
**WPLYW SAPROTROFICZNYCH MIKROORGANIZMÓW NA
ROZWÓJ PSEUDOTECJÓW *VENTURIA INAEQUALIS* (COOKE)
ADERH.**

**Effect of saprotrophic microorganisms on the development of *Venturia
inaequalis* pseudothecia**

Beata Mieszka, Anna Bielenin
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

ABSTRACT

The influence of different bacteria isolated from urea-treated apple leaves on the development of *V. inaequalis* pseudothecia and on the decomposition of the leaves was evaluated in the experiments conducted in 2004-2005. The number of bacteria isolated from the leaves treated with a 5% urea solution in the autumn was significantly higher than of those isolated from the untreated leaves. Among the isolated bacteria, the most numerous were Gram-negative *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp. and *Enterobacter* sp. They suppressed the formation of *V. inaequalis* pseudothecia from 14% (*Pseudomonas* sp.) to 38% (*Erwinia* sp. and *Enterobacter* sp.). The use of a *Pseudomonas* sp. suspension in a 5% urea solution resulted in a strong inhibition of the formation (in 99%) and development of pseudothecia. The suspension was also the most effective in the decomposition of apple leaves.

Key words: apple scab, urea, saprotrophic bacteria, pseudothecia development

WSTĘP

Parch jabłoni powodowany przez grzyb *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. jest najgroźniejszą chorobą jabłoni, występującą we wszystkich rejonach uprawy tego gatunku. Jednym z czynników decydujących o jej nasileniu, obok warunków atmosferycznych i podatności odmiany, jest poziom pierwotnego źródła infekcji. W warunkach klimatycznych Polski głównym źródłem infekcji pierwotnych są zarodniki workowe rozwijające się w pseudotecjach tworzonych na porażonych ubiegłorocznych liściach jabłoni. Ryzyko epidemii parcha jabłoni może być istotnie zmniejszone przez zabiegi agrotechniczne prowadzące do ograniczenia poziomu inokulum. W ostatnich latach najczęściej stosowaną metodą jest zabieg roztworem

mocznika wykonywany jesienią, w okresie opadania liści (Meszka i Bielenin 2001; Margraf i in. 1972; Gupta i Lele 1980; Montealegre i Gonzales 1983). Zabieg ten na traktowanych liściach jabłoni stymuluje rozwój mikroorganizmów, przede wszystkim bakterii.

Celem pracy była ocena zmian zachodzących w populacji bakterii zasiedlających opadłe liście jabłoni po zabiegu roztworem mocznika oraz zbadanie wpływu bakterii najczęściej izolowanych z liści traktowanych mocznikiem na formowanie i dojrzewanie pseudotecjów *V. inaequalis*, a także na dekompozycję liści.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono w latach 2004-2005 w Sadzie Doświadczalnym Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Dąbrowicach na liściach jabłoni odmiany 'McIntosh'. Z liści nietraktowanych i traktowanych jesienią 5% roztworem mocznika izolowano bakterie i liczono uzyskane kolonie na pożywkach mikrobiologicznych. Bakterie identyfikowano uwzględniając ich cechy fizjologiczne i biochemiczne. Badania taksonomiczne przeprowadzono na podstawie powszechnie stosowanych w tego typu pracach testach, które obejmowały:

Testy podstawowe

1. Barwienie Grama (wg Manual of Microbiological Methods 1957, za Sobiczewskim 1998).
2. Występowanie fluorescencji (King i in. 1954).

Testy LOPAT – na podstawie schematu Lelliott i innych 1966

1. Obecność oksydaz (Kovacs 1956).
2. Aktywność pektolityczna – zgnilizna na ziemniaku (Lelliott i in. 1966).
3. Obecność dihydrolazy argininy (Thornley 1960).
4. Redukcja azotanów (Kiraly i in. 1977).
5. Produkcja kwasu z glukozy (Hugh i Leifson 1953).

Po wykonaniu wszystkich testów, identyfikację bakterii przeprowadzono wg klucza Bradbury'ego (1988).

Oceniono także wpływ najczęściej występujących bakterii z rodzajów: *Pseudomonas*, *Enterobacter* i *Erwinia* na rozwój i dynamikę dojrzewania owocników *V. inaequalis*. W tym celu zebrane jesienią liście jabłoni odmiany 'McIntosh', silnie porażone przez *V. inaequalis*, moczniono przez 20

minut (28 października 2004) w wodnych zawiesinach testowanych bakterii oraz w 5% roztworze mocznika i zawiesinie bakterii *Pseudomonas*. Liście kontrolne mocznono w wodzie. Każda kombinacja obejmowała 400 liści (po 100 liści w 4 powtórzeniach). Zawiesiny bakterii sporządzano zmywając 24-godzinne kolonie bakterii z pożywki agarowej (z pięciu skosów) 100 ml wody. Następnie zawiesinę uzupełniono wodą lub roztworem mocznika do objętości 500 ml, ustalając gęstość zawiesiny za pomocą pomiaru transmittancji na 82%. Ponadto w celu dokładnego określenia liczby bakterii, w używanych do badań zawiesinach, zastosowano metodę rozcieńczeń i posiewów płytkowych na pożywkę agarową, zawierającą 2,5% agaru (Difco Nutrient Agar) z dodatkiem 5% sacharozy. Po 2 dobach inkubacji w temperaturze 25°C liczono kolonie bakteryjne i oznaczano ich liczbę w 1 ml zawiesiny. Wynosiła ona od 12×10^9 do 19×10^9 bakterii/ml zawiesiny. Potraktowane liście umieszczano w siatkach i pozostawiano na powierzchni gleby pod koronami drzew.

Badania nad rozwojem pseudotecjów rozpoczynano około połowy marca, gdy w owocnikach zaczynał się proces formowania worków. Próby losowe, po 10 liści z każdego powtórzenia, pobierano bezpośrednio z sadu, co 7 dni. Pod binokulem na każdym liściu określano liczbę wytworzonych owocników na 1 cm^2 powierzchni plamy parcha, w czterech powtórzeniach. Następnie z każdego liścia, z różnych plam parcha, preparowano po 10 owocników i umieszczano je na szkiełku podstawowym w kropli wody. Po rozgnieceniu oznaczano stadium rozwojowe każdego z nich, używając mikroskopu świetlnego przy 150-krotnym powiększeniu. W każdym terminie oceniano rozwój 100 owocników pobranych z 10 liści w kombinacji. Do oceny dynamiki dojrzewania owocników wykorzystano pięciostopniową skalę bonitacyjną (Borecki i Cichosz 1961; Meszka i Bielenin 2002).

Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu metody analizy wariancji R.A. Fishera. Do oceny różnic między średnimi użyto testu t-Studenta lub wielokrotnego testu t – Duncana, przyjmując poziom istotności 5%.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Jesienne traktowanie liści jabłoni roztworem mocznika miało wyraźnie stymulujący wpływ na rozwój bakterii. Już po dwóch tygodniach od zabiegu obserwowano kilkakrotny wzrost populacji bakterii. Liczba bakterii rozwijających się na traktowanych liściach była niekiedy nawet kilkadziesiąt razy większa niż na liściach kontrolnych (tab. 1).

Tabela 1

Liczba bakterii ($\times 10^6$) na liściach jabłoni 'McIntosh' nietraktowanych i traktowanych 5% roztworem mocznika – Number of bacteria ($\times 10^6$) on apple leaves 'McIntosh' untreated and treated with 5% urea

Kombinacja Treatment	Termin pobierania próbek liści (w tygodniach od terminu traktowania ich roztworem mocznika) – Leaf sample collection time (weeks after treatment with 5% urea)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
rok doświadczenia – year of experiment 2004									
Liście kontrolne Control leaves	179*	92	185	153	155	49	124	101	219
Liście traktowane 5% roztworem mocznika Leaves treated with 5% urea	nb	390*	1547*	1047*	630*	1522*	1522*	414*	1047*
rok doświadczenia – year of experiment 2005									
Liście kontrolne Control leaves	nb	29	18	34	180	156	163	608	190
Liście traktowane 5% roztworem mocznika Leaves treated with 5% urea	nb	237*	367*	610*	161 ^{NI}	205*	189 ^{NI}	1583*	1543*

* różnice istotne przy 5% poziomie istotności; test t-Studenta – significant differences at the 5% level of significance; Student's t-test

NI – różnice nieistotne przy 5% poziomie istotności; test t-Studenta – Differences not significant at the 5% level of significance; Student's t-test

Także Burchill i Cook (1971) wykazali, że mocznik po pewnym czasie od jego zastosowania stymulował rozwój bakterii na liściach jabłoni. Podobne wyniki uzyskał w swoich badaniach Crosse (1963), który stwierdził, że mocznik w początkowym okresie po zastosowaniu hamuje aktywność bakterii, a wzrost ich liczebności następuje dopiero później. Dalsze badania autora wykazały, że bakterie osiągały maksimum liczebności ($1,5 \times 10^8$) po 39 dniach od traktowania mocznikiem i wtedy ich liczba była w przybliżeniu 20 razy większa niż na liściach kontrolnych (Crosse i in. 1968).

Tabela 2

Liczba owocników *V. inaequalis* wytworzona na liściach jabłoni po jesiennym traktowaniu zawiesiną bakterii – Number of *V. inaequalis* pseudothecia formed on apple leaves treated with bacteria suspensions

Kombinacja – Treatment	Liczba owocników w szt./cm ² plamy parcha Number of pseudothecia/cm ² of scab lesion
Liście kontrolne – traktowane wodą Control – leaves treated with water	46,7 c*
Liście traktowane zawiesiną <i>Pseudomonas</i> sp. Leaves treated with <i>Pseudomonas</i> sp. suspension	40,3 b
Liście traktowane zawiesiną <i>Erwinia</i> sp. Leaves treated with <i>Erwinia</i> sp. suspension	29,4 b
Liście traktowane zawiesiną <i>Enterobacter</i> sp. – Leaves treated with <i>Enterobacter</i> sp. suspension	28,9 b
Liście traktowane zawiesiną <i>Pseudomonas</i> sp. w 5% roztworze mocznika Leaves treated with <i>Pseudomonas</i> sp. suspension in 5% urea solution	0,1 a

*Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy 5% poziomie istotności; wielokrotny test t-Duncana – Means followed by the same letter do not differ significantly at the 5% level of significance; Duncan's multiple range t-test

Wśród bakterii izolowanych z liści traktowanych roztworem mocznika znajdowano głównie bakterie Gram (-). Charakterystyczne wśród nich były zielono fluoryzujące bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas*. Wszystkie te bakterie dawały pozytywny wynik w teście Kovacs'a i powodowały redukcję azotanów do azotynów lub wolnego azotu. Pozytywny wynik dawały również w teście z ziemniakami, powodując ich zgniliznę w charakterystycznym brązowym kolorze. Pozwalało to odróżnić bakterie z rodzaju *Pseudomonas* od bakterii *Xanthomonas*, które powodowały zgniliznę ziemniaka w kolorze miodowym. Większość bakterii z rodzaju *Pseudomonas* stanowiły takie gatunki, jak: *P. syringae*, *P. marginalis*, *P. fluorescens*, *P. cichorii*, *P. agarici*. Bardzo dużo bakterii z rodzaju *Pseudomonas* notowali także na liściach jabłoni traktowanych mocznikiem Crosse i inni (1968). Według nich bakterie te mogły być odpowiedzialne za rozkład liści.

Poza bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* z liści traktowanych roztworem mocznika często izolowano także bakterie z rodzaju *Erwinia*, głównie dwa gatunki, *E. stewartii* i *E. rhapantici* oraz *Enterobacter* sp. Oprócz wymienionych rodzajów izolowano również, choć z mniejszą częstotliwością, bakterie z rodzajów: *Flavibacterium*, *Clostridium* i *Xanthomonas*.

Jesienne moczenie porażonych przez *V. inaequalis* liści jabłoni odmiany 'McIntosh' w zawiesinach bakteryjnych spowodowało ograniczenie liczby tworzących się owocników od 14 do 38% i około 3-tygodniowe opóźnienie w dojrzewaniu pseudotecjów w porównaniu z owocnikami na liściach kontrolnych. Bardzo silne ograniczenie liczby tworzonych pseudotecjów (w 99%) zanotowano po zastosowaniu zawiesiny *Pseudomonas* sp. w 5% roztworze mocznika (tab. 2). Jedynie ta mieszanina spowodowała także wyraźne zahamowanie rozwoju owocników, czyli tworzenia się w nich worków i zarodników workowych. Na liściach traktowanych roztworem mocznika w żadnym z nielicznie uformowanych owocników (1%) nie wytworzyły się zarodniki workowe (rys. 1).

W trakcie prowadzonych obserwacji stwierdzono, że zastosowane zawiesiny bakterii, a przede wszystkim zawiesina bakterii *Pseudomonas* w roztworze mocznika, powodowały szybszy rozkład liści jabłoni. W przypadku zastosowania wodnych zawiesin bakterii rozkład liści nastąpił w końcu maja lub pierwszych dniach czerwca, a po zastosowaniu roztworu mocznika znacznie wcześniej, bo już w drugiej połowie maja. Wielu autorów podkreślało w swoich pracach, że mocznik przez stymulację rozwoju bakterii na opadłych liściach jabłoni wpływał pośrednio na szybszy ich rozkład (Gupta i Lele 1980; Gupta 1989; Creemers i in. 1996; Thakur i Sharma 1999).

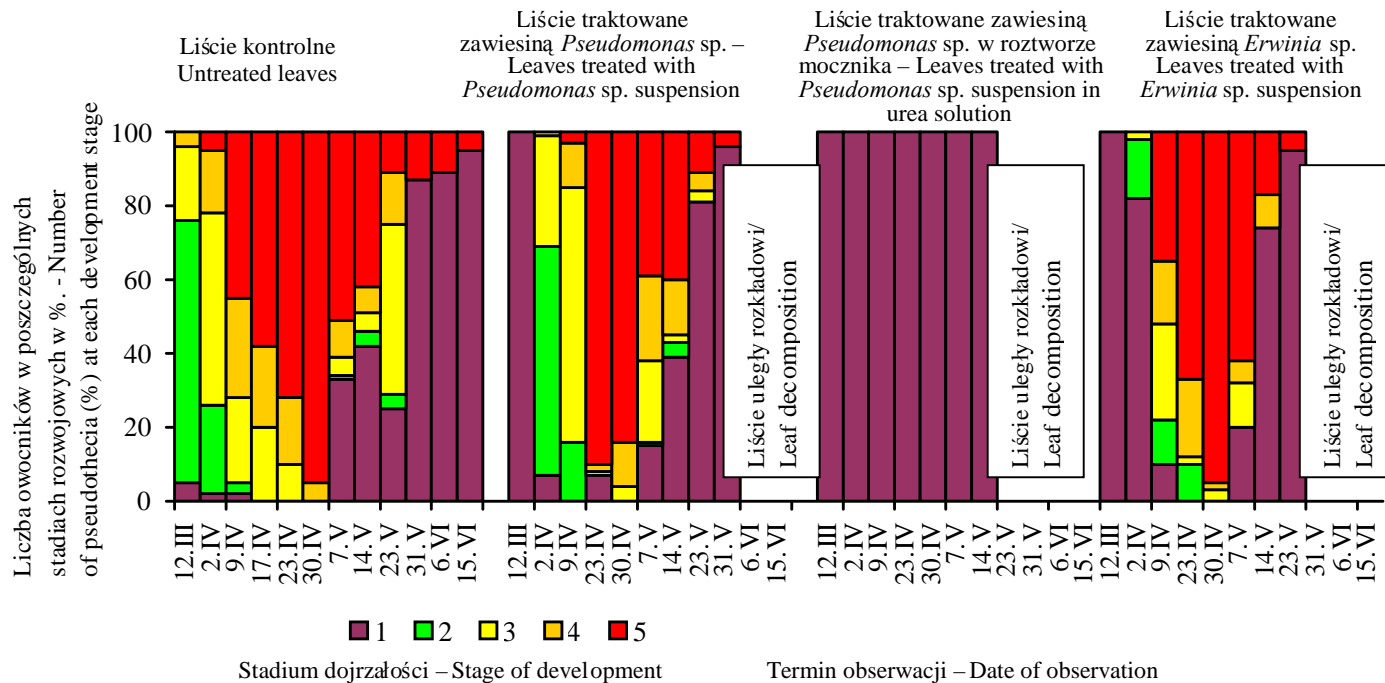
WNIOSKI

1. Traktowanie liści jabłoni 5% roztworem mocznika stymulowało wzrost liczby bakterii. Była ona nawet kilkadziesiąt razy większa niż na liściach kontrolnych.

2. Potraktowanie liści jabłoni wodnymi zawiesinami bakteryjnymi powodowało szybszą ich dekompozycję. Proces ten przebiegał jednak wolniej niż po zastosowaniu roztworu mocznika.

3. Testowane bakterie zastosowane w wodnych zawiesinach ograniczały liczbę wytwarzanych przez *V. inaequalis* owocników w 14% (*Pseudomonas* sp.) i w około 38% (*Erwinia* sp., *Enterobacter* sp.). Dodatek 5% roztworu mocznika do zawiesiny bakterii *Pseudomonas* sp. spowodował silne zahamowanie wytwarzania pseudotecjów (w 99%).

Wykres 1. Dynamika dojrzewania owocników *V. inaequalis* na liściach jabłoni odmiany 'McIntosh' nietraktowanych i traktowanych zawiesinami bakterii, 2005 – Dynamics of *V. inaequalis* development on apple leaves cv. 'McIntosh' untreated and treated with bacteria suspensions



Stadia rozwojowe owocników – stages of pseudothecia development:

1 – owocniki bez worków – no asci; 2 – owocniki z workami – pseudothecia with asci; 3 – owocniki z 1 do 10% worków z zarodnikami workowymi – 1-10% of pseudothecia with ascospores; 4 – owocniki z 10 do 30% worków z zarodnikami workowymi – 10-30% of pseudothecia with ascospores; 5 – owocniki z >30% worków z zarodnikami workowymi – more than 30% of pseudothecia with ascospores

LITERATURA

- B o r e c k i Z., C i c h o s z E. 1961. Obserwacje nad wysiewem zarodników workowych grzyba *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. w Polsce centralnej w roku 1959. Acta Agrobot. 10 (1): 151-175.
- B r a d b u r y J.F. 1988. Identification of cultivable bacteria from plants and plant tissue cultures by use of simple classical methods. Acta Hort. 225: 27-35.
- B u r c h i l l R. T., C o o k R. T.A. 1971. The interaction of urea and micro-organisms in suppressing the development of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. In: Ecology of leaf surface micro-organisms. Eds. Preece T.F and Dickinson C.H., 471-482.
- C r e e m e r s P., V a n m e c h e l e n A., H e r b o t s A. 1996. Control of apple scab using a reduced treatment schedule integrating fungicidal and climatic characteristics, as well as biological parameters. Fruit Belge 64 (459): 7-12.
- C r o s s e J.E. 1963. Bacterial canker of stone fruits. V. A. Comparison of leaf surface populations of *Pseudomonas mors-prunorum* in autumn on two cherry varieties. Ann. Appl. Biol. 52: 97-104.
- C r o s s e J.E., G a r r e t t C.M.E., B u r c h i l l R.T. 1968. Changes in the microbial population of apple leaves associated with the inhibition of the perfect stage of *Venturia inaequalis* after urea treatment. Ann. Appl. Biol. 61: 203-216.
- G u p t a G.K., L e l e V.C. 1980. Role of urea in suppression of ascigerous stage and comparative in vitro efficacy of fungicides against apple scab. Indian J. Agric. Sci. 50 (2): 167-173.
- G u p t a G. K. 1989. Pre-leaf fall spray of chemicals and cow urine in suppression of ascospores. Pesticides 23 (10): 23-24.
- H u g h R., L e i f s o n E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bact. 66: 24-26.
- K i n g E.O., W a r d M.K., R a n e y D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301.
- K i r a l y Z., K l e m e n t Z., S o l y m o s y F., V o r o s J. 1977. Fitopatologia, wybór metod badawczych. PWRiL, Warszawa, s. 457.
- K o v a c s N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction. Nature 178: 703.
- L e l l i o t t R.A., B i l l i n g E., H a y w a r d A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. J. Appl. Bact. 29: 470-489.
- M a r g r a f K., H o f f m a n n J., K o b e r s t e i n S. 1972. Urea leaf-fall sprays against the causal agent of apple scab. Nachr.- Bl. Pfl.-Schutzdienst DDR 26 (12): 255-256.

- M e s z k a B., B i e l e n i n A. 2001. The suppression of ascospore production of *Venturia inaequalis* and changes in the microbial population of apple leaves after urea treatment. Bull. IOBC WPRS 24 (5): 345-349.
- M e s z k a B., B i e l e n i n A. 2002. Rola mocznika w ograniczaniu infekcji pierwotnych parcha jabłoni (*Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh.). Acta Agrob. 55 (1): 225-231.
- M o n t e a l e g r e A. J., G o n z a l e s M. S. 1983. Autumn treatments and their effects on primary inoculum production by *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. in Valdivia. Agro-Sur. 11(1): 1-4.
- S o b i c z e w s k i P. 1998. Diagnostyka zarazy ogniowej (*Erwinia amylovora*) Burill, Winslow et al. Wyd. ISK Skierniewice, s. 41.
- T h a k u r V. S., S h a r m a R. D. 1999. Effect of urea on microbial degradation of apple leaf litter and its relationship to the inhibition of pseudothecial development of *Venturia inaequalis*. Indian J. Agric. Sci. 69 (2): 147-151.
- T h o r n l e y M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bact. 23: 37

