

Eligia Starzycka, Michał Starzycki, Jan Pszczola, Katarzyna Mikołajczyk
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Stopień odporności hodowlanych rodów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) na zgniliznę twardzikową w 1999 roku oraz badania patogena *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

Stem rot resistance degree of winter oilseed rape strains (*Brassica napus* L.) in 1999 and investigations on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. pathotypes

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, odporność rodów, DNA patotypów *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

Key words: winter rape, strains resistance, DNA *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary., pathotypes

Zgnilizna twardzikowa powodowana przez grzyb *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. jest jedną z groźniejszych chorób rzepaku (*B. napus*). Patogen ten powoduje znaczne obniżenie plonu nasion. Prace badawcze poświęcone temu zagadnieniu najczęściej obejmują hodowlę odpornościową rzepaku i badania nad patogenem. Na polu prowokacyjnym w 1999 roku, w ZDHAR Borowo wykonano doświadczenie odpornościowe na *S. sclerotiorum* z udziałem 78 najlepiej plonujących rodów hodowlanych z doświadczeń wstępnych. Inokulowano 1560 roślin metodą pineżkową, opracowaną w Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej IHAR w Poznaniu. Otrzymane wyniki mają charakter aplikacyjny, informując o najodporniejszych rodach rzepaku (PNG 2170, MA 1615-1, MZL 236, BK 2466/93, MA 1649-1) i najsilniej porażanych (MA 0742-2, PN 610z/98, MZL 189, MZL 201, PN 9011AB/97). W zakresie badań nad zróżnicowaniem populacji *S. sclerotiorum* wykonano analizy DNA RAPD przy użyciu 10 starterów OPW. Wstępnie otrzymane wyniki wskazują na mały polimorfizm pomiędzy badanymi patotypami.

Stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. pathotypes is one of the most dangerous diseases of rapeseed. This pathogen causes a major decrease of seed yield. Many research works had been done on the investigation on the pathogen as well as resistance breeding. In 1999 the field was conducted on the infection field in Plant Breeding and Acclimatization Station Borowo. The resistance to *S. sclerotiorum* of the 78 top yielding breeding strains was tested. 1550 plants were inoculated by "pin-up" method. This method had been elaborated in The Laboratory of Resistance Breeding Method of Plant Breeding and Acclimatization Institute in Poznań. The results of the field test were able to recognize the most resistant (PNG 2170, MA 1615-1, MZL 236, BK 2466/93, MA 1649-1) and the most susceptible strains (MA 0742-2, PN 610z/98, MZL 189, MZL 201, PN 9011AB/97). Investigations of differentiation of *S. sclerotiorum* population were done by RAPD method of DNA analysis. Obtained results showed small polymorphism among the tested pathotypes.

Wstęp

Grzyb *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. poraża corocznie wiele gatunków roślin uprawnych, w tym rzepak oraz różne gatunki chwastów (Kim i Diers 2000, Dickson i Petzoldt 1994). Literatura dotycząca zgnilizny twardzikowej rzepaku jest bardzo obszerna zarówno w kraju, jak i za granicą (Starzycka i Starzycki 1994, Philips i Raymer 1995, Turner i Hardwick 1995, Devies 1995, Hu 1995, Luth i Eiben 1995). W sprzyjających dla rozwoju grzyba latach nasilenie choroby na plantacjach wzrasta, co bezpośrednio wpływa na obniżenie plonu nasion (Sansford 1995). Aby straty związane z atakiem *S. sclerotiorum* na rośliny były jak najmniejsze należy równolegle prowadzić hodowlę odpornościową rzepaku opartą na atestacji nowo kreowanych odmian oraz badać patogena (Godoy i in. 1990, Starzycka i Starzycki 1998, Page i in. 1997, Ziman i in. 1998). W pierwszej części pracy porównano odporność hodowlanych rodów rzepaku ozimego z doświadczeń wstępnych na *S. sclerotiorum*, w drugiej przedstawiono badania przypuszczalnego polimorfizmu DNA różnych patotypów grzyba.

Material i metody

W celu atestacji zdrowotności roślin rzepaku na *S. sclerotiorum* w warunkach polowych wykorzystano najskuteczniejszą metodę (pinezkową) opracowaną w Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej Oddziału Poznańskiego IHAR. Grzybnię patogena *S. sclerotiorum* wyszczepiono na pożywcę V₂. Po czterech dniach inkubacji grzybni nakładano na nią wysterylizowane w autoklawie ziarniki żyta (około 100 sztuk), które w ciągu trzech dni silnie przerastały strzępkami *S. sclerotiorum*. Tak przygotowane inokulum umieszczano na pinezce, również wysterylizowanej, którą podczas inokulacji wkłuwano w roślinę. Miejsce zranienia zabezpieczano paskiem folii aluminiowej. Siedemdziesiąt osiem rodów rzepaku ozimego z doświadczeń wstępnych poddano atestacji powyższym testem. Atestację wykonano w warunkach pola infekcyjnego w ZDHAR Borowo (obecnie Spółka Nasienna Strzelce). Ogółem inokulowano 1560 roślin, po 20 z każdego rodu. Odczytu długości plamy infekcyjnej zakażanych roślin dokonano w dwóch terminach: 14 dni po inokulacji i 46 dni po inokulacji. Wyniki odporności rzepaku na zgniliznę twardzikową opracowano statystycznie przy użyciu analizy wariancji.

W celu stwierdzenia ewentualnego polimorfizmu pomiędzy DNA szesnastu badanych patotypów *S. sclerotiorum* (populacja z Borowa), wykonano analizy PCR RAPD przy użyciu 10 starterów (dziesięcio-nukleotydowych) firmy Operon Technologies, oznaczonych: OPW-02, OPW-04, POW-06, OPW-07, OPW-09, OPW-11, OPW-12, OPW-15, OPW-16, OPW-17. Izolację DNA wykonano według zmodyfikowanej metody Doyle i Doyle (1990), a analizę RAPD według metody Williams'a i in. (1990).

Wyniki

Długości plam infekcyjnych po zakażeniu rzepaku zostały przedstawione w tabeli 1. Odczyty wykonane w pierwszym terminie (14 dni po inokulacji) w sposób jednoznaczny były zróżnicowane w stosunku do wartości odczytanych później. Przedstawione wyniki obliczone za pomocą analizy wariancji wskazały na istotne zróżnicowanie odporności badanych rodów rzepaku na zgniliznę twardzikową.

Niniejsza praca ma charakter aplikacyjny informując o najodporniejszych rodach rzepaku (PNG 2170, MA 1615-1, MZL 236, BK 2466/93, MA 1649-1) i najsilniej porażanych (MA 0742-2, PN 610z/98, MZL 189, MZL 201, PN 9011AB/97).

Tabela 1
Wyniki testu odpornościowego rodów rzepaku z doświadczeń wstępnych na *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. (ZDHAR Borowo 1999) — *Results of the test oilseed rape strains resistance to Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary. (ZDHAR Borowo 1999)*

Odczyt długości plamy infekcyjnej — <i>Length of infection blot</i>							
27.05.1999				28.06.1999			
14 dni od inokulacji — <i>14 days after inoculation</i>				46 dni od inokulacji — <i>46 days after inoculation</i>			
Lp. No	Ród Line	długość plamy infekcyjnej infection blot	% wzorca % pattern	Lp. No	Ród Line	długość plamy infekcyjnej infection blot	% wzorca % pattern
1	MZL 236	2,70	51,1	1	PNG 2170	16,78	67,3
2	PNG 2170	3,13	59,1	2	MA 1615 -1	16,92	67,9
3	MZL 183	3,73	70,5	3	MZL 236	19,35	77,6
4	BK 2069/95	3,73	70,5	4	BK 2466/93	19,95	80,1
5	PN 3476/B/97	3,80	71,9	5	MA 1649-1	20,00	80,3
6	MA 1649-1	3,85	72,8	6	MA 0741-5	20,12	80,7
7	MA 1615-1	3,98	75,2	7	MZL 191	21,53	86,4
8	MZL 191	4,13	78,0	8	G 304/2B/97	21,55	86,5
9	MZL 246	4,20	79,5	9	BK 2069/95	21,90	87,9
10	MZL 220	4,23	79,9	10	MZL 220	21,95	88,1
11	Kana	4,38	82,8	11	LA 1680/92	22,05	88,5
12	MA 1647-1	4,38	82,8	12	BK 1905/95	22,13	88,8
13	MZL 190	4,45	84,2	13	MZL 183	22,33	89,6
14	G 304/2B/97	4,47	84,7	14	PN 4287/LB/97	22,68	91,0
15	BK 2466/93	4,48	84,7	15	PN 7046/97	22,78	91,4
16	MA 1634-1	4,60	87,0	16	BK 3422/97	22,83	91,6
17	BK 3422/97	4,70	88,9	17	MA 0181/4Z	22,85	91,7
18	BK 2521/95	4,73	89,4	18	BK 2070/p/96	23,08	92,6
19	MZL 203	4,75	89,9	19	PN 3476/B/97	23,10	92,7
20	MZL 178	4,78	90,3	20	MZL 246	23,13	92,8
21	MA 0181/4Z	4,80	90,8	21	BK 5776/92	23,30	93,5
22	MZL 234	4,80	90,8	22	BK 5808/92	23,45	94,1
23	MZL 198	4,85	91,7	23	BK 2055/p/96	23,50	94,3
24	MA 1562-1	4,88	92,2	24	MZL 203	23,53	94,4
25	MA 1652-1	4,88	92,2	25	MZL 198	23,63	94,8
26	MZL 193	4,93	93,2	26	MZL 190	23,63	94,8
27	BK 2055/p/96	5,03	95,1	27	MA 1559-1	23,68	95,0

ciąg dalszy tabeli 1

28	MZL 212	5,10	96,5	28	BK 5888/92	23,72	95,2
29	MZL 211	5,10	96,5	29	PNG 2187	23,80	95,5
30	PN 7046/97	5,13	97,0	30	MZL 193	23,80	95,5
31	MA 1593-2	5,15	97,4	31	PN 9236/95	23,88	95,8
32	BK 5808/92	5,15	97,4	32	MA 0741-7Z	24,00	96,3
33	BK 2070/p/96	5,18	97,9	33	MZL 211	24,05	96,5
34	MZL 225	5,23	98,8	34	Kana	24,30	97,5
35	BK 1905/95	5,28	99,8	35	MZL 204	24,38	97,8
36	MA 1624-1	5,33	100,7	36	MA 1634-1	24,47	98,2
37	BK 5888/92	5,35	101,2	37	MA 1562-1	24,63	98,8
38	LA 1680/92	5,35	101,2	38	MA 1647-1	24,90	99,9
39	MA 0181-7	5,35	101,2	39	MZL 195	24,93	100,0
40	MA 0181-3	5,38	101,7	40	BK 2521/95	24,98	100,2
41	MA 1513-3	5,38	101,7	41	PN 7479/97	25,20	101,1
42	MZL 202	5,40	102,2	42	PN 9256/95	25,23	101,2
43	PN 9236/95	5,43	102,6	43	MA 1593-2	25,23	101,2
44	MA 1559-1	5,48	103,6	44	MA 1652-1	25,28	101,4
45	MZL229	5,50	104,0	45	MA 0181-7	25,30	101,5
46	PN 7482/97	5,52	104,5	46	BK 7351/93	25,35	101,7
47	MZL 188	5,55	105,0	47	MZL 237	25,43	102,0
48	MZL 192	5,58	105,5	48	MA 1513-3	25,68	103,0
49	MA 0741-7Z	5,60	105,9	49	MZL 192	25,98	104,2
50	MA 1513-2Z	5,60	105,9	50	MA 1513-2Z	26,20	105,1
51	PN 4287/LB/97	5,63	106,4	51	MA 1624-1	26,25	105,3
52	MZL 195	5,65	106,9	52	MA 1498-2	26,33	105,6
53	PN 9256/95	5,68	107,4	53	MA 1439-2Z	26,35	105,7
54	BK 5776/92	5,68	107,4	54	MZL 210	26,58	106,6
55	MZL 237	5,70	107,8	55	MZL 160	26,68	107,0
56	MZL 204	5,73	108,3	56	MZL188	26,72	107,2
57	MA 1500-1Z	5,75	108,8	57	MZL 178	26,75	107,3
58	MA 0741-5	5,75	108,8	58	MA 0181-3	26,75	107,3
59	MZL 210	5,80	109,7	59	PN 2907/LB/97	26,93	108,0
60	PNG 2187	5,83	110,2	60	MZL 229	27,00	108,3
61	BK 7351/93	5,95	112,6	61	MZL225	27,03	108,4
62	PN 34z/98	6,05	114,4	62	MZL 212	27,43	110,0
63	PN 2907/LB/97	6,08	114,9	63	BK 5820/92	27,53	110,4
64	BK 7297/93	6,08	114,9	64	MZL 202	27,63	110,8
65	MA 0742-2	6,18	116,8	65	MZL 234	27,65	110,9
66	MA 0917-1	6,20	117,3	66	BK 3594/92	27,73	111,2
67	MZL 160	6,23	117,8	67	PN 34z/98	27,75	111,3
68	PN 7479/97	6,30	119,2	68	MA 1500-1Z	27,85	111,8
69	PN 9011/AB/97	6,38	120,6	69	PN 581z/98	28,00	112,4
70	PN 581z/98	6,38	120,6	70	PN 7482/97	28,08	112,7
71	MZL 189	6,40	121,1	71	BK 7297/93	28,43	114,1
72	BK 5820/92	6,40	121,1	72	MA 0181/6Z	28,73	115,3
73	MA 1498-2	6,55	123,9	73	MA 0917-1	28,90	116,0
74	MA 1439-2Z	6,63	125,3	74	PN 9011/AB/97	29,22	117,3
75	PN 610z/98	6,65	125,8	75	MZL 201	29,30	117,6
76	BK 3594/92	6,70	126,7	76	MZL 189	30,87	123,9
77	MZL 201	6,75	127,7	77	PN 610z/98	31,47	126,3
78	MA 0181/6Z	6,90	130,5	78	MA 0742-2	31,65	127,0

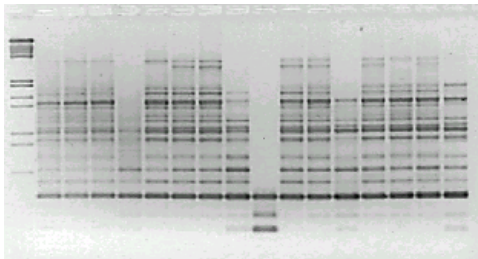
F obl. = 1,578703**

NIR 0,05 = 6,50

NIR 0,01 = 8,57

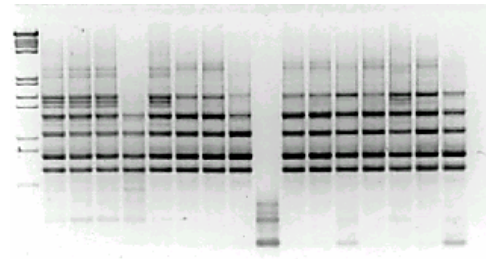
Populacja grzyba *S. sclerotiorum* analizowana metodą PCR-RAPD była mało zróżnicowana pod względem genetycznym, ponieważ amplifikowane fragmenty DNA różnych patotypów w większości przypadków posiadały swój odpowiednik w każdej analizowanej próbie. Wyniki (dla 15 patotypów z analizowanych 16) zostały przedstawione na zdjęciach żeli agarozowych rozdziału fragmentów amplifikowanego DNA (rys. 1).

wz 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

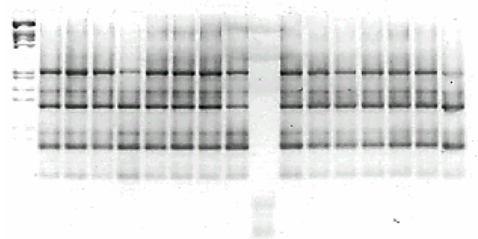


1. OPW-02

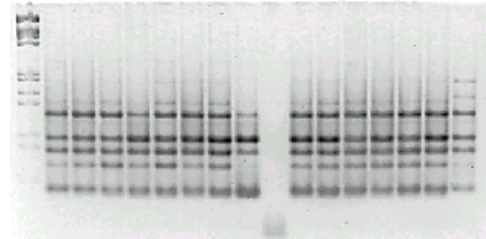
wz 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



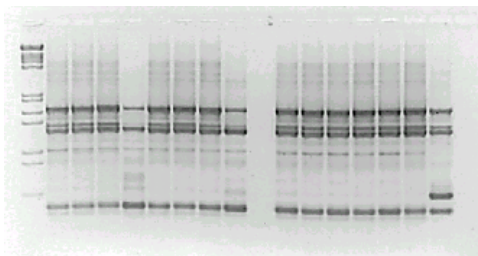
2. OPW-04



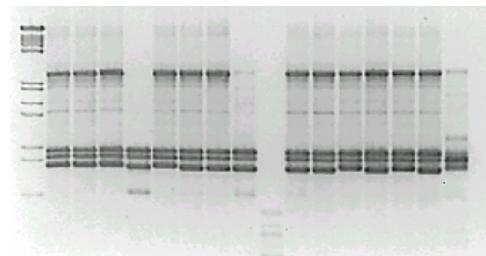
3. OPW-06



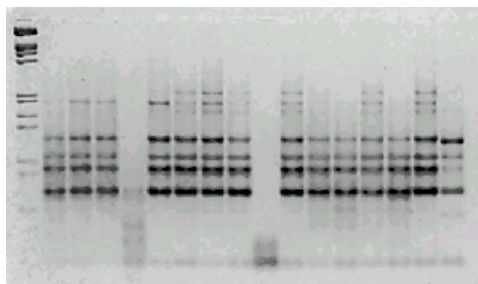
4. OPW-07



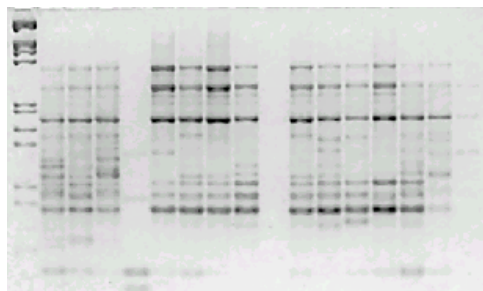
5. OPW-09



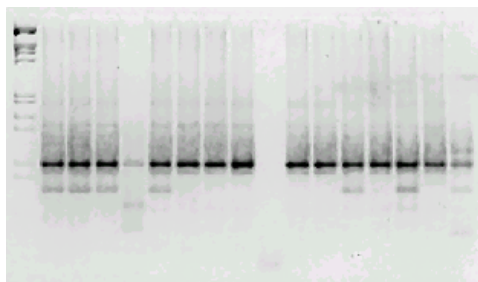
6. OPW-11



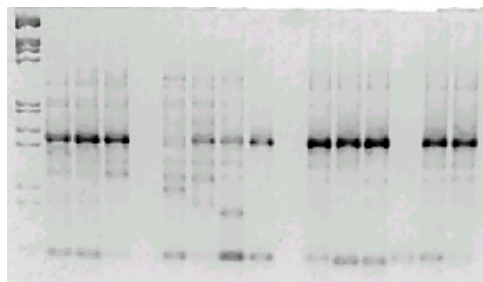
7. OPW-12



8. OPW-15



9. OPW-16



10. OPW-17

Rys. 1. Analiza DNA szesnastu patotypów *S. sclerotiorum*. Elektroforetyczny rozdział, na 1,8% żelu agarozowym, produktów reakcji PCR/RAPD z zastosowaniem starterów: 1. OPW-02, 2. OPW-04, 3. OPW-06, 4. OPW-07, 5. OPW-09, 6. OPW-11, 7. OPW-12, 8. OPW-15, 9. OPW-16, 10. OPW-17. DNA analysis of 16 pathotypes of *S. sclerotiorum*. Electrophoretic distribution (on 1,8% agarosa gel) of products PCR/RAPD reaction with the next primers: 1. OPW-02, 2. OPW-04, 3. OPW-06, 4. OPW-07, 5. OPW-09, 6. OPW-11, 7. OPW-12, 8. OPW-15, 9. OPW-16, 10. OPW-17.

Dyskusja

Dotychczasowe badania krajowe, jak i zagraniczne w zakresie poznania patogena *S. sclerotiorum* wskazują na dużą jego szkodliwość (Sansford 1995, Starzycka i in. 1998, Li i in. 1998, Li i in. 2000). Podstawową trudnością w walce z grzybem jest brak w całej roślinie równomiernie funkcjonujących mechanizmów odporności, ponieważ młodsze tkanki roślin szybciej ulegają porażeniu niż starsze (Starzycka i Starzycki 1994). Z tego powodu po wielu uprzednio wykonanych eksperymentach do inokulacji wybierano miejsce typowe dla naturalnego zakażenia, tj. 5–10 cm powyżej połowy kwitnącej rośliny. Dlatego w naszej pracy wszystkie testowane rośliny rzepaku były inokulowane w podanym miejscu. Po przeanalizowaniu wyników stwierdzono, że praktycznie większe znaczenie w odszukaniu form odpornych rzepaku może mieć drugi termin odczytu (46 dni po

inokulacji), ponieważ długość plamy infekcyjnej na łodydze jest silnie skorelowana z plonowaniem, co odnotowano wcześniej (Starzycka i in. 1998).

Małe zróżnicowanie genetyczne populacji (15 patotypów na badanych 16) grzyba ujawnione na podstawie wstępnych analizy DNA RAPD było prawdopodobnie spowodowane izolacją przestrzenną i wyborem patotypów *S. sclerotiorum* z jednej miejscowości (Borowo). Obecnie wiadomo, że patogen *S. sclerotiorum* wytwarza dwa rodzaje patotypów: posiadające zdolność wytwarzania kwasu szczawowego jako mikotoksyny (patotypy bardziej agresywne) oraz patotypy nie mające tej zdolności (mniej agresywne). Jednak w analizowanej przez nas populacji nie wykonano analiz tych mikotoksyn. Aby dać odpowiedź do jakiej grupy należą analizowane patotypy, w przyszłości oprócz uzupełnienia nieudanych amplifikacji DNA (patotyp 9), każdorazowo trzeba będzie kontrolować chemicznie obecność grup szczawianowych w pochodzonym filtracie grzyba *S. sclerotiorum*.

Wnioski

- Zastosowana metoda pinezkowa inokulacji grzybem *S. sclerotiorum* pozwala w sposób pośredni (mierząc długość plamy infekcyjnej) ocenić odporność badaniach rodów rzepaku na zgniliznę twardzikową.
- Otrzymane wyniki mają charakter aplikacyjny, informując o najodporniejszych nowo kreowanych przez hodowców rodach rzepaku.
- Wstępnie wykonane analizy PCR-RAPD miejscowej populacji borowskiej grzyba *S. sclerotiorum* wykazały mały jej polimorfizm.

Literatura

- Davies J.M.L. 1995. Petal culturing to forecast *Sclerotinia* winter oilseed rape. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK 4-7 July 1995, 3: 1010-1011.
- Dickson M.H., Petzoldt R. 1994. White mold or *Sclerotinia* resistance in *B. oleracea*. Ninth Crucifer Genetics Workshop, ISHS Symposium on Brassicas, 15-19 November 1994, Lisbon, Portugal: 41.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. Focus, 12: 13-15.
- Godoy G., Steadman J.R., Dickman M.B., Dam R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. Physiological and Molecular Plant Pathology 37: 179-191.
- Hu B.C. 1995. Stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) tolerance and disease avoidance in CMS lines of *Brassica napus*. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 4: 1211-1213.
- Kim H.S., Diers B.W. 2000. Inheritance of Partial Resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean, Crop Science, vol. 40, Nr 1: 55-61.

- Kohn L.M., Stasovski E., Carbone I., Royer J., Anderson J.B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 81: 480-485.
- Li Guoqing, Wang Daoben, Jiang Daohong, Huang Hongzhang, Zhou Qi, 1998. A new kind of lettuce drop caused by *Sclerotinia* sp. in central China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 28 (3): 249-255.
- Li Guoqing, Wang Daoben, Huang Hongzhang, Zhou Qi, 1996. Polymorphisms of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from eggplant in Jiamusi, Heilongjiang province. *Acta Phytopathologica Sinica*, ib (3): 237-241.
- Luth P., Eiben U. 1995. First results in the development of biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*, The disease-causing agent of stem rot in oilseed rape. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 4: 1275-1277.
- Page D., Delclos B., Aubert G., Bonavent J.F., Mousset-Declas C. 1997. *Sclerotinia* rot resistance in red clover: Identification of RAPD markers using bulked segregant analysis. *Plant Breeding*, 116: 73-78.
- Philips D.V., Raymer P.L. 1995. The relationship between time of development of apothecia and appearance of symptoms of *Sclerotinia sclerotiorum* stem rot in the southeastern USA. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 2: 637-639.
- Sansford C.E. 1995. Oilseed rape development of stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) and its effect on yield. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 2: 634-636.
- Starzycka E., Starzycki M. 1994. Badanie podatności pędów i liści rzepaku ozimego na porażenie przez *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rośliny Oleiste*, XV: 83-85.
- Starzycka E., Starzycki M. 1997. Nowa metoda inokulacji roślin rzepaku ozimego patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Rośliny Oleiste*, XVIII: 315-320.
- Starzycka E., Starzycki M., Cichy H., Mikołajczyk K. 1998. Badanie odporności rzepaku ozimego na porażenie przez *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Rośliny Oleiste*, XIX: 493-500.
- Turner J.A., Hardwick N.V. 1995. The rise and fall of *Sclerotinia sclerotiorum*, the cause of stem rot of oilseed rape in the UK. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 2: 640-642.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.
- Ziman L., Jędryczka M., Srobarova A. 1998. Relationship between morphological and biochemical characters of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates and their aggressiveness. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105 (3): 283-288.