

Wpływ kwasu salicylowego syntetyzowanego przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* i *P. chlororaphis* na fitopatogeniczne grzyby rodzaju *Fusarium*

¹Urszula Jankiewicz, ¹Dariusz Gołąb, ²Magdalena Frąk

¹Katedra Biochemii – Wydział Rolnictwa i Biologii

²Katedra Kształtowania Środowiska – Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, Polska

Abstrakt: Występujące powszechnie w ryzosferze bakterie z rodzaju *Pseudomonas* są zdolne do stymulacji wzrostu roślin. Mechanizm korzystnego oddziaływania tych bakterii na rośliny jest złożony, jednym z jego elementów jest ograniczanie wzrostu patogenów grzybowych roślin.

Za antagonistyczne oddziaływanie bakterii *Pseudomonas* względem grzybów patogenicznych odpowiadają pozakomórkowe enzymy lityczne oraz metabolity wtórne.

W pracy zbadano zdolność do syntezy kwasu salicylowego przez dwa szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas*: *P. fluorescens* (UM1) oraz *P. chlororaphis* (UM2). Bakteryjny kwas salicylowy wykrywano techniką chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz: kwas octowy:chloroform (9:1). Dodany do podłoża hodowlanego kwas salicylowy uzyskany po ekstrakcji octanem etylu z hodowli badanych bakterii spowodował znaczne zahamowanie wzrostu grzybni fitopatogenów z rodzaju *Fusarium*. Najmniej podatny na działanie kwasu salicylowego okazał się *F. graminearum*, natomiast największe zahamowanie wzrostu stwierdzono dla *F. culmorum* na podłożu z dodatkiem kwasu salicylowego z hodowli UM1. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują na istotną rolę syntetyzowanego przez bakterie kwasu salicylowego w ograniczaniu wzrostu grzybowych patogenów z rodzaju *Fusarium*.

słowa kluczowe: *Pseudomonas*, grzyby patogeniczne, biologiczne zwalczanie, kwas salicylowy

WSTĘP

Wiele gatunków bakterii z rodzaju *Pseudomonas* jest zaliczanych do grupy PGPR (ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria) – niepatogennych bakterii ryzosferowych, które wywierają pozytywny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Bakterie z grupy PGPR stymulują kiełkowanie

nasion, wydłużanie się siewek, rozwój korzeni roślin oraz ułatwiają pobieranie wody i składników odżywczych przez rośliny. Pozytywne oddziaływanie bakterii PGPR z roślinami jest możliwe dzięki wytwarzaniu przez drobnoustroje biologicznie aktywnych metabolitów, w tym także regulatorów wzrostu.

Wśród PGPR szczególną uwagę poświęca się bakteriom z rodzaju *Pseudomonas*, które występują powszechnie w ryzosferze roślin i są uważane za mikroorganizmy możliwe do wykorzystania w walce biologicznej z agrofagami, będące alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin (Weller, 1988; O'Sullivan, O'Gara, 1992; Pietr, Sobiczewski, 1993).

Termin biologiczne zwalczanie w odniesieniu do chorób roślin uprawnych oznacza zwalczanie fitopatogenów przez niepatogenne mikroorganizmy. Zjawisko to w dużym stopniu przyczynia się do redukcji populacji patogena. Ogranicza to występowanie określonych chorób i tym samym stymuluje wzrost i rozwój roślin (Pal i in., 2006).

Antagonistyczne działanie bakterii z rodzaju *Pseudomonas* względem grzybów będących fitopatogenami jest wynikiem współdziałania i uzupełniania się wielu mechanizmów. Bezpośredni antagonizm w stosunku do patogenów objawia się przede wszystkim walką o niszę ekologiczną. Ochrona roślin przez mikroorganizmy odbywa się przez produkcję metabolitów wtórnych, w tym antybiotyków, cyjanowodoru lub sideroforów.

Kwas salicylowy (SA) syntetyzowany przez bakterie *Pseudomonas* jest jednym z ważniejszych czynników biologicznej ochrony roślin. Szczegółowy mechanizm fungistatycznego oddziaływania SA nie jest do końca poznany (Mercado-Blanco i in., 2001). Wiadomo, że bakteryjny SA tworzy trwałe kompleksy z żelazem – tzw. siderofory, a ponadto jest elicitorem w indukowanej systemicznej odporności roślin (Meyer, 1992, De Vleeschauwer i in., 2006, Rajkumar, 2008). Właściwości chelatujące kwasu salicylowego były obserwowane u bakterii: *P. fluorescens* oraz *P. putida* (Meyer, 1992). Stwierdzono udział kwasu

Autor do kontaktu:

Urszula Jankiewicz

e-mail: urszula_jankiewicz@sggw.pl

tel. 48 22 5932560, fax 4822 5932562

Praca wpłynęła do redakcji 6 listopada 2013 r.

salicylowego syntetyzowanego przez *P. fluorescens* w indukowaniu odporności przeciwko *Fusarium oxysporum* (Saikia i in., 2003) oraz przeciw wirusowi mozaiki tytoniu (Meyer, 1992).

Celem pracy było ustalenie, czy i w jakim stopniu kwas salicylowy syntetyzowany przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* oddziałuje na grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny

Materiałem biologicznym używanym do badań były szczepy bakterii wyizolowane z ryzosfery pszenicy ozmiej: *Pseudomonas fluorescens* (oznaczony w laboratorium jako UM1) oraz *P. chlororaphis* (UM2). Bakterie przechowywano w temperaturze -80°C w 15% glicerolu. Przynależność gatunkową bakterii ustalono na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych z wykorzystaniem testów API (bioMerieux).

W badaniach wykorzystano grzyby: *Fusarium solani*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum* oraz *Fusarium culmorum* pochodzące z kolekcji SGGW.

Podłoża hodowlane bakterii i grzybów

Bakterie syntetyzujące kwas salicylowy hodowano na płynnej pożywce SSM o składzie [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]:

K_2HPO_4	6,0
KH_2PO_4	3,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
MgSO_4	0,2
kwas bursztynowy	4,0

Odczyn pożywki doprowadzano przed sterylizacją do pH 6,8 za pomocą $2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH. Hodowlę bakterii prowadzono 72 h w 28°C z wytrząsaniem przy 120 rpm.

Grzyby będące patogenami roślin hodowano przez 7 dni w temperaturze pokojowej na podłożu stałym PDA (Potato-Dextrose Agar).

Wykrywanie kwasu salicylowego techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Płyn pohodowlany odwirowano, supernatant przefiltrowano (filtr membranowy o średnicy porów $0,22\ \mu\text{m}$) i zakwaszono do pH 2,0 stosując 2M HCl. Roztwór został poddany ekstrakcji 1 objętością octanu etylu. Zebrano fazę organiczną, wysuszono w wirówce próżniowej w ciemności. Próby zawieszono w 20% metanolu. Wzorec stanowił kwas salicylowy (Sigma Aldrich) rozpuszczony także w 20% metanolu (Jones i in., 2007). Rozdział został przeprowadzony techniką chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym (Silica Gel 60 Merck) w komórce chromatograficznej. Fazę ruchomą stanowił kwas octowy: chloroform (9:1) (Siddiqui, Shaikat, 2003).

Badanie wpływu wzorcowego i endogennego kwasu salicylowego (SA) na wybrane szczepy grzybów z rodzaju *Fusarium*

Wyekstrahowany z hodowli bakterii i zateżony kwas salicylowy sterylizowano przez filtrację i dodawano do schłodzonego podłoża PDA w objętości 1/6 podłoża. Szacowane na podstawie chromatogramów końcowe stężenie tego metabolitu w podłożu wynosiło ok. $150\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ w przypadku bakterii *P. fluorescens* (UM1) i $120\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz *P. chlororaphis* (UM2). Podłoże rozlewano na szalki Petriego, a następnie szczepiono grzybnią odpowiednich fitopatogenów z rodzaju *Fusarium*. Podobny układ doświadczalny zastosowano dla hodowli pleśni prowadzonych w obecności syntetycznego kwasu salicylowego o końcowym stężeniu $150\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodowla kontrolna nie zawierała SA w pożywce PDA. Na przygotowane według powyższego opisu podłoża przenoszono wycięte sterylnym korkoborem przerośnięte badaną grzybnią krążki agarowe z przygotowanych wcześniej 7-dniowych kultur grzybów na podłożu PDA. Hodowlę prowadzono w 28°C przez 8 dni.

Stopień zahamowania wzrostu grzybni określano przez porównanie średnicy wzrostu grzybni w hodowlach kontrolnych i z dodatkiem kwasu salicylowego.

Wszystkie wyniki przedstawione w pracy są średnią z co najmniej trzech powtórzeń doświadczenia.

WYNIKI

Do badań wykorzystano dwa izolaty ryzosferowe, zidentyfikowane jako *Pseudomonas fluorescens* (UM1) oraz *P. chlororaphis* (UM2). Na podstawie wyników uzyskanych po rozdziale chromatograficznym stwierdzono, że badane bakterie *Pseudomonas* są zdolne do syntezy kwasu salicylowego. Pomimo że kwas salicylowy wykryto w hodowli zarówno szczepu UM1, jak i UM2, to pierwszy z nich uwalniał do podłoża więcej tego metabolitu. Szacowane na podstawie chromatogramów stężenie tego metabolitu wynosiło ok. $150\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ w przypadku bakterii *P. fluorescens* (UM1) i $120\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz *P. chlororaphis* (UM2). Przeprowadzone badania wpływu bakteriynego i syntetycznego kwasu salicylowego na wybrane grzyby z rodzaju *Fusarium* pozwoliły stwierdzić, że dodatek do podłoża hodowlanego SA w warunkach *in vitro* hamuje wzrost grzybni

Zarówno dla bakteriynego, jak i wzorcowego kwasu salicylowego uzyskano podobny stopień zahamowania wzrostu grzybni dla poszczególnych gatunków *Fusarium*. Najmniej podatny na działanie kwasu salicylowego okazał się gatunek *F. graminearum*, w tym przypadku stopień zahamowania wzrostu grzybni nie przekraczał 50%. Największe zahamowanie wzrostu grzybni stwierdzono dla *F. culmorum* na podłożu z dodatkiem kwasu salicylowego z hodowli UM1 (fot. 1). Uzyskane wyniki, będące średnią z trzech powtórzeń doświadczenia, przedstawiono w tabeli 1.



K A B
 fot. D. Gołąb

Fot. 1. 8-dniowa hodowla *F. culmorum* na podłożu PDA: K – hodowla kontrolna, A – z dodatkiem bakteryjnego kwasu salicylowego UM1, B – z dodatkiem syntetycznego kwasu salicylowego

Fot. 1. 8-day of breeding ground *F. culmorum* on PDA: K – control culture, A – with the addition of salicylic acid bacteria UM1, B – with the addition of a synthetic salicylic acid.

Tabela 1. Stopień zahamowania wzrostu grzybni [%] patogenów z rodzaju *Fusarium*

Table 1. The inhibition [%] of mycelial growth of *Fusarium* pathogens.

Patogen Pathogen	SA wzorcowy synthetic SA	SA	SA
		wyekstrahowany z hodowli UM1 SA from UM1	wyekstrahowany z hodowli UM2 SA from UM2
<i>Fusarium solani</i>	90	80	80
<i>Fusarium culmorum</i>	80	100	80
<i>Fusarium avenaceum</i>	90	85	90
<i>Fusarium graminearum</i>	50	50	40

DYSKUSJA

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie biologiczną ochroną roślin. Środki chemiczne stają się niewystarczające, a ich stosowanie niesie ryzyko zanieczyszczenia środowiska czy szkodliwego działania na niedocelowe organizmy oraz zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. Wśród PGPR szczególną uwagę poświęca się bakteriom z rodzaju *Pseudomonas*, które występują powszechnie w ryzosferze roślin. Są one uważane za mikroorganizmy możliwe do użycia w walce biologicznej, będące alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin (Weller, 1988; O'Sullivan, O'Gara, 1992; Pietr, Sobiczewski, 1993). Wiele danych literaturowych potwierdza wykorzystanie tych mikroorganizmów do wspomaganie wzrostu roślin i zwalczania ich patogenów. Uczestniczą one w ochronie roślin poprzez hamowanie wzrostu grzybów fitopatogenicznych (Scheffer i in., 1989; Haas, Defago, 2005; Jousset i in., 2006). Antagonistyczne działanie bakterii *Pseudomonas* związane jest z wytwarzaniem metabolitów wtórnych, które pośrednio lub bezpośrednio ograniczają wzrost i rozwój grzybów patogenicznych. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* powszechnie uwalniają do środowiska siderofory typu piowerdyna lub piochelina (Jankiewicz, 2009). Jak wynika

z badań własnych synteza kwasu salicylowego nie jest rozpowszechnioną cechą u tych bakterii.

W prezentowanych w tej pracy doświadczeniach zbadano stopień hamowania rozwoju patogenów z rodzaju *Fusarium* w obecności kwasu salicylowego wyekstrahowanego z hodowli dwóch szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, zidentyfikowanych jako *Pseudomonas fluorescens* oraz *P. chlororaphis*. Obydwa szczepy wykazywały zdolność do syntezy kwasu salicylowego, jednakże w ich hodowlach wykryto różne stężenie tego związku. Stwierdzono, że kwas salicylowy wyekstrahowany z hodowli tych bakterii wykazywał działanie fungistatyczne. Podobnie działał wzorcowy kwas salicylowy pozyskany handlowo. Obserwowane różnice w działaniu fungistatycznym mogą być wynikiem gatunkowego zapotrzebowania grzybów z rodzaju *Fusarium* na żelazo lub ich potencjalną zdolnością do syntezy chelatów żelaza. Mechanizm inhibicji wzrostu grzybni patogenów wiąże się bowiem prawdopodobnie w tym wypadku z chelatowaniem przez kwas salicylowy jonów żelaza, niezbędnych do prawidłowego wzrostu grzybów. Brak zdolności wytwarzania chelatów żelaza przez niektóre grzyby patogeniczne uniemożliwia wówczas ich rozwój (Lemanceau i in., 2007). Fungistatyczne działanie kwasu salicylowego było już obiektem wielu badań (Meyer i in., 1992). Badaniem wpływu syntetycznego kwasu salicylowego na wzrost *F. oxysporum ciceri* zajmowali się także Saikia i in. (2003). Przedstawione przez tych autorów wyniki badań świadczą o hamowaniu rozwoju patogenicznego grzyba na podłożu z dodatkiem SA w stężeniu końcowym 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Interesujące badania zostały przeprowadzone także przez Chen i in. (1999). Ci autorzy przeprowadzili obserwacje działania syntetycznego kwasu salicylowego na zoospory *Pythium aphanidermatum*. Przetastawione przez nich wyniki badań wykazały, że kwas salicylowy całkowicie hamował kiełkowanie zoospor dopiero w stężeniu 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Te zróżnicowane dane literaturowe pokazują, że hamowanie wzrostu grzybów patogenicznych w obecności kwasu salicylowego może być uzależnione od gatunku patogena lub warunków doświadczenia.

WNIOSKI

1. Badane bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mają zdolność do syntezy kwasu salicylowego.
2. Bakteryjny kwas salicylowy dodany do podłoża powodował zahamowanie wzrostu patogenicznych grzybów z rodzaju *Fusarium*,

3. Wśród zbadanych gatunków *Fusarium* najbardziej oporny na działanie kwasu salicylowego okazał się *F. graminearum*, a najmniej *F. culmorum*.

PIŚMIENNICTWO

- Chen CH., B'elanger R.R., Benhamou N., Paulitz T.C., 1999.** Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *Europ. J. Plant Pathol.*, 105: 477-486.
- De Vleeschauwer D., Cornelis P., Höfte M., 2006.** Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 19: 1406-1419.
- Haas D., D'efago G., 2005.** Biological control of soil borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(4): 307-319.
- Jankiewicz U., 2009.** Charakterystyka i znaczenie piowerdyn bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. *Post. Mikrobiol.*, 48(4): 243-254.
- Jones A.M., Lindow S.E., Wildermuth M.C., 2007.** Salicylic acid, yersiniabactin, and pyoverdine production by the model phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: synthesis, regulation, and impact on tomato and *Arabidopsis* host plants. *J. Bacteriol.*, 10: 6773-6786.
- Jousset A., Lara A., Wall L.G., Valverde C., 2006.** Secondary metabolites help Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(11): 7083-7090.
- Lemanceau P., Robin A., Mazurier S., Vansuyt G., 2007.** Implication of pyoverdines in the interactions of *Fluorescens Pseudomonas* with soil microflora and plant in the rhizosphere. *Soil Biol.*, 12: 14-16.
- Mercado-Blanco J., van der Drift Koen M. G. M., Olsson Per E., Thomas-Oates Jane E., van Loon Leendert C., Bakker P.A.H.M., 2001.** Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.*, 183(6): 1909-1920.
- Meyer J.M., 1992.** Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 951-958.
- O'Sullivan D.J., O'Gara F., 1992.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, 56: 662-676.
- Pal K. K., McSpadden Gardener B., 2006.** Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instr.*, DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pietr S.J., Sobiczewski P., 1993.** Możliwości i ograniczenia zastosowania bakterii do ochrony roślin przed chorobami. *Mat. Symp. „Biotyczne środowisko uprawne a zagrożenie chorobowe roślin”*, Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne – ART Olsztyn, Olsztyn, ss. 47-57.

- Rajkumar M., Lee K.J., Freitas H., 2008.** Effects of chitin and salicylic acid on biological control activity of *Pseudomonas* spp. against damping off of pepper. *South Afr. J. Bot.*, 74: 268-273.
- Saikia R., Singh T., Kumar R., Srivastava R., Srivastava A.K., Singh K., Arora D.K., 2003.** Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiol. Res.*, 158(3): 203-213.
- Scheffer R.J., Elgersma D.M., Strobel G. A., 1989.** *Pseudomonas* for biological control of dutch elm disease. *Europ. J. Plant Pathol.*, 95(5): 123-131.
- Siddiqui I., Shaukat S., 2003.** Role of salicylic acid in *Pseudomonas aeruginosa* strain IE-6S+-mediated induction of systemic resistance against *Meloidogyne javanica* in tomato. *Phytopathol. Meditter.*, 43: 268-274.
- Weller D.M., 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.

U. Jankiewicz, M. Frąk

EFFECT OF SALICYLIC ACID, SYNTHESIZED BY THE BACTERIA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* AND *P. CHLORORAPHIS* ON PHYTOPATHOGENIC FUNGI *FUSARIUM*

Summary

Commonly found in the rhizosphere, bacteria of the *Pseudomonas* strain are capable of stimulating plant growth. The mechanism of the beneficial impact of these bacteria on plants is complex, one of its components is to reduce the growth of plant fungal pathogens. The antagonistic effect of *Pseudomonas* bacteria on the fungal phytopathogens is related to extracellular lytic enzymes and secondary metabolites. The study investigated the ability of the synthesis of salicylic acid by the two strains of bacteria of the genus *Pseudomonas*: *P. fluorescens* (UM1) and *P. chlororaphis* (UM2). Bacterial salicylic acid was detected in the thin layer chromatography phase: acetic acid:chloroform (9:1). Added to the culture medium, salicylic acid obtained after extraction with ethyl acetate from a culture of the test bacteria, resulted in a significant inhibition of mycelia growth of *Fusarium* phytopathogens. *Fusarium graminearum* was found to be the least sensitive to salicylic acid. Growth inhibition was observed for *Fusarium culmorum* on the substrate with the addition of salicylic acid from the culture UM1. The results of the experiments indicate the importance of salicylic acid synthesized by bacteria in reducing the growth of fungal phytopathogens and thus in stimulating plant growth.

key words: *Pseudomonas* species, fungal pathogens, biological control, salicylic acid