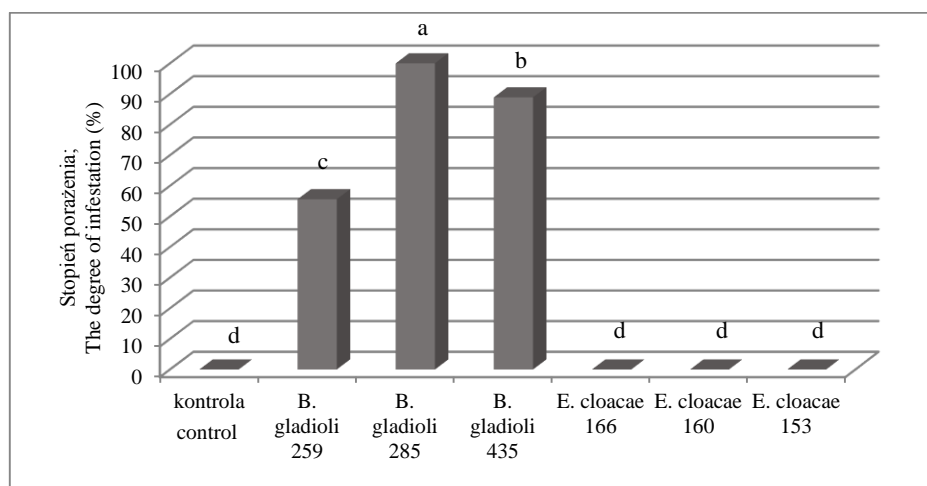
Fragmenty organów warzyw – sześć plastrów marchwi, sześć fragmentów róż kalafiora, trzy fragmenty liści kapusty pekińskiej zostały umieszczone w szalkach Petriego o średnicy 180 mm, które wcześniej zostały wyłożone zwilżoną, sterylną bibułą filtracyjną. Na każdy fragment naniesiono 20 µl zawiesiny bakteryjnej o gęstości 1,0-2,5 × 10⁸ jtk·ml⁻¹. Liście kapusty pekińskiej przed inokulacją bakteriami uszkodzono za pomocą igły laboratoryjnej. Dla każdej bakterii przygotowano po trzy szalki

z badanym gatunkiem warzyw (powtórzenia). Kombinację kontrolną stanowiły warzywa nie inokulowane bakteriami. Szalki Petriego inkubowano w 28 °C przez 4 dni. Następnie oceniano zmiany chorobowe na fragmentach warzyw. W przypadku kalafiora i marchwi stopień porażenia tkanek określano jako procent porażonej powierzchni, natomiast w przypadku kapusty pekińskiej mierzono średnicę plamy z objawami chorobowymi.

Każde doświadczenie zostało przeprowadzone trzy razy. Uzyskane wyniki opracowano metodą analizy wariancji. Do oceny istotności różnic między średnimi użyto testu Newmana-Keulsa ($p = 0,05$).

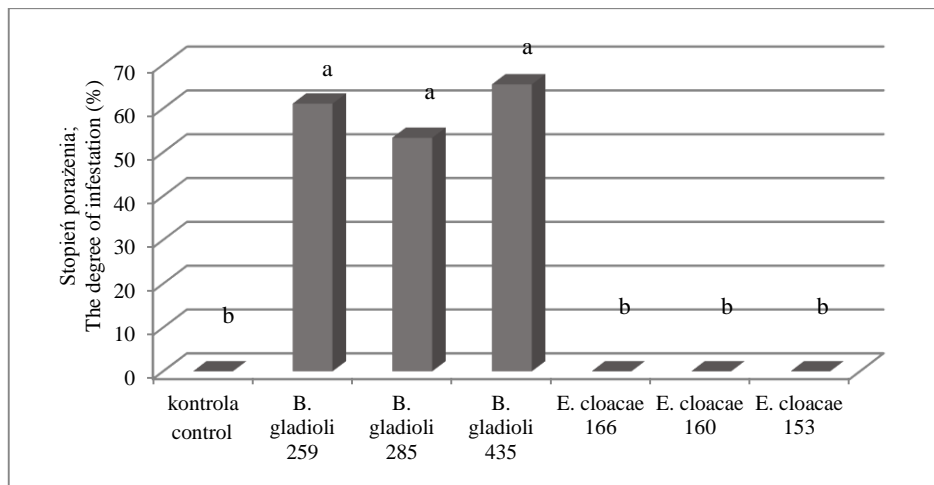
WYNIKI I Dyskusja

Bakteria *B. gladioli* okazała się najbardziej wirulentna spośród badanych gatunków. Wszystkie izolaty tego gatunku wykazały patogeniczność w stosunku do korzeni marchwi, róz kalafiora i liści kapusty pekińskiej. Izolaty Bg 259, Bg 285 i Bg 435 wywoływały miękką zgniliznę, której zmiany chorobowe osiągnęły odpowiednio 55, 100 i 89% powierzchni róz kalafiora (rys. 1), około 50-60% powierzchni krążków marchwi (rys. 2) oraz 6,9; 7,6 i 5,9 mm średnicy plam chorobowych na liściach kapusty pekińskiej (rys. 3). Izolaty referencyjne *B. cepacia* LMG 6962 i *B. gladioli* pv. *alliicola* LMG 6979 na krążkach marchwi wywoływały objawy chorobowe sięgające niemal 100% ich powierzchni (rys. 4).



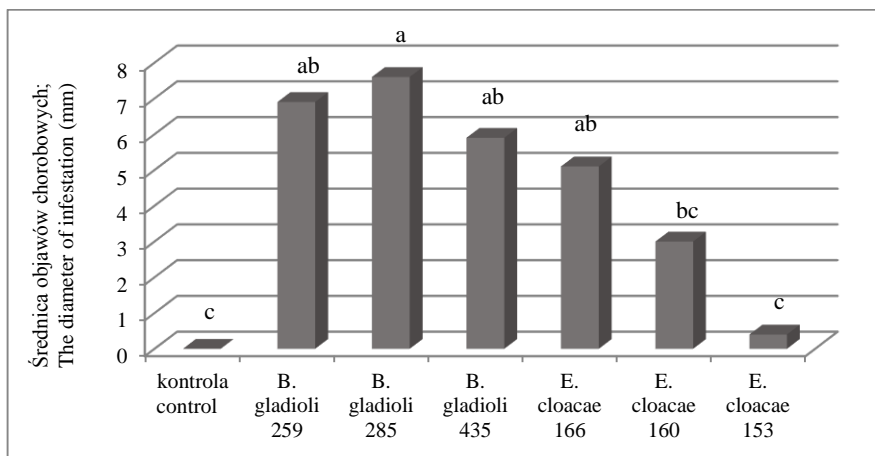
Średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy $p = 0,05$
Means followed by the same letter are not significantly different at $p = 0.05$

Rys. 1. Stopień porażenia róz kalafiora przez izolaty *B. gladioli* i *E. cloacae*
Fig. 1. The degree of infestation of cauliflower curds by bacterial isolates of *B. gladioli* and *E. cloacae*



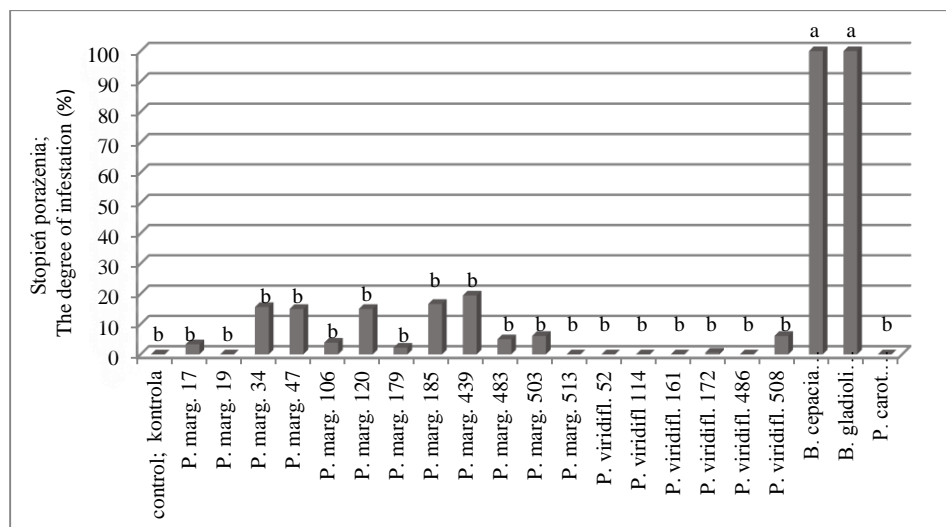
Objaśnienia: patrz rys. 1
 Explanations: see Fig. 1

Rys. 2. Stopień porażenia krążków marchwi przez *B. gladioli* i *E. cloacae*
 Fig. 2. The degree of infestation of carrot roots by bacterial strains of *B. gladioli* and *E. cloacae*



Objaśnienia: patrz rys. 1; Explanations: see Fig. 1

Rys. 3. Średnica objawów chorobowych wywołanych przez *B. gladioli* i *E. cloacae* na fragmentach liści kapusty pekińskiej
 Fig. 3. The diameter of infestation of Chinese cabbage leaves by bacterial strains of *B. gladioli* and *E. cloacae*



Objaśnienia: patrz rys. 1; Explanations: see Fig. 1

Rys. 4. Stopień porażenia krążków marchwi przez bakteryjne izolaty – *P. marginalis*, *P. viridiflava*, *B. cepacia* LMG 6962, *B. gladioli* pv. *alliicola* LMG 6979, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 1747

Fig. 4. The degree of infestation of carrot roots by bacterial isolates – *P. marginalis*, *P. viridiflava*, *B. cepacia* LMG 6962, *B. gladioli* pv. *alliicola* LMG 6979, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 1747

W literaturze znajduje się wiele doniesień na temat infekcji różnych gatunków roślin przez *B. gladioli*. Na przykład izolowano tę bakterię z roślin *Gladiolus* sp., *Iris* sp., *Eustoma grandiflorum* (Coenye i Vandamme 2003; Stoyanova i in. 2007), roślin z rodziny Orchidaceae (Keith i in. 2005), śnieżycy leśnej (Stoyanova i in. 2013), szafranu (Fiori i in. 2011), kukurydzy (Gijon-Hernandez i in. 2011) i ryżu (Nandakumar i in. 2009). Jednocześnie określono, że bakteria ta powoduje miękką zgniliznę tych gatunków roślin. *B. gladioli* występuje także w warunkach naturalnych w wodzie, glebie i ryzosferze, zatem uważana jest za oportunistyczny patogen. Brak jest danych na temat wywoływania przez tę bakterię chorób na marchwi, kalafiorze i kapuście pekińskiej. Na podstawie uzyskanych wyników można zakładać, że bakteria *B. gladioli* może stanowić potencjalne zagrożenie dla korzeni marchwi, róż kalafiora i kapusty pekińskiej. Należy jednak pamiętać, że pojawienie się choroby w warunkach polowych jest konsekwencją szeregu czynników biotycznych (relacja roślina – patogen) i abiotycznych (np. temperatura, wilgotność).

Badane trzy izolaty *E. cloacae* różniły się między sobą patogenicznością i wirulencją w stosunku do kapusty pekińskiej. Izolaty Ec 166 i Ec 160 wywoływały najbardziej rozległe zmiany, plamy chorobowe osiągały odpowiednio średnicę 5,1 i 3,0 cm. Natomiast izolat Ec 153 nie wywoływał zmian chorobowych na liściach kapusty pekińskiej (rys. 3). Szczepy bakteryjne tego samego gatunku mogą różnić się stopniem wirulencji w stosunku do atakowanych gatunków roślin. Jest to zjawisko dobrze udokumentowane w literaturze (Thomidis i in. 2005; Kowalska 2010; Mikiciński i in. 2010; Elbanna i in. 2014). Zjawisko to także wystąpiło w badaniach prowadzonych z izolatami *E. cloacae*. W naturze *E. cloacae* występuje w glebie, w wodzie, na nasionach roślin. W sprzyjających warunkach powoduje zgniliznę cebuli (ang. *enterobacter bulb decay*) (Schroeder i in. 2009; Kowalska 2010). Zasięg choroby nie jest duży, ale z roku na rok wzrasta liczba miejscowości, w których bakteria ta jest wykrywana jako patogen cebuli. Są doniesienia, że patogen ten, oprócz cebuli, poraża także papaję (Nishijima i in. 1987) i imbir (Nishijima i in. 2004). W literaturze brak jest informacji na temat patogeniczności bakterii *E. cloacae* w stosunku do kapusty pekińskiej, jednak wyniki badań wskazują, że bakteria może stanowić zagrożenie dla kapusty pekińskiej.

Badane izolaty *P. viridiflava* and *P. marginalis* nie wywoływały istotnych zmian chorobowych na korzeniach marchwi. Jedynie pięć izolatów *P. marginalis* powodowało zmiany chorobowe na fragmentach korzeni osiagające około 18-20% powierzchni, jednakże różnice nie były istotne statystycznie (rys. 4). Bakterie *Pseudomonas* szczególnie *P. viridiflava* i *P. marginalis* są powszechnie znane jako patogeny wywołujące miękką zgniliznę różnych gatunków roślin. W literaturze światowej są także doniesienia na temat zmian chorobowych wywoływanych przez te bakterie na korzeniach marchwi, szczególnie podczas przechowywania (Godfrey i Marshall 2002; Kahala i in. 2012).

Podsumowując, uzyskane wyniki świadczą o zdolnościach chorobotwórczych badanych izolatów bakterii w stosunku do marchwi, kapusty pekińskiej i kalafiora, należy jednak podkreślić, że fakt ten nie upoważnia do stwierdzenia, że patogeny te wywołają zmiany chorobowe w warunkach polowych.

WNIOSKI

1. Izolaty *B. gladioli* Bg 259, Bg 285 i Bg 435 wyosobnione z porażonych cebul wywoływały zmiany chorobowe w postaci gnilnych plam na różach kalafiora 'Fremont F₁', korzeniach marchwi 'Nrec F₁' i liściach kapusty pekińskiej 'Bilko F₁'.

2. Izolaty *E. cloacae* Ec 166 i Ec 160 powodujące miękką zgniliznę cebuli wywoływały gnilne zmiany na liściach kapusty pekińskiej ‘Bilko F₁’.
3. Stopień porażenia krążków marchwi przez izolaty *P. marginalis* i *P. viridiflava* nie różnił się istotnie od kontroli, zatem można przypuszczać, że izolaty te nie stanowią zagrożenia dla marchwi ‘Nerec F₁’.

Literatura

- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press, s. 656-662.
- Coenye T., Vandamme P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5(9): 719-729. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x.
- Elbanna K., Elnaggar S., Bakeer A. 2014. Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot. *Journal of Phytopathology* 162(11-12): 712-722. DOI: 10.1111/jph.12250.
- Fiori M., Ligios V., Schiaffino A. 2011. Identification and characterization of *Burkholderia* isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 50(3): 450-461.
- Gijon-Hernandez A., Teliz-Ortiz D., Mejia-Sanchez D., De La Torre-Almaraz R., Cardenas-Soriano E., De Leon C., Mora-Aguilera A. 2011. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. *Journal of Phytopathology* 159(5): 377-381. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2010.01776.x.
- Godfrey S.A.C., Marshall J.W. 2002. Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. *Plant Pathology* 51(2): 155-162. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2002.00679.x.
- Kahala M., Blasco L., Joutsjoki V. 2012. Molecular characterization of spoilage bacteria as a means to observe the microbiological quality of carrot. *Journal of Food Protection* 75(3): 523-531. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-185.
- Keith L.M., Sewake K.T., Zee F.T. 2005. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii. *Plant Disease* 89(12): 1273-1278. DOI: 10.1094/PD-89-1273.
- Kowalska B. 2010. Charakterystyka bakterii patogenicznych występujących na cebuli (*Allium cepa* L.) i metody ich zwalczania. Praca doktorska, Skier-niewice, s. 129.
- Kowalska B., Smolińska U., Oskiera M. 2015. *Burkholderia gladioli* associated with soft rot of onion bulbs in Poland. *Journal of Plant Pathology* (w druku) DOI: 10.4454/JPP.V97I1.007.

- Mikiciński A., Sobiczewski P., Sulikowska M., Puławska J., Treder J. 2010. Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. *Journal of Phytopathology* 158(4): 201-209. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01597.x.
- Nandakumar R., Shahjahan A.K.M., Yuan X.L., Dickstein E.R., Groth D.E., Clark C.A. i in. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States. *Plant Disease* 93(9): 896-905. DOI: 10.1094/PDIS-93-9-0896.
- Nishijima K.A., Couey H.M., Alvarez A.M. 1987. Internal yellowing, a bacterial disease of papaya fruits caused by *Enterobacter cloacae*. *Plant Disease* 71: 1029-1034. DOI: 10.1094/PD-71-1029.
- Nishijima K.A., Alvarez A.M., Hepperly P.R., Shintaku M.H., Keith L.M., Sato D.M. i in. 2004. Association of *Enterobacter cloacae* with rhizome rot of edible ginger in Hawaii. *Plant Disease* 88(12): 1318-1327. DOI: 10.1094/PDIS.2004.88.12.1318.
- Schollenberger M., Zamorski C. 2008. Nowa choroba bakteryjna eustomy. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 48(2): 520-523.
- Schollenberger M., Zamorski C., Czyż J., Mielecka M. 2008. Znane patogeny bakteryjne na mniej znanych gospodarzach. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 529: 183-189.
- Schroeder B.K., du Toit L.J., Schwartz H.F. 2009. First report of *Enterobacter cloacae* causing onion bulb rot in the Columbia Basin of Washington State. *Plant Disease* 93(3): 323. DOI: 10.1094/PDIS-93-3-0323A.
- Schwartz H.F., Mohan S.K. 2008. *Compendium of onion and garlic diseases and pests*. APS Press, s. 127.
- Stoyanova M., Georgieva L., Moncheva P., Bogatzevska N. 2013. *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas marginalis* pathogens of *Leucojum aestivum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 27(5): 4069-4073. DOI: 10.5504/BBEQ.2012.0139.
- Stoyanova M., Pavlina I., Moncheva P., Bogatzevska N. 2007. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 21(3): 306-310. DOI: 10.1080/13102818.2007.10817465.
- Thomidis T., Tsipouridis C., Exadaktylou E., Drogoudi P. 2005. Comparison of three laboratory methods to evaluate the pathogenicity and virulence of ten *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains on apple, pear, cherry and peach trees. *Phytoparasitica* 33(2): 137-140. DOI: 10.1007/BF03029971.
- Toth I.K., Bell K.S., Holeva M.C., Birch P.R.J. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4(1): 17-30. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x.