

The possible causes of leaf spotting of *Kalanchoe blossfeldiana*: metabolic and potential methods of their control

Przyczyny plamistości liści *Kalanchoe blossfeldiana*: zmiany metaboliczne i możliwości ochrony

Anna Jarecka Boncela, Alicja Saniewska, Justyna Górąj, Marian Saniewski

Summary

The leaves of *Kalanchoe blossfeldiana*, a succulent grown in greenhouse conditions showed disease symptoms, such as yellow and gradually browning spots. The disease was caused by *Pestalotia* sp. In detached healthy leaves of *K. blossfeldiana* kept in the inverted position at natural light conditions red-violet anthocyanins were produced and accumulated. In detached leaves with disease symptoms caused by *Pestalotia* sp. kept in the same light conditions anthocyanins were not produced formed the disease spots at a distance about 5–10 mm from. The fungicides: Biosept Active, Signum 33 WG i Topsin M 500 SC significantly inhibited the growth and development of the fungi *Pestalotia* sp.

Key words: *Kalanchoe blossfeldiana*, *Pestalotia* sp., metabolic reactions, anthocyanins formation, infection, leaves, fungicides

Streszczenie

Na liściach sukulentu *Kalanchoe blossfeldiana* rosnącego w warunkach szklarniowych, wystąpiły symptomy chorobowe. Testy chorobotwórczości wykazały, że główną przyczyną, początkowo drobnych żółtych plam, stopniowo brązowiejących i obejmujących znaczną część powierzchni górnej i dolnej strony liścia, jest grzyb *Pestalotia* sp. W odciętych zdrowych liściach *K. blossfeldiana* trzymany na świetle w pozycji odwróconej, następowało nagromadzenie antocyjanów o barwie czerwono-fioletowej, natomiast w odciętych zainfekowanych liściach przez *Pestalotia* sp., trzymany w tych samych warunkach na świetle, antocyjany nie tworzyły się w odległości około 5–10 mm od zainfekowanych plam. Badane fungicydy: Biosept Active, Signum 33 WG i Topsin M 500 SC silnie ograniczały wzrost i rozwój *Pestalotia* sp.

Słowa kluczowe: *Kalanchoe blossfeldiana*, *Pestalotia* sp., antocyjany, infekcja, liście, fungicydy

Institut Ogrodnictwa
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
Anna.Jarecka@inhort.pl

Wstęp / Introduction

Kalanchoe blossfeldiana występuje w obrębie rzędu skalnicowce – Saxifragales, rodziny gruboszowate – Crassulaceae i rodzaju *Kalanchoe*. W naturze gatunek ten można spotkać w wysokogórskich lasach deszczowych Madagaskaru, gdzie rośnie jako bylina trzydziestocentymetrowej wysokości. Charakteryzuje się trwałymi liśćmi (ciemnozielone z czerwonym obrzeżeniem, grube i mięsiste, delikatnie ząbkowane) i kwiatami zebranymi w baldachogrona. Kwiaty rozkwitają w styczniu. W Polsce zyskała popularność, jako roślina doniczkowa. Uprawia się ją w szklarniach. W sprzedaży znajdują się rośliny kwitnące prawie przez cały rok, co jest możliwe dzięki uprawie sterowanej, w której zapewnia się roślinom warunki krótkiego dnia.

Celem pracy była identyfikacja patogenu powodującego plamistość liści *K. blossfeldiana* oraz analiza zmian metabolicznych i ocena skuteczności fungicydów w ograniczaniu choroby.

Materiały i metody / Materials and methods

Izolacja grzybów

Fragmenty (około 5 mm) chorych liści, po ich powierzchniowym odkażeniu w 25% alkoholu metylowym i w wodzie destylowanej wykładano na pożywkę agarowo-ziemniaczano-glukozową (PDA – Potato Dextrose Agar), po 10 sztuk na szalkę i inkubowano w temperaturze 20–25°C. Wyrastające kolonie grzybów przeszczepiano na skosy, a po wyrośnięciu segregowano makroskopowo na grupy. Wybrane izolaty z poszczególnych grup po doprowadzeniu do kultur jednozarodnikowych oznaczano do gatunku, posługując się monografiami i opracowaniami autorów: Barnett (1960), Arx (1974).

Ocena chorobotwórczości wybranych izolatów grzybów

Do doświadczeń nad patogennością wybrano po 10 izolatów pozyskanych gatunków: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Botrytis cinerea* Pers. i *Pestalotia* sp. Krążki grzybni o średnicy 3 mm wycinano z 7-dniowych kultur rosnących na pożywce PDA i наносono na liście *K. blossfeldiana*. Inokulowane liście układano na siatce polietylenowej, w tacach wyłożonych bibułą filtracyjną, nasączoną wodą destylowaną. Kuwety przykrywano folią aluminiową w celu zwiększenia wilgotności. Liście inkubowano w temperaturze 25°C. Do oceny chorobotwórczości każdego z badanych izolatów użyto 40 liści. Doświadczenie wykonano w dwóch seriach w odstępie 30 dni. Po 10 dniach inkubacji wykonano pomiary długości nekrozy.

Wzrost grzybni *Pestalotia* sp. (P-8) *in vitro*

W pierwszym etapie określano wpływ rodzaju pożywki na wzrost grzybni. Badania prowadzono na pożywkach: agarowo-ziemniaczano-glukozowej (PDA), fasolowej zestawionej agarem (LBA), maltozowej (malt-extract-agar)

i pożywce mineralnej Czapka zestawionej agarem (CzDA) w temperaturze 20°C. Pożywka, na której przyrost liniowy grzybni był największy, posłużyła do określenia wpływu temperatury na wzrost grzybni, z określeniem temperatury optymalnej dla wzrostu i rozwoju patogenu. Na środek szalki Petriego o średnicy 90 mm наносono krążek grzybni o średnicy 3 mm pobrany z 7-dniowej kultury, po czym szalki umieszczano w termostatach, w zakresie temperatury od 7 do 35°C na 8 dni. W czasie inkubacji mierzono średnicę kultur. Na podstawie tych pomiarów obliczano powierzchnię kultur. Doświadczenie prowadzono w dwóch seriach, po 5 szalek dla każdej pożywki.

Zmiany metaboliczne zachodzące pod wpływem światła naturalnego na liściach *K. blossfeldiana*

Do badań użyto zdrowe liście *K. blossfeldiana* pozyskane z roślin uprawianych w szklarni w okresie letnim. Liście inokulowano *Pestalotia* sp., a następnie układano w kuwetach i trzymano na świetle w pozycji naturalnej i odwróconej bez zraszania.

Oddziaływanie fungicydów w ograniczaniu wzrostu i rozwoju *Pestalotia* sp. *in vitro*

Do badań użyto piraklostrobinę – substancję aktywną preparatu (Signum 33 WG) i wyciąg z grejpfruta – substancję aktywną preparatu (Biosept Active). Jako preparat standardowy zastosowano tiofanat metylu, substancję aktywną preparatu (Topsin M 500 SC).

Doświadczenie A – oddziaływanie preparatów na wzrost grzybni *Pestalotia* sp. *in vitro*

Preparaty dodawano do pożywki PDA w ilości: 100, 250 i 500 µg/cm³ pożywki. Tak przygotowane szalki z pożywką szczepiono krążkami kultur *Pestalotia* sp. o średnicy 3 mm. Po 2, 4, 6 i 8 dniach inkubacji w temperaturze 25°C mierzono średnicę kultur w dwóch prostopadłych kierunkach. Doświadczenie wykonano w 2 seriach po 5 szalek dla każdego stężenia.

Doświadczenie B – oddziaływanie preparatów stosowanych profilaktycznie i interwencyjnie w ograniczaniu rozwoju *Pestalotia* sp. na liściach *K. blossfeldiana* w warunkach laboratoryjnych

Liście pobierano z roślin zdrowych uprawianych w warunkach szklarniowych. Profilaktycznie opryskano izolowane liście zawiesiną preparatów (w stężeniach: 100, 250 i 500 µg/cm³), a następnie po osuszeniu inokulowano je krążkami 7-dniowej kultury *Pestalotia* sp. o średnicy 3 mm rosnącej na pożywce PDA. Interwencyjnie, stosowano preparaty po 2 dniach od inokulacji krążkami kultury *Pestalotia* sp., tj. na liście z widocznymi symptomami porażenia. Po inokulacji i zaprawieniu w preparatach, liście układano na siatce polietylenowej w kuwetach wyłożonych wilgotną bibułą i przykrywano szczelnie folią aluminiową. Po 7 i 12 dniach inkubacji w temperaturze 25°C mierzono średnicę nekrozy. Dla każdego preparatu testowano 40 liści (10 liści w 4 powtórzeniach). Doświadczenie wykonano w dwóch seriach w odstępie 30 dni.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie posługując się analizą wariancji. Do oceny różnic między średnimi użyto testu Duncana, przyjmując poziom istotności 5%.

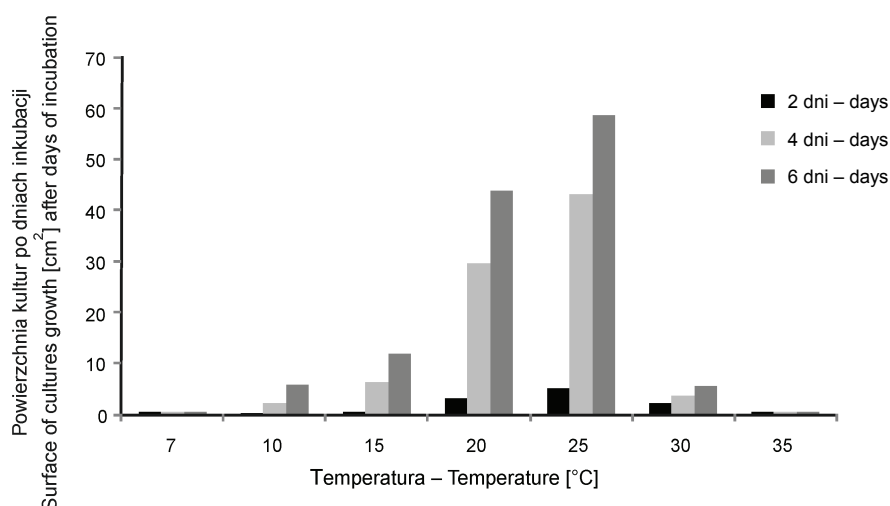
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Z chorych liści *K. blossfeldiana* z objawami brązowej, zgorzelowej plamistości, izolowano głównie *A. alternata*, *B. cinerea* i *Pestalotia* sp. Przeprowadzone testy chorobotwórczości wykazały, że główną przyczyną, początkowo drobnych żółtych plam, stopniowo brązowiejących i obejmujących znaczną część powierzchni górnej i dolnej strony liścia jest grzyb *Pestalotia* sp. W warunkach zwiększonej wilgotności na powierzchni brązowych plamach obserwowano ciemne drobne wzniesienia, skupień zarodników konidialnych *Pestalotia* sp. Wszystkie badane izolaty patogenu wywoływały objawy plamistości na liściach *K. blossfeldiana*. Stwierdzono zróżnicowanie w ich agresywności. Długość plam nekrotycznych, w następstwie porażenia badanymi izolatami *Pestalotia* sp., mierzona po 14 dniach inkubacji liści w temperaturze 25°C wahała się od 8 cm do 25 cm. Spośród badanych izolatów

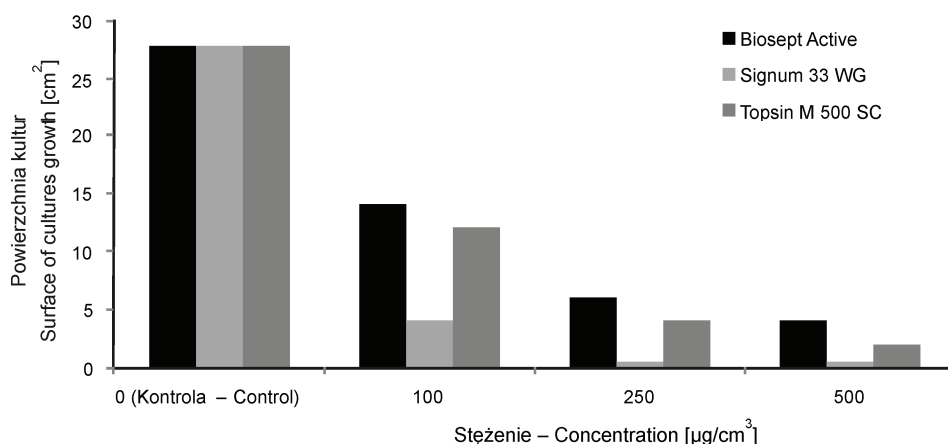
najbardziej agresywny w rozwoju choroby okazał się izolat P-8, który używano w dalszych badaniach.

Minimalny wzrost grzybnii izolatu P-8 *Pestalotia* sp. obserwowano w temperaturze 7–10 oraz w 30°C (rys. 1). Grzybnia badanego izolatu rozwijała się najszybciej w zakresie temperatury 20–25°C. Maksimum wzrostu grzybnii stwierdzono w temperaturze 25°C zarówno po 2, 4, i 6 dniach inkubacji (rys. 1). Najlepszą pożywką dla wzrostu *Pestalotia* sp. okazała się pożywka PDA i maltozowa. Nieco słabszy wzrost obserwowano na pożywce fasolowej, a najwolniej przebiegał wzrost liniowy grzybnii na pożywce Czapka.

W odciętych zdrowych liściach *K. blossfeldiana* trzymany na świetle (bez zraszania) w pozycji odwróconej, po czterech dniach następowało nagromadzenie się antocyjanów o barwie czerwono-fioletowej, natomiast w pozycji naturalnej antocyjany nie tworzyły się. Należy dodać, że w odciętych zainfekowanych liściach przez *Pestalotia* sp. trzymany w tych samych warunkach na świetle antocyjany nie tworzyły się w odległości około 5–10 mm od zainfekowanych plam.



Rys. 1. Wpływ temperatury na wzrost [cm²] kultur *Pestalotia* sp. na pożywce agarowo-ziemniaczano-glukozowej (PDA)
Fig. 1. Influence of temperature on the growth [cm²] of *Pestalotia* sp. cultures on potato-dextrose-agar medium (PDA)



Rys. 2. Wpływ fungicydów na wzrost [cm²] kultur *in vitro* *Pestalotia* sp. po 8 dniach inkubacji
Fig. 2. Influence fungicides on the *in vitro* growth [cm²] of *Pestalotia* sp. cultures after 8 days of incubation

Tabela 1. Wpływ fungicydów stosowanych profilaktycznie na rozwój *Pestalotia* sp. na liściach *K. blossfeldiana*
 Table 1. Influence of fungicides preventively applied on the development of *Pestalotia* sp. on *K. blossfeldiana* leaves

Traktowanie Treatment	Stężenie Concentration [μg/cm ³]	Długość nekrozy [mm] po dniach inkubacji Length of necrotic spots [mm] after days of incubation	
		7	12
Kontrola – Control	—	14,1 e	23,8 e
Signum 33 WG	100	2,6 b	4,8 b
Signum 33 WG	250	1,6 a	2,3 a
Signum 33 WG	500	1,1 a	2,3 a
Biosept Active	100	4,4 d	10,4 d
Biosept Active	250	3,6 c	7,3 c
Biosept Active	500	3,3 c	6,9 c
Topsin M 500 SC	100	4,7 d	11,5 d
Topsin M 500 SC	250	3,8 c	6,7 c
Topsin M 500 SC	500	2,9 b	5,8 c

Średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy 5%; wielokrotny test Duncana

Means in columns followed by the same letter do not differ at 5% level of significance; Duncan's multiple range test

Tabela 2. Wpływ fungicydów zastosowanych interwencyjnie na rozwój *Pestalotia* sp. na liściach *K. blossfeldiana*
 Table 2. Influence of fungicides applied curatively on the development of *Pestalotia* sp. on *K. blossfeldiana* leaves

Traktowanie Treatment	Stężenie Concentration [μg/cm ³]	Długość nekrozy [mm] po 2 dniach od inokulacji liści Length of necrotic spots [mm] 2 days after leaf inoculation	Długość nekrozy [mm] po 10 dniach od opryskania liści środkami ochrony Length of necrotic spots [mm] 10 days after spraying leaves
Kontrola – Control	—	4,0 a	26,7 e
Signum 33 WG	100	4,1 a	12,0 b
Signum 33 WG	250	3,8 a	6,8 a
Signum 33 WG	500	4,1 a	6,1 a
Biosept Active	100	4,0 a	18,8 d
Biosept Active	250	3,7 a	18,1 d
Biosept Active	500	4,1 a	17,1 d
Topsin M 500 SC	100	4,0 a	17,0 d
Topsin M 500 SC	250	4,2 a	14,1 c
Topsin M 500 SC	500	4,1 a	13,1 c

Średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy 5%; wielokrotny test Duncana

Means in columns followed by the same letter do not differ at 5% level of significance; Duncan's multiple range test

Wcześniej stwierdzono, że w odciętych zdrowych liściach *Crassula multica* trzymanych na świetle w pozycji naturalnej lub odwróconej, następowało nagromadzenie się antocyjanów o barwie czerwono-fioletowej. Natomiast w odciętych zainfekowanych liściach przez *Pestalotia* sp. trzymanych w tych samych warunkach na świetle antocyjany nie tworzyły się w odległości około 4–8 mm od zainfekowanych plam (Saniewski i wsp. 2008). Ye i wsp. (2003) sugerują, że *Pestalotia* sp. wydziela związki chemiczne, które mogą być metabolitami wtórnymi lub toksynami, które hamują reakcje biochemiczne związane z tworzeniem się antocyjanów. Wiadomo również, że gatunki *Pestalotiopsis* produkują seskwiterpeny i acetogeniny (Pulici i wsp. 1996a, b). Magnani i wsp. (2003) wykazali, że z pnia kory *Pinus taeda* porażonej przez *Pestalotiopsis* sp. wyizolowali trzy związki: pestalodiosolid, taedolidol i 6-epitaedolidol.

Badacze sugerują, że gatunki *Pestalotiopsis* są bogatym źródłem naturalnych metabolitów wtórnych.

W warunkach *in vitro* pochodna strobiluryny wykazała silnie fungitoksyczny wpływ na wzrost liniowy grzybnia *Pestalotia* sp. Piraklostrobina w stężeniu 100 μg/cm³ pożywką hamowała wzrost grzybnia patogenu w 83%, a w stężeniu 250 μg/cm³ wystąpiło całkowite zahamowanie wzrostu grzybnia (rys. 1). Tiofanat metylu i wyciąg z grejpfruta w stężeniu 200 μg/cm³ ograniczały wzrost grzybnia odpowiednio w 85 i 73%. Należy jednak dodać, że wyższe stosowane stężenia tych środków ochrony nie zahamowały całkowicie wzrostu grzybnia patogenu (rys. 2).

Pochodna strobiluryny stosowana profilaktycznie silnie ograniczała rozwój *Pestalotia* sp. na liściach *K. blossfeldiana* w porównaniu do liści kontrolnych, nieopryskiwanych (tab. 1). Efekt ochronny tiofanatu metylu i wyciągu z grejpfruta był nieco słabszy niż pochodnej strobiluryny, jednakże te środki ochrony również silnie

ograniczały rozwój choroby (tab. 1). Badane preparaty zastosowane interwencyjnie do opryskania liści z symptomami plamistości o długości od 4–6 mm, ograniczały rozwój choroby w około 60% (tab. 2).

Wcześniejsze badania wykazały wysoką skuteczność fungicydów strobilurynowych w zwalczaniu między innymi rdzy chryzantemy – *Puccinia horiana* (Wojdyła 2007), rdzy wierzy – *Melampsora epitea* (Wojdyła 2008a), mączniaka prawdziwego róży – *Sphaerotheca pannosa* var. *rose* (Wojdyła 2008b) oraz czarnej plamistości róż – *Diplocarpon rosae* (Wojdyła 2009). W literaturze istnieje wiele informacji o wysokiej skuteczności grzybobójczej fungicydów typu strobilurin. Jest to grupa związków wykazująca dobre działanie zapobiegawcze i wyniszczające. Poza bezpośrednim hamującym wpływem strobilurin na grzyby, związki te zmieniają równowagę hormonalną w roślinach (Grossmann i wsp. 1999). W preparacie Biosept Active substancjami biologicznie aktywnymi są przede wszystkim endogenne flawonoidy (Saniewska 2002), tworzące się w wielu gatunkach roślin w następstwie infekcji przez patogeniczne mikroorganizmy, odgrywają ważną rolę w reakcji obronnej podczas rozwoju choroby. Związki te hamują kiełkowanie zarodników, wzrost strzępki rostkowej i strzępki grzybni poprzez uszkodzenie systemów membranowych (Dakora 1995). Wcześniejsze badania wykazały również fungistatyczny wpływ preparatu Citrosept na wzrost liniowy:

B. cinerea, *B. tulipae*, *Phoma narcissi*, *P. poolensis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* i *F. oxysporum* f. sp. *callistephi*, f. sp. *narcissi* (Saniewska 2004; Saniewska i Jarecka 2006). Saniewska i wsp. (2005) wykazali wysoką skuteczność preparatu Biosept 33 SL w ograniczaniu rozwoju rdzy malwy ogrodowej.

Wnioski / Conclusions

1. W odciętych zdrowych liściach *K. blossfeldiana* trzymany na świetle (bez zraszania) w pozycji odwróconej, następowało nagromadzenie antocyjanów o barwie czerwono-fioletowej, natomiast w pozycji naturalnej antocyjany nie tworzyły się.
2. W odciętych zainfekowanych liściach przez *Pestalotia* sp. trzymany w tych samych warunkach na świetle antocyjany nie tworzyły się w odległości kilku milimetrów od zainfekowanych plam.
3. Badane preparaty (Biosept Active, Signum 33 WG i Topsin M 500 SC) stosowane profilaktycznie i interwencyjnie silnie ograniczały wzrost *Pestalotia* sp. na liściach *K. blossfeldiana* w porównaniu do liści kontrolnych, nieopryskiwanych.
4. W warunkach *in vitro* preparaty wykazały również silny fungitoksyczny wpływ na wzrost liniowy kultur *Pestalotia* sp.

Literatura / References

- Arx J.A. von 1974. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. Cramer. Lehre, Vaduz, 315 pp.
- Barnett H.L. 1960. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, Minn., 212 pp.
- Dakora F.D. 1995. Plant flavonoids: biological molecules for useful exploitation. Austr. J. Plant Physiol. 22: 87–99.
- Esterio M.A., Auger J.G., Vazquez E., Reyes M., Scheelje F., Verhoeff K. 1992. Efficacy of grapefruit extract BC – 1000 for control of *Botrytis cinerea* on table grapes in Chile. Proc. 10th Int. Botrytis Symp., Greece, Crete, Heraclion, 10–15 September 1992, 545, 10: 211–214.
- Grossmann K., Kwiatkowski J., Gaspar G. 1999. Regulation of phytohormone levels leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). J. Plant Physiol. 154: 805–808.
- Magnani R.F., Rodrigues-Fo E., Daolio C., Ferreira A.G., de Souza A.Q.L. 2003. Three highly oxygenated caryophyllene sesquiterpenes from *Pestalotiopsis* sp., a fungus isolated from bark of Pinus taeda. Z. Naturforsch. 58: 319–324.
- Pulici M., Sugawara F., Koshino H., Uzawa J., Yoshida S., Lobkovsky E., Clardy J. 1996a. A new isodrimeninol from *Pestalotiopsis* sp. J. Nat. Prod. 59: 47–48.
- Pulici M., Sugawara F., Koshino H., Uzawa J., Yoshida S. 1996b. Metabolite of endophytic fungi of Taxus brevifolia: The first highly functionalized humulane of fungal origin. J. Chem. Res. 8: 378–379.
- Saniewska A. 2002. Aktywność antygrzybowa endogennych flawonoidów grejpfruta (*Citrus paradise*). Mat. Symp. Nauk. „Fitopatologia polska w Europie”. Warszawa, 17–19 września 2002, 346, s. 62.
- Saniewska A. 2004. Antifungal activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) endogenic flavonoids. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 496: 609–617.
- Saniewska A., Jarecka A., Marasek A. 2005. Biopreparat Biosept 33 SL w ograniczaniu rozwoju rdzy malwy ogrodowej. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 504: 689–696.
- Saniewska A., Jarecka A. 2006. Wpływ endogennych flawonoidów grejpfruta (*Citrus paradisi*) na wzrost i rozwój dwóch form specjalnych *Fusarium oxysporum* Schlecht. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 46 (2): 517–520.
- Saniewski M., Saniewska A., Urbanek H. 2008. Inhibition of the anthocyanins accumulation in detached leaves of *Crassula multicava* Lem. Around the infected spots caused by *Pestalotia* sp. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 524: 393–400.
- Wojdyła A.T. 2007. Wpływ związków strobilurynowych na rozwój *Puccinia horiana*. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 47 (2): 366–370.
- Wojdyła A.T. 2008a. Wpływ związków strobilurynowych na rozwój *Melampsora epitea*. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 48 (2): 548–551.
- Wojdyła A.T. 2008b. Wpływ związków strobilurynowych na występowanie mączniaka prawdziwego róży (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*). Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 529: 263–269.
- Wojdyła A.T. 2009. Wpływ związków strobilurynowych na rozwój *Diplocarpon rosae*. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 49 (1): 301–304.
- Ye H.Z., Zhu T.H., Luo M.J. 2003. Isolation and purification of Pf-toxin from *Pestalotia funerea* (in Chinese). Acta Phytopathol. Sinica 33: 541–545.