**Kształtowanie się zbiorowiska grzybów izolowanych
z nasion łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)
pod wpływem okresu przechowywania**

BOŻENA CWALINA–AMBROZIAK, TOMASZ P. KUROWSKI

Katedra Fitopatologii i Entomologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski,
ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn, e-mail:kurowski@uwm.edu.pl

Department of Phytopathology and Entomology, University of Warmia and Mazury,
ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn, Poland

Shaping of the fungal communities isolated from yellow lupin seeds (*Lupinus luteus* L.)
throughout storage time

(Otrzymano: 01.04.2005)

Summary

The object of the experiment were seeds of two traditional cultivars of yellow lupin (Juno and Amulet) cultivated in 1999 in two crop-rotation with 20% and 33% yellow lupine contribution. The quantitative and qualitative composition of the fungal community colonizing the seeds were determined in the laboratory conditions after 0.5-, 1.5- and 2.5-year of storage time.

In total 1077 fungal colonies were isolated from the lupin seeds. Fungi representing the species of *Penicillium* – 29.3%, *Alternaria alternata* – 26.7% and *Rhizopus nigricans* – 12.7% were isolated most widely. Among the fungi pathogenic to lupin, the species of *Colletotrichum gloeosporioides* (16.3% isolates) was dominant.

The crop rotation with 20% lupin reduced the number of fungal colonies colonizing the seeds including the pathogens from the species of *C. gloeosporioides*. Seed disinfection decreased the total number of fungal colonies isolated from both cultivars. Higher number of *C. gloeosporioides* isolates was found in the combination with disinfected seeds. More fungal colonies were obtained from seeds of cv. Amulet than from those of cv. Juno. The storage duration had an effect on the population and the composition of species of fungi isolated from seeds of yellow lupine. With longer storage population of *Penicillium* spp. and *Rhizopus* spp. increased, whereas the population of *C. gloeosporioides* decreased.

Key words: pathogenic fungi, seeds, storage time, crop rotation, cultivars of yellow lupin

WSTĘP

Uwzględniając walory pastewne łubinu żółtego oraz możliwości wykorzystania tej rośliny jako dobrego przedplonu o niskich wymaganiach glebowych, coraz częściej uprawia się nowe odmiany tego gatunku z różnym udziałem w płodozmianie. W okresie wegetacji już od najwcześniejszych faz rozwojowych, aż do wytworzenia nasion jest on atakowany przez wiele czynników chorobotwórczych. Nasiona porażone przez patogeny stanowią groźne źródło infekcji roślin w roku następnym. Poznanie struktury zbiorowiska grzybów zasiedlających nasiona umożliwia ograniczenie ich występowania lub wręcz wyeliminowanie, co decyduje o większej zdrowotności uprawy. W literaturze znajdujemy doniesienia (Ostaszewski, 1960; Filipowicz i Wagner, 1987; Filipowicz, 1989; Pulitz i Atlin, 1992; Faluyi i in., 1993; Nowicki, 1995; Kurowski i Bieniaszewski, 2001) o prowadzonych tego typu badaniach z nasionami łubinu żółtego, wąskolistnego i białego. Autorzy stwierdzili występowanie takich gatunków grzybów patogenicznych jak: *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pleiochaeta setosa* oraz różnych gatunków z rodzaju *Fusarium* i *Phoma*.

Powyższe argumenty stanowią o celowości przeprowadzenia badań nad określeniem zbiorowisk grzybów zasiedlających nasiona dwóch odmian łubinu żółtego uprawianego w płodozmianach z jego 20% i 33% udziałem po 0,5-, 1,5- i 2,5-letnim okresie ich przechowywania.

MATERIAŁ I METODY

Badania nad zbiorowiskiem grzybów zasiedlających nasiona łubinu żółtego przeprowadzono na materiale pochodzącym z doświadczenia w Kociborzu k. Reszla, ze zbiorów w 1999 roku. Analizowano nasiona dwóch odmian łubinu żółtego o niezdeterminowanym wzroście (Amulet i Juno), uprawianych w płodozmianie z 20% udziałem łubinu (ziemniak, jęczmień jary, łubin żółty, żyto ozime, żyto ozime) i z 33% udziałem (łubin żółty, żyto ozime, jęczmień jary). W laboratorium określano skład ilościowy i jakościowy zbiorowiska grzybów zasiedlających nasiona po 0,5-, 1,5- i 2,5-letnim okresie przechowywania. Nasiona do izolacji grzybów przechowywano w suchym pomieszczeniu w temperaturze 12–16°C.

Próby składały się z 200 losowo pobranych z kombinacji dojrzałych, dobrze wykształconych nasion, które przed wyłożeniem na pożywkę PDA dzielono na dwie równe partie; odkażane w 0,1% podchlorynie sodu (NaOCl) przez 30 sekund, potem 3-krotnie płukane w sterylnej wodzie oraz na partię nasion tylko płukanych 3-krotnie w sterylnej wodzie. Po 7-dniowym okresie inkubacji wyrosłe kolonie grzybów przeszczepiano na skosy agarowe i oznaczano przy użyciu kluczy i monografii (Arx, 1970; Booth, 1971; Ellis, 1971).

WYNIKI

W wyniku przeprowadzonych trzyletnich badań z nasion łubinu żółtego otrzymano 1077 kolonii grzybów (tab. 1 i 2). Reprezentowane one były przez 21 gatunków oraz grzyby drożdżopodobne i kultury niezarodnikujące. Liczebność grzybów podczas kolejnych okresów przechowywania kształtowała się na zbliżonym poziomie (ryc. 1a), jednak najwięcej uzyskano z nasion analizowanych pół roku po zbiorze (35,0% izolatów). Pod względem jakościowym najbogatsze było zbiorowisko grzybów izolowanych z nasion po 1,5-rocznym okresie przechowywania i zidentyfikowano w nim 15 gatunków. Najmniejszą różnorodność gatunkową (8 gatunków) stwierdzono po 2,5-rocznym okresie składowania. Z nasion odmiany Amulet izolowano o 7,6% kultur więcej niż z nasion odmiany Juno (ryc. 1b).

Ryc. 1. Procent grzybów izolowanych z nasion łubinu żółtego w zależności od:
a. okresu przechowywania
b. odmiany

Fig. 1. Percentage of fungi isolated from yellow lupine seeds depending on:
a. storage time
b. cultivar

Tabela 1
Grzyby wyizolowane z nasion łubinu żółtego odmiany Amulet po okresie przechowywania
Table 1
Fungi isolated from seeds of yellow lupine cv. Amulet after storage time

Gatunek grzyba Species of fungus	0,5 roku przechowywania 0.5-year of storage time					1,5 roku przechowywania 1.5-year of storage time					2,5 roku przechowywania 2.5-year of storage time				
	20%		33%		Σ	20%		33%		Σ	20%		33%		Σ
	I	II	I	II		I	II	I	II		I	II	I	II	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	29*	17	15	13	74	6	7	16	10	39					
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud											1				1
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem.							1			1					
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Pers.			5	1	6	1	1	3	7	12	2				2
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.				2	2	2				2					
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries						1				1					
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.	28	10	28	30	96	1		5	1	7					
<i>Humicola grisea</i> Traaen						11	8			19					
<i>Monodictys glauca</i> (Cook et Harkn.) Hughes						5	5			10					
<i>Penicillium</i> spp.		3	1		4	2	10		21	33	40	38	32	49	159
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	1	5	4	7	17	4	7	3	12	26	10	13	7	14	44
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bain							5			5					
Grzybnie nie zarodnikujące – Non sporulating fungi	5		6	2	13			1		1					
Grzyby drożdżopodobne – Yeast-like fungi														5	5
Razem – Total	63	35	59	55	212	33	44	28	51	156	53	51	39	68	211

20%; 33% – płodozmian z 20% lub 33% udziałem łubinu żółtego

– crop rotation with 20% or 33% of yellow lupine contributions

I – nasiona odkażane – disinfected seeds

II – nasiona nieodkażane – no disinfected seeds

* – liczba izolatów – number of isolates

Tabela 2
Grzyby wyizolowane z nasion łubinu żółtego odmiany Juno po okresie przechowywania

Table 2
Fungi isolated from seeds of yellow lupine cv. Juno after storage time

Gatunek grzyba Species of fungus	0,5 roku przechowywania 0.5-year of storage time					1,5 roku przechowywania 1.5-year of storage time					2,5 roku przechowywania 2.5-year of storage time				
	20%		33%		Σ	20%		33%		Σ	20%		33%		Σ
	I	II	I	II		I	II	I	II		I	II	I	II	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	17*	10	20	15	62	27	20	21	33	101			8	4	12
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Pers.	1	1	2		4	4	7	6	2	19			1	3	4
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.							3			3					
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries		1			1										
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.	21	10	25	17	73										
<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb. ex Schlecht.		1			1										
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.						1				1					
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.				1	1										
<i>Monodictys glauca</i> (Cook et Harkn.) Hughes	1				1		2			2					
<i>Mortierella isabelina</i> Oudemans				3	3										
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer								1	1						
<i>Papulaspora</i> sp.	1				1										
<i>Penicillium</i> spp.	1	2	2	5	10		12	1	7	20	26	26	8	30	90
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn							2			2					
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg				3	3	3	8	3	4	18	4	6	7	12	29
<i>Sporotrichum olivaceum</i> Fries											5		1		6
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bain											4			1	5
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai												6			6
Grzybnie nie zarodnikujące – Non sporulating fungi	3	1			4			6	7	13					
Grzyby drożdżopodobne – Yeast-like fungi		1			1							1			1
Razem – Total	45	27	49	44	165	35	54	37	54	180	39	39	25	50	153

Objaśnienia jak w tabeli 1 - Explanations as in table 1

Wśród grzybów potencjalnie patogenicznych najczęściej izolowanych z nasion znajdują się gatunki: *Colletotrichum gloeosporioides* – sprawca antraknozy hubinu i *Botrytis cinerea* – sprawca szarej pleśni. Zanotowano pojedyncze izolaty grzybów: *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *Bipolaris sorokiniana* i *Rhizoctonia solani*. Zdecydowanie największy udział (47,5% ogółu izolatów) stanowiły patogeny wyizolowane z nasion po 0,5-rocznym okresie przechowywania (ryc. 2a). Podczas kolejnych dwóch terminów badań liczebność patogenów zmalała do 11,3 i 1,6%. *C. gloeosporioides* bardzo licznie zasiedlało nasiona po 0,5-rocznym okresie przechowywania (44,8% ogółu izolatów), sporadycznie po 1,5-rocznym (2,1%), a nie wyisobniono go po 2,5-rocznym okresie składowania nasion.

Ryc. 2. Procentowy udział najczęściej izolowanych grzybów z nasion hubinu żółtego w zależności od:

a. okresu przechowywania

Fig. 2. Percentage of most often isolated fungi from yellow lupine seeds depending on:

a. storage time

W zbiorowisku grzybów zasiedlających nasiona hubinu liczny udział miały grzyby saprotroficzne. W pierwszych dwóch terminach badań licznie izolowano gatunek *Alternaria alternata* (od 36 do 41,7% ogółu wyisobnień), a zdecydowanie rzadziej *B. cinerea* (od 2,7 do 9,2%). Zbiorowisko grzybów z nasion po 2,5-rocznym okresie przechowywania zdominowały gatunki z rodzaju *Penicillium* (68,4% ogółu izolatów) i *Rhizopus nigricans* (20,1%).

Również odmiany, udział hubinu w płodozmianie oraz proces odkażania nasion kształtowały skład zbiorowiska grzybów. Odmiana Amulet była częściej zasiedlona

przez grzyby patogeniczne, w tym głównie gatunek *C. gloeosporioides* (ryc. 2b). Natomiast z nasion odmiany Juno uzyskano przeważającą liczbę izolatów *B. cinerea* oraz pojedyncze wyisobnienia *R. solani* i grzybów z rodzaju *Fusarium*.

Z nasion obydwu odmian łubinu uprawianych w płodozmianie z jego 20% udziałem wyisobniono o 7,6% mniej izolatów grzybów patogenicznych niż z nasion uzyskanych z płodozmianu z 33% jego udziałem (ryc. 2c).

Proces powierzchniowego odkażania nasion nieznacznie zredukował liczbę uzyskanych izolatów grzybów. Bardziej widoczne różnice zaznaczyły się pod względem jakościowym. Spadła częstotliwość występowania grzybów z rodzaju *Penicillium* i *R. nigricans* odpowiednio o 13,1 i 6,8% ogółu wyisobnień (ryc. 2d). Proces odkażania nie ograniczył liczby sprawcy antraknozy łubinu, a wprost przeciwnie – większą liczebność izolatów *C. gloeosporioides* stwierdzono w kombinacji z nasionami odkażonymi niż w kombinacji bez odkażania nasion. Świadczy to o rozwoju *C. gloeosporioides* również wewnątrz nasion, a jego lepszy rozwój na podłożu był możliwy po uprzednim zabiciu w procesie odkażania konkurencyjnych grzybów bytujących na powierzchni nasion.

Ryc. 2. Procent udział najczęściej izolowanych grzybów z nasion łubinu żółtego w zależności od: b. odmiany; c. płodozmianu; d. odkażania nasion

Fig. 2. Percentage of most often isolated fungi from yellow lupine seeds in dependence on: b. cultivar; c. crop rotation; d. disinfection of seeds

DYSKUSJA

Pośród 1077 izolatów otrzymanych z nasion dwóch odmian łubinu żółtego o niezdeterminowanym wzroście dominującymi okazały się grzyby saprotroficzne: *A. alternata* oraz z rodzaju *Penicillium* i *Rhizopus*. Grzyby patogeniczne były reprezentowane przez gatunki *Colletotrichum gloeosporioides* i *Botrytis cinerea*, a także

pojedyncze wyosobnienia *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana* i grzybów z rodzaju *Fusarium*. Powyższe gatunki grzybów izolowali z nasion łubinów: Filipowicz i Wagner (1987), Filipowicz (1989), Nowicki (1995), Majchrzak (1998) oraz Kurowski i Bieniaszewski (2001).

W wyniku przeprowadzonych badań własnych stwierdzono różnice w zbiorowisku grzybów zasiedlających nasiona łubinu w zależności od jego udziału w płodozmianie i odmiany. Uprawa łubinu w płodozmianie z jego 20% udziałem ograniczyła liczebność grzybów patogenicznych, w tym *C. gloeosporioides*. We wcześniej opublikowanych przez autorów (Kurowski i in., 2001) badaniach nad zdrowotnością łubinu w okresie wegetacji stwierdzono, że patogeny silniej opanowały rośliny w płodozmianie z 33% udziałem łubinu żółtego, a więc uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie badań polowych.

Porównując skład ilościowy grzybów zasiedlających nasiona obydwu odmian łubinu wykazano, że wraz z upływem okresu przechowywania częściej izolowano z nich grzyby saprotroficzne z rodzaju *Penicillium* i *Rhizopus* niż grzyby patogeniczne. Odmienne kształtowała się liczebność gatunku *Alternaria alternata*; zdecydowanie najwięcej izolatów otrzymano po 0,5- i 1,5-rocznym okresie przechowywania nasion, a po 2,5-rocznym okresie liczebność grzyba 6-7-krotnie spadła. W doniesieniach z literatury (Neegard, 1977; Narkiewicz-Jodko, 1986) spotykamy informacje, iż grzyby z rodzaju *Mucor*, *Penicillium* i *Rhizopus* uznawane są za grzyby „przechowalniane”, a ich liczebność wzrasta podczas przechowywania nasion. Natomiast gatunki takie jak: *A. alternata* i grzyby z rodzaju *Fusarium*, określane mianem grzybów „polowych”, najczęściej izolowane są z nasion bezpośrednio po zbiorze. Również gatunek *C. gloeosporioides*, coraz bardziej zagrażający uprawom łubinów (Frenzel, 2001; Kurowski i in., 2001; Bieniaszewski i in., 2004), praktycznie zasiedlał tylko nasiona analizowane po najkrótszym okresie ich składowania, nie wliczając znikomego procentu izolatów tego gatunku uzyskanych z nasion odmiany Amulet po 1,5-rocznym przechowywaniu. O zanikaniu *C. gloeosporioides* w przechowywanym materiale siewnym pisali wcześniej Kurowski i Bieniaszewski (2001).

Mniej izolatów grzybów otrzymano z nasion odmiany Juno niż Amulet. Patogeniczny gatunek *C. gloeosporioides* lepsze warunki rozwoju znalazł na odmianie Amulet i stanowił tu 17,8% ogółu izolatów w stosunku do 14,7% na odmianie Juno. Również w badaniach polowych odmiana Amulet była silniej atakowana przez tego patogena (Kurowski i in., 2001).

Proces powierzchniowego odkażania nasion zredukował liczebność grzybów z rodzaju *Penicillium* i gatunku *R. nigricans*. Gatunki patogeniczne *C. gloeosporioides* i *B. cinerea* częściej izolowano z nasion odkażanych, co przemawia za ich rozwojem wewnątrz nasion.

WNIOSKI

1. Wraz z wydłużaniem się okresu przechowywania wzrastała liczebność grzybów z rodzajów *Penicillium* i *Rhizopus*, natomiast malała patogeniczności gatunku *Colletotrichum gloeosporioides*.
2. Uprawa łubinu w płodozmianie z jego 20% udziałem ograniczała liczebność kolonii grzybów zasiedlających nasiona, w tym także sprawcy antraknozy łubinu.
3. Odmiana Amulet charakteryzowała się bogatszym pod względem ilościowym zbiorowiskiem grzybów w porównaniu z odmianą Juno.
4. Powierzchniowe odkażanie nasion nie ograniczało liczby izolatów *C. gloeosporioides*.

LITERATURA

- Arx von J.A., 1970. The genera of fungi sporulating in pure culture. Verlag von J. Cramer.
- Bieniaszewski T., Kurowski T.P., Szwejkowski Z., Władyko S., 2004. State of cultivation and occurrence of lupin antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in the province of Warmia and Mazury. Pol. J. Natur. Sc. 16 (1): 7–18.
- Booth T.C., 1971. The genus *Fusarium*. Comm. Mycol. Institute Kew Surrey, England.
- Ellis M.B., 1971. Dematiaceus hyphomycetes. Comm. Mycol. Institute Kew Surrey, England.
- Faluyi M. A., Mather D. E., Atlin G. N., Merrick L., Paulitz T. C., 1993. Field evaluation of seed, pod and stem rot in white lupine germ plasm. Plant Dis. 77: 926–929.
- Filipowicz A., 1989. Mikoflora nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) i łubinu białego (*L. albus* L.) uprawianego w Polsce. Hod. Rośl. Nasien. 5-6: 11–14.
- Filipowicz A., Wagner A. 1987. Mikoflora nasion łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) uprawianego na terenie Polski. Biul. IHAR 163: 149–156.
- Frencel I., 2001. Zagrożenie łubinów występowaniem antraknozy. Zesz. Nauk. Akad. Rol. Wroc. 427, Rolnictwo 81: 175–183.
- Kurowski T.P., Bieniaszewski T., 2001. Grzyby izolowane z nasion łubinu żółtego, ze szczególnym uwzględnieniem *Colletotrichum gloeosporioides*, w zależności od okresu przechowywania materiału siewnego. Zesz. Nauk. Akad. Rol. Wroc. 427, Roln. 82: 195–204.
- Kurowski T.P., Cwalina-Ambroziak B., Sadowski T., 2001. Choroby czterech odmian łubinu żółtego uprawianego w zróżnicowanych płodozmianach. Zesz. Nauk. AR Wrocław 427, Rolnictwo 82: 205–213.
- Majchrzak B. 1998. Wpływ stresu chłodno-wodnego na kiełkowanie nasion i zdrowotność siewek wybranych roślin strączkowych. Wydawnictwo ART Olsztyn, Rozpr. i Monogr. 1: 1–56.

- Narkiewicz-Jodko M. 1986. Wartość siewna przechowywanego ziarna trzech zbóż w aspekcie fitopatologicznym. Zesz. Nauk. Akad. Rol. Wroc., Rozpr., 55.
- Neergaard P. 1977. Seed Pathology. Vol. 1, The Macmillan Press, London.
- Nowicki B. 1995. Patogeniczne grzyby zasiedlające nasiona łubinu wąskolistnego. Acta Agrobot. 48 (2): 59–64.
- Ostaszewski S. A. 1960. Studies on seed-borne spot fungus in white lupine. Phytopathology 50: 577.
- Pulitz T. C., Atlin G. N. 1992. First report of brown spot of lupines caused by *Pleiochaeta setosa* in Canada. Plant Dis. 76: 1185.

Streszczenie

Przedmiotem badań były nasiona dwóch odmian łubinu żółtego (Juno i Amulet) uprawianych w roku 1999 w dwóch płodozmianach z jego 20% i 33% udziałem. W laboratorium określono skład ilościowy zbiorowisk grzybów zasiedlających nasiona po 0,5-, 1,5- i 2,5-rocznym okresie przechowywania.

Z nasion łubinu otrzymano ogółem 1077 kolonii grzybów. Do najliczniej izolowanych należały grzyby z rodzaju *Penicillium* – 29,3%, *Alternaria alternata* – 26,7 % i *Rhizopus nigricans* – 12,7% ogółu wyosobnień. Wśród grzybów patogenicznych dla łubinu dominował gatunek *Colletotrichum gloeosporioides* – 16,3%.

Uprawa łubinu z jego 20% udziałem w płodozmianie ograniczała liczebność kolonii grzybów zasiedlających nasiona, w tym także patogenicznego gatunku *C. gloeosporioides*. Proces odkażania nasion zmniejszył ogólną liczbę kolonii grzybów izolowanych z nasion obydwu odmian, w tym głównie z rodzaju *Penicillium* oraz gatunku *Rhizopus nigricans*. Większą liczebność izolatów *C. gloeosporioides* stwierdzono w kombinacji z nasionami odkażanymi. Odmiana Amulet charakteryzowała się bogatszym pod względem ilościowym zbiorowiskiem grzybów w porównaniu z odmianą Juno. Czas przechowywania miał wpływ na liczebność i skład gatunkowy grzybów izolowanych z nasion łubinu żółtego. Wraz z wydłużaniem się okresu przechowywania wzrastała liczebność grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Rhizopus*, natomiast zdecydowanie malała grzyba *C. gloeosporioides*.