

Teresa KRZYŚKO-ŁUPICKA¹

WYBRANE ASPEKTY WYKORZYSTANIA ANTAGONISTYCZNYCH WŁAŚCIWOŚCI BAKTERII DO ZWALCZANIA FUZARIOZY PSZENICY

SOME ASPECTS OF ANTAGONISTIC BACTERIA STRAINS APPLICATION TO CONTROL OF WHEAT FUSARIOSIS

Abstrakt: Badano uzdolnienia pięciu szczepów antagonistycznych bakterii (*Erwinia herbicola* ID25, *Erwinia herbicola* IIA1, *Bacillus subtilis* ID20, *Nocardia* sp.37C/IV i *Streptomyces* sp. 5B/IV) do produkcji substancji typu regulatorów wzrostu roślin w zależności od warunków hodowli. Bakterie te wyizolowane z ryzosfery zbóż wykazywały działanie antagonistyczne w stosunku do fitopatogennych grzybów *Fusarium culmorum* i *Fusarium avenaceum*. Aktywność biologiczną metabolitów oceniono w teście z sałatą, a wyodrębnienie i wstępną identyfikację metabolitów typu regulatorów wzrostu (auksyn i giberelin) przeprowadzono metodą TLC. Stwierdzono, że testowane szczepy nie tylko ograniczają porażenie roślin, ale i stymulują ich wzrost. Najlepszy efekt stymulacji wykazał szczep promieniowca *Streptomyces* sp. 5B/IV. Wytwarzał on szereg metabolitów typu auksyn (Rf 0,07±0,87) i giberelin (Rf 0,08±0,88) o różnych wartościach Rf i różnych barwach.

Słowa kluczowe: auksyny, gibereliny, *Streptomyces*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*

W ochronie roślin przed fuzariozami wywoływanymi przez grzyby z rodzaju *Fusarium* dominują metody chemiczne. Jest to związane z ich krótkim czasem działania, wysoką skutecznością stosowanych fungicydów i względną łatwością wykonania zabiegów. Jednak wzrost kosztów ich stosowania, skażenie środowiska naturalnego, a także częste przypadki uodparniania się na nie fitopatogenów sprawiają, że wzrasta zainteresowanie biologicznymi metodami ochrony roślin z wykorzystaniem saprofitycznych lub słabo patogennych szczepów bakterii i grzybów [1].

Antagonistyczne, w stosunku do fitopatogenów - *Fusarium avenaceum* i *Fusarium culmorum*, szczepy mikroorganizmów wyodrębniono poprzez trójstopniową selekcję obejmującą sprawdzenie aktywności substancji biologicznych, konkurencję i fungistazę. Działanie osłonowe na rośliny kontrolowano w teście vegetacyjnym z siewkami pszenicy w warunkach sztucznego zakażenia gleby grzybami *Fusarium avenaceum* i *Fusarium culmorum*. W tym kierunku przebadano około 450 szczepów bakterii i grzybów wyizolowanych z ryzosfery zbóż. Kilkanaście szczepów antagonistycznych znosiło hamujące działanie fitopatogenów na rozwój siewek pszenicy, ale tylko szczepienie nasion pszenicy zawiesinami izolatów, takich jak: *Erwinia herbicola* IIA1, *Erwinia herbicola* I25, *Bacillus subtilis* ID20, *Streptomyces* 5B/4 i *Nocardia* 37C/IV, chroniło siewki pszenicy przed infekcją, poprawiało wschody i stymulowało rozwój roślin [2]. Nasunęło to przypuszczenie, że właśnie te bakterie mogą być producentami metabolitów typu regulatorów wzrostu roślin, takich jak auksyny, gibereliny, cytokiny, etylen i kwas abscynowy [3, 4].

Na szczególną rolę promieniowców z rodzaju *Streptomyces* w funkcjonowaniu ekosystemów zwróciły uwagę Marcinkiewicz i Bis [5].

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 4, 45-035 Opole, tel. 77 401 60 57, email: teresak@uni.opole.pl

Celem przedstawianej pracy było przebadanie antagonistycznych szczepów bakterii *Erwinia herbicola* IIA1, *Erwinia herbicola* I25, *Bacillus subtilis* ID20, *Streptomyces* sp. 5B/IV i *Nocardia* sp. 37C/IV, znoszących hamujące działanie *Fusarium avenaceum* i *F. culmorum* na infekcję siewek pszenicy, w kierunku wytwarzania substancji typu regulatorów wzrostu roślin.

Materiał i metodyka badań

Materiał badawczy stanowiły wyselekcjonowane antagonistyczne w stosunku do *Fusarium avenaceum* i *F. culmorum* trzy szczepy bakterii właściwych (*Erwinia herbicola* IIA1, *Erwinia herbicola* I25, *Bacillus subtilis* ID20) i dwa szczepy promieniowców (*Streptomyces* sp. 5B/IV i *Nocardia* sp. 37C/IV).

Do kontroli aktywności biologicznej metabolitów testowanych mikroorganizmów zastosowano podłoża, na jakich wyodrębniano je z ryzosfery zbóż: do hodowli bakterii właściwych podłoże DDG z ekstraktem drożdżowym, a promieniowców podłoże Williams-Doviesa [6].

Podłoża szczepiono standaryzowanym inoculum o $\zeta = 2$ przy długości fali $\lambda = 520$ nm i inkubowano w temperaturze 28°C przez 9 dób. Następnie hodowle odwirowywano i korygowano pH płynów pohodowlanych do pH wody destylowanej. Aktywność biologiczną kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń ($10^0 \div 10^{-5}$) metabolitów wytworzonych przez testowane szczepy bakterii oceniano metodą reakcji wzrostowej siewek sałaty (*Lactuca sativa*) wg Sobieszczańskiego [7, 8]. Kontrolę stanowiła sterylna woda destylowana jako związek obojętny dla roślin. Oznaczenie wykonano w czterech powtórzeniach.

Wybrane szczepy bakterii, wykazujące największą stymulację wzrostu siewek sałaty, hodowano w podłożach, jak podano wcześniej. Oceniano wpływ warunków hodowli na produkcję auksyn i giberelin, dawki tryptofanu (200 i 500 mg·dm⁻³) jako prekursora auksyn, dawki inoculum (2 i 5 cm³) i odczynu podłoża (pH 6,0 i 7,2÷7,4). Wyodrębnienie i wstępną identyfikację metabolitów typu regulatorów wzrostu roślin, z płynów pohodowlanych najaktywniejszych szczepów, przeprowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej, TLC. Substancje typu regulatorów wzrostu ekstrahowano octanem etylu (2 x 50 cm³) z 9-dobowych hodowli, odwadniano i zagęszczano (1 cm³), a następnie наносzono (40 µl; 1 µl = 1 mm³) na płytki chromatograficzne DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄. Na płytce наносzono wzorce (40 µl): auksyn - IAA (kwas indolilo-3-octowy), IPA (kwas indolilo-3-propionowy), IAN (3-indoliloacetonitryl) i giberelin - GA₃ (kwas giberelinowy). Metabolity były rozdzielane z użyciem układów rozwijających: auksyny - chloroform:octan etylu:kwas octowy lodowaty (70:40:5); gibereliny - benzen:butanol:kwas octowy lodowaty (80:25:5). Płytki chromatograficzne wywołano z zastosowaniem testu Ehrlicha dla auksyn i testu fluorescencyjnego (UV, $\lambda = 254$ nm) dla giberelin.

Wyniki i dyskusja

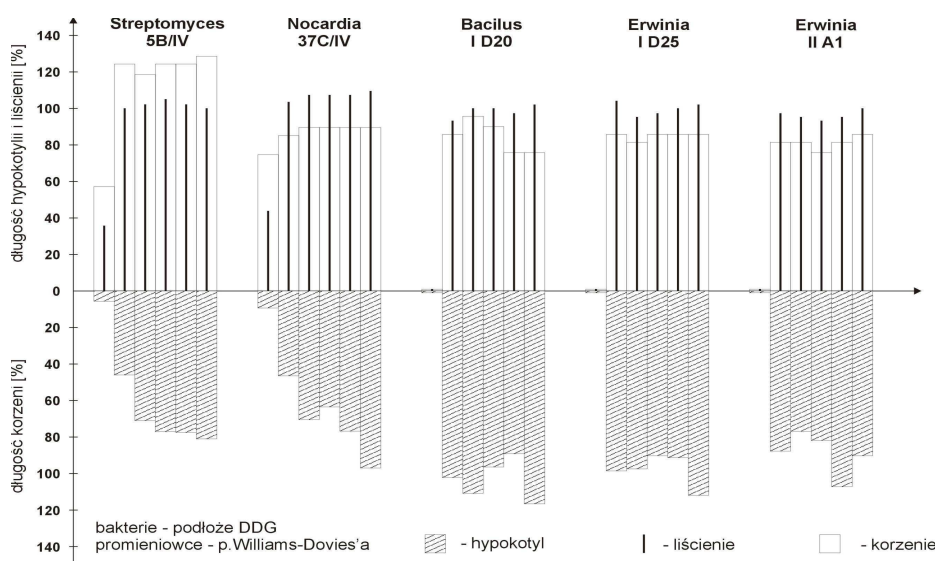
Testowane szczepy bakterii właściwych (*Erwinia herbicola* IIA1, *Erwinia herbicola* I25, *Bacillus subtilis* ID20) i promieniowców (*Streptomyces* sp. 5B/IV i *Nocardia* sp. 37C/IV) nie tylko ograniczały porażenie siewek pszenicy, ale i stymulowały ich wzrost [2]. Takie działanie może być związane z produkcją specyficznych metabolitów, do których

należą auksyny i gibereliny - związki o dużej aktywności fizjologicznej wpływającej na wzrost i rozwój roślin [3, 9].

Aktywność biologiczną metabolitów oceniano reakcją wzrostową siewek sałaty, a ich wyodrębnienie i rozdział przeprowadzono metodą TLC.

Metabolity produkowane przez testowane szczepy różnie oddziaływały na wzrost siewek sałaty. Stwierdzono, że jedynie metabolity produkowane przez *Streptomyces* sp. 5B/IV istotnie stymulowały wzrost hypokotylu w granicach $18 \div 25\%$, ale hamowały wzrost korzeni sałaty ($18 \div 50\%$), przy czym efekt ten malał wraz ze wzrostem rozcieńczenia metabolitów. Natomiast metabolity pozostałych testowanych szczepów niezależnie od rozcieńczenia (w porównaniu do kontroli) hamowały wzrost hypokotylu sałaty, a tylko w największych rozcieńczeniach stymulowały rozwój korzeni (rys. 1).

Wyniki uzyskane dla siewek sałaty wykazały, że metabolity wytworzone przez badane szczepy charakteryzowały się różną aktywnością: hamowały lub stymulowały wzrost siewek sałaty. Zjawisko to sugeruje, że są to różne związki. Starano się przynajmniej częściowo zidentyfikować związki stymulujące rozwój roślin jako jednego z czynników antagonistycznego oddziaływania z fitopatogennymi grzybami *Fusarium avenaceum* i *Fusarium culmorum*.

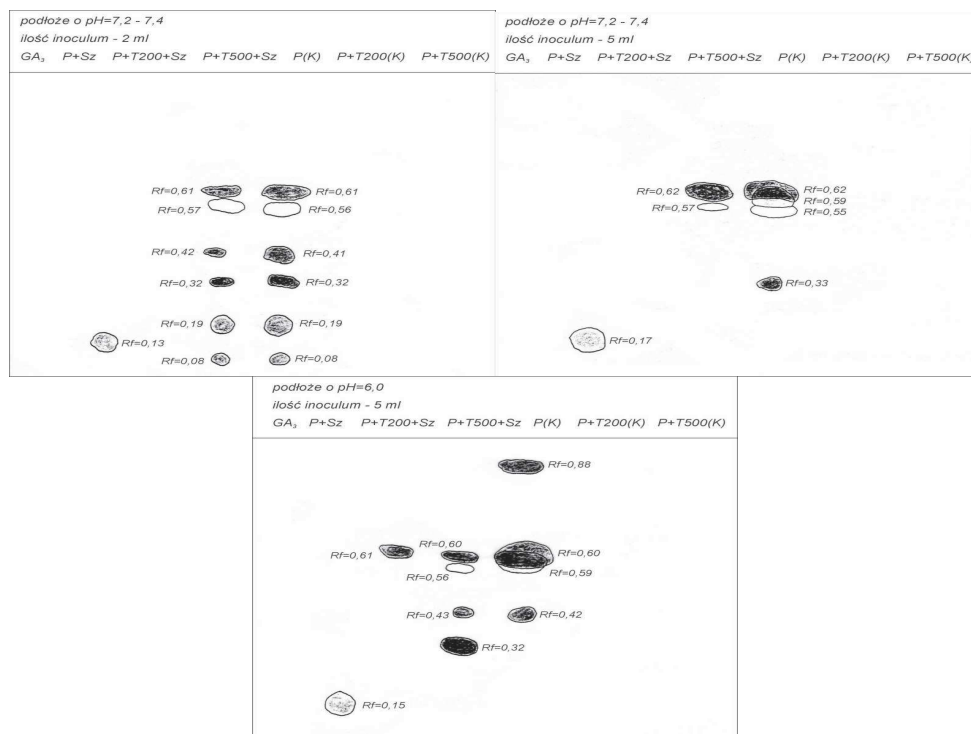


Rys. 1. Reakcja [%] siewek sałaty na obecność metabolitów wytworzonych w podłożach hodowlanych przez testowane szczepy bakterii i promieniowców

Fig. 1. Response of lettuce seedlings on the presence of metabolites synthesis by tested bacteria and actinomycetes on medium [%]

Z przeprowadzonego rozdziału chromatograficznego wynika, że niezależnie od dawki inoculum szczep *Streptomyces* sp. 5B/IV wytwarzał zarówno metabolity typu auksyn (R_f $0,07 \div 0,61$), jak i giberelin ($0,08 \div 0,88$) o różnych wartościach R_f i różnych barwach (rys. rys. 2 i 3).

Działanie substancji typu regulatorów wzrostu roślin w zależności od ich stężenia może stymulować lub hamować wzrost roślin [10]. Dobierając odpowiedni skład podłoża i warunki hodowli, można sterować produkcją substancji biologicznie aktywnych przez szczepy mikroorganizmów antagonistycznych [3, 11, 12].



Układ rozwijający - benzen:butanol:kwas octowy lodowaty (80:25:5)

Test wywołujący: Ehrlicha

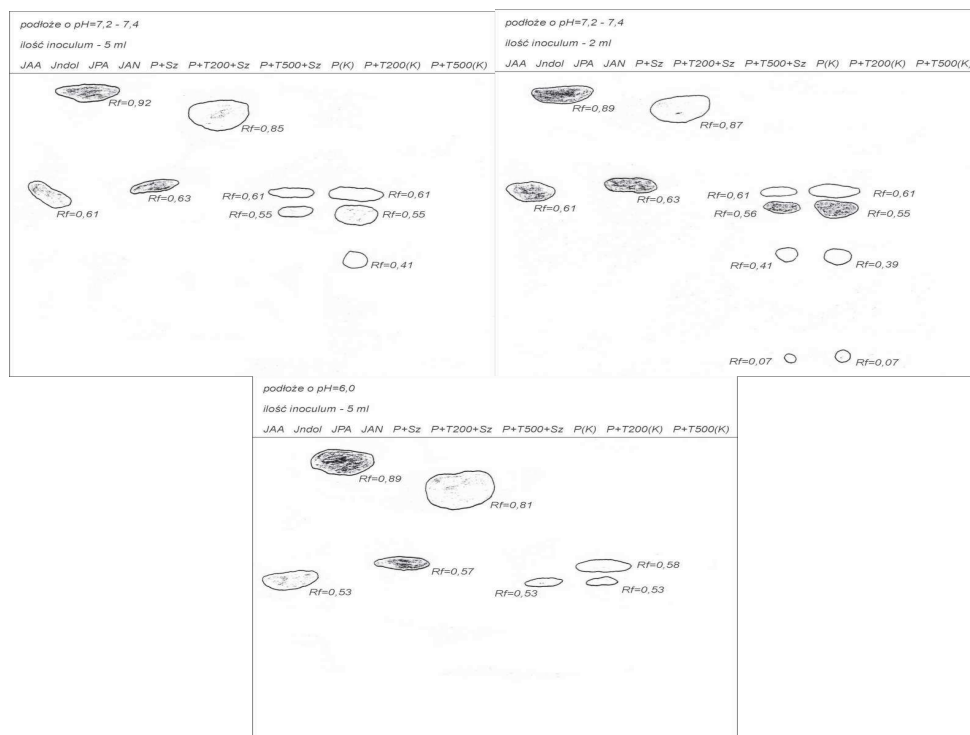
K - kontrola; P - podłoże; T - tryptofan; Sz - szczep *Streptomyces* sp. 5B/IV; GA₃ - kwas giberelinowy.

Rys. 2. Chromatogram zagęszczonego ekstraktu octanowego z płynów pochodzących z kultury promieniowca *Streptomyces* sp. 5B/IV - gibereliny

Fig. 2. Chromatogram of condensed extracts from postliquid cultures *Streptomyces* sp. 5B/IV strain - gibberellin

Na podstawie porównania z zastosowanymi wzorcami wykryto IPA (kwas indolilo-3-propionowy). Natomiast w przypadku IAA (kwasu indolilo-3-octowego) co prawda uzyskano metabolity o wartościach R_f zbliżonych do wzorca, ale o innej barwie. Nie stwierdzono wśród metabolitów substancji zgodnych z wzorcami, takimi jak: IAN (3-indoliloacetonitryl) czy GA₃ (kwas giberelinowy) (rys. 3).

Uzyskane wyniki sugerują, że antagonistyczne szczepy nie tylko wykazują działanie ochronne na rośliny przed infekcją grzybami z rodzaju *Fusarium*, ale mogą również stymulować wzrost roślin, co w przypadku szczepu *Streptomyces* sp. 5B/IV jest związane z produkcją substancji auksyno- i giberelinopodobnych.



Układ rozwijający - chloroform:octan etylu:kwas octowy lodowaty (70:40:5)

Test wywołujący: fluorescencyjny

K - kontrola; P - podłoże; T - tryptofan; Sz - szczep *Streptomyces* sp. 5B/IV; IAA - kwas indolilo-3-octowy;

IPA - kwas indolilo-3-propionowy; IAN - 3-indoliloacetonitril

Rys. 3. Chromatogram zagęszczonego ekstraktu octanowego z płynu pochodzącego szczepu promieniowca *Streptomyces* sp. 5B/IV - auksyny

Fig. 3. Chromatogram of condense extracts from postliquid cultures *Streptomyces* sp. 5B/IV strain - auxins

Reasumując można uznać, że istnieją podstawy do wykorzystania szczepu promieniowca *Streptomyces* sp. 5B/IV w biologicznej ochronie przed fitopatogennymi grzybami z rodzaju *Fusarium*.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki sugerują, że antagonistyczne szczepy nie tylko wykazują działanie ochronne na rośliny przed infekcją grzybami z rodzaju *Fusarium*, ale mogą również stymulować wzrost roślin, co w przypadku szczepu *Streptomyces* sp. 5B/IV może być związane z produkcją substancji auksyno- i giberelinopodobnych.
2. Z przeprowadzonego rozdzielania chromatograficznego wynika, że niezależnie od dawki inoculum szczep *Streptomyces* sp. 5B/IV wytwarzał zarówno metabolity typu auksyn (R_f 0,07÷0,61), jak i giberelin (0,08÷0,88) o różnych wartościach R_f i różnych barwach.

Literatura

- [1] Kirk J.I., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H. i Trevors J.T.: J. Microbiol. Methods, 2004, **58**, 169-188.
- [2] Krzyśko-Łupicka T.: *Rola mikroorganizmów ryzosfery zbóż w ograniczaniu rozwoju fitopatogennych grzybów z rodzaju Fusarium*. Przygotowane do druku, 2010.
- [3] Pietr S.: Post. Nauk Roln., 1990, **3**, 19-36.
- [4] Pour M.: Chem. Listy, 2003, **97**, 1061-1069.
- [5] Marcinkiewicz K i Bis H.: Zesz. Nauk. AR Wrocław, 1998, **332**, 45-54.
- [6] Difco manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, 48232 USA, tenth ed., 1984.
- [7] Sobieszczański J.: Acta Microbiol. Polon., 1965, **14**, 183-202.
- [8] Sobieszczański J.: Acta Microbiol. Polon., 1966, **15**(1), 67-84.
- [9] Rumińska A., Suchorska K. i Węglarz Z.: Acta Horticult. (ISHS), 1978, **73**, 131-136.
- [10] Wierzbowska J. i Bowszys T.: J. Elementol., 2008, **13**(3), 411-422.
- [11] Sobieszczański J., Stempniewicz R. i Krzyśko T.: *Interrelationships between Microorganisms and Plant in Soil* (ed. Vancura V. i Kunc F.). Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha 1987, 201-205.
- [12] Stempniewicz R., Sobieszczański J. i Krzyśko T.: Mat. Ogólnopol. Symp. Wzajemne stosunki między drobnoustrojami a roślinami wyższymi. Poznań - Dymaczewo 2-5.06.1987, 22-23.

SOME ASPECTS OF ANTAGONISTIC BACTERIA STRAINS APPLICATION TO CONTROL WHEAT FUSARIOSIS

Independent Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole

Abstract: The abilities of five bacteria strains (*Erwinia herbicola* ID25, *Erwinia herbicola* IIA1, *Bacillus subtilis* ID20, *Nocardia* sp. 37C/IV and *Streptomyces* sp. 5B/IV) to produce plant growth regulators according to the medium and methods of cultivation were examined. These bacteria isolated from cereals rhizospheres were antagonistic to phytopathogenic fungi: *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. The biological activity of the microbial metabolites was determined using lettuce seedlings bioassay and the identification of metabolites was achieved using TLC. The most active was strain stimulated the growth of lettuce - *Streptomyces* 5B/IV. It was shown that strains *Streptomyces* 5B/IV produced auxin (R_f 0.07÷0.61) and gibberellin - like substances (R_f 0.08÷0.88). Among these metabolites was detected 3-indole propionic acid (IPA).

Keywords: auxin, gibberellin, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Streptomyces* sp.