

VPLIV RIZOSFERNIH BAKTERIJ NA RAST SADIK PARADIŽNIKA (*Solanum lycopersicum* L.)

Tina DEMŠAR¹, Špela KUBIK², Ana ROTTER³, Maja RUPNIK⁴, Maja RAVNIKAR⁵

^{1,3,5}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

²Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana

⁴Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta Maribor, Zavod za zdravstveno varstvo Maribor,
Maribor in Center odli nosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Ljubljana

IZVLE EK

Rizobakterije (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR) se uporabljajo za pospeševanje rasti rastlin in za biotično varstvo rastlin pred različnimi rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi tako v kmetijstvu kot gozdarstvu. Paradižnik je ekonomsko pomembna rastlina v Sloveniji, gojimo ga v rastlinjakih in tunelih, kar je prednost pri morebitni aplikaciji bakterijskih izolatov za pospešeno rast rastlin in varstvo pred rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi. V poskusih smo preverili pozitivni učinek izoliranih bakterij iz rizosfere paradižnika na rast rastlin paradižnika in sposobnosti inhibicije treh patogenih bakterij *in vitro*. Pri nekaterih bakterijskih izolatih iz rodu *Pseudomonas* smo opazili tako pozitiven učinek na rast sadik paradižnika kot tudi sposobnost inhibicije na nekatere testirane patogene rastlinske bakterije, zato bi bili ti izolati uporabni za nadaljnje raziskave inhibicije pred rastlinskimi patogenimi bakterijami *in vivo* in kasneje za ugotavljanje pozitivnega učinka na rast rastlin paradižnika v poljskih poskusih. Izolirane bakterije smo identificirali z analizo profila maščobnih kislin, z BIOLOG in sekvenciranjem 16S rRNA ter rezultate primerjali z drugimi identifikacijskimi metodami. Ugotovili smo, da nobena od preizkušenih metod za identifikacijo ne omogoča zanesljivo razlikovanje med različnimi sevi iz rodu *Pseudomonas*, temveč je potrebno za zanesljivo določitev uporabiti kombinacijo metod.

Ključne besede: biotično varstvo, identifikacija, paradižnik, PGPR, rizobakterije

ABSTRACT

EFFECT OF RHIZOBACTERIA ON GROWTH OF TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum* L.)

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are used for biocontrol against various plant pathogens and to promote plant growth in both agriculture and forestry. Tomatoes are economically important plants in Slovenia, cultivation in the greenhouse and plastic tunnels is an advantage in potential application of bacterial isolates to improve plant growth and protect against plant pathogens. The positive effect on the growth of tomato plants of 21 strains isolated from the rhizosphere of tomato was examined and their ability to inhibit three pathogenic bacteria *in vitro* was tested. In some bacterial isolates of the genus *Pseudomonas*, we noticed a positive effect on the growth of tomato plants as well as their

¹ univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² univ. dipl. mikrobiol., prav tam

³ dr. stat. znan., prav tam

⁴ prof., dr. biol. znan., Prvomajska ulica 1, SI-2000 Maribor; Slomškov trg 15, SI-2000 Maribor; Jamova 39, SI-100 Ljubljana

⁵ prof., dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000, Ljubljana

ability to inhibit some plant pathogenic bacteria tested, so these isolates are useful for the further research of inhibition against plant pathogenic bacteria *in vivo* and subsequently to identify a positive effect on the growth of tomato plants in field trials. Isolated bacteria were identified by fatty acid profile analysis, BIOLOG and sequencing of 16S rRNA and the results were compared with other identification methods. We found out that none of the tested methods for identification does not allow reliable differentiation between different strains of the genus *Pseudomonas*. For reliable identification combination of methods should be used.

Key words: biocontrol, identification, PGPR, rhizobacteria, tomato

1 UVOD

Bakterije, ki pospešujejo rast rastlin (angl. *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR)) so vse tiste rizobakterije, ki izpolnjujejo vsaj dva od treh kriterijev: kompetitivno kolonizirajo korenine rastlin, stimulirajo rast rastlin in inhibirajo patogene mikroorganizme. V terminu »biognojilo« zdužujemo vse PGPR, ki pospešujejo rast rastlin. Mehanizem delovanja v tem primeru je fiksacija dušika, dostopnost raztopljenega fosfata, produkcija rastlinskih hormonov in vsebnost hlapnih pospeševalcev rasti. Pri drugi skupini PGPR, ki jo označujemo pod terminom »biopesticid«, pa je v ospredju njihova vloga antagonist patogenih mikroorganizmov (Haas in Defago, 2005). Inhibicija patogenih mikroorganizmov je posledica tekmovanja za dostopnost hranil, preprečitev kolonizacije korenin, produkcije sekundarnih metabolitov, produkcije sideroforjev, liti nih encimov in indukcija inducirane sistemske rezistence (Van Wees in sod., 1999).

Rizobakterije so v uporabi za pospeševanje rasti rastlin in za biokontrolo pred različnimi patogenimi mikroorganizmi tako v kmetijstvu kot gozdarstvu. Študije so večinoma opravljene v treh korakih: izolacija bakterijskih sevov iz rizosfere, selekcija sevov na uporabne značilnosti in aplikacija izbranih sevov v poljskih poskusih. Zadnji korak je najtežji, ker morajo rizobakterije uspešno kolonizirati rizosfero, da so učinkovite (Kumari in Srivastava, 1999). Rizobakterije lahko dodamo direktno na semena ali v prst. Kolonizacijo korenin lahko povečamo z večanjem doze rizobakterij, z uporabo mešanic različnih sevov ali z gensko modifikacijo sevov. Uporaba rizobakterij je ustrezna alternativa ali dopolnitev uporabi pesticidov in umetnih gnojil, zato pri njih upoštevamo v prihodnosti povečano uporabo rizobakterij za pospeševanje rasti rastlin in pri biotičnem varstvu rastlin. Študije rizobakterij izoliranih iz rizosfere paradižnika so osredotojene na fluorescentne pseudomonade in na njihov vpliv na rast rastlin paradižnika in inhibicijo patogenih bakterij (Kumar in Dube, 1991).

2 MATERIAL IN METODE

Bakterijski izolati so bili izolirani iz rizoplana paradižnika (Kubik, 2002). Na podlagi njihove identifikacije (Kubik, 2002) smo izbrali 21 bakterijskih izolatov za nadaljne poskuse, ki naj bi po zbrani literaturi imeli pozitiven vpliv na rast rastlin.

2.1 Inhibicija patogenih bakterij *in vitro*

Da bi preverili sposobnost bakterijskih izolatov, da inhibirajo rast patogenih bakterij *in vitro*, smo izbrali tri pogoste patogene mikroorganizme, ki povzročajo bolezni paradižnika: *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in *Xanthomonas vesicatoria*. Na gojišču v King B smo naredili razmaz z vatenko za konfluentno rast patogenih bakterij. Po 24 urah inkubacije smo na vsako petino gojišča cepili v ravni vrsti izolirane PGPR bakterijske izolate. Gojišča smo inkubirali 2 dni pri 25°C.

2.2 Rastlinski poskusi, ugotavljanje pozitivnega uinka na rast rastlin

Na podlagi predhodnih rastlinskih poskusov (Demšar, 2003) smo ugotovili, da je tretiranje rastlin z bakterijsko suspenzijo v vodi najboljši presejalni test, ko želimo ugotoviti ali bakterijski sev pozitivno vpliva na rast rastlin. Za rastlinski poskus smo uporabili semena paradižnika *Solanum lycopersicum* L. kultivarja Moneymaker, ki smo jih najprej površinsko sterilizirali. Semena smo nato tretirali v suspenziji PGPR bakterijskih izolatov PGPR v 1% raztopini karboksimetil celuloze in jih nato posadili v steriliziran pesek. Rastline smo na 2 dni zalivali s suspenzijami bakterijskih izolatov v sterilni pitni vodi. Po 5 tednih smo tehtali svežo in suho maso korenin in zgornjih delov rastlin. Za vsak bakterijski izolat smo uporabili po 12 rastlin paradižnika. Poskus smo zaradi velikega števila preizkušenih izolatov razdelili na 3 podposkuse.

2.3 Identifikacija bakterijskih izolatov

Za identifikacijo bakterijskih izolatov smo uporabili tri različne laboratorijske metode: analizo profila mašobnih kislin, analizo metabolnega profila BIOLOG in analizo sekvenciranja 16S rRNA. Za etna identifikacija je bila opravljena že v okviru diplomske naloge (Kubik, 2002). S primerjavo vseh rezultatov smo skušali ugotoviti katera metoda ali kombinacija metod je najbolj zanesljiva za identifikacijo preučevanih bakterij.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Inhibicija patogenih mikroorganizmov *in vitro*

393

Trije bakterijski izolati so šibko zavirali rast bakterije *Ralstonia solanacearum in vitro*. 13 bakterijskih izolatov je imelo sposobnost, da zavirajo rast patogene bakterije *Xanthomonas vesicatoria*, od tega največ fluorescentnih pseudomonad. 10 bakterijskih izolatov je zaviralo rast bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Trije bakterijski izolati so zavirali rast vseh treh testiranih patogenih bakterij (preglednica 1).

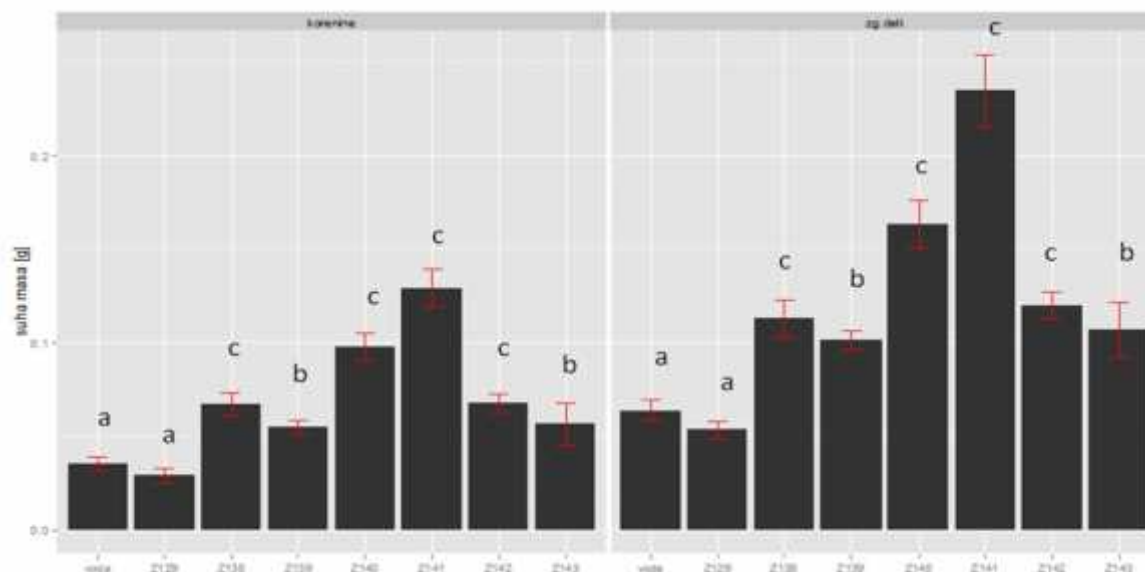
3.2 Rastlinski poskusi, ugotavljanje pozitivnega uinka na rast rastlin

Pri 6 bakterijskih izolatih smo ugotovili največji vpliv na rast rastlin (povečano svežo in suho maso korenin in zgornjih delov rastlin). Nekaj rezultatov je prikazanih na sliki 1 in v preglednici 1. Trije bakterijski izolati so identificirani kot *Pseudomonas* sp. Dva bakterijska izolata sta identificirana kot *Stenotrophomonas maltophilia*. Ker je ta bakterija lahko patogeni oportunist, ni ustrezna za nadaljnje raziskave. Negativen vpliv na rast rastlin smo ugotovili pri enem bakterijskem izolat, ki sicer inhibira rast vseh treh testiranih patogenih bakterij *in vitro*, kar pomeni, da je pomembno testirati rizobakterije, tako na vpliv na rast rastlin kot na inhibicijo na patogene mikroorganizme, ker s tem lahko zelo hitro izločimo neprimerne izolate za nadaljne poskuse.

3.3 Identifikacija bakterijskih izolatov

Trije bakterijski izolati so pri vseh metodah, nedvoumno identificirani kot *Stenotrophomonas maltophilia*. 1 bakterijski izolat je bil z analizo profila mašobnih kislin identificiran kot *Chryseobacterium indolgenes* v diplomski nalogi Kubik, 2002 pa je izolat identificiran kot podoben *Brevundimonas diminuta*. Z analizo profila mašobnih kislin nismo dobili ustreznega rezultata za 4 izolate od skupaj 21 analiziranih izolatov. Vsi ostali 13 izolatov so identificirani kot *Pseudomonas* sp. Pri vseh teh smo opazili razlike v identifikaciji pri analizi profila mašobnih kislin med različnimi bazami podatkov. Vse baze izolatov sicer identificirajo

kot *Pseudomonas*, vendar razli ne vrste, zato smo naredili še nekaj biokemijskih testov in identifikacijo zaklju ili na osnovi rezultatov le-teh. Nekaj rezultatov je prikazanih v preglednici 1.



Slika 1: Povpre je suhe mase rastlin paradižnika tretiranih s 7 različnimi bakterijskimi izolati v sterilni pitni vodi v prvem podposkusu. a – ni statistično značilno (glede na kontrolo), b – mejno statistično značilno (p-vrednost je med 0.01 in 0.1), c – statistično značilno (primerjava glede na kontrolo)

394

Figure 1: Average dry weight of tomato plants treated with 7 different bacterial isolates in the water in first sub-experiment. a – not statistically different from control (water), b – statistically different from control (water) (p-value between 0.01 and 0.1), c – Statistically significant different from control (water)

Na podlagi rezultatov vseh treh identifikacijskih metod lahko sklepamo, da v našem primeru nobena uporabljena metoda sama zase ne omogo a zanesljivega razlikovanja med vrstami iz rodu *Pseudomonas*, ki so bile izolirane iz rizosfere paradižnika. Zavedati se moramo tudi, da je rizosfera pomemben rezervoar oportunisti nih humanih patogenov iz rodov *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* in *Stenotrophomonas* (Berg, 2005), zato sta dobra identifikacija in nadaljni izbor sevov zelo pomembna.

4 SKLEPI

Pri nekaterih bakterijskih izolatih smo potrdili pozitiven u inek na rast sadik paradižnika. Gre za bakterijske izolate iz rodu *Pseudomonas* (verjetno *Pseudomonas putida*) in bakterijske izolate *Stenotrophomonas maltophilia*. Bakterijski izolati *Stenotrophomonas maltophilia* niso inhibirali testiranih patogenih rastlinskih bakterij (*Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*) *in vitro*. Pri nekaterih bakterijskih izolatih iz rodu *Pseudomonas* pa smo opazili tako pozitiven u inek na rast sadik paradižnika kot tudi sposobnost inhibicije na nekatere testirane patogene rastlinske bakterije. Ti bakterijski izolati bi lahko prispevali k zmanjšani uporabi kemi nih pripravkov pri zatiranju rastlinskih patogenih bakterij in zmanjšanju uporabe umetnih gnojil pri gojenju paradižnika, vendar bi bile za to potrebne nadaljnje analize sposobnosti inhibicije rastlinskih patogenih bakterij *in vivo* ter nadaljni bolj obširni poskusi vpliva izbranih bakterijskih izolatov na rast sadik paradižnika različnih vrst v laboratorijskih in poljskih poskusih.

Preglednica 1: Zbirna tabela nekaterih testiranih bakterijskih izolatov z rezultati vpliva na rast rastlin, inhibicije patogenih bakterij v *in vitro* in identifikacije.

Table 1: Summary table of some tested bacterial isolates with results of effect on plant growth, inhibition of pathogenic bacteria *in vitro* and identification.

Bakterijski sev	Pozitivni uinek na rast rastlin paradiznika		<i>In vitro</i> inhibicija rastlinskih patogenih bakterij			Identifikacija			
	sveža masa korenin in zg. delov rastlin	suha masa korenin in zg. delov rastlin	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Profil maš obnih kislin in nekateri biokemijski testi	BIOLOG	Sekvenciranje 16S rRNA	Biokemijski testi in profil maš obnih kislin (Kubik, 2002)
NIB Z 139	++	++	ni inhibicije	inhibicija	inhibicija	ni identifikacije	ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
NIB Z 140	+++	+++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	ni identifikacije	/	podoben <i>Brevundimonas diminuta</i>
NIB Z 142	++	++	ni inhibicije	inhibicija	inhibicija	ni identifikacije	ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (profil maš obnih kislin: <i>Pseudomonas fluorescens</i>)
NIB Z 143	-	+	šibka inhibicija	šibka inhibicija (inhibicija)	mo na inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ali <i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar V ali <i>Pseudomonas putida</i>
NIB Z 146	++	++	ni inhibicije	inhibicija	šibka inhibicija (inhibicija)	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 148	+++	+++	šibka inhibicija (ni inhibicije)	šibka inhibicija	ni inhibicije	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	ni identifikacije
NIB Z 149	++	++	šibka inhibicija	šibka inhibicija	šibka inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	ni identifikacije	/	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 150	+++	+++	ni inhibicije	šibka inhibicija	ni inhibicije	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	/	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
NIB Z 151	-	-*	šibka inhibicija	inhibicija	inhibicija	ni identifikacije	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (profil maš obnih kislin: ni identifikacije)
NIB Z 152	+++	+++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
NIB Z 153	+++	+++	ni inhibicije	ni inhibicije	ni inhibicije	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> biovar A	<i>Pseudomonas putida</i> / <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
NIB Z 154	++	++	ni inhibicije	šibka inhibicija	ni inhibicije (F)	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip F	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
NIB Z 156	++	++	ni inhibicije	inhibicija	mo na inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotip G	Uncultured soil bacterium / <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (profil maš obnih kislin: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)
NIB Z 157	+/++	++	ni inhibicije	*	mo na inhibicija	<i>Pseudomonas</i> sp., verjetno <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	ni identifikacije, verjetno <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (profil maš obnih kislin: <i>Pseudomonas chlororaphis</i>)

Simboli: - ni pove ane glede na kontrolo, + rahlo pove anje glede na kontrolo, ++ pove anje glede na kontrolo, +++ mo no pove anje glede na kontrolo, -* zmanjšano glede na kontrolo, F rast patogene bakterije okoli testiranega izolata boljša, * testni organizem se je mo no razrasel

Na podlagi rezultatov vseh treh identifikacijskih metod (profil maš obih kislin, BIOLOG, sekvenciranje 16S rRNA) lahko sklepamo, da nobena metoda sama zase v našem primeru ne omogo a zanesljivo razlikovanje med sevi iz rodu *Pseudomonas*, ki so bile izolirane iz

rizosfere paradižnika. Edini izolat ki je bil v vseh primerih nedvoumno karakteriziran je bil *Stenotrophomonas maltophilia*.

5 ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujemo bakteriološkemu laboratoriju Plant Protection Service na Nizozemskem, za pomoč pri izvedbi analize profila mašobnih kislin in Igorju Zidari u (Kmetijski inštitut Slovenije) za pomoč pri analizi BIOLOG.

6 LITERATURA

- Berg G., Eberl L., Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7,11: 1673-1685
- Demšar, T., Kubik Š., Ravnikar, M., Rupnik, M. 2003. Characterization of rhizobacteria from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) rhizosphere. V: AVŠI -ŽUPANC, Tatjana (ur.). 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Slovenia, Ljubljana, *Abstract book*. Delft, The Netherlands: FEMS, str. 375.
- Haas D., Defago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3,4: 307-319
- Kubik Š. 2002. Izolacija in karakterizacija bakterij iz rizosfere paradižnika. Diplomsko naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Kumari V., Srivastava J.S. 1999. Molecular and biochemical aspects of rhizobacterial ecology with emphasis on biological control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 5: 535-543
- Kumar B.S.D., Dube H.C. 1991. Plant Growth-Promoting Activity of A Fluorescent Pseudomonas from Tomato Rhizosphere. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29,4: 366-370
- VanWees S. C. M., Lijndijk M., Smoorenburg I., Van Loon L. C., Pieterse C. M. J., 1999, Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes, but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge, *Plant Mol. Biol.*, 41: 537-549