

**METODYKI TESTOWANIA ODPORNOŚCI
KAPUSTY GŁOWIASTEJ BIAŁEJ I PEKIŃSKIEJ ORAZ KALAFIORA NA CZERŃ
KRZYŻOWYCH, POMIDORA NA ALTERNARIOZĘ I OGÓRKA NA BAKTERYJNĄ
KANCIASTĄ PLAMISTOŚĆ OGÓRKA**

Autorzy:

Dr Marzena Nowakowska

Dr Urszula Kłosińska

Dr Piotr Kamiński

Opracowanie redakcyjne: prof. dr hab. Elżbieta U. Kozik

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 6.8:**

„Opracowanie metod oceny i selekcji roślin oraz wyodrębnienie źródeł odporności na najważniejsze patogeny roślin warzywnych”

Programu Wieloletniego:

„Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodniczej w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodniczych oraz zachowania bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów”
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2014

Spis treści:

1. Metodyka testowania odporności kapusty głowiastej i pekińskiej oraz kalafiora na czerń krzyżowych.....	3
2. Metodyka testowania odporności pomidora na alternariozę.....	5
3. Metodyka testowania odporności ogórka na bakteryjną kanciastą plamistość.....	6

Metodyka testowania odporności kapusty głowiastej białej i kapusty pekińskiej oraz kalafiora na czerń krzyżowych

Patogen

Alternaria brassicicola (Schw.) Wiltsh.

Utrzymywanie kultur

Długoterminowe utrzymywanie kultur grzyba w 20% glicerolu w temperaturze -80°C.

Przygotowanie inokulum

- Namnożenie kultur *A. brassicicola* na pożywce PDA lub V 8 w temperaturze 25 °C przy świetle fluorocencyjnym z 12-godzinnym fotoperiodem.
- Po 7-10 dniach zalanie kultury grzyba niewielką ilością sterylnej wody.
- Delikatne ścieranie pędzelkiem zarodników konidialnych.
- Filtrowanie uzyskanej zawiesiny przez kilka warstw gazy, celem usunięcia pozostałości strzępek grzybni.
- Kalibracja stężenia zarodników w zawieszynie do 1×10^5 zarodników $\cdot \text{ml}^{-1}$ wodą destylowaną z dodatkiem 0,1% roztworu agaru.

Rośliny żywicielskie

Brassica oleracea var. *capitata alba* – kapusta głowiasta biała

Brassica rapa subsp. *pekinensis* – kapusta pekińska

Brassica oleracea var. *botrytis* - kalafior

Linie/odmiany referencyjne

Odporne Inicznik siewny (*Camelina sativa*)
 gorczyca biała (*Sinapsis alba*)

Podatna 'Kamienna głowa'

Liczba testowanych roślin

Przynajmniej po 20 roślin każdej populacji.

Warunki wzrostu roślin

- Przeprowadzenie testu w fitotronie lub szklarni
- Pikowanie siewek do plastikowych doniczek o Ø 10 cm lub wielodoniczek wypełnionych wysterylizowanym substratem torfowym
- Utrzymywanie 12-godzinnego fotoperiodu oraz temperatury 22/18°C dzień/noc w czasie kiełkowania i wzrostu siewek

Metoda inokulacji

Opryskiwanie całych roślin w wieku 50-55 dni wodną zawiesiną zarodników grzyba tak, aby krople inokulum nie spadły z powierzchni liści.

Warunki poinokulacyjne

- Umieszczenie roślin po inokulacji w tunelikach foliowych celem zapewnienia wysokiej wilgotności (RH 80-100%)
- Inkubacja zainokulowanych roślin w temperaturze 24-25°C (22°C w przypadku izolatów charakteryzujących się wysoką agresywnością) w ciemności przez pierwszą dobę, a następnie wprowadzenie 12-godzinnego fotoperiodu

Ocena stopnia porażenia roślin

Określenie nasilenia objawów chorobowych 7–10 dni po inokulacji na podstawie procentowego porażenia powierzchni całych roślin według 6. stopniowej skali bonitacji:

0 brak widocznych uszkodzeń na liściach

- 1 $\leq 10\%$ powierzchni porażenia
- 2 11 – 25% powierzchni porażenia
- 3 26 – 50% powierzchni porażenia
- 4 51 – 75% powierzchni porażenia
- 5 $> 75\%$ powierzchni porażenia.

Interpretacja skali i klasyfikacja roślin do grup odpornych/podatnych

odporne - w klasach 0 i 1

średniopodatne/średnioodporne - w klasach 2 i 3

podatne - klasach 4-5

Metodyka testowania odporności pomidora na alternariozę (ang. early blight)

Patogen

Alternaria solani

Utrzymywanie kultur patogena

Długoterminowe utrzymywanie kultur grzyba w 20% glicerolu w temperaturze -80°C.

Przygotowanie inokulum

- Namnożenie kultury grzyba na pożywce PDA, LBA lub V 8 w temperaturze 21 - 22 °C przy świetle fluoroscencyjnym, z 12-godzinnym fotoperiodem przez 10 – 14 dni.
- W przypadku braku zarodnikowania:
 - usunąć grzybnię powietrzną
 - poddać odwróconą, otwartą szalkę działaniu światła fluoroscencyjnego przez 12 godzin w temperaturze 23 °C
 - umieścić szalkę z kulturą grzyba w temperaturze 19 °C w ciemności przez 10-17 dni.
- Po stwierdzeniu zarodnikowania grzyba zalać szalkę z kulturą grzyba niewielką ilością sterylnej wody
- Delikatnie ścierać pędzelkiem zarodniki
- Filtrować inokulum przez kilka warstw gazy, celem usunięcia pozostałości strzępek grzybni
- Kalibrować stężenie zarodników w zawiesinie do 2×10^4 zarodników \cdot ml⁻¹ przy użyciu wody destylowanej z dodatkiem 0,1% roztworu agaru

Roślina żywicielska

Pomidor

Linie/odmiany referencyjne

Odporna *Solanum habrochaites* LA 2650

Podatna 'Rumba'

Liczba testowanych roślin

Minimum 20 roślin każdej populacji

Warunki wzrostu roślin

Przeprowadzenie testu w fitotronie lub szklarni

Pikowanie siewek do plastikowych doniczek o Ø 8-10 cm wypełnionych wysterylizowanym substratem torfowym

Utrzymanie 12-godzinnego fotoperiodu oraz temperatury 22/20°C dzień/noc

Metoda inokulacji

Rośliny w wieku 4-5 tygodni inokulować przez naniesienie pojedynczej kropli inokulum o objętości 10 µl na każdym z trzech listków wierzchołkowych dwóch – czterech w pełni rozwiniętych liści, liczonych od stożka wzrostu.

Warunki poinokulacyjne

Inkubacja zainokulowanych roślin w temperaturze 25 - 27°C w dzień oraz 20 - 22°C w nocy, wilgotności względnej w czasie trwania inkubacji utrzymana na poziomie: 60 – 70% RH (dzień) oraz 95 – 100% RH (noc).

Ocena poziomu porażenia roślin

Określenie stopnia nasilenia objawów chorobowych po 7 – 10 dniach od inokulacji przez pomiar długości i szerokości plam nekrotycznych i obliczenie powierzchni porażenia co pozwoli na zaklasyfikowanie roślin do grupy podatnych lub odpornych.

Metodyka testowania odporności ogórka na bakteryjną kanciastą plamistość

Patogen

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*

Przechowywanie patogena

Długoterminowe przechowywanie w postaci jednorodnych kultur bakterii w 20% glicerolu w temperaturze -80°C .

Przygotowanie inokulum

- posiew bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* na płytce Petriego zawierające zestaloną pożywkę King B i inkubowanie przez 24 godziny, w temperaturze 28°C ,
- zalanie kultur bakterii sterylną wodą destylowaną,
- ustalenie koncentracji bakterii w zawiesinie (1×10^8 jtk·ml⁻¹) metodą seryjnych rozcieńczeń i pomiar transmitancji na spektrofotometrze przy długości fali 630 nm,
- sprawdzenie patogeniczności bakterii testem nadwrażliwości na roślinach tytoniu odmiany Samsun, polegającym na wprowadzeniu zawiesiny bakterii do mięksizu między nerwami blaszki liściowej za pomocą strzykawki lekarskiej. Wystąpienie nekrozy w okresie 24 godzin po infiltracji liści świadczy o reakcji nadwrażliwości.

Roślina żywicielska

Cucumis sativus L, ogórek

Linie/odmiany referencyjne

podatna odmiana Wisconsin SMR 18

odporna linia Gy 14

Liczba testowanych roślin

Przynajmniej po 20 roślin każdej populacji

Warunki wzrostu roślin

- przeprowadzenie testu w fitotronie lub szklarni,
- wysiew nasion do plastikowych doniczek o \varnothing 8cm wypełnionych wysterylizowanym substratem torfowym,
- utrzymywanie 12-godzinne fotoperiodu oraz temperatury $23/18^{\circ}\text{C}$ dzień/noc w czasie wzrostu siewek.

Metoda inokulacji

Opryskanie zawiesiną bakterii roślin ogórka w fazie 3-4 liści przy użyciu opryskiwacza ręcznego.

Warunki poinokulacyjne

- inkubacja zainokulowanych roślin przez dwie doby w ciemności w temperaturze 20°C i 100% wilgotności względnej,
- Po dwóch dobach utrzymywanie roślin w temperaturze 24°C i 12. godzinnym fotoperiodzie.

Ocena poziomu porażenia roślin

Określenie nasilenia objawów chorobowych 7-8 dni po inokulacji na podstawie procentowego porażenia powierzchni liści według 9. stopniowej skali bonitacyjnej:

- 9 brak objawów lub niewielkie nekrotyczne plamki do 3% powierzchni liścia, brak chloroz
- 8 kilka małych nekrotycznych plamek na 3,1-8% powierzchni liścia, brak chloroz

- 7 nekrotyczne plamy na 9-15% powierzchni liścia
- 6 duże nekrotyczne plamy na 16-25% powierzchni liścia; niewielkie chlorozy wokół plam
- 5 uwodnione i nekrotyczne plamy z chlorotycznymi obwódkami na 26-50% powierzchni liści i na ogonkach
- 4 duże, uwodnione i nekrotyczne plamy na 51 = 75% powierzchni liścia z wyciekami bakteryjnymi i chlorozami
- 3 silnie rozwinięte uwodnione i nekrotyczne plamy na 76-87% powierzchni liścia, z wyciekami bakteryjnymi i rozległymi chlorozami
- 2 intensywne chlorozy i nekrozy na 88-95% powierzchni liścia
- 1 rośliny w 100% porażone

Interpretacja skali i klasyfikacja roślin do grup odpornych/podatnych

odporne	w klasach 9 i 8
średnioodporne	w klasach 7 i 6
średniopodatne	w klasach 5 i 4
podatne	w klasach 3, 2, 1