

Received: 29.04.2016 / Accepted: 14.12.2016

Occurrence of *Fusarium* basal rot of onion (*Allium cepa*) in selected horticultural farms in Poland and evaluation of disease harmfulness

Występowanie fuzaryjnej zgnilizny piętki cebuli (*Allium cepa*) w wybranych gospodarstwach ogrodnich w Polsce oraz jej szkodliwość

Tomasz Lenartowicz^{1*}, Leszek B. Orlikowski², Magdalena Ptaszek²

Summary

Occurrence and population density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and its harmfulness for onion were the purpose of our studies. Mycological analysis was performed on 91 onion bulbs with basal rot symptoms that were collected from 9 farms, was done. Independently to onion source in each farm *Fusarium* basal rot caused by *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (*Foc*) was noticed. Using of rhododendron leaves as baits, *Foc* was detected from onion soil samples taken from 19 farms with different pathogen population. Isolate of *Foc* caused rotting of onion leaves, roots and bulb scales. In greenhouse trial, symptoms of discoloration of leaves and bulbs were observed on at least 50% of plants growing 9 weeks in substratum infested with *Foc*.

Key words: onion; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*; plantations; detection; harmfulness

Streszczenie

Badano występowanie i liczebność *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* na plantacjach cebuli oraz szkodliwość tego gatunku dla roślin. Przeprowadzono analizę mykologiczną 91 porażonych cebul z objawami zamierania szczyptoru oraz zgnilizny korzeni i piętki, pobranych z 9 gospodarstw. W każdym z gospodarstw stwierdzono na roślinach występowanie fuzaryjnej zgnilizny piętki powodowanej przez *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (*Foc*). Przy zastosowaniu liści różanecznika jako pułapek, w 19 gospodarstwach uprawiających cebulę, stwierdzono występowanie zróżnicowanej liczebności *Foc* w glebie. Badany izolat *Foc* powodował zgniliznę szczyptoru, korzeni i łusek cebuli. W doświadczeniu szklarniowym, po 9 tygodniach uprawy siewek w podłożu zakażonym przez *Foc*, symptomy zamierania stwierdzono na co najmniej 50% roślin.

Słowa kluczowe: cebula; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*; plantacje; wykrywanie; szkodliwość

¹Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych
Słupia Wielka, 63-022 Słupia Wielka

²Instytut Ogrodnictwa
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

*corresponding author: t.lenartowicz@coboru.pl

Wstęp / Introduction

Cebula (*Allium cepa* L.) należy do grupy najczęściej uprawianych warzyw na świecie (Rabiei-Motlagh i wsp. 2010; Southwood i wsp. 2012; Taylor i wsp. 2013; Ghanbarzadeh i wsp. 2014). Jej uprawie zagrażają liczne czynniki chorobotwórcze, spośród których do najgroźniejszych należą patogeny glebowe. Wśród nich największe straty powodują gatunki rodzaju *Fusarium*. Większość prezentowanych danych dotyczy *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (*Foc*), oznaczonego przez Snydera i Hansena w 1940 roku (Crowe 2008). Lacy i Roberts (1982), Kuruppu (1999), Cramer (2000), Galvan i wsp. (2008), Schwartz i Mohan (2008), Dissanayake i wsp. (2009) oraz Sasaki i wsp. (2015) podają, że straty spowodowane porażeniem cebul przez *Foc* przekraczają nawet 50%. Już Link i Bailey (1926), a następnie Woolliams (1927) i Palo (1928) stwierdzili występowanie fuzaryjnej zgnilizny cebuli, ale duże straty w jej uprawie zanotowano dopiero w drugiej połowie 20. wieku w południowej Afryce (Doidge i wsp. 1954). Od tego czasu występowanie tej choroby stwierdzono w Holandii, Serbii, Turcji, Wielkiej Brytanii, Iranie, Sri Lance, Urugwaju i USA (Southwood i wsp. 2012).

Kehr i wsp. (1962) oraz Rabiei-Motlagh i wsp. (2010) izolowali *Foc* z porażonych korzeni oraz podstawy gnijącej cebuli. Z kolei Doidge i wsp. (1954), Du Toit i wsp. (2003) oraz Ghanbarzadeh i wsp. (2014) uważają, że *Foc* wywołuje zgniliznę piętki cebuli. Bayraktar (2010) podaje, że *Foc* jest przyczyną początkowo więdnienia, następnie żółknięcia wierzchołków liści, ich zakrzywiania się lub zamierania oraz brązowej, mokrej zgnilizny zainfekowanych cebul. Poza występowaniem objawów chorobowych na roślinach w polu, choroba może rozwijać się w trakcie przechowywania.

Latem 2015 roku, w okresie bardzo sprzyjającym rozwojowi patogenów glebowych z uwagi na wysoką temperaturę powietrza, w wielu polskich gospodarstwach ogrodniczych, uprawiających cebulę, stwierdzono zamieranie roślin, spowodowane zgnilizną piętki, ze stratami plonu powyżej 20%.

Celem prowadzonych badań była izolacja czynnika chorobotwórczego powodującego chorobę, określenie liczebności inokulum patogena w glebach, gdzie na uprawianej cebuli stwierdzono objawy fuzariozy w różnych gospodarstwach oraz ocena jego szkodliwości dla roślin.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał roślinny i jego analiza mikologiczna

Do analizy pobrano 91 cebul z objawami zbrązowienia lub zbrunatnienia szczypioru, zgnilizny korzeni lub korzeni i piętki cebuli w lipcu i sierpniu 2015 roku z 8 gospodarstw z terenu Wielkopolski i jednego z Lubelszczyzny. Po zdjęciu łusek zewnętrznych widoczne było zbrązowienie lub zbrunatnienie piętki cebuli, a zgnilizna rozszerzała się ku górze. Na około połowie próbek cebuli zgnilizna obejmowała tkanki powyżej piętki i niektóre z nich były

miękkie, rozpadające się. Na części cebul, na ich piętkach widoczne były różowawe skupienia zarodników.

Z każdej cebuli, po zdjęciu zewnętrznych łusek, wycinano część piętki i po odkażeniu jej nad płomieniem palnika około 3–5 mm fragmenty wykładano na pożywkę ziemniaczano-glukozową (PDA – Potato Dextrose Agar, Merck) w szalkach Petriego o średnicy 90 mm. Po 3 dniach inkubacji w temperaturze 25°C wyrastające fragmenty kultur przeszczepiano na skosy z pożywką PDA. Po 10 dniach kultury segregowano na podstawie ich wyglądu oraz ich cech morfologicznych i oznaczano do gatunku korzystając z klucza do oznaczania grzybów rodzaju *Fusarium* (Booth 1970).

Próbki gleby i określenie ich zasiedlenia przez *F. oxysporum* f. sp. *cepae*

Począwszy od końca czerwca 2015 roku do marca następnego roku z 9 wcześniej wymienionych gospodarstw oraz dodatkowych 10 plantacji z Wielkopolski, na których uprawiane rośliny charakteryzowały się objawami zaginania się szczypioru, jego żółknięcia, brązowienia i stopniowego zamierania, a na cebulach stwierdzano zagniewanie ich piętki, pobierano próby gleby. Idąc po przekątnej pola z 4 miejsc pobierano około 1 kg ziemi z głębokości 5–15 cm. Próbkę wsypywano do jednego worka i dokładnie mieszano, a następnie wykonano ich analizę mykologiczną. Do detekcji *Foc* gatunku zastosowano liście różanecznika odmiany Nova Zembla stosując metodę opisaną przez Orlikowskiego i wsp. (2011). Analizowane próby gleby, bezpośrednio po ich uzyskaniu z poszczególnych gospodarstw, umieszczano w kuwetach fotograficznych, a następnie zalewano wodą destylowaną, tak aby jej poziom był około 1 cm powyżej powierzchni ziemi. Na powierzchnię wody wykładano liście różanecznika i okrywano to folią. Po 4 dniach inkubacji całe liście wyjmowano, dokładnie płukano, osuszano i wykładano na pożywkę PDA. Miara zasiedlenia gleb przez *Foc* była liczba nekrotycznych plam na liściach pułapkowych oraz liczba kolonii tego gatunku uzyskanych z wyłożenia 20 skrawków porażonych liści (niezależnie od ich liczby na blaszce liściowej) na pożywkę PDA.

Ocena szkodliwości *F. oxysporum* f. sp. *cepae* dla cebuli

Do badań chorobotwórczości wybrano losowo izolat reprezentacyjny *Foc* oznaczony symbolem C3. Kultury tego grzyba przygotowano na pożywce PDA. Po 7 dniach od zaszczepienia szalek z brzegu kultur wycinano krążki pożywki przerośnięte grzybnia i przenoszono je na nasady liści, korzeni i zewnętrznych łusek cebul odmiany Wolska, umieszczonych w kuwetach (32 × 26 × 5 cm) wyłożonych wilgotną, sterylną bibułą filtracyjną, przykrytą cienką siatką. Po inokulacji, kuwety okrywano folią i inkubowano na stołach laboratoryjnych w temperaturze 22–25°C. Po 5 i 7 dniach mierzono długość nekrozy.

Doświadczenia laboratoryjne założono w układzie całkowicie losowym w 4 powtórzeniach po 5 organów cebuli i powtórzono 2-krotnie w odstępie 2-tygodniowym. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic pomiędzy średnimi ($\alpha = 0,05$) oceniono testem Duncana.

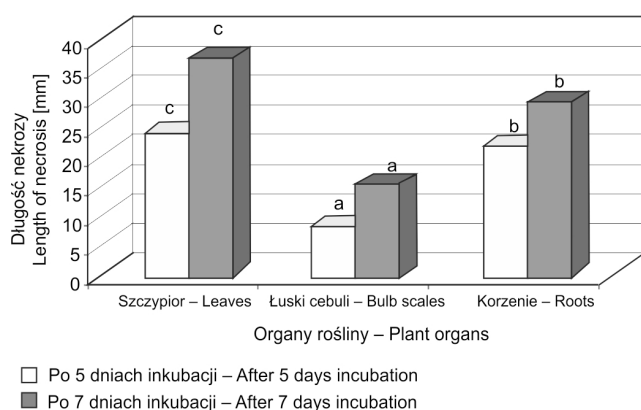
[illegible]

Tabela 2. Detekcja *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* z gleb pobranych z różnych plantacji z uprawą cebuli wykazującej objawy fuzaryjnej zgnilizny piętki; analizę mykologiczną pobranych prób gleby wykonywano od końca czerwca 2015 do marca 2016 roku

Table 2. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from soil samples taken from different plantations with symptoms of basal rot of bulbs; mycological analysis of soil samples obtained were done from the end of June 2015 till March 2016

Nr gospodarstwa Farm number	Liczba nekrotycznych plam na liść pułapkowy Number of necrotic spots/leaf bait	Średnia liczba uzyskanych izolatów <i>Foc</i> z 20 eksplantatów wyłożonych na pożywkę PDA Mean number of <i>Foc</i> isolates obtained from 20 inokula transferred on PDA medium
C1	41,3 g	19,0 gh
C2	20,8 de	11,0 de
C3	52,5 h	20,0 h
C4	53,0 h	17,8 g
C5	43,0 g	17,8 g
C6	10,5 ab	8,0 bc
C7	6,0 a	6,0 a
C8	8,3 a	8,5 bc
C9	22,5 de	12,5 ef
C10	9,5 ab	10,5 de
C11	25,8 ef	12,3 ef
C12	19,0 cd	8,0 bc
C13	40,8 g	18,5 gh
C14	18,8 cd	9,8 cd
C15	23,5 de	14,0 f
C16	9,5 ab	6,8 ab
C17	29,3 f	11,0 de
C18	38,8 g	12,3 ef
C19	14,0 bc	6,8 ab

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncan
Means in columns, followed by the same letter, do not differ, according to Duncan's multiple range test



Rys. 1. Kolonizacja organów cebuli przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

Fig. 1. Colonisation of onion organs by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

W doświadczeniu szklarniowym, po 3 tygodniach od wysiewu nasion, objawy przejaśnienia siewek i żółknięcia wierzchołków szczypioru stwierdzono na około 10% siewek odmiany Wenta i 5% na odmianie Wolska (tab. 3). Po tym okresie objawy przejaśnienia wystąpiły spora-

dycznie na siewkach kontrolnych, a przyczyną okazał się *Pythium ultimum*. Po 6 tygodniach objawy brązowienia szczypioru stwierdzono na około 26% siewek odmiany Wenta i około 20% na odmianie Wolska (tab. 3). Po 9 tygodniach zbrązowienie szczypioru i zgniliznę piętki na długości około 3 mm stwierdzono na co najmniej 60% roślin odmiany Wenta i połowie roślin odmiany Wolska (tab. 3). Niezależnie od terminu obserwacji, po wyłożeniu porażonych tkanek na pożywkę PDA izolowano z nich *Foc*.

Wyniki badań mykologicznych zarówno porażonej cebuli, jak i prób gleb pochodzących z 19 plantacji, wskazują na występowanie w nich *Foc*. Najbardziej prawdopodobnym źródłem tego patogena były nasiona lub/i dymka. Występowanie fuzariozy stwierdzano bowiem w różnych miejscach plantacji. Obok możliwości przenoszenia patogena z nasionami i dymką, istotny wpływ na rozprzestrzenianie *Foc* mogła mieć mechaniczna uprawa i przemieszczanie patogena w resztkach gleby na kołach ciągnika i narzędziach w czasie orki i odchwaszczania plantacji. Na polach, nawet o lekkim nachyleniu, zarodniki grzyba mogły być rozprzestrzeniane z wodą opadową lub w czasie nawadniania plantacji. Ghanbarzadeh i wsp. (2014) podają, że *Foc* powoduje opóźnienie kiełkowania nasion, zgorzel przed- i powschodową,

Tabela 3. Rozwój fuzaryjnej zgnilizny piętki cebuli w zależności od odmiany i okresu uprawy
Table 3. Development Fusarium basal rot of onion in relation to cultivar and growing period

Odmiany Cultivars	Kombinacje Treatments	% porażonych siewek (n = 50) po dniach uprawy % of diseased plants (n = 50) after days of growing		
		21	42	63
Wenta	kontrola niezakażona control uninfested	1,6 a	3,6 a	6,0 a
	podłoże zakażone <i>Foc</i> substratum infested by <i>Foc</i>	9,0 c	33,0 c	72,0 b
Wolska	kontrola niezakażona control uninfested	1,0 a	3,0 a	6,0 a
	podłoże zakażone przez <i>Foc</i> substratum infested by <i>Foc</i>	5,0 b	17,6 b	53,6 b

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
Means in columns, followed by the same letter, do not differ, according to Duncan's multiple range test

zahamowanie wzrostu siewek, chlorozę i nekrozę liści, zmianę zabarwienia korzeni oraz cebul i w efekcie końcowym zgniliznę i zamieranie roślin. W badaniach własnych obserwowano podobne objawy na polu, ale w doświadczeniach szklarniowych nie stwierdzano zgorzeli przedwschodowej. Wynikało to zapewne z wysiewu wszystkich nasion na tej samej głębokości i znacznie mniejszego zagęszczenia siewek. Można to tłumaczyć niewielką, często niewidoczną jeszcze nekrozą piętki po zbiorze i mimo znacznie niższej temperatury w pomieszczeniu, rozwojem choroby wewnątrz cebuli. Zdaniem Kehr i wsp. (1962) oraz Abawi i Lorbeera (1972) optimum temperatury dla rozwoju tej choroby to 28–32°C, aczkolwiek autorzy obserwowali fuzariozę już w temperaturze 15°C. Wysoka temperatura powietrza latem 2015 roku w Polsce sprzyjała niewątpliwie rozwojowi fuzaryjnej zgnilizny piętki, co w niektórych gospodarstwach powodowało straty plonu nawet powyżej 20%.

Zdaniem Cramera (2000), główną formą inokulum *Foc* są chlamydospory, które mogą przetrwać w glebie przez wiele lat. Brayford (1996) uważa, że obecność chlamydospor w glebie sprawia, że nie ma możliwości uzyskania plonu cebuli wolnej od *Foc*. Istotne jest więc zminimalizowanie lub wyeliminowanie patogena z nasion. Taylor i wsp. (2013) twierdzą, że w Wielkiej Brytanii tylko tiuram, stosowany do przedsięwzięcia odfekowania nasion, skutecznie eliminuje omawianego patogena. Z badań Ozer i Koycu (1998) wynika, że benomyl w mieszaninie z tiuramem ograniczają zakażenie nasion przez *Foc*, ale w przypadku ich wysiewu do zakażonej gleby skuteczniej-

szym w zaprawianiu okazał się prochloraz. Jest prawdopodobne, że stosowanie nadtlenu wodoru może w znacznej mierze ograniczać *Foc* na co wskazują badania Barnetta (1976) na nasionach sosny zakażonych przez *F. oxysporum*. Nadtlenek wodoru, zastosowany przez autora do kilkuminutowego zaprawiania nasion, całkowicie eliminował tego patogena. Postępem w ograniczeniu występowania fuzariozy może być hodowla odpornościowa. Kehr i wsp. (1962) stwierdzili bowiem odporność niektórych linii hodowlanych cebuli na *Foc*.

Wnioski / Conclusions

1. *F. oxysporum* f. sp. *cepae* okazał się najczęściej występującym grzybem na porażonych cebulach pochodzących z 9 gospodarstw.
2. Analiza gleby pobranej z 19 gospodarstw, gdzie stwierdzono objawy zamierania cebuli, wykazała występowanie w nich *F. oxysporum* f. sp. *cepae*.
3. W doświadczeniach laboratoryjnych *F. oxysporum* f. sp. *cepae* powodował objawy zgnilizny szczypioru, łusek cebuli i korzeni, przy czym nekroza rozwijała się najszybciej na liściach.
4. W badaniach szklarniowych, niezależnie od odmiany cebuli, po 9 tygodniach uprawy roślin w podłożu zakażonym przez *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, objawy więdnienia i brązowienia szczypioru oraz zgnilizny piętki cebuli wykazywało ponad 50% roślin.

Literatura / References

- Abawi G.S., Lorbeer J.W. 1972. Several aspects of the ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology* 62: 870–876.
- Barnett J.P. 1976. Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide. *Tree Planters Notes* 27 (3): 17–19.
- Bayraktar H. 2010. Genetic diversity and population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the causal agent of Fusarium basal rot on onion using RAPD markers. *Journal of Agricultural Science* 16: 139–149.
- Booth C. 1970. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England: 130–154.
- Brayford D. 1996. IMI descriptions of fungi and bacteria set 127. *Mycopathologia* 133: 35–63.
- Carrieri R., Raimo F., Pentangelo A., Lahoz E. 2013. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarisation combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Crop Protection* 43: 414–423.

- Cramer C.S. 2000. Breedings and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica* 115 (3): 159–166.
- Crowe F.J. 2008. *Fusarium* bulb rot of onion and garlic. p. 15–17. In: “Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests” 2nd edition (H.F. Schwartz, S.K. Mohan, eds.). APS Press, St. Paul, MN, 136 pp.
- Dissanayake M.L.M.C., Kashima R., Tanaka S., Ito S. 2009. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from wilted Welsh onion in Japan. *Journal Genetic Plant Pathology* 75 (2): 125–130.
- Doidge E.M., Bottomley A.M., Van der Plank J.E., Pauer G.D. 1954. A revised list of plant diseases in South Africa. Union South Africa, Department of Agriculture Science Bulletin 346: 1–122.
- Du Toit L.J., Inglis D.A., Pelter G.Q. 2003. *Fusarium proliferatum* pathogenic to onion bulbs in Washington. *Plant Disease* 87 (6): 750.1.
- Galvan G.A., Koning-Boucoiran C.F.S., Koopman W.J.M., Burger-Meijer K., Gonzales P.H., Waalwijk C., Kik C., Scholten O.E. 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology* 121: 499–512.
- Ghanbarzadeh B., Goltapeh E.M., Safaie N. 2014. Identification of *Fusarium* species causing basal rot of onion in East Azarbaijan province, Iran and evaluation of their virulence on onion bulbs and seedlings. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47 (9): 1050–1062.
- Kehr A.E., O’Brien M.J., Davis E. 1962. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and its interaction with *Pyrenochaeta terrestris* on onion. *Euphytica* 11: 197–208.
- Kuruppu P.U. 1999. First report of *Fusarium oxysporum* causing a leaf twisting disease on *Allium cepa* var. *ascalonicum* in Sri Lanka. *Plant Disease* 83 (7): 695–695.
- Lacy M., Roberts D. 1982. Yields of onion cultivars in Midwestern organic soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Pyrenochaeta terrestris*. *Plant Disease* 66: 1003–1005.
- Link G.K.K., Bailey A.A. 1926. *Fusaria* causing bulb rot of onions. *Journal of Agriculture Research* 33 (10): 929–952.
- Marlatt R. 1958. Onion *Fusarium* basal rot in Arizona. *Plant Disease Reporter* 42: 667–668.
- Orlikowski L.B. 1999. Selective medium for the evaluation of biocontrol agents efficacy in the control of soil-borne pathogens. *Bulletin of Polish Academy of Science, Biological Science* 47 (2–4): 167–172.
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011. Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody. *Sylwan* 155 (7): 493–499.
- Ozer N., Koycu N.D. 1998. Evaluation of seed treatments for controlling *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* on onion seeds. *Phytopathologia Mediterranea* 37 (1): 33–40.
- Palo M.A. 1928. A *Fusarium* causing bulb rot of onion in Philippines. *Philippines Agriculture* 17: 301–316.
- Rabiei-Motlagh E., Falahati-Rasteger M., Rouhani H., Jafarpour B., Jahanbakhsh V. 2010. Root diseases of onion caused by some root colonizing fungi in northeast of Iran. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science* 7 (4): 484–491.
- Schwartz H.F., Mohan S.K. (eds.). 2008. *Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests*. 2nd edition. APS Press, St. Paul, MN, 136 pp.
- Sasaki K., Nakahara K., Tanaka S., Shigyo M., Ito S.I. 2015. Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and Welsh onion in Japan. *Phytopathology* 105 (4): 525–532.
- Sohi H., Puttoo B. 1972. Studies of the fungal flora of onion (*Allium cepa* L.) seeds. *Indian Journal of Horticulture* 29: 231–234.
- Southwood M.J., Viljoen A., Mostert L., Rose L.J., McLeod A. 2012. Phylogenetic and biological characterization of *Fusarium oxysporum* isolates associated with onion in South Africa. *Plant Disease* 96: 1250–1261.
- Stankovic S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., Moretti A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 118 (2): 165–172.
- Taylor A., Vagany V., Barbara D.J., Thomas B., Pink D.A.C., Jones J.E., Clarkson J.P. 2013. Identification of differential resistance of six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates on commercial onion cultivars through the development of rapid seedling assay. *Plant Pathology* 62 (1): 103–111.
- Vannacci G. 1981. Presence of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wr. and Reinke on onion seeds and its pathogenicity. *Phytopathologia Mediterranea* 20: 144–148.
- Woolliams G.E. 1927. *Fusarium* bulb-rot of onions at Summerland. Division of Botany, Canada Department of Agriculture: 182–192.