

Metody przydatne do oceny porażenia nasion fasoli przez *Colletotrichum lindemuthianum* oraz grzyby z rodzaju *Fusarium*

BARBARA ŁACICOWA, ZOFIA MACHOWICZ, DANUTA SULEK

Instytut Ochrony Roślin Akademii Rolniczej, Lublin, Akademicka 15

Łacicowa B., Z. Machowicz, D. Sułek. (Institute of Plant Protection, College of Agriculture, 20-033 Lublin, Akademicka 15, Poland), *Methods suitable for estimation of infection of bean seeds by Colletotrichum lindemuthianum and fungi of the genus Fusarium*, Acta Mycologica 11 (2):79-91, 1975.

Bean seeds were analyzed for infection by *Colletotrichum lindemuthianum* and fungi of the genus *Fusarium* using the method of isolation on maltose medium and by means of planting the seeds in moist sand. 38 samples of seeds from various varieties of beans were examined. Both methods proved to be suitable for the detection of fungi, but the percentage of seeds infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and fungi of the *Fusarium* genus can be estimated more precisely by determining the number of infected seedlings obtained from material planted in the sand. On the agar medium used the growth of *Colletotrichum lindemuthianum* and fungi from the *Fusarium* genus was impossible due to other fungi present in the plant material. Treatment of the bean seeds with a low temperature (-16°C for 12 hours) is necessary before using the method of isolation on maltose medium.

WSTĘP

Dobre plonowanie roślin uprawnych zależy w dużym stopniu od doboru zdrowego materiału siewnego. Ocena przydatności nasion do wysiewu, a więc i ich zdrowotności, prowadzona w Stacjach Oceny Nasion opiera się na wynikach analiz zalecanych przez ISTA (International Seed Testing Association). Podejmowanie jednak badań nad udoskonalaniem stosowanych obecnie metod do analizy sanitarnej materiałów siewnych oraz opracowaniem nowych jest wciąż sugerowane przez fitopatologów (Limonard 1967; Thomson 1970; Neergaard 1970). Wynika to głównie z konieczności ustalania faktycznego zakażenia nasion przez

patogeny, które przenosząc się przez materiał siewny przekazują choroby z jednej generacji roślin na drugą.

Poważne zagrożenie chorobowe upraw fasoli w Polsce wynikające z wysiewu nasion zakażonych przez *Colletotrichum lindemuthianum* i grzyby z rodzaju *Fusarium* (Lacicowa, Filipowicz, Machowicz 1973) nakazuje przeprowadzać dokładną analizę fitopatologiczną materiału siewnego tej rośliny. Zachodzi zatem potrzeba zalecenia do praktycznego stosowania najbardziej przydatnej metody do oceny porażenia.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na 38 próbach kwaflikowanego materiału siewnego różnych odmian fasoli z lat zbioru 1969, 1970 i 1971. Na podstawie wyników analizy mikologicznej stwierdzono w wybranych próbach częste występowanie *Colletotrichum lindemuthianum* i grzybów z rodzaju *Fusarium* (Lacicowa, Filipowicz, Machowicz 1973). Z każdej próby materiału siewnego wydzielano 60 nasion z brunatnymi plamami na powierzchni i 60 nasion normalnie zabarwionych. Doświadczenia przeprowadzono metodą szalkową wykładając nasiona na zestaloną pożywkę maltozową (Lacicowa, Filipowicz, Machowicz 1963) oraz równolegle — na wysterylizowany, wilgotny piasek kwarcowy o 40% pojemności wodnej (Cobry 1970).

W doświadczeniu pierwszym z każdej próby wykładano na 10 szalek Petriego po 30 nasion normalnie zabarwionych i po 30 nasion z brunatnymi plamami na powierzchni (po 6 sztuk na szalkę). Po 7 dniach przetrzymywania szalek w temperaturze 22°C oceniano porażenie nasion. Uwzględniono również kombinację, w której wyłożone na pożywkę nasiona, po 48 godzinach przetrzymywania w temperaturze 22°C, poddawano 12- lub 24-godzinnemu działaniu temperaturą -5°C, -10°C i -16°C (60 nasion w każdym zakresie temperatury).

Po upływie tego czasu przenoszono analizowany materiał do warunków pierwotnych i postępowano z nim tak, jak z nasionami nie potraktowanymi temperaturą ujemną.

Doświadczenie drugie przeprowadzono w takich samych kombinacjach jak pierwsze, wykładając nasiona powierzchniowo odkażone (Lacicowa, Filipowicz, Machowicz 1973) do piasku w blaszanych pojemnikach. Nasiona umieszczano na głębokości 2 cm zachowując między nimi pięciocentymetrową odległość. Po wyłożeniu ich przykrywano pojemniki szklanymi płytami i przetrzymywano w temperaturze 20—22°C na świetle rozproszonym, po czym przez 10 dni notowano liczbę siewek i obserwowano ogólną zdrowotność roślin. Doświadczenie zlikwidowano po 11 dniach, siewki wydobyto z piasku i poddano analizie makroskopowej. Wybrane części siewek z objawami chorobowymi wyło-

żono do komór wilgotnościowych (Łacicowa, Filipowicz 1969) dla uzyskania na powierzchni analizowanego materiału roślinnego wegetacji grzybów.

Ponadto spośród grzybów zasiedlających materiał siewny fasoli wytypowano siedem gatunków uznanych za chorobotwórcze dla tej rośliny oraz osiem gatunków saprofitycznych (tab. 1), w celu zbadania ich wzajemnego oddziaływania (Łacicowa 1973).

PRZEBIEG I WYNIKI BADAŃ

W badaniach dysponowano 19 próbami, w których znajdowały się nasiona porażone przez *Colletotrichum lindemuthianum* oraz taką samą liczbą prób wyróżniających się częstym zasiedlaniem nasion przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Ponieważ w każdej próbie materiału siewnego były nasiona normalnie zabarwione oraz nasiona z brunatnymi plamami na powierzchni, dlatego analizowano obydwie kategorie.

Po 7 dniach od wyłożenia materiału siewnego na pożywkę maltozową i przetrzymywania szalek w temperaturze 22°C wyróżniało się łatwo wyrosłe wokół nasion kolonie grzybów. Kolonie *Colletotrichum lindemuthianum* wzrastające na zastosowanym podłożu oraz w określonych warunkach temperatury charakteryzowały się ciemnooliwkowym zabarwieniem powierzchni o aksamitnej strukturze (ryc. 8). Grzyb ten najczęściej wytwarzał w tym czasie konidia. Jakkolwiek siedmiodniowe kolonie przedstawicieli rodzaju *Fusarium* podobne były do kolonii opisywanych przez Raiłło (1950), ale sporadyczne tylko zarodnikowanie ich w tym czasie oraz potrzeba oznaczenia do gatunku wymagały dalszych precyzyjniejszych badań (Raiłło 1950). W wyniku przeprowadzonej analizy za każdym razem z wytypowanych 19 prób nasion uzyskiwano kolonie *Colletotrichum lindemuthianum*, przy czym wyrastały one znacznie częściej wokół nasion z plamami na powierzchni, aniżeli z nasion normalnie zabarwionych (ryc. 1). Podobne wyniki otrzymano z badania prób materiału siewnego, w którym występowały często grzyby z rodzaju *Fusarium* (ryc. 1).

Po pięciodniowym przetrzymywaniu szalek w zastosowanych warunkach termicznych, z wyłożonych na pożywkę kiełkujących nasion uzyskiwano siewki fasoli z kilkucentymetrowym korzeniem głównym oraz epikotyłem z liścieniami (ryc. 2). Szybkie skielkowanie nasion oraz wzrost wytworzonych siewek był najczęściej przyczyną pęknięcia i odstawiania warstwy pożywki agarowej od dna szalek, co utrudniało wzrost koloniom grzybów zasiedlających materiał siewny. Natomiast poddanie nasion działaniu temperatury ujemnej uniemożliwiło rozwój kiełków (ryc. 3). Z uwzględnionej w eksperymencie temperatury ujemnej najodpowied-

Tabela 1

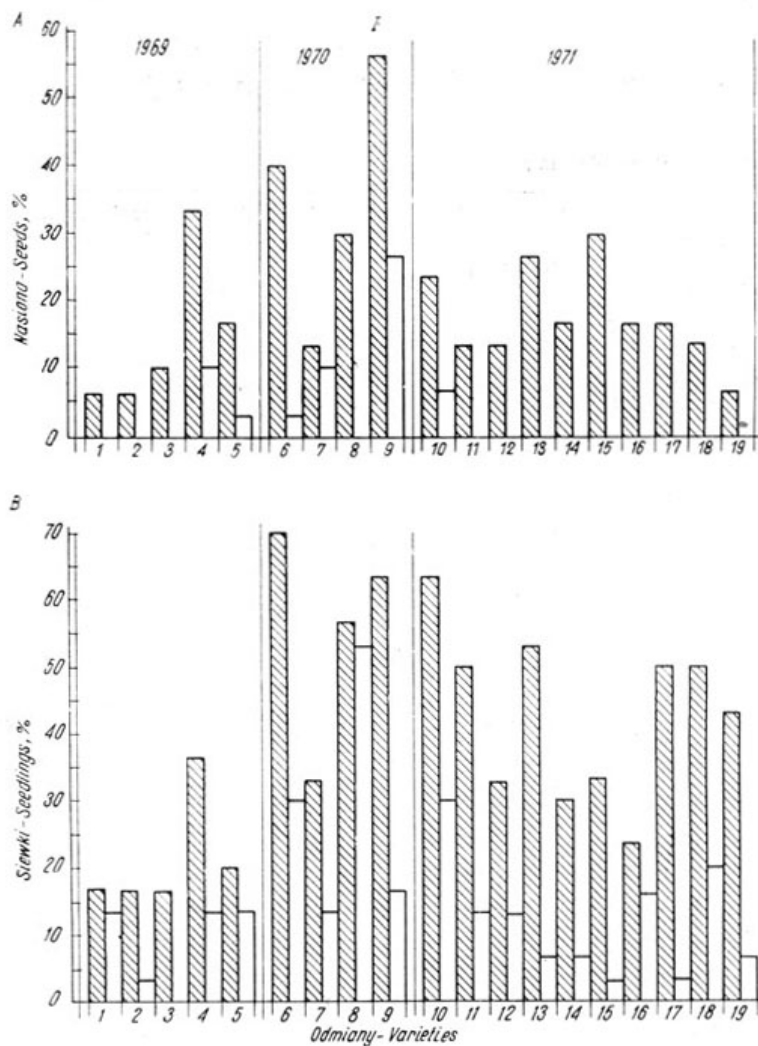
Badane grzyby testowane wyosobnione z nasion fasoli uporządkowane według
Fungi isolated for tests from bean seeds arranged in the order

Grzyby testowane Fungi testet	Licz- ba kolo- nii	Grzyby chorobotwórcze													
		Colletotrichum lindemu- thianum Sacc. et Magn.							Fusarium oxysporum (Schl.) Sny. et Hans.						
	No. of colo- nies	Stopnie oceny													
		3 -	2 -	1 -	0	1 +	2 +	3 +	2 -	1 -	0	1 +	2 +	3 +	
Alternaria tenuis Nees	530				530						530				
Penicillium roquefortii Thom.	119						119						119		
Penicillium nota- tum Westling	64							64						64	
Cladosporium herbarum Link ex Fr.	47				47						47				
Trichothecium roseum (Pers.) Lk.	25						52				25				
Penicillium chry- sogenum Thom	12					12							12		
Rhizopus nigri- cans Ehrenberg	6							6						6	
Trichoderma lig- norum (Tode) Harz	5								5					5	
Ogółem — Total	808				577	12	144	75			47	555	195	11	
%	100				71,4	1,4	17,8	9,2			5,8	68,8	24,1	1,4	

— Table 1

przydziału do poszczególnych stopni oddziaływania na wzrost grzybów testowych
of degree in which they affect the growth of the pathogenic fungi

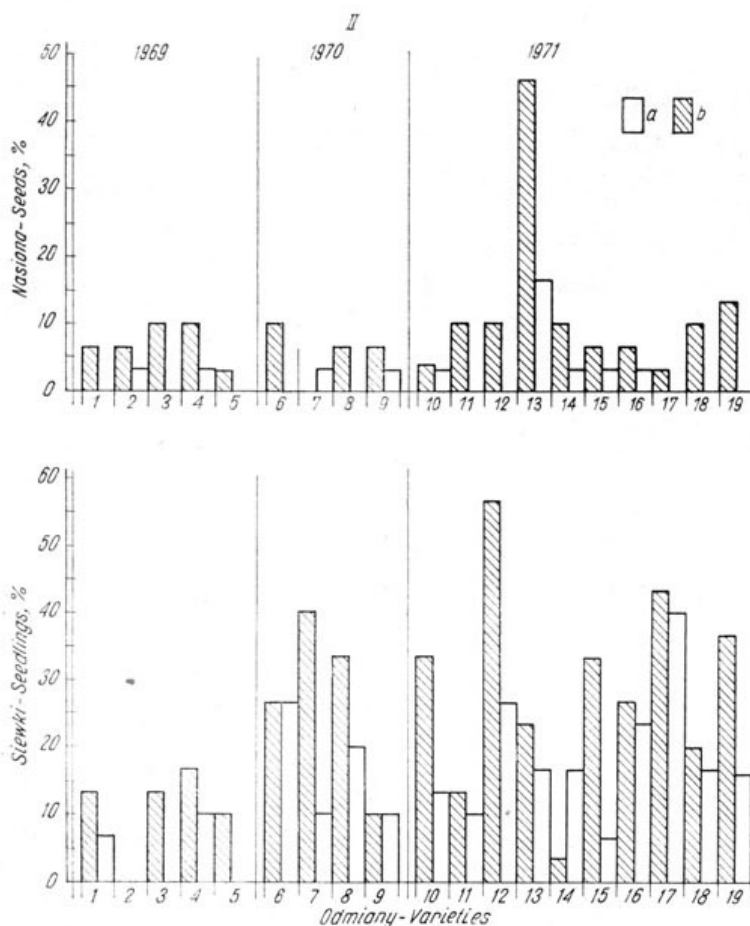
(testowe) — Pathogenic fungi																						
Fusarium roseum (Lk.) Sny. et Hans.					Fusarium solani Sny. et Hans.					Fusarium poae (Peck.) Wr.												
— Degrees of score																						
3	2	1	0	+	2	3	3	3	1	0	+	2	3	3	3	2	1	0	+	2	3	3
			530							530								530				
					119					119								119				
					64							64					64					
	47											47									47	
			25							25								25				
					12						12								12			
					6							6								6		
					5								5									5
	47	555		206						674	12	117	5				64	674	12	53	5	
	5,8	68,8		25,5						83,4	1,4	14,4	0,6				7,9	83,4	1,4	6,5	0,6	



Ryc. 1. (I) Występowanie *Colletotrichum lindemuthianum* w próbach materiału siewnego fasoli (objaśnienia na s. 85)

Occurrence of *Colletotrichum lindemuthianum* in the seedling material of the bean (Explanation see p. 85)

I — 1, 2, 3 'Harvester'; 4, 7, 8, 9, 16, 17 'Wiejska'; 5, 18, 19 'Złota Saxa'; 6 'Biała wyborowa'; 10 'Mamut'; 11 'Rakowicka'; 12, 13, 14, 15 'Szubińska'



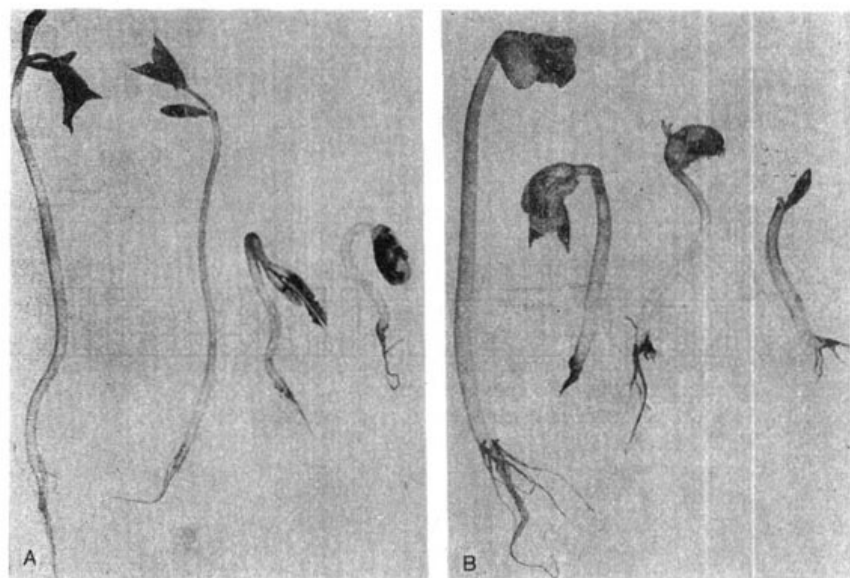
Ryc. 1. (II). Występowanie *Fusarium* w próbach materiału siewnego fasoli
Occurrence of *Fusarium* in the seeding material of the bean

A — metoda szalkowa; nasiona, z których uzyskano kolonie — w %; B — metoda kiełkowania nasion w piasku; siewki porażone — w %
A — plate method; seeds from which colonies were obtained — in %; B — method of sprouting seeds in sand; infected seedlings — in %

a — nasiona normalnie zabarwione, b — nasiona z plamami na okrywie nasiennej (odmiany)
a — normally coloured seeds; b — seeds with spots on the seed cover (varieties)

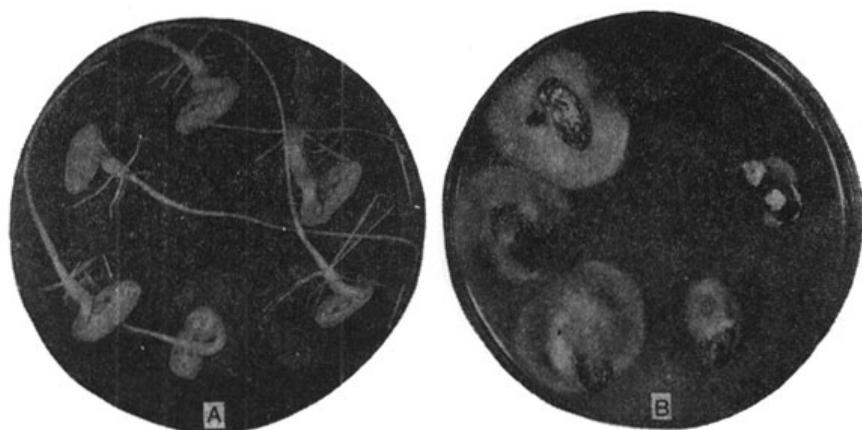
II — 1, 6, 11, 12 'Biała Wyborowa'; 2 'Saxa'; 3, 4, 14, 15 'Tanderlong'; 5, 9, 19 'Złota Saxa'; 7, 8, 16, 17, 18 'Wiejska'; 12 'Bomba'; 13 'Szubińska'

niejszą okazała się temperatura -16°C . Nasiona fasoli poddane 12-godzinnemu działaniu tą temperaturą zatraciły całkowicie zdolność kiełkowania, przy czym wyosobniono z nich podobną liczbę kolonii grzybów, jak z nasion nie potraktowanych temperaturą ujemną.



Ryc. 2. Siewki fasoli uzyskane z nasion porażonych przez *Colletotrichum lindemuthianum* (A) oraz z nasion porażonych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (B)
 Bean seedlings from seed infected by *Colletotrichum lindemuthianum* (A) and from seed infected by fungi of *Fusarium* spp. (B)

Analiza 11-dniowych siewek fasoli uzyskanych z nasion wyłożonych do wilgotnego piasku pozwoliła odróżnić rośliny porażone przez *Colletotrichum lindemuthianum* od roślin porażonych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Siewki otrzymane z nasion porażonych przez pierwszy grzyb wykazywały delikatną nekrozę na końcach korzeni i ciemnobrązowe, zaokrąglone plamy (2-4 mm) na liścieniach. Ponadto na blaszkach pierwszych liści takich siewek obserwowano występowanie nieregularnych brązowych plam o wyraźnie zarysowanych brzegach (ryc. 2A). Na piątą dzień od chwili wyłożenia roślin do komór wilgotnościowych występowały na powierzchni plam jasnobrunatne lub brunatnoczerwone skupienia zarodników *Colletotrichum lindemuthianum*. Natomiast siewki fasoli uzyskane z nasion porażonych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* charakteryzowały się silną nekrozą końców korzenia głównego i korzeni bocz-



Ryc. 3. Kolonie grzybów uzyskane z nasion fasoli

A — wyłożonych na pożywkę maltozową po 7 dniach przetrzymywania szalek w temp. 22°C;
 B — poddanych działaniu temperaturą -16°C przez 12 godzin

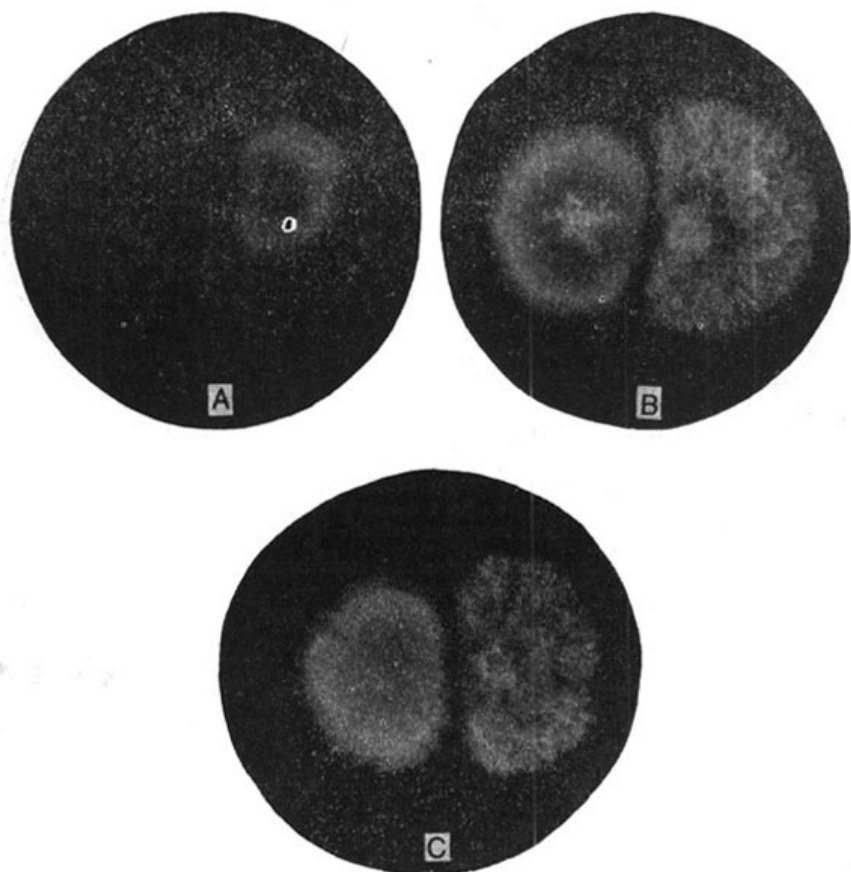
Colonies of fungi obtained from bean seeds

A — placed on maltose medium after 7 days of storage of the Petri dishes at 22°C;
 B — exposed to -16°C for 12 hours

nych oraz brunatnymi, rozlewnymi plamami na liścieniach (ryc. 2B). Liście takich siewek wolne były od objawów chorobowych. Analiza mikroskopowa preparatów przygotowanych z zarodników wytworzonych na chorych organach w komorach wilgotnościowych pozwalała na identyfikację badanych grzybów.

W wyniku zastosowanej metody kiełkowania nasion w piasku uzyskiwano za każdym razem większą liczbę siewek porażonych przez *Colletotrichum lindemuthianum* lub grzyby z rodzaju *Fusarium*, aniżeli kolonii tych grzybów wyrosłych z nasion wyłożonych na pożywkę maltozową (ryc. 1).

Uzyskane wyniki oceny stosunków biotycznych między analizowanymi gatunkami grzybów wskazują, że wśród gatunków testowanych ograniczających rozwój *Colletotrichum lindemuthianum* znalazły się: *Penicillium notatum*, *P. roquefortii*, *P. chrysogenum* oraz *Trichoderma lignorum* (tab. 1). Gatunki te wykazywały również ograniczające działanie na wzrost *Fusarium oxysporum* i *F. roseum* (ryc. 4). Obojętnie natomiast w stosunku do *Colletotrichum lindemuthianum* i wszystkich izolowanych gatunków z rodzaju *Fusarium* zachowała się *Alternaria tenuis*. Wyraźnie zróżnicowane oddziaływanie w stosunku do wybranych grzybów testowych wykazało *Cladosporium herbarum*. Ograniczało ono rozwój *Fusarium solani* i *F. poae*, wykazywało -1°C oddziaływanie w stosunku do



Ryc. 4. Wzajemne oddziaływanie grzybów po 6-dniowym okresie wspólnego rozwoju na pożywce maltozowej w temp. 22°C

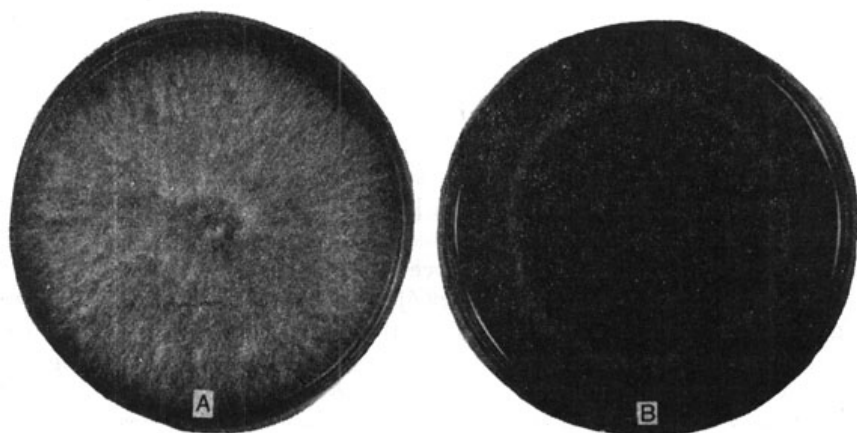
Interaction between the fungi after 6 days of development together on maltose medium at 22°C

A — *Colletotrichum lindemuthianum* (z lewej — left) i *Penicillium roquefortii* (z prawej — right); B — *Penicillium roquefortii* (z lewej — left) i *Fusarium oxysporum* (z prawej — right)
C — *Penicillium chrysogenum* (z lewej — left) i *Fusarium oxysporum* (z prawej — right)

F. oxysporum i *F. roseum* oraz zachowało się obojętnie względem *Colletotrichum lindemuthianum*.

DYSKUSJA

Analiza mikologiczna, prowadzona metodą izolacji na sztucznych podłożach, jest powszechnie stosowana w badaniach nad porażeniem nasion przez grzyby patogeniczne, przy czym do wykrywania ich wewnątrz-



Ryc. 5. Sześciodniowa kultura *Fusarium oxysporum* (A) i *Colletotrichum lindemuthianum* (B) wzrastająca na pożywce maltozowej w temp. 22°C
6-day culture of *Fusarium oxysporum* (A) and *Colletotrichum lindemuthianum* (B) growing on maltose medium at 22°C

nego zakażenia zaleca się często pożywkę maltozową (Kolk 1970; Neergaard 1970; Tempe 1970). Przy tego typu badaniach wskazane jest powierzchniowe odkażenie materiału siewnego dla usunięcia zewnętrznego zanieczyszczenia nasion przez mikroflorę saprofityczną (Tempe 1970). Wykazanie w obecnych badaniach możliwości wyosabniania z nasion fasoli *Colletotrichum lindemuthianum* oraz grzybów z rodzaju *Fusarium*, przy zastosowaniu pożywki maltozowej, potwierdziły jej przydatność do fitopatologicznej oceny materiałów siewnych (Tempe 1970). Obecne przepisy dotyczące analizy sanitarnej zalecają wysiew nasion fasoli na pożywki agarowe tylko do wykrywania ich porażenia przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (Naumowa 1973). Omawianą metodę można również zalecić do wykrywania i *Colletotrichum lindemuthianum* w materiale siewnym fasoli, przy czym należy ją udoskonalić potraktowaniem nasion temperaturą -16°C przez 12 godzin. Ujemna temperatura zastosowana po raz pierwszy przez Limonarda (1967) jest obecnie stosowana w Centralnej Stacji Oceny Nasion w Wageningen do wykrywania porażenia ziarna jęczmienia przez *Helminthosporium sorokinianum* (Tempe 1970).

Wysiew nasion do wilgotnego piasku jest zalecany do wykrywania porażenia materiału siewnego przez patogeny wywołujące objawy chorobowe na liścieniach, liściach, hipokotylu oraz korzeniach siewek (Colbry 1970). Do takich patogenów należą *Colletotrichum lindemuthianum* i grzyby z rodzaju *Fusarium*. W wyniku przeprowadzonych badań można zalecić omawiane metody do wykrywania grzybów z rodzaju *Fusarium*,

przy czym porażanie nasion fasoli przez różne gatunki wymaga prowadzenia dodatkowych badań laboratoryjnych dla ich oznaczenia (Łacicowa 1964).

Wybrane sposoby wykrywania *Colletotrichum lindemuthianum* oraz grzybów z rodzaju *Fusarium* w materiale siewnym fasoli są różne i dlatego wyniki analizy sanitarnej nie są jednakowe. Wysiewając nasiona do wilgotnego piasku uzyskiwano za każdym razem z tych samych prób materiału siewnego większą liczbę siewek porażonych przez badane grzyby, aniżeli ich kolonii na pożywce maltozowej. Należy przypuszczać, że na tym podłożu agarowym rozwój *Colletotrichum lindemuthianum* i grzybów z rodzaju *Fusarium* zasiedlających nasiona fasoli uniemożliwiają inne grzyby towarzyszące im w materiale siewnym. Głównie do takiego stwierdzenia upoważnia hamujące oddziaływanie na te grzyby gatunków z rodzaju *Penicillium*, licznie wyosabnianych z nasion fasoli (Łacicowa, Filipowicz, Machowicz 1973), które przez to mogą wywierać wpływ na wyniki analizy mikologicznej prowadzonej metodą izolacji na podłożach agarowych (Łacicowa 1973).

WNIOSKI

1. Częste występowanie *Colletotrichum lindemuthianum* oraz grzybów z rodzaju *Fusarium* w nasionach fasoli z brunatnymi plamami na powierzchni wydaje się podstawą do dyskwalifikowania tych partii materiałów siewnych, w których takie nasiona występują w dużym procencie.

2. Możliwość bezobjawowego zakażenia nasion fasoli przez *Colletotrichum lindemuthianum* i grzyby z rodzaju *Fusarium* wymaga również analizowania nasion normalnie zabarwionych.

3. Stacjom Oceny Nasion można zalecić obydwie metody — metodę izolacji na pożywce maltozowej oraz wysiew nasion do wilgotnego piasku — jako przydatne do wykrywania *Colletotrichum lindemuthianum* i grzybów z rodzaju *Fusarium* w materiale siewnym fasoli.

4. Traktowanie nasion fasoli temperaturą -16°C przez 12 godzin jest koniecznym zabiegiem do stosowania przy metodzie izolacji na pożywce maltozowej.

5. Możliwość równoczesnego określania zdolności kiełkowania oraz porażania nasion przez *Colletotrichum lindemuthianum* i grzyby z rodzaju *Fusarium* przy użyciu wilgotnego piasku jako podłoża upoważnia zalecić Stacjom Oceny Nasion szczególnie tą metodę do przeprowadzania analizy sanitarnej materiału siewnego fasoli.

LITERATURA

- Colbry V. L., 1970, Literature review and suggestions for rule changes pertaining to evaluation of bean seedlings, Proc. Int. Seed Test. Ass. 35: 403-416.
- Kolk H., 1970, Seedling diseases of cereals in Sweden, Proc. Int. Seed Test. Ass. 35: 57-67.
- Limonaard T., 1967, A modified blotter test for seed health, Neth. J. Path. 72: 319-321.
- Łacicowa B., 1964, Badania nad morfologią i biologią *Fusarium poae* (Peck.) Wr. oraz patogenicznością tego gatunku względem siewek pszenicy, Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, ser. C, 18: 419-439.
- Łacicowa B., Filipowicz A., 1969, Badania nad występowaniem *Helminthosporium gramineum* Rabh. (st. doskonałe *Pyrenophora graminea* (Died.) Ito et Kurib.) w uprawach jęczmienia jarego woj. lubelskiego, Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, ser. E, 24: 299-315.
- Łacicowa B., 1973, Wzajemne oddziaływanie niektórych grzybów zasiedlających materiał siewny zbóż, Acta Mycol. 9: 7-10.
- Łacicowa B., Filipowicz A., Machowicz Z., 1973, Próby oceny zagrożenia chorobowego przez grzyby patogeniczne fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) uprawianej w Polsce, na podstawie analizy nasion. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, ser. E (w druku).
- Naumowa N., 1973, Fitopatologiczna ocena nasion, PWRiL, Warszawa.
- Neergaard P., 1970, Seed Pathology, International Cooperation and Organization, Proc. Int. Seed. Test. Ass. 35: 19-42.
- Railló A. J., 1950, Grzyby roda *Fusarium*, Moskwa.
- Tempe J. de, 1970a, Routine methods for determining the health condition of seeds in the Seed Testing Station, Proc. Int. Seed. Test. Ass. 35: 257-296.
- Tempe J. de, 1970b, The determination of *Drechslera sativa* in Barley, Proc. Int. Seed. Test. Ass. 35: 185-191.
- Thomson J. R., 1970, Health as a Factor in Seed Quality, Proc. Int. Seed. Test. Ass. 35: 9-17.