

## PORAŻENIE NASION ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO ZNAJDUJĄCYCH SIĘ W OBROTCIE KOMERCYJNYM PRZEZ GRZYBY CHOROBOTWÓRCZE I SAPROTROFICZNE

MALGORZATA JĘDRYCZKA, JOANNA KACZMAREK

*Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu*

mjed@igr.poznan.pl

**Synopsis.** Badania dotyczyły oceny czystości mikrobiologicznej nasion łubinu wąskolistnego odmiany Sonet, przed ich wprowadzeniem do obrotu komercyjnego. Badano niezaprawiane nasiona w stopniu kwalifikacji C/2, pobrane przez oficjalnego próbobiorecę z trzech pól produkcyjnych na terenie Pomorza Zachodniego w 2011 roku. Szczególną uwagę poświęcono ocenie porażenia nasion przez grzyb *Colletotrichum lupini*, wywołujący antraknozę. Z powodu brak metodyk ISTA (International Seed Testing Association), opracowano kilka własnych komplementarnych metod testowych. Pierwsza z nich polegała na wykładaniu nasion na zmodyfikowaną pożywkę PDA, ponadto nasiona wkładano do skrętów z bibuły filtracyjnej, na szalki Petriego zawierające bibułę filtracyjną, a także do donic z substratem torfowym. Testowane nasiona pobierano losowo, po 400 sztuk z każdego wariantu, po czym badano nasiona nieodkazywane oraz odkazywane powierzchniowo. Porażenie nasion łubinu wąskolistnego grzybami należącymi do rodzaju *Colletotrichum* było niewielkie i wahało się od 2% w przypadku nasion nieodkazywanych do 5% po zastosowaniu odkazywania. W teście bibułowym stwierdzono 0,5% nasion z objawami antraknozy. Nasiona łubinu były w silnym stopniu porażone przez grzyby rodzaju *Penicillium* oraz *Alternaria*. W grupie nasion nieodkazywanych stwierdzono 46,8% nasion porażonych przez *Penicillium* sp., a po zastosowaniu odkazywania nadal wystąpiło aż 35,4% takich nasion. Oznacza iż patogen w 11,3% przypadków występował wyłącznie na okrywie nasiennej, lecz na około 30% badanych nasion znajdował się pod okrywą nasienną. W przypadku porażenia nasion przez grzyby rodzaju *Alternaria* sytuacja była zbliżona. Na nasionach występowały także inne grzyby, w tym gatunki chorobotwórcze takie jak *Fusarium* sp., *Stemphylium* sp., *Botrytis* sp., ale także gatunki saprotroficzne takie jak *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., a także – choć rzadko, grzyby nadpasożytnicze rodzaju *Trichoderma*.

**Słowa kluczowe** – *key words*: łubin wąskolistny – *narrow-leafed lupin*, antraknoza – *anthracnose*, patologia nasion – *seed pathology*, grzyb chorobotwórczy – *pathogenic fungus*, organizm saprotroficzny – *saprotrofy organism*

### WSTĘP

W związku z realizacją programów rolnośrodowiskowych oraz rozwoju integrowanego i ekologicznego systemu uprawy roślin areal uprawy łubinów w Polsce. Ważną zaletą uprawy tej rośliny jest wzbogacanie gleby w substancje organiczne i azot [Jasińska i Kotecki 2003]. Rośliny łubinu wytwarzają od trzech do pięciu razy większą powierzchnię liściową aniżeli zboża. Ich obecność przyczynia się do zacieniania gleby, a co za tym idzie – do intensyfikacji życia biologicznego w podłożu [Prusiński 2007]. Prowadzi to do zachowania lub podwyższenia żywności gleby. Z tego względu łubin uznano za jedną z wiodących „roślin ekologicznych” w Polsce. Zdolność do wiązania azotu atmosferycznego ogranicza zanieczyszczenie środowiska szkodliwymi nawozami azotowymi. Uprawa łubinu znacząco przyczynia się do wzrostu kultury gleby

i jest bardzo korzystna dla roślin następczych. Poza wzbogaceniem gleby w substancje odżywcze poprawa stanowiska jest też wynikiem spulchnienia gleby, spowodowanej głębokim korzeniem się roślin. Czerpanie wody z głębszych warstw gleby jest możliwe dzięki długim i silnym korzeniom palowym. Uprawa łubinu jest szczególnie polecana gospodarstwom z dużym udziałem zbóż, a dobór gatunku łubinu zależy od żyzności gleby i warunków klimatycznych w danym rejonie. Wykazano, że uproszczenia w uprawie roli, w tym system uprawy bezplużnej, mogą być z powodzeniem stosowane w uprawie łubinu wąskolistnego i żółtego i nie przyczyniają się do wzrostu zachwaszczenia [Faligowska i Szukała 2008].

Po okresie gwałtownego spadku uprawy i produkcji nasion łubinu obserwowanej w połowie lat 80-tych, uprawa łubinu ponownie zyskuje na znaczeniu, zarówno na świecie jak też w Polsce. Z danych GUS wynika, że w roku 2011 łubin słodki na ziarno wysiany był na powierzchni 52,5 tys. ha a jego średni plon wynosił  $1,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ , z kolei areał uprawy łubinu gorzkiego na ziarno wynosił ponad 6 tys. ha (plon:  $1,35 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), a łubinu na zielonkę – niecałe 4 tys. ha. W 2011 roku produkcja łubinu w naszym kraju wynosiła 26 tys. ton [GUS 2012]. Plon łubinu wąskolistnego w istotny sposób skorelowany jest z gęstością siewu [Corbett i in. 2001]. Jedną z głównych przyczyn drastycznego zmniejszenia opłacalności uprawy łubinu były niskie plony nasion, spowodowane – między innymi – silnym porażeniem roślin przez choroby, w tym zwłaszcza antraknozę. Choroba ta stanowi najpoważniejsze zagrożenie w uprawie łubinu wąskolistnego. Znaczne nasilenie objawów chorobowych obserwowano kilka lat temu zarówno w Polsce jak i na świecie [Frencel i in. 1997, Sweetingham 1997, Yang i in. 2004]. Choroba powodowana jest przez grzyb *Colletotrichum lupini* (Bondar) Nirenberg, Feiler & Hagendorn i jest przenoszona przez nasiona [Decker 1947]. Pomimo tego, do tej pory nie opracowano standardowych metodyk ISTA (International Seed Testing Association), do oceny porażenia nasion łubinu wąskolistnego, bądź innych gatunków łubinu. Co więcej, w literaturze niewiele doniesień poświęcono chorobom łubinu przenoszonym przez nasiona [Filipowicz 1989, Lewartowska i in. 1994] lub pojawiających się na siewkach łubinu [Sweetingham 1989].

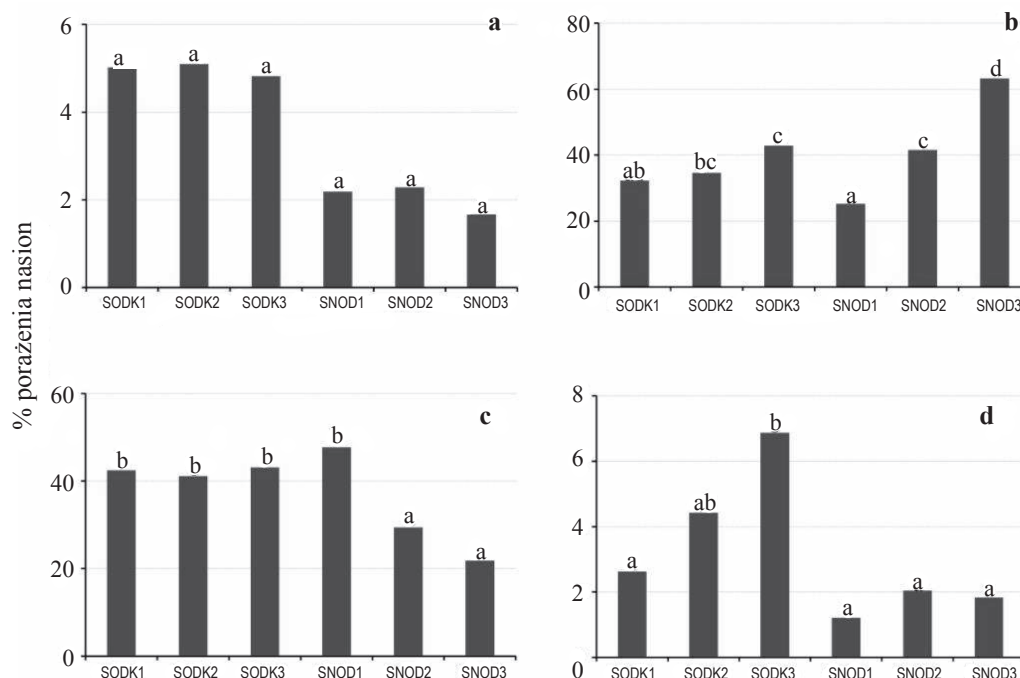
Celem badań było opracowanie laboratoryjnych testów oceny, pozwalających na szybką detekcję nasion porażonych grzybem *Colletotrichum lupini*, a także identyfikacja innych gatunków grzybów z prób przeznaczonych do obrotu komercyjnego w Polsce.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły nasiona łubinu wąskolistnego odmiany Sonet, z trzech plantacji wielkotowarowych z roślinami, na których występowało od 8 do 12% roślin z objawami antraknozy. Próby nasion łubinu pobrano z pól należących do PH Agromor Spółka jawna w ławnie ( $54^{\circ} 21' \text{ N}$ ,  $16^{\circ} 40' \text{ E}$ ) na terenie województwa zachodniopomorskiego w 2011 roku. Testowano niezaprawiane nasiona (próby: 70, 80 i 120 ton), w stopniu kwalifikacji C/2, pobrane przez oficjalnego próbobiorecę. Każda z ocenianych partii nasion liczyła 400 sztuk nasiona pobierano losowo.

Zastosowano następujące warianty: nasiona nieodkażane powierzchniowo oraz odkażane w 3% roztworze płynu Javel, zawierającego podchloryn sodu ( $\text{NaOCl}$ ), a następnie płukane i osuszane na sterylnej bibule filtracyjnej. Poszczególne próby nasion oznaczono symbolami; w przypadku odkażanych powierzchniowo nasion odmiany Sonet były to symbole od SODK1 do SODK3, natomiast próby nasion nieodkażanych powierzchniowo oznaczono jako SNOD1-SNOD3.

Sprawdzono efektywność metod polegających na wykładaniu nieodkażonych powierzchniowo i odkażonych nasion na następujące podłoża:



SODK1-3 odkażane nasiona odmiany Sonet z prób 1–3; SNOD1-3 – nieodkażane nasiona odmiany Sonet z prób 1–3. Różnymi literami oznaczono statystycznie istotne zróżnicowanie średnich wartości poszczególnych parametrów przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$

*SODK1-3 surface disinfected seeds of cv. Sonet of samples 1–3; SNOD1-3 – not disinfected seeds of cv. Sonet, samples 1–3. Different letters mean statistical differences between mean values of tested parameters at significance level  $\alpha = 0.05$ .*

Rys. 1. Procent porażenia powierzchniowo odkażanych i nieodkażanych nasion trzech wielotonowych partii nasion łubinu wąskolistnego odmiany Sonet przed wprowadzeniem do obrotu komercyjnego, przez grzyby chorobotwórcze i saprotroficzne: a) *Colletotrichum lupini*, b) *Penicillium sp.*, c) *Alternaria sp.*, d) *Cladosporium sp.*

*Fig. 1. The percent of infection of surface disinfected and not disinfected seeds of three samples of narrow-leaved lupin cv. Sonet, before entry to commercial market, by pathogenic and saprotrophic fungi of the following genera: a) Colletotrichum lupini, b) Penicillium sp., c) Alternaria sp., d) Cladosporium sp.*

- 1) pożywka PDA zawierająca siarczan streptomocyny oraz 0,2% roztwór 2,4D (kwas 2,4-dichlorofenoxyoctowy)
- 2) skręty z bibuły filtracyjnej
- 3) szalki Petriego z bibułą filtracyjną
- 4) donice z torfem.

Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Dla uzyskanych danych obliczono średnie i procentowe wartości porażenia nasion. Wnioskowanie dotyczące istotności różnic pomiędzy obiektami badawczymi prowadzono na podstawie analizy wariancji. W przypadku, gdy analiza wariancji nie wykazała istotności różnic między rozpatrywanymi grupami, nie prze-

prowadzano już dalszych testów. Natomiast, gdy hipoteza zerowa została odrzucona w analizie wariancji, badanie różnic między średnimi z poszczególnych grup przeprowadzono testem Tukeya. Wszystkie wykazane różnice przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ . Obliczenia przeprowadzono z użyciem pakietu statystycznego GenStat Release 12.1 [Payne i in. 2007].

## WYNIKI I DISKUSJA

W badanych próbach nasion łubinu wąskolistnego odmiany Sonet, zebranych z plantacji wielkotowarowych, porażenie nasion łubinu wąskolistnego grzybami należącymi do rodzaju *Colletotrichum* było niewielkie i wahało się od 2% w przypadku nasion nie odkażanych w NaOCl do 5% po zastosowaniu odkażania. W teście bibułowym stwierdzono 0,5% nasion z objawami antraknozy. W teście szklarniowym obserwowano rośliny o słabszej kondycji, jednakże nie wystąpiły na nich typowe objawy antraknozy, pomimo wykonania testu w warunkach sprzyjających rozwojowi tej choroby. Taki wynik doświadczenia wskazuje, że w sytuacji uprawy polowej, nasiona z roślin z objawami antraknozy w znacznej mierze nie przedostają się do partii nasion przeznaczonych do obrotu komercyjnego. Jest to najprawdopodobniej spowodowane wytwarzaniem zdecydowanie mniejszej liczby nasion przez rośliny porażone grzybem *C. lupini*, a ponadto – z powodu mniejszej masy porażonych nasion ich znaczna część zostaje oddzielona w procesie czyszczenia. Negatywny wpływ choroby na wielkość i masę nasion nie tylko prowadzi do zmniejszenia plonu nasion, lecz także jest nieoczekiwanym sprzymierzeńcem w uprawie łubinu na skalę produkcyjną. Ze względu na przenoszenie choroby przez nasiona główny nacisk w uprawie łubinu powinien być związany ze stosowaniem zdrowego i właściwie zaprawionego materiału nasiennego. Straty plonu można także w znacznym stopniu ograniczyć poprzez traktowanie roślin fungicydami, zwłaszcza takimi jak azoksystrobina, chlorotalonil i mankozeb [Thomas i in. 2008]. Niewątpliwie jednak głównym sposobem zabezpieczenia przed tą groźną chorobą jest uprawa odmian charakteryzujących się tolerancją [Wiatr i in. 2003] bądź odpornością na porażenie grzybem *C. lupini* [Ruge-Wehling i in. 2009]. Ze względu na stosunkowo powolny wzrost grzyba testowanie nasion po zastosowaniu odkażania powierzchniowego sprzyja ujawnieniu infekcji nasion grzybem *C. lupini*. W przeciwnym przypadku te trudne do zainicjowania i wolno rosnące kultury są zdominowane przez szybko rosnące izolaty grzybów z rodzaju *Mucor*, *Penicillium* czy *Fusarium*.

Także dla nasion badanych w niniejszym doświadczeniu obserwowano silne porażenie grzybami rodzaju *Penicillium* oraz *Alternaria*. Dla wariantu bez odkażania stwierdzono 46,8% nasion porażonych przez *Penicillium* sp., a po zastosowaniu odkażania nadal wystąpiło aż 35,4% takich nasion, co oznacza iż grzyb ten w 11,3% przypadków występował wyłącznie na okrywie nasiennej, lecz na około 1/3 badanych nasion znajdował się pod okrywą nasienną. W przypadku porażenia nasion przez grzyby rodzaju *Alternaria* sytuacja była podobna. Na nasionach występowały także inne grzyby, w tym gatunki chorobotwórcze takie jak *Fusarium* sp., *Stemphylium* sp., *Botrytis* sp., ale także gatunki saprotroficzne takie jak *Mucor* sp., *Cladosporium* sp. Lewartowska i in. [1994] obserwowali zbliżony zestaw rodzajów grzybów porażających lub zasiedlających nasiona dwóch odmian łubinu wąskolistnego.

W niewielkim nasileniu na nasionach łubinu występowały także nadpasożytnicze grzyby należące do rodzaju *Trichoderma*. Procentowy udział tych gatunków w przypadku nasion nieodkażonych wynosił: 1,7% dla *Mucor* sp., 1,9% dla *Cladosporium* sp., 0,6% dla *Stemphylium* sp. oraz 1,4% dla *Trichoderma*. Dla nasion odkażonych w podchlorynie sodu procentowe udziały porażonych nasion były następujące: 1,0% nasion zasiedlonych przez *Mucor* sp., 5,1% na-

sion zaatakowanych przez *Cladosporium* sp. i 0,8% nasion porażonych przez *Stemphylium* sp. Na nasionach odkażonych powierzchniowo nie stwierdzono nadpasożytniczego grzyba rodzaju *Trichoderma*. Izolaty grzybów należących do tego rodzaju uzyskano wyłącznie z powierzchni nasion nie poddanych odkażaniu. W doświadczeniu wazonowym przeprowadzonym przez Jeske [2006] rośliny łubinu białego odmiany Bardo, opryskiwane zawiesiną zarodników wytwarzanych przez gatunek *T. viride*, charakteryzowały się niższym procentem porażenia przez wywołujący antraknozę grzyb, wówczas identyfikowany jako *Colletotrichum gloeosporioides*. Być może taką pożyteczną rolę grzyby rodzaju *Trichoderma* spełniały także na badanych nasionach łubinu wąskolistnego i są potencjalnymi gatunkami możliwymi do wykorzystania w ochronie biologicznej. Ten typ ochrony roślin stanowi obecnie szczególnie popieraną formę zwalczania patogenów roślin uprawnych i jest ważnym elementem integrowanych metod ochrony roślin.

Pozostałe gatunki grzybów, w tym głównie izolaty rodzaju *Fusarium* i *Botrytis* oraz grzyby nie tworzące zarodnikowania sumarycznie miały podobny udział na nasionach odkażonych i nieodkażonych, wynoszący odpowiednio 10,1 i 10,5%. W teście bibułowym procent porażenia nasion odkażanych i nieodkażanych powierzchniowo różnił się statystycznie istotnie i dla badanych prób wynosił odpowiednio 10 i 38%. W tym przypadku odkażanie powierzchniowe oraz sposób inkubacji nasion ujawniły podobny odsetek grzybów chorobotwórczych i saprotroficznych, znajdujących się na okrywie nasiennej, jak w przypadku inkubacji na pożywce agarowej, tj. około 10%. W kilku przypadkach stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla nasion odkażonych i nie odkażonych. W tej sytuacji świadczy to o dużym zasiedleniu nasion grzybami znajdującymi się pod okrywą nasienną, co nie jest zjawiskiem korzystnym.

## WNIOSKI

1. Nasiona łubinu wąskolistnego z plantacji, na której obserwowano antraknozę, nasiona łubinu wąskolistnego były w niewielkim stopniu porażone grzybem *Colletotrichum lupini*.
2. Opracowanie i wdrożenie metody skutecznej detekcji grzyba *C. lupini* z nasion łubinu i certyfikacji zdrowotności nasion powinno być niezbędnym elementem obrotu zdrowym materiałem nasiennym.
3. Nasiona łubinu wąskolistnego znajdujące się w obrocie towarowym mogą charakteryzować się lepszą zdrowotnością, aniżeli przewidywano na podstawie stanu zdrowotności plantacji. Jest to spowodowane niższą plennością porażonych roślin oraz eliminacją chorych nasion w procesie czyszczenia.

## PODZIĘKOWANIE

Autorki pracy składają serdeczne podziękowanie Przedsiębiorstwu Handlowemu Agromor, Spółka jawna w Sławnie za umożliwienie przeprowadzenia badań na partiach nasion łubinu wąskolistnego z plantacji wielkotowarowych, o łącznej wadze 270 ton, przeznaczonych do obrotu komercyjnego w województwie pomorskim.

## PIŚMIENNICTWO

- Corbett A.J., Mock I.T., Matassa V. 2001. Effect of plant density and sowing date on narrow leaf lupin production in the Victorian Mallee. *Proceed. 10th Agron. Confer. Hobart, Tasmania, 29 January – 1 February 2001.*
- Decker P. 1947. Anthracnose of blue lupine is seed borne. *Plant Disease Report* 31: 486.
- Faligowska A., Szukała J. 2008. Wpływ systemów uprawy roli na zachwaszczenie łubinu żółtego i wąskolistnego. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 48(1): 343–347.
- Filipowicz A. 1989. Mikoflora nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) i łubinu białego (*Lupinus albus* L.) w Polsce. *Biul. Branż. Hod. Rośl. Nasien.* 5–6: 11–18.
- Frencel I., Lewartowska E., Czerwińska A. 1997. Występowanie antraknozy (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) na łubinach w Polsce. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 446: 467–470.
- Główny Urząd Statystyczny 2012. *Rolnictwo w 2011.*
- Jasińska Z., Kotecki A. 2003. *Szczegółowa Uprawa Roślin.* Wyd. AR Wrocław, 2: ss. 690.
- Jeske M. 2006. Biologiczna ochrona łubinu przed *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 46(2): 556–559.
- Lewartowska E., Jędryczka M., Frencel I., Pieczyrak J. 1994. Seed-borne fungi of *Lupinus angustifolius* L. cultivars. *Phytopathologia Polonica* 7: 123–130.
- Payne R.W., Harding S.A., Murray D.A., Soutar D.M., Baird D.B., Welham S.J., Kane A.F., Gimour A.R., Thompson R., Webster R., Tunnicliffe-Wilson G. 2007. *The Guide to GenStat Release 10, Part 2: Statistics.* Oxford: VSN International, Wielka Brytania.
- Prusiński J. 2007. Postęp biologiczny w łubinie (*Lupinus* sp.) – rys historyczny i stan aktualny. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 522: 23–37.
- Ruge-Wehling B., Dieterich R., Thiele C., Eickmeyer F., Wehling P. 2009. Resistance to anthracnose in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.): sources of resistance and development of molecular markers. *J. Kulturpflanzen* 61: 62–65.
- Sweetingham M.W. 1989. Fungi associated with root and hypocotyl diseases of seedling lupins in Western Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 40: 781–789.
- Sweetingham M.W. 1997. Lupin anthracnose. *Farmnote Agriculture Western Australia* 24: 4.
- Thomas G.J., Sweetingham M.W., Adcock K.G. 2008. Application of fungicides to reduce yield loss in anthracnose-infected lupins. *Crop Prot.* 27: 1071–1077.
- Wiatr K., Frencel I., Lewartowska E., Barzyk P. 2003. Nowe odmiany łubinu żółtego o zwiększonej tolerancji na antraknozę. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 495: 295–306.
- Yang H., Boersma J.G., You M., Buirchel B.J., Sweetingham M.W. 2004. Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Mol. Breeding* 14: 145–151.

M. JĘDRYCZKA, J. KACZMAREK

## INFESTATION OF COMMERCIAL SEED LOTS OF NARROW-LEAFED LUPIN BY PATHOGENIC AND SAPROTROPHIC FUNGI

## Summary

The study concerned the assessment of microbiological cleanliness of the seeds of narrow-leaved lupin variety Sonet, prior to their entry to the commercial market. The untreated seeds of the C/2 qualification level were sampled by an official specialist. Particular attention was paid to assessing seed infestation by the fungus *Colletotrichum lupini*, causing anthracnose. Due to the lack of ISTA (International Seed Testing Association) methodologies, a number of complementary testing methods was elaborated. The first method involved subculturing of narrow-leaved lupin seeds on PDA medium containing streptomycin sulfate and 0.2% solution of 2,4D. Moreover, the seeds were placed in folded and rolled pieces of filter

paper placed into glass tubes with small water content, on Petri dishes containing filter paper, and also to pots with soil substrate in glasshouse conditions. In each case two variants of seeds were tested: seeds that were not surface disinfected and the seeds treated with 3% solution of sodium hypochlorite (NaOCl), and then rinsed and dried on sterile filter paper. Each of the examined samples was composed of 400 randomly collected seeds. The infestation of narrow-lupin seeds by the fungi of the genus *Colletotrichum* was low and ranged from 2% in the case of seeds did no surface disinfection to 5% of seeds after their decontamination with NaOCl. The filter paper test showed 0.5% of seeds with anthracnose symptoms. Lupin seeds were strongly infested with fungi belonging to *Penicillium* and *Alternaria* genera; in the case of not disinfected seeds the contamination with *Penicillium* was 46.8%, and after surface disinfection it was still 35.4% of seeds, what means that 11.3% of these fungi were present on seed coat only, but about 1/3 of them was under the seed coat. In the case of seed infection by the fungus *Alternaria* the situation was similar. The seeds were also infested by other fungi, including pathogenic species such as *Fusarium*, *Stemphylium* and *Botrytis*, but also saprotrophic species such as *Mucor*, *Cladosporium* and - although rarely, they were also infested with fungal species from the hyperparasitic genus *Trichoderma*.