Badania nad infekcją kwiatów truskawek przez grzyb *Botrytis cinerea* Pers.

Some factors influencing strawberry flowers infection by *Botrytis cinerea* Pers.

H. BORECKA, A. BIELENIN, R. RUDNICKI

WSTĘP

Grzyb *Botrytis cinerea* Pers. jest sprawcą najgroźniejszej choroby truskawek zwanej szarą pleśnią. Choroba ta, w zależności od sezonu i odmiany, niszczy od 10% do 80% plonu. Wrażliwość uprawianych truskawek jest różna, a przyczyny tego zjawiska liczni badacze tłumaczą w różny sposób, Jarvis [4] — budową kwiatu i pokrojem krzaka, a Irvine i Fulton [7] składem biochemicznym owocu.

Wszyscy badacze stwierdzają [3, 8], że decydującą rolę w zakażeniu owoców odgrywa infekcja kwiatów. Różne stadia rozwojowe kwiatu (zielony pąk, biały pąk, otwarty kwiat, stary kwiat z opadającymi płatkami korony) wykazują różną wrażliwość na zachorowanie [6].

Roślina ułatwia infekcję przez pobudzenie zarodników grzyba *Botrytis cinerea* do intensywnego kiełkowania [3].

Równolegle prowadzone badania przez Chu Chu [2], wykazały stymulujące działanie pyłku kwiatowego na przebieg i zakres infekcji; substancja stymulująca nie była cukrem ani ich mieszaniną.

Przedstawiona praca ma na celu dalsze wyjaśnienie zjawisk dotyczących infekcji kwiatów truskawek przez grzyb *Botrytis cinerea*, jak warunki termiczne, wilgotnościowe, świetlne oraz wpływ kwiatów, jako gospodarza, na kiełkowanie zarodników grzyba.

Przeprowadzone analizy biochemiczne miały na celu ustalenie obecności kwasu abscysynowego w różnych częściach kwiatu, jako stymulatora kiełkowania zarodników grzyba. Poprzednie badania wykazały stymulujące działanie kwasu abscysynowego (AbA) na kiełkowanie wielu grzybów patogenicznych, między innymi i na grzyb *Botrytis cinerea* [1].

MATERIAŁ I METODYKA

I. Badania nad infekcją kwiatów w różnych warunkach termicznych wilgotnościowych, w świetle dziennym i w ciemności, przeprowadzono na kwiatach odmiany 'Talisman', ciętych z trzyletniej plantacji truskawek nie opryskiwanej fungicydami. Kwiaty zakażano w czterech stadiach rozwojowych: zielony pąk, biały pąk, otwarty kwiat i stary kwiat z opadającymi płatkami korony. Po ścięciu kwiatów wstawiono je (jak do wazonu) do małych buteleczek z wodą, zamykanych gumowym korkiem z wyborowanym otworem na łodyżkę kwiatu, następnie otwór uszczelniano parafiną. W jednej buteleczce, będącej powtórzeniem, umieszczano tylko jeden kwiat. Doświadczenia przeprowadzono w dziesięciu, piętnastu oraz dwudziestu powtórzeniach.

Inoculum stanowiły suche zarodniki grzyba lub wodna zawiesina zarodników w ilości 62 500 sztuk w 1 ml wody lub 1 cm³; zarodniki pochodziły z kultur grzyba rosnących na pożywce brzeczkowej o zawartości 2% suchej masy.

Wilgotność względną powietrza modyfikowano przy pomocy nasyconych roztworów soli [9].

Wyniki obliczono statystycznie metodą χ^2 .

II. Wpływ gospodarza na kiełkowanie zarodników grzyba sprawdzono przez porównanie kiełkowania zarodników grzyba w wodzie destylowanej z kiełkowaniem w wodzie z dodatkiem badanej części kwiatu. Poszczególne części kwiatu pobierano z dziesięciu rozwiniętych kwiatów odmiany 'Talisman'. Przebadano wpływ pyłku, pyłku z pylnikiem, słupków, płatków korony, działek kielicha oraz dna kwiatowego wraz ze słupkami. W zależności od poszczególnych kombinacji, w 1 ml wody destylowanej znajdowało się prócz 62 500 zarodników grzyba 80 pylników albo 260 słupków, bądź 26 płatków korony lub działek kielicha, bądź też 3600 ziarn pyłku.

Wyniki kiełkowania zarodników przedstawione w wartościach procentowych przeanalizowano statystycznie metodą analizy wariancyjnej na wartościach Bliss'a.

III. Do analiz biochemicznych pobrano pyłek z 8218 kwiatów, płatki korony z 3770 kwiatów, działki kielicha z 3570 kwiatów, dno kwiatowe ze słupkami z 3250 kwiatów.

Materiał roślinny homogenizowano w 80% alkoholu etylowym, homogenat sączono i przesącz odparowywano w warunkach próżniowych w temperaturze 50°C do całkowitego odparowania alkoholu. Wodną pozostałość zakwaszano 10% kwasem solnym do pH = 2,5 i ekstrahowano trzykrotnie eterem etylowym. Ekstrakt eterowy odparowano do sucha,

a suchą pozostałość rozpuszczono w 80% alkoholu etylowym, po czym наносono na bibułę Whatman'a No. 3 w postaci pasma w obecności syntetycznego kwasu abscysynowego (AbA), jako wzorca. Chromatogram rozwijano w solwencie — izopropanol:amoniak:woda (10:1:1). Chromatogramy oglądano w świetle ultrafioletowym o długości fali 254 mμ, w którym syntetyczny AbA był widoczny w postaci silnie absorbującej plamy. Pasma chromatogramu o wartości R_f odpowiadającej plamie syntetycznego AbA wycinano i eluowano 96% etanolem. Etanолоwy ekstrakt z bibuły odparowywano do sucha, rozpuszczano w 0,5% roztworze sacharozy i po przygotowaniu szeregu rozcieńczeń oznaczano ilościowo w teście wydłużeniowym koleoptyli pszenicy metodą opisaną w poprzednich badaniach [1].

WYNIKI

I. Wpływ temperatury, wilgotności i światła dziennego na infekcję kwiatów truskawek przez grzyb *Botrytis cinerea*

a. Temperatura

Zakażone kwiaty truskawek wstawiono do siedmiu różnych stałych temperatur od 5°C do 35°C; równolegle sprawdzano wpływ tych temperatur na kiełkowanie zarodników grzyba. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 — Table 1

Wpływ temperatury na kiełkowanie zarodników grzyba *Botrytis cinerea* oraz infekcję kwiatów truskawek odmiany 'Talisman'
Effect of temperature on germination of spores of *B. cinerea* and on infection of 'Talisman' flowers

Temperatura Temperature (°C)	Kiełkowanie zarodników w wodzie po 48 godz. Spore germination in water after 48 hours (%)	Infekcja kwiatów po 3 dniach Infected flowers after 3 days (%)	χ^2
5	2	0	0,105*
10	87	10	28,8 **
15	92	90	0,105
20	90	100	
25	80	100	15,172 **
30	52	45	11,612 **
35	6	0	

* Różnice udowodnione przy poziomie 0,05

** Różnice udowodnione przy poziomie 0,01

* Significant at P = 0,05

** Significant at P = 0,01

Tabela 2 — Table 2

Wrażliwość różnych stadiów rozwojowych kwiatu (odm. 'Talisman') an infekcję dwoma typami inoculum grzyba *Botrytis cinerea* Pers.

Susceptibility of 'Talisman' strawberry flowers at different stages to two inocula of *B. cinerea*

Tem- pera- tura (°C) Tem- pera- ture	Średni procent porażonych kwiatów Mean % affected flowers in inoculated flower stages							
	suche zarodniki dry spore inoculum				zawiesina zarodników spore suspension inoculum			
	stadia rozwojowe kwiatu flower stages at inoculation							
	zielony pąk green bud	biały pąk white bud	otwarty kwiat open flower	stary kwiat old flower	zielony pąk green bud	biały pąk white bud	otwarty kwiat open flower	stary kwiat old flower
10	0	0	20	0	0	20	10	20
25	100	100	100	100	100	100	100	100
χ^2	14,96**	14,96**	10,94**	10,00**	14,96**	10,94**	11,25**	10,94**

** Różnica udowodniona przy $P=0,01$.

Significant at $P=0.01$.

Temperatury 5°C, 10°C oraz powyżej 30°C wyraźnie hamowały przebieg infekcji; różnice udowodniono statystycznie przy większym poziomie dokładności.

Wpływ typu inoculum, suche zarodniki oraz zawiesina zarodników grzyba, przebadano w dwóch temperaturach: optymalnej — 25°C oraz hamującej — 10°C, na infekcję czterech stadiów rozwojowych kwiatu. Stwierdzono powtórnie wyraźny wpływ temperatury na przebieg infekcji niezależnie od typu inoculum (tabela 2).

b. Wilgotność

Zakażone kwiaty truskawek w czterech stadiach rozwojowych umieszczono w temp. 25°C i 55% oraz 92% wilgotności względnej powietrza; drugą partię kwiatów umieszczono w temp. 10°C i 38% oraz 55% wilgotności względnej. W obydwóch przypadkach stwierdzono wyraźny wpływ wilgotności na przebieg infekcji; nie stwierdzono natomiast wpływu typu inoculum.

c. Światło

Zakażone kwiaty w czterech stadiach rozwojowych umieszczono w ciemności oraz w oświetlonym dziennym światłem — termostacie. Wyniki przedstawia tabela 3. Stwierdzono wpływ światła w pierwszej

Tabela 3 — Table 3

Wrażliwość kwiatów truskawek na zakażenie przez grzyb *B. cinerea* w świetle dziennym i ciemności w temp. 25°C

Susceptibility of strawberry flowers to infection of *B. cinerea* in light and dark at 25°C

Stadia rozwojowe	Inoculum	Średni % porażonych kwiatów Mean % affected flowers					
		po 2 dniach after 2 days			po 5-ciu dniach after 5 days		
		ciem- ność dark	światło light	χ^2	ciem- ność dark	światło light	χ^2
Zielony pąk Green bud	suche zarodniki dry spores	10	0	1,05	100	20	13,33**
	zawiesina zarodników spore suspension	0	0		100	10	16,36**
Biały pąk White bud	suche zarodniki dry spores	50	30	0,83	100	90	1,05
	zawiesina zarodników spore suspension	20	30	0,27	100	60	5,0*
Otwarty kwiat Open flower	suche zarodniki dry spores	50	100	6,67*	100	100	0
	zawiesina zarodników spore suspension	100	80	1,15	100	100	0
Stary kwiat Old flower	suche zarodniki dry spores	20	50	1,25	100	100	0
	zawiesina zarodników spore suspension	10	50	3,81	100	100	0

* Różnica udowodniona przy $P = 0,05$

Significant at $P = 0,01$

** Różnica udowodniona przy $P = 0,001$

Significant at $P = 0,05$

fazie infekcji, po upływie dwóch dni, w stadium otwartego kwiatu; po pięciu dniach uzyskano lepsze wyniki infekcji zielonych pąków kwiatowych w warunkach ciemności niż w oświetlonym termostacie.

II. Wpływ gospodarza na kiełkowanie zarodników grzyba *Botrytis cinerea* Pers.

Stwierdzono wpływ badanych części kwiatu na kiełkowanie zarodników grzyba; we wszystkich kombinacjach uzyskano większy procent

Tabela 4 — Table 4

Wpływ różnych organów kwiatu na kiełkowanie zarodników grzyba *Botrytis cinerea*
 Stimulatory effect of different flowers part on *B. cinerea* spore germination

Części kwiatu Flower parts	Procent kiełkujących zarodników Percent spore germination	
	w wodzie in water	w 1% glukozie in 1% glucose
Słupki Pistils	38,0	24,5
Dno kwiatowe Receptacle	47,7	22,5
Pyłek z pylnikami Pollen grains with anthers	49,0	23,0
Pyłek Pollen grains	72,7	21,7
Kielich Sepals	22,0	19,5
Płatki korony Petals	23,5	10,5
Kontrolna Control	0	0
LSD ₁ =	9,8	5,3
LSD ₂ =	13,3	7,2

kiełkowania i wszystkie kombinacje różniły się w sposób istotny od kombinacji kontrolnej. Nie każda jednak część kwiatu stymulowała kiełkowanie jednakowo (tabela 4); dodatek 1% glukozy hamowało wpływ stymulatora znajdującego się w części kwiatu; najsilniej stymulował: pyłek, pyłek z pylnikiem, dno kwiatowe ze słupkiem oraz same słupki; dużo słabsze działanie, choć udowodnione statystycznie w porównaniu z kontrolą, wykazały płatki korony i działki kielicha.

III. Analizy biochemiczne

We wszystkich badanych częściach kwiatu stwierdzono obecność kwasu abscysynowego, choć poszczególne organy kwiatu różniły się znacznie pod względem zawartości tego hormonu. Najwięcej AbA zawierał pyłek — od 36,8 µg do 48,8 µg w 100 g świeżej masy, najmniej płatki korony 3,48 µg do 8,61 µg/100 g św. m. Wyniki cyfrowe przedstawiono w tabeli 5.

Porównanie tabeli 4 z tabelą 5 wskazuje na możliwość działania AbA

Tabela 5 — Table 5

Zawartość kwasu abscysynowego w różnych organach kwiatu truskawek
 Concentration of AbA in different parts of strawberry flower

Części kwiatu Parts of flower	Zawartość AbA AbA concentration	
	w 100 g świeżej masy in 100 g fresh mass µg	w 1000 kwiatach in 1000 flowers µg
Pylek Pollen grains	36,80—48,80	1,84— 2,44
Dno kwiatowe Receptacle	22,57—28,24	11,11—13,90
Kielich Sepals	11,07—14,77	8,33—11,11
Płatki korony Petals	3,48— 8,61	0,53— 1,31

znajdującego się w kwiatach, jako stymulatora kiełkowania zarodników grzyba. Części kwiatu najsilniej stymulujące kiełkowanie zawierały największą ilość kwasu abscysynowego, jak np. pyłek czy dno kwiatowe.

WNIOSKI

1. Infekcja kwiatów truskawek przez grzyb *Botrytis cinerea*, zależy w dużym stopniu od temperatury; temperatury poniżej 10° oraz powyżej 30° wyraźnie hamowały kiełkowanie zarodników grzyba oraz przebieg infekcji.

2. Wilgotność względna powietrza jest drugim ważnym czynnikiem warunkującym infekcję kwiatów truskawek przez grzyb *B. cinerea*.

3. Światło dzienne zwiększa infekcję otwartych kwiatów truskawek; jest to prawdopodobnie wpływ nektarowania, gdyż nektar stymuluje kiełkowanie zarodników grzyba.

4. Wszystkie części kwiatu truskawek, w mniejszym lub większym stopniu, są stymulatorami kiełkowania zarodników grzyba. Najsilniejsze właściwości stymulujące wykazał pyłek, pyłek z pylnikami oraz dno kwiatowe.

5. Kwas abscysynowy (AbA) — niedawno odkryty hormon roślinny wykazujący właściwości stymulujące kiełkowanie zarodników grzybów, znajdował się we wszystkich częściach kwiatu. Stwierdzono korelację pomiędzy zawartością AbA a siłą wpływu na kiełkowanie zarodników danej części kwiatu truskawki. Pyłek, pylniki z pyłkiem i dno kwiatowe zawierały najwięcej AbA i wykazywały najsilniejsze działanie stymulujące kiełkowanie zarodników grzyba *Botrytis cinerea* Pers.

SUMMARY

The infection of strawberry flowers (cv Talisman) by *Botrytis cinerea* was studied in various conditions of temperature, relative humidity and light.

Temperature was a limiting factor in the infection of flowers in each of the four stages of growth; the optimum being between 20°C and 25°C.

Infection of flowers was achieved at low relative humidity; light stimulated the infection with dry spores at the open flower stage. Infection was achieved by both dry spore and spore suspension inocula.

The different parts of flowers stimulated *Botrytis cinerea* spore germination; the best stimulators were: pollen grains, pollen grains with anthers, receptacle and pistils with a high of abscisic acid content; weakest stimulators were: sepals and petals with a low AbA concentration.

LITERATURA

1. Borecka H., Pieniążek J., 1968, Stimulatory effect of abscisic acid on spore germination of *Gloeosporium album* Ostrw. and *Botrytis cinerea* Pers., Bull. Acad. Pol. Sci. A V, XVI.
2. Chu Chu, Myra and Preece T. F., 1968, The effect of pollen grains on infections caused by *Botrytis cinerea* Fr., Ann. appl. Biol., 62: 11—22.
3. Gilles G., 1959, Biologie et lutte contre *Botrytis cinerea* Pers. sur fraisiers, Comité National pour l'étude du fraisier, 1—28.
4. Jarvis W. R., 1962, The infection of strawberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr., Ann. appl. Biol., 50, 569—75.
5. Jarvis W. R. and Borecka H., 1966, Strawberry flowers infection caused by *Botrytis cinerea* Pers., *Botrytis* meeting in 1966, not published.
6. Jarvis W. R. and Borecka H., 1968, Relations between blossom blight and fruit rot caused by *Botrytis cinerea* in strawberries, Hort. Res., 8 (2): 147—154.
7. Irvine T. B. and Fulton R. H., 1959, A study of laboratory methods to determine susceptibility of strawberry varieties to grey mould fruit rot, *Botrytis cinerea*, Phytopath. 49:542.
8. Powelson R. L., 1960, Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*, Phytopathology 50, 491—494.
9. Wiston P. W. and Bates D. H., 1960, Saturated solutions for the control of humidity in biological research, Ecology 41:232—237.