

*Michał Starzycki, Eligia Starzycka*  
*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*  
*Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu*

## **Test grzybniowy do oceny odporności siewek rzepaku ozimego w stadium A na porażenie przez *Phoma lingam***

Sucha zgnilizna roślin kapustnych *Leptosphaeria maculans* (Desm), stadium konioidalne *Phoma lingam* (Tode) Desm. jest jedną z najgroźniejszych chorób występujących na rzepaku ozimym *Brassica napus* L. Istnieje duża potrzeba prowadzenia badań w zakresie hodowli odpornościowej na tego patogena. Jako główne kryterium patogeniczności *Phoma lingam* przyjmuje się agresywność wyizolowanych patotypów (Koch, Badawy 1989). Patogeniczność suchej zgnilizny roślin krzyżowych jest opisana przez wielu autorów (Delwiche, Williams 1979; Badaway, Hoppe 1989; Barbetti 1975, 1976; Bonman, Delwiche, Gabrielson 1984; Hammond-Kim, Lewis 1987; Hanacziwskyj, Drysdalale 1984; Custis, Xu Xiao Hua, Willtam 1984).

Prowadzone badania w IHAR – Poznań zmierzały do zoptymalizowania testu opartego na zakażeniu korzeni siewek za pomocą pożywki przerośniętej grzybnią. Proponowana metoda pozwoliła na preselekcjonowanie odporności na *Phoma lingam* znacznej liczby (ok. 40 tys.) siewek rzepaku ozimego w stadium A.

### **Materiały i metody**

---

Do badań użyto nasiona rzepaku ozimego pochodzące z hodowli poznańskiej. Przetestowano także odmiany *B. napus*: Mar, Polo, Leo i BOH-1491. W pracy wykorzystano 6 agresywnych patotypów *Phoma lingam* znajdujących się w kolekcji patogenów IHAR – Poznań (Starzycki, Starzycka 1992).

#### **Metoda grzybniowa**

Zasada prowadzenia testu grzybniowego była przedstawiona w publikacji pt. "Testowanie rzepaku ozimego na *Phoma lingam* stosując do inokulacji grzybnię patogena" (1991). Metodę tę ulepszono, co pozwala na testowanie równocześnie większej ilości roślin w stadium A.

Do prowadzenia testu stosowano następujący zestaw pożywek:

- pożywkę B5 – do kiełkowania nasion,
- pożywkę V8 – do rozwoju grzybni patogena.

Stosowana pożywka B5 wg Gamborga, zawierała tylko makro- i mikroelementy (żelazo w formie chelatowej). Po 4-krotnym rozcieńczeniu jej wodą destylowaną utwardzano ją za pomocą dodatku 1,1% agaru (Agar Agar SERVA high gel-strength). Tak przygotowaną pożywkę sterylizowano w kuchence mikrofalowej przez 10 minut (600 W/1 l).

Pożywka V8 zawierała 80 ml soku pomidorowego na 1 litr wody destylowanej i była utwardzana dodatkiem 1,5% agaru.

Pożywkę B5 rozlewano na 90 szalek Petriego po 44 ml na każdą szalkę, również pożywkę V8 rozlano na szalki w tej samej ilości.

### **Sterylizacja nasion**

Nasiona przesiewano przez sito celem wybrania frakcji o wyrównanej średnicy i sterylizowano w 96% etanolu przez 3 minuty. Następnie płukano je 3-krotnie sterylizowaną wodą destylowaną i suszono na bibule. W utwardzonej pożywce B5 znajdującej się w pojedynczej szalce Petriego wycinano 50 kanałów o średnicy 3 mm, w których umieszczano wysterylizowane nasiona rzepaku. W ciągu 4 dni siewki osiągały stadium A.

### **Przygotowanie patotypów *Phoma lingam***

Po pobraniu z kolekcji 6 agresywnych patotypów *Phoma lingam* (Starzycki, Starzycka 1992) rozmnażano je na pożywce V8. Po kilku dniach, kiedy strzępki grzyba przerosły pożywkę, wycinano z każdej paski o powierzchni 5 cm<sup>2</sup>, które umieszczano w strzykawce o pojemności 20 ml i wyciskano w celu rozdrobnienia grzybni i dokładnego jej wymieszania. Następnie na szalki z V8 наносzono tak sporządzone inokulum, które powodowało przerastanie całej powierzchni pożywki strzępkami grzybni w ciągu 4 dni. Na 4-dniową kulturę *Phoma lingam* nakładano pożywkę B5 z siewkami rzepaku w stadium A. Po 10 dniach dokonywano oceny odporności poszczególnych roślinek obserwując porażenie hypokotyła. Roślinki z najmniejszymi oznakami porażenia po odcięciu części korzeniowej umieszczano w kulturze hydroponicznej w celu powtórnego ukorzenienia.

### **Test hydroponiczny z mykotoksynami *Phoma lingam*.**

W kolbie o pojemności 1 litra z płynną pożywką V8 umieszczano krążek agarowy przerośnięty 5-dniową grzybnią agresywnej formy *P. lingam*. Kulturę prowadzono w warunkach pokojowych z jednogodzinnym wytrząsaniem w ciągu doby. Po 30 dniach, kiedy powstające w płynnej pożywce mykotoksyny wstrzymały rozwój grzybni patogena, sterylną strzykawką pobierano klarowny płyn, wolny od strzępek grzyba i rozlewano go na płytki Petriego. W tak przygotowanym roztworze inokulum umieszczano hypokotyle roślinek wyselekcjonowanych metodą grzybniową, tak odpornych

jak i nieodpornych. Po 7 dniach obserwowano normalny rozwój odpornych roślin rzepaku. Na formach nieodpornych początkowo hypokotyle, a następnie liścienie ulegały odbarwieniu i maceracji. Metoda ta została opracowana w IHAR – Poznań (niepublikowane). W celu potwierdzenia wyników testu grzybniowego wybrane rośliny rzepaku poddano również badaniom za pomocą testu Williams'a (Delwiche, Williams 1979).

## Wyniki

Przeprowadzono udany eksperyment stosując do inokulacji korzeni rzepaku ozimego mieszaninę agresywnych patotypów i porównano efekt po inokulacji z pojedynczym agresywnym patotypem.

Po zastosowaniu do obliczeń testu t–Studenta stwierdzono istotne zróżnicowanie w przebiegu infekcji pomiędzy pojedynczym patotypem użytym do inokulacji, a mieszaniną wybranych agresywnych patotypów. Mieszanina patotypów *Phoma lingam* powodowała silniejsze porażenie roślin (tabela 1). Aby potwierdzić większą odporność roślin rzepaku w stadium A na *Phoma lingam* testowanych metodą grzybniową, testowano je powtórnie testem hydroponicznym (tabela 2) uzyskując wysoko zgodne wyniki i testem Williams'a (tabela 3).

**Tabela 1.** Porównanie udziału odpornych roślin oznaczanych metodą grzybniową u trzech odmian rzepaku ozimego, po inokulacji mieszaniną 6 agresywnych patotypów *Phoma lingam* (a) oraz agresywnym patotypem nr 17 (b)

Odmiana	Leo		Polo		Mar	
	a	b	a	b	a	b
Liczba roślin obserwowanych	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Liczba roślin odpornych	24	74	33	91	41	157

a – mieszanina patotypów, b – patotyp nr 17.

**Tabela 2.** Wyniki testu hydroponicznego z mykotoksynami *P. lingam* – test potwierdzający odporność siewek rzepaku ozimego wybranych na podstawie testu grzybniowego.

	Siewki odporne	Siewki nieodporne
Liczba roślin obserwowanych	15	30
Liczba roślin odpornych	15	0
Liczba roślin nieodpornych	0	30

**Tabela 3.** Wyniki badania odporności na *Phoma lingam* za pomocą testu Williams'a na roślinach odpornych i nieodpornych wyselekcjonowanych za pomocą testu grzybniewego

Rośliny odporne		Rośliny nieodporne	
Nr rośliny	Porażenie w skali 1–9	Nr rośliny	Porażenie w skali 1–9
1	3, 3, 3, 3	1	4, 4, 5, 5
2	3, 3, 3, 3	2	6, 4, 6, 5
3	3, 3, 4, 3	3	6, 6, 6, 6
4	3, 2, 3, 2	4	6, 6, 7, 7
5	4, 4, 2, 3	5	9, 9, 9, 9
6	3, 3, 4, 4	6	4, 4, 6, 4
7	5, 5, 4, 3	7	6, 6, 4, 6
8	2, 3, 5, 2	8	7, 7, 7, 7
9	4, 3	9	6, 6, 4, 4
10	2, 2, 2, 2	10	2, 3, 4, 4
11	2, 2, 2, 2	11	7, 7, 4, 3
12	4, 4	12	7, 7, 2, 2
13	4, 4, 4, 4	13	3, 3, 5, 3
14	5, 5, 3, 3	14	5, 5, 4, 4
15	3, 3, 2, 2	15	2, 2, 3, 3

1 – rośliny zdrowe, 9 – rośliny maksymalnie porażone.

## Wnioski

- Metoda grzybniewa pozwala na przetestowanie dużej ilości roślin rzepaku w stadium A.
- Uzyskano dużą zgodność wyników testu grzybniewego z wynikami testu Williams'a i testu hydroponicznego z mykotoksynami *Phoma lingam*.
- Stwierdzono w teście grzybniewym istotnie silniejsze porażenie hypocotyli przy zastosowaniu mieszaniny patotypów (tab. 1).

---

**Literatura**

---

- Delwiche P. A. 1979. Screening for resistance to blackleg of crucifers in the seedling stage. *Cruciferae Newsletter* 4.
- Badawy H. M. A., Hoppe H. H. 1989. Nonspecific phytotoxic effect of sirodesmins on host and non host plants of *L. maculans*. *J. Phyt.* 127: 137-145.
- Barbetti M. J. 1975. Late blackleg infection in rape are important. *Aut. plant patho. Society. Newsletter* 4 (1).
- Bonman J. M., Delwiche P. A., Gabrielson R. L., Williams P. H. 1981. Virulence of *Phoma lingam* to cabbage. *Plant disease* 65/119: 865-867.
- Hammond-Kim E., Lewis B. G. 1987. Variation in stem infection caused by aggressive isolates of *L. maculans* on *B. napus* var. *oleifera*. *Plant Path.* 36: 53-65.
- Hanacziwskyj B., Drysdalaie R. B. 1984. Cultural and biochemical characterisation of isolates of *L. maculans* varying in pathogenicity.
- Koch E., Badawy H. M. A., Hoppe H. H. 1989. Differences Between Aggressive and Non-Aggressive Single Spore Lines of *Leptosphaeria maculans* in Cultivar Characteristics and Phytoxin Production. *Phytopatology* 124: 52-62.
- Hill Custis B., Xu Xiao Hua, Willtam P. H. 1984. Correlation of virulence crown rate pigment production and allozyme banding patterns which differentiate virulent and avirulent isolates of *L. maculans*. *Eucarpia. Cruciferae Newsletter* 9.
- Starzycki M., Brun H. 1991. Testowanie roślin rzepaku ozimego na *Phoma lingam* stosując do inokulacji grzybnie patogena. *Zeszyty problemowe IHAR. Wyniki badań nad rzepakiem ozimym*. 119-123.
- Starzycki M., Starzycka E. 1992. Rozdzielanie agresywnych i nieagresywnych patotypów *Phoma lingam* przy zastosowaniu inokulacji dobranego zestawu linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego. *Zeszyty problemowe IHAR. Wyniki badań nad rzepakiem ozimym*. 216-219.

---

## The mycelium test for evaluation of resistance of young winter rapeseed plants in A-stage to *Phoma lingam*

---

### Summary

The former work revealed differences in pathogenity among pathotypes of *Phoma lingam* (Tode) Desm. The presented test is conducted on young germ-free plants grown on agar medium in closely contact with fresh mycelium of the pathogen. After 2 weeks necrosis on hypocotyls and death of sensitive plants are observed. A great advantage of this method is the possibility to use the most resistant plants in breeding programmes. It is possible by cutting the part of pathogen-free hypocotyl and its regeneration in hydroponic culture. There were observed significant differences in infection by single aggressive pathotype and the mixture of several aggressive pathotypes. The mixture caused much stronger infection of plants. This test is conformable to Williams test and to hydroponic test made on solution of mycotoxins.