AKTYWNOŚĆ DROŻDŻY *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA* PRZECIWKO PATOGENOM ZIEMNIAKA SADZENIAKA *SOLANUM TUBEROSUM* L.

Aleksandra Steglińska[1], Agata Czyżowska[2], Beata Gutarowska[1], Dorota Kręgiel[1]

1) Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź
2) Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

10.06.2022

Ziemniak sadzeniak

- Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) jest trzecią najczęściej konsumowaną rośliną spożywczą na świecie, po pszenicy i ryżu.
- Polska to 2. w Europie i 7. na świecie największy producent ziemniaków.
- Zbiory w 2021 roku w Polsce osiągnęły wartość 7,1 mln ton (powierzchnia uprawy 200 tys. ha).
- Duży potencjał eksportowy - problemem jest duża aktywność fitopatogenów ziemniaka.
- Bezpośrednie straty plonów spowodowane przez patogeny roślin zmniejszają globalną produktywność rolnictwa o 20–50%.
- Głównie porażone są sadzeniaki.

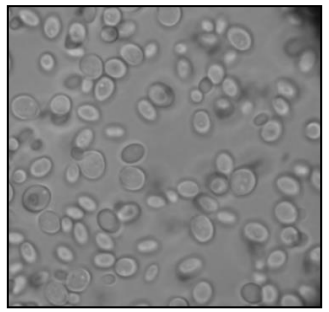
Biopreparat vs. chemiczny fungicyd

Problemy związane ze stosowaniem chemicznych fungicidów:

- Słaba biodegradowalność
- Akumulacja w roślinach, glebie, wodzie
- Toksyczność dla organizmów ludzkich i zwierzęcych
- Negatywny wpływ na bioróżnorodność
- Niska selektywność
- Wzrost oporności patogenów

Rosnący trend ograniczania stosowania chemicznych środków ochrony roślin na rzecz alternatyw przyjaznych środowisku.

- Mikroorganizmy i ich metabolity
- Substancje pochodzenia roślinnego zawarte w olejkach i ekstraktach



Cel i zakres pracy

Selekcja szczepów drożdży *M. pulcherrima* jako czynnika hamującego wzrost patogenów ziemniaka sadzeniaka:

- ocena izolatów *M. pulcherrima* pod kątem
  - zdolności hamowania fitopatogenów sadzeniaków *in vitro*
  - aktywności enzymatycznej
  - wytwarzania kwasu pulcherriminowego i innych metabolitów
- badania aplikacyjne na sadzeniach wybranego szczepu drożdży namnożonego w pożywce serwatkowej

Drożdże *Metschnikowia pulcherrima*

- Naturalna mikrobiota owoców, kwiatów i owadów.
- Dość wysoka odporność na stres środowiskowy (wysuszenie, działanie promieni słonecznych i wahania temperatury).
- Silne działanie przeciwgrzybowe, słabszy antagonizm wobec bakterii.

MECHANIZMY ANTAGONISTYCZNEJ AKTYWNOŚCI DROŻDŻY Z RODZAJU *METSHNIKOWIA:*

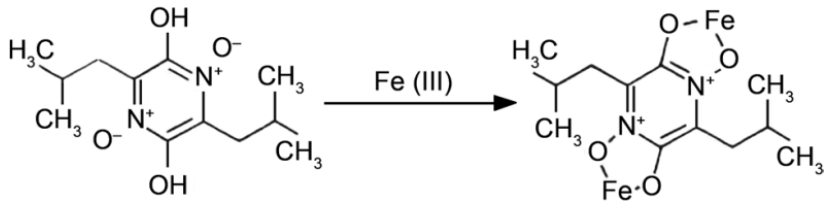
- producja kwasu pulcherriminowego wiążącego żelazo
- współzawodnictwo o nisze ekologiczne
- współzawodnictwo o składniki odżywcze (m.in. sacharydy, azot)
- zmiany pH na skutek wytwarzania kwasów organicznych
- wydzielanie enzymów litycznych (np. chitynaza, proteazy)

Tabela 1. Szczepy drożdży wykorzystane w badaniach.

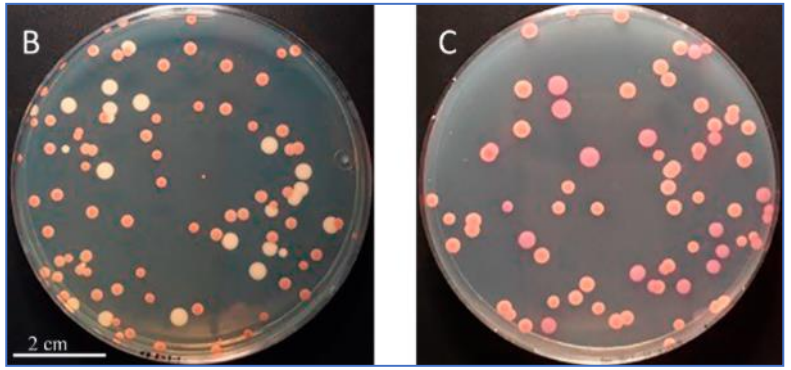
Szczep	Pochodzenie izolatu
Metschnikowia pulcherrima J2	Jabłko (owoc)
Metschnikowia pulcherrima J3	Jabłko (owoc)
Metschnikowia pulcherrima J6	Jabłko (owoc)
Metschnikowia pulcherrima TK1	Truskawka (kwiat)
Metschnikowia pulcherrima M4	Malina (owoc)

Pulcherrimina

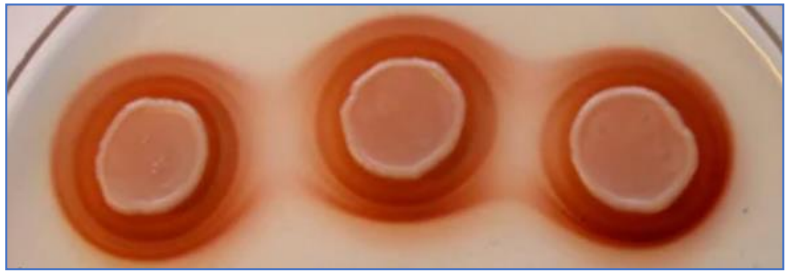
Kwas pulcherriminowy tworzy w środowisku zewnętrznym kompleks z jonami żelaza (III) o czerwonym zabarwieniu. Reakcja przebiega bez udziału enzymów.



kwas pulcherriminowy pulcherrimina



Żelazo to pierwiastek niezbędny do wzrostu mikroorganizmów, dlatego reakcja kompleksowania Fe, wyczerpująca jego dostępność w środowisku, to istotny element antagonizmu *Metshnikowia pulcherrima* w stosunku do grzybów.



Sipiczki, M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72, 6716–6724.

Fitopatogeny ziemniaka sadzeniaka

Fusarium oxysporum Z154*,
Fusarium sambucinum DSM 62397
Sucha zgnilizna bulw

Phoma exigua DSM 62040
Fomoza

Alternaria solani Z184*
Alternaria alternata ŁOCK 408,
Alternaria tenuissima DSM 63360
Alternarioza

Colletotrichum coccodes DSM 62126
Antraknoza

Rhizoctonia solani DSM 22843
Rizoktonioza

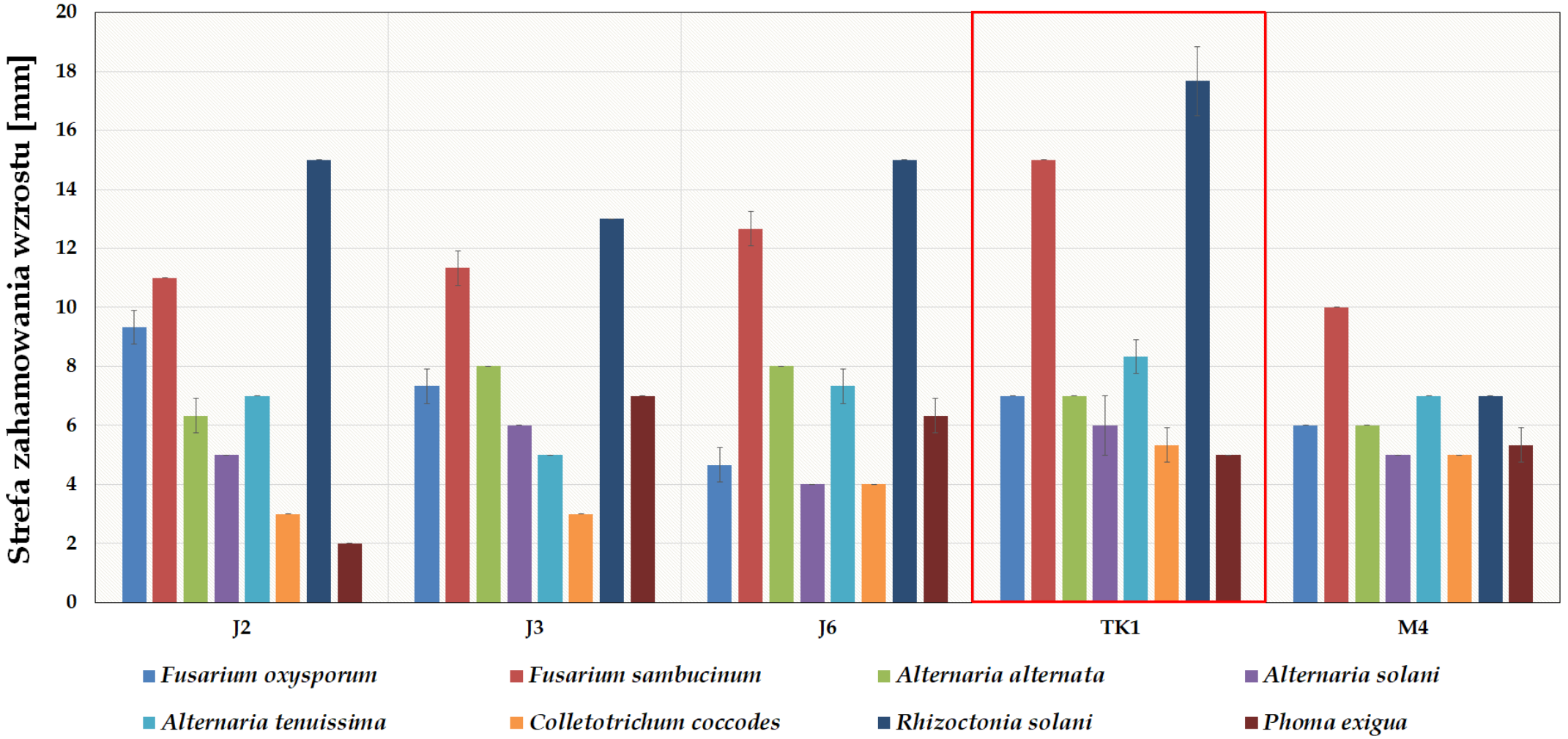
DSM – German Collection od Microorganisms and Cell Cultures GmbH; ŁOCK – Politechnika Łódzka, Kolekcja Czystych Kultur Instytutu Fermentacji i Mikrobiologii
* Izolaty pozyskane z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy

Metodyka badań

1. Ocena przeciwdrobnoustrojowych właściwości drożdży wobec fitopatogenów ziemniaka sadzeniaka: metoda agarowo-dyfuzyjna (studzienki): posiew zawiesiny fitopatogenów o gęstości 10^6 jtk/ml w 0,85% NaCl na podłoże PDA, ⌀ studzienki = 10 mm, objętość nanoszonej hodowli drożdży w YPG = 250 µl, inkubacja 2-7 dni w zależności od fitopatogenu w T = 25°C.
2. Ocena aktywności enzymatycznej: test API® ZYM.
3. Oznaczenie metabolitów metodą HPLC: analiza płynów po 72-godz hodowli drożdży w YPG w temp. 25°C.
4. Ocena produkcji pulcherriminy: posiew 10 µl zawiesiny drożdży w w 0,85% NaCl na podłoże YPG suplementowane różnymi stężeniami $FeCl_3$ (0,005; 0,01; 0,2 mg/ml), inkubacja przez 5 dni i ocena wizualna.
5. Testy aplikacyjne na sadzeniakach: zanurzenie naciętych sadzeniaków w hodowli drożdży w YPG i podłożu serwatkowym*, po wyschnięciu inokulacja 20 µl zawiesiny fitopatogenów o gęstości 10^6 jtk/ml w 0,85% NaCl, inkubacja przez 14 dni w T = 25°C i ocena porażenia w porównaniu do kontroli.

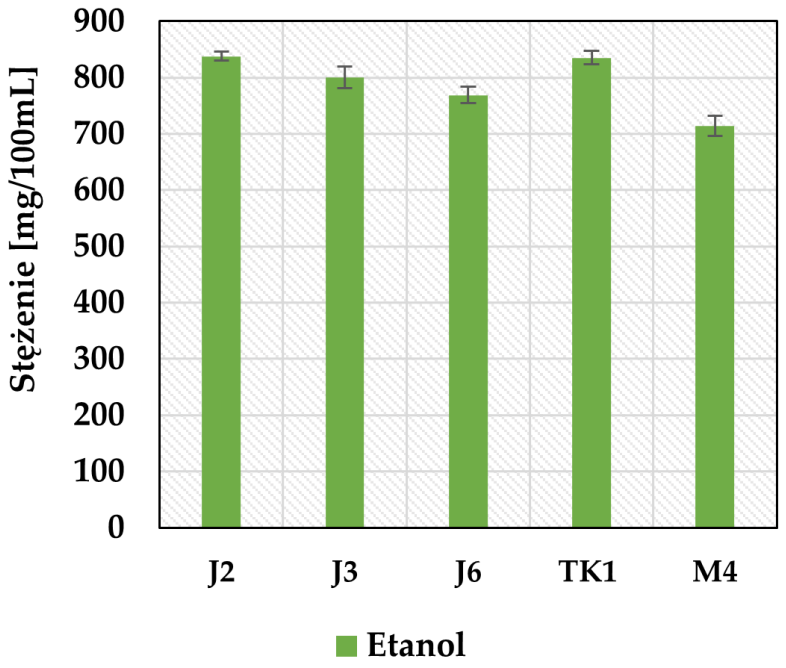
* serwatka + 0,25% ekstraktu drożdżowego + 0,5% peptobaku + 1% glukozy

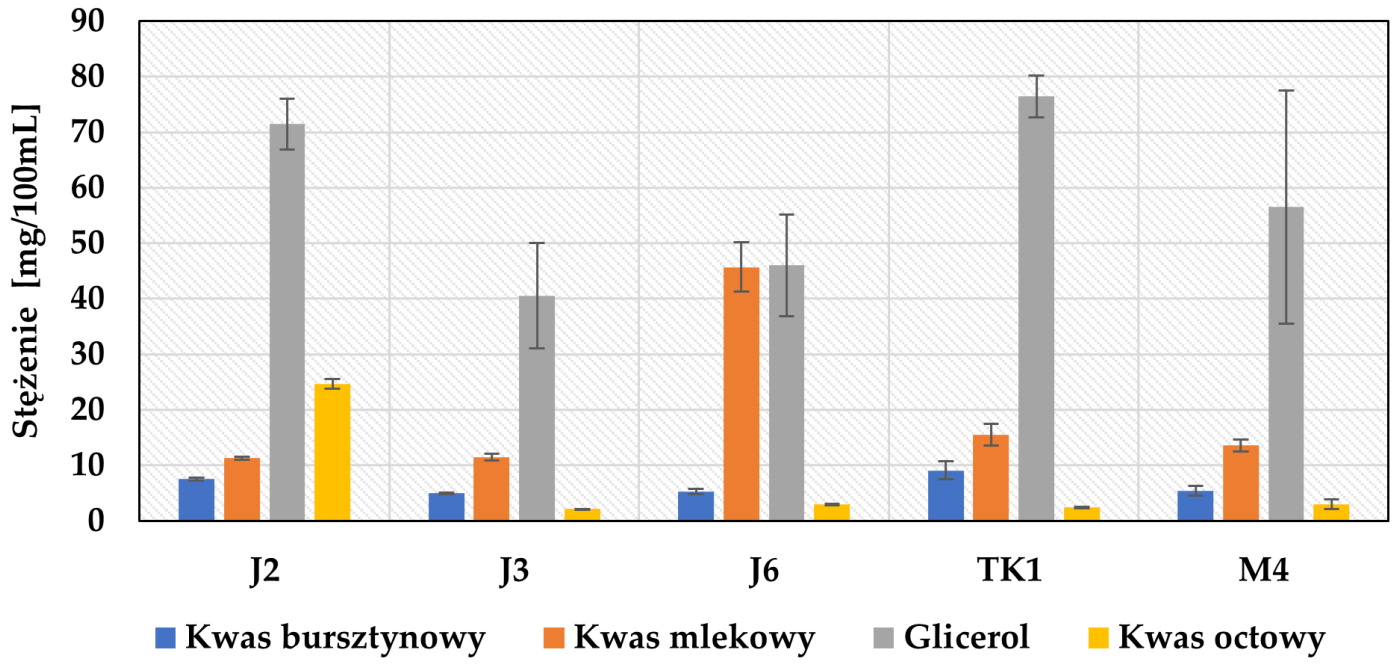
Aktywność przeciwdrobnoustrojowa drożdży *M. pulcherrima* w testach *in vitro*



Aktywność enzymatyczna drożdży *M. pulcherrima* (API® ZYM)

Metabolity drożdży *M. pulcherrima*

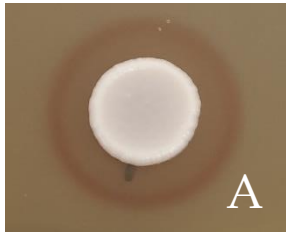


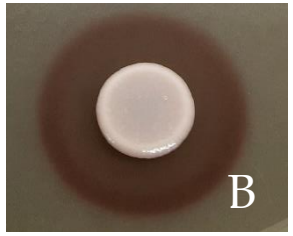


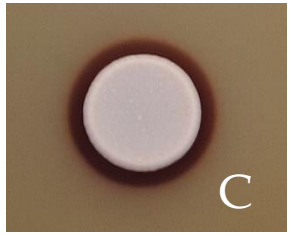
Metabolity oznaczono w 72-godz hodowli drożdży w podłożu YPG w 25˚C.

Wytwarzanie pulcherriminy przez szczepy *M. pulcherrima*

Suplementacja $FeCl_3$ [mg/mL]	Cechy wzrostu kolonii i wytwarzania pulcherriminy	Szczep				
		J2	J3	J6	TK1	M4
YPG bez suplementacji [A]	Kolor kolonii	biały	biały	biały	biały	biały
	Średnica „halo” [mm]	0.5	0.5	0.5	4.0	0.0
0,005 [B]	Kolor kolonii	biały	biały	biały	biały	biały
	Średnica „halo” [mm]	1.0	1.0	2.0	6.0	1.0
0,01 [C]	Kolor kolonii	biały	biały	biały	biały	biały
	Średnica „halo” [mm]	0.5	0.0	0.0	1.5	0.0
0,2 [D]	Kolor kolonii	czerwony	czerwony	czerwony	czerwony	czerwony
	Średnica „halo” [mm]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0







Wzrost szczepu *M. pulcherrima* TK1 na YPG suplementowanym różnymi stężeniami $FeCl_3$.

Testy aplikacyjne na sadzeniakach

Fitopatogeny	Redukcja stopnia porażenia sadzeniaków [%]	
	Suplementowane podłoże serwatkowe	YPG
Fusarium oxysporum	30±10	30±5
Fusarium sambucinum	100±0	80±10
Alternaria alternata	100±0	80±5
Alternaria solani	100±0	90±5
Alternaria tenuissima	100±0	95±5
Colletotrichum coccodes	100±0	100±0
Rhizoctonia solani	50±5	60±5
Phoma exigua	100±0	80±5

Próbka kontrolna – *A. solani*

Hodowla *M. pulcherrima* TK1 na podłożu serwatkowym – *A. solani*

Podsumowanie

- Szczep *M. pulcherrima* TK1 wykazał wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych grzybowych fitopatogenów ziemniaka sadzeniaka w testach *in vitro*.
- Szczep *M. pulcherrima* TK1 zahamował wzrost wszystkich 8 badanych fitopatogenów grzybowych w zakresie 30-100% w testach *in vivo*.
- Wybrany szczep *M. pulcherrima* TK1 może zostać wykorzystany do opracowania ekologicznego biopreparatu do ochrony ziemniaków sadzeniaków przed patogenami grzybowymi.

Dziękuję za uwagę

mgr inż. Aleksandra Steglińska

aleksandra.steglinska@dokt.p.lodz.pl

Badania wykonane w ramach projektu „Opracowanie strategii zapobiegania rozwojowi fitopatogenów ziemniaka sadzeniaka w oparciu o ekologiczne rozwiązania biotechnologiczne i nową metodę przechowywania” w ramach konkursu Działania 16. Współpraca objętego PROW 2014-2020 / Agencja Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa