

Received: 07.07.2014 / Accepted: 05.03.2015

Occurrence of the pathogenic bacteria *Pantoea agglomerans* in soybean cultivation

Występowanie bakterii fitopatogenicznej *Pantoea agglomerans* w uprawie soi

Wołodymyr Patyka¹, Tetiana Gnatiuk¹, Natalia Zhytkevych¹,
Antonina Kalinichenko^{2*}, Krzysztof Frączek³

Summary

The results of monitoring of soybean crops in Ukraine revealed the occurrence of numerous pathogens. Along with the typical and common bacterial diseases of soybean, the facultative plant pathogen *Pantoea agglomerans* is becoming more active. In some years the pathogen is widespread and damaging, whereas in the others its development was restrained.

Key words: *Pantoea agglomerans*; phytopathogen; monitoring; biological properties

Streszczenie

Monitorowanie występowania chorób bakteryjnych w uprawach soi na Ukrainie wykazało różnorodny skład gatunkowy czynników chorobotwórczych. Stwierdzono, że wraz z typowymi i powszechnymi chorobami bakteryjnymi soi aktywizuje się fakultatywny fitopatogen *Pantoea agglomerans*. W niektórych latach patogen występuje powszechnie i powoduje znaczące straty, w innych latach jego rozwój jest ograniczony.

Słowa kluczowe: *Pantoea agglomerans*; fitopatogen; monitoring; właściwości biologiczne

¹Institut Mikrobiologii i Wirusologii im. D.K. Zabolotnogo Państwowej Akademii Nauk Ukrainy
03680, Kijów, Akademika Zabolotnogo 154

²Uniwersytet Opolski, Katedra Inżynierii Procesowej
Dmowskiego 7-9, 45-365 Opole

³Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Katedra Mikrobiologii
Al. Mickiewicza 24/28, 30-058 Kraków

*corresponding author: akalinichenko@uni.opole.pl

Wstęp / Introduction

Rozprzestrzenianie chorób bakteryjnych soi zależy od czynników klimatycznych i rolno-ekologicznych (Gerhardt 1983). Z badań prowadzonych w ostatnich dziesięcioleciach fitopatolodzy wyciągają wniosek, że w rolnictwie Ukrainy choroby wywoływane przez bakterie są równie ważne jak choroby powodowane przez grzyby (Gorlenko 1966), a nawet w niektórych przypadkach przekraczają poziom ich występowania. Jednocześnie zaobserwowano wzrost porażenia roślin patogenami bakteryjnymi zarówno przez polifagi, jak i monofagi. W tym samym czasie odnotowano wzrost poziomu agresywności mikroorganizmów, które wcześniej były uznawane za fakultatywnie patogeniczne dla roślin (Dankevich i wsp. 2010). Jednym z takich patogenów jest *Pantoea agglomerans*, który w ciągu całego okresu wegetacji jest częścią metagenomu populacji rodzimej mikroflory roślin, zwłaszcza bakterii chorobotwórczych. W niektórych przypadkach może powodować porażenie łodygi i ogonków: soi, fasoli, grochu i innych roślin strączkowych. *P. agglomerans* jest też stałym składnikiem ryzosferowej, epifitycznej i endofitycznej mikroflory roślin (Gerhardt 1983; Zhytkevych i Zhmurko 2005). Zasugerowano, że wszystkie żółtopigmentowe objawy bakteriozy roślin uprawnych pochodzą od *P. agglomerans*, co może być spowodowane stopniowym przystosowaniem się jej do pasożytnictwa (Zhytkevych i wsp. 2009).

P. agglomerans może też wpływać na proces zakażenia spowodowany innym fitopatogenem, powodując wówczas ograniczenie objawów chorobowych wywołanych przez tego patogena (Gerhardt 1983). Wyniki badań są zbieżne z danymi dotyczącymi skutków konkurencji między *P. agglomerans* i czynnikami głównych bakterioz soi (Zhytkevych i Zhmurko 2005). W 2003 roku na Ukrainie (obwód Kijowski) zaobserwowano masowe porażenie łodyg spowodowane przez tego fakultatywnego patogena.

Celem pracy było monitorowanie porażenia upraw soi na Ukrainie przez *P. agglomerans* oraz zbadanie jego właściwości biologicznych.

Materiały i metody / Materials and methods

Monitorowanie występowania i rozprzestrzeniania się chorób porażających łodygi soi prowadzono przez okres 10 lat (2003–2013) na polach doświadczalnych oraz w uprawach produkcyjnych. Doświadczenia prowadzono w regionach: Kijowskim, Winnickim, Czerkaskim, Rówieńskim i Chersońskim. Badanie roślin soi oraz izolację patogenu *P. agglomerans* przeprowadzono w fazie od kiełkowania do kwitnienia oraz podczas wypełniania i dojrzewania nasion. Analizę porażenia roślin soi wykonano w warunkach terenowych metodą liniową. Linie wyznaczono prostopadle do krawędzi pola; linia zaczynała się 15 metrów od krawędzi pola. W punktach badawczych (od 3–5) oceniano populację patogenów występującą na różnych częściach roślin lub istnienie objawów choroby (Iwanow 2001).

W doświadczeniach dotyczących patogeniczności *P. agglomerans* obiektem były izolaty bakteryjne (185 szczepów) wyizolowane z uszkodzonych tkanek soi pochodzących z doświadczeń i upraw produkcyjnych. Wytypowano pędy roślin z objawami uszkodzeń bakteryjnych, które następnie poddano analizie bakteriologicznej.

Właściwości chorobotwórcze wybranych izolatów bakteryjnych określono w warunkach terenowych. W doświadczeniu zastosowano cztery powtórzenia. Sztuczne zakażenie roślin soi (5 roślin dla każdego izolatu) przeprowadzono wstrzykując bakteryjną zawiesinę komórek w ich łodygi i liście. Gęstość zawiesiny wynosiła 1×10^9 jtk/cm³. Na każdej roślinie iniekcjami zaszczepiono trzy poziomy liści w czterech powtórzeniach na każdym liściu, jak również łodygi i nasiona. Grupą kontrolną było 5 roślin soi, które zaszczepiono sterylną wodą. Odczyt zakażenia sztucznego wykonano po 10–14 dniach w skali 5-punktowej (Patyka i wsp. 2007).

W badaniu właściwości biologicznych jako gatunki testowe wykorzystano 5 szczepów *P. agglomerans* (tab. 1) oraz *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (3 szczepy), uzyskane z kolekcji kultur mikroorganizmów z Działu

Tabela 1. Kolekcyjne szczepy *Pantoea agglomerans* wykorzystane w badaniach

Table 1. Strains of *Pantoea agglomerans* – used in the study

Izolat <i>Pantoea agglomerans</i> Isolate of <i>Pantoea agglomerans</i>	Pochodzenie szczepu – Origin of strain	
	kraj pochodzenia, roślina-gospodarz country of origin host-plant	kolekcja collection
<i>P. agglomerans</i> 8490	Szkocja, owies – Scotland, oat	Wydział fitopatogenicznych bakterii IMW PANU Department of phytopathogenic bacteria IMVNASU
<i>P. agglomerans</i> 7695	Ukraina, fasola – Ukraine, beans	Wydział fitopatogenicznych bakterii IMW PANU Department of phytopathogenic bacteria IMVNASU
<i>P. agglomerans</i> 8456	Rumunia, fasola – Romania, beans	Wydział fitopatogenicznych bakterii IMW PANU Department of phytopathogenic bacteria IMVNASU
<i>P. agglomerans</i> 8508	Południowa Afryka, mango – South Africa, mango	Wydział fitopatogenicznych bakterii IMW PANU Department of phytopathogenic bacteria IMVNASU
<i>P. agglomerans</i> UKM V-1089 ^t	Belgia, owies – Belgium, oat	Ukraińska Kolekcja Mikroorganizmów (typowy szczep) Ukrainian collection of microorganisms (typical strain)

Fitopatogenicznych Bakterii Instytutu Mikrobiologii i Wirusologii im. D.K. Zabolotnego Państwowej Akademii Nauk Ukrainy (IMW PANU) (D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Science of Ukraine – IMVNASU).

Cechy morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne wyizolowanych izolatów bakterii badano metodami opisanymi w pracach Klementa (1963) i Gerhardta (1983). Aktywność oksydazy określono według Kovacs (1956). Identyfikację wyizolowanych bakterii przeprowadzono przez porównanie ich właściwości z charakterystyką kolekcyjnych szczepów *P. agglomerans* (BSMB 2005).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

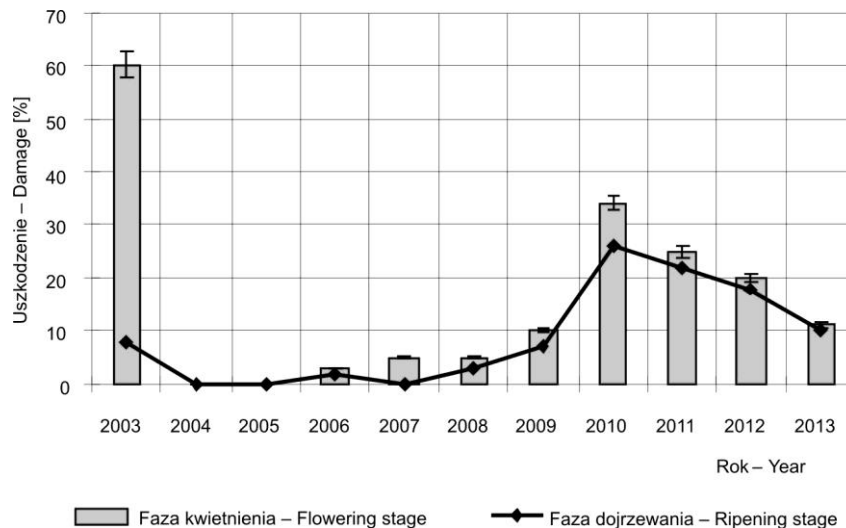
Objawy choroby przejawiające się porażeniem łodyg u soi w fazie kwitnienia roślin (do 60% roślin na polach) zaobserwowano po raz pierwszy w kilku regionach Ukrainy w roku 2003 (rys. 1). Z tego powodu zdecydowano się na przeprowadzenie systematycznych badań w wielu doświadczalnych i produkcyjnych uprawach soi położonych w strefie laso-stepowej, w celu identyfikacji patogenu *P. agglomerans* oraz miejsca jego rozprzestrzeniania się wśród innych patogenów bakteryjnych soi jako czynnika chorobotwórczego.

Z uszkodzonych tkanek różnych odmian soi izolowano czyste kultury bakterii, następnie badano ich właściwości chorobotwórcze (tab. 2). Stwierdzono, że występujące u nich cechy morfologiczne były typowe dla gatunku *P. agglomerans*, a mianowicie: Gram-ujemne, ruchliwe, asporogeniczne pałeczki tworzące żółte, lekko wypukłe, półprzezroczyste, błyszczące kolonie o gładkiej powierzchni. Wykazano, że zarówno kolekcyjne, jak i wyizolowane w doświadczeniu wirulentne szczepy okazały się

wysoko i średnio agresywne dla soi. Izolaty *P. agglomerans* porażały liście i nasiona soi, a większość wyizolowanych szczepów nie traciła swojej wirulentności nawet po dłuższym ich przechowywaniu (tab. 2).

Wykazano również, że badane szczepy nie są zdolne do wytworzenia siarkowodoru, indolu, oksydazy i azotanów, lecz koagulują mleko, rozcieńczają żelatynę i tworzą alkalia na lakmusowej serwatce. Wytypowane przez autorów niniejszej publikacji szczepy bakteryjne, jak i kolekcyjne, wykorzystywały jako jedyne źródło pożywienia szereg alkoholi i cukrów, z wyłączeniem laktozy (tab. 3). W przeciwieństwie do głównego patogenu, jakim jest *X. axonopodis* pv. *glycines*, bakteria *P. agglomerans* fermentuje w warunkach anaerobowych glukozę do kwasów. Jest również wysoko aktywna podczas wzrostu na podłożach diagnostycznych, z wyłączeniem laktozy, co jest charakterystyczne dla rodziny Enterobacteriaceae. Przeprowadzona analiza wykazała, że na podstawie stwierdzonych właściwości morfologiczno-kulturowych i biochemicznych, nowo wyizolowane szczepy są typowymi przedstawicielami gatunku *P. agglomerans*.

Obecnie w diagnostyce mikrobiologicznej skład kwasów tłuszczowych lipidów komórkowych uważany jest za ważną chemotaksonomiczną właściwość przy rodzajowej i gatunkowej identyfikacji drobnoustrojów. Stwierdzono znaczną zmienność składu ilościowego, a w niektórych przypadkach i składu jakościowego kwasów tłuszczowych lipidów komórkowych, nowo izolowanych i kolekcyjnych szczepów *P. agglomerans*, co może wskazywać że ten test nie pozwala na skuteczną chemotaksonomiczną identyfikację gatunkową (BMSB 2005; Petrychenko i wsp. 2013). Dlatego określenie przynależności izolatów bakterii *P. agglomerans* do gatunku, powinno być identyfikowane za pomocą zestawu innych cech genotypowych (Hvozdyak i wsp. 2011; Petrychenko i wsp. 2013).



Rys. 1. Porażenie roślin soi przez *Pantoea agglomerans* w latach 2003–2013

Fig. 1. Infection of soybean crops by *Pantoea agglomerans* in 2003–2013

Tabela 2. Wirulentne właściwości wyizolowanych szczepów izolatów gatunku *Pantoea agglomerans* przy sztucznej inokulacji odmiany soi Kijowska-27Table 2. Virulent properties of isolated strains type *Pantoea agglomerans* during artificial inoculation of soybean variety Kyivska-27

Izolaty – Isolates	Inokulacja – inoculation		
	łodyga – stem	liście – leaves	nasiona – seeds
2003			
15 szczepów – 15 strains	3–4	–	–
14 szczepów – 14 strains	3	±	2
18 szczepów – 18 strains	3–4	2	2–3
2006–2007			
12 szczepów – 12 strains	3–4	±	±
2008–2009			
12 szczepów – 12 strains	3–4	–	–
10 szczepów – 10 strains	3–4	±	±
27 szczepów – 27 strains	3–4	2+	2–3
2010			
25 szczepów – 25 strains	3–4	2	2
17 szczepów – 17 strains	3–4	2	2–3
2011–2012			
12 szczepów – 12 strains	3–4	2	2
8 szczepów – 8 strains	3–4	+	±
2013			
15 szczepów – 15 strains	3–4	+	2

Ocena agresywności przedstawiona w 5-punktowej skali (0:4), 0 – brak infekcji, 4 – porażenie największe

The evaluation of the aggressiveness presented in a 5-point scale (0:4), 0 – no infection, all plants disease free, 4 – severe plant infection

Tabela 3. Fizjologiczno-morfologiczne i biochemiczne właściwości izolatów *Pantoea agglomerans*Table 3. Physiological, morphological and biochemical properties of the isolates of *Pantoea agglomerans*

Właściwości fizjologiczno-biochemiczne Physiological and biochemical properties	Izolaty – Isolates	
	kolekcyjne szczepy B-1089 ^T , 8490, 7695, 8456, 8508 i szczepy typu <i>Pantoea agglomerans</i> collection strains B-1089 ^T , 8490, 7695, 8456, 8508 and strains type <i>Pantoea agglomerans</i>	szczepy <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 3, 8562, 9075 strains <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 3, 8562, 9075
1	2	3
Ruchliwość – Motility	+	+
Barwienie metodą Grama – Gamma staining	–	–
Oksydaza – Oxidase	–	–
Redukcja nitratów – Nitrates reduction	–	–
Lakmusowa syrow – Lit mus test	A	K
Wykorzystanie mleka – Milk use	Z	Z/P
Powstawanie H ₂ S – Formation of H ₂ S	–	+
Hydrolyza żelatyny – Hydrolysis of gelatin	+	–
Wykorzystanie: – Use of:		
Glukozy w warunkach tlenowych Glucose in anaerobic conditions	K	–/+
Glukozy w warunkach beztlenowych Glucose in aerobic conditions	K	–

1	2	3
Sacharozy – Saccharose	K	K
Laktozy – Lactose	–	K
Maltozy – Maltose	K	K
Ramnozy – Rannose	K	–
Galaktozy – Galactose	K	–/K
Arabinozy – Arabinose	K	K
Ksylozy – Xylois	K	K
Mannitol – Mannitol	K	–/K
Dulcitol – Dulcitol	–	–
Pigment – Pigment	żółty – yellow	żółty – yellow

– brak oznak, P – peptonizacja, Z – krzepnięcie, K – powstanie kwasu, A – powstanie alkalia
 – no signs, P – peptonization, Z – coagulation, K – acid formation, A – creation of alkali

Przeprowadzona w niniejszej pracy systematyczna kontrola postępu procesu zakażenia podczas okresu wegetacji pozwoliła na określenie ogólnych wzorców rozprzestrzeniania się patogenu porażającego łądygi soi w zależności od fazy rozwoju rośliny. Stwierdzono, że w okresie do kwitnienia, na ogonkach, żyłkach liści i łądyg występowały na badanych roślinach brązowe lub czarne podłużne plamy i krótkie smugi. W fazie kwitnienia, formowania się strąków i początku wypełnienia nasion obserwowano na dolnej części łądygi czerwono-brązowe, fioletowe, czasami mokre, wydłużone plamy i paski, natomiast od początku nalewania ziarna do końca dojrzewania powszechnie występowały nekrotyczne, podłużne, czarno-brązowe paski na całej łądydze.

P. agglomerans porażał głównie łądygi roślin. Intensywne porażenie roślin soi przez *P. agglomerans* bywa opóźnione przez rozwój populacji innych, wysoko szkodliwych patogenów bakteriozy soi (Gerhardt 1983), co może być wykorzystywane do biokontroli (Vanneste i Beer 1992; Volksch i wsp. 1996).

Podczas wczesnych etapów rozwoju procesów zakażenia soi najbardziej rozpowszechnione są patogeny bakteriozy soi: *P. savastanoi* pv. *glycinea* (kątowa plamistość), *X. axonopodis* pv. *glycines* (bakterioza pustułkowa) oraz *P. agglomerans* wywołujące bardzo podobne objawy chorobowe, tj. bardzo drobne, czarno-brązowe plamy i suche, brązowoczekoladowe lub czerwone krótkie przebarwienia (3–4 mm) (Shkalykov i wsp. 2004). W pewnych fazach rozwoju choroby pojawia się wiele podobnych objawów porażenia pochodzących od różnych patogenów. W naturalnych warunkach, w niektórych przypadkach, objawy choroby mogą być maskowane działaniem czynników biotycznych i abiotycznych.

Literatura / References

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (BMSB). 2005. Vol. 2: The Proteobacteria (G. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Stanley, eds.). 2nd ed. Springer, N.Y., 1388 pp.
- Dankevich L.A., Zytkevich N.V., Patyka V.F. 2010. Identyfikacja patogeny dla soi sztamów *Pantoea agglomerans* s pomoszczu żirnokislnotnogo sostava kletok. W: Materiały VII Międzynarodowej Konferencji, Sowriemiennoie sostoiannie i perspektiwy razwitiya mikrobiologii i biotechnologii. Białoruś, Mińsk, 31.05–04.06.2010: 21–23.

W ciągu okresu badawczego z założonych i produkcyjnych upraw soi wyodrębniono 185 szczepów *P. agglomerans*, które powodowały porażenie ich łądyg. Jak wynika z rysunku 1., w okresie przeprowadzonych badań (lata 2003–2013), na wyznaczonych obiektach doświadczalnych w 2003 roku stwierdzono znaczny wzrost porażenia łądyg soi patogenem *P. agglomerans*, po czym w okresie od 2004–2005 roku nastąpił całkowity zanik ich porażenia. Ponowne, stopniowe wystąpienie objawów zakażenia łądyg soi zaobserwowano od 2006–2010 roku ze szczytem rozwoju choroby w 2010 roku. W latach 2011–2013 stwierdzono ponowny zanik choroby. Prawdopodobnie takie wahania związane są z gwałtownymi zmianami temperatury i wilgotności powietrza oraz stosowaniem różnorodnych pestycydów.

Powyższe obserwacje mogą zostać wykorzystane do przewidywania rozprzestrzeniania się badanego patogenu w uprawach soi.

Wnioski / Conclusions

1. Na plantacjach soi na Ukrainie stwierdzono występowanie fakultatywnego fitopatogenu *P. agglomerans*.
2. W poszczególnych latach porażenie roślin przez *P. agglomerans* było zróżnicowane. W początkowym okresie badań zaobserwowano spadek uszkodzenia roślin przez *P. agglomerans*, a następnie umiarkowany wzrost liczby porażonych roślin.
3. Ze względu na podobieństwo objawów do chorób powodowanych przez inne pasożyty bakteryjne i grzybowe, dla potwierdzenia prawidłowej identyfikacji *P. agglomerans* konieczne są badania laboratoryjne.

- Gerhardt D.T. 1983. *Mietody obszczej baktierologii*. Mir, Moskwa, 563 pp.
- Gorlenko M.V. 1966. *Baktierialnyie bolezni rastienij*. Wyższa Szkoła, Moskwa, 300 pp.
- Hvozdyak R.I., Pasichnik L.A., Yakovleva L.M., Moroz S.M., Lytvynchuk O.O., Zhytkevych N.V., Hodos S.F., Butsenko L.M., Dankevich L.A., Grynyk I.V., Patyka V.P. 2011. *Fitopatogienni baktierii*. Baktierialni chworobi roslin. NPP Interserwis, Kyjiw, 444 pp.
- Iwanow A.V. 2001. *Baktierialnyie zaboliewanija luka i czesnoka w Riespublikie Moldowa i razrobotka schiemy otbora ustojcziwych k nim form*. Awtoferat disertacji na soiskanie stepieni kandidata biologicskich nauk. Moskwa, 16 pp.
- Klement Z. 1963. Rapid detection pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Journal Nature* 199 (4890): 299–300.
- Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Journal Nature* 178, p. 703.
- Patyka V.P., Omelyanets T.G., Grynyk I.V., Petrychenko V.F. 2007. *Ekologija mikroorganizmiw*. Osnowa, Kijów, 186 pp.
- Petrychenko V.F., Kornijchuk O.V., Pasichnik L.A., Butsenko L.M., Zhytkevych N.V., Hnatiuk T.T., Patyka V.P. 2013. Baktierialni chworobi silskogospodarskich roslin i piesticidi. *Wisnik agrarnoi nauki* 4 (13): 21–26.
- Shkalykov V.A., Bukreev D.D., Gorbaczev I.V. 2004. *Zaszczita rastienij ot boleznej*. Kolos, Moskwa, 255 pp.
- Vanneste J.L., Beer S.V. 1992. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh 252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology* 174 (9): 2785–2786.
- Volksch B., Nuske J., May R. 1996. Characterization of two epiphytic bacteria from soybean leaves with antagonistic activities against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Basic Microbiology* 36 (6): 453–462.
- Zhytkevych N.V., Gnatiuk T.T., Petrychenko V.F., Patyka V.P. 2009. Diagnostika baktierialnych patogieniw soi. *Mizwidomczij tiematicznij naukowij zbirnik: Kormi i Kormowirobnictvo* 64: 62–69.
- Zhytkevych N.V., Zhmurko L.G. 2005. Rozpowsiudszczenija baktierialnych zachworjuwan soi u Knivskij oblasti. *Wisnik Odeskogo Nacionalnogo Universitetu* 10 (7): 244–248.