

PREIZKUŠANJE DVEH METOD TESTIRANJA ODPORNOSTI SONČNIC NA GLIVO *ALTERNARIASTER HELIANTHI*

Sebastjan RADIŠEK¹⁸, Silvija FERK¹⁹

UDC / UDK 633.494:631.52:632(045)
izvirni znanstveni članek / original scientific article
prispelo / received: 15. 10. 2011
sprejeto / accepted: 01. 12. 2011

Izvleček

Ocenjevanje odpornosti sort in ostalega genetskega materiala na polju je močno odvisno od vremenskih pogojev, začetnega bolezenskega potenciala in različnega dozorevanja sort, kar velikokrat prispeva k dolgotrajnim postopkom pridobivanja realnih ocen in različnim vrednotenjem rezultatov. Iz omenjenega raziskovalci stalno razvijajo nove postopke vrednotenja, ki ponujajo hitrejše vrednotenje odpornosti v čim bolj uniformnih pogojih. Rezultati testiranj so ključnega pomena za izvajanje sortne politike posameznih regij ter žlahtniteljske programe, ki preko selekcij vzgajajo nove odporne sorte in hibride sončnic. V prispevku predstavljajmo vpeljavo in preizkušanje dveh metod umetnega okuževanja sončnic z glivo *Alternariaster helianthi* v kontroliranih pogojih rastne komore z namenom razvoja rutinskega postopka vrednotenja odpornosti.

Ključne besede: sončnica, *Helianthus annuus* L., *Alternariaster helianthi*, žlahtnjenje rastlin

COMPARISON OF TWO TESTING ASSAYS TO EVALUATE SUNFLOWER RESISTANCE AGAINST *ALTERNARIASTER HELIANTHI*

Abstract

The evaluation of how well varieties and other genetic material resist disease under field conditions is influenced by seasonal and environment conditions, variations in disease potential and differences in maturity between genotypes. Such assessments

¹⁸ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec,
e-pošta: sebastjan.radisek@ihps.si

¹⁹ Dipl. inž. hort., prav tam, e-pošta: silvija.ferk@ihps.si

demand longer procedures to obtain accurate evaluations of disease resistance; therefore researchers continue to develop new testing methods which offer faster and more reliable testing in uniform conditions. Disease resistance data presents important information for development of variety policy in a particular region and for breeding programs which select to breed new, resistant plant material. The manuscript presents implementation and comparison of two methods of artificially inoculating sunflowers by *Alternariaster helianthi* in the controlled conditions of a growing chamber.

Key words: sunflower, *Helianthus annus* L., *Alternariaster helianthi*, plant breeding

1 UVOD

Gliva *Alternariaster helianthi* (Hansford) E. G. Simmons (sin. *Helminthosporium helianthi* Hansford; *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishihara) je povzročiteljica temne pegavosti sončnic, ki spada med najbolj nevarne bolezni te pomembne kmetijske rastline. Bolezen najprej prepoznamo po temnih nekrotičnih pegah na listih, ki z napredovanjem povzroči propad listja, kar močno vpliva na zmanjšanje asimilacijske površine in s tem na prezgodnje dozorevanje sončnic. Okužbe na stebelu in zadnji strani koškov se izrazijo v obliki elipsastih in rahlo vdrtih temnih peg, ki lahko tudi razpokajo. Občutljivost tkiva se veča s starostjo, kar pomeni, da so starejši listi mnogo bolj okuženi kot mladi še razvijajoči listi (Allen in sod., 1983). Največje izgube pridelka (do 80 %) beležimo pri izbruhih v fazi cvetenja, ko rastline pričnejo z intenzivno mobilizacijo hranil v smeri razvoja semena (Carson, 1985). Razvoj bolezni je močno odvisen od vremenskih pogojev. Tako največje izbruhe in škode beležimo v tropskih in subtropskih regijah, kjer dolgotrajna obdobja pogostih padavin in hkratne visoke temperature omogočajo hiter bolezenski razvoj in posledično veliko škodo. Poleg sončnic lahko gliva *A. helianthi* okužuje tudi ostale rastline iz rodu *Helianthus* in nekaj rastlin iz sorodnih rodov kot je *Rudbeckia*. Gliva se ohranja in širi predvsem z okuženim semenom in ostanki okuženih rastlin, zato preprečevanje temelji predvsem na širokem kolobarju, razkuževanju semena in odpornih sortah. Škropljenje s fungicidi je z navadnimi traktorskimi škropilnicami možno samo v zgodnjem obdobju rasti, za kasnejšo uporabo pa so primerne posebej prilagojene škropilnice, v nekateri deželah pa uporabljajo tudi letala. Iz omenjenega sodobna pridelava sončnic večinoma temelji na odpornih sortah in hibridih, ki bistveno prispevajo k zmanjšanju razvoja bolezni. Setev odpornih sort tako predstavlja najcenejši način preprečevanja bolezni in je hkrati najmanj obremenjujoča za okolje, zato je vzgoja novih odpornih sort in hibridov bistvenega pomena za razvoj rastlinske produkcije. Ocenjevanje odpornosti sort in ostalega genetskega materiala na polju je močno

odvisno od vremenskih pogojev, začetnega bolezenskega potenciala in različnega dozorevanja sort, kar velikokrat prispeva k dolgotrajnim postopkom pridobivanja realnih ocen in različnim vrednotenjem rezultatov. Zato raziskovalci stalno razvijajo nove postopke vrednotenja, ki ponujajo hitrejše vrednotenje odpornosti v čim bolj uniformnih pogojih. Rezultati testiranj so ključnega pomena za izvajanje sortne politike posameznih regij ter žlahtniteljske programe, ki preko selekcij vzgajajo nove odporne sorte in hibride sončnic. V prispevku predstavljamo vpeljavo in preizkušanje dveh metod umetnega okuževanja sončnic z glivo *A. helianthi* v kontroliranih pogojih rastne komore z namenom razvoja rutinskega postopka vrednotenja odpornosti.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Izolacija glive in morfološka identifikacija

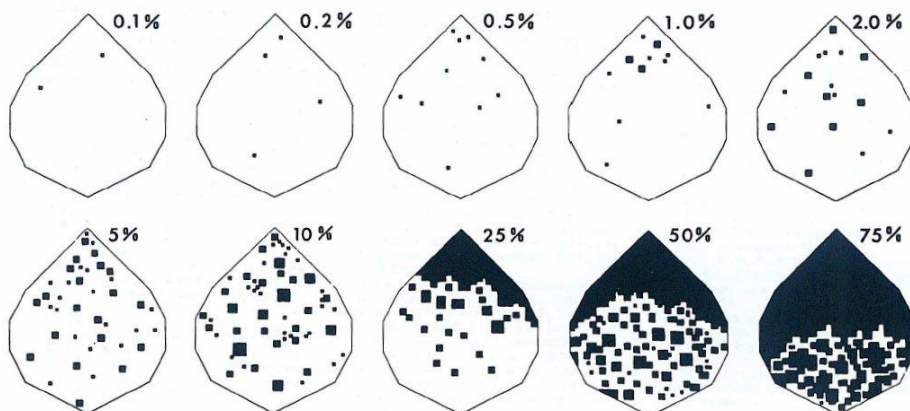
Izolacijo glive *A. helianthi* smo izvršili iz prizadetega tkiva listov sončnice, ki smo jih vzorčili na rastlinah sorte Kongo na poskusnem polju IHPS v Žalcu v letu 2010. Okužene liste smo predhodno mikroskopsko pregledali in determinirali prisotnost *A. helianthi* na osnovi morfoloških značilnosti (Simmons, 2007). V sterilnih pogojih smo izvedli površinsko sterilizacijo z namakanjem tkiva (1 min) v 2 % raztopini natrijevega hipoklorida (NaOCl). Koščke tkiva smo nato položili v petrijevke s krompirjevim dekstroznim agarjem (PDA-potato dextrose agar; pH 5.2; 50 mg streptomycin sulfat/l) in inkubirali pri sobni temperaturi v temi. Po 5 dneh smo izolirane kulture mikroskopsko pregledali in izolate *A. helianthi* precepili na sveže PDA in češpljevo laktosno gojišče (PLYA) (Talboys, 1960). Izolate smo do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

2.2 Umetno okuževanje

Vse poskuse smo izvajali v rastni komori (Kambič, RK-13300), pri čemer smo rastline izpostavili 80 % relativni zračni vlagi in 12-urni fotoperiodi fluorescentne svetlobe (L 58W/77; Fluora, Osram). Pri tem smo v času osvetlitve temperaturo komore naravnali na 20° C, v temni fazi pa na temperaturo 15° C. Poskuse smo izvajali na sortah Duško, Baća, Srijemac, Kongo, Rimi PR, Irigi (Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija) in NK Ferti Oleic (Syngenta). Kot vir okužbe smo izbrali reprezentativni izolat *A. helianthi* (No. IHPS 2010), ki smo ga z namenom indukcije sporulacije 2-3 tedne gojili na PLYA gojišču v temi pri sobni temperaturi.

Metoda 1

Testiranje temelji na foliarnem okuževanju z znano koncentracijo inokula in predstavlja uveljavljeno standardno metodo testiranja, ki so jo razvili Kong s sod., 1995. V našem poskusu smo inokulum pripravili s spiranjem kultur *A. helianthi* z sterilno destilirano vodo. Infekcijski potencial inokula smo s Thoma števno komoro umerili na koncentracijo 2×10^5 konidijev/ml. Za testiranje odpornosti posamezne sorte smo vključili 10 rastlin, ki smo jih okužili v fazi prvih dveh pravih listov. Rastline smo foliarno inokulirali z ročno razpršilko in takoj pokrili s prozorno PVC vrečko z namenom ohranjanja visoke zračne vlage in omočenosti listov. Pojav bolezni smo ocenjevali v intervalih 3, 7 in 10 dni po inokulaciji, kot delež prizadete površine kličnih in prvih dveh pravih listov z vizualnim ključem (slika 1), ki ga je izdelal Allen s sod. (1983). Prisotnost glive *A. helianthi* na prizadetem tkivu smo potrdili s svetlobnim mikroskopom in reizolacijo izolata.



Slika 1: Vizualni ključ za oceno deleža okužb sončnic z glivo *Alternariaster helianthi* na listih (Allen s sod, 1983)

Figure 1: Pictorial assessment key for *Alternariaster helianthi* infections on sunflower leaves (Allen et al., 1983)

Metoda 2

Okužba rastlin temelji na setvi rastlin v okužen substrat. Metoda ni standardna in se večinoma uporablja pri epidemioloških študijah patogenih organizmov. V primeru epidemioloških študij *A. helianthi* so to metodo razvili in uporabili Jeffery in sod. (1984). V našem poskusu smo inokulum pripravili z namakanjem narezanih delov sončnic (< 5cm) v 2 % raztopini glukoze in 0,1 % raztopini kalijevega nitrata preko noči. Namočen substrat smo nato parno sterilizirali (1h; 120°C; 1,5Bar) in okužili z dodajanjem celih kultur *A. helianthi* skupaj z PLYA agarjem (5 kultur/500g substrata). Sledila je 2-3 tedenska inkubacija v temi pri sobni temperaturi ob tedenskem ročnem mešanju substrata. Po inkubaciji smo inokulum zmešali s

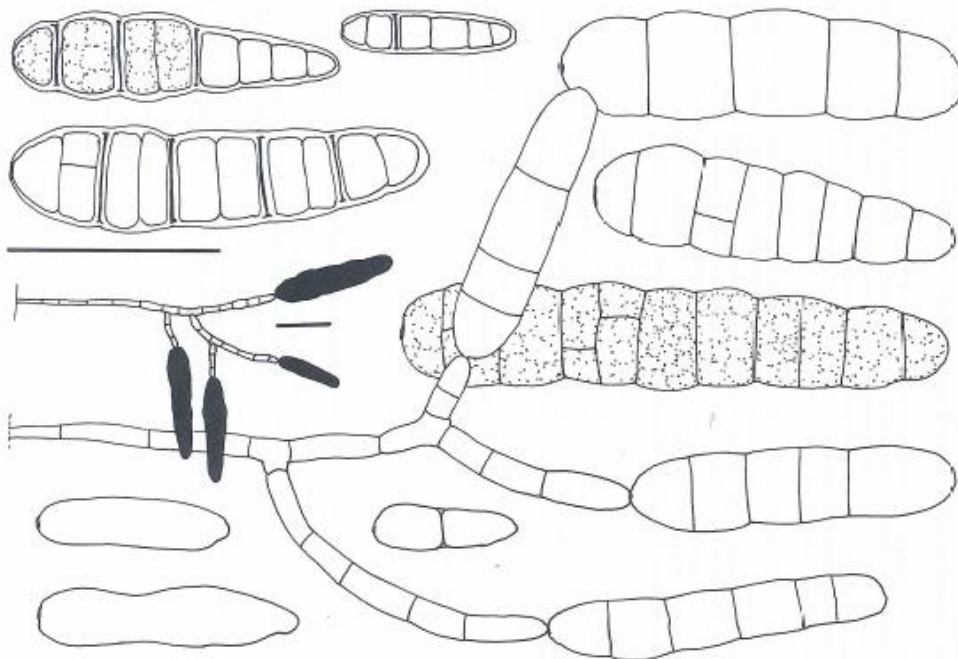
sterilnim rastnim substratom v razmerju 50:50 in vanj posejali 60 semen za posamezno sorto. Kontrolne rastline smo posejali v neokuženo mešanico ostankov sončnic in substrata v enakem razmerju in številu semen. Rastline smo po vzniku enako kot pri metodi foliarnega okuževanja gojili pod PVC vrečkami. Pojav bolezni smo ocenjevali 7 in 14 dni po vzniku kot število rastlin s prisotnimi bolezenskimi znamenji in število propadlih rastlin zaradi napredovanja okužbe. Ocenili smo tudi vznik v okuženem in neokuženem substratu.

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

V Sloveniji se število površin posajenih s sončnicami v zadnjih letih povečuje, predvsem zaradi zahtev upoštevanja kolobarja v skladu z integrirano pridelavo poljščin. Proizvodnja je večinoma usmerjena v pridelavo semena ali za zeleni podor, ponekod pa tudi kot surovina za bioplinarne in izdelavo biodizla. Izbira sort, ki so dostopne kmetom, je precej omejena, mnogi pa za setev uporabljajo seme, ki je namenjeno za prehrano ptic ali pa uporabljajo domače seme. Skladno z večanjem površin opazamo na območju Savinske doline tudi večjo frekvenco okužb sončnic z glivo *A. helianthi*. Med glavnimi razloge za posamezne večje izbruhe smo identificirali uporabo nerazkuženega domačega semena, setev na isto površino in vremenske pogoje, ki lahko močno vplivajo na razvoj bolezni. Ozek sortni izbor in pomanjkanje podatkov o odpornosti prav tako prispevajo svoj delež k nastanku izbruhov, zato smo v okviru poskusov pričeli z razvojem hitrih in zanesljivih metod testiranja odpornosti, s katerimi lahko vrednotimo odpornost obstoječih in novih sort z izolati *A. helianthi*, ki predstavljajo populacijo slovenskih pridelovalnih območij.

3.1 Morfološka identifikacija

Reprezentativne izolate *A. helianthi* smo identificirali na osnovi osnovnih morfoloških lastnosti, ki so jih razvili na rastlinskem tkivu in gojiščih PDA ter PLYA (slika 2). Kulture izolatov so razvile temno rjave septirane in razvejane hife na katerih smo odkrili razvejane kondiofore velikosti od 50 -150 μm . Najbolj prepoznaven ključ predstavljajo svetlo rjavi konidiji elipsate oblike s 5 -10 septami in zaobljenimi konci, velikosti 25 – 100 μm x 10-30 μm . Primerjava rasti in razvoja kultur na PDA in PLYA je pokazala višji nivo sporulacije *A. helianthi* na PLYA gojišču, zato smo to gojišče uporabili pri pripravi inokula za namene umetnih okužb.



Slika 2: *Alternariaster helianthi*: konidiji in konidiofori, črta = 50 μ m (Simmons, 2007)

Figure 2: *Alternariaster helianthi*: conidia and conidiophores, bar = 50 μ m (Simmons, 2007)

3.2 Metoda 1

Pri vpeljavi in preizkušanju foliarnega okuževanja smo potrdili pomembnost zagotavljanja vsaj 48 urnega obdobja 100 % vlage po nanosu inokula, ki smo ga zagotovili z rednim pršenjem s sterilno destilirano vodo in prekrivanjem inokuliranih rastlin s PVC vrečkami. Prva bolezenska znamenja smo opazili 2 dni po okužbi, kar potrjuje prvotne ugotovitve o kratki inkubacijski dobi (Allen in sod., 1983). Pri ocenjevanju smo se osredotočili na pojav bolezenskih znamenj na kličnih in prvem paru pravih listov ter stebel. Dinamiko napredovanja bolezni smo spremljali 3, 7 in 10 dni po inokulaciji. Najnižjo stopnjo okužb kličnih listov smo zabeležili pri sorti Bača in Ferti Oleic, medtem ko so bili pri sorti Irigi in Rimi PR klični listi močno kolonizirani. Okužbe pravih listov so se najmanj razvile na sorti Bača, Srijemac, Fert Oleic in Duško, ponovno najvišje deleže okužb pa smo zaznali na sortah Irigi in Rimi. Podobne rezultate beležimo tudi pri ocenjevanju stebelnih lezij, kjer smo najboljše razvoje bolezni ugotovili pri sortah Kongo, Irigi in Rimi PR. Rezultati foliarnega okuževanja (preglednica 1) tako kažejo na

večjo občutljivost sort Kongo, Irgi in Rimi PR. Razlik v inkubacijski dobi med sortami nismo zaznali.

Preglednica 1: Povprečne vrednosti deležev obolelosti tkiva različnih genotipov sončnic z glivo *Alternariaster helianthi* pri metodi foliarne aplikacije inokula v letu 2011

Table 1: Average proportion values of affected tissue of sunflower genotypes by *Alternariaster helianthi* by using foliar inoculum application in 2011

Sorta/hibrid	1. ocena (3 DPI)*			2. ocena (7 DPI)*			3. ocena (10 DPI)*		
	KL	L	S	KL	L	S	KL	L	S
Bača	15,7 ^b	16,4 ^b	1,2 ^a	37,7 ^a	36,3 ^a	3,5 ^a	66,8 ^a	51,5 ^a	12,5 ^b
Srijemac	17,7 ^b	16,0 ^b	1,5 ^b	59,8 ^d	33,8 ^a	3,5 ^a	87,0 ^c	53,3 ^b	7,0 ^a
Ferti Oleic	20,9 ^c	12,6 ^a	1,5 ^b	41,3 ^b	30,5 ^a	2,9 ^a	66,0 ^a	54,3 ^b	7,5 ^a
Duško	15,9 ^b	12,5 ^a	1,0 ^a	43,8 ^b	31,8 ^a	4,2 ^a	83,8 ^c	59,3 ^b	4,5 ^a
Kongo	9,9 ^a	13,4 ^b	5,7 ^b	37,0 ^a	34,3 ^a	15,4 ^b	78,3 ^b	67,5 ^c	27,0 ^c
Irgi	18,5 ^b	23,0 ^c	5,1 ^b	54,8 ^c	43,5 ^b	9,2 ^a	98,8 ^d	80,3 ^d	23,5 ^c
Rimi PR	22,4 ^c	26,3 ^d	7,0 ^c	65,8 ^e	54,0 ^c	23,5 ^c	93,5 ^c	82,3 ^d	33,0 ^d

* DPI - dnevi po inokulaciji; KL - klični listi; L - prvi par pravih listov; S - steblo

** povprečne vrednosti obolelosti z enako črko pri posameznem obravnavanju se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (Duncanov test mnogoterih primerjav, $\alpha = 5\%$)

3.3 Metoda 2

Setev rastlin v okužen substrat ni vplivala na vznik in zgodnje propadanje rastlin, saj nismo ugotovili razlik med setvijo v okužen in neokužen substrat. Prva bolezenska znamenja smo opazili 4-5 dni po vzniku na kličnih listih vseh sort. Pri sortah Irgi, Srijemac in Rimi PR smo pri prvem ocenjevanju zaznali tudi okužbe in lezije na steblo, ki so povzročile propad rastlin. Nadaljnja 7 dnevna inkubacija je pokazala najnižje število obolelih in propadlih rastlin pri sorti Bača in Irgi, medtem ko je bil delež obolelih in propadlih rastlin pri ostalih sortah primerljiv (preglednica 2).

Preglednica 2: Rezultati testiranja različnih genotipov sončnic na glivo *Alternariaster helianthi* v rastni komori z metodo setve rastlin v okužen substrat v letu 2011.

Table 2: Results of resistance testing of sunflower genotypes against *Alternariaster helianthi* in growing chamber by using infected soil substrate as a source of inoculum 2011.

Sorta	Vznik (%)		1 ocena (7 DPV)*		2. ocena (14 DPV)*	
	Neokužen substrat	Okužen substrat	okužene rastline (%)	propadle rastline (%)	okužene rastline (%)	propadle rastline (%)
Bača	83,3	90,0	7,7	0	22,2	5,5
Irgi	83,3	95,0	11,5	1,0	31,5	10,5
Srijemac	90,0	91,6	30,5	3,2	50,2	17,4
Kongo	90,0	86,6	15,0	0	53,1	8,0
Duško	88,3	98,3	27,4	0	54,9	15,2
Rimi PR	91,6	80,0	35,0	2,5	55,0	16,25
Ferti Ol.	93,3	96,6	11,3	0	59,0	17,5

*DPV- dnevi po vzniku.

4 SKLEPI

- Pri umetnem okuževanju sončnic v pogojih rastne komore ali rastlinjaka z glivo *A. helianthi* je ključnega pomena zagotovitev visoke relativne vlage (90-100%) pri temperaturah med 15-20°C. Inkubacijska doba v takšnih pogojih traja od 24-48 ur. V primeru foliranega okuževanja smo tako prva bolezenska znamenja opazili že 2 dni po inokulaciji, medtem ko so rastline v okuženem substratu razvile simptome po 4-5 dneh. Razlike v inkubacijski dobi med sortami nismo zaznali.
- Foliarno okuževanje omogoča homogen nadzor nad infekcijskim potencialom in enakomerno izpostavljenost vseh rastlin. Okuževanje preko talnega substrata ne zagotavlja uniformne foliarne izpostavljenosti rastlinskega tkiva, vendar se bolj realno približa pogojem na polju in je zato primernejše za proučevanje preživetvenih lastnosti *A. helianthi* ali testiranja odpornosti sončnic na talne patogene.
- V primeru foliarnega okuževanja smo med sortami zaznali večje razlike v odpornosti kot primeru talnega okuževanja. Nobena od sort ni izrazila izrazite odpornosti, identificirali pa smo dve zelo občutljivi sorti Rimi PR in Irgi.
- V primeru talnega okuževanja lahko homogenost in globina okuženega substrata močno vplivata na nastanek infekcij. Jeffery in sod.(1984) so ugotovili, da se število okužb sončnic poveča, če jih izpostavimo močnejšemu

površinskemu inokulu. Če takšen inokulum prekrijemo s tlemi, se število infekcij zniža. Primer sorte Irigi demonstrativno nakazuje na ta efekt, saj je sorta v primeru foliarnega okuževanja izrazila visoko stopnjo občutljivosti, v primeru talnega okuževanja pa smo zaznali nizko število okuženih rastlin.

- Z namenom ponovljivosti je potrebno pogoje testiranja standardizirati in hkrati vključiti referenčne sorte, ki predstavljajo interni standard testiranja.
- Zaradi pojava izgube virulence izolatov se pri testiranjih izogibamo starejšim izolatom, ki se več let ohranjajo na gojiščih. Izolatom je potrebno pred testiranjem določiti virulenco.
- Za testiranje odpornosti sončnic je primernejša metoda foliarnega okuževanja, pri čemer je priporočljivo ocenjevanja nadgraditi še z ocenami sporulacije nekrotičnih peg in merjenjem velikosti peg in lezij. Poskusi kažejo, da so te ocene v močni korelaciji z ocenami, ki so jih pridobili v okviru večletnih poljskih poskusov (Kong s sod., 1997).

Zahvala

Avtorja se zahvalujeta podjetju Syngenta Agro d.o.o in Institutu za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija, za seme sončnic. Poskus je potekal v okviru programa »Spodbujanje zaposlovanja dolgotrajno brezposelnih oseb 2009/2010«; Št pogodbe. 552-1-588/2009-9900-3-1416.

5 VIRI

- Allen S.J., Brown J.F., Kochman J.K. Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. *Plant Disease*. 1983; 67: 665-668.
- Carson M.L. Reaction of sunflower inbred lines to two foliar diseases. *Plant Disease*. 1985; 69: 986-988.
- Jeffery K.K., Lipps P.E., Herr L.J. Effects of isolate virulence, plant age, and crop residues on seedling blight of sunflower caused by *Alternaria helianthi*. *Phytopathology*. 1984; 74: 1107-1110.
- Kong G.A., Kochman J.K., Brown J.F. A greenhouse assay to screen sunflower for resistance to *Alternaria helianthi*. *Ann. Appl. Biol.* 1995; 127: 463-478.
- Kong G.A., Simpson G.B., Kochman J.K., Brown J.F. Components of quantitative resistance in sunflower to *Alternaria helianthi*. *Ann. appl. Biol.* 1997; 130: 439-451.
- Simmons E.G. *Alternaria* an Identification Manual. *CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrech, Netherlands*. 2007; str. 667.
- Talboys P.W. A culture medium aiding identification of *V.albo-atrum* and *V. dahliae*. *Plant Pathology*. 1960; 9: 57-58.