

**OCENA ODPORNOŚCI WYBRANYCH LINII OGÓRKA
NA BAKTERYJNĄ KANCIASZĄ PLAMISTOŚĆ
(*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *LACHRYMANS*)**

**EVALUATION OF RESISTANCE OF SELECTED CUCUMBER
LINES TO ANGULAR LEAF SPOT
(*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *LACHRYMANS*)**

Urszula Kłosińska, Elżbieta U. Kozik, Marzena Nowakowska

Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
urszula.klosinska@inhort.pl

Abstract

Angular leaf spot caused by bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* is a very common cucumber disease, which causes serious yield losses. The objective of this study was to examine the selected cucumber lines regarding their resistance to this pathogen. Twelve cucumber lines bred at the Research Institute of Horticulture were evaluated and compared with the resistant inbred line GY 14 and the susceptible cv. 'Wisconsin SMR 18'. Plants were inoculated under controlled conditions at cotyledon stage (experiment I) and at leaves stage (experiment II) with the highly aggressive strain of *P. s.* pv. *lachrymans* BO 1537. Disease severity was scored 8 days after inoculation using a nine-point rating scale (9 – no symptoms or a few pin-point lesions; 1 – damage up to 100% of leaves). Distribution of plants across severity classes and low variation coefficient indicate that all evaluated cucumber lines showed rather good uniformity in their respective degrees of resistance to this pathogen. All the materials tested presented lower disease severity in cotyledons stage than in leaves stage. It was also noted that greater differentiation among the lines in regard to their resistance to the bacteria was observed in the leaves stage. Two lines PW 2 and PW 7 exhibited the highest resistance against *P. s.* pv. *lachrymans* and can serve as a useful source of this trait in future breeding efforts.

Key words: *Cucumis sativus*, cucumber, inbred lines, inoculation techniques, resistance breeding

WSTĘP

Bakteryjna kanciasta plamistość ogórka wywoływana przez *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* jest jedną z najgroźniejszych chorób

ogórka, zarówno w uprawach polowych, jak i pod osłonami. Pierwsze objawy kanciastej plamistości mogą wystąpić już na liścieniach w postaci uwodnionych, nieregularnych plam oraz zasychania brzegów (Bradbury 1986). Najczęstsze i najbardziej charakterystyczne objawy choroby widoczne są na liściach właściwych ogórka w postaci kanciastych, ciemnozielonych, uwodnionych plam między nerwami na spodniej stronie liścia (Sherf i Macnab 1986; Sobiczewski i Schollenberger 2002). W miejscach tych plam przy wysokiej wilgotności względnej powietrza pojawiają się śluzowate wycieki zawierające komórki bakteryjne, które jako oznaki etiologiczne znacznie ułatwiają zdiagnozowanie bakteriozy. Po 2, 3 dniach porażone tkanki zasychają i wykruszają się, co powoduje powstawanie kanciastych dziur w liściach (Sobiczewski i Schollenberger 2002). Wodniste, nieregularne plamy oraz wycieki bakteryjne mogą również pojawić się na ogonkach liściowych, pędach i owocach.

Pierwotnym źródłem zakażenia roślin ogórka, oprócz nasion pochodzących z chorych owoców (Kłossowska 1973; Shila i in. 2013), są resztki porażonych roślin z poprzedniego roku (Leben 1986). Natomiast wtórnym źródłem infekcji są śluzowate wycieki bakteryjne, rozprzestrzeniające się z wodą lub przenoszone przez owady albo człowieka w czasie prac pielęgnacyjnych oraz w trakcie zbioru owoców (Sobiczewski i Schollenberger 2002). Do zakażenia roślin dochodzi przez naturalne otwory, np. aparaty szparkowe, hydatory oraz uszkodzenia mechaniczne. Porażone rośliny słabiej rosną i plonują, wytwarzają skarłowaciałe oraz zniekształcone owoce, co obniża również jakość plonu (Chand i in. 1964; Bradbury 1986). Pohronezny i in. (1977) oraz Khlaif (1995) wykazali, że choroba ta powoduje spadek plonu ogórków od 30 do 60%, w zależności od podatności odmiany na *P. s. pv. lachrymans*.

Bakteryjna kanciasta plamistość ogórka występuje we wszystkich rejonach Polski. W ostatnich latach zaobserwowano jej nasilenie na terenie województwa podkarpackiego i wielkopolskiego (Walczak i in. 2013). Zwalczanie chemiczne w trakcie sezonu wegetacyjnego polega na opryskiwaniu roślin fungicydami miedziowymi zawierającymi tlenochlorek miedziowy, wodorotlenek miedziowy i trójzasadowy siarczan miedziowy, jednakże ze względu na długi okres karencji oraz fitotoksyczne działanie na kwiaty i zawiązki owoców można je stosować tylko do okresu kwitnienia ogórków (Robak 2013). Najlepszym sposobem przeciwdziałania chorobie jest uprawa odmian odpornych na patogena. W latach 70. XX wieku, w wyniku prac przeprowadzonych w ówczesnym Instytucie Warzywnictwa w Skierniewicach, otrzymano linie ogórka o zwiększonej odporności

na bakteryjną kanciastą plamistość, które wykorzystano w hodowli mieszańców Polan F₁ i Lech F₁ (Kłossowska 1973). Obecnie jednak odporność tych odmian została przełamana przez patogena. Niektóre odmiany wyhodowane w Instytucie Ogrodnictwa, np. 'Aladyn F₁', 'Atlas F₁', 'Bazył F₁', 'Izyd F₁' oraz odmiana holenderska 'Sonate F₁' (Rijk Zwaan), według niektórych autorów, są mało podatne na bakteryjną kanciastą plamistość (Bartoszak 2004; Olczak-Woltman i in. 2008).

W związku z tym, że na świecie, również w Polsce, brak jest odmian całkowicie odpornych na bakteryjną kanciastą plamistość, podjęto prace nad oceną wybranych linii ogórka gruntowego pod względem odporności na *P.s. pv. Lachrymans*, zarówno w fazie liścieni, jak i liści właściwych.

MATERIAŁY I METODY

Materiał roślinny

Oceniane było 12 linii ogórka wyhodowanych w Zakładzie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Warzywnych IO w Skierniewicach. Na podstawie wcześniejszych badań (Chand i Walker 1964; Dessert i in. 1982; Williams i Palmer 1996; Olczak-Woltman i in. 2007, 2008) dla porównania użyto podatnej na bakteriozę odmiany 'Wisconsin SMR 18' i odpornej – linii Gy 14. Przed rozpoczęciem testów fitopatologicznych przeprowadzono hodowlę wsobną wszystkich linii w celu sprawdzenia ich poziomu homozygotyczności pod względem cech użytkowych. Badania prowadzono w warunkach fitotronowych. Podkiełkowane nasiona wysiewano pojedynczo do plastikowych doniczek o \varnothing 8 cm wypełnionych substratem torfowym Kronen Mix. Doświadczenie założono w czterech powtórzeniach, po sześć roślin w każdym. W czasie wzrostu siewek utrzymywano 12-godzinny fotoperiod oraz temperaturę 23/18 °C dzień/noc.

Patogen

Do badań użyto szczepu BO 1537 charakteryzującego się najwyższą patogennością i najmniejszą zmiennością w wywoływaniu objawów chorobowych na podatnej odmianie 'Wisconsin SMR 18' (dane niepublikowane). Szczep ten pochodził z Pracowni Fitopatologii Sadowniczej IO, gdzie był przechowywany w postaci jednorodnych kultur hodowanych na skosach z agarem odżywczym (2,3% Nutrient Agar, Difco z 5% dodatkiem sacharozy) w temperaturze 8 °C. W celu przygotowania inokulum wykonano posiew bakterii na płytki Petriego zawierające zestaloną pożywkę King B (King i in. 1954) i inkubowano przez 24 godziny w cieplarni w temperaturze 28 °C. Następnie kultury bakterii zalewano sterylną wodą destylowaną. Koncentrację bakterii w zawiesinie (około 1×10^8 jtk · ml⁻¹)

ustalano wykorzystując metodę seryjnych rozcieńczeń i pomiar transmisji na spektrofotometrze SEMCO S91E przy długości fali 630 nm. Patogeniczność bakterii sprawdzano testem nadwrażliwości na roślinach tytoniu 'Samsun', polegającym na wprowadzeniu zawiesiny bakterii do miększu między nerwami blaszki liściowej za pomocą strzykawki lekarskiej. Wystąpienie nekrozy w ciągu 24 godzin po infiltracji liści świadczyło o reakcji nadwrażliwości.

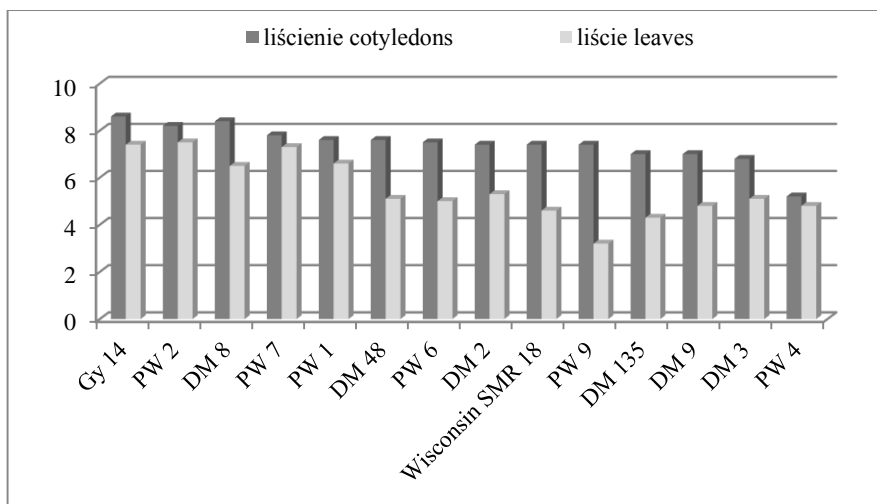
Testy fitopatologiczne

Rośliny w fazie liścieni (doświadczenie I) oraz w fazie 3-4 liści (doświadczenie II) opryskiwano zawiesiną bakterii *P. s. pv. lachrymans* i inkubowano przez dwie doby w ciemności, w temperaturze 20 °C i 100% wilgotności względnej powietrza. Następnie rośliny utrzymywano w temperaturze 22-24 °C i 12-godzinnym fotoperiodzie. Po 8 dniach od inokulacji określano nasilenie objawów chorobowych na podstawie porażenia powierzchni liścieni (doświadczenie I) i liści (doświadczenie II), oddzielnie dla każdej rośliny, według 9-stopniowej skali (9 – brak objawów lub niewielkie nekrotyczne plamki; 8 – kilka plamek nekrotycznych na 3-8% powierzchni liścia; 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 – zniszczone 88-95% powierzchni rośliny, intensywne chlorozy i nekrozy; 1 – roślina całkowicie porażona). Następnie obliczono dla linii ogórka wskaźnik podatności DSI. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji, a istotność różnic między średnimi oceniono testem Duncana przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Oszacowano także współczynnik zmienności (V) w celu oceny stopnia zróżnicowania/wyrównania wewnątrzliniowego w obrębie danej populacji pod względem odporności na *P. s. pv. lachrymans*.

WYNIKI I DYSKUSJA

Odporność ocenianych linii ogórka na *P. s. pv. lachrymans* była zróżnicowana i zależała od wieku roślin (rys. 1). W fazie liścieni wszystkie linie były mniej podatne niż w fazie liści, o czym świadczą zarówno średnie wartości DSI dla liścieni (7,5) i liści (5,7) (tab. 1, 2), jak i zakres DSI dla liścieni 5,2-8,6 i dla liści 3,2-7,5. Podobną zależność zaobserwowali

również Williams i Palmer (1996) oraz Olczak-Woltman i in. (2008), którzy stwierdzili niewielkie objawy chorobowe na liścieniach podatnej odmiany ‘Wisconsin SMR 18’. Zarówno wyniki badań wyżej cytowanych autorów, jak i nasze wykazały, że faza 3-4 liści właściwych jest odpowiednią fazą do testowania odporności ogórka na *P. s. pv. lachrymans*.



Rys. 1. Stopień porażenia wybranych linii ogórka w fazie liścieni i liści przez bakteryjną kanciastą plamistość po inokulacji *P. syringae pv. lachrymans* (fitotron)

Fig. 1. Severity classes of angular leaf spot of selected cucumber lines in cotyledons and leaves stage after inoculation with *P. syringae pv. lachrymans* (the growth chamber)

Rozkład roślin w klasach porażenia oraz niskie współczynniki zmienności dla liścieni ($V = 8,1\%$) i dla liści ($V = 9,7\%$) wskazują, że wszystkie badane linie charakteryzują się wyrównaną gradacją odporności/podatności na kanciastą plamistość (tab. 1, 2). Biorąc pod uwagę stopień porażenia liścieni, większość linii ogórka zaklasyfikowano jako średnio odporne i odporne na *P. s. pv. lachrymans* (tab. 1). Wyjątek stanowiła linia PW 4, która pod względem nasilenia choroby była średnio podatna ($DSI = 5,2$). Znacznie większe zróżnicowanie między badanymi genotypami zaobserwowano w fazie liści (tab. 2).

Tabela 1. Współczynnik zmienności (V) oraz stopień podatności (DSI) wybranych linii ogórka w fazie liścieni na *P. syringae* pv. *lachrymans* (fitotron)
 Table 1. Variation coefficient (V) and disease severity index (DSI) of selected cucumber lines in cotyledons stage to *P. syringae* pv. *lachrymans* (the growth chamber)

Linia; Line	Liczba roślin w klasach porażenia No. of plants in severity classes									DSI	V* (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Gy 14								10	14	8,6 e	5,9
DM 8								14	10	8,4 e	5,8
PW 2								12	12	8,5 e	6,0
PW 1							6	10	8	8,1 de	9,6
PW 7							6	18		7,8 cd	5,7
DM 48							12	9	3	7,6 cd	9,3
PW 6							12	12		7,5 bcd	6,8
DM 2							15	9		7,4 bcd	6,5
PW 9							14	10		7,4 bcd	6,8
Wisconsin SMR 18							14	10		7,4 bcd	6,7
DM 135						4	15	5		7,0 bc	8,9
DM 9					2	5	9	8		7,0 bc	13,7
DM 3						9	12	3		6,8 b	10,0
PW 4				2	14	8				5,2 a	11,6
Średnia; Mean										7,5	8,1

* współczynnik zmienności; variation coefficient

Średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie według testu Duncan'a przy $p = 0,05$

Means followed by the same letter within column are not significantly different at $p = 0.05$ according to Duncan's test

Spośród 12 ocenianych linii najwyższy i najbardziej wyrównany poziom odporności w klasach 7 i 8 odnotowano dla linii PW 2 i PW 7, których wskaźnik podatności DSI wynosił odpowiednio 7,5 i 7,3 i nie różnił się istotnie od DSI linii odpornej Gy 14 (DSI = 7,4). U linii tych obserwowano niewielkie nekrotyczne drobne plamki, zajmujące do 15% powierzchni liścia. Największe porażenie bakterią zanotowano u linii PW 9, której wskaźnik DSI (3,1) różnił się istotnie od DSI kontrolnej, podatnej odmiany 'Wisconsin SMR 18' (4,5). Średnim poziomem odporności charakteryzowały się dwie kolejne linie PW 1 i DM 8, których DSI wynosiło 6,6. Genotypy te miały plamy nekrotyczne na 8-25% powierzchni liścia oraz brak lub niewielkie chlorozy. Średnim poziomem podatności charakteryzowała się większość badanych linii (7 z 12), których wskaźnik DSI

dla fazy liści był w zakresie od 4,3 do 5,5 (tab. 2). Również w badaniach innych autorów (Kłossowska 1973; Olczak-Woltman i in. 2008) przeważały linie średnio podatne i podatne na bakteryjną kanciastą plamistość. Z tego wynika, iż liczba materiałów hodowlanych ogórka z najwyższą odpornością na *P. s. pv. lachrymans* jest niewielka. Mimo to prognozy co do przyszłości upraw ogórka gruntowego odpornego na bakteriozę są optymistyczne. Świadczą o tym zidentyfikowane potencjalne źródła odporności, między innymi linie PW 2 i PW 7 naszej hodowli, które mogą być wykorzystane w programach hodowli odpornościowej ogórka, mającej na celu wprowadzenie tej cechy do materiałów hodowlanych o różnym poziomie odporności na tego patogena. Dotychczasowe badania innych autorów wykazały, że w wyniku krzyżowania i selekcji można uzyskać szybki postęp, prowadzący do otrzymania linii ogórka o zwiększonej odporności (Kłossowska 1973; Olczak-Woltman i in. 2008).

Tabela 2. Współczynnik zmienności (V) oraz stopień podatności (DSI) wybranych linii ogórka w fazie liści na *P. syringae* pv. *lachrymans* (fitotron)

Table 2. Variation coefficient (V) and disease severity index (DSI) of selected cucumber lines in leaves stage to *P. syringae* pv. *lachrymans* (the growth chamber)

Linia; Line	Liczba roślin w klasach porażenia No. of plants in severity classes									DSI	V* (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
PW 2							12	12		7,5 f	6,8
Gy 14							14	8		7,4 f	6,7
PW 7							16	8		7,3 ef	6,6
PW 1						12	12			6,6 e	7,9
DM 8						12	12			6,6 e	7,9
DM 2					12	12				5,5 d	9,3
DM 3				6	10	4	2			5,1 cd	18,1
PW 6				2	20	2				5,0 bcd	8,3
PW 4				8	10	6				4,9 bcd	15,8
DM 48				6	13	3				4,9 bcd	13,1
DM 9				7	15	1				4,7 bc	11,5
Wisconsin SMR 18				13	9	2				4,5 bc	14,5
DM 135			3	12	9					4,3 b	15,9
PW 9		2	18	4						3,1 a	16,3
									Średnia; Mean	5,8	9,7

Uwagi: patrz Tabela 1; Note: see Table 1

PODSUMOWANIE

Wyhodowane w Zakładzie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Warzywnych IO w Skierniewicach linie ogórka charakteryzują się zróżnicowanym i zależnym od wieku roślin poziomem odporności na bakteryjną kanciastą plamistość. Dwie linie PW 2 i PW 7 charakteryzują się najwyższym poziomem odporności na *P. s. pv. lachrymans* i mogą stanowić wartościowy materiał w programach hodowli odpornościowej, mającej na celu wprowadzenie tej cechy do linii hodowlanych ogórka. Faza wzrostu testowanych roślin miała istotny wpływ na stopień porażenia roślin przez *P. s. pv. lachrymans*. Wykazano, że faza 3-4 liści właściwych jest odpowiednią fazą do testowania odporności ogórka na bakteryjną kanciastą plamistość.

Podziękowanie

Autorzy dziękują prof. dr. hab. P. Sobiczewskiemu za udostępnienie szczepu bakterii *P. s. pv. lachrymans* i mgr. S. Berczyńskiemu oraz H. Kijańskiej za przygotowanie kultury bakterii.

Literatura

- Bartoszak K. 2004. Performance of pickling cucumber cultivars presently on the Polish national list. W: Lebeda A., Paris H.S. (red.), Progress in cucurbit genetics and breeding research. Olomouc, Palacký University, s. 333-336.
- Bradbury J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute, London, s. 154-177.
- Chand J.N., Walker J.C. 1964. Inheritance of resistance to angular leaf spot of cucumber. *Phytopathology* 54: 51-53.
- Dessert J.M., Baker L.R., Fobes J.F. 1982. Inheritance of reaction to *Pseudomonas lachrymans* in pickling cucumber. *Euphytica* 31: 847-855.
- Khlaif H. 1995. Varietal reaction and control of angular leaf spot disease on cucumber. *Pure and Applied Science* 22(5): 1201-1208.
- King E.O., Ward N.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Kłossowska E. 1973. Badania nad odpornością ogórków na kanciastą plamistość (*Pseudomonas lachrymans* Smith i Bryan). Praca doktorska, Instytut Warzywnictwa, Skierniewice.
- Leben C. 1986. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* with cucumber roots. *Plant Soil* 91: 139-142.
- Olczak-Woltman H., Masny A., Bartoszewski G., Plucienniczak A., Niemirowicz-Szczytt K. 2007. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae*

- pv. *lachrymans* strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathology* 56: 373-382.
- Olczak-Woltman H., Schollenberger M., Mądry W., Niemirowicz-Szczytt K. 2008. Evaluation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars grown in Eastern Europe and progress in breeding for resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). *European Journal of Plant Pathology* 122: 385-393.
- Pohronezny K., Larson P.O., Leben C. 1977. Observations on cucumber fruit invasion by *Pseudomonas lachrymans*. *Plant Disease Reporter* 62: 306-309.
- Robak J. 2013. <http://doradztwowarzywnicze.pl/ochrona-ogorkow-polowych-przed-chorobami>.
- Shila S.J., Islam M.R., Ahmed N.N., Dastogeer K.M.G., Meah M.B. 2013. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* associated with the seeds of cucurbits. *Universal Journal of Agricultural Research* 1(1): 1-8. DOI: 10.13189/ujar.2013.010101.
- Sherf A.F., Macnab A.A. 1986. *Vegetable diseases and their control*. Wiley – InterScience Publ., s. 311-315.
- Sobiczewski P., Schollenberger M. 2002. Bakteryjne choroby roślin ogrodniczych. PWRiL, Warszawa.
- Walczak F., Bandyk A., Jakubowska M., Roik K., Tratwal A., Wielkopolan B. i in. 2013. Ocena uszkodzeń spowodowanych przez najważniejsze agrofagi głównych roślin uprawnych w Polsce, w roku 2012. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 53(4): 856-877. DOI: 10.14199/ppp-2013-036.
- Williams P.H., Palmer M.J. 1996. NC State and USDA cucumber disease handbook. Angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). <http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/cuke/dshndbk/als.html>

Opracowanie wykonano w ramach zadania nr 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 MRiRW.