



Ministerstwo Rolnictwa
i Rozwoju Wsi



Zakład Odmianoznawstwa Szkółkarstwa
i Zasobów Genowych

METODYKA OCENY I POPRAWY ZDROWOTNOŚCI NASION POMIDORA (*LYCOPERSICUM ESCULENTUM*)



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 2024

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 2024 roku przedmiotem analiz mikrobiologicznych były nasiona pomidora. W badaniach realizowanych w bieżącym roku sprawozdawczym stosowano wybrane metody uszlachetniania nasion, ukierunkowane m.in. na poprawę zdrowotności nasion i eliminację najgroźniejszych grzybów chorobotwórczych, przenoszonych z materiałem siewnym (tab. 2).

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 przeniesionego 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. Prawidłowo wykonane oznaczenie porażenia nasion wymaga zastosowania odpowiednich warunków inkubacji, zapewniających szybki wzrost grzybnii i zarodnikowanie (sporulacja) oraz wyeksponowanie 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 pomidora oceniono stosując do określenia ich mikoflory 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, **10 dni inkubacji w temperaturze 20 ° C z naprzemiennym doświetlaniem 12/12 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 5 dni bez światła w temperaturze 25 ° C z naprzemiennym doświetlaniem 12/12 lampami NUV**. 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 pomidora prowadzono przy pomocy mikroskopii świetlnej, wysokiej czułości mikroskopu elektronowego firmy Leica oraz dostępnych kluczy do identyfikacji grzybów patogennych.

Wyniki badań zestawiono w 7 tabelach. Stwierdzono, że ekologiczne nasiona komercyjne pomidora były porażone w 29% przez chorobotwórcze grzyby należące do 10 rodzajów (tab. 3). Dominowała asocjacja grzybów z rodzaju *Alternaria*, kontaminująca materiał siewny pomidora w 11,5%, co stanowiło niespełna 40% udział w całkowitej mikoflorze, izolowanej z nie traktowanych nasion pomidora. Gatunki należące do rodzaju *Alternaria* wykazywały zróżnicowaną patogeniczność w stosunku do siewek pomidora. Najsłabszą patogenicznością wykazywały się w badaniach in vitro gatunki *Alternaria alternata*, najsilniejszą natomiast grzyby należące do gatunku *Alternaria solani* – sprawcy alternariozy, suchej plamistości liści i czarnej zgnilizny owoców pomidora. Grzyby z rodzaju *Alternaria* należą do tzw. grzybów polowych, bytujących w fylosferze, stwarzających największe zagrożenie przed i w czasie zbioru nasion. Istotną grupę z punktu widzenia presji przenoszonych chorób, stanowiły wyizolowane z nasion pomidora gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium* – sprawcy fuzaryjnego wędnięcia roślin pomidora, mikopatogeny powodujące antraknozę pomidora, należące do gatunku *Colletotrichum gleosporioides* oraz sprawcę najgroźniejszej choroby pomidora – zarazy ziemniaka na pomidorze - *Phytophthora infestans*. Z gatunków grzybów tzw. przechowalniczych, wskazujących na niewłaściwe składowanie nasion, izolowano grzyby należące do rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Rhizopus*, które w dużym nasileniu mogą degradować materiał siewny podczas nawet krótkiego składowania. Większość wyizolowanych z komercyjnych (nie uszlachetnianych) nasion, chorobotwórczych grzybów przenosi się z materiałem siewnym na rośliny potomne, powodując trudne do zwalczania, zwłaszcza w uprawach ekologicznych, choroby roślin pomidora.

Jedyną alternatywą przy braku zarejestrowanych biologicznych środków do zaprawiania nasion pomidora jest **przedsiewne uszlachetnianie materiału siewnego**, celem wyeliminowania sprawców chorób, zasiedlających nasiona i przenoszonych na plantacje. Wychodząc naprzeciw trudnym wyzwaniom produkcji nasiennej, opracowano niechemiczne metody uszlachetniania nasion pomidora w aspekcie poprawy jakości i zdrowotności ekologicznego materiału siewnego (tab. 1 i 4-7).

Przeprowadzone badania w zakresie uszlachetniania nasion pomidora, 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** przedsiewnego traktowania nasion pomidora : ozonem, laserem oraz pulsującymi falami radiowymi (tab. 6-7). Wymienione zabiegi pozwoliły zredukować porażenie nasion nawet o 60-70%. Zabieg hydrotermoterapii polegającej na traktowaniu nasion pomidora gorącą wodą (40°C) przez 20 minut, 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 pomidora odznaczały się również **metody biologiczne**. Stosując **biokondycjonowanie** nasion

pomidora, polegające nałączeniu zabiegu kondycjonowania z zaprawianiem środkami biologicznymi, uzyskano kompleksowy efekt w zakresie przyspieszenia kiełkowania nasion o około 4 dni oraz istotną redukcję patogenów zasiedlających materiał siewny. 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 preparaty krzemowe, głównie Zumsil oraz Zumsil aplikowany donasiennie łącznie z preparatem FungiZum, preparat na bazie drożdży BioSach oraz preparat mikrobiologiczny Polyversum zawierający oospory grzyba antagonistycznego *Pythium oligandrum* (tab. 4-5). Bardzo dobre efekty ochronne odnotowano również po zastosowaniu jako biokondycjonerów podczas kondycjonowania nasion naturalnych środków – pieprzu cayenne i kurkumy (tab. 4).

Tabela 1. **Metody uszlachetniania** nasion pomidora 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.	18 h
Hydrotermoterapia (40°C i 50°C)	10	20, 30 min.	16 h
Traktowanie nasion polem magnetycznym (natężenie 4 mT, częstotliwość 50 – 60 Hz)	20	15, 60, 120 min	6 h kondycjonowanie
Traktowanie nasion laserem (długość fali- 632,8nm, moc 5 mW)	20	1, 60, 120, 240 sekund	6 h kondycjonowanie
Traktowanie nasion światłem LED o zmiennym widmie, różnej długości i natężeniu fal	20	4,5; 30; 60; 180 minut	6 h kondycjonowanie
<u>Biokondycjonowanie</u> - środki proekologiczne: Polyversum 1%, Chlorella 20%, Kurkuma 1%, Pieprz Cayenne 1% Huminpol (50%) BioSach C 0,2% Zumsil 10% FungiZum 0,5% Adesil Optysil 50% Alginit 2,5% Popiół drzewny	40	20 - 30 min.	24,48h/20°C

Tabela 2. **Ważniejsze patogeny nasion pomidora przenoszone z materiałem siewnym i powodowane choroby**

Grzyby patogeniczne	Nazwa choroby
<i>Alternaria solani</i> syn. <i>Alternaria porri</i> f. sp. <i>solani</i> ; syn. <i>Macrosporium solani</i>	Alternarioza, Sucha plamistość liści Czarna zgnilizna owoców pomidora
<i>Cladosporium fulvum</i> syn. <i>Fulvia fulva</i> ; syn. <i>Mycovellosiella fulva</i> ;	Brunatna plamistość liści pomidora

<i>syn. Passalora fulva</i>	
<i>Colletotrichum gleosporioides</i> (stadium doskonałe <i>Glomerella cingulata</i>)	Antraknoza pomidora
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fuzaryjne więdnienie pomidora
<i>Diplodina lycopersici</i> syn. <i>Ascochyta lycopersici</i> ; syn. <i>Phoma lycopersici</i> (stadium doskonałe <i>Didymella lycopersici</i>)	Zgorzel podstawy łodyg i brunatna zgnilizna owoców pomidora
<i>Phytophthora infestans</i>	Zaraza ziemniaka na pomidorze
<i>Septoria lycopersici</i>	Septorioza pomidora
<i>Verticillium dahliae</i>	Wercilioza
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Zgorzel siewek
<i>Rhizoctonia solani</i> (stadium doskonałe <i>Thanatephorus cucumeris</i>)	Zgorzel siewek, Rizoktonioza pomidora

Tabela 3. **Mikrobiologiczna ocena zdrowotności komercyjnych nasion pomidora** (przed zabiegami uszlachetniania) – procent w stosunku do ogółu izolatów

Patogeny nasion pietruszki	Kontrola
<i>Alternaria solani</i>	2,5
<i>Alternaria alternata</i>	9,0
<i>Colletotrichum gleosporioides</i>	2,0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1,5
<i>Fusarium avenaceum</i>	0,8
<i>Cladosporium herbarum</i>	1,5
<i>Pythium aphanidermatum</i>	1,5
<i>Phytophthora infestans</i>	0,8
<i>Verticillium dahliae</i>	0,5
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3,5
<i>Aspergillus</i> sp.	1,2
<i>Penicillium</i>	0,5
<i>Rhizopus</i> sp.	1,5
<i>Stemphylium</i> spp.	0,5
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,5
Porażenie nasion (%)	29,0

Tabela 4 – 5. Wpływ **biokondycjonowania** nasion pomidora na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

Patogen	Biokondycjonowanie nasion pomidora			
	Kontrola	Polyversum	Kurkuma	Pieprz cayenne

<i>Alternaria solani</i>	2,5	1,4	0,8	0,0
<i>Alternaria alternata</i>	9,0	4,8	3,5	2,5
<i>Colletotrichum gleosporioides</i>	2,0	1,4	1,0	0,7
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1,5	0,6	1,0	0,8
<i>Fusarium avenaceum</i>	0,8	0,0	0,4	0,0
<i>Cladosporium herbarum</i>	1,5	1,0	1,0	0,6
<i>Pythium aphanidermatum</i>	1,5	0,6	0,8	0,5
<i>Phytophthora infestans</i>	0,8	0,5	0,5	0,3
<i>Verticillium dahliae</i>	0,5	0,3	0,5	0,0
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3,5	2,8	2,5	1,8
<i>Aspergillus</i> sp.	1,2	1,0	0,7	0,0
<i>Penicillium</i>	0,8	0,5	0,2	0,0
<i>Rhizopus</i> sp.	1,5	1,0	1,0	0,0
<i>Stemphylium</i> spp.	0,5	0,3	0,0	0,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,5	0,3	0,3	0,1
Porażenie nasion (%)	29	18,0	18,0	15,0

Patogen	Biokondycjonowanie nasion pomidora			
	Kontrola	Zumsil	Zumsil +FungiZum	BioSach
<i>Alternaria solani</i>	2,5	1,2	0,6	1,8
<i>Alternaria alternata</i>	9,0	4,0	2,8	5,5
<i>Colletotrichum gleosporioides</i>	2,0	1,0	0,0	1,6
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1,5	0,8	0,5	1,0
<i>Fusarium avenaceum</i>	0,8	0,3	0,0	0,6
<i>Cladosporium herbarum</i>	1,5	0,0	0,0	1,0
<i>Pythium aphanidermatum</i>	1,5	0,8	0,4	1,2
<i>Phytophthora infestans</i>	0,8	0,4	0,4	0,6
<i>Verticillium dahliae</i>	0,5	0,0	0,0	0,2
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3,5	2,0	1,0	2,8
<i>Aspergillus</i> sp.	1,2	0,8	0,5	0,8
<i>Penicillium</i>	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>Rhizopus</i> sp.	1,5	0,6	0,4	1,0
<i>Stemphylium</i> spp.	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,5	0,2	0,0	0,2
Porażenie nasion (%)	29	16	13,5	18,0

Tabela 6-7. Wpływ uszlachetniania nasion pomidora wybranymi **metodami fizycznymi** na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

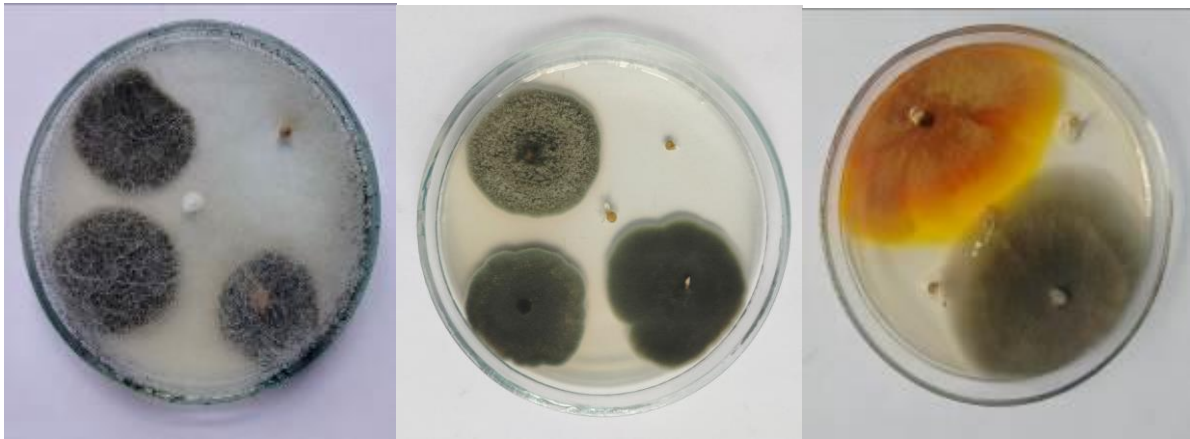
Patogen	Uszlachetnianie nasion pomidora			
	Kontrola	Ozon	PFR	Hydrotermoterapia
<i>Alternaria solani</i>	2,5	0,4	0, 6	1,5

<i>Alternaria alternata</i>	9,0	1,5	1,8	4,0
<i>Colletotrichum gleosporioides</i>	2,0	0,0	0,0	1,5
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1,5	0,5	0,5	1,0
<i>Fusarium avenaceum</i>	0,8	0,0	0,4	0,6
<i>Cladosporium herbarum</i>	1,5	0,0	0,5	0,8
<i>Pythium aphanidermatum</i>	1,5	0,8	1,0	1,5
<i>Phytophthora infestans</i>	0,8	0,2	0,4	0,6
<i>Verticillium dahliae</i>	0,5	0,0	0,0	0,3
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3,5	1,2	1,5	2,5
<i>Aspergillus</i> sp.	1,2	0,0	0,6	0,9
<i>Penicillium</i>	0,5	0,0	0,0	0,2
<i>Rhizopus</i> sp.	1,5	0,5	0,5	1,0
<i>Stemphylium</i> spp.	0,5	0,0	0,0	0,2
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,5	0,2	0,0	0,5
Porażenie nasion (%)	29	6,0	9,5	19,5

Patogen	Uszlachetnianie nasion pomidora			
	Kontrola	Pole magnetyczne	Laser	Światło LED
<i>Alternaria solani</i>	2,5	1,9	0,8	1,5
<i>Alternaria alternata</i>	9,0	7,5	4,0	6,0
<i>Colletotrichum gleosporioides</i>	2,0	1,5	0,6	1,0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1,5	1,0	0,5	0,8
<i>Fusarium avenaceum</i>	0,8	0,5	0,0	0,3
<i>Cladosporium herbarum</i>	1,5	1,2	0,6	1,0
<i>Pythium aphanidermatum</i>	1,5	1,0	0,0	0,6
<i>Phytophthora infestans</i>	0,8	0,8	0,4	0,6
<i>Verticillium dahliae</i>	0,5	0,5	0,0	0,2
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3,5	3,0	1,0	2,0
<i>Aspergillus</i> sp.	1,2	0,8	0,3	0,5
<i>Penicillium</i>	0,5	0,2	0,0	0,0
<i>Rhizopus</i> sp.	1,5	1,0	0,5	0,5
<i>Stemphylium</i> spp.	0,5	0,5	0,0	0,0
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,5	0,3	0,0	0,2
Porażenie nasion (%)	29	18,0	10,5	16,8

Zdrowotność nasion pomidora przed i po zastosowaniu metod uszlachetniania

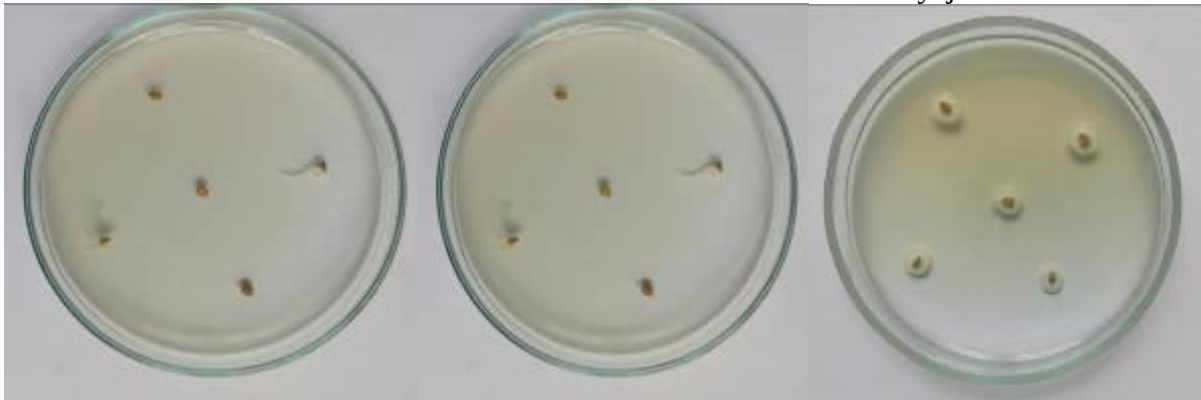
Kontrola – nasiona pomidora nie uszlachetnione



Nasiona ozonowane

Laser

Biokondycjonowanie - Zumsil



Uzlachetnianie nasion pomidora