

## EFEKTYWNOŚĆ OCHRONNEGO DZIAŁANIA CHITOZANU W OGRANICZANIU CHORÓB GRZYBOWYCH SOI

Danuta Pięta, Alina Pastucha

**Streszczenie.** W latach 1999–2001 przeprowadzono badania na polu Gospodarstwa Doświadczalnego w Czesławicach z naturalnie nagromadzonym w glebie materiałem infekcyjnym. Przedmiotem badań była soja odm. ‘Polan’ oraz chitozan w postaci mikrokrystalicznego żelu zawierającego odpowiednio 2,76% czystego związku. Do badań użyto wodnej zawiesiny tego związku zawierającej 0,1% chitozanu. W doświadczeniu uwzględniono dwie kombinacje, stosując chitozan do oprysku siewek i roślin w początkowej fazie kwitnienia oraz kontrolę bez żadnych zabiegów. W każdym roku badań prowadzono dwukrotnie obserwacje polowe, w których uwzględniono liczebność i zdrowotność siewek, a także roślin w fazie kwitnienia. Po zbiorze roślin określano również wielkość i jakość plonu nasion soi. W trakcie prowadzonych obserwacji polowych, porażone siewki, a także porażone rośliny w fazie kwitnienia pobierano do laboratorium w celu wykonania analizy mikologicznej.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono zróżnicowane wschody i zdrowotność roślin w poszczególnych kombinacjach doświadczenia. Chitozan stosowany do oprysku roślin w fazie kwitnienia nieco poprawił zdrowotność roślin i nasion oraz przyczynił się do wzrostu plonowania roślin w porównaniu do kombinacji, gdzie był stosowany do oprysku czterotygodniowych siewek, a także w porównaniu do kontroli.

Siewki soi najczęściej porażane były przez *F. solani* i *Rhizoctonia solani*. Natomiast rośliny w fazie kwitnienia najczęściej porażane były przez *F. oxysporum* f. sp. *glycines*. Z porażonych nasion soi wyosabniano *Phomopsis sojae*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *A. alternata*, *B. cinerea* i *S. sclerotiorum*.

**Słowa kluczowe:** chitozan, soja, grzyby chorobotwórcze przeżywające w glebie

### WSTĘP

Występowanie chorób w okresie wegetacji roślin spowodowało częste stosowanie fungicydów. Wzrost wiedzy o konsekwencjach dla środowiska oraz możliwościach skażenia produktów rolnych wynikające z powtarzających się zabiegów preparatami chemicznymi, wskazuje na potrzebę wprowadzenia metod niechemicznego zwalczania chorób. Obecnie coraz częściej dąży się do biologicznego zwalczania fitopatogenów,

wykorzystując biopreparaty uzyskiwane na bazie mikroorganizmów antagonistycznych oraz związków organicznych. Stosowanie biopreparatów m.in. ogranicza powstawanie wirulentnych izolatów fitopatogenów oraz skażenie uprawnego środowiska glebowego związkami chemicznymi [Borecki 1984]. Jednym z takich związków jest chitozan. Jest on pochodną chityny otrzymywany przez jej termiczną deacetylację. Chityna i chitozan wywołują szerokie spektrum reakcji obronnych w roślinach [Orlikowski i Skrzypczak 1997], czego przykładem jest odkładanie kallozy [Kohle i in. 1984], lignifikacja [Barber i in. 1989] oraz zmiana w przepuszczalności błon komórkowych [Yaung i in. 1982].

Według wielu badaczy chitozan indukuje odporność roślin oraz zabezpiecza je przed porażeniem przez wirusy, bakterie oraz grzyby [Pospieszny i in. 1995, Pospieszny 1997, Wojdyła i Orlikowski 1997, Pięta i in. 1998].

Przeprowadzone badania przez Reddy i in. [1998] wykazały, że chitozan znacznie ograniczał wzrost strzępek, tworzenie zarodników oraz hamował procesy biochemiczne w komórkach grzybni *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, przez co grzyb ten wytwarzał mniej mikotoksyn i stał się mało wirulentny. Według Perekhoda i in. [1997] omawiany związek indukuje odporność w roślinach ziemniaka przeciwko *Phytophthora infestans* przez wzmożoną syntezę fitoaleksyn, a szczególnie riszytyny. Chitozan wprowadzony na ziarno pszenicy skutecznie chronił kielki, a następnie rośliny przed porażeniem przez *Fusarium graminearum* [Reddy i in. 1999]. Natomiast omawiany związek stosowany do podłoża agarowego ograniczał wzrost i rozwój *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* oraz gatunków z rodzajów *Pythium*, *Rhizoctonia* i *Fusarium* [Li Bao Ying i Ma Shu Mei 1997, Pięta i in. 1998, Pastucha 2001]. Według Orlikowskiego i Skrzypczaka [1997] moczenie cebul tulipana i bulw mieczyka w chitozanie znacznie zmniejszyło występowanie fuzariozy tych roślin.

Wymienione zalety chitozanu jako czynnika indukującego odporność roślin przed porażeniem przez fitopatogeny oraz jego nieszkodliwość dla ludzi i środowiska były inspiracją do podjęcia badań nad efektywnością działania chitozanu w ograniczaniu porażania soi przez grzyby przeżywające w glebie.

## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w latach 1999–2001 w Gospodarstwie Doświadczalnym w Czesławicach k. Nałęczowa na polu z naturalnie nagromadzonym materiałem infekcyjnym po sześciolatej, powtarzającej się uprawie soi. Do założenia doświadczenia użyto nasiona soi odmiany 'Polan' oraz chitozan w postaci mikrokryształicznego żelu zawierającego 2,76% czystego związku. Związek ten otrzymano z Instytutu Włókien Chemicznych w Łodzi. Do doświadczeń użyto wodnej zawiesiny tego związku zawierającej 0,1% chitozanu, uwzględniając następujące kombinacje:

- oprysk siewek po czterech tygodniach od założenia doświadczenia,
- oprysk roślin na początku kwitnienia,
- kontrola, bez żadnych zabiegów,

Każda kombinacja doświadczenia obejmowała 4 poletka (4 powtórzenia) o powierzchni 1,25 m<sup>2</sup>, na które wysiewano po 100 nasion. Doświadczenie co roku zakładano w I dekadzie maja. W każdym roku badań przeprowadzano dwukrotne obserwacje,

pierwszą po sześciu tygodniach od założenia doświadczenia oraz drugą w fazie pełni kwitnienia roślin. Obserwacje te przypadały po dwóch tygodniach od oprysku chitozanem. Podczas przeprowadzanych obserwacji ustalano liczebność oraz zdrowotność roślin na poletkach poszczególnych kombinacji doświadczenia. W przypadku wystąpienia roślin z objawami nekrozy na korzeniach i podstawie łodygi pobierano po 5 z każdej kombinacji do laboratorium w celu ustalenia czynników powodujących nekrozę korzeni i podstawy łodyg. Przygotowanie materiału roślinnego, sposób jego odkażania i przeprowadzenie analizy mikologicznej było zgodne z metodą opisaną przez Pięć [1988]. Po zbiorze roślin ustalono wielkość i jakość plonu nasion.

Wyniki liczebności, zdrowotności roślin oraz plonu nasion opracowano statystycznie, a istotność różnic określono za pomocą półprzedziałów Duncana [Elandt 1964].

## WYNIKI

Podczas pierwszej obserwacji zanotowano zróżnicowane wschody na poletkach poszczególnych kombinacji doświadczenia (tab. 1). Na poletkach z zastosowaniem chitozanu do oprysku czterotygodniowych siewek zanotowano od 76 do 88 roślin, przy czym z objawami chorobowymi było średnio 5,3 siewek (tab. 1). Siewki uznane za porażone były zahamowane we wzroście z żółknącymi dolnymi liśćmi i nekrotycznymi plamami na korzeniach i podstawie łodygi. Natomiast na poletkach kombinacji kontrolnej wyrosło od 72 do 88 siewek (średnio 82), a z objawami chorobowymi było średnio 15,3 roślin. Dane dotyczące liczebności i zdrowotności siewek uzyskane z poletek, na których wzrastała soja bez żadnych zabiegów, a przeznaczona do oprysku chitozanem na początku kwitnienia były zbliżone do wyników z kombinacji kontrolnej (tab. 1).

Po przeprowadzeniu drugiej obserwacji polowej przypadającej po dwóch tygodniach od zastosowania chitozanu, tj. w okresie pełni kwitnienia roślin soi, zanotowano niewielką różnicę w liczbie roślin w poszczególnych kombinacjach w porównaniu z wynikami z pierwszej obserwacji (tab. 2). Na poletkach z zastosowanym chitozanem do oprysku roślin w początkowej fazie kwitnienia ogólna liczba roślin wahała się od 68 do 86 (tab. 2). Nieco więcej roślin na poletkach, bo od 72 do 90 zanotowano w kombinacji, gdzie chitozanu użyto tylko do oprysku czterotygodniowych siewek (tab. 2). Podczas tej obserwacji zauważono rośliny z wyraźnymi objawami chorobowymi. Rośliny uznane za porażone były bez pąków kwiatowych oraz z wyraźnymi rozległymi plamami nekrotycznymi na korzeniach i podstawie łodygi. Najmniej porażonych, bo średnio 6 roślin zanotowano w kombinacji, gdy zastosowano chitozan do oprysku roślin na początku kwitnienia. Natomiast najwięcej roślin z opisanymi objawami chorobowymi było w kombinacji kontrolnej, w której udział roślin z objawami chorobowymi wzrósł o 7% (tab. 2).

Wielkość uzyskanego plonu była proporcjonalna do liczebności i zdrowotności roślin w poszczególnych kombinacjach doświadczenia (tab. 3). Największy plon (średnio 416 g) z najmniejszym udziałem nasion porażonych (średnio 3,9%) uzyskano z roślin wyrosłych w kombinacji z chitozanem zastosowanym do oprysku roślin na początku fazy kwitnienia (tab. 3). Nieco mniejszy plon (średnio 398 g) przy większej liczbie nasion z plamami (średnio 7%) uzyskano z kombinacji po zastosowaniu chitozanu do

Tabela 1. Liczebność i zdrowotność siewek soi w doświadczeniu polowym  
Table 1. Number and healthiness of the soybean seedlings in the field experiment

Kombinacja doświadczenia Experimental combination	Liczba siewek – Number of seedlings								% porażonych siewek Percentage of infected seedlings
	Ogólna liczba siewek Total number of seedlings				Liczba siewek porażonych Number of infected seedlings				
	1999	2000	2001	średnia mean	1999	2000	2001	średnia mean	
Opryskane siewki Sprayed seedlings	88 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	76 <sup>a</sup>	84,7 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	5,3 <sup>a</sup>	6,26 <sup>a</sup>
Siewki bez żadnych zabiegów przewidzianych do oprysku chitozanem w początkowej fazie kwitnienia Nontreated seedlings meant for spraying with chitosan in the initial phase of anthesis	88 <sup>a</sup>	86 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	24 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	17,1 <sup>b</sup>
Kontrola Control	86 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	28 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	15,3 <sup>b</sup>	18,6 <sup>b</sup>

Tabela 2. Liczebność i zdrowotność roślin soi w fazie kwitnienia w doświadczeniu polowym  
Table 2. Number and healthiness of the soybean plants at anthesis in the field experiment

Kombinacja doświadczenia Experimental combination	Liczba roślin – Number of plants								% porażonych roślin Percentage of infected plants
	Ogólna liczba roślin Total number of plants				Liczba roślin porażonych Total number of infected plants				
	1999	2000	2001	średnia mean	1999	2000	2001	średnia mean	
Opryskane siewki Sprayed seedlings	88 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>	72 <sup>a</sup>	83,3 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	8,8 <sup>a</sup>
Opryskane rośliny na początku kwitnienia Sprayed the plants at anthesis	86 <sup>a</sup>	86 <sup>ab</sup>	68 <sup>a</sup>	80 <sup>ab</sup>	8 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>
Kontrola Control	82 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>	78 <sup>a</sup>	32 <sup>c</sup>	16 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	25,6 <sup>b</sup>

\*Średnie wartości w kolumnach nie różnią się istotnie przy  $P \leq 0,05$ , jeśli są oznaczone tą samą literą (tabela 1 i 2)  
\*Means within the columns do not differ significantly  $P \leq 0,05$ , if they are marked with the same letter (table 1 and 2)

Tabela 3. Plon nasion soi i ich zdrowotność  
Table 3. Yield and healthiness of soybean seeds

Kombinacja doświadczenia Experimental combination	Masa nasion z poletka, g Seeds weight from a plot, g			Udział nasion z plamami, % Percentage of seeds with spots			
	1999	2000	2001	średnia mean	1999	2000	2001
Opryskane siewki Sprayed seedlings	440 <sup>a*</sup>	375 <sup>b</sup>	379 <sup>ab</sup>	398 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	9,8 <sup>b</sup>
Opryskane rośliny na początku kwitnienia Sprayed the plants at anthesis	425 <sup>b</sup>	392 <sup>b</sup>	433 <sup>b</sup>	416 <sup>b</sup>	4,2 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>
Kontrola Control	153 <sup>a</sup>	162,5 <sup>a</sup>	315 <sup>a</sup>	210 <sup>a</sup>	10,0 <sup>b</sup>	8,3 <sup>b</sup>	10,5 <sup>b</sup>
				średnia mean			
							7,0 <sup>ab</sup>
							3,9 <sup>a</sup>
							9,6 <sup>b</sup>

\* Średnie wartości w kolumnach nie różnią się istotnie przy  $P \leq 0,05$ , jeśli są oznaczone tą samą literą

\* Means within the columns do not differ significantly  $P \leq 0,05$ , if they are marked with the same letter

Tabela 4. Grzyby wyizolowane z porażonych siewek soi  
Table 4. Fungi isolated from the infected soybean seedlings

Grzyby Fungi Fungus species	Suma izolatów uzyskanych w latach 1999–2001 Sums of isolates obtained in the years 1999–2001									
	Kombinacja doswiadczenia – Experimental combination					Razem Total	Razem Total	Razem Total	Ogółem Total	
	Opryskane czterotygodniowe siewki Sprayed seedlings									
k	pl	razem total	k	pl	razem total	k*	pl**	Ogółem Total		
<i>Alternaria alternata</i> (fr.) Keissler	-	2	2	7	14	7	16	23		
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghe	-	1	1	1	4	1	5	6		
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	-	2	2	-	15	-	17	17		
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (fries) de Vries	2	-	2	6	-	8	-	8		
<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda ex Fr.) Sacc.	-	2	2	4	8	4	10	14		
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	-	1	1	8	15	8	16	24		
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>glycines</i> Amst. Amst.	4	7	11	18	22	22	29	51		
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	3	8	11	25	28	28	36	64		
<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman, Abbott.	2	2	4	1	-	3	2	5		
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier	1	3	4	2	-	3	3	6		
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	-	1	1	1	2	1	3	4		
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>verrucosum</i>										
Samsom, Stolk et Hadlok	1	-	1	8	16	9	16	25		
<i>Phoma exigua</i> Desm var. <i>exigua</i>	-	1	1	6	15	6	16	22		
<i>Pythium irregulare</i> Buisman	-	1	1	8	13	8	14	22		
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	-	10	10	15	26	15	36	51		
<i>Trichoderma viride</i> Pers ex S.F. Gray	6	7	13	1	4	7	11	18		
<i>Trichothecium roseum</i> Link	1	-	1	5	3	6	3	9		
<b>RAZEM – TOTAL</b>	<b>116</b>	<b>185</b>	<b>301</b>	<b>20</b>	<b>48</b>	<b>136</b>	<b>233</b>	<b>369</b>		

\*k – korzeń, root

\*\*pl – podstawa łodygi, stem base

Tabela 5. Grzyby wyizolowane z porażonych roślin soi w fazie kwitnienia  
Table 5. Fungi isolated from the infected soybean plants at anthesis

Gatunek grzyba Fungus species	Suma izolatów uzyskanych w latach 1999–2001 Sums of isolates obtained in the years 1999–2001													
	Kombinacja doświadczenia – Experimental combination						Kontrola Control							
	Opryskane czterogodniowe siewki Sprayed seedlings			Opryskane rośliny w fazie kwitnienia Sprayed the plants at anthesis			Kontrola Control			Razem Total				
k*	pl**	razem total	k	pl	razem total	k	pl	razem total	k	pl	razem total	k	pl	razem total
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	14	23	37	7	23	30	12	24	36	33	70	103		
<i>Alternaria tenuissima</i> (Fries) Wiltshire	5	8	13	7	15	22	8	17	25	20	40	60		
<i>Borytis cinerea</i> Pers.	6	11	17	2	10	12	5	18	23	13	39	52		
<i>Cladosporium herbarum</i> Link ex Fries	10	21	31	7	29	36	11	30	41	28	80	108		
<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda ex Fr.) Sacc.	3	9	12	4	8	12	8	15	23	15	32	47		
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	10	14	24	9	21	30	6	20	26	25	55	80		
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	20	27	47	15	22	37	21	28	49	56	77	133		
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>glycines</i> Amst. Amst.	30	61	91	33	60	93	52	74	126	115	195	310		
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	14	28	42	12	26	38	11	27	38	37	81	118		
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	8	11	19	3	12	15	6	15	21	17	38	55		
<i>Penicillium notatum</i> Westling	14	15	29	17	24	41	31	38	69	62	77	139		
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>verrucosum</i> Samson, Stolk et Hadlok	18	27	45	17	29	46	18	28	46	53	84	137		
<i>Phoma eupyrena</i> Sacc.	4	7	11	11	17	28	15	21	36	30	45	75		
<i>Phoma exigua</i> Desm var. <i>exigua</i>	1	8	9	5	4	9	14	14	28	20	26	46		
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	5	23	28	12	24	36	15	25	40	32	72	104		
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	14	21	35	7	10	17	9	16	25	30	47	77		
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	1	10	11	6	6	12	5	9	14	12	25	37		
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.)	4	8	12	4	15	19	2	1	3	10	24	34		
<i>Trichoderma koningii</i> Oud.	4	9	13	8	13	21	3	-	3	15	22	37		
<i>Trichoderma viride</i> Pers ex S.F. Gray	4	8	12	9	28	37	3	4	7	16	40	36		
<b>RAZEM TOTAL</b>	<b>189</b>	<b>349</b>	<b>538</b>	<b>195</b>	<b>396</b>	<b>591</b>	<b>255</b>	<b>424</b>	<b>679</b>	<b>639</b>	<b>1169</b>	<b>1788</b>		

\*k – korzeń, root

\*\*pl – podstawa łodygi, stem base

Tabela 6. Grzyby wyizolowane z porażonych nasion soi  
Table 6. Fungi isolated from the infected soybean seeds

Gatunek grzyba Fungus species	Suma izolatów uzyskanych w latach 1999–2001 Sums of isolates obtained in the years 1999–2001											
	Kombinacja doświadczenia – Experimental combination											Razem Total
	Opryskane czterygodniowe siewki Sprayed seedlings			Opryskane rośliny w fazie kwitnienia Sprayed the plant at anthesis			Kontrola Control		Razem Total		Ogółem Total	
	a*	b**	Razem Total	a	b	Razem Total	a	b	Razem Total	a		b
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	4	-	4	1	2	3	3	12	15	8	14	22
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	-	2	2	-	2	2	2	7	9	2	11	13
<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda ex Fr.) Sacc.	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	1
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	-	4	4	-	1	1	2	8	10	2	13	15
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	1	2	3	-	1	1	2	2	4	2	5	7
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl.	1	2	3	1	1	2	5	7	12	7	10	17
<i>Humicola grisea</i> Domsch	5	1	6	3	-	3	-	-	-	8	1	9
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	-	1	1	-	-	-	3	4	7	3	5	8
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	-	1	1	-	-	-	2	4	6	2	5	7
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>verrucosum</i> Samson, Stolk et Hadlok	-	1	1	-	2	2	3	6	9	3	9	12
<i>Phoma exigua</i> Desm var. <i>exigua</i>	1	5	6	-	-	-	6	17	23	7	22	29
<i>Phomopsis sojae</i> Lehman	45	44	89	42	44	86	41	31	72	128	119	247
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	-	1	1	1	-	1	2	9	11	3	10	13
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	-	1	1	-	-	-	3	17	20	3	18	21
<i>Trichoderma viride</i> Pers ex S.F. Gray	2	4	6	2	6	8	-	-	-	4	10	14
<i>Trichothecium roseum</i> Link	1	2	3	-	-	-	-	-	-	1	2	3
<b>RAZEM TOTAL</b>	<b>60</b>	<b>71</b>	<b>131</b>	<b>50</b>	<b>59</b>	<b>109</b>	<b>75</b>	<b>124</b>	<b>199</b>	<b>184</b>	<b>254</b>	<b>438</b>

\*a – nasiona bez plam – seeds without spots

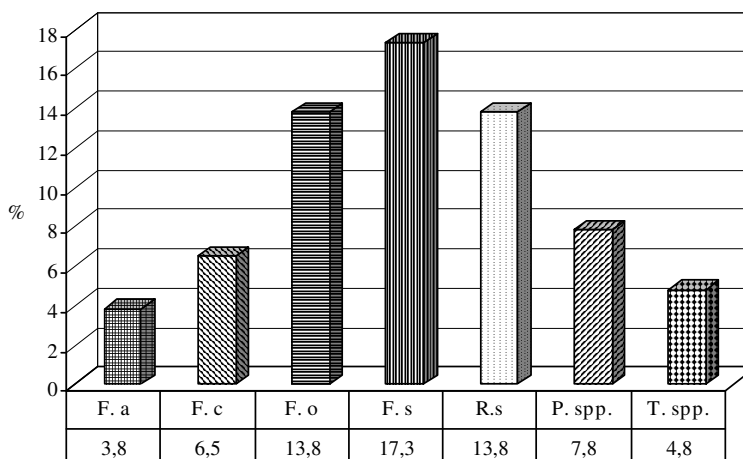
\*\*b – nasiona z plamami – seeds with spots



oprysku czterotygodniowych siewek. Najmniejszy plon nasion soi (średnio 210 g) przy największym udziale nasion z plamami uzyskano z roślin wzrastających w kombinacji kontrolnej, tj. bez użycia chitozanu (tab. 3).

W wyniku przeprowadzonej laboratoryjnej analizy mikologicznej porażonych organów siewek (korzenie, podstawa łodygi) uzyskano 369 izolatów grzybów zaliczonych do 17 różnych gatunków (tab. 4). Prawie dwukrotnie więcej grzybów uzyskiwano z podstawy łodygi siewek, aniżeli z korzeni.

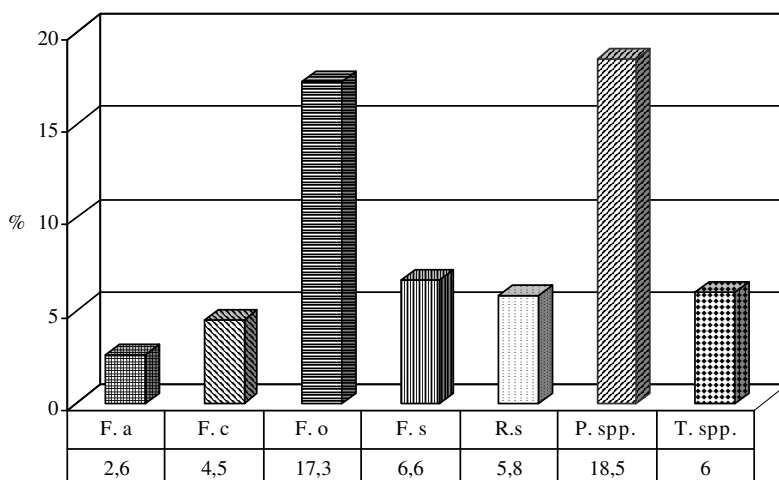
Spośród uzyskanych grzybów najczęściej izolowanym gatunkiem okazał się *Fusarium solani*, którego izolaty stanowiły 17,3% wszystkich wyosobnień (rys. 1). Najmniej tego patogenu izolowano z porażonych korzeni i podstawy łodygi siewek wyrosłych w kombinacji z zastosowanym chitozanem do oprysku siewek, zaś najwięcej izolatów tego grzyba uzyskiwano z roślin z kombinacji kontrolnych (tab. 4). Z porażonych korzeni i podstawy łodygi siewek również licznie izolowano *F. oxysporum* f. sp. *glycines*, izolaty tego patogenu stanowiły bowiem 13,8% wszystkich wyosobnień. Ponadto rodzaj *Fusarium* reprezentowany był przez *F. culmorum* i *F. avenaceum*, których izolaty stanowiły odpowiednio 6,5 i 3,8% wszystkich wyosobnień (rys. 1). Z badanych siewek często izolowano również *Rhizoctonia solani*, bowiem kolonie tego gatunku stanowiły 13,8% izolatów (rys. 1). *Rhizoctonia solani* był izolowany tylko z podstawy łodygi siewek opryskanych chitozanem, a z korzeni i podstawy łodygi z siewek kombinacji kontrolnej (tab. 4). Podczas wykonanej analizy mikologicznej porażonych siewek uzyskano również *Trichoderma viride*, którego izolaty stanowiły 4,8% wszystkich wyosobnień (tab. 4, rys. 1). Grzyb ten izolowano częściej w przypadku kombinacji z użyciem chitozanu do oprysku czterotygodniowych siewek, aniżeli w kontroli (tab. 4).



F. a – *F. avenaceum*, F. c – *F. culmorum*, F. o – *F. oxysporum*, R. s – *R. solani*, P. spp. – *Penicillium* spp., T. spp. – *Trichoderma* spp.

Rys. 1. Udział niektórych grzybów uzyskanych z porażonych siewek soi  
Fig. 1. Percentage of some fungi obtained from infected soybean seedlings

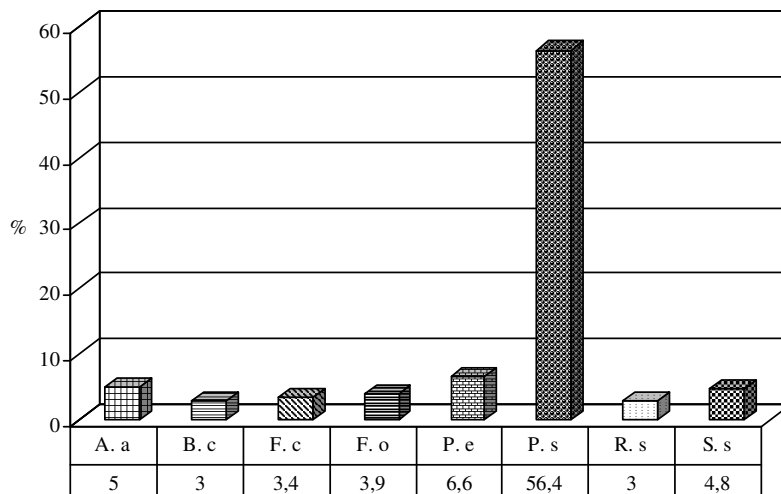
Z korzeni i podstawy łodygi porażonych roślin w fazie kwitnienia uzyskano 1788 izolatów grzybów zaliczanych do 20 różnych gatunków (tab. 5). Najczęściej izolowanym gatunkiem z porażonych roślin w fazie kwitnienia okazał się *F. oxysporum* f. sp. *glycines*, którego izolaty stanowiły 17,3% (tab. 5, rys. 2). Najliczniej grzyb ten izolowano z roślin z kombinacji kontrolnej, a także z kombinacji, w której chitozanu użyto tylko do oprysku siewek (tab. 5). Spośród gatunków patogenicznych często izolowano także *F. culmorum* (4,5%), *F. solani* (6,6%), *Rhizoctonia solani* (5,8% wszystkich wyosobnień) (tab. 5, rys. 2). Gatunki tych grzybów izolowano znacznie rzadziej z badanych organów roślin opryskanych chitozanem w początkowej fazie kwitnienia aniżeli z roślin kontrolnych (tab. 5). Grzyby z rodzajów *Penicillium* i *Trichoderma* uzyskiwano liczniej podczas analizy mikologicznej korzeni i podstawy łodygi roślin opryskiwanych chitozanem w porównaniu do kombinacji kontrolnej, tj. bez chitozanu (tab. 5, rys. 2).



F. a – *Fusarium avenaceum*, F. c – *Fusarium culmorum*, F. o – *Fusarium oxysporum*,  
F. s – *Fusarium solani*, R. s – *Rhizoctonia solani*, P. spp. – *Penicillium* spp.,  
T. spp. – *Trichoderma* spp.

Rys. 2. Udział niektórych grzybów uzyskanych z porażonych roślin w fazie kwitnienia  
Fig. 2. Percentage of some fungi obtained from infected soybean plants at anthesis

W wyniku analizy mikologicznej nasion z plamami i bez plam otrzymano 438 izolatów grzybów należących do 16 różnych gatunków (tab. 6). Ponad połowę izolatów uzyskanych grzybów stanowił *Phomopsis sojae* wyosobniony ze wszystkich kombinacji doświadczenia bez względu na kategorię nasion, tj. z plamami i bez plam (tab. 6). Grzyb *Phoma exigua* var. *exigua* był często izolowanym gatunkiem z nasion z plamami i głównie pochodzącym z kombinacji kontrolnej (tab. 6). Spośród izolowanych grzybów uzyskiwano także *F. oxysporum*, którego izolaty stanowiły 3,9% wszystkich wyosobnień. Gatunek ten izolowano przede wszystkim z kombinacji kontrolnej. Z badanych nasion wyosobniano również *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*



A. a – *Alternaria alternata*, B. c – *Botrytis cinerea*, F. c – *Fusarium culmorum*,  
 F. o – *Fusarium oxysporum*, P. e – *Phoma exigua* var. *exigua*,  
 P. s – *Phomopsis sojae*, R. s – *Rhizoctonia solani*, S. s – *Sclerotinia sclerotiorum*

Rys. 3. Udział grzybów patogennych w porażeniu nasion soi

Fig. 3. Percentage of pathogenic fungi in the infection of soybean seeds

i *Sclerotinia sclerotiorum* przy czym głównie uzyskiwano kolonie tych grzybów z nasion z plamami. Gatunek *F. culmorum* wyosobniano sporadycznie i tylko z nasion zebranych z kombinacji kontrolnej (tab. 6, rys. 3).

## DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wskazały na możliwość wykorzystania chitozanu do ochrony soi przed grzybami chorobotwórczymi. Fakt ten znajduje wyjaśnienie w tym, że omawiany związek bezpośrednio lub pośrednio ogranicza znacznie wzrost i rozwój grzybów [Wojdyła i Orlikowski 1997, Pięta i in. 1998]. W bezpośrednim kontakcie chitozanu ze strzępkami grzybów patogennych następują zmiany w strukturze ścian komórkowych oraz ograniczenie syntezy aminokwasów i tworzenie się białek [Ghaouth i in. 1991]. Po zastosowaniu chitozanu do gleby Stossel i Leuba [1984] zanotowali ograniczenie wzrostu biomasy grzybów w tym środowisku. Według Cheta [1981] i Harmana [1991] w badaniach *in vitro* omawiany związek nie ogranicza wzrostu *Trichoderma* spp., a przeciwnie jest dla tego rodzaju korzystnym substratem i sprzyja wzrostowi produkcji enzymów chitynolitycznych. Stwierdzenie to znalazło potwierdzenie w prezentowanych badaniach, bowiem po zastosowaniu chitozanu wystąpił wzrost liczby kolonii grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Wydaje się, że może to świadczyć o stymulującym wpływie tego związku na wzrost i rozwój *Trichoderma* spp. Ponadto wcześniejsze badania przeprowadzone przez Piętę i in. [2001] wykazały, że chitozan wprowadzony do uprawnego środowiska glebowego istotnie wpłynął na wzrost liczeb-

ności populacji gatunków rodzaju *Trichoderma*. Gatunki tego rodzaju zaliczane są do grzybów o wysokim stopniu antagonistycznego oddziaływania względem grzybów patogenicznych przeżywających w glebie [Papavizas 1985, Pięta 1997].

W pośrednim wpływie chitozanu na ograniczenie rozwoju fitopatogenów odbywa się poprzez zmiany w procesach biochemicznych w komórkach roślin. Omawiany związek jako elicitor odporności indukuje syntezę związków fenolowych w tym i fitoaleksyn jako związków antybakteryjnych i antygrzybowych [Benhamou i Theriault 1992]. Według Benhamou i Theriaulta [1992] w komórkach roślin traktowanych chitozanem tworzą się znaczne ilości enzymów hydrolitycznych.

Wielokierunkowe działanie chitozanu może sprawić, że skutecznie chroni rośliny soi przed chorobami, na co wskazały także wyniki prezentowanych badań.

## PIŚMIENNICTWO

- Barber M. S., Bertman R. E., Ride J. P., 1989. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34, 3–12.
- Benhamou N., Theriault G., 1992. Treatments with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown rot pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41, 33–52.
- Borecki Z., 1984. *Fungicydy stosowane w ochronie roślin*. PWN. Warszawa.
- Elandt R., 1964. *Statystyka matematyczna w zastosowaniu do doświadczalnictwa rolniczego*. Warszawa PWN.
- Harman G., E., 1991. Seed treatments for biological control of plant diseases. *Crop Protection*, 10, 166–171.
- Kohle H., Young D. H., Kauss H., 1984. Physiological changes in suspension-cultured soybeans cells elicited by treatment with chitosan. *Plant Sci. Lett.* 33, 221–223.
- Li Bao Ying, Ma Shu Mei., 1997. Preliminary study on the prevention and control of soybean root disease by using chitosan. *Soybean Sci.* 16 (3), 269–273.
- Orlikowski L. B., Skrzypczak C., 1997. Chitosan in the control of soil-borne pathogens. *Mededelingen-Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent*, 62,3b, 1049–1053.
- Papavizas G. G., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopath.* 23, 23–54.
- Pastucha A., 2001. Oddziaływanie chitozanu na grzyby chorobotwórcze dla soi. *Ann. UMCS sec. EEE*, IX, 56–64.
- Pięta D., 1988. Mikozy występujące w uprawach fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) i podatność różnych odmian na porażenie przez niektóre grzyby. *Wyd. AR Lublin, Rozpr. Nauk.* 111, 1–77.
- Pięta D., 1997. Niektóre aspekty wykorzystania mikroorganizmów antagonistycznych do zwalczania chorób roślin. *Ann. UMCS. sec. EEE*, V, 1–8.
- Pięta D., Pastucha A., Patkowska E., 1998. Wpływ chitozanu na grzyby chorobotwórcze przeżywające w glebie. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie*, 333, 825–828.
- Pięta D., Pastucha A., Struszczyk H., Wójcik W., 2001. Kształtowanie się zbiorowisk mikroorganizmów w glebie, pod wpływem chitozanu i uprawy fasoli wielokwiatowej. *Mat. Sem. nt. „Nowe aspekty w chemii i zastosowaniu chityny i jej pochodnych”*. *Sec. Rolnicza, Dzierżazna k. Łodzi* 27–28 września, R–2, 10–13.
- Pospieszny H., 1997. Niektóre aspekty stosowania chitozanu w ochronie roślin. *Progress Plant Protect.* 37(1), 306–309.

- Pospieszny H., Żołobowska L., Maćkowiak A., Struszczyk H., 1995. Antibacterial activity of chitin derivatives. Polish Phytopatol. Soc. 99–102.
- Perekhoda E. A., Chalenko G. J., Gerasimova N. G., Vasyukova N. J., Ozerestskovskaya O. L., Tatarinova N. J., Anisimova M. V., Varlamov V. P., 1997. Chitosan as a modulator of potato resistance to *Phytophthora*. Dokłady biochemisty 355, 1–6, 63–65.
- Reddy M. V. B., Arul J., Ait-Barka E., Angers P., Richard C., Castaigne F., 1998. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Biocontrol-Science and Techn. 8/1, 33–43.
- Reddy M. V. B., Arul J., Angers P., Couture L., 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. J. Agric. Food Chem. 47, 3, 1208–1216.
- Stossel P., Leuba J. L., 1984. Effect of chitosan, chitin and aminosugars on growth of various soilborne pathogenic fungi. Phytopath. 111, 82–90.
- Wojdyła A. T., Orlikowski L. B., 1997. Chitozan w zwalczaniu grzybów odglebowych i nalistnych. Progress Plant Protect. 37(1), 301–305.
- Young D. H., Kohle H., Kauss H., 1982. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. Plant Physiol. 70, 1449–1454.

## THE PROTECTIVE EFFECT OF CHITOSAN IN LIMITING FUNGI DISEASES OF SOYBEAN

**Abstract.** In the years 1999–2001 studies were conducted on the field belonging to the Experimental Station at Czesławice. The field contained naturally accumulated infection material. The subject of the studies was soybean, Poland cv. and chitosan in the form of micro-crystalline gel containing 2.76 of the pure compound. Water solution of this compound with 0.1% chitosan was used in the experiment. Two combinations were considered using chitosan for spraying the seedlings and the plants at the initial stage of anthesis, and the control without any treatments. In each year, field observations were performed which considered the number and healthiness of seedlings and plants at anthesis. After the harvest, the size and quality of the soybean seeds yield were also determined. In the course of field observations the infected seedlings as well as the infected plants at anthesis were taken for laboratory mycological analysis.

The studies found out differentiated emergencies and healthiness of plants in particular experimental combinations. Chitosan used for spraying the plants at anthesis slightly improved the healthiness of plants and seeds and contributed to an increase of the yielding as compared to the combination where it was used for the spraying of four weeks old seedlings, and also in comparison to the control.

Soybean seedlings were infected by *F. solani* and *R. solani* most frequently. On the other hand, plants at anthesis were mostly infected by *F. oxysporum* f. sp. *glycines*. The following were isolated from the infected soybean seeds: *Phomopsis sojae*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *A. alternata*, *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*.

**Key words:** chitosan, soybean, soil-borne pathogenic fungi

Danuta Pięta, Alina Pastucha, Katedra Fitopatologii, Akademia Rolnicza w Lublinie, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin