

**NOWE MOŻLIWOŚCI INTEGROWANEJ OCHRONY KAPUSTY
GŁOWIASTEJ PRZED KIŁĄ KAPUSTY
– *PLASMUDIOPHORA BRASSICAE***

**THE NEW POSSIBILITIES OF INTEGRATED PROTECTION
OF WHITE CABBAGE AGAINST CLUBROOT
– *PLASMUDIOPHORA BRASSICAE***

Agnieszka Czajka, Anna Czubatka-Bieńkowska, Józef Robak*

Instytut Ogrodnictwa

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

*emerytowany pracownik Instytutu Ogrodnictwa

Agnieszka.Czajka@inhort.pl

Abstract

The aim of study was to investigate the possibility of reduction of infection by *Plasmodiophora brassicae* on white cabbage by using fertilizers. The experiment was conducted by using two products: Bacphos and Phos 60 EU. The first product is the formulation of *Bacillus amyloliquefaciens*, nitrogen and phosphite, while the second one consisted the compounds of phosphite. The effectiveness of products against *P. brassicae* was assessed by observation of macroscopic root infection in a scale 0–3. The effects of the use of both products were evaluated by number of roots infected by *P. brassicae*. Both Bacphos and Phos 60 EU showed high effectiveness in reducing the prevalence of *P. brassicae*. The most effective results in clubroot infection inhibition were obtained after the application of Phos 60 EU applied alone (66,7–93%) and with Bacphos applied twice (71,4–75%). After treating cabbage plants with both products the reduction of root galls were visible.

Key words: cabbage, clubroot, *Plasmodiophora brassicae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, phosphite

WSTĘP

Kiła kapusty stanowi w Polsce poważny problem w rejonach towarowej produkcji warzyw kapustnych, a także rzepaków. Sprawcą choroby jest organizm glebowy, śluzorośle – *Plasmodiophora brassicae* Wor. Patogen ten może porażać ponad 200 gatunków i 64 rodzaje roślin z rodziny kapustowatych i innych – zarówno uprawnych, jak i chwastów (Robak 1981; Nowicki 1984). Pierwsze doniesienia o wystąpieniu tej choroby pojawiały się w wieku XIII, ale dopiero w roku 1878 została ona dokładniej

opisana przez rosyjskiego botanika Woronina, który określił czynnik sprawczy jako organizm grzybopodobny i dał mu nazwę *Plasmodiophora brassicae* (Woronin 1878). Obecnie choroba jest szeroko rozpowszechniona na całym świecie, szczególnie w strefie klimatu umiarkowanego (Ji i in. 2014). Sprawca choroby może występować endemicznie na glebach torfowych (torfy niskie), jak również na torfowiskach wysokich, skąd pozyskuje się torf do produkcji substratów (Robak 1981). Kiła kapusty to głównie choroba gleb zdegradowanych: piaszczystych, kwaśnych, ubogich w pożyteczną mikroflorę. Pożyteczne mikroorganizmy stają się bardzo ważnym czynnikiem w profilaktyce choroby. Symptomami porażenia przez *P. brassicae* są zgrubienia i wyrośla różnych kształtów na korzeniach bocznych i korzeniu głównym, zanikanie włóśników i związane z tym problemy z pobieraniem i transportem wody i składników pokarmowych, a w konsekwencji wędnięcie i zamieranie roślin (Dixon 2006). Zarodniki przetrwalnikowe *P. brassicae* posiadają zdolność do przeżycia w glebie nawet do 20 lat, zachowując przy tym zdolność do infekcji (Dixon 2009).

Ze względu na to, że *P. brassicae* jest pasożytem bezwzględny, zwalczanie powodowanej przez niego choroby jest bardzo trudne. Patogen ten jest mocno zróżnicowany biologicznie i występuje w postaci kilkunastu ras (patotypów), które różnicuje się przy pomocy zestawów roślin testowych. W Polsce najpowszechniej występującymi są patotypy 2, 4 i 7 (Robak 1991; Robak i in. 2013). Obecnie nie ma fungicydów, które skutecznie chroniłyby warzywa kapustne przed kiłą kapusty. Jednym ze sposobów ograniczania występowania tej choroby jest odpowiedni płodozmian oraz prawidłowo przeprowadzane zabiegi agrotechniczne.

W związku z wprowadzeniem od 1 stycznia 2014 r. obowiązku stosowania zasad integrowanej ochrony roślin w Polsce, wzrasta zainteresowanie stosowaniem środków niekonwencjonalnych, tj. biologicznych i biotechnicznych, w ograniczaniu występowania chorób. Stosowanie tych środków zwiększa bezpieczeństwo ludzi i środowiska oraz opóźnia uodpornienie się patogenów na substancje czynne obecne w środkach chemicznych.

Celem badań była ocena skuteczności nawozu fosforynowego Phos 60 EU stosowanego dolistnie i środka biologicznego Bacphos (*Bacillus amyloliquefaciens*) stosowanego dogłębowo w zwalczaniu kiły kapusty w uprawie kapusty głowiastej białej ‘Kamienna Głowa’.

MATERIAŁY I METODY

W Instytucie Ogrodnictwa przeprowadzono dwa doświadczenia: polowe i mikroplotkowe na roślinach kapusty głowiastej białej ‘Kamienna

Głowa' w celu oceny skuteczności działania dwóch środków: Phos 60 EU i Bacphos.

Phos 60 EU jest nawozem płynnym zawierającym fosforyn potasu i fosforyn amonu. Łatwość absorpcji przez rośliny i przemieszczania się sprawia, że działa układowo. W jego składzie znajduje się 43% fosforu (P_2O_5), 10% azotu (N) i 5% potasu (K_2O). Jest środkiem działającym fungistatycznie. Fosforyny wchodzące w skład nawozu wzmacniają strukturę błon i ścian komórkowych, dzięki czemu stanowią one lepszą fizyczną barierę dla wnikania patogenów. Ponadto są bardzo łatwo przyswajalne i doskonale przemieszczają się w roślinach poprzez ksylem i floem.

Środek Bacphos to koformulacja naturalnie występujących organizmów glebowych *Bacillus amyloliquefaciens*, azotu oraz fosforynów. Wprowadzone bakterie *B. amyloliquefaciens* rozwijają się przy systemie korzeniowym i tworzą otoczkę chroniącą korzenie przed atakiem patogenów. Korzyści wynikające ze stosowania Bacphosu to między innymi poprawa zdolności kiełkowania i rozwoju korzeni, zwiększona ilość i jakość plonów oraz poprawa kondycji roślin.

Doświadczenie 1 – mikropoletka

W mikropoletkach o powierzchni 1 m² inokulowano ziemię zawieszoną spor *P. brassicae*. Inokulum patogena pozyskano poprzez homogenizację porażonych korzeni roślin kapusty głowiastej. Po oczyszczeniu homogenizatu zagęszczenie zarodników określono przy użyciu komory Thoma pod mikroskopem optycznym. Patotyp pozyskanego inokulum określono metodą Williama (1966) przez pasażowanie z wykorzystaniem roślin testowych. Do każdego mikropoletka dodano 2 litry zawiesiny zawierającej 108 spor w 1 ml. Przed wysadzeniem roślin z losowo wybranych mikropoletek pobrano próby gleby do analizy ilości patogena w celu oceny skuteczności przeprowadzonej inokulacji. Ilość patogena *P. brassicae* w glebie określano przez pomiar ilości DNA patogena metodą qPCR. Reakcję qPCR z wykorzystaniem sondy Taqman prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w pracy Wallenhammar i in. (2012) przy użyciu zestawu LightCycler 480 Probes Master (Roche). Kontrolę negatywną stanowiła ziemia dwukrotnie autoklawowana i sterylizowana w temp. 150 °C przez 2 godz., przy ciśnieniu 2,5 atmosfery. Odnosząc się do krzywej standardowej wyznaczono, że średnia liczba spor w pojedynczym poletku wynosiła około 106 spor na 1 g gleby.

Doświadczenie założono w układzie bloków losowanych w 4 powtórzeniach. Na pojedyncze poletko o powierzchni 1 m² wysadzano 10 roślin

kapusty. Zabiegi wykonywano według schematu zamieszczonego w tabeli 1. Środkiem porównawczym był fungicyd Altima 500 SC (fluazynam).

Ocenę stopnia porażenia korzeni przez kiłę kapusty przeprowadzono dwukrotnie, pierwszą po 5 tygodniach po sadzeniu roślin i drugą po kolejnych 5 tygodniach z wykorzystaniem skali bonitacyjnej 0–3 (EPPO PP 1/39 (2), gdzie: 0 – brak wyrosła na całym systemie korzeniowym rośliny; 1 – pojedyncze zgrubienia na korzeniach bocznych; 2 – liczne zgrubienia na korzeniach bocznych i delikatne zgrubienie korzenia głównego; 3 – zniekształcenie całego systemu korzeniowego, jednolite wyrosła na korzeniu głównym. Za każdym razem ocenie poddawano 5 losowo wybranych roślin.

Doświadczenie 2 – pole

Doświadczenie założono w układzie bloków losowanych w 4 powtórzeniach na polu naturalnie zasiedlonym przez *P. brassicae*. Powtórzenie stanowiło jedno poletko o powierzchni 5 m². Na każdym poletku wysadzano 30 roślin. Przed wysadzeniem roślin z każdego poletka pobrano próbę gleby do analizy ilości patogenu. Każda z prób składała się z dziesięciu podpróbek losowo pobranych z całego poletka. Przeprowadzona izolacja DNA i qPCR była analogiczna, jak w doświadczeniu 1. Ustalony stopień porażenia gleby przez patogena wykorzystano do zmapowania pola (rys. 1), na którym prowadzone było doświadczenie.

Zabiegi wykonywano według schematu zamieszczonego w tabeli 1. Środkiem porównawczym był fungicyd Altima 500 SC (fluazynam).

Ocenę zdrowotności systemu korzeniowego przeprowadzono podobnie jak w doświadczeniu 1. Do oceny pobierano 10 i 20 roślin z każdego poletka, odpowiednio po 5 i 10 tygodniach od posadzenia roślin. Po zakończonym doświadczeniu pobrano próby korzeni do określenia patotypu patogena według metody Williamsa (1966).

Wyniki opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji. Do oceny istotności różnic pomiędzy średnimi użyto testu Newmana-Keulsa. Skuteczność środków obliczono za pomocą wzoru Abbotta (Abbott 1925).

Tabela 1. Schemat doświadczenia
Table 1. Scheme of trials

Badane środki; Treatments	Stężenie środka; Product concentration (%)	Uwagi; Details
1. Kontrola (control)	-	
2. Bacphos podlewanie (watering)	0,42	zabieg jednokrotny w paletkach; single treatment in multipallet
3. Bacphos podlewanie (watering)	0,42	zabieg jednokrotny w paletkach; single treatment in multipallet
Phos 60 EU	0,33	opryskiwanie 2x po posadzeniu co 2 tygodnie; spraying after planting 2x, every two weeks
4. Bacphos podlewanie (watering)	0,42	zabieg 2-krotny: 1. w paletkach, 2. po posadzeniu na miejsce stałe; treatment 2 times: 1 st in multipallet, 2 nd after planting at the permanent site
5. Bacphos podlewanie (watering)	0,42	zabieg 2-krotny: 1. w paletkach, 2. po posadzeniu na miejsce stałe; treatment 2 times: 1 st in multipallet, 2 nd after planting at the permanent site
Phos 60 EU	0,33	opryskiwanie 2x po posadzeniu co 2 tygodnie; spraying after planting 2x, every two weeks
6. Phos 60 EU	0,33	opryskiwanie 2x po posadzeniu co 2 tygodnie; spraying after planting 2x, every two weeks
7. Altima 500 SC	0,33	aplikacja doglebowa przed sadzeniem; soil application before planting

WYNIKI I DYSKUSJA

W badaniach mikropoletkowych najwyższą skuteczność ochrony kapusty głowiastej białej przed kiłą kapusty uzyskano na poletkach traktowanych nawozem Phos 60 EU (93%) i środkiem Bacphos zastosowanymi jednokrotnie w formie podlewanie (89,3%). Równie wysoką skuteczność uzyskano po zastosowaniu obydwu preparatów przemienne –

71,4%, przy czym Bacphos zastosowano dwukrotnie (tab. 2). Wyniki te potwierdziło doświadczenie polowe. Poletka traktowane nawozem Phos 60 EU w połączeniu ze środkiem Bacphos stosowanym dwukrotnie wykazały najwyższą skuteczność w ochronie kapusty przed kiłą kapusty (75%).

Tabela 2. Skuteczność środków biologicznych w ochronie roślin kapusty głowistej przed kiłą kapusty (*P. brassicae*) w doświadczeniu polowym – mikropoletka w 2015 roku

Table 2. Evaluation of the efficiency of biological agents in protecting cabbage plants against clubroot (*P. brassicae*) in fields experiment – microplots in 2015

Badane środki; Treatments	Stężenie środka; Product concentration (%)	Stopień porażenia skala 0–3; Disease index scale 0–3	Skutecz- ność;* Effective- ness (%)	Stopień porażenia skala 0–3; Disease index scale 0–3	Skutecz- ność;* Effective- ness (%)
		28.07.2015 I ocena 5 tygodni po sadzeniu I assessment 5 weeks after planting		10.09.2015 II ocena przed zbiorem II assessment before harvest	
1. Kontrola	-	2,8 a	-	2,8 a	-
2. Bacphos podle- wanie (watering)	0,42	0,2 e	93,0	0,3 b	89,3
3. Bacphos podle- wanie (watering) Phos 60 EU	0,42 0,33	2,5 a	10,7	2,8 a	-
4. Bacphos podle- wanie (watering)	0,42	2,1 b	25,0	2,2, a	21,4
5. Bacphos podle- wanie (watering) Phos 60 EU	0,42 0,33	0,7 d	75,0	0,8 b	71,4
6. Phos 60 EU	0,33	0 e	100	0,2 b	93,0
7. Altima 500 SC	0,33	1,2 c	57,1	2,7 a	3,6

Wartości w kolumnach oznaczone takimi samymi literami nie różnią się istotnie między sobą przy poziomie $p = 0,05$, test Newmana-Keulsa

Newman-Keuls test, means in columns followed by the same letter are not significantly different at $p = 0.05$

*skuteczność obliczona za pomocą wzoru Abbotta; the efficacy of product calculated by Abbott's formula

Tabela 3. Skuteczność środków biologicznych w ochronie roślin kapusty głowiastej przed kiłą kapusty (*P. brassicae*) w doświadczeniu polowym w 2015 rokuTable 3. Evaluation of the efficiency of biological agents in protecting cabbage plants against clubroot (*P. brassicae*) in fields experiment in 2015

Badane środki; Treatments	Stężenie środka; Product concentration (%)	Stopień porażenia skala 0–3; Disease index scale 0–3	Skutecz- ność;* Effective- ness (%)	Stopień porażenia skala 0–3; Disease index scale 0–3	Skutecz- ność;* Effective- ness (%)
		02.07.2015 I ocena 5 tygodni po sadzeniu I assesment 5 weeks after planting		10.09.2015 II ocena przed zbiorem II assesment before harvest	
1. Kontrola	-	1,4 a	-	1,2 ab	-
2. Bacphos podle- wanie (waternig)	0,42	0,1 bc	93,0	0,7 bcd	41,7
3. Bacphos podle- wanie (watering) Phos 60 EU	0,42 0,33	0,3 bc	78,6	1,4 a	-
4. Bacphos podle- wanie (watering)	0,42	0,2 bc	85,7	0,8 bc	33,3
5. Bacphos podle- wanie (watering) Phos 60 EU	0,42 0,33	0,1 bc	93,0	0,3 cd	75,0
6. Phos 60 EU	0,33	0,4 bc	71,4	0,4 cd	66,7
7. Altima 500 SC	0,33	0 c	100	0,7 bcd	83,3

Objaśnienie patrz tabela 2; Note see Table 2

Równie wysoką skuteczność (66,7%) uzyskano na poletkach traktowanych nawozem Phos 60 EU (tab. 3). W literaturze podaje się informacje o pozytywnym wpływie bakterii *B. amyloliquefaciens* na ograniczenie wzrostu niektórych patogenów glebowych w badaniach *in vitro* (Yuan i in. 2012; Ji i in. 2013).

Ocena skuteczności działania badanych środków Phos 60 EU i Bacphos wskazuje na możliwość zwalczania *P. brassicae* w uprawie kapusty głowiastej białej. Środki naturalne stanowią alternatywę dla chemicznych

środków ochrony roślin, są mało szkodliwe dla ludzi i środowiska oraz zwierząt i mikroorganizmów pożytecznych. Powyższe cechy pozwalają na ich wykorzystanie w integrowanych programach ochrony warzyw kapustnych.

Badania molekularne wykazały mniejsze zagęszczenie zarodników na polu doświadczalnym w porównaniu do mikropoletek. Średnia liczba spor na polu doświadczalnym wahała się od 10^3 do 10^5 spor/g ziemi (rys. 1). Na mikropoletkach średnia liczba spor wynosiła 10^6 spor/g ziemi. Różnice w ilości zarodników patogena w ziemi mogły przyczynić się do zaistniałych różnic w skuteczności badanych środków.



Rys. 1. Rozmieszczenie ilości spor patogena *P. brassicae* wykrytych przy pomocy reakcji qPCR w próbkach gleby pobranych z pola doświadczalnego przed wysadzeniem roślin.

Fig. 1. Arrangement the amount of spores of the pathogen *P. brassicae* detected using qPCR in soil samples collected from the experimental field before planting.

Testy pozwoliły stwierdzić, że patotyp pozyskanego inokulum wykorzystany do inokulacji mikropoletek to '4'. Patotyp uzyskany z korzeni pobranych z pola doświadczalnego to mieszanina patotypów '4' i '7'. Użyte patotypy najczęściej występują w Polsce (Robak 1991). Wysoka skuteczność badanych środków w stosunku do tych patotypów pozwoli na ich zastosowanie w ochronie warzyw kapustnych przed kiłą kapusty.

WNIOSKI

1. Środki Phos 60 EU i Bacphos wykazują wysoką skuteczność w ochronie kapusty głowiastej białej przed patogenem glebowym – *Plasmodiophora brassicae*.

2. Środki Phos 60 EU i Bacphos nie wykazują fitotoksyczności dla kapusty głowiastej białej 'Kamienna Głowa'.
3. Środki Phos 60 EU i Bacphos dają nowe możliwości ochrony kapusty głowiastej białej przed kiłą kapusty w systemie integrowanej ochrony.

Literatura

- Abbott W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18(2): 265–267. DOI: 10.1093/jee/18.2.265a.
- Dixon G.R. 2006. The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. – A review of recent advances. *Acta Horticulturae* 706: 271–282. DOI: 10.17660/Acta-Hortic.2006.706.32.
- Dixon G.R. 2009. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 194–202. DOI: 10.1007/s00344-009-9090-y.
- Ji S.H., Paul N.C., Deng J.X., Kim Y.S., Yun B.S., Yu S.H. 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology* 41(4): 234–242. DOI: 10.5941/MYCO.2013.41.4.234.
- Ji R., Zhao L., Xing M., Shen X., Bi Q., Peng S., Feng H. 2014. Infection of *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage. *Genetic and Molecular Research* 13(4): 10976–10982. DOI: 10.4238/2014.december.19.20.
- Nowicki B. 1984. Zróżnicowanie biologiczne *Plasmodiophora brassicae* Wor. w Polsce oraz podatność uprawianych roślin krzyżowych na wykryte patotypy grzyba. SGGW-AR, Warszawa, 76 s.
- Robak J. 1981. Występowanie kiły kapusty na glebach torfowych oraz jej zwalczanie metodami chemicznymi. Praca doktorska, Instytut Warzywnictwa, Skierniewice, 123 s.
- Robak J. 1991. Zmienność patotypów *Plasmodiophora brassicae* Wor. występujących w Polsce i ich patogeniczność w stosunku do odmian i linii hodowlanych *Brassica oleracea*. Prace habilitacyjne 6, Instytut Warzywnictwa, Skierniewice, 61 s.
- Robak J., Czubatka A., Czajka A. 2013. Kiła kapusty – monitorowanie i diagnostyka molekularna *Plasmodiophora brassicae* w uprawach roślin kapustowatych. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, 14 s. www.inhort.pl/files/program_wieloletni/wykaz_publicacji/obszar1/1.13_2013_1_Raport.pdf
- Wallenhammar A.-C., Almquist C., Söderström M., Jonsson A. 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathology* 61: 16–28. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02477.x.

- Williams P.H. 1966. A system for the determination of race of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* 56: 624–626.
- Woronin M.S. 1878. *Plasmodiophora brassicae*, Urheber der Kohlpflanzen-Hernie. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 11: 548–574.
- Yuan J., Raza W., Shen Q., Huang Q. 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology* 78(16): 5942–5944. DOI: 10.1128/AEM.01357-12.

Badania zostały wykonane w ramach programu wieloletniego „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Zadanie 2.3 – Analiza możliwości integrowanej ochrony wybranych roślin ogrodnich dla upraw małoobszarowych