Występowanie patotypów grzyba *Ascochyta pisi* (Lib.) w rejonie olsztyńskim

HELENA FURGAŁ – WĘGRZYCKA

Zakład Mikrobiologii Rolnej ART, 10-718 Olsztyn-Kortowo

H. Furgał-Węgrzycka (Institute of Microbiology Agricultural and Technical Academy in Olsztyn, 10-718 Olsztyn-Kortowo, Poland). Acta Agrobotanica 44 (1, 2): 5-22, 1991. Occurrence of pathotypes of *Ascochyta pisi* (Lib.) in the Olsztyn district.

(Otrzymano dn. 1989. 04. 26)

Abstract

The causal agents of leaf and pods spot-pot of peas and field peas in the Olsztyn district was the fungus *Ascochyta pisi* (Lib.). Investigated isolates of *A. pisi* differed by macroscopic and microscopic features. From diseased leaves and pods of peas and field peas obtained also saprophytic fungi among which *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Stemphylium botryosum*, *Sordaria fimicola* and mycelia starilia were dominated. In the study of the identification and distribution of pathotypes of *A. pisi* five pathotypes were identified among which pathotype 2 were dominated. The identified the pathotypes differed by macroscopic and microscopic features.

WSTĘP

Zgorzelowa plamistość grochu i peluszek powodowana przez grzyb *A. pisi* jest szeroko rozpowszechniona na świecie. Powoduje ona corocznie znaczne straty w plonach, zwłaszcza w ciepłe i wilgotne lata (Bajan, 1965; Gilpatrick i Bush, 1950; Lityński i Fedorowska, 1963). Grzyb *A. pisi* poraża również nasiona grochu i peluszek, co powoduje szybkie rozpowszechnianie się tego patogena wraz z materiałem siewnym (Bajan, 1965; Filipowicz, 1976; Czyżewska, 1979; Grzelak i Iłakiewicz, 1973). Odporność grochu i peluszek na porażenie przez *A. pisi* warunkowana jest dwoma genami dominującymi (Wark, 1950). Daje to realną szansę uzyskania materiałów hodowlanych grochu

i peluszek odpornych na porażenie przez *A. pisi* metodą selekcji lub krzyżowania (Wark, 1950).

A. pisi jest zróżnicowany biologicznie. Tworzy patotypy, które różnią się morfologią grzybni powietrznej, szybkością przyrostu liniowego grzybni wegetatywnej, intensywnością zarodnikowania oraz wirulencją wobec odmian testowych. Wallen (1957) w Kanadzie wśród patogenicznych izolatów *A. pisi* oznaczył 5 patotypów na podstawie zróżnicowanej wirulencji kultur tego grzyba wobec 8 odmian testowych grochu i peluszek oraz wobec odmian wyki należących do gatunków *Vicia villosa* i *Vicia villosa* var. *glabrescens*.

W latach 1975-1985 patotypy *A. pisi* wśród patogenicznych izolatów tego grzyba wyróżnili: Lepikova (1975) w ZSRR, Ondrejova (1978) w Czecho-Słowacji, Ali (1983) w Australii oraz Furgał - Węgrzycka (1984) w Polsce. Hubbeling i Huijbertas (1969) stwierdzili, że w Holandii *A. pisi* również tworzy 5 patotypów, przy czym odporność grochu na porażenie przez dominujące w tym kraju patotypy 2, 3 i 4 kontrolowana jest pięcioma genami dominującymi, zlokalizowanymi w jednym chromosomie. W Polsce badania nad biologią *A. pisi* przeprowadziła Bajan (1965). Wśród patogenicznych izolatów grzyba wyosobnionych z różnych odmian grochu i regionów naszego kraju Bajan (1965) oznaczyła trzy formy: a, b i c, które różniły się morfologią grzybni powietrznej, przrostem liniowym kolonii i wymiarami piknidiów oraz zarodników konidialnych.

Głównym celem badań było poznanie rozwoju grzyba *Ascochyta pisi* (Lib.) na pożywkach, niezbędne dla identyfikacji gatunku oraz wyodrębnienie patotypów grzyba i ustalenie ich patogeniczności w stosunku do grochu i peluszek w rejonie Olsztyna w latach 1976-1978. Badania te zostały poprzedzone rozpoznaniem mikoflory zasiedlającej liście i strąki grochu oraz peluszek z objawami plamistości zgorzelowej oraz ustalenie patogeniczności rozpoznanych grzybów.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

I. Izolacja, identyfikacja i ustalenie patogeniczności grzybów wyizolowanych z grochu i peluszek z objawami plamistości zgorzelowej liści i strąków.

Materiałem badań były liście i strąki grochu oraz peluszek, na których obserwowano jasnobrunatne nekrozy z ciemnobrunatnym, nieco wzniesionym brzegiem. Środek plam był jasny. Nekrozy zazwyczaj były nieregularnego kształtu. Na nekrozach zazwyczaj obserwowano piknidia patogena. Do analizy fitopatologicznej pobierano wycinki liści i strąków, zawierające tkankę zdrową i część tkanki nekrotycznej. Chore rośliny grochu i peluszek zebrano z kolekcji odmian tych roślin prowadzonej przez Katedrę Hodowli Roślin i Nasiennictwa ART w Olsztynie, z poletek hodowlanych RZD w Bałcynach i RZD w Pozortach. Materiał roślinny do izolacji *A. pisi* oraz grzybów zasiedlających nekrozy zebrano w latach 1971-1978 z 400 odmian grochu i peluszek zróżnicowanych morfologicznie (formy wysokie,

półkarłowe, karłowe, wąsate i o staśmionej łodydze).

Do izolacji grzybów zastosowano pożywkę glukozowo-ziemniaczaną oraz 2 % agar wodny. Izolację grzybów z porażonego materiału roślinnego i oznaczanie ich do gatunku przeprowadzono według powszechnie stosowanych metod.

Badania nad patogenicznością grzybów wyosobnionych z porażonych liści i strąków grochu oraz peluszki, przeprowadzono w laboratorium i szklarni. Patogeniczność wyosobnionych grzybów oznaczono na podstawie ich chorobotwórczego oddziaływania na siewki grochu odmian Kujawski Wczesny i Porta oraz peluszki odmiany Nieznanicka. Patogeniczność badanych gatunków grzybów oznaczono opierając się na pracach metodycznych B a j a n (1965) oraz H i l l s t r a n d a i A u l d a (1982). W laboratorium i szklarni patogeniczność badanych izolatów grzybów oznaczano poprzez zakażanie siewek roślin w fazie 3-4 liści przesączami z płynnych kultur grzybów. W laboratorium siewki roślin wskaźnikowych zanurzano w zlewkach, w przesączach z płynnych kultur grzybów, w szklarni natomiast siewki roślin wskaźnikowych zakażano przesączem z płynnych kultur grzybów, przeznaczając po 15 cm³ materiału infekcyjnego na 1 roślinę. Celem uzyskania przesączy do zakażeń roślin izolaty badanych gatunków grzybów, rozmnożono na płynnej pożywce Czapek-Doxa. Hodowlę grzybów prowadzono w temperaturze pokojowej 22-27°C (295-300°K) przez cztery tygodnie. Doświadczenie zarówno w laboratorium, jak i szklarni prowadzono w kontrolowanych warunkach wilgotnościowych (90-100 %) i termicznych – temp. 24-28°C (297-301°K). Doświadczenie zarówno w laboratorium, jak i szklarni założono w pięciu powtórzeniach po 35 roślin dla jednego badanego grzyba. Ocenę zdrowotności odmian wskaźnikowych przeprowadzono po 3, 5, 7, 10 i 15 dniach po ich zakażeniu, licząc rośliny z objawami żółknięcia liści lub więdnienia roślin oraz z objawami nekroz na liściach.

Porównawcze badania nad zmiennością morfologiczną kultur *A. pisi* przeprowadzono w laboratorium opierając się na pracach metodycznych B a j a n (1965). Celem ich było: badanie wzrostu grzyba, wyglądu kultur i zarodnikowania na różnych podłożach oraz uchwycenie różnic pomiędzy izolatami wyosobnionymi z porażonych roślin grochu i peluszki.

Badane izolaty *A. pisi* przeszczepiono na cztery pożywki: na pożywkę brzeczkową, ziemniaczano-glukozową, owsianą oraz na ryż. Na każdą pożywkę przeznaczono po 4 szalki Petriego. Szalki z kulturami trzymano w termostacie w temp. 25-26°C (298-299°K). Siódmego i 21 dnia wykonano pomiary liniowego przyrostu grzybni. Oprócz tego opisano wygląd kultur na poszczególnych pożywkach oraz mierzono po 50 piknidiów i po 50 zarodników konidialnych. Z pomiarów tych wyliczono średnią.

Intensywność zarodnikowania izolatów *A. pisi* badano w kulturach 30-dniowych. Nasilenie zarodnikowania określano w pięciostopniowej skali: 1 – brak zarodników, 2 – bardzo mało (1-4), 3 – mało (5-8), 4 – średnio (9-18), 5 – dużo (powyżej 20) zarodników w jednym polu widzenia. W badaniach nad biologią kultur *A. pisi* badano 50 izolatów tego grzyba wyosobnionych z porażonych liści i strąków grochu oraz 50

izolatów wyosobnionych z chorych roślin peluszki.

Wyniki uzyskane dla wyżej wymienionych cech opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji przy klasyfikacji pojedynczej i testu „T” Studenta.

II. Identyfikacja patotypów *Ascochyta pisi*.

Do badań nad patotypami *A. pisi* wzięto tylko izolaty silnie patogeniczne wobec odmian wskaźnikowych grochu i peluszki. Patogeniczne izolaty *A. pisi* otrzymano w latach 1976-1978 z chorych roślin grochu i peluszki zebranych z poletek hodowlanych objętych prawidłowym zmianowaniem i z wieloletniej monokultury corocznie sztucznie zakażanej materiałem infekcyjnym. Materiał infekcyjny do zakażeń poletka testowego stanowiła pożywka kukurydziano-piaskowo-glebowa w stosunku 1:1:3 przerośnięta grzybnią patogenicznych gatunków grzybów: *A. pisi*, *A. pinodes* i *P. medicaginis* var. *pinodella*. Grzyby hodowano w temperaturze 22-25°C (295-298°K) średnio przez 2-3 miesiące. Pole testowe zakażano inokulum, które sporządzano dokładnie mieszając w równych częściach kultury patogenicznych gatunków grzybów: *Ascochyta pisi*, *A. pinodes* i *Phoma medicaginis* var. *pinodella* wyrosłych na mieszance pożywkowej. Pole testowe materiałem infekcyjnym zakażono punktowo po 10 g materiału infekcyjnego na 1 punkt. Do materiału infekcyjnego w punkcie wysiewano po 2 nasiona grochu i peluszki. Po wykonaniu analiz mikologicznych w laboratorium metodą rozcieńczeń stwierdzono, że w 1 g materiału infekcyjnego stężenie czynników chorobotwórczych wynosiło od 3 000 do 5 000 kolonii.

Identyfikację patotypów *A. pisi* przeprowadzono w laboratorium i szklarni na podstawie zróżnicowanej reakcji odmian testowych, których zestaw podano w tabeli 4. Patotypy *A. pisi* zidentyfikowano w oparciu o prace metodyczne Wallena (1957), Hubbelinga i Huijberta (1969) oraz Ali (1983). Po 5 i 21 dniach od założenia doświadczenia policzono izolaty, które wywoływały objawy chorobowe u poszczególnych odmian testowych. Liczbę tych izolatów przedstawiono w procentach w stosunku do ogólnej liczby badanych (tab. 5).

Porównawcze badania nad zmiennością morfologiczną oznaczonych patotypów *A. pisi* przeprowadzono w laboratorium. Celem ich było: badanie wzrostu, wyglądu i zarodnikowania kultur wyodrębnionych patotypów tego grzyba. Badanie te przeprowadzono według metody opisanej uprzednio.

Wyniki uzyskane dla wyżej wymienionych cech opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji przy klasyfikacji pojedynczej i testu „T” Studenta.

WYNIKI

W wyniku izolacji, z nekrotycznych plam na liściach i strąkach grochu oraz peluszki wyosobniono łącznie 3398 koloni grzybów należących do 25 gatunków. Wśród grzybów wyosobnionych z nekrotycznych plam na liściach i strąkach zarówno z grochu jak i z peluszki najliczniej reprezentowanym gatunkiem był grzyb *A. pisi*. Z nekrotycznych plam na liściach i strąkach licznie wyosobniano również grzyby:

Alternaria alternata, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum purpurascens*, *Stemphylium botryosum*, *Sordaria fimicola*, gatunki grzybów z rodzaju: *Fusarium* (*F. avenaceum* i *F. culmorum*), *Mucor* (*M. hiemalis*), *Penicillium* oraz grzybnie nie zarodnikujące.

Stwierdzono różnice gatunkowe w mikroflorze zasiedlającej chore rośliny grochu lub zasiedlające porażone liście i strąki peluszek. Stwierdzono również różnice w mikroflorze zasiedlającej nekrozy na liściach i strąkach (tab. 1).

Tabela 1 - Table 1

Grzyby wyizolowane z liści i strąków grochu oraz peluszek wykazujących objawy plamistości zgorzelowej
List of fungi isolated from leaves and pods of peas and field peas with spot-pot symptoms

Gatunki grzybów Fungal species	Groch - Peas		Ogółem Total	Peluszką – Field peas		Ogółem Total
	liście foliar symptoms	strąki pods symptoms		liście foliar symptoms	strąki pods symptoms	
<i>Ascochyta pisi</i> (Lib.)	115	163	278	124	148	272
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	94	81	175	111	92	203
<i>Aspergillus niger</i> v. Tiegh	11	7	18	15	10	25
<i>Aspergillus flavus</i> Link	8	3	11	12	8	20
<i>Botrytis cinerea</i> (Pers. ex Fr.)	86	43	129	96	37	133
<i>Cephalosporium roseum</i> Oudem	22	7	29	28	16	44
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	78	34	112	84	41	125
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link. ex Fries	49	28	77	51	37	88
<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. et Curt.	19	11	30	22	17	39
<i>Epicoccum nigrum</i> Link. ex Wall.	31	24	55	28	10	38
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehr. ex Wall.	54	26	80	61	38	99
<i>Fusarium oxysporum</i> (Schl.) et Fr.	2	–	2	–	–	–
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	4	–	4	–	–	–
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	32	27	59	38	21	59
<i>Fusarium culmorum</i> (W. G. S.) Sacc.	28	19	47	32	19	51
<i>Gliocladium penicilioides</i> Corda	7	–	7	1	–	1
<i>Gliocladium roseum</i> (Link.) Thom	11	–	11	6	–	6
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	32	24	56	44	32	76
<i>Mucor</i> sp.	25	19	44	31	27	58
<i>Penicillium</i> sp.	54	36	90	59	44	103
<i>Phoma herbarum</i> Westend	6	3	9	4	–	4
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	11	4	15	7	–	7
<i>Stemphylium botryosum</i> Wall.	62	31	93	73	48	121
<i>Sordaria fimicola</i> (Rob.) Ces. et de Not.	42	24	66	38	18	56
<i>Trichoderma harzianum</i> (Pers.) Harz.	11	4	15	12	3	15
<i>Trichoderma lignorum</i> (Tode) Harz.	16	5	21	11	6	17
<i>Trichoderma glaucum</i> Pers. ex Tries	7	3	10	9	–	9
Grzybnie nie zarodnikujące – <i>Mycelia sterilia</i>	63	28	91	54	41	95
Ogółem – Total	970	664	1634	1051	713	1764

W doświadczeniach infekcyjnych przeprowadzonych zarówno w laboratorium jak i szklarni stwierdzono zdolność wywoływania plamistości zgorzelowej liści, strąków oraz nasion przez grzyb: *A. pisi* oraz niektóre izolaty grzybów *Alternaria alternata* i *Botrytis cinerea*.

Patogeniczne izolaty *A. pisi* zarówno w laboratorium jak i szklarni silnie porażały tylko liście, nie porażały natomiast szyjki korzeniowej i korzeni. W szklarni pierwsze objawy chorobowe u zainokulowanych siewek grochu i peluszek obserwowano dopiero po 6-8 dniach od ich zakażenia. Na liściach obserwowano kilkumilimetrowe plamy barwy jasnobrunatnej z ciemnobrunatnym wzniesionym brzegiem. Środek był najczęściej jaśniejszy. W laboratorium u zakażonych roślin wskaźnikowych obserwowano odmienne objawy chorobowe niż w przypadku patogenicznych gatunków grzybów *Ascochyta pinodes* i *Phoma medicaginis* var. *pinodella*.

W laboratorium pierwsze symptomy chorobowe u zainokulowanych roślin wystąpiły już trzeciego dnia. Obserwowano żółknięcie najpierw dolnych liści, potem środkowych i górnych. Po 5-6 dniach od inokulacji, siewki więdły i zasychały. Nie obserwowano, lub tylko sporadycznie, brązowych lub czarnych nekroz na korzeniach lub szyjce korzeniowej.

Niektóre izolaty grzybów *Alternaria alternata* i *Botrytis cinerea* charakteryzowały się mniejszą patogenicznością względem grochu i peluszek w porównaniu z izolatami *A. pisi*. Patogeniczne izolaty grzybów: *Alternaria alternata* i *Botrytis cinerea* u zainokulowanych roślin grochu i peluszek wywoływały nekrotyczne plamy tylko na liściach. Nekrozy te najczęściej były barwy czarnej lub jasnobrązowej. Izolaty wyżej cytowanych gatunków grzybów podobnie jak izolaty *A. pisi* nie porażały również korzeni i szyjki korzeniowej. U zainokulowanych siewek grochu i peluszek nie obserwowano także żółknięcia liści lub więdnienia całych roślin.

Kultury grzyba *A. pisi* na czterech pożywkach wykazywały różnice w wyglądzie makroskopowym i zarodnikowaniu (tab. 2 i 3). Analiza statystyczna wyników wykazała, że najkorzystniejszą pożywką dla wzrostu grzybni była pożywka ziemniaczano-glukozowa, natomiast największe piknidia kultury *A. pisi* wytwarzały na pożywce owsianej. Stwierdzono istotne różnice w wielkości grzybni i w wymiarach piknidiów w zależności od podłoża (tab. 8 i 9). Stwierdzono również zależność pomiędzy pochodzeniem izolatów *A. pisi* a cechami makroskopowymi i mikroskopowymi tego grzyba (tab. 3 i 4).

Izolaty *A. pisi* wyosobnione z porażonych roślin peluszek na wszystkich podłożach intensywniej zarodnikowały i wytwarzały większe piknidia i zarodniki konidialne. Charakteryzowały się natomiast słabszym przyrostem liniowym grzybni w porównaniu z izolatami *A. pisi* wyosobnionymi z porażonych roślin grochu. Stwierdzono również różnice w wyglądzie makroskopowym kultur *A. pisi* wyosobnionych z porażonych roślin grochu i wyosobnionych z chorych roślin peluszek (tab. 2 i 3).

W badaniach nad składem biologicznym grzyba *A. pisi* wykazano, że patogen ten w rejonie Olsztyna tworzy pięć patotypów. Dominującym patotypem *A. pisi* porażającym groch i peluszkę w latach badań 1976-1978 był patotyp 2 (tab. 5).

Tabela 2 – Table 2

Cechy makroskopowe i mikroskopowe badanych kultur *Ascochyta pisi* (Lib.) wyosobnionych z porażonych liści i strąków grochu
 Macroscopic and microscopic features of cultures of *Ascochyta pisi* (Lib.) obtained from leaves and pods of peas with spot-pot symptoms

Rodzaj pożywki Kind of medium	Przyrost liniowy grzybni w cm 7 i 21 dnia wzrostu Diameter of colonies in cm after 7 and 21 days growth		Wygląd kultur na badanych podłożach Appearance of cultures on different media	Średnie wymiary piknidiów w µm Measurements of picnidia in µm		Średnie wymiary zarodników konidialnych w µm Measurements of conidia in µm	
	liście – leaves	strąki – pods		liście – leaves	strąki – pods	liście – leaves	strąki – pods
glukozowo- ziemniaczana potato- dextrose agar	2,2-9,5	2,4-9,1	Grzybnia biała, puszysta, potem zbita; liczne piknidia brunatne z ceglastym wyciekim. Mycelium white coloured downy, next compacted. Picnidia brown with pink-red secrete.	167,3	174,2	12,9-3,4	12,1-3,2
brzeczkowa malt agar medium	2,6-8,4	2,2-7,8	Grzybnia biała, puszysta, następnie zbita, piknidia brunatne z ceglastym wyciekim. Mycelium white coloured downy, next compacted. Picnidia brown with pink-red secrete.	223,8	229,5	13,9-3,2	14,2-3,6
owsiana oat medium	2,1-6,1	2,4-5,8	Grzybnia rzadka, biała, liczne piknidia, brunatne. Air mycelium white and rarely. Picnidia brown coloured and abundant.	284,2	314,7	11,6-3,1	12,2-3,4
ryż rice medium	2,3-8,8	2,5-8,4	Grzybnia biała, środek kultur różowy lub różowo-biały, brzeg białokremowy. Spód kultur cytrynowy. Air mycelium white. Centre of the cultures white-pink, white or pink coloured, with white-cream margin. Bottom of the cultures citron coloured.	178,3	184,6	11,9-4,9	12,4-4,5

Tabela 3 – Table 3

Cechy makroskopowe i mikroskopowe badanych kultur *Ascochyta pisi* (Lib.) wyosobnionych z porażonych liści i strąków peluszek
 Macroscopic and microscopic features of cultures of *Ascochyta pisi* (Lib.) obtained from leaves and pods of field peas with spot-pot symptoms

Rodzaj pożywki Kind of medium	Przyrost liniowy grzybni w cm 7 i 21 dnia wzrostu Diameter of colonies in cm after 7 and 21 days growth		Wygląd kultur na badanych podłożach Appearance of cultures on different media	Średnie wymiary piknidiów w μm Measurements of picnidia in μm		Średnie wymiary zarodników konidialnych w μm Measurements of conidia in μm	
	liście – leaves	strąki – pods		liście – leaves	strąki – pods	liście – leaves	strąki – pods
glukozowo- ziemniaczana potato- dextrose agar	2,5-8,9	2,3-8,2	Grzybnia biała, puszysta, środek kremowy lub różowy, liczne piknidia brunatne z ceglastą wydzieliną. Spód kultur brunatny. Air mycelium white coloured, downy. Centre of the cultures cream or pink coloured. Picnidia brown coloured with pink-red secrete, abundant. Bottom of the cultures brown coloured.	223,7	231,4	15,9-4,6	15,8-4,4
brzeczkowa malt agar medium	2,6-7,9	2,4-7,6	Grzybnia biała, puszysta, następnie zbita, piknidia brunatne z ceglastoróżową wydzieliną. Spód kultur brunatny. Mycelium white coloured downy, next compacted. Picnidia brown with pink-red secrete. Bottom of the cultures brown coloured.	258,6	262,7	15,4-4,8	15,3-4,6
owsiana oat medium	1,5-4,1	1,6-4,4	Grzybnia pajęczynowata, biała, liczne piknidia brunatne z ceglastoróżowym wyciekem. Spód kultur brunatny. Air mycelium white and rarely. Picnidia brown coloured with pink-red secrete. Bottom of the cultures brown coloured.	311,6	319,7	12,3-4,2	12,4-4,1
ryż rice medium	2,4-6,3	2,5-6,4	Grzybnia zbita, biała, różowa lub białoróżowa. Spód kultur cytrynowy lub brunatny. Mycelium compacted, white, pink or white-pink coloured. Bottom of the cultures citron or brown coloured.	226,9	234,5	13,7-3,4	14,2-3,5

Tabela 4 – Table 4

Zestaw odmian testowych do identyfikacji patotypów *Ascochyta pisi* (Lib.) wg Hubellinga i Huijbertasa (1969)
 List of testing cultivars for identification of pathotypes *Ascochyta pisi* (Lib.) according to Hubelling and Huijbertas (1969)

Odmiany testowe Testing cultivars	Patotypy – Pathotypes					
	1	2	3	4	5	6
	wartości wskaźników chorobowych disease index					
Dick Trom	1*-2	2	2-3	3-4	4	6**
Rondo	2	2	2-3	3	4	6
Dwarf Grey Sugar	2	2	2-3	3-4	4	6
Rovar	1-2	2	2-3	3-4	4	6
Early Blue	2	2-3	4	3-4	5	6
Greenfast	2-3	4	5	5-6	5-6	6
Cud Ameryki	2-3	4	5	5-6	6	6
Thomas Laxton	4	5	5	6	6	6
Saxa	3-4	4-5	5	6	6	6

* — porażenie roślin słabe – resistant

** — porażenie roślin bardzo silne – very susceptible

Tabela 5 – Table 5

Częstotliwość występowania patotypów *Ascochyta pisi* (Lib.) w rejonie Olsztyna w latach 1976-1978
 Frequency of occurrence of pathotypes of *Ascochyta pisi* (Lib.) in the Olsztyn district during 1976-1978

Pochodzenie i data wysobnienia izolatów Locality and isolation data	Liczba badanych izolatów Number of investigated isolates						Ogółem Total	Częstotliwość występowania patotypów w % Frequency of occurrence of pathotypes in percent						
	patotypy – pathotypes							patotypy – pathotypes						
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6	
Groch – Peas														
I. Poletka hodowlane														
Field plots														
rok – year	– 1986	4	18	8	0	0	0	30	13,3	60,0	26,6	0	0	0
	– 1987	2	16	12	0	0	0	30	6,6	53,3	40,0	0	0	0
	– 1978	3	20	7	0	0	0	30	10,0	66,6	23,0	0	0	0
II. Poletko testowe														
Testing plots														
rok – year	– 1986	7	26	15	11	1	0	60	11,6	43,3	25,0	18,3	1,6	0
	– 1987	1	4	6	16	3	0	30	3,3	13,3	20,0	53,3	10,0	0
	– 1978	1	2	1	20	6	0	30	3,3	6,6	6,6	66,6	20,0	0
Peluszka – Field peas														
I. Poletka hodowlane														
Field plots														
rok – year	– 1986	3	20	5	2	0	0	30	10,0	66,6	16,6	6,6	0	0
	– 1987	4	22	4	0	0	0	30	13,3	73,4	13,3	0	0	0
	– 1978	2	25	3	0	0	0	30	6,6	83,4	10,0	0	0	0
II. Poletko testowe														
Testing plots														
rok – year	– 1986	5	22	17	14	2	0	60	8,3	36,6	28,3	23,3	3,0	0
	– 1987	0	3	12	15	0	0	30	0	10,0	40,0	50,0	0	0
	– 1978	1	1	6	21	1	0	30	3,3	3,3	20,0	70,1	3,3	0
Liczba przebadanych izolatów No of investigated isolates		33	179	96	99	13	0	420	–	–	–	–	–	–

Wśród izolatów *A. pisi* wyosobnionych z porażonych roślin grochu i peluszki zebranych z poletek hodowlanych objętych prawidłowym zmianowaniem nie wykryto silnie wirulentnych patotypów 4 i 5. Patotypy te oznaczono tylko wśród izolatów *A. pisi* wyosobnionych z chorych roślin grochu i peluszki pochodzących z monokultury.

Uprawa grochu i peluszki w monokulturze wywarła presję selekcyjną na populację *A. pisi* w kierunku zmiany dominacji patotypów tego grzyba. Groch i peluszka w monokulturze w latach badań porażone były głównie przez patotyp 4 *A. pisi*. Procentowy udział izolatów patotypu 4 w 1975 roku wynosił 53,3 % a w 1978 roku – 66,6 %. Izolaty silnie wirulentnego patotypu 5 *A. pisi*, którego nie wyróżniono wśród izolatów tego grzyba wyosobnionych z chorych roślin grochu i peluszki przy stosowaniu prawidłowego zmianowania, w monokulturze w 1978 roku stanowiły już 20 % w ogólnej ilości wyosobnień.

W prezentowanej pracy stwierdzono, że izolaty pięciu patotypów *A. pisi* na czterech pożywkach różniły się szybkością przyrostu liniowego grzybni wegetatywnej, jej pigmentacją oraz wymiarami piknidiów i zarodników konidialnych (tab. 6 i 7). Najszybszym przyrostem liniowym grzybni na czterech pożywkach oznaczały się izolaty patotypów 1 i 2 *A. pisi*, najwolniejszym zaś izolaty patotypów 4 i 5. Największe piknidia i zarodniki konidialne na stosowanych podłożach stwierdzono w przypadku izolatów patotypów 4 i 5. Omawiane różnice zostały statystycznie udowodnione (tab. 8 i 9).

WNIOSKI

1. W badaniach nad patogenicznością grzybów wyosobnionych z nekrotycznych plam na liściach i strąkach stwierdzono, że głównym sprawcą plamistości zgorzelowej był grzyb *A. pisi* oraz niektóre izolaty grzybów: *Alternaria alternata* i *Botrytis cinerea*.

2. Z analizowanych porażonych liści i strąków z objawami plamistości zgorzelowej licznie wyosobniano również grzyby saprofityczne, a szczególnie gatunki: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Epicoccum purpurascens*, *Stemphylium botryosum*, *Sordaria fimicola*, oraz grzybnie nie zarodnikujące.

3. Stwierdzono różnice gatunkowe w mikroflorze zasiedlającej nekrozy na roślinach grochu i peluszki oraz zasiedlającej nekrozy na liściach i strąkach.

4. Badane kultury *A. pisi* różniły się cechami makro i mikroskopowymi, a szczególnie liniowym przyrostem grzybni wegetatywnej i wymiarami piknidiów w zależności od podłoża i pochodzenia.

5. Patogeniczny gatunek grzyba *A. pisi* w rejonie Olsztyna zróżnicowany był biologicznie na pięć patotypów różniących się wirulencją względem odmian testowych oraz cechami makro i mikroskopowymi.

6. Oceniane odmiany grochu i peluszki w latach badań 1976-1978 w rejonie Olsztyna porażone były głównie przez dominujący patotyp 2 *A. pisi*.

7. Uprawa grochu i peluszki w monokulturze przez siedem lat wywarła presję w kierunku zmiany w dominacji wirulentnych patotypów 4 i 5 tego grzyba.

8. Groch i peluszka w monokulturze porażone były przez patotypy 3 i 4 *A. pisi*, które w latach badań dominowały.

Tabela 6 – Table 6

Zmienność morfologiczna kultur badanych patotypów grzyba *Ascochyta pisi* (Lib.) wyosobnionych z porażonych roślin grochu
 Morphological features of investigated cultures of pathotypes of *Ascochyta pisi* (Lib.) obtained from peas with leaves and pods spot-pot symptoms

Patotypy Pathotypes	Liczba badanych izolatów No of investigated isolates	Rodzaj pożywki – Kind of medium					Intensywność zarodnikowania Sporulation
		glukozowo-ziemniaczana potato-dextrose agar	brzeczkowa malt agar medium	owsiana oat medium	ryż rice medium		
1, 2	112	a	4,7-9,5 cm	4,9-9,2 cm	4,7-9,1 cm	3,9-9,4 cm	5 intensywna high
		b	142,3 µm	219,3 µm	220,7 µm	186,9 µm	
		c	12,1-3,1 µm	12,1-4,2 µm	11,9-3,1 µm	12,4-3,5 µm	
		d	Grzybnia powietrzna puszysta, kremowobiała, potem zbita; spód kultur brunatny; konidia najczęściej dwukomórkowe;piknidia brunatne z różowocęglastym wyciekim. Air mycelium downy, next compacted, cream-white coloured. Bottom of culture brown coloured. Conidia mostly with two cells. Picnidia brown coloured with pink-red secrete.	Grzybnia biała, puszysta, następnie zbita; piknidia brunatne z różowocęglastą wydzieliną. Mycelium white coloured, downy, next compacted. Picnidia brown with pink-red secrete.	Grzybnia powietrzna biała, rzadka; piknidia brunatne, liczne. Air mycelium white, and rarely. Picnidia brown coloured and abundant.	Grzybnia zbita, białoróżowa, spód kultury cytrynowego koloru. Mycelium compacted, white-pink coloured from the bottom citron coloured.	
3	49	a	3,9-9,1 cm	4,8-6,3 cm	4,1-8,1 cm	3,1-8,2 cm	5 intensywna high
		b	221,3 µm	237,6 µm	291,4 µm	219,4 µm	
		c	13,2-3,4 µm	14,2-3,6 µm	12,1-3,1 µm	13,8-4,4 µm	

		d	Grzybnia powietrzna białokremowa, średnio zbita; spód kultury brunatny; konidia najczęściej dwukomórkowe; piknidia drobne, brunatne z różowoceglastym wyciekami. Air mycelium white-cream, mean compacted. Bottom of cultures brown coloured. Conidia mostly with two cells. Picnidia small brown with pink-red secrete.	Grzybnia biała, rzadka, drobne brunatne piknidia. Mycelium white coloured, rarely. Picnidia small, brown coloured.	Grzybnia powietrzna biała z puszystym brzegiem. Air mycelium white coloured whit downy of the margin.	Grzybnia zbita, białoróżowa. Mycelium compacted, white-pink coloured.	
4, 5	57	a b c d	2,1-8,1 cm 254,3 µm 15,6-4,8 µm Grzybnia zbita, kremoworóżowa; spód kultury koloru bursztynowego lub cytrynowego; piknidia drobne, brunatne. Mycelium compacted, cream-pink coloured. Bottom of the culture amber or citron. Picnidia small, brown.	2,9-3,4 cm 260,3 µm 15,8-4,9 µm Grzybnia jasnokremowa, cienka. Mycelium light-cream coloured, and thin.	1,3-4,2 cm 336,4 µm 14,1-4,4 µm Grzybnia białoróżowa, zbita; spód kultury koloru jasnobrązowego lub cytrynowego. Mycelium compacted, and white-pink coloured. Bottom of the cultures light-brown or citron.	1,2-6,4 cm 244,3 µm 14,1-4,7 µm Grzybnia zbita, kremowa z białym brzegiem; spód kultury cytrynowego koloru. Mycelium compacted, cream coloured with white margin. Bottom of the culture citron coloured.	5 intensywna high

a — średnica kolonii w cm 7 i 21 dnia wzrostu, przyrost liniowy grzybni w cm — diameter of colonies (in cm) after 7 and 21 days of growth, linear increase of mycelium; b — średnie wymiary piknidiów w µm — measurements of picnidia in µm; c — średnie wymiary zarodników konidialnych w µm — measurements of conidia in µm; d — wygląd kultur na badanych podłożach — appearance of cultures on different media

Tabela 7 – Table 7

Zmienność morfologiczna kultur badanych patotypów grzyba *Ascochyta pisi* (Lib.) wyosobnionych z porażonych roślin peluszek
 Morphological features of investigated cultures of pathotypes of *Ascochyta pisi* (Lib.) obtained from field peas with leaves and pods spot-pot symptoms

Patotypy Pathotypes	Liczba badanych izolatów No of investigated isolates	Rodzaj pożywki – Kind of medium				Intensywność zarodnikowania Sporulation
		glukozowo-ziemniaczana potato-dextrose agar	brzeczkowa malt agar medium	owsiana oat medium	ryż rice medium	
1, 2	108	a	5,1-10,2 cm	5,4-9,7 cm	4,9-9,3 cm	4,4-9,8 cm
		b	212,4 µm	188,7 µm	269,4 µm	180,5 µm
		c	12,8-3,3 µm	12,9-4,6 µm	12,6-3,1 µm	12,9-3,8 µm
		d	Grzybnia powietrzna puszysta, kremowobiała, potem zbita; spód kultur brunatny; konidia najczęściej dwukomórkowe; piknidia brunatne z różowocęglastym wyciekim. Air mycelium downy, next compacted, cream-white coloured. Bottom of culture brown coloured. Conidia mostly with two cells. Picnidia brown coloured with pink-red secrete.	Grzybnia biała, puszysta, następnie zbita; piknidia brunatne z różowocęglastą wydzieliną. Mycelium white coloured, downy, next compacted. Picnidia brown with pink-red secrete.	Grzybnia powietrzna biała, rzadka; piknidia brunatne, liczne. Air mycelium white, and rarely. Picnidia brown coloured and abundant.	Grzybnia zbita, białoróżowa, spód kultury cytrynowego koloru. Mycelium compacted, white-pink coloured from the bottom citron coloured.
3	47	a	4,5-9,9 cm	5,6-6,9 cm	4,6-8,8 cm	3,6-8,9 cm
		b	242,6 µm	231,7 µm	299,4 µm	235,4 µm
		c	13,8-3,7 µm	14,9-3,9 µm	12,3-3,1 µm	12,7-4,8 µm
		d	Grzybnia powietrzna białokremowa lub biała, średnio zbita; środek kultury nie porośnięty grzybnia, spód kultury brunatnooliwkowy	Grzybnia biała, rzadka, drobne brunatne piknidia. Mycelium white coloured, rarely. Picnidia small, brown	Grzybnia powietrzna biała z nitkowatym środkiem i puszystym brzegiem. Air mycelium white coloured	Grzybnia zbita białoróżowa. Mycelium compacted, white-pink coloured.

			lub brunatny; konidia najczęściej dwukomórkowe; piknidia drobne, brunatne z różowoceglastym wyciekem. Air mycelium white-cream or white coloured, mean compacted. Centre of the cultures without of the growth of mycelium. Bottom of cultures brown-olive or brown coloured; picnidia small brown, with pink-red secrete.	coloured.	with scare of the centre and downy of the margin.		
4, 5	55	a b c d	2,4-8,9 cm 276,5 µm 15,9-4,8 µm Grzybnia zbita, kremoworóżowa, u niektórych izolatów biała lub białoróżowa; grzybnia powietrzna najczęściej na brzegach szalek Petriego lub w postaci wysepek na podłożu; spód kultury koloru bursztynowego lub cytrynowego; piknidia drobne, brunatne. Mycelium compacted, cream-pink coloured. Sometimes white or white-pink coloured. Mycelium like of clumps or vere growth on the edge of substrate. Bottom of the culture amber or citron. Picnidia small, brown.	2,9-7,4 cm 264,7 µm 15,8-4,7 µm Grzybnia jasnokremowa, cienka. Mycelium light-cream coloured, and thin.	1,2-3,9 cm 343,4 µm 14,1-4,3 µm Grzybnia białoróżowa, zbita; spód kultury koloru jasnobrązowego lub cytrynowego. Mycelium compacted, and white-pink coloured. Bottom of the cultures light-brown or citron.	1,4-6,2 cm 249,2 µm 14,3-4,7 µm Grzybnia zbita, kremowa z białym brzegiem; spód kultury cytrynowego koloru. Mycelium compacted, cream coloured with white margin. Bottom of the culture citron coloured.	5 intensywna high

a — średnica kolonii w cm 7 i 21 dnia wzrostu, przyrost liniowy grzybni w cm — diameter of colonies (in cm) after 7 and 21 days of growth, linear increase of mycelium; b — średnie wymiary piknidiów w µm — measurements of picnidia in µm; c — średnie wymiary zarodników konidialnych w µm — measurements of conidia in µm; d — wygląd kultur na badanych podłożach — apparence of cultures on different media

Tabela 8 – Table 8

Średnie wartości cech izolatów pięciu badanych patotypów grzyba *Ascochyta pisi* (Lib.) wyosobnionych z porażonych liści i strąków grochu
 Mean values characters for five investigated pathotypes of *Ascochyta pisi* (Lib.) obtained from leaves and pods of peas with spot-pot symptoms

Patotypy Pathotypes	Średnie dla patotypów – Mean for pathotypes					Pożywki Kind of medium	Średnie dla pożywek – Mean for kind of medium				
	Średnica kolonii Diameter of colonies		Wymiary piknidiów w μm Measurements of picnidia in μm	Wymiary zarodników konidialnych w μm Measurements of conidia in μm			Średnica kolonii Diameter of colonies		Wymiary piknidiów w μm Measurements of picnidia in μm	Wymiary zarodników konidialnych w μm Measurements of conidia in μm	
	7 dnia after 7 days	21 dnia after 21 days		długość length	szerokość width		7 dnia after 7 days	21 dnia after 21 days		długość length	szerokość width
1, 2	4,5	9,3	208,0	12,1	3,4	I	3,5	8,9	228,6	13,6	3,7
						II	4,2	6,2	225,7	14,0	4,2
3	3,9	7,9	242,4	13,3	3,6	III	3,3	7,1	299,8	12,7	3,5
4, 5	1,8	5,5	273,8	14,9	4,7	IV	2,7	8,0	211,6	13,4	4,2
NIR P = 0,05 P = 0,01	1,0 1,4	2,4 3,5	F emp. < < F tab.	1,1 1,5	0,6 1,0	NIR P = 0,05 P = 0,01	1,2 1,8	F emp. < < F tab.	18,1 27,5	0,8 1,3	F emp. < < F tab.

Opis tabeli – Explanations:

- I — pożywka glukozowo-ziemniaczana – potato-dextrose agar
- II — pożywka brzezkowa – malt agar medium
- III — pożywka owsiana – oat medium
- IV — ryż – rice medium

Tabela 9 – Table 9

Średnie wartości cech izolatów pięciu badanych patotypów grzyba *Ascochyta pisi* (Lib.) wyosobnionych z porażonych liści i strąków peluszek
 Mean values characters for five investigated pathotypes of *Ascochyta pisi* (Lib.) obtained from leaves and pods of field peas with spot-pot symptoms

Średnie dla patotypów – Mean for pathotypes						Średnie dla pożywek– Mean for kind of medium					
Patotypy Pathotypes	Średnica kolonii Diameter of colonies		Wymiary piknidiów w μm Measurements of picnidia in μm	Wymiary zarodników konidialnych w μm Measurements of conidia in μm		Pożywki Kind of medium	Średnica kolonii Diameter of colonies		Wymiary piknidiów w μm Measurements of picnidia in μm	Wymiary zarodników konidialnych w μm Measurements of conidia in μm	
	7 dnia after 7 days	21 dnia after 21 days		długość length	szerokość width		7 dnia after 7 days	21 dnia after 21 days		długość length	szerokość width
1, 2	4,9	9,7	242,7	12,8	3,7	I	4,0	9,6	243,8	14,1	3,9
						II	4,6	8,0	228,3	14,5	4,4
3	4,5	8,6	252,2	13,4	3,9	III	3,5	7,3	304,0	13,0	3,5
4, 5	1,9	6,6	283,4	15,0	4,6	IV	3,2	8,3	221,7	12,2	4,4
NIR P = 0,05 P = 0,01	1,1 1,6	2,6 3,7	F emp. < < F tab.	1,2 1,7	0,8 1,1	NIR P = 0,05 P = 0,01	1,4 1,9	F emp. < < F tab.	18,3 27,8	0,9 1,5	F emp. < < F tab.

Opis tabeli – Explanations:

- I — pożywka glukozowo-ziemniaczana – potato-dextrose agar
- II — pożywka brzezkowa – malt agar medium
- III — pożywka owsiana – oat medium
- IV — ryż – rice medium

Streszczenie

Z nekrotycznych plam na liściach i strąkach grochu oraz peluszki oprócz głównego sprawcy plamistości zgorzelowej *A. pisi*, licznie wyosabniano również grzyby saprofityczne, a szczególnie gatunki: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Stemphylium botryosum*, *Sordaria fimicola* oraz grzybnie nie zarodnikujące. Stwierdzono różnice gatunkowe w mikroflorze zasiedlającej nekrozy na liściach i strąkach grochu oraz zasiedlającej porażone rośliny peluszki.

Przez wszystkie lata badań z nekroz na liściach wyosabniano więcej gatunków grzybów saprofitycznych w porównaniu ze strąkami grochu i peluszki.

Badane kultury grzyba *A. pisi* różniły się cechami makro i mikroskopowymi w zależności od podłoża i pochodzenia. Patogeniczny gatunek grzyba *A. pisi* jest zróżnicowany biologicznie na pięć patotypów. Groch jak i peluszka w latach badań 1976-1978 porażone były głównie przez patotyp 2 o niższej agresywności.

Wirulentne patotypy 4 i 5 oznaczono tylko wśród izolatów wyosabnionych z porażonych roślin grochu i peluszki pochodzących z monokultury. Badane patotypy *A. pisi* różniły się cechami makro i mikroskopowymi (liniowym przyrostem grzybni wegetatywnej, intensywnością zarodnikowania oraz wymiarami piknidiów i zarodników konidialnych).

LITERATURA

- A l i S., 1983. Pathotypes of black spot complex pathogenes of field peas, selections and inheritance of resistance in pea lines. Proceed. Austr. Plant. Breeding Conference 246-248.
- B a j a n C., 1965. Badania nad etiologią i patogenicznością gatunków rodzaju *Ascochyta* powodujących plamistość zgorzelową grochu (*Pisum sativum* L.). Praca doktorska. ART Olsztyn, Biblioteka Główna (maszynopis).
- C z y ż e w s k a A., 1979. Badania nad grzybami zasiedlającymi nasiona grochu (*Pisum sativum* L.). Hod. Rośl. Biul. branz., 1 (2): 22-29.
- F i l i p o w i c z A., 1976. Badania mikroflory nasion grochu siewnego (*Pisum sativum* L.), ze szczególnym uwzględnieniem grzybów *Ascochyta* i *Fusarium*. Roczn. Nauk Roln. Seria E. Ochrona Roślin.
- F u r g a ł - W ę g r z y c k a H., 1984. Występowanie i zmienność grzyba *Ascochyta pisi* (Lib.) na grochu w rejonie Olsztyna w latach 1971 i 1976. Roczn. Nauk. Roln. Seria E. Ochrona Roślin 14: 136-147.
- G i l p a t r i c k I. D., B u s h L. V., 1950. Studies on the pathogenicity of different isolates of *Ascochyta pisi* (Lib.). Plant. Dis. Repr. 34(4): 383-387.
- G r z e l a k K., H ł a k i e w i c z A., 1973. Grzyby z rodzaju *Ascochyta* w laboratoryjnej ocenie zdrowotności nasion grochu (*Pisum sativum* L.). Biul. IHAR 3(4): 155-161.
- H i l l s t r a n d D. S., A u l d D. J., 1982. Comparative evaluation of four techniques for screening winter peas for resistance of *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. Euphytica 36: 276-279.
- H u b e l l i n g N., H u i j b e r t a s N., 1969. Onderscheiding van *Ascochyta pisi* (Lib.) on teesting on algebele resistantie daertegen, Dertig. Jaren. PSC. Wageningen. 4(1): 42-47.
- L e p i k o v a M. R., 1975. Differentiation of virulence in population of *Ascochyta* in pea. Plant. Breed. Abstr. 5 (7): 855-856.
- L i t y Ń s k i A., F e d o r o w s k a B., 1963. Wstępne badania odporności grochu na *Ascochyta pisi* i nad zwalczaniem tej choroby środkami chemicznymi. Hod. Rośl. Aklim. Nasion., 7(6): 615-623.
- O n d r e j o v a I I., 1978. Resistance to Netherlands races of *Ascochyta pisi* (Lib.) in peas. Zborn. Wys. Školy Zasad. Praha, 3(1): 233-240.
- W a l l e n V. R., 1957. The identification and distribution of physiologic races of *Ascochyta pisi* (Lib.) in Canada. Canad. J. Plant. Sci., 37(4): 337-341.
- W a r k D. C., 1950. The inheritance of resistance to *Ascochyta pisi* (Lib.) in *Pisum sativum* L. Aust. J. Agric Res 4: 382-390.