

Badania laboratoryjne zmienności kultur *Ascochyta fabae* uzyskanych z bobiku

ANTONI JÓZEF FILIPOWICZ

Katedra Fitopatologii i Techniki Ochrony Roślin, Akademia Rolnicza w Lublinie

Filipowicz A. J.: (Department of Phytopathology, Academy of Agriculture, 15 Akademicka st., 20-934 Lublin, Poland). *Laboratory investigations of variability of *Ascochyta fabae* Speg. isolates obtained from horse bean*, Acta Mycol. 22 (2): 165-171, 1986 (1988).

Fifty five isolates of *Ascochyta fabae* Speg. were investigated. They were selected from 1650 isolates of this fungus obtained from horse bean seeds in 1974-1976. All the isolates grew and sporulated on Potato Dextrose Agar, Malt Agar and Horse Bean Agar. The rate of their growth amounted to 1-4 mm per 24 hours. The variability of isolates in size of pycnidia and conidia and number of septa was noticed. A few spores with untypical shapes were observed as well.

WSTĘP

Ascochyta fabae została wyizolowana przez Spegazziniego w Argentynie z nekrotycznych plam występujących na nadziemnych organach bobiku i opisany w 1899 roku. Następnie grzyby z tego rodzaju na roślinach motylkowatych badał Sprague (1929). Autor ten stwierdził, że gatunki z rodzaju *Ascochyta* występujące na grochu i bobiku mają wiele cech wspólnych, przy czym występujące na bobiku tworzą znacznie większe zarodniki. Sprague uznał, że na obydwu roślinach występuje ten sam gatunek: izolatom z bobiku nadał nazwę *Ascochyta pisi* var. *fabae*. Jednak późniejsze badania licznych autorów (które omawiają Borema i in. 1973, 1979) wykazały istnienie odrębnego gatunku, *Ascochyta fabae* Speg. Jedynie Mielnik (1977) reprezentuje inny pogląd: opierając się na zaleceniach Międzynarodowego Kongresu Nomenklatury Botanicznej uznał *Ascochyta fabae* za synonim *Ascochyta boltshauseri* opisanego przez Saccardo w 1891 roku. Wobec pewnych wątpliwości dotyczących poglądu Mielnika oraz z powodu powszechnego używania nazwy zaproponowanej przez Spegazziniego w niniejszej pracy posłużono się nazwą *Ascochyta fabae*. Według Mielnika *Ascochyta boltshauseri*

Sacc. poraża rośliny z rodzajów *Lens*, *Coronilla*, *Onobrychis*, *Orobus*, *Phaseolus*, *Trifolium* i *Vicia* oraz inne z rodziny motylkowatych. Natomiast *Ascochyta fabae* Speg. wg Beaumonta (1950), Sprague (1929) oraz Tichonowej i Kaszmanowej (1970) może w słabym stopniu porażać groch, peluszkę i wykę, czego nie potwierdziły badania Gindrata (1969), Sundheima (1973) oraz Wallena i Galway (1977). Wydaje się więc, że *Ascochyta fabae* jest patogenem ściśle przystosowanym do porażania *Vicia faba*.

Wśród grzybów powodujących choroby bobiku za szczególnie groźny uznano *Ascochyta fabae*. Gatunek ten przenoszony jest głównie z materiałem siewnym. Z nasionami importowanymi z Wielkiej Brytanii zawleczono go m.in. do Kanady (Gorley, Delbridge 1973), Australii (Randlers, Dubé 1977) oraz Nowej Zelandii (Newton, Hill 1978). Derenne (1967) prowadząc badania nad askochytozą bobiku wyraził przypuszczenie, że na terenie Szwajcarii istnieją bardziej i mniej wirulentne formy *Ascochyta fabae*, a Dodd (1971) sugeruje, że w obrębie izolatów tego patogena istnieje zmienność. Przesyłanie i wymiana materiału siewnego niesie więc możliwość rozprzestrzeniania bardziej wirulentnych kultur tego grzyba. Ponieważ zmienność morfologiczna kultur grzyba niekiedy bywa skorelowana z różnicami w jego patogeniczności, w badaniach tych starano się wykazać różnice w izolatach *Ascochyta fabae* otrzymanych z terenu Polski.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiło 55 kultur *Ascochyta fabae* Speg. wybranych spośród 1650 izolatów tego grzyba uzyskanych w czasie badań mikroflory nasion bobiku (Filipowicz 1985). Wytypowano po 5 kultur pochodzących z województw: Siedlce, Zamość, Kielce, Przemyśl i Krosno oraz po 3 izolaty z województw: Suwałki, Szczecin, Olsztyn, Katowice, Konin, Gorzów, Wrocław, Wałbrzych, Jelenia Góra i Legnica. Pod względem pochodzenia kultury reprezentowały wszystkie makroregiony, na terenie których uprawiany jest bobik oraz większość stref rolniczo-klimatycznych naszego kraju. Wybór izolatów z poszczególnych województw polegał na makroskopowym uchwyceniu różnic w zabarwieniu grzybni powietrznej, podłoża, szybkości wzrostu i intensywności wytwarzania pyknidiów, co obserwowano w czasie wstępnej segregacji kultur rosnących na skosach.

Celem badań było ustalenie wpływu różnych podłoży na wzrost, cechy makroskopowe kolonii oraz ustalenie wymiarów konidiów poszczególnych izolatów. Obserwacje prowadzono na trzech rodzajach pożywek zestalonych agarem: bobikowej (wyciąg wodny z 50 g śruty z nasion bobiku, uzupełnione wodą do 1000 ml), maltozowej (2.5% wodny roztwór ekstraktu „Malto”) oraz ziemniaczano-glukozowej (Potato-Dextrose, Difco).

Badania prowadzono na szalkach Petriego o średnicy 10 cm. Szalki z pożywką szczepiono inokulami jednakowej wielkości. Inokula pochodziły z 10-dniowych, jednozardnikowych kultur badanych izolatów, które rosły w temperaturze 20-22°C w świetle rozproszonym. Dla każdego izolatu i pożywki obserwacje prowadzono w czterech powtórzeniach (traktując jedną szalkę jako powtórzenie). Po 10 dniach wzrostu opisywano cechy makroskopowe uzyskanych kultur, analizując strukturę powierzchni i barwę grzybni powietrznej oraz zabarwienie spodu kolonii. Wzrost liniowy grzybni zmierzono po 14 dniach jako średnią z ośmiu pomiarów (4 powtórzenia \times 2 pomiary średnicy kolonii na krzyż). Pomiary pyknidiów i konidiów wykonywano z 14-dniowych kultur rosnących na pożywce bobikowej w temperaturze 20-22°C w świetle rozproszonym. Z każdej kultury grzyba mierzono długość i szerokość oraz określano liczbę przegród dla 100 zarodników.

WYNIKI BADAŃ

W wyniku badań laboratoryjnych stwierdzono, że wszystkie analizowane kolonie gatunku *Ascochyta fabae* wytwarzały pyknidy i konidia na trzech użytych pożywkach (ryc. 1-3). Owocniki i zarodniki były równie licznie wytwarzane na pożywce bobikowej i ziemniaczano-glukozowej, natomiast na pożywce maltozowej mniej obficie.

Grzybnia wyrastała najbujniej na pożywce ziemniaczano-glukozowej. Grzybnia powietrzna była watowata, luźna, do 10 mm wysoka, białokremowa, białoróżowa lub białooliwkowa, z czasem nieco ciemniejąca. Zabarwienie spodu kolonii, zwykle kremowe lub oliwkowe, w przypadku izolatu L 906 czerwonawe. W zastosowanych warunkach wzrost liniowy kolonii średnio szybki lub powolny. W czasie 14 dni tylko niektóre kolonie (Kr 858, P 1082, P 1100, P 1108, P 1123, Wa 1192, Wr 1168, Sz 1145, Si 1135) zarastały całkowicie szalki z pożywką bobikową i ziemniaczano-glukozową. Natomiast inne rosły wolniej, a L 916 i Ka 704 nie przekroczyły nawet średnicy 40 mm. Najszybszy wzrost liniowy kolonii obserwowano na pożywce bobikowej i ziemniaczano-glukozowej.

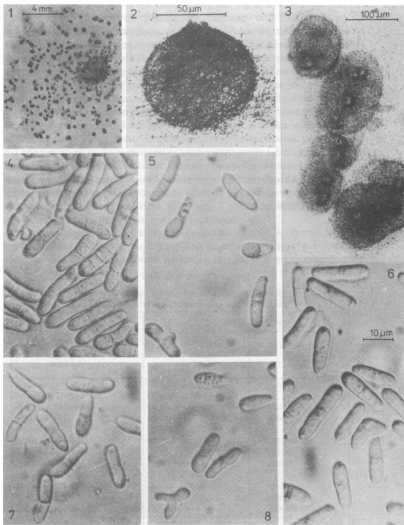
Po 6-8 dniach wytwarzały się dość liczne pyknidy częściowo pogrążone w podłożu. Gatunek *Ascochyta fabae* wytwarzał pyknidy kuliste, niekiedy nieco spłaszczone o wymiarach 80-200 μm , z uściem na szczycie 10-15 μm (ryc. 2). Gdy pyknidy łączyły się ze sobą wytwarzając 2-4 ujścia, osiągały wymiary do 300 μm (ryc. 3). Nie zauważono różnic w wymiarach pyknid u poszczególnych kultur grzyba. Ściany pyknid zbudowane z pseudoparenchymy, grubsze na szczycie niż u podstawy. Na szczycie owocnika komórki drobniejsze o grubszych ścianach i w związku z tym o wyraźnie widocznej, ciemniejszej obrączce wokół ujścia. Trzonków konidialnych nie zauważono.

Konidia cylindryczne, zaokrąglone na końcach, zwykle proste, najczęściej dwukomórkowe. Wśród badanych 55 izolatów *Ascochyta fabae* występowanie takich konidiów notowano od 71% do 100%. Zarodniki jednokomórkowe występowały od 1 do 29%, natomiast trzykomórkowe występowały od 1 do 15% (tab. 1). W przypadku kultury oznaczonej Si 1234 wystąpiły sporadycznie zarodniki czterokomórkowe (ryc. 4). Występowania zarodników jednokomórkowych nie stwierdzono w szesnastu izolatach. Zarodniki trzykomórkowe występowały w dziewięciu izolatach. Grubość konidiów wynosiła od 3 do 7 μm , z przewagą 4 do 5 μm (tab. 1). W jednym przypadku (Wa 1192) występowały sporadycznie zarodniki o grubości powyżej 7 μm . Długość zarodników wynosiła od 10 do 30 μm , przy czym dominowały konidia od 14 do 22 μm (tab. 1). Zarodniki o długości nie przekraczającej 20 μm występowały w dziewięciu izolatach. Natomiast długość zarodników była zawsze większa od 16 μm w dziewięciu izolatach. Zauważono, że izolaty z przewagą zarodników o mniejszych wymiarach pochodziły z województw Jelenia Góra, Gorzów, a częściowo Zamość i Legnica, natomiast zarodniki większe z województw Krosno i częściowo z Zamościa, Szczecina i Siedlec (tab. 1).

Wśród typowych konidiów obserwowano nieliczne zarodniki o odmiennych kształtach. W izolacie JG 617 (ryc. 5) występowały zarodniki dwukomórkowe z wyrostkiem – brodawką na jednej z komórek. W izolatach Wr 1171 i Ka 687 (ryc. 6) stwierdzono obecność zarodników zakrzywionych, bumerangowatych, natomiast w izolacie G 591 (ryc. 7) konidiów maczugowatych. Wśród zarodników izolatów G 615 (ryc. 8) notowano konidia rozwidlone w kształcie litery Y. Izolaty odznaczające się nietypowym kształtem konidiów pochodziły ze Śląska lub zachodniej Polski. Ponadto zauważono, że niektóre izolaty odznaczały się występowaniem zarodników przewężonych w miejscu przegrody, które częściowo rozpadały się w pojedyncze komórki. Ponieważ jednak pojedyncze komórki z rozpadniętego konidium różniły się od zarodników jednokomórkowych proporcjami grubości do długości, można je było łatwo rozróżnić od tych ostatnich.

DYSKUSJA

Cechy makroskopowe grzybni powietrznej na pożywkach agarowych opisane przez B o e r e m ę i D o r e n b o s c h (1973) oraz Y u (1947) okazały się zgodne z podanymi w niniejszej pracy. Kolonie po tygodniu wzrostu grzyba osiągają średnicę od 1,5 cm do 4,5 cm (B o e r e m a i D o r e n b o s c h 1973), co także stwierdzono w wyniku badań własnych. Grzybnia rozwija się w temperaturze od 8°C do 33°C, a optimum wynosi 25°C (Y u 1947). Natomiast wg W a l l e n a i G a l w a y (1977) optymalny wzrost zachodzi w temperaturze 20°C. *Ascochyta fabae* rośnie w przedziale pH od 3,8 do 9,0, przy czym najbardziej korzystne do rozwoju grzyba jest pH 6,8 (Y u 1947). Z zastosowa-



Ryc. 1-8. *Ascochyta fabae* Speg.

1 - kultura na polycywie bobikowej (colony on horse bean agar); 2 - pyknidium (pycnidium); 3 - pyknidy (pycnidia); 4-8 - konidia, kultury (conidia, isolates), 4 - Si 1234, 5 - JG 617, 6 - Wr 1171, 7 - G 591, 8 - G 615

nych pożywek agarowych omawiany grzyb, wg Wallena i Galway (1977), rósł najlepiej na pożywce maltozowej, zaś wg Yu (1947) na pożywce ziemniaczano-glukozowej. Wymienieni badacze oraz Gourley i Delbridge (1973) stwierdzają, że *Ascochyta fabae* najobficiej owocuje na pożywce z nasion bobiku, przy czym Yu (1947) zauważył, że szczególnie obficie wytwarzają się pyknidy po kilku przeszczepieniach. Sundheim (1973) stwierdził natomiast, że zarodnikowanie na pożywkach agarowych było bardzo skąpe, a w celu pobudzenia grzyba do owocowania wskazane jest naświetlanie kultur promieniami zbliżonymi do ultrafioletu. W przeprowadzonych badaniach wszystkie analizowane izolaty zarodnikowały na trzech zastosowanych podłożach, przy czym najobficiej na pożywce bobikowej. Konidia wytwarzane na podłożach agarowych charakteryzowały się podobną wielkością, jak zarodniki uzyskane z chorych roślin, natomiast pyknidia odznaczały się znaczną zmiennością wymiarów (Yu 1947). Wobec zaobserwowanej zmienności przytacza się wymiary pyknidiów i zarodników konidialnych wg różnych autorów (tab. 2). W wyniku badań własnych stwierdzono, że wymiary pyknidiów wynosiły od 80 do 300 μm , natomiast konidiów 10-30 \times 3-7 μm , a więc odpowiadały wielkością dotychczas opisanym dla gatunku *Ascochyta fabae*.

Odrębnym zagadnieniem jest występowanie zmienności w obrębie gatunku *Ascochyta fabae*. W bogatej literaturze dotyczącej omawianego patogena nie znaleziono praktycznie opracowań na ten temat. Jedynie, co zaznaczono we

Tabela 2 - Table 2

Wymiary pyknidiów i konidiów (μm) *Ascochyta fabae* Speg.
Size of pycnidia and conidia (μm) *Ascochyta fabae* Speg.

Autor Author	Wymiary - Size of	
	konidiów conidia (μm)	pyknidiów pycnidia (μm)
Beaumont (1950)	12-23 \times 4-6	80-150(200)
Boerema i Dorenbosch (1973)	14,5-24 \times 3,5-6	
Gourley i Delbridge (1973)	14-23 \times 3-6	80-150(200)
Mielnik (1977)	12-25 \times 4-7	100-200(250)
Ondřej (1971)	16-35 \times 5-8	
Rauckite (1966)	15-23 \times 3-6	180-240
Ruokola i Vestberg (1978)	12-23 \times 2,5-4	172-327
Spegazzini (1899)	10-25 \times 5-6	100-120
Sprague (1929)	14,5-25 \times 3,5-6	
Strukczinskas (1977)	13,8-28 \times 6,3-6,7	93-225
Sundheim (1973)	14,4-25,2 \times 3,6-7,2	100-180
Tichonowa i Kaszmanowa (1970)	15,8-23,2 \times 4,5-6	220-240(400)
Yu (1947)	14-30,4 \times 3,8-7,9	92-301
Žierbele (1963)	13,5-27 \times 3,6-6	

wstępie, D e r e n n e (1969) wyrażał przypuszczenie, że na terenie Szwajcarii istnieją zapewne formy mniej i bardziej wirulentne, a D o d d (1971) sugerował, że w obrębie izolatów tego patogena istnieje zmienność.

Badania własne wykazały, że w obrębie 55 kultur *Ascochyta fabae* pochodzących z różnych rejonów Polski istnieje znaczna zmienność. Zmienność ta wyraziła się w cechach makroskopowych kultur i mikroskopowych konidiów, jak też w szkodliwości grzyba dla roślin w warunkach szklarniowych (F i l i p o w i c z 1983) i polowych (F i l i p o w i c z 1985). W warunkach szklarniowych najbardziej chorobotwórcze okazały się kultury pochodzące z południa Polski. Być może specyficzne warunki środowiska (wyższa i równomiernie występująca temperatura, regularne podlewanie) spowodowały ujawnienie się chrobotwórczości tych izolatów (F i l i p o w i c z 1983). Natomiast w warunkach polowych przy zmiennych opadach i znacznie niższej niż w szklarni temperaturze większą wirulencję ujawniły kultury pochodzące z południowego zachodu i północnego wschodu naszego kraju. Jednak w 1979 r., gdy suma opadów w okresie wegetacji była niska, a średnia temperatura wysoka, szczególnie szkodliwe okazały się niektóre kultury z południa Polski. Podobnie w chłodnym i obfitym w opady sezonie 1978 roku najwyższą wirulencją odznaczały się izolaty pochodzące z południowego zachodu, wschodu i północnego wschodu naszego kraju (F i l i p o w i c z 1985). Fakty te wskazują na różnice w przystosowaniu się poszczególnych szczepów *Ascochyta fabae* do zmiennych warunków środowiska w różnych regionach Polski.

Mimo, że zanotowano różnice w wyglądzie, tempie wzrostu grzybni i intensywności zarodnikowania poszczególnych kultur *Ascochyta fabae* na różnych pożywkach *in vitro* oraz w chorobotwórczym oddziaływaniu tych izolatów na rośliny bobiku, nie udało się tych cech powiązać ze sobą. Być może do tego celu potrzebny jest bogatszy zestaw podłoży, przeprowadzenie hodowli w różnej temperaturze, a na pewno bardzo liczny zestaw odmian *Vicia faba*.

WNIOSKI

1. Kultury *Ascochyta fabae* w warunkach laboratoryjnych *in vitro* rosną i zarodnikują bez względu na zastosowanie podłoża (pożywki: maltozowa, bobikowa i ziemniaczano-glukozowa).
2. Tempo wzrostu grzybni *Ascochyta fabae* jest powolne i wynosi 1-4 mm na dobę.
3. Wymiary pyknid *Ascochyta fabae* wynoszą 80-200 (300) μm .
4. Gatunek *Ascochyta fabae* wytwarza głównie konidia dwukomórkowe, rzadko jedno- i trzykomórkowe, sporadycznie czterekomórkowe, a ich wymiary wynoszą (10)14-22(30) \times (3)4-5(7) μm .
5. W kulturach *Ascochyta fabae*, oprócz typowych dla tego gatunku

konidiów cylindrycznych, obserwuje się sporadycznie zarodniki z wyrostkiem – brodawką, zakrzywione – bumerangowate, maczugowate oraz rozwidlone w kształcie litery Y.

LITERATURA

- Beaumont A., 1950, On the *Ascochyta* spot disease of broad beans. Trans. Br. Mycol. Soc. 33: 345-349.
- Boerema G. H., Dorenbosch M. H. J., 1973, The *Phoma* and *Ascochyta* species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit – rotting. Stud. Mycol. 3, pp. 50.
- Boerema G. H., Verhoeven A. A., 1979, Check – list for scientific names of common parasitic fungi. Series 2c: Fungi of field crops: pulse (legumes) and forage crops (herbage legumes). Neth. J. Pl. Path., 85: 151-185.
- Derenne P., 1967, *Ascochyta*, parasite dommageable de la féverole. Rev. Agric. 20, 6, 845-849.
- Dodd J. I., 1971, Some aspects of the biology of *Ascochyta fabae* Speg. Ph. D. Thesis., University of Hull.
- Filipowicz A., 1983, Chorobotwórczość izolatów *Ascochyta fabae* Speg. w stosunku do bobiku (*Vicia faba* L. var. *minor* Harz.). Biul. IHAR, 150, 39-44.
- Filipowicz A., 1985, Badania mikoflory materiału siewnego bobiku (*Vicia faba* L. var. *minor* Harz.). Roczn. Nauk Rol., E. (w druku).
- Filipowicz A., 1986, Badania polowe chorobotwórczości kultur *Ascochyta fabae* Speg. w stosunku do bobiku (*Vicia faba* L. var. *minor* Harz.). Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. (w druku).
- Gindrat D., 1969, Les principaux champignons parasites de la feverole. Revue Suisse d'Agriculture 1,5: 111-115.
- Gourley C. O., Delbridge R. W., 1973, *Botrytis fabae* and *Ascochyta fabae* on broad beans in Nova Scotia. Can. Pl. Dis. Surv. 53, 2, 79-82.
- Mielnik W. A., 1977, Opredelitel gribov roda *Ascochyta* Lib. Leningrad, pp. 248.
- Newton S. D., Hill G. D., 1978, A survey of commercial field bean (*Vicia faba* L.) crops in Canterbury. Proc. Agronomy Soc. of New Zeland, 8: 31-35.
- Ondřej M., 1971, Vyskyt hub rodu *Ascochyta* Lib. na Bole a Fazolu. Ochr. Rost. 7, 3, 226-229.
- Randlers J. W., Dube A. J., 1977, Three seedborne pathogens isolated from *Vicia faba* seed imported from the United Kingdom. APPS Newsletter 6, 3: 37-38.
- Ruokola A. L., Vestberg M., 1978, Fungus diseases of field bean in Finland during 1975-1977. Jour. Sci. Agric. Soc. Finland. 50, 6, 455-467.
- Sprague R., 1929, Host range and life-history studies of some leguminous *Ascochytae*. Phytopath. 19, 917-932.
- Strukczińska M. T., 1977, Gribnyje bolezni bobowych rastenij w Litwie. Trudy Akad. Nauk Lit. SSR, C, 3, 79: 55-60.
- Sundheim L., 1973, *Botrytis fabae*, *B. cinerea* and *Ascochyta fabae* on broad bean (*Vicia faba*) in Norway. Acta Agriculturae Scandinavica 23, 1: 43-51.
- Tichonowa N. A., Kaszmanaowa O. J., 1970, Wozbuditeli askochitoza kormowych bobow i ich specjalizacja na bobowych kulturach. Mikoł. i Fitopat. 4, 3: 263-266.
- Wallen V. R., Galway D. A., 1977, Studies on the biology and control of *Ascochyta fabae* on faba bean. Can. Pl. Dis. Survey 57, 1/2: 31-35.
- Yu T. F., 1947, *Ascochyta* blight and leaf and pod spot of Broad Bean in China. Phytopath. 37: 207-214.