

Received: 15.12.2023 / Accepted: 01.03.2024

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Wpływ metody inokulacji roślin kukurydzy patogenami bakteryjnymi na powstawanie i rozwój objawów chorobowych

The effect of the method of inoculation of corn plants with bacterial pathogens on the formation and development of disease symptoms

Anna Hoffmann, Weronika Zenelt, Krzysztof Krawczyk* 

Streszczenie

Podstawę diagnostyki fitopatologicznej stanowią postulaty Kocha, których spełnienie pozwala stwierdzić czy badany mikroorganizm jest sprawcą danej choroby. Trzeci z tych postulatów określa, że inokulacja zdrowej rośliny-gospodarza czystą kulturą domniemanego patogenu musi skutkować wywołaniem objawów chorobowych podobnych, lub takich samych, do tych jakie występują w warunkach naturalnych. Do spełnienia trzeciego postulatu Kocha wymagany jest wynik testu patogenności, którego niewłaściwa interpretacja może prowadzić do odrzucenia prawidłowych wyników. Wieloletnie badania nad bakteriozami roślin uprawnych, w tym kukurydzy, wykazały że objawy choroby powstałe od inokulacji badanym szczepem bakterii, mogą się różnić, w zależności od użytej metody inokulacji i warunków inkubacji zainokulowanych roślin. W ramach przeprowadzonych badań określono wpływ różnych metod inokulacji roślin kukurydzy wybranymi szczepami patogennych bakterii wyisobnionych z chorych roślin kukurydzy, na powstawanie i rozwój objawów chorobowych. Szczepy te należały do gatunków *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya zeae*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea agglomerans* i *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*. Zaobserwowano, że objawy choroby spowodowane przez użyte metody inokulacji, różnią się od objawów obserwowanych w warunkach naturalnych. Ponadto, niezależnie od przynależności gatunkowej badanych szczepów bakterii, obserwowane objawy były zbliżone w obrębie danej metody inokulacji. Również, niezależnie od przynależności gatunkowej badanego szczepu, inkubacja zainokulowanych roślin w komorze hodowlanej, w której panowały warunki optymalne dla rozwoju choroby, powodowała przyspieszenie powstawania objawów i rozwoju choroby.

Słowa kluczowe: kukurydza, postulaty Kocha, objawy chorobowe, metody inokulacji

Abstract

The basis of phytopathological diagnostics are Koch's postulates, the fulfillment of which allows determining whether the examined microorganism is the cause of a given disease. The third of these postulates specifies that inoculation of a healthy host plant with a pure culture of the putative pathogen must result in the induction of disease symptoms similar or the same to those occurring in natural conditions. To meet Koch's third postulate, a pathogenicity test result is required, and incorrect interpretation may lead to rejection of correct results. Many years of research on bacteriosis of crop plants, including corn, have shown that the symptoms of the disease resulting from inoculation with the tested strain of bacteria may vary, depending on the inoculation method used and the incubation conditions of the inoculated plants. The conducted research determined the impact of various methods of inoculating corn plants with selected strains of pathogenic bacteria isolated from diseased corn plants on the occurrence and development of disease symptoms. These strains belonged to the species *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya zeae*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*. It was observed that the symptoms of the disease caused by the inoculation methods used differ from the symptoms observed in natural conditions. Moreover, regardless of the species affiliation of the tested bacterial strains, the observed symptoms were similar within a given inoculation method. Also, regardless of the species affiliation of the tested strain, incubation of inoculated plants in a culture chamber with optimal conditions for the development of the disease resulted in the acceleration of symptoms and disease development.

Key words: corn, Koch's postulates, disease symptoms, inoculation methods

Wstęp / Introduction

Kukurydza (*Zea mays* L.) jest jedną z najważniejszych roślin uprawnych na świecie. W Polsce uprawiana jest głównie z przeznaczeniem na paszę dla zwierząt (np. kiszonki, komponent mieszanek paszowych), jako żywność dla ludzi (np. olej kukurydziany, płatki kukurydziane, mąka kukurydziana), a także na potrzeby sektora energetycznego (biomasa, biogaz, bioetanol, brykiety itp.). O znaczeniu kukurydzy dla sektora energetycznego może świadczyć fakt, że najwięcej bioetanolu można uzyskać z jej ziarna, w porównaniu do tej samej masy ziemniaków czy buraków cukrowych (Piątek i wsp. 2007). W ciągu ostatniej dekady zarówno areal kukurydzy (ponad 350 000 ha), jak i jej plon (2 000 000 ton) stale rosną, do czego znacząco przyczynił się rozwój sektora energetycznego w Polsce.

Choroby kukurydzy istotnie obniżają plon. Wśród nich znaczącą rolę odgrywają bakteriozy. Do najczęściej opisywanych bakteryjnych patogenów kukurydzy należą: *Pseudomonas avenae* subsp. *avenae* (Manns) (Pataky i wsp. 1997; Claflin 2000; Giester i Rees 2004), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya zae* (Sabet) (Dickey 1987; Claflin 2000; Giester i Rees 2004), *Pantoea stewartii* (Lamka i wsp. 1991; Mergaert i wsp. 1993), *Burkholderia andropogonis* (Smith) Stapp, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Vidaver i Carlson 1978; Smidt 1986), *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* (Elliott) (Ribeiro 1977), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Lindow i wsp. 1982), *Xanthomonas campestris* pv. *zae* (Elliott) Dye (Coutingo i Wallis 1991; Claflin 2000; Giester i Rees 2004), *Pantoea ananatis* (Paccola-Meirelles i wsp. 2001; Goszczynska i wsp. 2007; Pérez-y-Terrón i wsp. 2009), *Pantoea agglomerans* (Morales-Valenzuela i wsp. 2007) i *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* (Hoffmann i wsp. 2005). Trzy ostatnie z wymienionych gatunków to polifagi występujące powszechnie w środowisku naturalnym. Są one zarówno epifitami, jak i endofitami. Mogą być również oportunistycznymi patogenami ludzi (Stock i wsp. 2001; De Baere i wsp. 2004; Rezzonico i wsp. 2009; Sobiczewski i Iakimova 2022).

Infekcja roślin przez *D. zae* i *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* powoduje zgniliznę łodyg i wierzchołków łodyg roślin kukurydzy. Pierwsze symptomy pojawiają się zwykle w środku sezonu, kiedy rośliny nagle przestają rosnąć. Jedno do kilku międzywęźli brązowieje, staje się uwodnione i miękkie, a tkanka łodygi ma zmacerowany wygląd i nieprzyjemny zapach. Gnicie nadziemnych organów rośliny, jeśli występuje, zaczyna się w czasie intensywnego wzrostu wegetatywnego kukurydzy. Wierzchołki najwyższych położonych liści więdną, a zgnilizna pojawia się u podstawy tworzących się liści. Zgnilizna rozszerza się gwałtownie w kierunku korzeni, co prowadzi do zamarcia rośliny. Przedstawione objawy mogą przypominać zgniliznę wywołaną przez grzyby z rodzaju *Phytium* (Claflin 2000).

Chorobę, plamistość liści kukurydzy (ang. leaf spot disease), powodowaną przez *P. ananatis* wykryto po raz pierwszy w Brazylii (Paccola-Meirelles i wsp. 2001). Jej występowanie potwierdzono również w Polsce na roślinach kukurydzy (Krawczyk i wsp. 2010). Bakteria ta powoduje również inną chorobę kukurydzy zwaną bakteryjnym gniciem łodygi (ang. bacterial stalk rot) (Goszczynska i wsp. 2007). Jej charakterystyczne objawy to karłowacenie i występowanie pionowego pęknięcia w łodydze na wysokości pierwszego międzywęźla. U wielu chorych roślin pęknięcie można obserwować również na drugim i trzecim międzywęźlu. Po pęknięciu międzywęźla obserwuje się zazwyczaj zmiany chorobowe widoczne wzdłuż miejsca pęknięcia oraz wewnętrzne brązowienie tkanki łodygi rozszerzające się w części nadziemnej rośliny, w niektórych przypadkach sięgające wierzchołka łodygi. Kolby są często nie w pełni rozwinięte. Niekiedy obserwuje się mięknięcie, więdnienie brzegów liści, ich żółknięcie i zwijanie do wewnątrz.

Bakteria *P. agglomerans* w początkowej fazie choroby powoduje zmiany w postaci niewielkich (2–3 mm średnicy) uwodnionych plamek koloru zielonego. W trakcie rozwoju choroby zmiany te powiększają się, brązowieją i przyjmują postać nekroz z wyraźnie wyróżnionymi brzegami i żółtą otoczką wokół nich. Nieregularne plamy koloru słomkowego obejmują w końcu cały liść, co istotnie zmniejsza możliwości asymilacyjne rośliny i prowadzi do zmniejszenia plonu (Morales-Valenzuela i wsp. 2007).

Bakteryjne gnicie łodygi kukurydzy powoduje *E. cloacae* subsp. *dissolvens*. Objawy choroby występują na nadziemnej części rośliny i rozwijają się w kierunku wierzchołka. Górne liście więdną, międzywęźla przebarwiają się i żółkną. Wnętrze łodygi gnije. Skórka traci swój naturalny, ciemnozielony kolor i przybiera barwę jasnożółtą (słomkową). Zainfekowane łodygi stają się miękkie i zmieniają się w suchą masę poszarpanych, łatwo rozdzielających się od siebie włókien. Rzadko dochodzi do porażenia kolb kukurydzy, które opuszczają się i zwisają wzdłuż łodygi. W końcowej fazie choroby łodyga rośliny łamie się pod własnym ciężarem i roślina zamiera (Thind i Payak 1985).

Objawom chorób bakteryjnych kukurydzy najczęściej nie towarzyszą charakterystyczne dla danej choroby oznaki etiologiczne, co powoduje, że dla prawidłowej diagnostyki niezbędne jest spełnienie postulatów Kocha oraz określenie wybranych cech fenotypowych i genotypowych przypuszczalnego patogenu. Postulaty Kocha obejmują cztery kryteria określające, że:

- 1) mikroorganizm, który ma być uznany za sprawcę choroby, jest obecny w chorej tkance,
- 2) mikroorganizm, który na podstawie swego powiązania z chorą tkanką wydaje się być sprawcą choroby, musi być wyizolowany z chorej rośliny, a jego czysta kultura musi być hodowana na odpowiedniej pożywce mikrobiologicznej i scharakteryzowana,

- 3) przypuszczalny patogen musi powodować podobne lub takie same objawy na roślinie-gospodarzu, jakie występują w warunkach naturalnych,
- 4) patogen musi zostać wyizolowany z zakażonej rośliny.

W zależności od występowania objawów chorobowych na poszczególnych organach roślin do testu patogenności (spełnienie trzeciego postulatu Kocha) wybiera się odpowiedni organ, np. liść, łodygę, kwiat, owoc, pęd zdrewniały, który następnie inokuluje się czystą kulturą przypuszczalnego patogenu (Schaad i wsp. 2001).

Opisywane w literaturze metody wykorzystywane do inokulacji roślin kukurydzy to: wstrzykiwanie (strzykawką lekarską z igłą lub bez), wprowadzanie zawiesiny bakteryjnej w pęd główny młodej rośliny (Lamka i wsp. 1991; Azad i wsp. 2000; Paccola-Meirelles i wsp. 2001, 2002; Schaad i wsp. 2001), opryskiwanie powierzchni liści zawiesiną bakterii po ich uprzednim delikatnym uszkodzeniu, np. karborundem (Azad i wsp. 2000; Paccola-Meirelles i wsp. 2001, 2002), opryskiwanie powierzchni roślin zawiesiną bakterii, bez ich uszkodzania (Azad i wsp. 2000; Paccola-Meirelles i wsp. 2001), odcięcie wierzchołka pędu głównego młodej siewki i naniesienie na powstałe zranienie zawiesiny badanych bakterii (Coplin i wsp. 2002) oraz nanoszenie badanych bakterii ze wzrostu na pożywce na zranienie rośliny (Azad i wsp. 2000). Należy podkreślić, że prawidłowa diagnostyka choroby, w tym identyfikacja patogenu, są bardzo pomocne w doborze środków zapobiegawczych i interwencyjnych.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu różnych metod inokulacji roślin kukurydzy wybranymi szczepami patogennych bakterii wyosobnionych z chorych roślin kukurydzy, na powstawanie i rozwój objawów chorobowych. Szczepy te należały do gatunków: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *D. zea*, *P. ananatis*, *P. agglomerans* i *E. cloaceae* subsp. *dissolvens*.

Materiały i metody / Materials and methods

Przygotowanie inokulum i inokulacja roślin / Preparation of inoculum and inoculation of plants

W doświadczeniu użyto osiem szczepów bakterii patogennych dla kukurydzy należących do czterech gatunków: *P. ananatis*, *P. agglomerans*, *E. cloaceae* subsp. *dissolvens* i *D. zea* (tab. 1). Bakterie hodowano na pożywce TSA (ang. Tryptic Soy Agar) (Sigma Aldrich, USA) w temperaturze 27°C. Po 24 godzinach inkubacji wzrost bakterii zalewano sterylną wodą destylowaną. Gęstość uzyskanej zawiesiny ustalono na $1,3-1,4 \times 10^8$ jtk/ml stosując metodę seryjnych rozcieńczeń i posiewów na pożywkę – podłoże YDC (ang. Yeast-Dextrose-Carbonate agar) (ekstrakt drożdżowy 10 g, dekstroza 20 g, węglan wapnia 20 g, agar 15 g) (Schaad i wsp. 2001) oraz przez pomiar optycznej gęstości (OD, ang. Optical Density) na spektrofotometrze przy długości fali 600 nm.

Testy wykonano na siewkach kukurydzy cukrowej odmiany Waza F1 w stadium 3–4 liści, rosnących w pojemnikach z ziemią ogrodową wymieszaną z torfem (1 : 1), przy 12-godzinnym oświetleniu. Zastosowano następujące metody inokulacji roślin:

- 1) wstrzykiwanie 1 ml zawiesiny za pomocą strzykawki lekarskiej do łodygi lub liścia,
- 2) wprowadzenie 1 ml zawiesiny do liścia strzykawką lekarską bez igły,
- 3) nanoszenie 5 ml zawiesiny bakterii na liście każdej siewki opryskiwaczem pod ciśnieniem,
- 4) nanoszenie opryskiwaczem 5 ml zawiesiny bakterii na liście każdej siewki uprzednio uszkodzone karborundem,
- 5) nanoszenie bakterii ze wzrostu na pożywce na liść każdej siewki, uprzednio uszkodzony punktowo igłą (jedno płaskie oczko ezy o średnicy 5 mm na uszkodzenie).

Tabela 1. Wykaz testowanych szczepów bakterii
Table 1. List of tested bacterial strains

Lp. No.	Nazwa gatunkowa szczepu Species name of the strain	Symbol szczepu Strain symbol	Roślina-Gospodarz Host name	Pochodzenie szczepu Origin of the strain
1.	<i>Pantoea ananatis</i>	M408	<i>Zea mays</i>	Bank patogenów IOR – PIB Pathogen bank IPP – NRI
		ATCC 33244	<i>Ananas comosus</i>	ATCC 33244
2.	<i>Pantoea agglomerans</i>	M260	<i>Zea mays</i>	Bank patogenów IOR – PIB Pathogen bank IPP – NRI
		ATCC 33243	<i>Homo sapiens</i>	ATCC 33243
3.	<i>Enterobacter cloaceae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	M425	<i>Zea mays</i>	Bank patogenów IOR – PIB Pathogen bank IPP – NRI
		ATCC 23373	<i>Zea mays</i>	ATCC 23373
4.	<i>Dickeya zea</i>	CH3	<i>Zea mays</i>	MWB UG & GU (Egipt)
		CH63	<i>Zea mays</i>	MWB UG & GU (Holandia)

Na każdą metodę inokulacji i każdy testowany szczep użyto po 10 siewek. Kombinację kontrolną stanowiły siewki traktowane odpowiednio sterylną wodą destylowaną. Dla porównania do badań włączono szczepy referencyjne z kolekcji ATCC (tab. 1).

Po inokulacji połowę roślin inkubowano w warunkach szklarniowych (temperatura 19–25°C, wilgotność 50–95%), a drugą połowę w komorze inkubacyjnej o podwyższonej temperaturze i wilgotności (temperatura 32°C, wilgotność 95%). Po 14 dniach wykonano obserwację notując wystąpienie lub brak objawów chorobowych według skali porażen opisanej przez Hagooda i Stridera (1982), gdzie stopień 1 – oznacza brak nekrozy lub wystąpienie nekrozy tylko w miejscu inokulacji, 2 – nekroza o średnicy od 0,1 do 1 cm wokół miejsca inokulacji, 3 – nekroza o średnicy większej niż 1 cm wokół miejsca inokulacji (Haygood i Strider 1982).

Reizolacja bakterii / Re-isolation of bacteria

Z roślin, na których obserwowano objawy chorobowe, reizolowano bakterie, które następnie identyfikowano do rodzaju według klucza Shaad i wsp. (2001), określając typ ściany komórkowej bakterii (barwienie Grama), ich zdolność do wzrostu w warunkach beztlenowych (pożywka Hugh- Leifson, HL), wytwarzanie pigmentu (pożywka YDC i King B) i wytwarzanie katalazy i oksydazy (Schaad i wsp. 2001) oraz do gatunku za pomocą testów API 20E (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France) (Truu i wsp. 1999; Janda i Abbott 2002).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Inokulacja roślin przez wprowadzenie zawiesiny bakterii do pędu głównego, dla wszystkich badanych szczepów, spowodowała wystąpienie objawów porażenia tkanek wokół

miejsca inokulacji. Obserwowano gnicie pędu głównego, co istotnie ograniczało rozwój roślin (fot. 1).

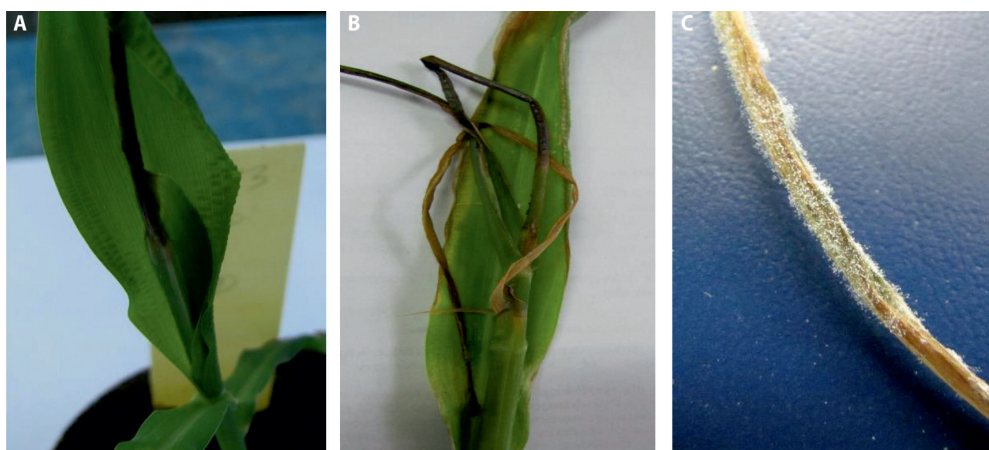
Po wprowadzeniu bakterii do liści, dla wszystkich badanych szczepów, obserwowano nekrozy tworzące się w miejscu inokulacji, rozwijające wzdłuż nerwów liściowych i stopniowo obejmujących znaczną powierzchnię liści (fot. 2).

Opryskiwanie roślin zawiesiną bakterii oraz nanoszenie zawiesiny bakterii na liście uprzednio uszkodzone karbo-rundem, dla wszystkich badanych szczepów, powodowało wystąpienie niewielkich nekroz, początkowo owalnych, jasnobrązowych w środku i z żółtą otoczką na zewnątrz. Nekrozy te powiększały się i zlewały, zajmując znaczne obszary blaszki liściowej (fot. 3).

Nakładanie bakterii ze wzrostu na uprzednio uszkodzone punktowo liście, dla wszystkich badanych szczepów, powodowało wystąpienie nekroz tworzących się w miejscu inokulacji, rozwijających wzdłuż nerwów liściowych i stopniowo zajmujących znaczną powierzchnię liści (fot. 4).

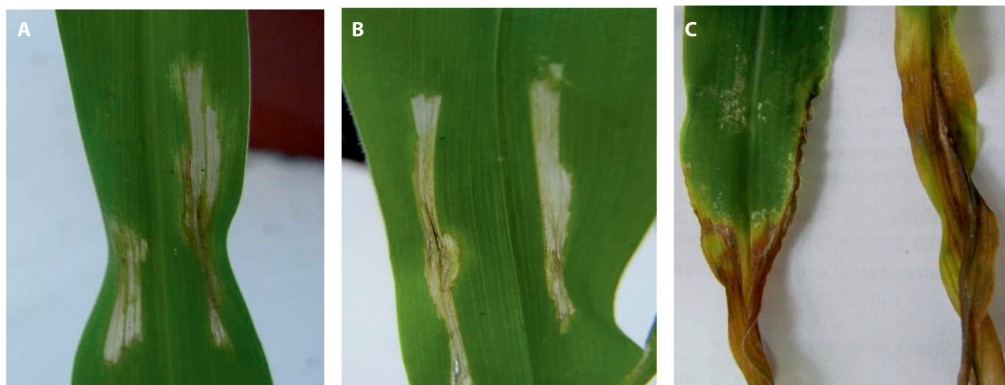
Inkubowanie zakażonych roślin w komorze hodowlanej, w której panowały warunki optymalne dla rozwoju choroby, nie spowodowało wzrostu liczby pojedynczych zmian chorobowych, a jedynie nasiliło i przyspieszyło rozwój objawów już istniejących (fot. 1C, 2C, 3C, 4C). Na roślinach inokulowanych poprzez wprowadzenie bakterii do pędu głównego, inkubowanych w komorze hodowlanej, zaobserwowano wystąpienie wtórnych infekcji grzybowych (fot. 1C), czego nie odnotowano w pozostałych przypadkach (fot. 2C–4C).

Zaobserwowano, że objawy choroby spowodowane przez użyte metody inokulacji, różnią się od objawów obserwowanych w warunkach naturalnych. Ponadto, niezależnie od przynależności gatunkowej badanych szczepów bakterii, obserwowane objawy były zbliżone w obrębie danej metody inokulacji (tab. 2).



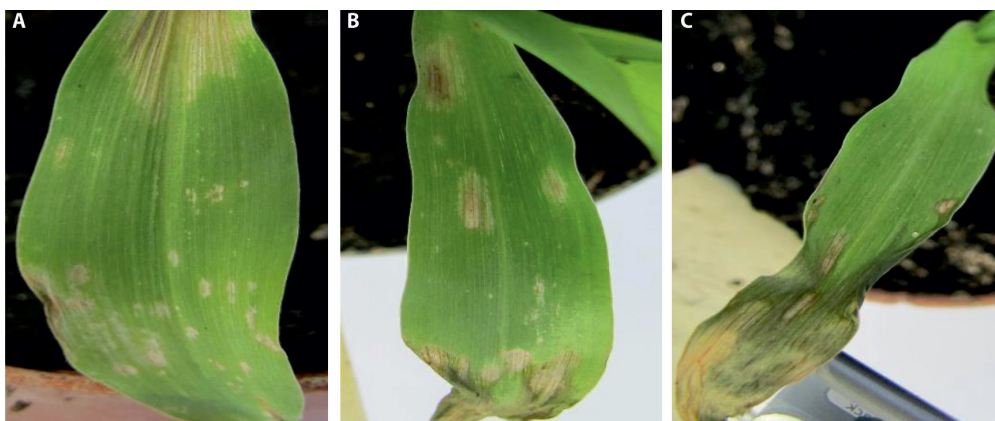
Fot. 1. Objawy chorobowe powstałe po zastosowaniu metody inokulacji polegającej na wprowadzeniu zawiesiny bakterii w pęd główny rośliny przy pomocy strzykawki lekarskiej z igłą. A, B – rośliny hodowane w warunkach szklarniowych, C – rośliny hodowane w komorze inkubacyjnej

Photo 1. Disease symptoms resulting from the inoculation method of injecting a bacterial suspension into the plant stem with a needle. A, B – plants grown in greenhouse conditions, C – plants grown in the incubation chamber



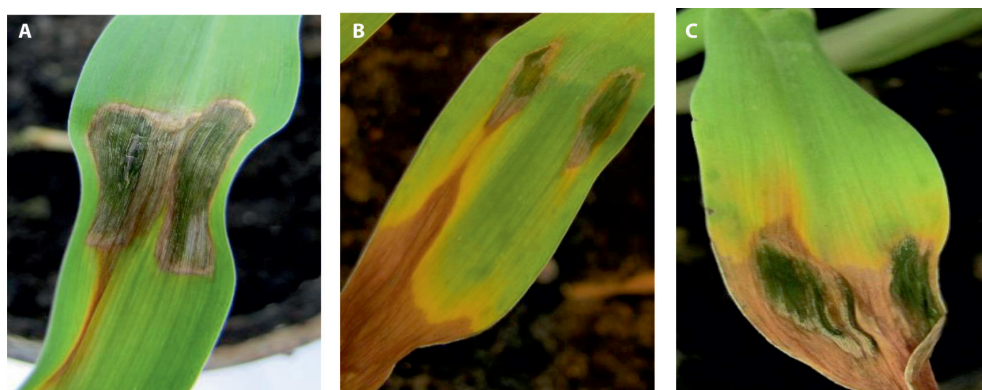
Fot. 2. Objawy chorobowe powstałe po zastosowaniu metody inokulacji polegającej na wprowadzeniu zawiesiny bakterii do liści za pomocą strzykawki lekarskiej bez igły. A, B – rośliny hodowane w warunkach szklarniowych, C – rośliny hodowane w komorze inkubacyjnej

Photo 2. Disease symptoms resulting from the inoculation method of injecting a bacterial suspension into the leaves using a syringe without a needle. A, B – plants grown in greenhouse conditions, C – plants grown in the incubation chamber



Fot. 3. Objawy chorobowe powstałe po zastosowaniu metody inokulacji polegającej na opryskiwaniu liści zawiesiną bakterii pod ciśnieniem. A, B – rośliny hodowane w warunkach szklarniowych, C – rośliny hodowane w komorze inkubacyjnej

Photo 3. Disease symptoms resulting from the inoculation method of spraying leaves with a bacterial suspension under increased pressure. A, B – plants grown in greenhouse conditions, C – plants grown in the incubation chamber



Fot. 4. Objawy chorobowe powstałe po zastosowaniu metody inokulacji polegającej na nakładaniu bakterii ze wzrostu na liście w miejscach z uprzednio uszkodzoną tkanką. A, B – rośliny hodowane w warunkach szklarniowych, C – rośliny hodowane w komorze inkubacyjnej

Photo 4. Disease symptoms resulting from the use of the inoculation method consisting in placing bacterial colonies directly on the leaves in places with artificially damaged epidermis. A, B – plants grown in greenhouse conditions, C – plants grown in the incubation chamber

Tabela 2. Występowanie i nasilenie objawów choroby na testowanych roślinach kukurydzy**Table 2.** Occurrence and severity of disease symptoms on tested corn plants

Szczep – Strain		Metoda inokulacji – Method of inoculation*									
Lp. No.	nazwa gatunkowa szczepu species name of the strain	strzykawka z igłą syringe with needle		strzykawka bez igły syringe without needle		opryskiwanie spraying		karborund carborundum		nakładanie eżą application with a loop	
1.	<i>Pantoea ananatis</i> ATCC 33244	0/0/5**	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	1/0/5	3/0/5
2.	<i>Pantoea ananatis</i> M408	0/3/5	0/0/5	1/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/4/5	2/2/5
3.	<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC 33243	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5
4.	<i>Pantoea agglomerans</i> M260	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/4/5	2/2/5
5.	<i>Enterobacter cloaceae</i> ss. <i>dissolvens</i> ATCC 23373	0/0/5	0/0/5	0/0/5	1/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	2/1/5	2/0/5
6.	<i>Enterobacter cloaceae</i> subsp. <i>dissolvens</i> M425	0/3/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/0/5	0/1/5	2/3/5
7.	<i>Dickeya zeae</i> CH3	3/2/5	0/1/5	3/0/5	3/0/5	2/0/5	0/1/5	1/0/5	0/0/5	2/3/5	0/5/5
8.	<i>Dickeya zeae</i> CH63	3/0/5	1/1/5	1/1/5	2/2/5	2/1/5	5/0/5	0/0/5	0/0/5	2/3/5	2/2/5

Objaśnienia: *strzykawka z igłą – inokulacja przez wprowadzenie zawiesiny bakterii do pędu głównego rośliny za pomocą strzykawki lekarskiej z igłą; strzykawka bez igły – inokulacja przez wprowadzenie zawiesiny bakterii do liści za pomocą strzykawki lekarskiej bez igły; opryskiwanie – inokulacja przez opryskiwanie siewek kukurydzy zawiesiną bakterii; karborund – inokulacja przez nakładanie zawiesiny bakterii na liście siewek kukurydzy uprzednio uszkodzone karborundem; nakładanie eżą – inokulacja poprzez nałożenie bakterii ze wzrostu na uprzednio wykonane, punktowe uszkodzenia liści, **skala porażenia według Haygooda i Stridera (1982): liczba roślin wykazujących nekrozy o średnicy od 0,1 do 1 cm wokół miejsca inokulacji / liczba roślin z nekrozami o średnicy większej niż 1 cm / liczba roślin testowanych w powtórzeniu

Explanations: *syringe with a needle – inoculation by introducing a bacterial suspension into the main shoot of the plant using a medical syringe with a needle; syringe without a needle – inoculation by introducing a bacterial suspension into the leaves using a medical syringe without a needle; spraying – inoculation by spraying corn seedlings with a bacterial suspension under pressure; carborundum – inoculation by rubbing the bacterial suspension into the leaves of corn seedlings previously damaged with carborundum; application with a loop – inoculation by applying bacteria from a growth strip to previously made, point damage to the leaves, **infestation scale according to Haygood and Strider (1982): number of plants showing necroses with a diameter of 0.1 to 1 cm around the inoculation site / number of plants with necroses with a diameter of more than 1 cm / number of plants tested in a repetition

W warunkach naturalnych, objawy powodowane przez *D. zeae* obejmują brązowienie łodygi, które stają się mocno uwodnione oraz miękkie i dalej prowadzi to do maceracji tkanki, która wydziela nieprzyjemny zapach. W miarę rozwoju choroby, zgnilizna rozszerza się, prowadząc do więdnienia rośliny i załamania się jej pod własnym ciężarem (Claffin 2000). Tymczasem, po inokulacji, objawy zbliżone do gnicia tkanki łodygi obserwowano jedynie po wprowadzeniu bakterii do pędu głównego (fot. 1). Co więcej, zmiany chorobowe postępowały w kierunku wierzchołka rośliny, od miejsca wstrzyknięcia bakterii, a nie w kierunku części podziemnej, jak w warunkach naturalnych, co stwierdził Claffin (2000). Opisane objawy uzyskano niezależnie od przynależności gatunkowej badanych szczepów bakterii. Podobną zależność obserwowano dla *E. cloaceae* subsp. *dissolvens*, który w warunkach naturalnych powoduje gnienie łodygi kukurydzy, co stwierdzili Thind i Payak (1985). Tutaj, podobnie jak wyżej, obserwowane po inokulacji gnienie łodygi postępowało w kierunku wierzchołka rośliny (fot. 1). Pozostałe, zastosowane metody inokulacji, dla szczepów *D. zeae* oraz *E. cloaceae* subsp. *dissolvens*, prowadziły do powstania nekroz wokół miejsca wstrzyknięcia patogenu, rozwijających się wzdłuż nerwów liściowych i zajmujących znaczną powierzchnię liści (fot. 2–4). Nekrozy te otoczone były przez żółtą otoczkę (halo) i miały tendencję do zlewania się zajmując znaczne obszary blaszki li-

ściowej, szczególnie w przypadku metod wykorzystujących opryskiwanie zawiesiną bakteryjną (fot. 3).

W przypadku *P. ananatis*, objawami występującymi w warunkach naturalnych jest plamistość liści kukurydzy (Paccola-Meirelles i wsp. 2001; Krawczyk i wsp. 2010) oraz zgnilizna łodygi kukurydzy (Goszczyńska i wsp. 2007). Dla badanych szczepów *P. ananatis*, objawy zbliżone do plamistości liści obserwowano po opryskiwaniu liści zawiesiną bakterii (fot. 3), natomiast po wprowadzeniu zawiesiny bakterii w pęd główny, obserwowano wystąpienie zgnilizny (fot. 1).

Dla *P. agglomerans*, objawy obserwowane w warunkach naturalnych mają postać nieregularnych plam koloru słomkowego, rozciągających się na całą długość liścia (Morales-Valenzuela i wsp. 2007). Podobne nekrozy uzyskano przy użyciu wszystkich zastosowanych metod inokulacji (fot. 2–4) z wyjątkiem wprowadzania zawiesiny bakterii w pęd główny, gdzie również obserwowano gnienie (fot. 1).

Niezależnie od badanego szczepu bakterii, inkubacja za-inokulowanych roślin w komorze hodowlanej, w podwyższonej temperaturze i wilgotności, nasiliła i przyspieszyła rozwój objawów już istniejących (fot. 1C, 2C, 3C, 4C), co najprawdopodobniej było spowodowane występowaniem warunków optymalnych dla rozwoju choroby.

Co ważne, w testach patogenności, żadna z użytych metod inokulacji nie pozwoliła na uzyskanie objawów

choroby, takich jak te obserwowane w polu, w warunkach naturalnych. Ponadto, niezależnie od gatunku bakterii, obserwowane objawy były zbliżone do siebie w obrębie użytej metody inokulacji (fot. 1, 2, 3, 4). Zależność braku podobieństwa objawów wywołanych przez inokulację, z tymi występującymi w warunkach naturalnych, obserwowano dla *Kosakonia cowanii* infekującego soję (Krawczyk i Borodynko-Filas 2020), dla *P. ananatis* infekującej kukurydzę i pszenicę (Krawczyk i wsp. 2020) oraz dla *Pseudomonas syringae* infekującego morwę białą (Krawczyk i Łochyńska 2020).

Na podstawie wyników, można wnioskować, że objawy choroby spowodowane inokulacją szczepami bakterii na roślinach kukurydzy różnią się od objawów obserwowanych w warunkach naturalnych. Ponadto, objawy choroby uzyskane po inokulacji nie są specyficzne dla żadnego z badanych gatunków bakterii patogennych i są do siebie zbliżone w obrębie danej metody inokulacji. Występowanie takiej zależności należy brać pod uwagę przy interpretacji

wyników testów patogenności. Uznawanie za prawdziwe jedynie objawów bardzo zbliżonych do tych występujących naturalnie, może prowadzić do odrzucenia prawidłowych wyników jako fałszywie pozytywnych. Testy patogenności są narzędziem pozwalającym ocenić czy badany szczep bakterii może zainfekować zdrową roślinę gospodarza i spowodować u niej rozwinięcie się objawów choroby. Ostateczna postać objawów będzie się różnić w zależności od użytej metody inokulacji.

Wnioski / Conclusions

1. Przynależność gatunkowa bakteryjnych patogenów kukurydzy nie determinuje postaci objawów choroby powstałych w wyniku inokulacji roślin.
2. Dla roślin kukurydzy, wybór metody inokulacji i warunków hodowli roślin po inokulacji, warunkuje postać i nasilenie obserwowanych objawów choroby.

Literatura / References

- Azad H.R., Holmes G.J., Cooksey D.A. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. *Plant Disease* 84 (9): 973–979. DOI: 10.1094/PDIS.2000.84.9.973
- Claffin L.E. 2000. Diseases caused by Prokaryotes. s. 3–9. W: *Compendium of Corn Diseases* (D.G. White, red.). The American Phytopathology Society, 165 ss. ISBN 978-089-05-44-921.
- Coplin D.L., Majerczak D.R., Zhang Y., Kim W.-S., Jock S., Geider K. 2002. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. *Plant Disease* 86 (3): 304–311. DOI: 10.1094/PDIS.2002.86.3.304
- Coutingo T.A., Wallis F.M. 1991. Bacterial streak disease of maize (*Zea mays* L.) in South Africa. *Journal of Phytopathology* 133 (2): 112. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1991.tb00144.x
- De Baere T., Verhelst R., Labit C., Verschraegen G., Wauters G., Claeys G., Vaneechoutte M. 2004. Bacteremic infection with *Pantoea ananatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (9): 4393–4395. DOI: 10.1128/JCM.42.9.4393-4395.2004
- Dickey R.S., Claffin L.E., Zumoff C.H. 1987. *Erwinia chrysanthemi*: Serological comparisons of strains from *Zea mays* and other hosts. *Phytopathology* 77: 426–430.
- Giester L.J., Rees J.M. 2004. *Bacterial Diseases of Corn*. Clay/Webster, St. Paul, MN, USA.
- Goszczyńska T., Botha W.J., Venter S.N., Coutinho T.A. 2007. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. *Plant Disease* 91 (6): 711–718. DOI: 10.1094/PDIS-91-6-0711
- Haygood R.A., Strider D.L. 1982. A comparison of inoculation methods of *Erwinia chrysanthemi* in greenhouse ornamentals. *Plant Disease* 66 (6): 461–463. DOI: 10.1094/PD-66-461
- Hoffmann H., Stindl S., Ludwig W., Stumpf A., Mehlen A., Heesemann J., Monget D., Schleifer K.H., Roggenkamp A. 2005. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Systematic and Applied Microbiology* 28 (3): 196–205. DOI: 10.1016/j.syapm.2004.12.010
- Janda J.M., Abbott S.L. 2002. Bacterial identification for publication: when is enough enough? *Journal of Clinical Microbiology* 40 (6): 1887–1891. DOI: 10.1128/jcm.40.6.1887-1891.2002
- Krawczyk K., Borodynko-Filas N. 2020. *Kosakonia cowanii* as the new bacterial pathogen affecting soybean (*Glycine max* Willd.). *European Journal of Plant Pathology* 157: 173–183. DOI: 10.1007/s10658-020-01998-8
- Krawczyk K., Kamasa J., Zwolinska A., Pospieszny H. 2010. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *Journal of Plant Pathology* 92 (3): 807–811.
- Krawczyk K., Łochyńska M. 2020. Identification and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *mori* affecting white mulberry (*Morus alba*) in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 158: 281–291. DOI: 10.1007/s10658-020-02074-x
- Krawczyk K., Wielkopolan B., Obrepalska-Stęplowska A. 2020. *Pantoea ananatis*, a new bacterial pathogen affecting wheat plants (*Triticum* L.) in Poland. *Pathogens* 9 (12): 1079. DOI: 10.3390/pathogens9121079
- Lamka G.L., Hill J.H., McGee D.C., Braun E.J. 1991. Development of an immunosorbent assay for seedborne *Erwinia stewartii* in corn seeds. *Phytopathology* 81: 839–846. DOI: 10.1094/Phyto-81-839
- Lindow S.E., Arny D.C., Upper C.D. 1982. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant Physiology* 70 (4): 1084–1089. DOI: 10.1104/pp.70.4.1084
- Mergaert J., Verdonck L., Kersters K. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 162–173.

- Morales-Valenzuela G., Silva-Rojas H.V., Ochoa-Martínez D., Valadez-Moctezuma E., Alarcón-Zúñiga B., Zelaya-Molina L.X., Córdova-Téllez L., Mendoza-Onofre L., Vaquera-Huerta H., Carballo-Carballo A., Farfán-Gómez A., Ávila-Quezada G. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Disease* 91 (10): 1365. DOI: 10.1094/PDIS-91-10-1365A
- Paccola-Meirelles L.D., Ferreira A.S., Meirelles W.F., Marriel I.E., Casela C.R. 2001. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Journal of Phytopathology* 149 (5): 275–279. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x
- Paccola-Meirelles L.D., Meirelles W.F., Parentoni S.N., Marriel I.E., Ferreira A.S., Casela C.R. 2002. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananatis* isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2 (4): 587–590. DOI: 10.12702/1984-7033.V02N04A12
- Pataky J.K., du Toit L.J., Kerns M.R. 1997. Bacterial leaf blight on shrunken-2 sweet corn. *Plant Disease* 81 (11): 1293–1298. DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.11.1293
- Pérez-y-Terrón R., Villegas M.C., Cuellar A., Muñoz-Rojas J., Castañeda-Lucio M., Hernández-Lucas I., Bustillos-Cristales R., Bautista-Sosa L., Munive J.A., Caicedo-Rivas R., Fuentes-Ramírez L.E. 2009. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 96–99. DOI: 10.1071/DN09041
- Piątek E., Nowacka T., Podkówka Z., Waligóra H. 2007. Kukurydza. Czasopismo wydawane przez Polski Związek Producentów Kukurydzy.
- Rezzonico F., Smits T.H.M., Montesinos E., Frey J.E., Duffy B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology* 9: 204. DOI: 10.1186/1471-2180-9-204
- Ribeiro R. de L.D., Durbin R.D., Arny D.C., Uchtyl T.F. 1977. Characterization of the bacterium inciting chocolate spot of corn. *Phytopathology* 67 (12): 1427–1431. DOI: 10.1094/Phyto-67-1427
- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. 2001. *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, USA, 373 ss. ISBN 0-89054-263-5.
- Smidt M. 1986. Population dynamics of *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense* in field-grown dent corn and popcorn. *Plant Disease* 70: 1031–1036.
- Sobiczewski P., Iakimova E.T. 2022. Plant and human pathogenic bacteria exchanging their primary host environments. *Journal of Horticultural Research* 30 (1): 11–30. DOI: 10.2478/johr-2022-0009
- Stock I., Grüger T., Wiedemann B. 2001. Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18 (6): 537–545. DOI: 10.1016/S0924-8579(01)00463-0
- Thind B.S., Payak M.M. 1985. A review of bacterial stalk rot of maize in India. *International Journal of Pest Management* 31 (4): 311–316. DOI: 10.1080/09670878509371007
- Truu J., Talpsep E., Heinaru E., Stottmeister U., Wand H., Heinaru A. 1999. Comparison of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses. *Journal of Microbiological Methods* 36 (3): 193–201. DOI: 10.1016/S0167-7012(99)00030-5
- Vidaver A.K., Carlson R.R. 1978. Leaf spot of field corn caused by *Pseudomonas andropogonis*. *Plant Disease Reporter* 62 (3): 213–216.