

Zakład Odmianoznawstwa Szkółkarstwa i Zasobów Genowych

METODYKA OCENY ZDROWOTNOŚCI NASION PIETRUSZKI (*PETROSELINUM CRISPUM*)



Autor: dr Regina Janas

Opracowanie przygotowane w ramach zadania celowego 7.3.

Opracowanie ekologicznych metod produkcji nasiennych roślin jednorocznych i dwuletnich 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 2023

Zdrowotność nasion należy do zespołu cech składających się na jakość nasion. Ocena zasiedlenia nasion mikroflorą patogeniczną powinna być przeprowadzona w pierwszym etapie analiz jakości nasion. Polega na diagnostyce mikroorganizmów patogenicznych i saprofitycznych zasiedlających materiał siewny, określeniu stopnia porażenia i ilości zakażonych nasion, a finalnie szkodliwości mikroorganizmów. Wyniki oceny fitopatologicznej nasion są podstawą do zaleceń dotyczących zaprawiania, jak również wyboru metod uszlachetniania nasion, celem poprawy zdrowotności. W badaniach realizowanych w 2023 roku przedmiotem analiz mikrobiologicznych były nasiona pietruszki. Powierzchnia uprawy pietruszki zmniejsza się sukcesywnie, przede wszystkim ze względu na zawodność uprawy i jest zastępowana uprawą pasternaku. Jednym z najważniejszych powodów takiego stanu jest wysokie porażenie materiału siewnego trudnymi do zwalczania patogenami, przenoszonymi z nasionami, powodującymi choroby infekcyjne roślin. W badaniach realizowanych w 2023 roku stosowano wybrane metody uszlachetniania nasion, ukierunkowane m.in. na poprawę zdrowotności nasion i eliminację najgroźniejszych grzybów chorobotwórczych, przenoszonych z materiałem siewnym (tab. 1).

Szkodliwość patogenów zasiedlających nasiona

Patogeny nasion stanowią bardzo zróżnicowaną grupę pod względem właściwości biologicznych. W związku z tym obserwuje się nie tylko różny stopień szkodliwości wyrządzanych przez nie chorób, ale i różnorodność sposobów infekcji.

- Sprawcami większości chorób infekcyjnych (nawet 85-90%) występujących w uprawach pietruszki są grzyby, w znacznie mniejszym stopniu bakterie i sporadycznie wirusy.
- Materiał siewny (nasiona) jest źródłem pierwotnej infekcji, gdyż większość grzybów i bakterii zasiedlających nasiona przenosi się na rośliny potomne, powodując lub współtworząc choroby roślin przeznaczonych na konsumpcję i na nasiona.
- Patogeny zasiedlające nasiona powodują spadek ich jakości nasion (energii i zdolności kiełkowania, masy tysiąca nasion, wigoru, zdrowotności).
- Przeżywalność wielu patogenów zasiedlających nasiona jest często tak długa, jak długa jest żywotność nasion (nawet powyżej 10 lat), co prowadzi do degradacji materiału siewnego i znacznych strat podczas przechowywania nasion.
- Grzyby patogeniczne zasiedlające nasiona 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 przenoszonego 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 grzybnii 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. Wielkość próby nasion pobranej do badania zależy również od tych czynników.

Najczęściej wyróżnia się następujące metody badania zdrowotności nasion:

Metody inkubacyjne

1. Metody bezpośrednie – B
2. Testy bibułowe – TB
3. Metody agarowe – A (pożywkowe)

Testy wzrostowe – TW

4. Testy glebowe – TG
torfowe, piaskowe – TT, TP
kompostowe – TK
gruz ceglany – GC

Metody serologiczne – S i inne dla wirusów i bakterii

- immunofluorescencyjne - IF
- test płytkowy – LP
- ELLISA test

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

1. Metody bezpośrednie – B - badanie nasion suchych, moczonych, płukanych, badanie popłuczyn, badanie pod lupą UV, badania makro- i mikroskopowe;

2. Testy bibułowe – TB – podłoże z bibuły filtracyjnej, wysiew nasion na zwilżonej bibule w szklanych szalkach Petriego, nasiona nie przykryte warstwą bibuły, 14 dni inkubacji w temperaturze 20 ° C z doświetlaniem lampami NUV. Test bibułowy jest bardzo czuły i pozwala na wykrycie wielu gatunków grzybów zasiedlających nasiona. Jego zaletą jest prostota oraz relatywnie niskie koszty niezbędnego wyposażenia i materiałów. Identyfikacja występujących grzybów jest jednak bardzo pracochłonna i czasochłonna. Test bibułowy ma powszechne zastosowanie w ocenie zdrowotności nasion warzyw, ale także zbóż, roślin ozdobnych, drzew leśnych i innych.

3. Metody agarowe – A – podłoże agarowe, wykładanie nasion na pożywki agarowe (400 nasion po 10 w szalce) - pożywkę glukozowo – ziemniaczaną PDA z dodatkiem streptomycyny (eliminującej bakterie) w dawce 10 mg/l pożywki w szklanych szalkach Petriego, inkubacja w termostacie 14 dni bez światła w temperaturze 20-22 ° C.

Do mierzenia wzrostu kolonii grzybów stosowano pomiar liniowy średnicy kolonii, a szybkość wzrostu wyrażano dziennym przyrostem kolonii poszczególnych mikopatogenów. Obserwowano cechy morfologiczne kolonii oraz zarodnikowanie poszczególnych grzybów (sporulację). Przy identyfikacji brano pod uwagę: sposób formowania, rozgałęzienia i długość konidioforu, kształt, wielkość, barwę, charakter powierzchni zarodników konidialnych oraz sposób ich rozmieszczenia tj. pojedynczo, w łańcuszkach, główkach lub grupach, czy zarodniki występują w skupieniach, takich, jak owocniki, acerwulusy, piknidia, pionnoty.

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

Wyniki jednorocznych badań zestawiono w 7 tabelach. Stwierdzono, że ekologiczne nasiona komercyjne pietruszki były niemal w 100% porażone przez asocjację grzybów należących do 11 rodzajów (tab. 2). Najpowszechniej kontaminowały materiał siewny pietruszki grzyby z rodzaju *Alternaria*, zasiedlając niemal 100% nasion. Gatunki należące do rodzaju *Alternaria* wykazywały zróżnicowaną patogeniczność w stosunku do siewek pietruszki. Najśłabszą patogenicznością wykazywały się w badaniach in vitro gatunki *Alternaria alternata*, średnią *Alternaria dauci* odpowiedzialny za alternariozę naci pietruszki. Przy dużym nasileniu inokulum i łącznym występowaniu obydwu gatunków, powodowały one zgnilizny. Najsilniejszą patogenicznością wykazywały się natomiast *Alternaria radicina* i *A. petroselini* – sprawcy czarnej zgnilizny korzeni i septoriozy. Znaczącą grupę patogenów nasion pietruszki stanowiły liczne gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium* – sprawcy fuzaryjnego wędnięcia roślin. Większość zdiagnozowanych gatunków grzybów zasiedlających nasiona pietruszki należy do tzw. grzybów polowych, które bytują w fyllosferze a ich największe nasilenie i zagrożenie występuję w okresie zbioru nasion. Z gatunków grzybów tzw. przechowalniczych wskazujących na niewłaściwe składowanie nasion, izolowano powszechnie gatunki należące do rodzaju *Aspergillus*, które w dużym nasileniu mogą degradować materiał siewny. Niemal wszystkie wyizolowane z materiału siewnego grzyby przenoszą się z nasionami, powodując trudne do zwalczania choroby roślin.

Opracowano metody i parametry uszlachetniania nasion pietruszki, zestawione w tabeli 3 i 4.

Przeprowadzone badania w zakresie uszlachetniania nasion pietruszki wskazują na wysoką skuteczność ochronną zastosowanych metod w aspekcie redukcji porażenia mikopatogenami, co skutkowało istotną poprawą zdrowotności nasion. Spektakularne efekty uzyskano po zastosowaniu fizycznych metod przedsięwziętego traktowania nasion pietruszki : ozonowania oraz traktowania nasion falami radiowymi (tab. 6-7). Zabieg ozonowania pozwolił na istotną redukcję porażenia nasion z 99,5% w obiekcie nie traktowanym (kontroli) do niespełna 10% po 30 minutowym ozonowaniu nasion. Porównywalne wyniki i istotną poprawę zdrowotności nasion otrzymano po traktowaniu nasion pietruszki pulsującymi falami radiowymi (PFR) (tab.7).

Zabieg hydrotermoterapii polegającej na traktowaniu nasion pietruszki gorącą wodą (40°C), eliminował grzyby saprofityczne, kontaminujące nasiona (zasiedlające okrywę nasienną i porażające je zewnętrznie), co skutkowało zwiększeniem energii i zdolności kiełkowania nasion, w porównaniu z kontrolą. Wysoką efektywnością w uszlachetnianiu

nasion pietruszki odznaczały się również metody biologiczne. Stosując kondycjonowanie nasion pietruszki łącznie z biologicznym zaprawianiem uzyskano kompleksowy efekt w zakresie przyspieszenia kiełkowania nasion pietruszki o około 7 dni oraz istotną redukcję patogenów zasiedlających materiał siewny. Metoda nazywa się biokondycjonowaniem i w zależności od użytych biokondycjonerów (środków biologicznych o działaniu fungistatycznym) uzyskano pożądane efekty ochronne, mierzone ograniczeniem wzrostu i rozwoju grzybów patogenicznych, bytujących w spermoplane nasion. W tym zakresie wyróżniały się: preparat biotechniczny na bazie drożdży BioSach, preparat krzemowy Optysil oraz preparat mikrobiologiczny Polyversum zawierający oospory grzyba antagonistycznego *Pythium oligandrum* (tab. 5-6) Zadawalającą skuteczność ochronną uzyskano także po użyciu jako biokondycjonerów podczas kondycjonowania nasion naturalnych środków – pieprzu cayenne i kurkumy (tab. 5).

Tabela 1. Ważniejsze patogeny nasion pietruszki przenoszone z materiałem siewnym i powodowane choroby

Patogen	Nazwa choroby
Grzyby	
<i>Alternaria dauci</i>	Alternarioza naci
<i>Alternaria radicina</i>	Czarna zgnilizna korzeni
<i>Stemphylium radicinum</i>	Zgorzel siewek
<i>Erysiphe heraclei</i>	Mączniak prawdziwy baldaszkowatych
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Zgnilizna twardzikowa
<i>Rhizoctonia solani</i>	Rizoktonioza
<i>Septoria petroselini</i>	Septorioza pietruszki
<i>Fusarium spp.</i>	Fuzaryjne więdnienie roślin

Tabela 2. Mikrobiologiczna ocena zdrowotności komercyjnych nasion pietruszki (przed zabiegami uszlachetniania)

Patogeny nasion pietruszki	Kontrola
<i>Alternaria alternata</i>	84,0
<i>Alternaria radicina</i>	4,0
<i>Alternaria petroselini</i>	2,8
<i>Fusarium avenaceum</i>	2,0
<i>Fusarium culmorum</i>	1,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,2
<i>Septoria petroselini</i>	1,9
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,8
<i>Botrytis cinerea</i>	1,5
<i>Phoma spp.</i>	2,5

<i>Stemphylium botryosum</i>	3,0
<i>Ulocladium consortiale</i>	3,0
<i>Drechslera biseptata</i>	2,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,5
<i>Aspergillus</i> spp.	4,0
Porażenie nasion (%)	99,5%

Tabela 3. **Metody uszlachetniania** nasion pietruszki w aspekcie ochrony przed patogenami

Metoda uszlachetniania nasion	Parametry kondycjonowania		
	Wilgotność nasion (%)	Czas traktowania	Okres inkubacji
Kontrola	10	0	0
Traktowanie nasion ozonem (wydajność ozonu: 40 g/h)	10	10, 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 proekologiczne: Polyversum 1%, Chlorella 20%, Kurkuma 1%, Pieprz Cayenne 1% Huminpol (50%) Polyversum 1% Optysil 50% BioSach C 0,2% Humat potasu 20%	40	20 min.	24,48h/20°C

Tabela 4. **Traktowanie nasion pietruszki pulsującymi falami radiowymi (PFR)**

Wilgotność nasion/dni inkubacji	Parametry traktowania nasion pulsującymi falami radiowymi				
	Parametry traktowania	Napięcie prądu (V)	Częstotliwość impulsów (Hz)	Okres trwania impulsu (MS)	Czas traktowania (min.)
20% / 16h	F1	10	4	20	60
	F2	50	4	20	60
	F3	25	4	20	30

Tabela 5 – 6. Wpływ **biokondycjonowania** nasion pietruszki na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

Patogen	Biokondycjonowanie nasion pietruszki			
	Kontrola	Polyversum	Kurkuma	Pieprz cayenne
<i>Alternaria alternata</i>	84,0	25,5	34,2	30,0
<i>Alternaria radicina</i>	4,0	2,6	3,5	3,0
<i>Alternaria petroselini</i>	2,8	2,0	2,5	2,0

<i>Fusarium avenaceum</i>	2,0	0,5	1,0	0,8
<i>Fusarium culmorum</i>	1,4	0,5	0,9	0,6
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,2	0,6	1,1	0,8
<i>Septoria petroselini</i>	1,9	0,8	1,0	1,0
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,8	0,0	0,5	0,5
<i>Botrytis cinerea</i>	1,5	1,0	0,5	0,5
<i>Phoma</i> spp.	2,5	1,0	1,5	1,0
<i>Stemphylium botryosum</i>	3,0	0,8	1,2	1,0
<i>Ulocladium consortiale</i>	3,0	2,0	1,5	1,0
<i>Drechslera biseptata</i>	2,0	0,8	1,0	1,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,5	0,5	1,2	0,8
<i>Aspergillus</i> spp.	4,0	1,5	2,0	1,5
Porażenie nasion (%)	99,5%	26,0	37,0	33,0

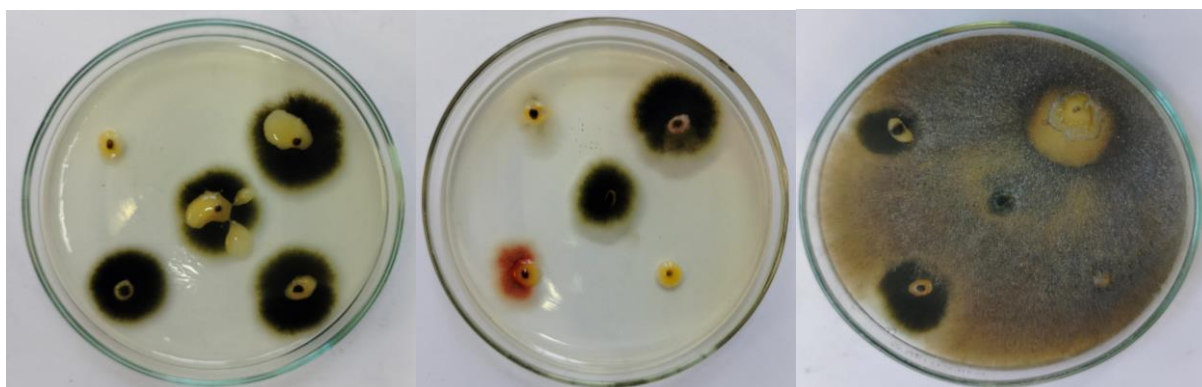
Patogen	Biokondycjonowanie nasion pietruszki			
	Kontrola	Optysil	BioSach	Humat potasu
<i>Alternaria alternata</i>	84,0	23,0	21,5	27,0
<i>Alternaria radicina</i>	4,0	2,0	3,0	2,5
<i>Alternaria petroselini</i>	2,8	1,5	2,0	2,0
<i>Fusarium avenaceum</i>	2,0	0,5	1,1	0,8
<i>Fusarium culmorum</i>	1,4	0,0	0,5	0,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,2	0,5	0,9	0,7
<i>Septoria petroselini</i>	1,9	0,8	0,5	0,8
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,8	0,0	0,3	0,0
<i>Botrytis cinerea</i>	1,5	0,5	0,8	0,8
<i>Phoma</i> spp.	2,5	0,0	1,2	0,6
<i>Stemphylium botryosum</i>	3,0	1,0	1,5	1,0
<i>Ulocladium consortiale</i>	3,0	0,6	1,0	0,5
<i>Drechslera biseptata</i>	2,0	0,0	0,6	0,5
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,5	0,5	1,2	0,8
<i>Aspergillus</i> spp.	4,0	1,5	2,0	2,0
Porażenie nasion (%)	99,5	24,0	22,6	29,2

Tabela 7. Wpływ uszlachetniania nasion pietruszki wybranymi metodami fizycznymi na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

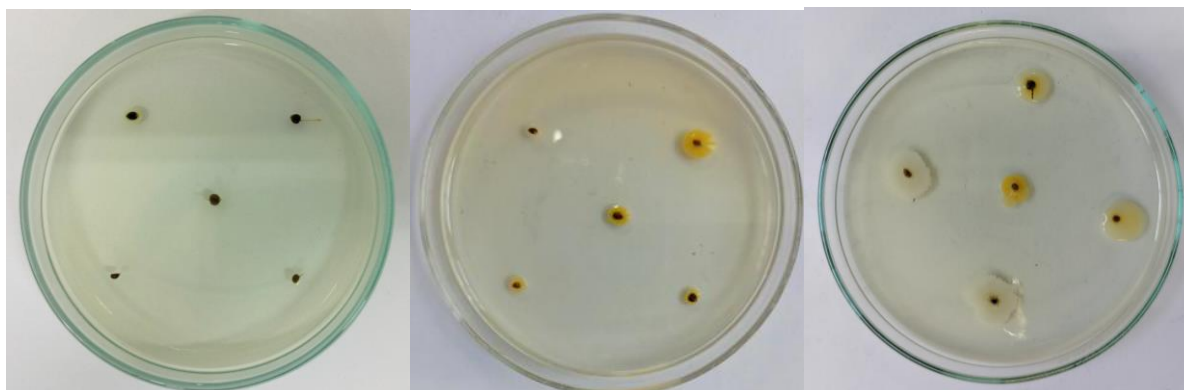
Patogen	Uszlachetnianie nasion pietruszki			
	Kontrola	Ozonowanie	PFR	Hydrotermoterapia
<i>Alternaria alternata</i>	84,0	9,1	11,0	28,5
<i>Alternaria radicina</i>	4,0	0,0	0,6	2,2
<i>Alternaria petroselini</i>	2,8	0,0	0,0	1,6
<i>Fusarium avenaceum</i>	2,0	0,0	0,0	1,0
<i>Fusarium culmorum</i>	1,4	0,0	0,3	0,9
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,2	0,2	0,5	1,0

<i>Septoria petroselini</i>	1,9	0,4	0,5	0,9
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,8	0,0	0,0	0,5
<i>Botrytis cinerea</i>	1,5	0,0	0,0	1,0
<i>Phoma</i> spp.	2,5	0,0	0,0	1,2
<i>Stemphylium botryosum</i>	3,0	0,5	0,5	1,3
<i>Ulocladium consortiale</i>	3,0	0,0	0,6	1,0
<i>Drechslera biseptata</i>	2,0	0,0	0,5	0,8
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,5	0,2	0,6	1,5
<i>Aspergillus</i> spp.	4,0	0,0	1,0	2,5
Porażenie nasion (%)	99,5%	9,8	12,5	30,5

Zdrowotność nasion po zastosowaniu metod uszlachetniania



Kontrola – nasiona pietruszki nieuszlachetnione



Nasiona ozonowane

Pulsujące fale radiowe

Biokondycjonowanie - BioSach