

REAKCJA BULW WYBRANYCH ODMIAN ZIEMNIAKA NA PORAZENIE PRZEZ WYSOKO WIRULENTNY SZCZEP BAKTERII *DICKEYA SOLANI*

TUBERS REACTION OF SELECTED POTATO CULTIVARS TO INFECTION WITH HIGHLY VIRULENT STRAIN OF BACTERIA *DICKEYA SOLANI*

dr hab. Renata Lebecka, prof. nadzw., mgr Krystyna Michalak
IHAR-PIB Oddział w Młochowie, e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl

Streszczenie

Testowanie odporności bulw 11 odmian ziemniaka pozwoliło na wyróżnienie odmian o podwyższonej odporności (*Mieszko*, *Tajfun* i *Sonda*), odmian średnio odpornych (*Glada*, *Denar*, *Jelly*, *Vineta*, *Satina* i *Bryza*) oraz podatnych (*Owacja* i *Irys*). Porażenie bulw, wyrażone masą zgniłej tkanki, różniło się pomiędzy powtórzeniami testu, średnia w pierwszym teście wynosiła 5,9 g, w drugim 8,3. *Mieszko* i *Owacja* uległy istotnie silniejszemu porażeniu w drugim teście, porażenie odmian *Tajfun* i *Irys* nie różniło się w obu testach. Wszystkie trzy najodporniejsze odmiany mają w swoim pochodzeniu klony wyselekcjonowane w oddziale IHAR-PIB w Młochowie.

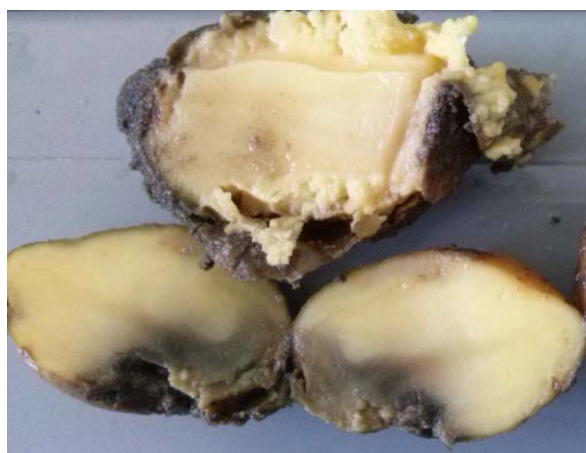
Słowa kluczowe: *Dickeya solani*, mokra zgnilizna bulw, podatność, ziemniak

Abstract

Testing of the resistance of eleven potato cultivars allowed to distinguish cultivars with higher resistance (*Mieszko*, *Tajfun*, and *Sonda*), medium resistant (*Glada*, *Denar*, *Jelly*, *Vineta*, *Satina*, and *Bryza*) and susceptible cultivars (*Owacja* and *Iris*). Tuber infection, expressed in mass of rotten tissue, was different between test replicates, mean in the first test was 5.9 g, in second 8.3 g. *Mieszko* and *Owacja* suffered a significantly stronger infection in the second test, the infection of the *Tajfun* and *Iris* cultivars did not differ in both tests. Among ancestors of all three of the most resistant cultivars are clones selected in Młochów Research Center, IHAR-PIB.

Keywords: *Dickeya solani*, potato, soft rot of tubers, susceptibility

Bakterie pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* (dawniej *Erwinia*) powodują dwie choroby ziemniaka: czarną nóżkę i mokrą zgniliznę bulw (fot. 1). W Polsce do najważniejszych sprawców tych chorób należą *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* i *P. wasabiae* (Waleron i in. 2013, Wiken Dees i in. 2017). Straty spowodowane przez te bakterie wynikają zarówno z obniżenia plonu i gnicia bulw, jak i ze strat finansowych związanych z obniżeniem stopnia kwalifikacji sadzeniaków. W Holandii roczne straty szacuje się na 30 mln euro (Sławiak i in. 2009a).



Fot. 1. Mokra zgnilizna bulw ziemniaka, objawy gnicia powodowane przez bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, nie do odróżnienia od objawów wywoływanych przez inne gatunki bakterii pektynolitycznych (fot. R. Lebecka)

Zmiany w populacji bakterii pektynolitycznych są dynamiczne. W Europie Zachodniej doszło do rozprzestrzenienia się nowego w uprawie ziemniaka gatunku bakterii z rodzaju *Dickeya*, który nazwano *D. solani* (Toth i in. 2011, Wolf i in. 2014). W Polsce bakterie te są wykrywane od 2005 r., a liczba województw, w których są one izolowane z cho-

rych tkanek roślinnych, sukcesywnie wzrasta (Sławiak i in. 2009). Według niektórych autorów bakterie *Dickeya* spp. są bardziej agresywne i preferują wyższe temperatury niż inne bakterie pektynolityczne (Czajkowski 2013, Toth i in. 2011). W ciepłym klimacie Izraela Tsror i inni (2009) oszacowali straty plonu od 20 do 25% na plantacji, na której 15% roślin miało objawy czarnej nóżki. Obecnie pojawił się i jest wykrywany w wielu krajach Europy, w tym także w Polsce, gatunek bakterii *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Waleron i in. 2015, Wolf i in. 2016).

Bakterie pektynolityczne nazywane są patogenami oportunistycznymi, ponieważ mogą zasiedlać bulwy ziemniaka, nie powodując objawów gnicia. Mówimy wtedy o porażeniu latentnym bulw. W sprzyjających warunkach temperatury i wilgoci bakterie zaczynają się dzielić, by po osiągnięciu krytycznej liczby zacząć produkować enzymy rozkładające składniki ścian komórkowych (Toth, Birch 2005; Sepulchre i in. 2007). Oszacowano, że jedna gnijąca bulwa może podczas sortowania porazić 100 kg ziemniaków (Elphinstone, Perombelon 1986). Posadzone w polu bulwy zasiedlone przez bakterie mogą zgnić w glebie, stanowiąc źródło infekcji dla rosnących obok roślin ziemniaka, lub mogą z nich wyrosnąć rośliny, w których w zależności od warunków środowiska może dojść lub nie do rozwoju czarnej nóżki. Jeśli objawy czarnej nóżki nie wystąpią, bakterie mogą przenieść się do bulw potomnych przez stolony albo w wyniku gnicia bulwy matecznej zakażić bulwy potomne przez przetchlinki lub zranienia. Bakterie pektynolityczne są agresywnymi hemibiotrofami wielu roślin uprawnych, mającymi duży arsenał enzymów rozkładających składniki ścian komórkowych, w tym pektyny i celulozę (Golanowska i in. 2015).

Nie prowadzi się ochrony chemicznej przed chorobami bakteryjnymi ziemniaka. Dotychczas w ziemniaku uprawnym nie znaleziono źródła skrajnej odporności na bakterie pektynolityczne. Choć znane są źródła wysokiej odporności na bakterie w diploidalnych mieszańcach *Solanum*, pochodzących od dzikich gatunków ziemniaka (Lebecka, Zimnoch-Guzowska 2004).

Odporność bulw ziemniaka na bakterie pektynolityczne jest warunkowana wieloma genami. Poziom porażenia bulw zależy od wielu czynników, dlatego testy oceny odporności odmian czy rodów prowadzi się z zastosowaniem odmian wzorcowych, których odporność na porażenie bakteriami danego gatunku jest znana. Odporność bulw na bakterie gatunku *D. solani* nie jest znana. Celem pracy była ocena reakcji bulw wybranych odmian na porażenie przez wysoko wirulentny izolat bakterii *D. solani* w teście laboratoryjnym.

Materiały i metody

Badano 11 odmian ziemniaka: Bryza, Denar, Głada, Irys, Jelly, Mieszko, Owacja, Satina, Sonda, Tajfun i Vineta z różnych grup wcześnieści i typów użytkowania (tab. 1). Doświadczenie przeprowadzono 4 miesiące po zbiorze, w dwóch testach (dwóch powtórze-

niach biologicznych), w odstępie 4-dniowym, w dniach od 13 do 16 i od 17 do 20 lutego. Do badań użyto wysoko wirulentnego szczepu bakterii *D. solani* IFB0099 z kolekcji bakterii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (Golanowska i in. 2015).

Bulwy moczo w 15-proc. podchlorynie sodu przez 15 min, płukano pod bieżącą wodą i zostawiano do wyschnięcia przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. 10 µl inokulum o koncentracji 10^8 jtk*mi⁻¹ wprowadzono w zranienie w bulwie wykonane stalowym prętem (10 x 2 mm), a następnie otwór zaklejało wazeliną (Wiken Dees i in. 2017). Bulwy zraszano wodą i szczelnie zamknięto w pojemnikach. W każdym z dwóch testów inokulowano po 10 bulw każdej odmiany w dwóch powtórzeniach technicznych – po 5 bulw w każdym pudełku. Po trzech dniach inkubacji w temperaturze 26°C bulwy krojono wzdłuż miejsca inokulacji, a masę zgniłej tkanki oznaczano jako różnicę wagi bulwy przed i po jej usunięciu.

Dwuczynnikową analizę wariancji i porównanie średnich testem Tukeya przeprowadzono programem STATISTICA for Windows (Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, USA (1997).

Tabela 1

Porażenie bulw ziemniaka inokulowanych bakteriami *Dickeya solani* (szczep IFB0099)

| Nazwa | Masa zgniłej tkanki (g) | Ocena katalogowa* | Typ użytkowy** |
|---------|-------------------------|-------------------|------------------------------|
| Mieszko | 2,9 a | brak | skrobiowa, średnio wczesna |
| Tajfun | 3,6 a | brak | jadalna, średnio wczesna |
| Sonda | 4,2 ab | brak | skrobiowa, późna (skreślona) |
| Głada | 5,3 bc | 5 | skrobiowa, średnio wczesna |
| Denar | 6,4 cd | 3 | jadalna, bardzo wczesna |
| Jelly | 7,3 d | brak | jadalna, średnio późna |
| Vineta | 7,5 d | 3 | jadalna, wczesna |
| Satina | 7,6 d | brak | jadalna, średnio wczesna |
| Bryza | 8,0 d | 3 | jadalna, średnio późna |
| Owacja | 9,9 e | brak | jadalna, wczesna |
| Irys | 16,1 f | 3 | jadalna, bardzo wczesna |

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie z $p < 0,05$ wg testu Tukeya; *ocena odporności bulw na mokrą zgniliznę powodowaną przez *Pectobacterium atrosepticum*, w skali od 1 do 9, gdzie 9 oznacza odporność najwyższą; **typ użytkowy odmian wg „Charakterystyki Krajowego Rejestru Odmian Ziemniaka”, IHAR-PIB Oddz. Jadwisin 2014 i 2016

Wyniki i ich omówienie

Na podstawie dwuczynnikowej analizy wariancji wykazano istotny wpływ odmiany, testu oraz interakcji obu czynników na porażenie bulw ziemniaka wyrażone masą zgniłej tkanki (tab. 2). Średnia porażenia w pierwszym teście wynosiła 5,9 g, w drugim 8,3. Istotne interakcje dotyczyły reakcji czterech odmian ziemniaka: Owacja i Mieszko istotnie silniej poraziły się w drugim teście, a Tajfun i

Irys uległy takiemu samemu porażeniu w obu testach.

Średnie porażenie bulw przez bakterie *D. solani* przedstawiono w tabeli 1. Odmiany Mieszko, Tajfun i Sonda poraziły się najslabiej, a najsilniej – Irys, podatny wzorzec w testach oceny odporności na *P. atrosepticum*. Mieszko i Tajfun uległy istotnie mniejszemu porażeniu niż Glada – wzorzec średniej odporności na *P. atrosepticum*.

Tabela 2

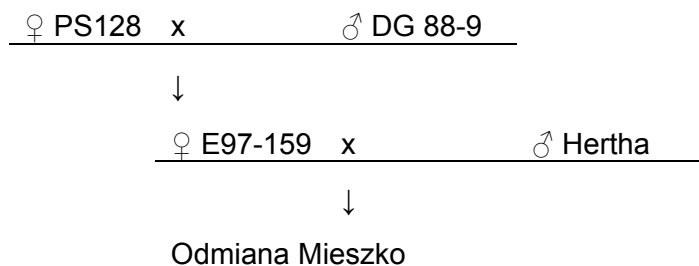
Analiza wariancji masy zgniłej tkanki bulw (g) 11 odmian ziemniaka inokulowanych bakteriami *Dickeya solani* (szczep IFB0099)

| Źródło zmienności | Stopnie swobody | Średnie kwadraty |
|-------------------|-----------------|------------------|
| Odmiana | 10 | 315,09*** |
| Test | 1 | 371,86*** |
| Odmiana x test | 10 | 18,55** |
| Błąd | 241 | 7,16 |

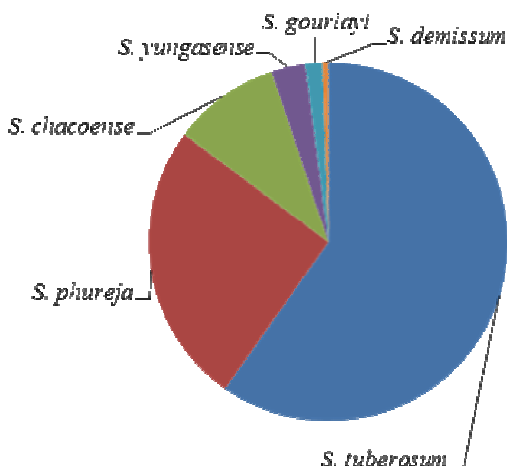
** , *** – statystycznie istotne odpowiednio z $p = 0,01$ i $0,001$



Fot. 2. Objawy porażenia bulw trzech odmian ziemniaka po trzech dniach od inokulacji bakteriami *Dickeya solani* (fot. R. Lebecka)



Rys. 1. Pochodzenie odmiany Mieszko, o podwyższonej odporności na bakterie *D. solani*



Rys. 2. Hipotetyczny udział gatunków *Solanum* diploidalnego mieszańca DG 88-9, będącego źródłem wysokiej odporności na bakterie z rodzaju *Pectobacterium* (Lebecka, Zimnoch-Guzowska 2004) w pochodzeniu odmiany Mieszko

Testy laboratoryjne oceny odporności bulw na mokrą zgniliznę charakteryzują się dużą zmiennością wyników, nawet przy testowaniu bulw tej samej odmiany. Dlatego ocena laboratoryjna jest prowadzona w powtórzeniach biologicznych. Przy bardzo starannym odtwarzaniu ustalonej procedury testowania nadal wiele czynników niekontrolowanych wpływa na wynik testu. Najczęstszym sposobem inokulacji bulw jest wprowadzanie do zranienia w bulwie końcówki mikropipety z zawiesiną bakterii. Końcówka ta zostaje w bulwie do końca testu.

Do testowania bulw w pokazanym eksperymencie zastosowano inokulację zawiesiną bakterii o znanej objętości (po 10 µl) wprowadzaną w świeże zranienia. Po inokulacji otwór zaklejano wazeliną, bulwy zraszano wodą i zamykano w szczelnych pudełkach. Taki sposób inokulacji wydaje się bardziej precyzyjny, ponieważ w tym wypadku, w odróżnieniu od inokulacji za pomocą końcówki mikropipety, znana jest objętość użytej zawiesiny.

Największym problemem w przeprowadzaniu testów jest stworzenie powtarzalnych warunków ograniczonego dostępu do tlenu. W warunkach tlenowych bulwy są w stanie obronić się przed bakteriami, wytwarzając warstwę perydermy w miejscu zranienia, która jest dla nich barierą nie do przebycia. Do gnicia w przechowalni dochodzi wtedy, kiedy bulwy są słabo przewietrzane, przechowywane w dużych przyzmacach, pokryte warstwą wody. Warunki takie powodują obniżenie zawartości tlenu w bulwach.

W laboratorium staramy się zapewnić jednorodne warunki testu, sprzyjające rozwojowi choroby. W ten sposób można się spodziewać, że wyselekcjonowane rody będą sobie lepiej radzić z infekcją w warunkach mniej sprzyjających rozwojowi bakterii. Bulwy układamy w pojemnikach równej wielkości i spryskujemy po inokulacji zbliżoną ilością wody.

Wyniki doświadczenia pokazują, że w pierwszym teście doszło do słabszego porażenia bulw 9 testowanych odmian niż w drugim terminie. Różnice te były jeszcze wyraźniejsze w przypadku odmian Owacja i Mieszko, które uległy istotnie silniejszemu porażeniu w drugim teście. Tylko dwie od-

miany poraziły się na tym samym poziomie w obu testach: Irys silnie, Tajfun – słabo.

W „Charakterystyce Krajowego Rejestru Odmian Ziemniaka” tylko 18 spośród 110 odmian ma ocenę odporności na mokrą zgniliznę bulw powodowaną przez bakterie *Pectobacterium*, wyrażoną w skali od 1 do 9, gdzie 9 oznacza odporność najwyższą. Glada ma najwyższą ocenę 5, Irys, Bryza, Vine-ta i Denar – 3. W teście oceny porażenia bulw przez bakterie *D. solani* Irys była istotnie silniej porażona niż pozostałe badane odmiany, a Glada charakteryzowała się średnim poziomem porażenia. Najodporniejsze na bakterie *D. solani* okazały się Mieszko, Tajfun i Sonda. Odmiana Mieszko w swoim pochodzeniu (rys. 1) ma diploidalny klon DG 88-9 (rys. 2), źródło wysokiej odporności na bakterie *P. atrosepticum* powodujące mokrą zgniliznę bulw. Jest to pierwsza odmiana, która powstała przy użyciu wyselekcjonowanego w oddziale IHAR-PIB w Młochowie klonu tetraploidalnego E97-159, o podwyższonej odporności na mokrą zgniliznę. Tajfun jest średnio wczesną odmianą jadalną, która pochodzi od wyhodowanego w IHAR-PIB w Młochowie tetraploidalnego rodu PS 646, a skrobiowa Sonda ma w swoim pochodzeniu ród tetraploidalny PS 674, również wyselekcjonowany w Młochowie. Obecnie Sonda nie figuruje już w krajowym rejestrze odmian ziemniaka, z którego została usunięta w 2015 r.

Podsumowanie i wnioski

Testowanie odporności bulw ziemniaka na porażenie przez bakterie pektynolityczne pozwala na wyróżnienie odmian o podwyższonej odporności, średnio odpornych oraz bardzo podatnych. W teście laboratoryjnym spośród 11 testowanych odmian trzy – Mieszko, Tajfun i Sonda – charakteryzowały się najwyższym poziomem odporności bulw na agresywny szczep bakterii *Dickeya solani*. Ze względu na istotny wpływ testu oraz istotne współdziałanie odmiany z testem ocenę odporności bulw na bakterie pektynolityczne należy wykonać co najmniej dwukrotnie.

Im bardziej odmiany są podatne na mokrą zgniliznę, tym ważniejsze jest, aby przestrzegać pewnych zasad podczas przechowywania bulw. Należy przechowywać bulwy

z wygojonymi zranieniami, które mogły powstać w czasie zbioru, stopniowo obniżać temperaturę w przechowalni, by zapobiec kondensacji pary wodnej na powierzchni bulw i wietrzyć przechowalnię w celu usunięcia nadmiaru dwutlenku węgla. Zabiegi te przeciwdziałają powstawaniu warunków beztlenowych w bulwach, które obniżają ich odporność na bakterie pektynolityczne i sprzyjają rozwojowi choroby. W okresie przechowywania należy usuwać wszystkie bulwy, na których wystąpią objawy mokrej zgnilizny.

Literatura

1. Czajkowski R., Boer W. J. de, Zouwen P. S., Kastelein P. van der, Jafra S., Haan E. G. de, Bovenkamp G. W. den, Wolf J. M. van der. 2013. Virulence of '*Dickeya solani*' and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). – Plant Pathol. 62: 597-610;
2. Elphinstone J. G., Perombelon M. C. M. 1986. Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading. – Plant Pathol. 35: 25-33;
3. Golanowska M., Galardini M., Bazzicalupo M., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Mengoni A., Potrykus M., Sławiak M., Lojkowska E. 2015. Draft genome sequence of a highly virulent strain of the plant pathogen *Dickeya solani*, IFB0099. Genome Announc 3(2):e00109-15. doi:10.1128/genomeA.00109-15;
4. Lebecka R., Zimnoch-Guzowska E. 2004. The inheritance of resistance to soft rot (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) in diploid potato families. – Am. J. Potato Res. 81: 395-401;
5. Sepulchre J. A., Reverchon S., Nasser W. 2007. Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. – J. Theor. Biol. 244: 239-257;
6. Sławiak M., Lojkowska E., Wolf J. M. 2009. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. – Plant Pathol. 58: 794;
7. Stat Soft. Inc., 2300 East 14th St. Tulsa, OK, 74104, USA (1997);
8. Toth I. K., Birch P. L. J. 2005. Rotting softly and stealthily. – Curr. Opin. Plant Biol. 8: 424-429;
9. Toth I. K., Wolf J. M., Saddler G., Łojkowska E., Helias V., Pirhonen M., Tsrör (Lahkim) L., Elphinstone J.G. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. – Plant Pathol. 60: 385-399;
10. Tsrör L., Erlich O., Lebiush S., Hazanovsky M., Zig U., Sławiak M., Grabe G., Wolf J. M., Haar J. J. van de. 2009. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. – Eur. J. Plant Pathol. 123, 311-320;
11. Waleron M., Waleron K., Łojkowska E., 2013. Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. – Eur. J. Plant Pathol. 137, 149-158;
12. Waleron M., Waleron K., Łojkowska E. 2015. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on potato and other vegetables in Poland. – Plant Dis. 99: 1271;
13. Wiken Dees M., Lebecka R., Perminow J. I. S., Czajkowski R., Grupa A., Motyka A., Zoledowska S., Śliwka J., Lojkowska E., Brurberg M. B. 2017. Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains obtained from diseased potato plants in different climatic conditions of Norway and Poland. – Eur. J. Plant Pathol. doi:10.1007/s10658-016-1140-2;
14. Wolf J. M., Nijhuis E. H., Kowalewska M. J., Saddler G. S., Parkinson N., Elphinstone J. G., Pritchard L., Toth I. K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garlant L., Helias V., Pothier J. F., Pfluger V., Duffy B., Tsrör L., Manulis S. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) International. – J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 768-774;
15. Wolf J. M., Haan E. G. de, Kastelein P., Krijger M., Haas B. H. de, Velvis H., Mendes O., Kooman-Gersmann M., Zouwen P. S. 2016. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. – Plant Pathol. Doi: 10.1111/ppa.12600



Praca realizowana w ramach projektu POTPAT
um. Pol-Nor/202448/28/2013 WP1

