
ALTERNARIOZA ROŚLIN KAPUSTOWATYCH CZĘŚĆ II: PERSPEKTYWY HODOWLI ODMIAN ODPORNÝCH

ALTERNARIA DISEASE OF CABBAGE PLANTS PART II: PERSPECTIVES ON BREEDING OF RESISTANT CULTIVARS

Elżbieta U. Kozik, Marzena Nowakowska

Instytut Ogrodnictwa

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

e-mail: Elzbieta.Kozik@inhort.pl

Abstract

Alternaria black spot of cabbage plants, incited by different species of *Alternaria*, causes an increasing damage of Brassicaceae crops throughout the world, including Poland. Usually, *Brassica* plants are attacked by *A. brassicae* (Berk.) Sacc., *A. brassicicola* (Schw.) Wiltsh., and *A. raphani* Groves & Skolko. *Alternaria* pathogens have a wide spectrum of hosts, including cabbage, other cultivated plants, and wild grown cruciferous plants. In this paper on *alternaria* of cabbage plants (Part II) several issues regarding sources of resistance, respective genes actions, and methods of testing of resistance, are presented. Strong cross-incompatibility, polygenic background of the resistance (additive and dominant gene interactions), as well as the differences in ploidy between the *Brassica* species of interest, render the transfer of *Alternaria* resistance from the source into the cultivated forms difficult. Such transfer is additionally often connected with employment of *in vitro* hybridization techniques, including somatic hybridization, embryo and ovary rescue, or protoplast fusion.

Key words: *Alternaria* black spot, Brassicaceae, resistance

WSTĘP

Zagrożenie upraw roślin kapustowatych alternariozą – chorobą o wzrastającym znaczeniu w Polsce i w innych krajach, uzasadnia podjęcie kompleksowych prac nad otrzymaniem odmian z genetyczną odpornością na tę chorobę. Uzyskanie odpornych odmian warzyw kapustowatych byłoby potencjalnie najbardziej ekonomicznym rozwiązaniem w ograniczaniu strat powodowanych przez alternariozy. Jest to zadanie ważne zarówno z punktu widzenia producentów warzyw kapustowatych, jak i konsumentów. Pozwoliłoby to na zmniejszenie zużycia środków ochrony roślin, co ma szczególne znaczenie w uprawach integrowanych i ekologicznych. W części I publikacji dotyczącej alternariozy roślin kapustowatych

przedstawiono kilka zagadnień dotyczących występowania i szkodliwości choroby oraz charakterystykę patogenów wywołujących chorobę, a także opis objawów chorobowych (Nowakowska i in. 2011). Część II pracy zawiera tematykę przydatną w hodowli odpornościowej roślin Brassica i innych gatunków z rodziny Brassicaceae.

Źródła odporności

Alternarioza kapustowatych jest chorobą atakującą zarówno uprawne, jak i dzikie gatunki roślin z rodziny kapustowatych, a najważniejszymi i podatnymi na alternariozę są: *Brassica campestris*, *B. oleracea*, *B. napus*, *B. napa*. Do tej pory nie udało się zidentyfikować źródeł wysokiej odporności na alternariozy wśród uprawnych gatunków z rodzaju Brassica, ale poszczególne odmiany w obrębie warzyw kapustowatych mogą różnić się poziomem podatności na tę chorobę (Otani i in. 2001, Nowicki i in. 2012). Najwyższą odpornością na alternariozę kapustowatych z uprawnych gatunków rodzaju Brassica wyróżnia się *B. carinata* (kapusta etiopska). Wśród dzikich gatunków z rodziny kapustowatych, blisko spokrewnionych z rodzajem Brassica, najwyższy poziom odporności na porażenie przez *A. brassicae* stwierdzono u *Sinapis alba* (gorczyca biała) (Kolte 1985, Brun i in. 1987, Ripley i in. 1992, Sharma i Singh 1992, Hansen i Earle 1995, 1997). Jednakże najwyższą odporność na *Alternaria* spp. stwierdzono u roślin kapustowatych bardziej oddalonych od Brassica takich jak: *Camelina sativa* (Inicznik siewny), *Capsella bursa-pastoris* (tasznik pospolity), *Eruca sativa* (rokietta siewna, syn. rukola) oraz *Neslia paniculata* (ożędka graniasta) (Conn i Tewari 1986, Conn i in. 1988, Tewari 1991, Tewari i Conn 1993, Nowicki i in. 2012).

Camelina sativa wyróżnia się immunologiczną odpornością na porażenie przez *A. brassicicola*. Tak wysoki poziom odporności u tego gatunku spowodowany jest jego zdolnością do produkcji fitoaleksyny – kamaleksyny (ang. camalexin), która ma właściwości antybiotyczne i w ten sposób może hamować rozwój patogena. Celem przeniesienia genów odporności przeprowadzono somatyczną hybrydyzację pomiędzy *B. carinata* i *C. sativa*, jednak nie udało się rozmnożyć otrzymanych mieszańców (Narasimhulu i in. 1994). Nie powiodła się również próba zregenerowania roślin mieszańców pozyskanych na skutek fuzji protoplastów pomiędzy *B. oleracea* i *C. sativa* (Hansen 1998). Odporność na czerń krzyżowych próbowano również przenieść z *E. sativa* do różnych gatunków uprawnych Brassica (Fahleson i in. 1988; Sikdar i in. 1990, Sigareva i Earle 1997), lecz w wielu przypadkach badania zakończyły się niepowodzeniem.

W badaniach nad poszukiwaniem genetycznych źródeł odporności na alternariozę (Sharma i in. 2002) w dziewięciu gatunkach z rodziny Brassicaceae zidentyfikowano całkowitą odporność u ośmiu gatunków: *Brassica desnotteii*, *Camelina sativa*, *Coincya pseuderucastrum*, *Diplotaxis berthautii*, *D. catholica*, *D. creacea*, *D. erucooides* i *Erucastrum gallicum* (rukwiślad francuski). U roślin tych nie obserwowano objawów chorobowych zarówno w warunkach naturalnej infekcji w polu, jak i w warunkach kontrolowanych. Komercyjne odmiany brokołu i kalafiora charakteryzowały się umiarkowaną odpornością, a kapusty były podatne. Kadian i Saharan (1983) wykazali odporność *Brassica juncea* na porażenie przez patogeny z rodzaju *Alternaria* w warunkach polowych, ale podczas sztucznej inokulacji gatunek ten był podatny.

Silne bariery niezgodności krzyżowej, poligeniczne uwarunkowanie odporności (współdziałanie addytywne i dominujące genów), różnice w poliploidalności (różna liczba chromosomów) pomiędzy poszczególnymi gatunkami rodziny kapustowatych sprawiają, że przeniesienie genów odporności z dzikich gatunków roślin do form uprawnych jest bardzo trudne i wiąże się z wykorzystaniem technik hybrydyzacji *in vitro* (w tym: somatyczna hybrydyzacja, „embryo and ovary rescue”, fuzja protoplastów). Pierwsze somatyczne mieszańce otrzymano w wyniku fuzji protoplastów pomiędzy *Brassica napus* (rzepak) i *Sinapis alba* (gorczyca biała) (Primard i in. 1988). Wstępne wyniki badań pokazały jednak, że żaden z otrzymanych mieszańców nie dorównywał poziomem odporności na porażenie przez *A. brassicae* rodzicielskiej formie *S. alba*. Z kolei Chevre i in. (1991) przeprowadzili krzyżowania międzygatunkowe z wyżej wymienionymi roślinami przez somatyczną hybrydyzację oraz z wykorzystaniem krzyżowania dwukierunkowego. Po zastosowaniu techniki „embryo rescue” udało im się zregenerować rośliny *B. napus* z 38 chromosomami wykazującymi odporność na *A. brassicae* zbliżoną do *S. alba*. Somatyczne mieszańce otrzymano również w wyniku fuzji: *Brassica oleracea* i *S. alba*, *B. oleracea* var. *botrytis* i *B. carinata* (Ryschka i in. 1996).

Genetyczne uwarunkowanie odporności

Dziedziczenie odporności roślin kapustowatych na alternariozę jest zagadnieniem słabo poznanym, a doniesienia na ten temat są niejednoznaczne. W zależności od badanego materiału, odporność na *A. brassicae/A. brassicicola* jest kontrolowana przez jeden lub kilka genów jądrowych o działaniu częściowo dominującym (Zhang i in. 1997) lub jest warunkowana dziedziczeniem addytywnym (Krishnia i in. 2000). Odporność na alternariozę, na przykład u gorczycy białej, powiązana jest z produkcją

enzymów z grupy fenolaz (oksydaza polifenolowa, peroksydaza), wysokim poziomem cukrów w liściach (Singh i in. 1992) oraz obecnością grubszej warstwy wosku, który zmniejsza przyczepność grzybni i zarodników, a także ogranicza kiełkowanie zarodników. Stwierdzono, że również u innych roślin kapustowatych odporność na porażenie przez *Alternaria* spp. jest skorelowana z obecnością intensywnego nalotu woskowego na liściach.

Testowanie odporności

W celu określenia stopnia odporności roślin na alternariozę przeprowadza się testy polowe, szklarniowe oraz fitotronowe. Obserwacje polowe można wykonać po wystąpieniu naturalnej infekcji patogena, jak również po infekcji kontrolowanej, wywołanej sztuczną inokulacją zawiesiną zarodników grzyba *Alternaria* ssp. Jednakże, ze względu na szybkość, powtarzalność i możliwość stworzenia optymalnych warunków inkubacji patogena stosowane są najczęściej testy szklarniowe i fitotronowe.

Do testów odpornościowych wykorzystywane są konidia grzybów z rodzaju *Alternaria* spp., pobrane bezpośrednio z porażonej tkanki roślinnej. Źródłem inokulum mogą być również utrzymywane na sztucznych pożywkach kultury tych patogenów. Utrzymywanie i wzrost kultur patogena przeprowadza się najczęściej na uniwersalnym dla *Alternaria* spp. podłożu PDA (ang. potato dextrose agar), na którym wzrost grzyba i efektywna spontaniczna sporulacja zachodzą w temperaturze 25 ± 2 °C, w ciemności. Możliwości hodowli izolatów z rodzaju *Alternaria* jest jednak więcej. Dla przykładu Otani i in. (1998) grzybnię *A. brassicicola* utrzymywali na pożywce V8A (ang. V8 juice agar) w temp. 25 °C, uzyskując spontaniczne zarodnikowanie przy dwunastogodzinnym fotoperiodzie.

W celu otrzymania inokulum porażoną tkankę roślinną lub szalkę z kulturą grzyba zalewa się niewielką ilością sterylnej wody, a następnie delikatnie ściera powierzchnię grzybni pędzelkiem, otrzymując zawiesinę zarodników. Inokulum filtruje się przez kilka warstw gazy, aby usunąć pozostałości grzybni (Otani i in. 1998). Można dodatkowo oczyszczać zarodniki przez trzykrotne przepłukanie wodą destylowaną i odwirowanie (przy $600 \times g$) przez 5 minut. Ze względu na wytwarzanie wosku na powierzchni roślin kapustowatych do wodnej zawiesiny zarodników dodaje się agar (Ho i in. 2007) lub Tween (Doullah i in. 2006), co zapewnia lepszą przyczepność zarodników konidialnych do powierzchni liścia. Przygotowując materiał roślinny do testu liściowego usuwa się również z ich powierzchni

wosk za pomocą wilgotnego wacika, dzięki czemu wodna zawiesina zarodników pozostaje równomiernie rozprowadzona na powierzchni liści bez potrzeby dodawania agaru czy adiuwantu (Sharma i Singh 2002).

Testy w warunkach kontrolowanych wykonywane są na całych roślinach (*in vivo*) lub na odciętych liściach (*in vitro*) (Sharma i in. 2002). Najczęściej rośliny testuje się w fazie 3-6 tygodniowej rozsady, ale przeprowadza się również testy w fazie liścieni (Doullah i in. 2006).

Test liściowy jest jedną z najczęściej stosowanych metod testowania roślin kapustowatych na alternariozę w warunkach kontrolowanych. Istnieją jednak różnice w sposobie inokulacji oraz w warunkach testowania liści. Stosowano inokulację zewnętrznej strony liści w stężeniu 5×10^4 zarodników/ml (Doullah i in. 2006) lub opryskiwanie dolnej strony liści inokulum o stężeniu 3×10^5 zarodników/ml (Parada i in. 2008). Z kolei Sharma i in. (2002) do testów używali jedynie czwartego i piątego liścia roślin (45-dniowa rozsada). Wilgotnym wacikiem łagodnie wycierano wosk z obu stron nerwu na wierzchniej powierzchni każdego liścia. Cienką igłą robiono niewielkie powierzchniowe nacięcie. W miejscu zranienia nanoszono kroplę inokulum o stężeniu 4×10^3 zarodników/ml. Objawy chorobowe obserwowano w 24-godzinnych odstępach przez 3 dni. Na ocenę stopnia odporności pojedynczych genotypów składała się suma punktów uzyskanych z pomiaru trzech parametrów, takich jak: procentowe porażenie powierzchni liścia (0-60 pkt), wielkość plamy (0-30 pkt) oraz długość okresu inkubacji (0-10 pkt). Badany genotyp mógł uzyskać maksymalnie 100 punktów (rośliny o najwyższej podatności). Ze względu na uzyskaną sumę punktów badany genotyp klasyfikowano do jednej z czterech grup: 0 – całkowicie odporny, 1-15 – umiarkowanie odporny, 16-25 – podatny; powyżej 25 punktów – wysoka podatność.

Optymalne warunki dla testów biologicznych uzyskane w niezależnych analizach są zbieżne i wymagają: temperatury 20 °C, wilgotności powyżej 90% przez co najmniej 6 godz. i stężenia inokulum 6×10^4 zarodników/ml (Sharma i in. 2002, Doullah i in. 2006).

PODSUMOWANIE

Dzięki coraz lepszemu poznaniu wzajemnych relacji patogen-roślina żywicielska, identyfikacji genów odporności, określeniu mechanizmu dziedziczenia tej cechy, możliwy będzie postęp w hodowli odpornych roślin kapustowatych na alternariozę. Ma to duże znaczenie, zwłaszcza

w ostatnich latach, kiedy dynamicznie rozwija się ekologiczna i integrowana uprawa roślin, uwzględniająca szczególnie odmiany odporne na agrofagi.

Silne bariery niezgodności krzyżowej, poligeniczne uwarunkowanie odporności (addytywne i dominujące współdziałanie genów), różnice w ploidalności pomiędzy poszczególnymi gatunkami rodziny kapustowatych sprawiają, że przeniesienie genów odporności z dzikich gatunków roślin do form uprawnych jest bardzo trudne i wiąże się z wykorzystaniem technik hybrydyzacji *in vitro* (w tym: somatyczna hybrydyzacja, „embryo and ovary rescue”, fuzja protoplastów).

Wprowadzenie genów odporności na alternariozę powinno polegać na kumulacji genów odporności poziomej. Niezbędna jest więc identyfikacja różnych typów odporności częściowej wśród roślin kapustowatych, a następnie łączenie ich w celu zwiększenia skuteczności ochrony przed patogenami wywołującymi tę chorobę.

Literatura

- Brun H., Plessis J., Renard M. 1987. Resistance of some crucifers to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. Proc. Seventh Int. Rapeseed Congr. Poznan, Poland, pp. 1222-1227.
- Chevre A.M., Eber F., Brun H., Plessis J., Primard C., Renard M. 1991. Cytogenetic studies of *Brassica napus* - *Sinapis alba* hybrids from ovary culture and protoplast fusion. Attempts to introduce *Alternaria* resistance into rapeseed. Proc. of International Rapeseed Conference 8: 346-351.
- Conn K.L., Tewari J.P. 1986. Hypersensitive reaction induced by *Alternaria brassicae* in *Eruca sativa*, an oil-yielding crucifer. Can. J. Plant Pathol. 8: 348.
- Conn K.L., Tewari J.P., Dahiya J.S. 1988. Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexins-elicitation in rapeseed and other crucifers. Plant Sci. 56: 21-25.
- Doullah M.A.U., Meah M.B., Okazaki K. 2006. Development of an effective screening method for partial resistance to *Alternaria brassicicola* (dark leaf spot) in *Brassica rapa*. Eur. J. Plant Pathol. 116: 33-43.
- Fahleson J., Rahlen L., Glimelius K. 1988. Analysis of plants regenerated from protoplast fusions between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. Theor. Appl. Genet. 76(4): 507-512.
- Hansen L.H. 1998. Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* (L.) and *Camelina sativa* (L.) Cranz. Euphytica 104: 173-179.

- Hansen L.H., Earle E.D. 1995. Transfer of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (L.) by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1293-1300.
- Hansen L.H., Earle E.D. 1997. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* (L.) and *Sinapis alba* (L.) with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. *Theor. Appl. Genet.* 94: 1078-1085.
- Ho W.C., Su H.J., Li J.W., Ko W.H. 2007. Effect of extracts of Chinese medicinal herbs on spore germination of *Alternaria brassicicola* and nature of an inhibitor from gallnuts of Chinese sumac (*Rhus Chinensis*). *Can. J. Plant Pathol.* 28: 519-525.
- Kadian A.K., Saharan G.S. 1983. Symptomatology, host range and assessment of yield losses due to *Alternaria brassicae* infection in rapeseed and mustard. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 13(3): 319-323.
- Kolte S.J. 1985. Diseases of annual edible oilseed crops. Vol. II: Rapeseed-mustard and sesame diseases. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, pp. 135.
- Krishnia S.K., Saharan G.S., Singh D. 2000. Genetic variation for multiple disease resistance in the families of interspecific cross of *Brassica juncea* × *B. carinata*. *Cruciferae Newsletter* 22: 51-53.
- Narasimhulu S.B., Kirti P.B., Bhat S.R., Prakash S., Chopra V.L. 1994. Intergeneric protoplast fusion between *Brassica carinata* and *Camelina sativa*. *Plant Cell Rep.* 13: 657-660.
- Nowakowska M., Niezgodą A., Kozik E.U. 2011. Alternarioza roślin kapustowatych. Część I: Charakterystyka patogena, objawy chorobowe i szkodliwość. *Now. Warz.* 52: 33-40.
- Nowicki M., Nowakowska M., Niezgodą A., Kozik E.U. 2012. *Alternaria* black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspective of resistance breeding. *Veget. Crops Res. Bull.* 76: 5-19.
- Otani H., Kohnobe A., Kodama M., Kohmoto K. 1998. Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. *Physiol. Mol. Plant P.* 52: 285-295.
- Otani H., Kohnobe A., Narita M., Shiomi H., Kodama M., Kohmoto K. 2001. A new type of host-selective toxin, a protein from *Alternaria brassicicola*. In: Keen N.T., Mayama S., Leach J.E. and Tsuyumu S. (Eds.), *Delivery and perception of pathogen signals in plants*. APS Press, St. Paul, MN, pp. 68-76.
- Parada R.Y., Sakuna E., Mori N., Oka K., Egusa M., Kodoma M., Otani H. 2008. *Alternaria brassicae* produces a host-specific protein toxin from germinating spores on host leaves. *Phytopathology* 98: 458-463.
- Primard C., Vedel F., Mathieu C., Pelletier G., Chevre A.M. 1988. Interspecific somatic hybridization between *Brassica napus* and *Brassica hirta* (*Sinapis alba* L.). *Theor. Appl. Genet.* 75: 546-552.

- Ripley V., Thorpe M., Iler S., Mizier K., Beversdorf W.D. 1992. Isozyme analysis as a tool for introgression of *Sinapis alba* germ plasm into *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 403-410.
- Ryschka U., Schumann G., Klocke E., Scholze P., Neumann M. 1996. Somatic hybridization in Brassicaceae. *Acta Hort.* 407: 201-208.
- Sharma T.R., Singh B.M. 1992. Transfer of resistance to *Alternaria brassicae* in *Brassica juncea* through interspecific hybridization among Brassica. *Journal of Genetics and Breeding* 46: 373-378.
- Sharma G., Kumar V.D., Haque A., Bhat S.R., Prakash S., Chopra V.L. 2002. Brassica coenospecies: a rich reservoir for genetic resistance to leaf spot caused by *Alternaria brassicae*. *Euphytica* 125: 411-417.
- Sigareva M.A., Earle E.D. 1997. Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 94: 213-220.
- Sikdar S.R., Chatterjee G., Das S., Sen S.K. 1990. "Erussuca" the ingeneric fertile somatic hybrid developed through protoplast fusion between *Eruca sativa* Lam. and *Brassica juncea* (L.). *Czern. Theor. Appl. Genet.* 79: 561-567.
- Singh B.P., Singh S.P., Mohammad A., Sinha P.P. 1992. Effect of nitrogen, phosphorus and potash on the development of *Alternaria* leaf spot of cabbage. *Indian Phytopath.* 45(2): 245.
- Tewari J.P. 1991. Structural and biochemical bases of the black spot diseases of crucifers. *Adv. Struct. Biol.* 1: 25-34.
- Tewari J.P., Conn K.L. 1993. Reactions of some wild crucifers to *Alternaria brassicae*. *Bulletin OILB/SROP* 16: 53-58.
- Zhang F.L., Xu J.B., Yan H., Li M.Y. 1997. A study on inheritance of resistance to black leaf spot in seedlings of Chinese cabbage. *Acta Agriculture Borealis Sinica* 12: 115-119.

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.