

Zakład Odmianoznawstwa Szkółkarstwa i Zasobów Genowych

METODYKA OCENY ZDROWOTNOŚCI NASION FASOLI (*PHASEOLUS VULGARIS*)



Autor: dr Regina Janas

Fot. mgr Aleksandra Wojska, inż. Katarzyna Traczyk

Opracowanie przygotowane w ramach zadania celowego **7.3. Opracowanie ekologicznych metod produkcji nasiennych roślin jednorocznych (fasola, ogórek, brokuł) i dwuletnich (marchew, cebula) o zwiększonym potencjale plonotwórczym oraz przyjaznej środowisku kompleksowej technologii produkcji nasion o wysokiej jakości i zdrowotności**

z obszaru 7. Sadownictwo i Warzywnictwo Metodami Ekologicznymi finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2021

METODYKA OCENY ZDROWOTNOŚCI NASION FASOLI (*PHASEOLUS VULGARIS*)

Ocena fitopatologiczna nasion jest jednym z początkowych etapów prowadzonych analiz ich jakości. Polega na diagnostyce mikroorganizmów patogenicznych zasiedlających materiał siewny, określeniu stopnia porażenia i ilości zakażonych nasion, a finalnie szkodliwości mikroorganizmów. Na podstawie wyników oceny fitopatologicznej nasion (zdrowotności) można podawać zalecenia odnośnie metod poprawy ich zdrowotności. W badaniach realizowanych w 2021 roku stosowano wybrane metody uszlachetniania nasion, ukierunkowane m.in. na uwalnianie nasion od patogenów przenoszonych z materiałem siewnym, bądź uzyskanie efektu inhibicyjnego rozwoju mikopatogenów (tab. 3).

Szkodliwość patogenów zasiedlających nasiona

- Sprawcami większości chorób infekcyjnych występujących w uprawach fasoli są grzyby, w znacznie mniejszym stopniu bakterie i sporadycznie wirusy.
- Nasiona są często źródłem pierwotnej infekcji, gdyż większość grzybów i bakterii zasiedlających materiał siewny przenosi się na rośliny potomne, powodując lub współtworząc rozległe epifitozy na plantacjach roślin przeznaczonych na konsumpcję i na nasiona.
- Patogeny zasiedlające nasiona powodują spadek ich jakości nasion (energii i zdolności kiełkowania, masy tysiąca nasion, wigoru, zdrowotności).
- Ich przeżywalność w nasionach jest często tak długa, jak długa jest żywotność nasion, co prowadzi do degradacji i znacznych strat podczas przechowywania nasion.
- Grzyby patogeniczne produkują szkodliwe, często rakotwórcze metabolity – mykotoksyny.
- Patogeny bytujące na nasionach przyczyniają się do słabszych i nierównomiernych wschodów, spadku wigoru roślin, zdrowotności i plonu

Ocena wartości siewnej nasion pod względem fitosanitarnym

Metody stosowane w rutynowej ocenie zdrowotności nasion muszą spełniać szereg warunków:

- ✓ umożliwiać diagnostykę patogenów z dużą pewnością i łatwością,
- ✓ dawać powtarzalne wyniki dla każdej próby i porównywalne dla różnych prób z wielu kombinacji,
- ✓ wyniki badań powinny dawać informację o potencjalnych wschodach polowych
- ✓ powinny być proste, szybkie i tanie,
- ✓ powinny być łatwe do standaryzacji, z odniesieniem do przepisów międzynarodowych (ISTA).

Ocena zdrowotności nasion musi uwzględniać biologię patogena przenieszonego przez nasiona, obecność innych antagonistycznych bądź synergistycznych względem siebie mikroorganizmów oraz właściwości biologiczne samych nasion. Nie jest więc prosta i wymaga specjalistycznej wiedzy. Podczas inkubacji analizowanych pod kątem zdrowotności nasion rozwijają się różne mikroorganizmy, wzajemnie na siebie oddziałujące i nawet niewielkie różnice w warunkach inkubacji, mogą zmienić wynik analizy. Prawdopodobnie wykonane oznaczenie porażenia nasion wymaga zastosowania odpowiednich warunków inkubacji, zapewniających szybki wzrost grzybnicy i zarodnikowanie oraz ujawnienie charakterystycznych cech grzyba, takich jak: tempo wzrostu, charakter kolonii, sposób tworzenia zarodników, ich wygląd oraz inne cechy, umożliwiające identyfikację patogena.

Najważniejszymi czynnikami wpływającymi na wzrost i zarodnikowanie grzybów, podczas inkubacji nasion, łatwymi do sterowania są temperatura i światło. Ze względu na odmienne wymagania grzybów patogenicznych zasiedlających nasiona, sterowanie temperaturą i światłem (natężeniem i długością fali), pozwala na regulację tempa i charakteru wzrostu grzyba, szybszą i pewniejszą identyfikację, opartą głównie na rodzaju sporulacji.

Dlatego też wybór metody oceny zdrowotności nasion zależy od cech nasion, cech biologicznych patogena oraz od celu badania.

Stan zakażenia komercyjnych i uszlachetnianych nasion fasoli oceniono stosując do określenia ich mikoflory następujące metody inkubacyjne zalecane przez ISTA:

- A – podłoże agarowe, metoda pożywkowa; 400 nasion (po 10 w szalce) wysiewano na pożywkę agarowo – ziemniaczaną PDA z dodatkiem streptomycyny w dawce 10 mg/l pożywki w szklanych szalkach Petriego i inkubowano w termostacie 10 dni bez światła w temperaturze 20-22°C,

- odk. + TB – odkażanie nasion + Testy bibułowe, podłoże z bibuły filtracyjnej, 7 dni inkubacji w temperaturze 20°C w ciemności.

- odk. + MA – odkażanie nasion + podłoże agarowe (pożywka słodowo - agarowa , 8 dni inkubacji w temperaturze 20°C w ciemności lub doświetlanie lampami NUV

Diagnostykę mikopatogenów izolowanych z komercyjnych i uszlachetnionych nasion fasoli prowadzono przy pomocy mikroskopii świetlnej, wysokiej czułości mikroskopu elektronowego firmy Leica oraz dostępnych kluczy do identyfikacji grzybów patogenicznych.

Wyniki jednorocznych badań zestawiono w 6 tabelach. Wskazują one na przydatność zastosowanych metod uszlachetniania nasion fasoli w poprawie zdrowotności. Spektakularne efekty uzyskano po zastosowaniu fizycznych metod przedsięwziętego traktowania nasion fasoli: ozonowaniu oraz traktowaniu nasion falami radiowymi (tab. 4-5). Zabieg ozonowania pozwolił na istotną redukcję porażenia nasion z niemal 41% w obiekcie nie traktowanym (kontroli) do 3,1% po ozonowaniu nasion przez 30 minut. Wysoką skuteczność ochronną odnotowano również po traktowaniu nasion fasoli falami radiowymi, gdzie zredukowano zasiedlenie materiału siewnego mikoflorą do 8,5 %. Po traktowaniu nasion fasoli gorącą wodą (zabieg hydrotermoterapii) zmniejszyła się ilość grzybów saprofitycznych, kontaminujących nasiona, co skutkowało lepszą energią i zdolnością kiełkowania nasion fasoli, wykazaną w sprawozdaniu z zadania.

Obiecujące wyniki w zakresie osłony biologicznej nasion fasoli przed patogenami otrzymano również po wprowadzeniu nowych biokondycjonerów podczas kondycjonowania nasion. W tym aspekcie najlepsze rezultaty uzyskano po biokondycjonowaniu nasion fasoli z użyciem kurkumy (tab. 6). Pozostałe biokondycjonery (spirulina, chlorella oraz preparat Agawit) w większym stopniu wpływały na poprawę jakości i wigoru nasion, w nieco mniejszym wykazywały efekty ochronne.

Tabela 1. Ważniejsze patogeny nasion fasoli przenoszone z materiałem siewnym

Patogen	Nazwa choroby
Grzyby	
<i>Ascochyta phaseolorum</i>	Askochytoza
<i>Botrytis cinerea</i>	Szara pleśń
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Antraknoza fasoli
<i>Colletotrichum phaseolorum</i>	Antraknoza
<i>Colletotrichum dematium</i>	Antraknoza
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fuzaryjne wędnięcie fasoli
<i>Fusarium solani</i>	Fuzaryjna zgorzel fasoli
<i>Phaeoisariopsis griseola</i>	Kanciasta plamistość fasoli
<i>Phomopsis phaseoli</i>	Plamistość fasoli
<i>Phomopsis sojae</i>	Plamistość fasoli
<i>Rhizoctonia solani</i>	Zgorzel siewek , Rizoktonioza
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Zgnilizna twardzikowa
<i>Stemphylium botryosum</i>	Czerwona plamistość nasion
<i>Pleospora tarda</i>	Plamistość liści
<i>Uromyces phaseoli</i>	Rdza fasoli
Bakterie	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Ostra bakterioza fasoli
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Bakterioza obwódkowa fasoli
<i>Corynebacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Bakteryjne wędnięcie fasoli
Wirusy	
<i>Bean common mosaic virus</i> BCMV	Wirus zwykłej mozaiki fasoli

Tabela 2. Mikrobiologiczna ocena zdrowotności komercyjnych nasion fasoli

Patogeny nasion fasoli	Kontrola
<i>Alternaria alternata</i>	32,0
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	4,8
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,5
<i>Fusarium solani</i>	2,8
<i>Botrytis cinerea</i>	4,6
<i>Phomopsis phaseoli</i>	3,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	3,5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4,2
<i>Stemphylium botryosum</i>	3,6
<i>Trichothecium roseum</i>	2,0
<i>Aspergillus</i> spp.	5,0
<i>Penicillium</i> sp.	3,5
Porażenie nasion (%)	40,8

Tabela 3. Metody uszlachetniania nasion fasoli w zakresie ochrony przed patogenami

Metoda uszlachetniania nasion	Parametry kondycjonowania		
	Wilgotność nasion (%)	Czas traktowania	Okres inkubacji
Kontrola	10	0	0
Odkazanie w KMnO ₄ , HuwaSan	10	20 min.	24h/20°C
Traktowanie nasion ozonem (wydajność ozonu: 40 g/h)	10	10, 20, 30 min.	24h/20°C
Traktowanie Pulsującymi Falami Radiowymi	20	60 min.	18h
Hydrotermoterapia (40°C i 50°C)	10	20, 30 min.	16h
Biokondycjonowanie (środki: Agawit 25%, Polyversum 1%, Chlorella, Spirulina, Kurkuma)	40	20 min.	24,48h/20°C



Fot. 1. Nasiona fasoli poddane ozonowaniu k – kontrola (nie traktowana) - test agarowy



Fot. 2. Nasiona fasoli poddane ozonowaniu - test bibułowy (TB)

Tabela 4. Wpływ ozonowania nasion fasoli na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

Patogen	Ozonowanie nasion fasoli			
	Kontrola	10 min.	20 min.	30 min.
<i>Alternaria alternata</i>	32,0	14,0	7,8	3,5
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	4,8	2,0	0,7	0,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,5	1,8	0,0	0,0
<i>Fusarium solani</i>	2,8	0,9	0,0	0,0
<i>Botrytis cinerea</i>	4,6	2,0	0,6	0,0
<i>Phomopsis phaseoli</i>	3,0	1,3	0,0	0,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	3,5	2,0	0,5	0,0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4,2	1,5	0,0	0,0
<i>Stemphylium botryosum</i>	3,6	0,9	0,5	0,3
<i>Trichothecium roseum</i>	2,0	0,0	0,0	0,0
<i>Aspergillus</i> spp.	5,0	1,9	0,8	0,0
<i>Penicillium</i> sp.	3,5	1,3	0,6	0,3
Porażenie nasion (%)	40,8	15,5	9,8	3,1



Fot. 3. Nietraktowane nasiona fasoli (K); nasiona ozonowane (test agarowy)

Tabela 5. Wpływ traktowania nasion fasoli falami radiowymi (PRF) na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

Patogen	Fale radiowe (PFR) -traktowanie nasion fasoli		
	Kontrola	F1/10/4/20/60	F2/50/4/20/60
<i>Alternaria alternata</i>	32,0	17,0	9,1
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	4,8	2,5	0,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,5	1,0	0,0
<i>Fusarium solani</i>	2,8	0,0	0,0
<i>Botrytis cinerea</i>	4,6	2,1	0,5
<i>Phomopsis phaseoli</i>	3,0	0,9	0,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	3,5	0,8	0,0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4,2	1,5	0,0
<i>Stemphylium botryosum</i>	3,6	2,0	0,8
<i>Trichothecium roseum</i>	2,0	0,5	0,0
<i>Aspergillus</i> spp.	5,0	1,8	0,5
<i>Penicillium</i> sp.	3,5	1,0	0,0
Porażenie nasion (%)	40,8	16,8	8,5

Tabela 6. Wpływ biokondycjonowania nasion fasoli na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

Patogen	Biokondycjonowanie nasion fasoli					
	Kontrola	Spirulina	Chlorella	Kurkuma	Agawit	Polyversum
<i>Alternaria alternata</i>	32,0	23,0	21,5	7,0	29,0	12,5
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	4,8	3,1	3,5	0,5	4,0	1,2
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,5	2,8	3,0	0,5	3,8	1,0
<i>Fusarium solani</i>	2,8	2,0	2,0	0,0	2,5	0,0
<i>Botrytis cinerea</i>	4,6	3,0	3,5	0,5	4,2	1,5
<i>Phomopsis phaseoli</i>	3,0	2,5	2,5	0,0	3,0	0,6
<i>Rhizoctonia solani</i>	3,5	1,5	2,0	0,0	3,2	0,8
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4,2	3,0	2,5	0,0	3,6	1,3
<i>Stemphylium botryosum</i>	3,6	2,8	3,0	0,6	3,2	0,5
<i>Trichothecium roseum</i>	2,0	1,4	1,5	0,0	1,8	0,0
<i>Aspergillus</i> spp.	5,0	3,1	2,8	0,8	4,0	1,6
<i>Penicillium</i> sp.	3,5	2,0	2,0	0,0	3,2	1,0
Porażenie nasion (%)	40,8	24,0	22,6	6,5	34,0	10,5