Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach
Zakład Odmianoznawstwa, Szkółkarstwa i Nasiennictwa Roślin,
Pracownia Nasiennictwa

Sprawozdanie z realizacji zadania w 2016 roku

Uprawy polowe metodami ekologicznymi – metody zaprawiania nasion metodami ekologicznymi. Wykorzystanie pożytecznych mikroorganizmów i środków ekologicznych do biologicznego zaprawiania nasion oraz zwalczania fitopatogenów w uprawach nasiennych wybranych gatunków roślin warzywnych.

KIEROWNIK PROJEKTU

dr Regina Janas

DYREKTOR INSTYTUTU OGRODNICTWA

prof. dr hab. Małgorzata Korbin

Wykonawcy: dr Regina Janas, prof. dr hab. Mieczysław Grzesik, dr hab. Lidia Sas-Paszt, prof. IO, dr Jan Sobolewski, dr Anna Lisek, dr Krzysztof Górnik, mgr Agnieszka Czajka, mgr Edyta Derkowska, mgr Sławomir Głuszek, mgr Ewa Chojnowska, mgr Renata Góralska.

WSTĘP

Celem zadania było opracowanie innowacyjnych metod osłony biologicznej nasion oraz roślin nasiennych wybranych gatunków warzywnych przed fitopatogenami, powodującymi największe straty plonów nasion w produkcji ekologicznej. W badaniach zastosowano bioprodukty i pożyteczne mikroorganizmy zgromadzone w IO w Skierniewicach (inokula bakteryjno-mikoryzowe) oraz wybrane, komercyjne środki biologiczne.

Opracowane zostały innowacyjne metody osłony biologicznej nasion oraz ochrony biologicznej wybranych gatunków roślin warzywnych (pomidor i marchew) przed fitopatogenami na bazie bioproduktów mikrobiologicznych zgromadzonych w SYMBIO BANKU Pracowni Rizosfery Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz komercyjnych środków biotechnicznych. Oceniony został wpływ nowo opracowanych metod biologicznej osłony na poprawę jakości i zdrowotności nasion, metabolizm nasion, procesy starzenia materiału siewnego oraz wschody i wzrost roślin w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych i uprawach polowych. W trakcie realizacji zadania opracowano nowatorską technologię biologicznego zaprawiania nasion (przeznaczonych do produkcji ekologicznej), polegającą na wprowadzeniu do otoczki nasion pożytecznych mikroorganizmów wyizolowanych w SYMBIO BANKU IO przy zachowaniu ich wysokiej skuteczności ochronnej i poprawie jakości nasion. Nowo opracowane metody i technologie osłony nasion roślin warzywnych przed chorobami, wzbogacone o pożyteczne mikroorganizmy glebowe, otwierają innowacyjną linię produkcji nasiennej warzyw w systemach ekologicznych, zapewniającą kompleksową ochronę nasion i roślin warzywnych oraz indukcję ich odporności począwszy od nasion i stadium juwenilnego aż do dojrzałości zbiorczej. Nowo opracowane technologie i bioprodukty mikrobiologiczne będą testowane w kolejnych latach badań na nasiennikach marchwi (drugi rok uprawy) i przekształcone w produkty komercyjne. Ze względu na niedobór skutecznych zapraw biologicznych i środków biologicznych do ochrony plantacji nasiennych, istnieje pilna potrzeba wprowadzenia do obrotu tego typu bioproduktów, które są konkurencyjne i bardziej skuteczne od istniejących na rynku preparatów pochodzenia zagranicznego. Oczekują tego zarówno producenci warzyw tzw. konsumpcyjnych, jak i polski sektor nasienny.

Realizacja zadania umożliwi zastosowanie bioproduktów mikrobiologicznych dla poprawy zdrowotności i wigoru nasion wybranych gatunków roślin warzywnych oraz ochrony roślin nasiennych w krajowej produkcji ogrodniczej. Zwiększenie asortymentu zapraw biologicznych wzbogaconych mikroorganizmami pożytecznymi, o szerokim spektrum właściwości ochronnych oraz możliwość zastępowania nimi standardowego zaprawiania chemicznego, zmniejszy skażenie gleb pestycydami , ograniczy liczbę chemicznych zabiegów ochrony, co przyczyni się do efektywnej ochrony agroekosystemów, szybszej regeneracji tzw. zmęczonych i wyjałowionych gleb, a finalnie - poprawy potencjału plonotwórczego roślin.

Podzadanie 1. Selekcja szczepów mikroorganizmów najbardziej skutecznych w biologicznej ochronie nasion wybranych gatunków roślin warzywnych

WSTĘP

Zastosowanie pożytecznych mikroorganizmów w uprawach ogrodniczych, w tym w uprawie roślin warzywnych, jest obecnie przedmiotem wielu prowadzonych na świecie badań. Doświadczenia dotyczą zarówno stymulacji kiełkowania nasion, usprawniania pobierania składników mineralnych w rizosferze jak i ograniczania negatywnego wpływu patogenów, szkodników i stresów abiotycznych w uprawie tych roślin. Wiele z tych badań ukierunkowanych jest na określenie pożytecznego oddziaływania symbiotycznych mikroorganizmów, m.in. w udostępnianiu trudnodostępnego fosforu związanego w glebie w kompleksach z jonami glinu, wapnia i żelaza. Inne badania wskazują na dużą efektywność bakterii *Azospirillum* w stymulacji wzrostu i plonowania roślin warzywnych. Pożyteczne mikroorganizmy odgrywają istotną rolę w mineralnym odżywianiu roślin oraz ich wzroście i plonowaniu. Ich działanie jest szerokie i obejmuje procesy takie jak: produkcja fitohormonów, sideroforów, indukcja odporności na czynniki stresowe u roślin, a także wpływają na zwiększenie dostępności jonów składników mineralnych w glebie, np. poprzez uwalnianie z kompleksów trudno dostępnych form fosforu, redukcję lub utlenianie jonów metali znajdujących się w glebie lub asymilację azotu atmosferycznego. Wykorzystanie odpowiednio wyselekcjonowanych dla potrzeb roślin mikroorganizmów pozwala na zwiększenie ich produktywności i poprawę jakości plonów, zwłaszcza w warunkach ograniczonej dostępności składników mineralnych w glebie lub w systemach zrównoważonej uprawy roślin. Z tego powodu wzrasta znaczenie mikroorganizmów w integrowanej i ekologicznych technologiach uprawy roślin, w których stosowane są one lub produkty ich metabolizmu jako hormonalne, biostymulujące lub nawozowe komponenty opracowywanych bionawozów. Bakterie PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), w tym pseudomonady (ang pseudomonads) są najczęściej badaną grupą mikroorganizmów pod kątem poprawy wzrostu i plonowania roślin uprawnych. Pożyteczne bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* wykazują szereg pożytecznych cech w stymulacji wzrostu i plonowania roślin. Są one efektywnymi antagonistami wielu patogenów roślin uprawnych. Pewne szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* produkują duże ilości regulatorów wzrostu roślin. Konsorcja pożytecznych mikroorganizmów dają szersze możliwości korzystnego oddziaływania na wzrost i plonowanie roślin niż pojedyncze szczepy stosowane w uprawach roślin. Dostępne na rynku, zagraniczne preparaty mikrobiologiczne w formie preparatów płynnych lub stałych substratów, zawierają w większości pojedyncze szczepy wyizolowane z warunków klimatycznych innych niż warunki Polskie. Zastosowanie konsorcjum zawierającego rodzime szczepy bakterii rizosferowych powoduje poprawę wzrostu i plonowania roślin oraz właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych gleby, co pozwala na ograniczenie mineralnego nawożenia roślin.

Właściwości szczepów bakterii w świetle dostępnej literatury światowej

Bacillus pumilus

Szczepy bakterii *Bacillus pumilus* zdolne są do wywoływania w roślinach odporności systemicznej. Szczep *B. pumilus* SE34 zwiększa odporność roślin tytoniu na infekcje wywoływane przez *Cucumber mosaic virus* lub przez *Tomato mottle virus* (ToMoV) (Kloepper i in. 2004). Bakterie te wykazują działanie przeciwko grzybom patogenicznym np. przeciwko *Peronospora tabacina* (Kloepper i in. 2004).

Bacillus weihenstephanensis

Bakterie *Bacillus weihenstephanensis* zdolne są do produkcji szeregu enzymów, z których część zdolna jest do biologicznego rozkładu różnych związków chemicznych, a inne z kolei mają zastosowanie w biotechnologii. *Bacillus weihenstephanensis* AN1 zdolny jest do degradacji węglowodorów aromatycznych (Maiti i in. 2013). Szczep *Bacillus weihenstephanensis* RI12 zdolny jest do rozkładu barwnika Congo Red (Mnif i in. 2015).

Klebsiella oxytoca

Bakterie *Klebsiella oxytoca* są m.in. endofitami występującymi w tkankach roślinnych. Wiele izolatów zdolnych jest do asymilacji azotu atmosferycznego (Iniguez i in. 2004; Fouts i in. 2008). Inne szczepy *Klebsiella* zdolne są do redukcji jonów metali (Lim i in. 2012).

***Pseudomonas* sp.**

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* wykazują silne działanie antagonistyczne przeciwko licznym gatunkom patogenów, m.in. przeciwko *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Manikandan i Raguchander 2014). Jednym z mechanizmów ich działania są produkowane przez te bakterie siderofory (Kloepper i in. 1980; Luján i in. 2015). Szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* produkują duże ilości regulatorów wzrostu roślin. *Pseudomonas putida* GR12-2 syntetyzuje ponad cztery razy więcej kwasu indolilooctoego (Indoleacetic Acid, IAA), niż porównywane „dzikie" szczepy bakterii (Xie i in. 1996).

***Lysobacter* sp.**

Rodzaj *Lysobacter* obejmuje liczne gatunki bakterii produkujące szereg metabolitów, pochodnych związków lipidowych, peptydowych, wielopierścieniowych i innych, które mogą zostać wykorzystane przeciwko innym gatunkom bakterii, przeciwko licznym grzybom, lęgniowcom (*Oomycetes*), a także przeciwko nicieniom atakującym uprawy roślin (Islam i in. 2005; Xie i in. 2012). Bakterie z tego rodzaju znaleziono w glebach mających naturalną zdolność do ograniczania rozwoju grzybów patogenicznych (Gómez Expósito i in. 2015; Wang i in. 2015).

***Paecilomyces* sp.**

Bakterie z rodzaju *Paecilomyces* wykazują szereg właściwości, które czynią ten rodzaj bakterii cennym składnikiem preparatów biologicznych. Bakterie te zdolne są do ograniczania *Paecilomyces fumosoroseus* powodującego obumieranie jaj roztocza gatunku *Tetranychus cinnabarinus* (Shi i Feng 2004). *Paecilomyces lilacinus* wykazuje zdolność do ograniczania rozwoju roztoczy *Aculus schlechtendali* (Demirci i Denizhan 2010), wywołujących szkody w uprawach jabłoni. Z kolei *P. polymyxa* GBR-1 zdolny jest do ograniczania rozwoju patogenicznych dla roślin nicieni (Khan i in. 2008).

METODYKA

Opracowanie składu mikrobiologicznych konsorcjów do biologicznego zaprawiania nasion roślin warzywnych.

Izolacja i charakterystyka szczepów mikroorganizmów wyizolowanych z rizosfery roślin warzywnych.

W celu izolacji, identyfikacji, charakterystyki i selekcji pożytecznych mikroorganizmów pobrano próby gleby rizosferowej i korzeni roślin marchwi i pomidora. Wyizolowane szczepy bakterii kultywowano na pożywkach w celu scharakteryzowania ich właściwości oraz

wyselekcjonowania szczepów skutecznych w biologicznej ochronie nasion roślin warzywnych oraz o działaniu stymulującym kiełkowanie nasion.

Izolacja mikroorganizmów

Mikroorganizmy izolowano z gleby rizosferowej oraz z młodych niezdrewniałych korzeni wraz z przylegającą do nich warstwą gleby.

Przygotowanie próbek:

W celu uzyskania próbek gleby rizosferowej z korzeni usunięto nadmiar gleby poprzez ich delikatne kilkukrotne otrząsanie. Następnie korzenie wraz z przylegającą do nich cienką warstwą gleby osuszono w temperaturze pokojowej przez ok. godzinę. Z osuszonych korzeni przy pomocy jałowej końcówki do pipety zebrano/zeskrobano próbki gleby rizosferowej. Uzyskaną próbkę wymieszano, zawieszono w jałowej wodzie destylowanej w stosunku 1:9 i homogenizowano przy użyciu wytrząsarki posuwisto zwrotnej. Z uzyskanych zawiesin przygotowano serie kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń, w jałowej wodzie destylowanej, które wysiewano na szalki z pożywkami agarowymi:

W celu izolacji mikroorganizmów o poszukiwanych cechach, rozcieńczone próbki wysiewano na szalkach Petriego z odpowiednimi pożywkami agarowymi:

- Do izolacji bakterii syntetyzujących siderofory użyto pożywki agarowej CAS (B. Alexander i D.A. Zuberer 1991), składającej się z mieszaniny czterech oddzielnie sterylizowanych roztworów o składzie:
    - Roztwór 1 (Fe-CAS roztwór wskaźnikowy): 10 ml roztworu 1mM $FeCl_3$ x $6H_2O$ w 10 mM HCl, 50 ml wodnego roztworu Chromeazurol S (1.21 mg x ml^{-1}), 40 ml wodnego roztworu bromku heksadecylotrimetyloamoniowego (1.82 mg x ml^{-1}).
    - Roztwór 2 (roztwór buforowy): 30.24 g PIPES, 750 ml wodnego roztworu soli: KH_2PO_4 0.3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1.0 g. pH roztworu doprowadzono do 6.8 przy pomocy 50 % KOH, po ustaleniu pH, objętość roztworu uzupełniono wodą destylowaną do 800 ml. Następnie dodano 15.0 g agaru i autoklawowano.
    - Roztwór 3: 70 g wody destylowanej, 2 g glukozy, 2 g mannitolu, 493 mg $MgSO_4$ x $7H_2O$, 11 mg $CaCl_2$, 1.17 mg $MnSO_4$ x H_2O, 1.4 mg H_3BO_3, 0.04 mg $CuSO_4$ x $5H_2O$, 1.2 mg $ZnSO_4$ x $7H_2O$, 1.0 mg Na_2MoO_4 x $2H_2O$.
    - Roztwór 4: 30 ml 10% wodnego roztworu kwasów kasaminowych. Sterylizacja przez filtrację.
- Do izolacji bakterii mogących rozpuszczać nierozpuszczalne związki fosforu (fosforan wapnia) w glebie użyto pożywki agarowej Pikovskiej o składzie: glukoza 20.0 g, $Ca_3(PO_4)_2$ 5.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, NaCl 0.2 g, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0.1 g, KCl 0.2 g, $MnSO_4$ x H_2O 0.002 g, $FeSO_4$ x $7H_2O$ 0.002 g agar 15.0 g, woda destylowana 1000 g.
- Do izolacji tlenowych bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe (*Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp.,) użyto pożywek: agaru odżywczego (pepton 5 g, ekstrakt drożdżowy 2.5 g, glukoza 1 g, woda destylowana 1000 g). Formy przetrwalnikowe bakterii uzyskano przez inkubację rozcieńczonych próbek w temperaturze 80°C przez 20 minut.

- Do izolacji diazotrofów użyto pożywki agarowej ”Azospirillum Isolation Medium” (E. A. Rodríguez Cáceres 1982) o składzie: DL-kwas jabłkowy 5.0 g, KOH 4.8 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, $FeCl_3$ x 6 H_2O 0.015 g, ekstrakt drożdżowy 0.5 g, Agar 20.0 g, woda destylowana 1000 g, 15 ml wodnego roztworu czerwieni Kongo o stężeniu 1:400, pH ~ 7.0.

- Do izolacji bakterii wytwarzających toksyczne metabolity dla grzyba *Verticillium dahliae* użyto agarowej pożywki ziemniaczano glukozowej (Merck). Pożywkę wstępnie zainokulowano zarodnikami *Verticillium dahliae* w ilości ok. 500-1000 jednostek na szalkę, a następnie rozprowadzono na jej powierzchni rozcieńczone próbki gleby.

Selekcja najbardziej wartościowych szczepów bakterii oraz grzybów do biologicznej ochrony nasion roślin warzywnych.

Selekcja szczepów:

Selekcję szczepów przeprowadzono na podstawie:
- Wytwarzania metabolitów wtórnych, toksycznych dla grzybów z rodzaju *Fusarium* (metoda dwóch kultur na pożywkach ziemniaczano-glukozowej oraz ‘glebowej’ o składzie: woda 1000 g, ziemia sucha 5g, agar 14 g).
- Rozpuszczania związków fosforu pod postacią fosforanu wapnia $Ca_3(PO_4)_2$ (pożywka wg Pikovskiej).
- Syntezy sideroforów (pożywka CAS).
- Wiązania azotu atmosferycznego na pożywce półpłynnej Nfb (nitrogen free broth).
- Syntezy kwasu indolilooctowego (IAA) w pożywce płynnej Lysogenic Broth z dodatkiem 5 mM L-tryptofanu. Obecność IAA w pożywce oceniano w reakcji kolorymetrycznej z użyciem odczynnika Salkovskiego.
- Antagonizm do grzyba *Verticillium dahliae* oraz *Fusarium* spp na pożywkach agarowych: ziemniaczano glukozowej (Merck) oraz pożywce o składzie: gleba (sucha piaszczysta) 5.0 g, agar bakteriologiczny 15.0 g.

Przygotowanie konsorcjów mikrobiologicznych do uszlachetniania nasion roślin warzywnych, do stymulacji wzrostu i plonowania roślin oraz o działaniu ochronnym.

W ramach podzadania opracowano konsorcja mikrobiologiczne do uszlachetniania nasion gatunków roślin warzywnych, w oparciu o szczepy pożytecznych mikroorganizmów wyizolowane z rizosfery roślin warzywnych oraz będące w zasobach SYMBIO BANKU Pracowni Rizosfery Instytutu Ogrodnictwa. Opracowano trzy konsorcja:
(1) konsorcjum do stymulacji kiełkowania nasion i wschodów roślin warzywnych,
(2) inokulum do stymulacji wzrostu wegetatywnego i plonowania roślin
(3) konsorcjum o działaniu ochronnym, jako biologiczny czynnik ochrony roślin przed patogenami. Konsorcjum mikroorganizmów mające na celu uszlachetnianie nasion oraz poprawę kiełkowania nasion, zawiera szczepy bakterii syntetyzujące auksyny, siderofory i wiążące azot atmosferyczny. Konsorcjum do stymulacji wzrostu wegetatywnego i plonowania roślin zawiera bakterie syntetyzujące auksyny, siderofory, wiążące azot atmosferyczny i rozpuszczające związki fosforu. Konsorcjum o działaniu ochronnym zawiera bakterie syntetyzujące auksyny, siderofory, wiążące azot atmosferyczny i rozpuszczające związki fosforu oraz wykazujące antagonizm w stosunku do grzybów patogenicznych z rodzaju *Fusarium* (Tab. 2).

Analizy chemiczne - badania nad optymalizacją składu chemicznego pożywek

hodowlanych

Metodyka:

Do badań nad optymalizacją składu pożywek hodowlanych użyto danych pochodzących z profili biochemicznych bakterii (system Biolog) dotyczących efektywności utleniania poszczególnych związków węgla przez bakterie: *Klebsiella oxytoca* (szczep SYMBIO BANKU: NAzot2), *Pseudomonas* sp. (szczep SYMBIO BANKU: Pi25C), *Bacillus pumilus* (szczep SYMBIO BANKU: Sp82AA), *Bacillus weihenstephanensis* (szczep SYMBIO BANKU: Sp82AB), *Lysobacter* sp. (szczep SYMBIO BANKU: 60.3AA) oraz *Paenibacillus* sp. (szczep SYMBIO BANKU: AF74AA). Do badań użyto pożywek na bazie soli M9 o składzie: Na_2HPO_4 6.78 g, KH_2PO_4 3 g, NH_4Cl 1g, NaCl 0.5 g, woda 1000 g oraz następujących węglowodanów: fruktoza, glukoza, glicerol, sacharoza. Jako kontroli użyto pożywki tryptonowo sojowej (BTL, nr kat. P-0120). Do zaszczepienia płynnych pożywek użyto 48 godzinnych kolonii wyrosłych na pożywce tryptonowo sojowej (BTL, P-090). Zaszczepione kolby inkubowano przez 48 godzin, w temperaturze 30°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem. W celu oceny wpływu węglowodanów na szybkość wzrostu populacji bakterii, oszacowano ich liczbę metodą posiewów kolejnych rozcieńczeń. Do badania populacji użyto pożywki PCA (BTL, nr. kat. P-0037). Zainokulowane szalki inkubowano w temperaturze 26°C, przez 96 godzin. Przy oznaczaniu liczby bakterii w badanym materiale brano pod uwagę szalki, na których liczba kolonii zawierała się w przedziale 30-300.

Tabela 1. Wpływ składu pożywki na liczebność bakterii.

Szczep	***Klebsiella oxytoca* (NAzot 2)**					***Pseudomonas* sp (Pi25C)**				
Pożywka	Sole M9 + fruktoza (10 g na litr)	Sole M9 + glukoza (10 g na litr)	Sole M9 + glicerol (10 g na litr)	Sole M9 + sacharoza (10 g na litr)	Pożywka tryptonowo sojowa	Sole M9 + fruktoza (10 g na litr)	Sole M9 + glukoza (10 g na litr)	Sole M9 + glicerol (10 g na litr)	Sole M9 + sacharoza (10 g na litr)	Pożywka tryptonowo sojowa
Populacja uzyskana po 48 godzinach hodowli [x 10^9 jtk x ml^{-1}]	2.8	1.7	1.6	4.5	5.3	1.9	1.5	2.2	0.8	3.1

Szczep	**Sp82AA *Bacillus pumilus***			**Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis***			
Pożywka	Sole M9 + glukoza (10 g na litr)	Sole M9 + glicerol (10 g na litr)	Pożywka tryptonowo sojowa	Sole M9 + fruktoza (10 g na litr)	Sole M9 + glukoza (10 g na litr)	Sole M9 + glicerol (10 g na litr)	Pożywka tryptonowo sojowa
Populacja uzyskana po 48 godzinach hodowli [x 10^9 jtk x ml^{-1}]	0.87	0.76	3.15	1.1	1.6	1.3	3.15

Szczep	**60.3AA *Lysobacter* sp**					**AF74AA *Paenibacillus sp***				
Pożywka	Sole M9 + laktoza (10 g na litr)	Sole M9 + glukoza (10 g na litr)	Sole M9 + odtłuszczone mleko w proszku (10 g na litr)	Sole M9 + sacharoza (10 g na litr)	Pożywka tryptonowo sojowa	Sole M9 + fruktoza (10 g na litr)	Sole M9 + glukoza (10 g na litr)	Sole M9 + glicerol (10 g na litr)	Sole M9 + sacharoza (10 g na litr)	Pożywka tryptonowo sojowa
Populacja uzyskana po 48 godzinach hodowli [x 10^9 jtk x ml^{-1}]	0.45	0.34	0.65	0.34	0.78	1.05	0.74	0.96	0.34	1.2

Wnioski:

Najlepszą pożywką do hodowli bakterii była płynna pożywka tryptonowo sojowa.
Najlepszymi cukrami do hodowli były:
- sacharoza dla szczepu *Klebsiella oxytoca* (NAzot 2),
- glicerol i glukoza dla szczepu *Pseudomonas* sp (Pi25C),
- glukoza dla szczepu *Bacillus pumilus* (Sp82AA) i *Bacillus weihenstephanensis* (Sp82AB).

Najlepszymi dodatkami do hodowli były:
- odtłuszczone mleko w proszku dla szczepu *Lysobacter* sp (60.3AA),
- fruktoza i glicerol dla szczepu *Paenibacillus sp* (AF74AA).

Tabela 2. Właściwości bakterii rizosferowych wybranych do badań.

Analiza / Szczep	Antagonizm do *Fusarium* spp	Rozpuszczanie $Ca_3(PO_4)_2$	Synteza siedoforów	Wiązanie azotu atmosferycznego	Synteza IAA
Sp82AA *Bacillus pumilus*	-	-	+	+/-	-
Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*	-	-	+	+/-	-
NAzot2 *Klebsiella oxytoca*	-	+	+	+	+
Pi25C *Pseudomonas* sp	-	+	+	+/-	+
60.3AA *Lysobacter* sp	+	-	+	-	-
AF74AA *Paecilomyces* sp	+	-	+	-	-

'+' - uzyskano pozytywną reakcję; '-' - uzyskano negatywny wynik; '+/-' – uzyskano wynik jest niejednoznaczny.

Skład opracowanych konsorcjów mikrobiologicznych:

<u>Bakterie użyte do stymulacji kiełkowania:</u>

- *Bacillus pumilus* (nr szczepu SYMBIO BANKU: Sp82AA), wielkość populacji ok. 1.1 x 10^9 jtk/ml, przekazana objętość ok. 1000 ml.

- *Bacillus weihenstephanensis* (nr szczepu SYMBIO BANKU: Sp82AB), wielkość populacji ok. 0,9 x 10^9 jtk/ml, przekazana objętość ok. 1000 ml.

<u>Bakterie użyte do stymulacji wzrostu wegetatywnego roślin:</u>

- *Klebsiella oxytoca* (nr szczepu SYMBIO BANKU: NAzot2), wielkość populacji ok. 5.4 x 10^9 jtk/ml, przekazana objętość ok. 1000 ml.

- *Pseudomonas* sp. (nr szczepu SYMBIO BANKU: Pi25C), wielkość populacji ok. 2,1 x 10^9 jtk/ml, przekazana objętość ok. 1000 ml.

<u>Bakterie użyte do stymulacji wzrostu wegetatywnego roślin oraz jako biologicznego czynnika ochrony roślin:</u>

- *Klebsiella oxytoca* (nr szczepu SYMBIO BANKU: NAzot2), wielkość populacji ok. 4,9 x 10^9 jtk/ml, przekazana objętość ok. 1000 ml.

- *Lysobacter* sp. (nr szczepu SYMBIO BANKU: 60.3AA), wielkość populacji ok. 1 x 10^8 jtk/ml, przekazana objętość ok. 1000 ml.

- *Paecilomyces* sp. (nr szczepu SYMBIO BANKU: AF74AA), wielkość populacji ok. 1,3 x 10^8 jtk/ml, przekazana objętość ok. 1000 ml.

Przygotowanie zawiesin bakteryjnych do badań:

Szczepy hodowano na pożywce tryptonowo sojowej przez 48 godzin, w temperaturze 26°C. Następnie z tak przygotowanej hodowli przeniesiono ok. 10 µl komórek bakteryjnych do kolby Erlenmeyera zawierającej płynną pożywkę tryptonowo sojową. Zaszczepioną pożywkę z mikroorganizmami inkubowano w kolbach przez 48 godzin, w temperaturze 28°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem (szybkość wytrząsania 90 wychyleń na minutę). Następnie z zawiesin bakteryjnych pobrano próbki i oznaczono ich liczebność przy użyciu metody posiewu kolejnych rozcieńczeń na pożywki agarowe (pożywka Plate Count Agar). Zawiesiny bakteryjne umieszczono w plastikowych pojemnikach i przekazano do Pracowni Nasiennictwa Instytutu Ogrodnictwa.

Identyfikacja i oznaczenie ilościowe grzybów strzępkowych i bakterii rizosferowych jako komponentów mikrobiologicznych konsorcjów do zaprawiania nasion.

Metody Identyfikacji:

W skład nowoopracowanych konsorcjów weszły pojedyncze szczepy mikroorganizmów zgromadzone w SYMBIO BANK-u Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz nowe szczepy pożytecznych mikroorganizmów pozyskane z rizosfery roślin warzywnych. W ramach podzadania zostały one zidentyfikowane do rodzaju lub gatunku, przy użyciu konwencjonalnych metod mikrobiologicznych, technik biochemicznych oraz molekularnych. Identyfikację biochemiczną bakterii przeprowadzono na podstawie metabolizmu związków węgla przy użyciu systemu identyfikacji mikroorganizmów BIOLOG. Identyfikację molekularną przeprowadzono na podstawie analizy sekwencji genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. Scharakteryzowane i zidentyfikowane szczepy pożytecznych mikroorganizmów zostały włączone w skład nowoopracowanych konsorcjów mikrobiologicznych.
Uzyskane profile biochemiczne umożliwiły identyfikację wyselekcjonowanych szczepów bakterii, do rodzaju lub gatunku, jako komponentów nowoopracowanych konsorcjów mikrobiologicznych (Tab. 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Tabela 3. Profil biochemiczny szczepu SYMBIO BANKU **Sp82AA (***Bacillus pumilus*) **obejmujący utlenianie związków węgla oraz aktywność metaboliczną (wytwarzanie dehydrogenaz) w obecności antybiotyków, soli oraz przy różnych odczynach pH.** Materiał z którego wyizolowano szczep: pryzma kompostowa. Pożywka: tryptonowo sojowa

Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Wytwarzanie dehydrogenaz
Dextrin	+	Inosine	+	D-Gluconic Acid	-	pH 6	+
D-Maltose	-	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	-	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	-	Glucuronamide	+	1% NaCl	+

D-Cellobiose	+	D-Sorbitol	-	Mucic Acid	+	4% NaCl	+
Gentiobiose	+	D-Mannitol	+	Quinic Acid	+	8% NaCl	+
Sucrose	+	D-Arabitol	-	D-Saccharic Acid	-	Fusidic Acid	-
D-Turanose	-	myo-Inositol	-	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	+	Troleandomycin	-
Stachyose	+	Glycerol	+	Methyl Pyruvate	-	Rifamycin SV	-
D-Raffinose	+	D-Glucose-6-PO4	-	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	Minocycline	-
α-D-Lactose	-	D-Fructose-6-PO4	+	L-Lactic Acid	+	Lincomycin	-
D-Melibiose	+	D-Aspartic Acid	+	Citric Acid	+	Guanidine HCl	+
β-Methyl-D-Glucoside	+	D-Serine	-	α-Keto-Glutaric Acid	-	Vancomycin	+
D-Salicin	+	Gelatin	+	D-Malic Acid	+	Tetrazolium Violet	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	Glycyl-L-Proline	-	L-Malic Acid	+	Tetrazolium Blue	-
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	-	L-Alanine	+	Bromo-Succinic Acid	+	Nalidixic Acid	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	L-Arginine	+	Tween 40	+	Lithium Chloride	+
N-Acetyl Neuraminic Acid	-	L-Aspartic Acid	+	γ-Amino-Butryric Acid	+	Potassium Tellurite	+
α-D-Glucose	+	L-Glutamic Acid	+	α-Hydroxy-Butyric Acid	+	Aztreonam	+
D-Mannose	+	L-Histidine	-	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	-	Sodium Butyrate	+
D-Fructose	+	L-Pyroglutamic Acid	+	α-Keto-Butyric Acid	+	Sodium Bromate	+
D-Galactose	+	L-Serine	+	Acetoacetic Acid	-		
3-Methyl Glucose	-	Niaproof 4	-	Propionic Acid	-		
D-Fucose	-	Pectin	-	Acetic Acid	-		
L-Fucose	-	D-Galacturonic Acid	+	Formic Acid	-		
L-Rhamnose	-	L-Galactonic Acid Lactone	-				

Tabela 4. Profil biochemiczny szczepu SYMBIO BANKU **Sp82AB (***Bacillus weihenstephanensis*) **obejmujący utlenianie związków węgla oraz aktywność metaboliczną (wytwarzanie dehydrogenaz) w obecności antybiotyków, soli oraz przy różnych odczynach pH.**
Materiał z którego wyizolowano szczep: pryzma kompostowa. Pożywka: tryptonowo sojowa

Dextrin	+	Inosine	+	D-Gluconic Acid	+	pH 6	+
D-Maltose	+	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	+	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	+	Glucuronamide	+	1% NaCl	+
D-Cellobiose	+	D-Sorbitol	-	Mucic Acid	-	4% NaCl	+
Gentiobiose	-	D-Mannitol	-	Quinic Acid	+	8% NaCl	+
Sucrose	+	D-Arabitol	-	D-Saccharic Acid	-	Fusidic Acid	-
D-Turanose	-	myo-Inositol	-	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	Troleandomycin	-
Stachyose	-	Glycerol	+	Methyl Pyruvate	-	Rifamycin SV	+
D-Raffinose	-	D-Glucose-6-PO4	+	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	Minocycline	-
α-D-Lactose	-	D-Fructose-6-PO4	+	L-Lactic Acid	+	Lincomycin	-
D-Melibiose	-	D-Aspartic Acid	-	Citric Acid	+	Guanidine HCl	+

β-Methyl-D-Glucoside	+	D-Serine	+	α-Keto-Glutaric Acid	+	Vancomycin	-
D-Salicin	+	Gelatin	+	D-Malic Acid	+	Tetrazolium Violet	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	Glycyl-L-Proline	+	L-Malic Acid	+	Tetrazolium Blue	-
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	-	L-Alanine	+	Bromo-Succinic Acid	+	Nalidixic Acid	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	+	L-Arginine	+	Tween 40	-	Lithium Chloride	+
N-Acetyl Neuraminic Acid	-	L-Aspartic Acid	+	γ-Amino-Butryric Acid	+	Potassium Tellurite	+
α-D-Glucose	+	L-Glutamic Acid	+	α-Hydroxy-Butyric Acid	+	Aztreonam	+
D-Mannose	+	L-Histidine	+	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	-	Sodium Butyrate	-
D-Fructose	+	L-Pyroglutamic Acid	-	α-Keto-Butyric Acid	+	Sodium Bromate	+
D-Galactose	+	L-Serine	+	Acetoacetic Acid	+		
3-Methyl Glucose	-	Niaproof 4	-	Propionic Acid	+		
D-Fucose	+	Pectin	-	Acetic Acid	-		
L-Fucose	+	D-Galacturonic Acid	-	Formic Acid	+		
L-Rhamnose	+	L-Galactonic Acid Lactone	+				

Tabela 5. Profil biochemiczny szczepu SYMBIO BANKU NAzot2 (*Klebsiella oxytoca*) obejmujący utlenianie związków węgla oraz aktywność metaboliczną (wytwarzanie dehydrogenaz) w obecności antybiotyków, soli oraz przy różnych odczynach pH. Materiał z którego wyizolowano szczep: gleba rizosferowa winorośli. Pożywka: pożywka wg Burka

Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Wytwarzanie dehydrogenaz
Dextrin	+	Inosine	+	D-Gluconic Acid	+	pH 6	+
D-Maltose	+	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	+	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	+	Glucuronamide	+	1% NaCl	+
D-Cellobiose	+	D-Sorbitol	+	Mucic Acid	+	4% NaCl	+
Gentiobiose	+	D-Mannitol	+	Quinic Acid	+	8% NaCl	+
Sucrose	+	D-Arabitol	+	D-Saccharic Acid	+	Fusidic Acid	+
D-Turanose	-	myo-Inositol	+	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	+	Troleandomycin	+
Stachyose	+	Glycerol	+	Methyl Pyruvate	+	Rifamycin SV	+
D-Raffinose	+	D-Glucose-6-PO4	+	D-Lactic Acid Methyl Ester	+	Minocycline	-
α-D-Lactose	+	D-Fructose-6-PO4	+	L-Lactic Acid	+	Lincomycin	+
D-Melibiose	+	D-Aspartic Acid	-	Citric Acid	+	Guanidine HCl	+
β-Methyl-D-Glucoside	+	D-Serine	+	α-Keto-Glutaric Acid	-	Vancomycin	+
D-Salicin	+	Gelatin	+	D-Malic Acid	+	Tetrazolium Violet	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	Glycyl-L-Proline	+	L-Malic Acid	+	Tetrazolium Blue	+
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	+	L-Alanine	+	Bromo-Succinic Acid	-	Nalidixic Acid	+
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	L-Arginine	-	Tween 40	-	Lithium Chloride	+
N-Acetyl Neuraminic Acid	+	L-Aspartic Acid	+	γ-Amino-Butryric Acid	-	Potassium Tellurite	-
α-D-Glucose	+	L-Glutamic	+	α-Hydroxy-	-	Aztreonam	+

		Acid		Butyric Acid			
D-Mannose	+	L-Histidine	+	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	-	Sodium Butyrate	-
D-Fructose	+	L-Pyroglutamic Acid	-	α-Keto-Butyric Acid	-	Sodium Bromate	-
D-Galactose	+	L-Serine	+	Acetoacetic Acid	-		
3-Methyl Glucose	-	Niaproof 4	+	Propionic Acid	-		
D-Fucose	+	Pectin	+	Acetic Acid	-		
L-Fucose	+	D-Galacturonic Acid	+	Formic Acid	-		
L-Rhamnose	+	L-Galactonic Acid Lactone	+				

Tabela 6. Profil biochemiczny szczepu SYMBIO BANKU Pi25C (*Pseudomonas* sp.*)* obejmujący utlenianie związków węgla oraz aktywność metaboliczną (wytwarzanie dehydrogenaz) w obecności antybiotyków, soli oraz przy różnych odczynach pH. Materiał z którego wyizolowano szczep: gleba rizosferowa koniczyny. Pożywka: pożywka wg Pikovskiej

Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Wytwarzanie dehydrogenaz
Dextrin	+	Inosine	+	D-Gluconic Acid	+	pH 6	+
D-Maltose	-	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	-	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	+	Glucuronamide	+	1% NaCl	+
D-Cellobiose	-	D-Sorbitol	+	Mucic Acid	+	4% NaCl	+
Gentiobiose	+	D-Mannitol	+	Quinic Acid	+	8% NaCl	-
Sucrose	+	D-Arabitol	+	D-Saccharic Acid	+	Fusidic Acid	+
D-Turanose	-	myo-Inositol	+	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	+	Troleandomycin	+
Stachyose	-	Glycerol	+	Methyl Pyruvate	+	Rifamycin SV	+
D-Raffinose	-	D-Glucose-6-PO4	-	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	Minocycline	-
α-D-Lactose	-	D-Fructose-6-PO4	+	L-Lactic Acid	-	Lincomycin	+
D-Melibiose	-	D-Aspartic Acid	-	Citric Acid	-	Guanidine HCl	+
β-Methyl-D-Glucoside	-	D-Serine	+	α-Keto-Glutaric Acid	-	Vancomycin	+
D-Salicin	-	Gelatin	-	D-Malic Acid	+	Tetrazolium Violet	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	Glycyl-L-Proline	-	L-Malic Acid	+	Tetrazolium Blue	+
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	-	L-Alanine	+	Bromo-Succinic Acid	+	Nalidixic Acid	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	L-Arginine	+	Tween 40	+	Lithium Chloride	+
N-Acetyl Neuraminic Acid	-	L-Aspartic Acid	+	γ-Amino-Butryric Acid	+	Potassium Tellurite	+
α-D-Glucose	+	L-Glutamic Acid	+	α-Hydroxy-Butyric Acid	+	Aztreonam	+
D-Mannose	+	L-Histidine	+	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	+	Sodium Butyrate	+
D-Fructose	+	L-Pyroglutamic Acid	+	α-Keto-Butyric Acid	+	Sodium Bromate	+
D-Galactose	+	L-Serine	+	Acetoacetic Acid	+		
3-Methyl Glucose	-	Niaproof 4	+	Propionic Acid	+		
D-Fucose	+	Pectin	+	Acetic Acid	+		
L-Fucose	+	D-Galacturonic	+	Formic Acid	+		

		Acid					
L-Rhamnose	-	L-Galactonic Acid Lactone	+				

Tabela 7. Profil biochemiczny szczepu SYMBIO BANKU 60.3AA (*Lysobacter* sp.*)* obejmujący utlenianie związków węgla oraz aktywność metaboliczną (wytwarzanie dehydrogenaz) w obecności antybiotyków, soli oraz przy różnych odczynach pH. Materiał z którego wyizolowano szczep: gleba rizosferowa truskawki odm Senga Sengana. Pożywka: pożywka z chityną koloidalną

Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Wytwarzanie dehydrogenaz
Dextrin	+	Inosine	-	D-Gluconic Acid	+	pH 6	+
D-Maltose	+	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	-	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	+	Glucuronamide	-	1% NaCl	+
D-Cellobiose	+	D-Sorbitol	+	Mucic Acid	+	4% NaCl	-
Gentiobiose	+	D-Mannitol	-	Quinic Acid	+	8% NaCl	-
Sucrose	+	D-Arabitol	+	D-Saccharic Acid	+	Fusidic Acid	+
D-Turanose	+	myo-Inositol	+	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	+	Troleandomycin	+
Stachyose	-	Glycerol	+	Methyl Pyruvate	+	Rifamycin SV	+
D-Raffinose	+	D-Glucose-6-PO4	+	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	Minocycline	-
α-D-Lactose	+	D-Fructose-6-PO4	+	L-Lactic Acid	-	Lincomycin	+
D-Melibiose	+	D-Aspartic Acid	-	Citric Acid	-	Guanidine HCl	-
β-Methyl-D-Glucoside	+	D-Serine	-	α-Keto-Glutaric Acid	+	Vancomycin	-
D-Salicin	+	Gelatin	+	D-Malic Acid	-	Tetrazolium Violet	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	Glycyl-L-Proline	+	L-Malic Acid	+	Tetrazolium Blue	+
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	+	L-Alanine	+	Bromo-Succinic Acid	+	Nalidixic Acid	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	+	L-Arginine	+	Tween 40	+	Lithium Chloride	+
N-Acetyl Neuraminic Acid	-	L-Aspartic Acid	+	γ-Amino-Butryric Acid	+	Potassium Tellurite	+
α-D-Glucose	+	L-Glutamic Acid	+	α-Hydroxy-Butyric Acid	+	Aztreonam	+
D-Mannose	+	L-Histidine	-	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	+	Sodium Butyrate	+
D-Fructose	+	L-Pyroglutamic Acid	-	α-Keto-Butyric Acid	-	Sodium Bromate	+
D-Galactose	+	L-Serine	+	Acetoacetic Acid	-		
3-Methyl Glucose	-	Niaproof 4	-	Propionic Acid	-		
D-Fucose	+	Pectin	-	Acetic Acid	+		
L-Fucose	+	D-Galacturonic Acid	-	Formic Acid	+		
L-Rhamnose	+	L-Galactonic Acid Lactone	+				

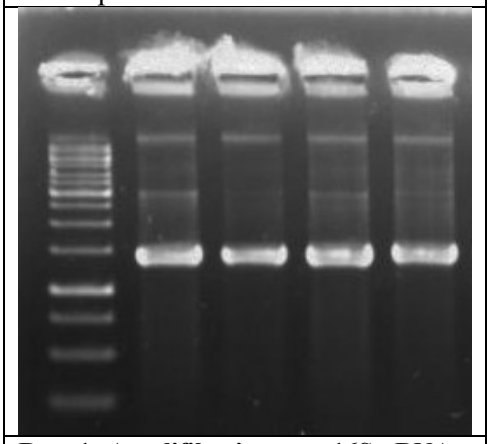
Tabela 8. Profil biochemiczny szczepu SYMBIO BANKU AF74AA (*Paecilomyces* sp.) obejmujący utlenianie związków węgla oraz aktywność metaboliczną (wytwarzanie dehydrogenaz) w obecności antybiotyków, soli oraz przy różnych odczynach pH. Materiał z którego wyizolowano szczep: podłoże wzrostowe 'Textil'. Pożywka: tryptonowo sojowa

substrat	utlenianie	substrat	utlenianie	substrat	utlenianie	substrat	wytwarzanie dehydrogenaz

Dextrin	+	Inosine	-	D-Gluconic Acid	-	pH 6	+
D-Maltose	+	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	-	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	-	Glucuronamide	+	1% NaCl	+
D-Cellobiose	+	D-Sorbitol	+	Mucic Acid	-	4% NaCl	-
Gentiobiose	+	D-Mannitol	+	Quinic Acid	+	8% NaCl	-
Sucrose	+	D-Arabitol	+	D-Saccharic Acid	-	Fusidic Acid	-
D-Turanose	+	myo-Inositol	+	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	+	Troleandomycin	+
Stachyose	+	Glycerol	+	Methyl Pyruvate	-	Rifamycin SV	-
D-Raffinose	+	D-Glucose-6-PO4	+	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	Minocycline	-
α-D-Lactose	+	D-Fructose-6-PO4	-	L-Lactic Acid	-	Lincomycin	-
D-Melibiose	+	D-Aspartic Acid	-	Citric Acid	-	Guanidine HCl	-
β-Methyl-D-Glucoside	+	D-Serine	-	α-Keto-Glutaric Acid	-	Vancomycin	-
D-Salicin	+	Gelatin	+	D-Malic Acid	-	Tetrazolium Violet	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	Glycyl-L-Proline	-	L-Malic Acid	-	Tetrazolium Blue	-
N-Acetyl-β-D-Mannosamine	-	L-Alanine	+	Bromo-Succinic Acid	-	Nalidixic Acid	+
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	L-Arginine	+	Tween 40	-	Lithium Chloride	+
N-Acetyl Neuraminic Acid	-	L-Aspartic Acid	-	γ-Amino-Butryric Acid	-	Potassium Tellurite	-
α-D-Glucose	+	L-Glutamic Acid	+	α-Hydroxy-Butyric Acid	+	Aztreonam	+
D-Mannose	+	L-Histidine	+	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	-	Sodium Butyrate	-
D-Fructose	+	L-Pyroglutamic Acid	+	α-Keto-Butyric Acid	-	Sodium Bromate	+
D-Galactose	+	L-Serine	-	Acetoacetic Acid	-		
3-Methyl Glucose	-	Niaproof 4	-	Propionic Acid	-		
D-Fucose	+	Pectin	-	Acetic Acid	+		
L-Fucose	+	D-Galacturonic Acid	+	Formic Acid	-		
L-Rhamnose	-	L-Galactonic Acid Lactone	-				

Identyfikacja szczepów bakterii z użyciem technik molekularnych

W celu izolacji, identyfikacji, charakterystyki i selekcji pożytecznych mikroorganizmów pobrano próby gleby z rizosfery i korzeni roślin marchwi i pomidora. Wyizolowane szczepy bakterii kultywowano na pożywkach mikrobiologicznych w celu scharakteryzowania ich właściwości oraz wyselekcjonowania szczepów skutecznych w biologicznej ochronie nasion. Do identyfikacji rodzajów lub gatunków bakterii zastosowano technikę opartą na analizie zróżnicowania mikroorganizmów w obrębie genu rybosomalnego 16S rRNA. Technika ta umożliwia identyfikację i rozróżnianie rodzajów i gatunków bakterii oraz ocenę ich podobieństwa genetycznego (Mulet et al., 2011, Susilowati et al., 2010). Przydatność tej techniki do identyfikacji bakterii wynika z faktu, że dostępna publicznie baza danych sekwencji małej podjednostki genu rybosomalnego 16S rRNA bakterii aktualnie zawiera ponad 4 miliony sekwencji (Yarza i in. 2014).



Rys. 1. Amplifikacja genu 16S rRNA - produkty PCR wielkości 1492 pz uzyskane w reakcji ze starterami 27f/1492r. 1 kb – marker wielkości.

Materiał i metody

Identyfikację szczepów bakterii przy użyciu technik molekularnych przeprowadzono dla wyselekcjonowanych 4 izolatów: Sp82AA, NAzot2, Pi25C oraz 60.3AA. DNA izolowano z kolonii bakteryjnych, przy użyciu zestawu komercyjnego GeneMatrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx) do izolacji DNA z bakterii i drożdży. Koncentrację DNA zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Do analiz sporządzono rozcieńczenia 10ng/µl DNA.

Amplifikację genu 16S rRNA przeprowadzono z użyciem starterów 27/1492r (Lane 1991). Obecność produktów PCR sprawdzano w 1,2% żelu agarozowym. Sekwencjonowanie przeprowadzono komercyjnie w Genomed S.A. Identyfikację szczepów bakterii przeprowadzono na podstawie porównania uzyskanych sekwencji z danymi zgromadzonymi w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

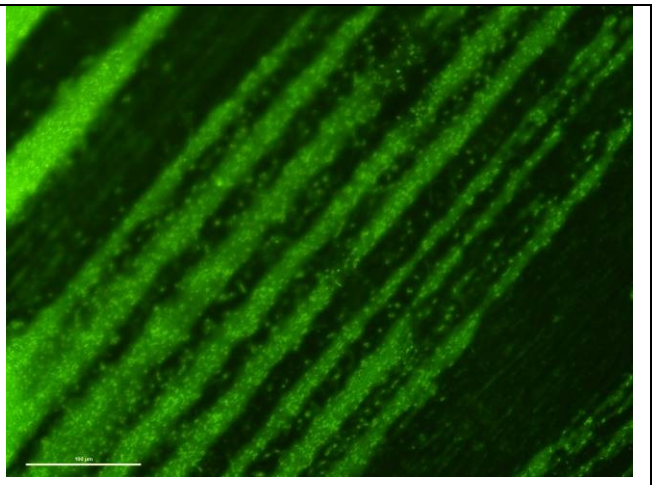
Wyniki

W wyniku amplifikacji genu 16S rRNA uzyskano produkt wielkości 1490pz. Uzyskane sekwencje wykazały 99% podobieństwo do sekwencji w bazie NCBI, co umożliwiło identyfikację rodzaju lub gatunku testowanych szczepów bakterii (Tab. 9). Wyniki identyfikacji szczepów bakterii uzyskane techniką analizy genu 16S rRNA były zgodne z wynikami analizy biochemicznej. Ponadto, wyniki analiz biochemicznych umożliwiły identyfikację gatunków szczepów bakterii.

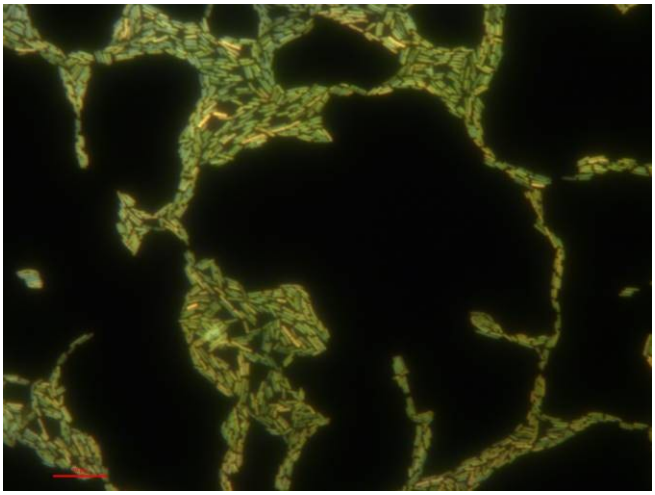
Tabela 9. Identyfikacja izolatów bakterii w oparciu o porównanie sekwencji genu 16S rRNA z danymi NCBI (% największego podobieństwa do sekwencji w bazie danych NCBI)

Izolat bakterii	Podobieństwo do sekwencji w bazie NCBI (%)	Identyfikacja
Sp82AA	**99**	***Bacillus* sp.**
NAzot2	**99**	***Klebsiella oxytoca***
Pi25C	**99**	***Pseudomonas* sp.**
60.3AA	**99**	***Lysobacter sp.***

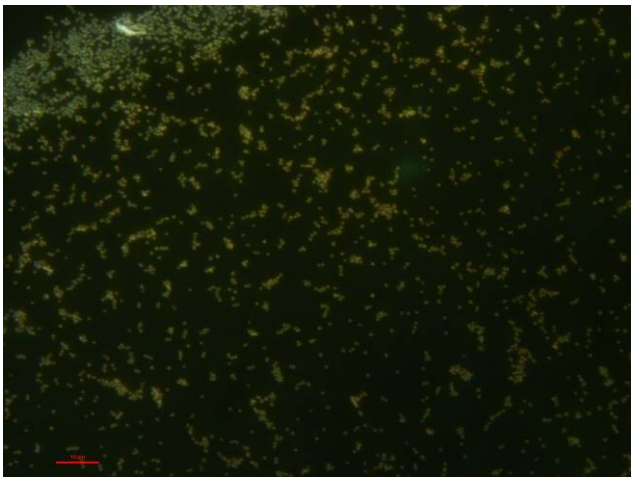
Dokumentacja fotograficzna szczepów bakterii wchodzących w skład nowoopracowanych konsorcjów mikrobiologicznych



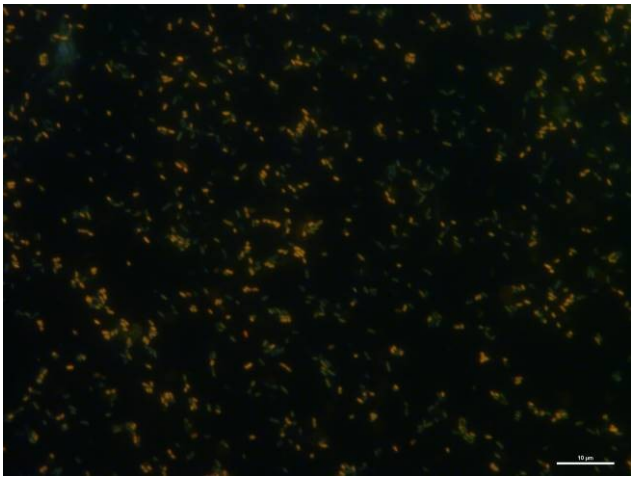
Fot. 1. nr AA. Komórki bakterii *Bacillus pumilus* (Szczep SYMBIO BANKU: Sp82AA). Preparat barwiony oranżem akrydyny



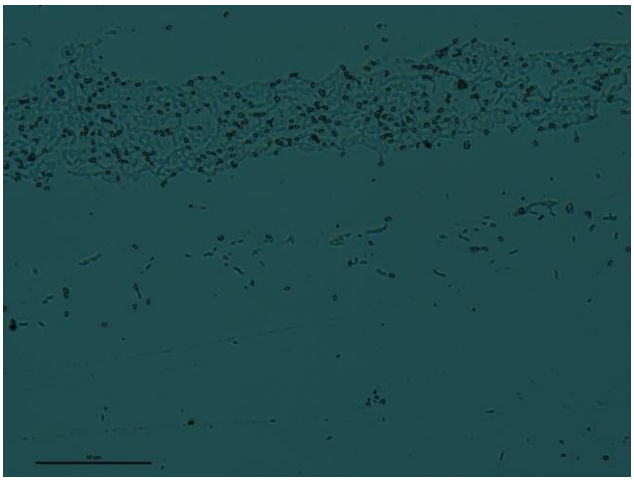
Fot. 2. nr AB. Komórki bakterii *Bacillus* sp. (Szczep SYMBIO BANKU: Sp82AB). Preparat barwiony oranżem akrydyny



Fot. 3. nr AC. Komórki bakterii *Klaebsiella oxytoca* (Szczep SYMBIO BANKU: NAzot2). Preparat barwiony oranżem akrydyny



Fot. 4. nr AD. Komórki bakterii *Pseudomonas* sp. (Szczep SYMBIO BANKU: Pi25C). Preparat barwiony oranżem akrydyny



Fot. 5. nr AE. Komórki bakterii *Paenibacillus* sp. (Szczep SYMBIO BANKU: AF74AA). Preparat utrwalony alkoholem metylowym i obserwowany pod mikroskopem z użyciem kontrastu fazowego

Ocena skuteczności ochronnego działania nowoopracowanych konsorcjów mikrobiologicznych do biologicznego zaprawiania nasion roślin warzywnych - doświadczenia laboratoryjne.

Metodyka

Do badań *in vitro* nad antagonizmem bakterii w stosunku do patogenicznych grzybów z rodzajów *Verticillium* i *Fusarium* zastosowano dwa szczepy bakterii rizosferowych: *Paenibacillus* sp. (szczep SYMBIO BANKU: AF74AA) i *Lysobacter* sp. (szczep SYMBIO BANKU: 60.3AA) oraz trzy szczepy grzybów patogenicznych: *Verticillium dahliae* (szczep użyczony przez Pracownię Fitopatologii Sadowniczej Instytutu Ogrodnictwa), *Fusarium* sp. (szczepy SYMBIO BANKU: *Fusarium* AH) i *Fusarium oxysporum* (Phyto BD).

Bakterie do badań kultywowano na pożywkach: ziemniaczano-glukozowej oraz glebowej (skład pożywki glebowej: 5 g suchej piaszczystej gleby, agar 15 g, woda destylowana 1000 g), w temperaturze 26°C, przez 72 godziny lub przez 168 godzin w atmosferze beztlenowej w anaerostatach. Grzyby do testów kultywowano na pożywkach ziemniaczano-glukozowej oraz glebowej w temperaturze 26°C przez 168 godzin. Na godzinę przed badaniem antagonizmu bakterie zniszczono przy użyciu chloroformu tak, aby w żelu agarowym pozostały wyprodukowane przez nie metabolity. Następnie szalki z pożywkami agarowymi: ziemniaczano-glukozową oraz glebową zainokulowano punktowo grzybami patogenicznymi: *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum* oraz *Verticillium dahliae*. Na krańce tak przygotowanych szalek wyłożono krążki agarowe wycięte z pożywek, na których hodowano bakterie. Następnie szalki inkubowano przez 168 godzin, w temperaturze 26°C. Po inkubacji określano strefy zahamowania wzrostu testowanych grzybów (w mm), (Tab.10-12).

Wyniki

Tabela 10. Hamowanie wzrostu patogenicznego grzyba *Verticillium dahliae* przez bakterie rizosferowe.

Szczepy bakterii	Pożywka ziemniaczano glukozowa, normalna koncentracja tlenu [mm]	Pożywka glebowa, normalna koncentracja tlenu [mm]	Pożywka ziemniaczano glukozowa, warunki beztlenowe [mm]	Pożywka glebowa, normalna koncentracja tlenu [mm]
Lysobacter sp. (60.3AA)	8,3 ± 1,5	12.5 ± 1.5	6,5 ± 1	5.7 ± 1
Paenibacillus sp (AF74AA)	9,3 ± 1,5	7.5 ± 1.5	6,5 ± 1	6.8 ± 1

Tabela 11. Hamowanie wzrostu patogenicznego grzyba *Fusarium* sp. (szczep: *Fusarium* AH) przez bakterie rizosferowe.

Szczepy bakterii	Pożywka ziemniaczano glukozowa, normalna koncentracja tlenu [mm]	Pożywka glebowa, normalna koncentracja tlenu [mm]	Pożywka ziemniaczano glukozowa, warunki beztlenowe [mm]	Pożywka glebowa, normalna koncentracja tlenu [mm]
Lysobacter sp. (60.3AA)	8,3 ± 1,5	12.3 ± 1.5	3.5 ± 1.5	3.6 ± 1
Paenibacillus sp (AF74AA)	9,3 ± 1,5	7.7 ± 1.5	5.3 ± 1	4.3 ± 2

Tabela 12. Hamowanie wzrostu patogenicznego grzyba *Fusarium oxysporum*) (szczep: Phyto BD) przez bakterie rizosferowe.

Szczepy bakterii	Pożywka ziemniaczano glukozowa, normalna koncentracja tlenu [mm]	Pożywka glebowa, normalna koncentracja tlenu [mm]	Pożywka ziemniaczano glukozowa, warunki beztlenowe [mm]	Pożywka glebowa, normalna koncentracja tlenu [mm]
Lysobacter sp. (60.3AA)	5,3 ± 1	4.0 ± 1.5	2 ± 1	2 ± 0.5
Paenibacillus sp (AF74AA)	6.3 ± 0.5	6.3 ± 1	4.3 ± 0.5	4.0 ± 0.5

Na podstawie przeprowadzonych testów stwierdzono zdolność testowanych szczepów bakterii do hamowania wzrostu grzybów patogenicznych *Verticillium dahliae* oraz *Fusarium* spp. w zróżnicowanych warunkach środowiskowych, takich, jak dostęp tlenu i substancji odżywczych. Zaobserwowane korzystne właściwości testowanych szczepów bakterii stanowiły podstawę do włączenia ich do nowoopracowanego konsorcjum mikrobiologicznego do biologicznego zaprawiania nasion roślin warzywnych.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał ochronny wyselekcjonowanych szczepów bakterii rizosferowych w warunkach laboratoryjnych. Szczepy te mają zdolność do hamowania wzrostu grzybów patogenicznych *Verticillium dahliae* oraz *Fusarium* spp., przy różnej dostępności tlenu i substancji odżywczych. Wymagane są dalsze badania nad optymalizacją składu mikrobiologicznego konsorcjum. Niezbędna jest optymalizacja składu nośników dla

konsorcjum mikroorganizmów o działaniu ochronnym, w celu zapewnienia wysokiej stabilności i przeżywalności mikroorganizmów o korzystnych właściwościach ochrony roślin. Proponowane jest zastosowanie nowych szczepów o działaniu ochronnym i naturalnych nośników pochodzenia roślinnego, w celu zwiększenia przeżywalności i aktywności metabolicznej szczepów bakterii o działaniu ochronnym.

Ocena skuteczności ochronnego działania nowoopracowanych konsorcjów mikrobiologicznych na kiełkowanie nasion pomidor - doświadczenia laboratoryjno-szklarniowe.

Metodyka:

Do badań nad biologicznymi czynnikami ochrony roślin przed grzybami *Fusarium* spp. użyto konsorcjum składające się z dwóch szczepów bakterii rizosferowych *Paenibacillus* sp (szczep SYMBIO BANKU: AF74AA) oraz *Lysobacter* sp. (szczep SYMBIO BANKU: 60.3AA). Do badań bakterie kultywowano w 50% bulionie tryptonowo sojowym przez 72 godziny, w łaźni wodnej z wytrząsaniem (temperatura 30°C, 100 wychyleń na minutę). Następnie odseparowano komórki bakterii przez odwirowanie (szybkość 6000 obrotów na minutę) i zawieszono w jałowej wodzie wodociągowej. Nasiona pomidora zainokulowano pożytecznymi mikroorganizmami przez zanurzenie na 30 minut w zawiesinie bakteryjnej, o koncentracji ok. 1.3 x 10^8 jtk x ml^{-1} (szczep AF74AA) oraz 3.8 x 10^8 jtk x ml^{-1} (szczep 60.3AA).

Podłoże do wzrostu roślin (torf wysoki, pH: 5.5 – 6.5) umieszczono w kolbach Erlenmeyera, wyjałowiono w autoklawie, zainokulowano grzybem *Fusarium* sp. (szczep SYMBIO BANKU: *Fusarium* AH) i inkubowano przez 14 dni w temperaturze ok. 20 ± 2°C. Następnie tak przygotowane podłoże umieszczono w paletach rozsadowych i wysiano na nie nasiona pomidora. Każdą kombinację doświadczalną stanowiło 50 nasion. W doświadczeniu użyto dwóch kombinacji kontrolnych: nasiona niezainokulowane pożytecznymi mikroorganizmami wysiane na wyjałowione podłoże wzrostowe (kontrola pozytywna) oraz na podłoże zainokulowane szczepem patogenicznego grzyba *Fusarium* AH (kontrola negatywna). Palety rozsadowe umieszczono w szklarni, w komorze wzrostowej na okres trzech tygodni w temperaturze ok. 24°C. W teście oceniano liczbę wykiełkowanych nasion na podłożach wzrostowych.

Wyniki

Tabela 13. Wpływ bakterii rizosferowych na ochronę nasion pomidora przed porażeniem przez grzyb *Fusarium* sp.

Kombinacja	Kontrola pozytywna [Liczba skiełkowanych nasion (%)]	Kontrola negatywna [Liczba skiełkowanych nasion (%)]	Szczep 60.3AA [Liczba skiełkowanych nasion (%)]	Szczep AF74AA [Liczba skiełkowanych nasion (%)]
Wykiełkowane nasiona	22 (92%)	0 (0%)	6 (25%)	8 (33%)

Zdolność kiełkowania nasion pomidora niezainokulowanych szczepami bakterii i wysianych na jałowe podłoże wzrostowe wynosiła 92%. W glebie zainokulowanej patogenicznym grzybem *Fusarium* sp. (szczep *Fusarium* AH) oraz przy braku traktowania nasion pożytecznymi szczepami bakterii *Paenibacillus* sp. i *Lysobacter* sp. nie zaobserwowano kiełkowania nasion pomidora. Szczepy bakterii *Paenibacillus* sp. (szczep AF74AA) oraz *Lysobacter* sp. (szczep 60.3AA) istotnie ograniczyły negatywy wpływ patogenicznego grzyba z rodzaju *Fusarium* na kiełkowanie nasion pomidora, odpowiednio o 33% i 25%.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał wyselekcjonowanych bakterii rizosferowych w ochronie nasion pomidora przed porażeniem przez grzyb *Fusarium* sp. w warunkach szklarniowych. Wymagane są dalsze badania nad optymalizacją nośników dla konsorcjum mikroorganizmów o działaniu ochronnym, w celu zapewnienia wysokiej stabilności i przeżywalności mikroorganizmów o korzystnych właściwościach ochrony roślin. Proponowane jest zastosowanie organicznych nośników na bazie naturalnych ekstraktów i innych naturalnych nośników pochodzenia roślinnego, w celu zwiększenia przeżywalności i aktywności metabolicznej szczepów bakterii o działaniu ochronnym.
Doświadczenia powinny obejmować badania skuteczności biopreparatów o działaniu ochronnym w warunkach towarowej uprawy szklarniowej roślin warzywnych.

Ocena skuteczności ochronnego działania ochronnego konsorcjum mikrobiologicznego na siewki marchwi odmiany Napoli F1 - doświadczenie polowe.

Metodyka

W sezonie 2016 roku na polu doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa przeprowadzono doświadczenie nad zastosowaniem bakterii rizosferowych jako biologicznego czynnika ochrony roślin marchwi odmiany Napoli F1. Zastosowano bakterie rizosferowe *Paenibacillus* sp. (szczep SYMBIO BANKU: AF74AA) oraz *Lysobacter* sp. (szczep SYMBIO BANKU: 60.3AA). Nasiona marchwi odmiany Napoli F1 zanurzono w zawiesinie bakteryjnej przez 30 minut. W każdej kombinacji doświadczenia wysiano po 50 sztuk nasion, w trzech powtórzeniach. Następnie na miejsca, w których wysiano zainokulowane nasiona zaaplikowano zawiesinę zarodników konidialnych i strzępek grzyba *Fusarium* spp. (szczep SYMBIO BANKU: *Fusarium* AH), w ilości 20 ml/nasiono, o koncentracji 1,1 x 10^6 jtk x ml^{-1}). W kombinacji kontrolnej wysiano nasiona zainokulowane zawiesiną zarodników konidialnych i strzępek grzyba *Fusarium* spp., nieinokulowane bakteriami rizosferowymi. W doświadczeniu określano liczbę roślin wykazujących symptomy porażenia roślin przez szczep grzyba *Fusarium* spp. (powodującego więdnięcie roślin).

Rośliny marchwi odmiany Napoli F1traktowane bakteriami rizosferowymi o działaniu ochronnym.

Wyniki

Tabela 14. Wpływ bakterii rizosferowych o działaniu ochronnym na porażenie roślin marchwi odmiany 'Napoli' F1 przez grzyb *Fusarium* spp.

Kombinacja	Liczba nasion [szt]	Liczba wykiełkowanych nasion [szt.]	Procentowy udział skiełkowanych nasion [%]	Liczba roślin z symptomami porażenia [szt.]	Procentowy udział porażonych roślin [%]
Nasiona kontrolne	50	42	84	2	4.8
Nasiona inokulowane *Paenibacillus* sp (AF74AA)	50	44	88	1	2.3
Nasiona inokulowane *Lysobacter* sp (60.3AA)	50	42	84	1	2.3

Zdolność kiełkowania nasion marchwi odmiany Napoli F1 wynosiła 85%. W doświadczeniu nie zaobserwowano masowego porażenia roślin po inokulacji grzybem, co mogło być związane z niekorzystnymi warunkami środowiskowymi i pogodowymi (temperatura, wilgotność) występującymi w warunkach polowych.
Występowanie symptomów fuzariozy obserwowano na roślinach stanowiących 2,3% wszystkich roślin marchwi wyrosłych z nasion inokulowanych bakteriami rizosferowymi. Kontrolne rośliny marchwi, nieinokulowane bakteriami rizosferowymi o działaniu ochronnym, były w większym stopniu porażone przez grzyby z rodzaju *Fusarium* i stanowiły 4.8%, w stosunku do wszystkich roślin.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał ochronny wyselekcjonowanych bakterii rizosferowych przed fuzariozą w uprawie marchwi odmiany Napoli F1 w warunkach polowych. Wymagane są dalsze badania nad optymalizacją składu mikrobiologicznego i nośników dla konsorcjum mikroorganizmów o działaniu ochronnym, w celu zapewnienia wysokiej stabilności i przeżywalności mikroorganizmów o korzystnych właściwościach ochrony roślin. Proponowane jest zastosowanie organicznych nośników na bazie proszku lub ekstraktu z alg i innych naturalnych nośników pochodzenia roślinnego, w celu zwiększenia przeżywalności i aktywności metabolicznej szczepów bakterii o działaniu ochronnym. Doświadczenia powinny obejmować badania skuteczności biopreparatów o działaniu ochronnym w warunkach towarowej uprawy polowej roślin warzywnych.

LITERATURA

Alexander B., Zuberer D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertilifly of Soil (1991) 12:39-45.

Demirci F, Denizhan E. 2010. *Paecilomyces lilacinus*, a potential biocontrol agent on apple rust mite *Aculus schlechtendali* and interactions with some fungicides in vitro. Phytoparasitica 38: 125–132.

Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson RJ, Mohamoud Y, Khouri H, Roesch LFW, Krogfelt KA, Struve C, Triplett EW, Methé BA. 2008. Complete genome sequence of the N_2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice.

PLoS Genet 4. e1000141: 1-18.

Gómez Expósito R, Postma J, Raaijmakers JM, De Bruijn I. 2015. Diversity and activity of *Lysobacter* species from disease suppressive soils. Frontiers in Microbiology 6: 1243.

Gould W. D., Hagedorn C., Bardinelli T. R., Zablotowicz R. M., 1984. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent Pseudomonads from various habitats. Applied and Environmental Microbiology 49, 28-32.

Iniguez AL, Dong Y, Triplett EW. 2004. Nitrogen Fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. Molecular Plant-Microbe Interactions 17: 1078–1085.

Islam MT, Hashidoko Y, Deora A, Ito T, Tahara S. 2005. Suppression of Damping-Off Disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne *Peronosporomycetes*. Applied and Environmental Microbiology 71: 3786–3796.

Khan Z, Kim SG, Jeon YH, Khan HU, Son SH, Kim YH. 2008. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. Bioresource Technology 99: 3016–3023.

Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN, 1980. Pseudomonas siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. Current Microbiology 4: 317–320.

Kloepper JW, Ryu C-M, Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259–1266.

Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115–175. In: Stackebrandt E. and M. Goodfellow (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systermatics*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom.

Lim HK, Syed MA, Shukor MY. 2012. Reduction of molybdate to molybdenum blue by *Klebsiella* sp. strain hkeem. Journal of Basic Microbiology 52: 296–305.

Luján AM, Gómez P, Buckling A. 2015. Siderophore cooperation of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in soil. Biology Letters 11 (20140934): 1–4.

Maiti A, Das S, Bhattacharyya N. 2013. High gelatinase activity of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria *Bacillus weihenstephanensis* strain AN1. Journal of Pharmacy Research 6: 199–204.

Manikandan, R., Raguchander, T., 2014. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* retardation through induction of defensive response in tomato plants using a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1). European Journal of Plant Pathology 140, 469–480.

Mnif I, Fendri R, Ghribi D. 2015. Biosorption of Congo Red from aqueous solution by *Bacillus weihenstephanensis* RI12; effect of SPB1 biosurfactant addition on biodecolorization potency. Water Science and Technology 72: 865–874.

Mulet M., David Z., Nogales B., Bosch R., Lalucat J., Garcia-Valdes E. 2011. *Pseudomonas* diversity on crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the *Prestige* oil spill. Appl Environ Microb 2011: 1076-1085.

Rodríguez Cáceres E. A. 1982. Improved Medium for Isolation of Azospirillum spp. Appl Environ Microbiol. 1982 Oct; 44(4): 990–991.

Shi W-B, Feng M-G. 2004. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. Biological Control 30: 165–173.

Susilowati A., Wayhudi A.T., Lestar Y., Wiyono S., Suwanto A. 2010. Genetic diversity of antifungi-producing rhizobacteria of *Pseudomonas* sp. isolated from rhizosphere of soybean plant. Microbiology+ 4: 33-38.

Wang X, Mavrodi DV, Ke L, Mavrodi OV, Yang M, Thomashow LS, Zheng N, Weller DM, Zhang J. 2015. Biocontrol and plant growth-promoting activity of rhizobacteria from Chinese

fields with contaminated soils. Microbial Biotechnology 8: 404–418.

Xie, H., Pasternak, J.J., Glick, R.B., 1996. Isolation and characterization of mutants of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. Current Microbiology 32: 67–71.

Xie Y, Wright S, Shen Y, Du L. 2012. Bioactive natural products from *Lysobacter*. Natural Product Reports 29: 1277–1287.

Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F. O., Ludwig W., Schleifer K. H., Whitman W.N., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. Nature Reviews Microbiology, 12(9), 635-645.

Podzadanie 2. Mikrobiologiczne zaprawianie nasion w aspekcie poprawy jakości, zdrowotności oraz procesów metabolicznych nasion i siewek

WSTĘP

W uprawach roślin ogrodniczych na nasiona istnieje konieczność ochrony roślin nasiennych (nasienników) i nasion w fazie wegetatywnej i generatywnej, co w praktyce oznacza stosowanie zabiegów ochrony w pierwszym i drugim roku uprawy (u roślin dwuletnich) lub wieloletnie (u roślin wieloletnich). W uprawach w systemach ekologicznych problemy w produkcji nasion wynikają również z braku skutecznych biologicznych zapraw nasiennych, jak też środków biologicznych do ochrony roślin nasiennych przed agrofagami. Choroby infekcyjne dziesiątkują plony roślin nasiennych i nasion, w związku z tym ich produkcja staje się coraz mniej opłacalna ekonomicznie (Janas 2005, 2011, 2013, Sobolewski i in. 2010). W trakcie wegetacji rośliny kolonizowane są przez mikroorganizmy na całej swojej powierzchni, na liściach, korzeniach, nasionach oraz międzykomórkowo i wewnątrzkomórkowo w tkankach i w wiązkach przewodzących. Każde z tych miejsc charakteryzuje się innymi warunkami i innymi wydzielinami będącymi dla wybranych mikroorganizmów źródłem substancji odżywczych albo czynnikiem hamującym ich rozwój (Whipps et all 2008).

W uprawach nasiennych największe znaczenie ma zbiorowisko mikroorganizmów fyllosfery oraz spermosfery. Patogeny zasiedlające nasiona przenoszą się bowiem z materiałem siewnym na rośliny potomne, powodując rozległe epifitozy, trudne do zwalczania. Fyllosfera (nadziemna część rośliny) jest siedliskiem bytowania mikroorganizmów o bardzo niekorzystnych dla ich rozwoju warunkach (Lindow, Brandl 2003). Zbiorowiska drobnoustrojów zasiedlających fyllosferę charakteryzują się dużym zróżnicowaniem zwłaszcza pod względem liczebności. Najwięcej jest tu bakterii, ich liczbę oszacowano na 106–108 komórek na centymetr kwadratowy. Znajdują się tu również również grzyby strzępkowe, drożdże, rzadziej glony, algi i nicienie (Bending et all 2008, Lindow, Brandl 2003, Whipps et all 2008). Mikroorganizmy fyllosfery mają duże znaczenie środowiskowe i rolnicze, przede wszystkim ze względu na wpływ mikroorganizmów na zdrowotność i plonowanie roślin (Wu et all 2009). W światowej literaturze znane są doniesienia o korzystnym wpływie środków pochodzenia naturalnego na ograniczanie zasiedlenia roślin i porażenia kiełkujących nasion przez patogeny pochodzenia grzybowego i bakteryjnego. Jednocześnie istnieją dowody na korzystny wpływ zaprawiania nasion tymi środkami na ogólną kondycję i dynamiczny wzrost siewek oraz roślin w dalszym stadium ich rozwoju. Również krajowe doniesienia wskazują na celowość wprowadzania środków naturalnych do zaprawiania nasion (Janas 2009, Janas, Grzesik 2005, 2012, Sadowski i in. 2005, Sobolewski i in. 2010).

CEL

Celem badań było określenie wpływu bioproduktów mikrobiologicznych oraz preparatów biologicznych na jakość nasion marchwi i pomidora, zdrowotność nasion i roślin w początkowym stadium wzrostu, metabolizm nasion oraz ich wigor, jak również procesy starzenia, świadczące o wartości przechowalniczej materiału siewnego.

METODYKA

Badania wykonano w Pracowni Nasiennictwa, zgodnie z założeniami metodyki zamieszczonej we wniosku aplikacyjnym. Doświadczenia prowadzono w warunkach laboratoryjnych (in vitro), w podłożach glebowych w halach wegetacyjnych (kontrolowane warunki temperatury i wilgotności) oraz in wiwo na certyfikowanym ekologicznym polu doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Komercyjne nasiona ekologiczne marchwi odmiany Napoli F1 pochodziły z firmy Bejo (numer świadectwa 100434) a pomidora odmiany ACE Vf zakupiono w firmie PlantiCo Zielonki (certyfikat No –EKO-01-001915). Nasiona obu wymienionych gatunków roślin warzywnych były zaprawiane izolatami z zasobów Symbio Banku: Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilus* oraz standardowymi (referencyjnymi) zaprawami nasion: Trianum (zawiera antagonistyczny grzyb z rodzaju *Trichoderma*) i BetaChicol (chitozan).
Ekologiczne nasiona poddano wstępnym analizom jakości (energia i zdolność kiełkowania, masa tysiąca nasion, wilgotność) i zdrowotności (ocena zasiedlenia nasion mikroflorą, diagnostyka gatunków i rodzajów). Wyizolowane ze spermoplany nasion mikopatogeny oraz wyselekcjonowane w SYMBIO Banku mikroorganizmy pożyteczne testowano pod kątem wzajemnych interakcji, celem określenia indywidualnego i sumarycznego efektu biotycznego. Oceniono stopień zmniejszania się kolonii (0 - 4 punkty), stopień otoczenia kolonii (0 - 4), szerokość strefy inhibicyjnej między koloniami (po 1 punkcie za każdy 1 mm). W kombinacjach z układem w płytkowej kulturze dwu mikroorganizmów (wspólny wzrost) określono również żywotność fitopatogena (mikroorganizmu testowanego), jeśli był kolonizowany przez nadpasożyty (mikroorganizmy testujące). Prowadzono również monitoring mechanizmów oddziaływania patogenów i nadpasożytów oraz zmian morfologicznych patogenów pod wpływem mikroorganizmów pożytecznych. – ewentualnych zmian zabarwienia elementów plechy grzyba testowanego, występowanie strefy inhibicyjnej (zahamowania wzrostu jednego z grzybów), konkurencji zasiedlania, pasożytowania oraz lizy (rozpuszczenia , destrukcji elementów plechy grzyba testowanego).
Prowadzono również badania w zakresie wpływu testowanych bioproduktów mikrobiologicznych na metabolizm nasion (ogólnej aktywności dehydrogenaz, aktywność katalazy), przyspieszonego starzenia nasion, warunkującego ich zdolnośćprzechowalniczą, wschodów roślin w kontrolowanych warunkach podłoży glebowych , wzrostu korzeni zarodkowych i siewek w testach PHYTOTOXKIT oraz doświadczenia polowe, w których były weryfikowane wyniki testów laboratoryjnych.

Badania jakości nasion

Badania w tym zakresie prowadzono zgodnie z przyjętymi wymogami ISTA (Międzynarodowej Organizacji Oceny Nasion). Nasiona marchwi i pomidora poddano 20 minutowemu traktowaniu bioproduktami mikrobiologicznymi, pochodzącymi z zasobów Symbio Banku z Pracowni Rizosfery IO Sp 82 AB *Bacillus sp* i Sp 82 AA *Bacillus pumilus* oraz standardowymi zaprawami nasion: Trianum i Betachicol. Otrzymano ok. 1000 ml szczepów bakterii B*acillus pumilus* - wielkość populacji ok. 1.1 x 10^9 jtk/ml oraz *Bacillus weihenstephanensis* - wielkość populacji ok. 0,9 x 10^9 jtk/ml. Środki biologiczne aplikowano donasiennie w stężeniu 1%. W następnym etapie wysiewano zainokulowane nasiona marchwi i

pomidora do szalek Petriego na nasączone bibuły filtracyjne i inkubowano w termostatach w temperaturze 20 ^{o}C celem określenia dynamiki kiełkowania po traktowaniu środkami biologicznymi. Kiełkujące nasiona liczono codziennie przez 14 kolejnych dni i na tej podstawie sporządzono wykresy dynamiki kiełkowania (liczba skiełkowanych nasion w procentach).
Równolegle wysiano nasiona obu gatunków warzyw na kiełkowniki Jakobsena (bibuły filtracyjne o określonej pojemności wodnej), celem określenia energii i zdolności kiełkowania inokulowanych nasion. Energię kiełkowania nasion marchwi liczono po 7 dniach a zdolność kiełkowania po 14 dniach, natomiast energię kiełkowania nasion pomidora określano po 5 dniach a zdolność kiełkowania po 14 dniach (zgodnie z wymogami ISTA).

Badanie wschodów roślin w podłożu glebowym

Badania polegały na wysiewie zainokulowanych nasion marchwi i pomidora do skrzynek wysiewnych, wypełnionych torfem firmy Klasmanna (podłoże ekologiczne) po 50 nasion z każdej kombinacji w trzech powtórzeniach. Wschody roślin liczono codziennie przez 14 kolejnych dni. Określono również indeks zawartości chlorofilu w fazie pierwszych liści właściwych pomidora i marchwi. Wyniki badań zestawiono na rysunkach i tabelach.

Badania zdrowotności nasion i roślin.

Badania miały na celu określenie wpływu aplikowanych donasiennie bioproduktów mikrobiologicznych i preparatów biologicznych na zasiedlenie nasion marchwi i pomidora mikroflorą. Przeanalizowano także interakcje pomiędzy mikopatogenami zasiedlającymi nasiona a mikroorganizmami pożytecznymi użytymi do osłony biologicznej (inokulacji). W ramach badań wykonano wstępne analizy mikologiczne materiału siewnego przed inokulacją mikroorganizmami pożytecznymi (diagnostyka ilościowa i jakościowa mikopatogenów do rodzajów i gatunków) oraz po traktowaniu bioproduktami mikrobiologicznymi i biopreparatami. Ocenę zdrowotności nasion wykonano dwoma najczęsiej stosowanymi metodami: metodą testu bibułowego (TB) oraz pożywkową (PDA). W pierwszej metodzie zainokulowane nasiona wysiewano w szalkach Petriego (po 10 nasion na szalce) na bibuły filtracyjne, nasączone wodą destylowaną i inkubowano w termostatach w temperaturze 20^{o}C - optymalnej do rozwoju mikroflory zasiedlającej nasiona. Kultury inkubowano przez 7 dób, a następnie identyfikowano przy pomocy mikroskopii świetlnej i dostępnych kluczy do rodzaju i gatunku. Metoda druga (pożywkowa) polegała na wysiewie nasion na selektywne pożywki agarowe i analogicznej inkubacji, jak w teście TB. W badaniach zastosowano uniwersalną pożywkę dekstrozowo-ziemniaczaną PDA. Po 7 dobach izolowano wyhodowane kolonie mikopatogenów, w razie konieczności pasażowano do uzyskania mono kultury a następnie diagnozowano i określano przynależność do rodzaju i gatunku.
W badaniach zdrowotności wschodów roślin (faza siewki i pierwszego liścia właściwego) mikopatogeny izolowano z porażonych organów i prowadzono ich diagnostykę przy pomocy opisanych testów (TB i pożywkowego). Reakcję mikopatogenów zasiedlających nasiona pomidora i marchwi na mikroorganizmy pożyteczne aplikowane donasiennie opisano i zestawiono w tabelach. Podczas trwania badań prowadzono również monitoring stabilności mikrobiologicznej nowo wprowadzanych inokulów i biopreparatów.

WYNIKI

Analizy mikologiczne

Wyniki wstępnych analiz mikologicznych komercyjnych nasion ekologicznych marchwi

odmiany Napoli F1 i pomidora odmiany ACE VF wykazały wysokie zasiedlenie mikoflorą należącą do co najmniej 9 rodzajów i gatunków w przypadku marchwi oraz 10 rodzajów i gatunków u pomidora. Identyfikację prowadzono tylko dla rodzajów i gatunków grzybów o największej patogeniczności lub występujących w największym nasileniu. Do powszechnie występujących należały przede wszystkim grzyby tzw. polowe z rodzaju *Alternaria, Epicoccum purpurascens, Fusarium* oraz przechowalnicze z rodzaju *Penicillium, Aspergillus, Rhizopus.* Zastosowanie biologicznej osłony nasion przy użyciu bioproduktów mikrobiologicznych z zasobów Symbio Banku: **Sp82AA *Bacillus pumilus***, **Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*** oraz preparatów biologicznych Trianum i Biochikol istotnie zmniejszyło zasiedlenie nasion mikoflorą. Najlepsze efekty i 50 % redukcję mikopatogenów oraz istotną poprawę zdrowotności nasion pomidora i marchwi uzyskano w kombinacjach inokulowanych szczepem ***Bacillus pumilus*** **oraz preparatem mikrobiologicznym Trianum.** Ich fungistatyczne oddziaływanie utrzymywało się również na etapie wschodów roślin w podłożach glebowych w doświadczeniach wazonowych oraz w warunkach polowych.
Analizy wzajemnych zależności pomiędzy mikopatogenami najczęściej zasiedlających nasiona marchwi i pomidora oraz mikroorganizmami pożytecznymi (bioproduktami mikrobiologicznymi) wskazują na ekspansywne zdolności do nadpasożytnictwa oraz antagonistycznego oddziaływania bioproduktu mikrobiologicznego Symbio Banku **Sp82AA *Bacillus pumilus***. Bakteria ta w największym stopniu hamowała wzrost grzybów patogenicznych z rodzaju *Fusarium* i *Alternaria* na nasionach marchwi oraz *Fusarium oxysporum, Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani i Alternaria solani* na nasionach pomidora. Wymienione mikopatogeny są sprawcami najgroźniejszych chorób marchwi i pomidora. *Fusarium* odpowiada za fuzaryjne więdnięcie roślin marchwi i pomidora, grzyby z rodzaju *Alternaria* a zwłaszcza patogeniczne gatunki *A. radicina* i *A. dauci* są sprawcami czarnej zgnilizny korzeni marchwi oraz alternariozy naci marchwi. U pomidora *A. solani* – jest sprawcą alternariozy a także współuczestniczy wraz z *Rhizoctonia solani* w infekcji siewek (zgorzel siewek). *Bacillus pumilus* istotnie hamował wzrost i rozwój patogenicznych grzybów należących do gatunku *Phytophthora infestans* , co wskazuje na skuteczną ochronę roślin pomidora przed zarazą ziemniaka. Nie stwierdzono fitotoksyczności badanych bioproduktów mikrobiologicznych i biopreparatów. Wyniki badań zestawiono w tabelach (1,2) .

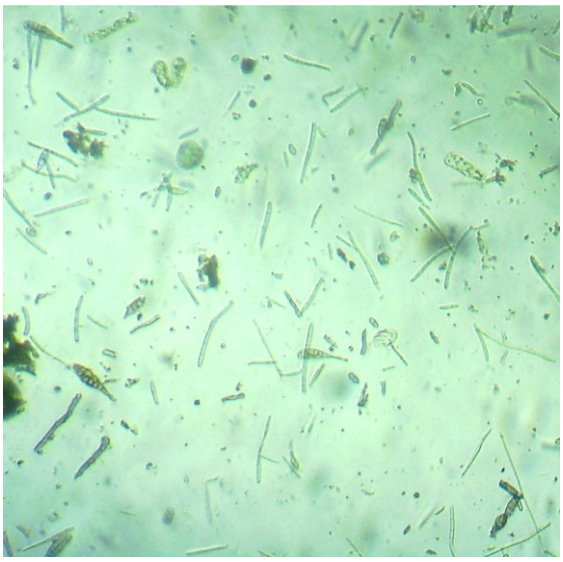
Tabela 1. Wpływ osłony biologicznej nasion marchwi na zasiedlenie mikoflorą (procent w stosunku do ogółu izolatów)

Rodzaj/gatunek mikopatogena	Osłona biologiczna nasion marchwi odmiany Napoli F1				
	Kontrola	Sp82AA *Bacillus pumilus*	Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*	Trianum	Biochikol
Alternaria alternata	89,0	50,5	60,0	48,0	50,0
Alternaria dauci	3,5	1,8	2,5	2,0	2,0
Alternaria radicina	4,8	2,0	2,8	2,0	2,5
Epicoccum purpurascens	11,0	7,0	7,0	9,2	7,5
Drechslera sp.	4,0	1,5	2,0	2,0	2,0
Fusarium sp.	3,5	0,6	0,9	1,0	1,5
Phoma sp.	1,4	0,8	1,0	0,5	1,0
Stemphyllium sp.	1,8	1,0	1,2	0,5	0,8
Aspergillus sp.	4,9	2,8	3,0	3,2	2,5
Cladosporium sp.	4,0	1,9	2,2	2,5	2,5
Sclerotinia	2,8	1,2	0,5	0,7	1,6

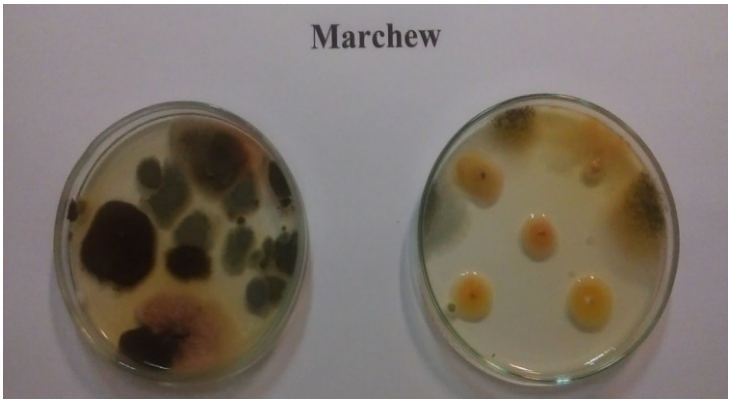
sclerotiorum					
Porażenie nasin (%)	91,0	47,0	53,0	51,5	53,0

Tabela 2. Wpływ osłony biologicznej nasion pomidora na zasiedlenie mikoflorą (procent w stosunku do ogółu izolatów)

Rodzaj/gatunek mikopatogena	Osłona biologiczna nasion pomidora odmiany ACE VF				
	Kontrola	Sp82AA *Bacillus pumilus*	Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*	Trianum	Biochikol
Alternaria alternata	52,5	28,8	31,0	30,6	31,5
Alternaria solani	4,0	2,5	2,9	2,5	2,0
Fusarium oxysporum	2,5	0,6	1,0	0,8	0,8
Colletotrichum sp.	0,6	0,0	0,3	0,0	0,2
Cladosporium fulvum	0,8	0,0	0,4	0,0	0,5
Phytophthora infestans	1,2	0,5	0,8	0,4	0,8
Rhizoctonia solani	1,5	0,0	0,3	0,6	0,5
Penicillium sp.	2,0	1,3	1,0	0,8	1,0
Epicoccum purpurascens	3,5	2,0	2,2	2,0	1,5
Rhizopus nigricans	0,9	0,3	0,3	0,5	0,5
Porażenie nasin (%)	45,0	20,5	23,0	21,0	22,2



Fot.1. Zarodniki grzybów z rodzaju *Alternaria* izolowane z materiału roślinnego marchwi

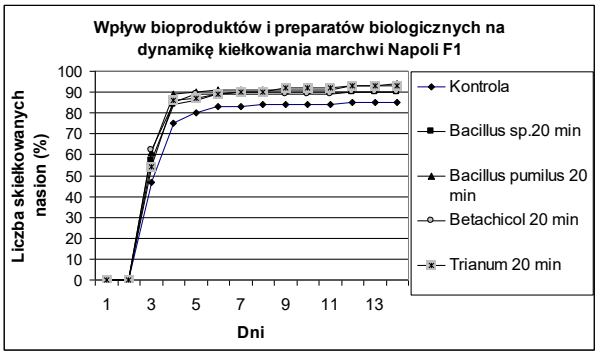


Fot. 2. Nasiona marchwi zasiedlone mikoflorą, kontrola – z lewej,
nasiona traktowane *Bacillus pumilus* – dominacja bakterii -z prawej

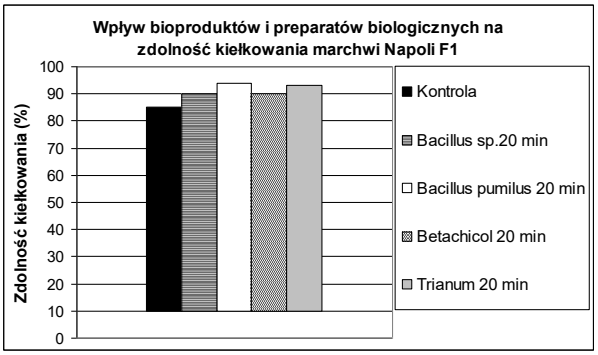
Analizy jakości nasion marchwi i pomidora

Uzyskane wyniki wskazują na korzystny wpływ stosowanych środków biologicznych i bioproduktów mikrobiologicznych na kiełkowanie nasion, ich wigor oraz aktywność fizjologiczną. Najlepsze rezultaty uzyskano po aplikacji szczepu ***Bacillus pumilus*** **Sp82AA** i biopreparatu na bazie grzybów z rodzaju Trichoderma **– Trianum.** Pożyteczne bakterie indukowały proces kiełkowania, przyspieszając go średnio o 2 dni, wzrastała również energia i zdolność kiełkowania. Wzrastała również aktywność fizjologiczna co stwierdzono na podstawie indeksu zawartości chlorofilu w liściach. Wyniki zestawiono na rysunkach 1-12 .

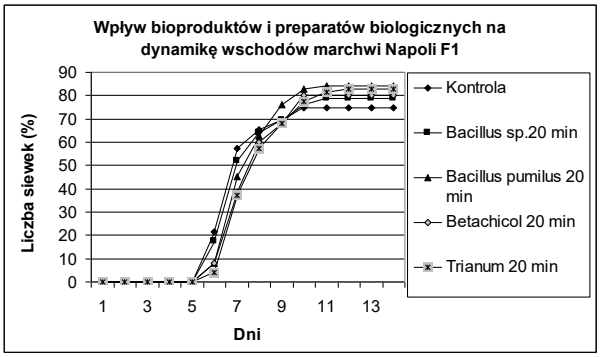
Marchew odmiany Napoli F1



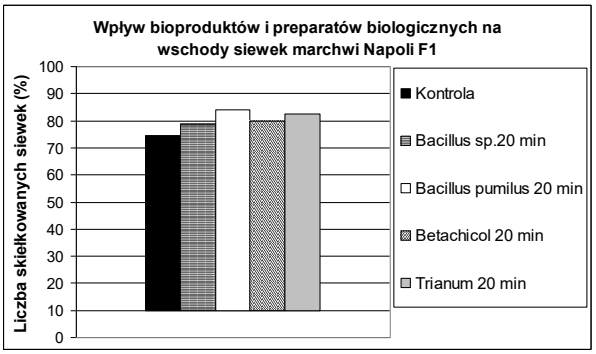
Rys. 1



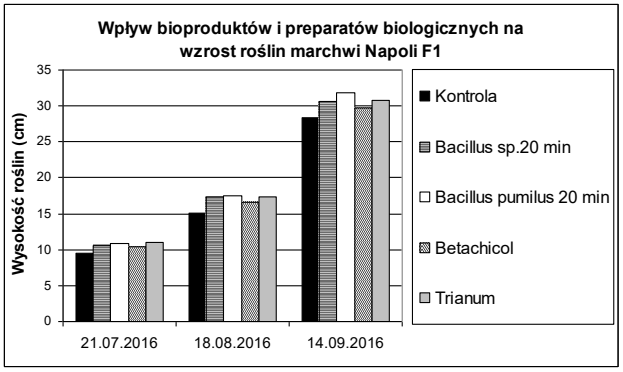
Rys.2.



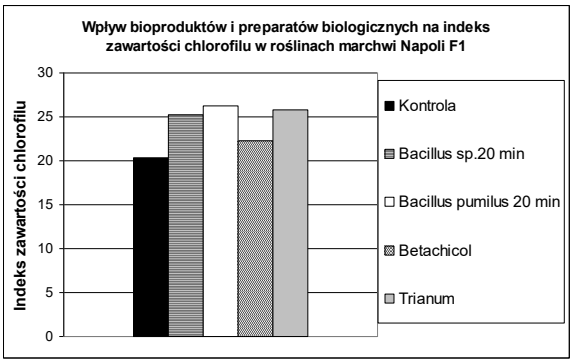
Rys.3



Rys.4.

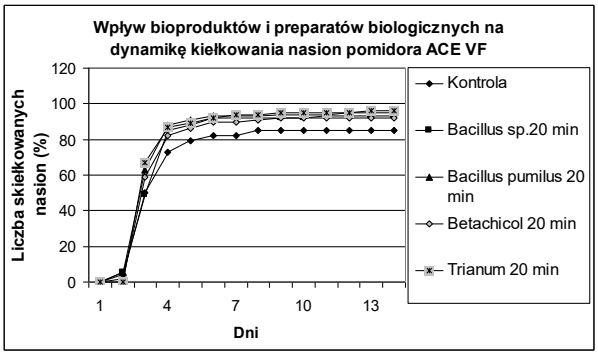


Rys.5.

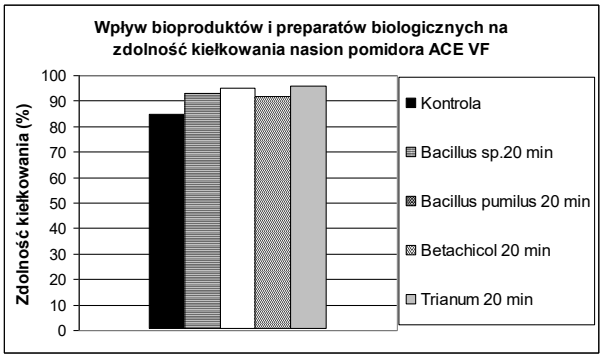


Rys.6.

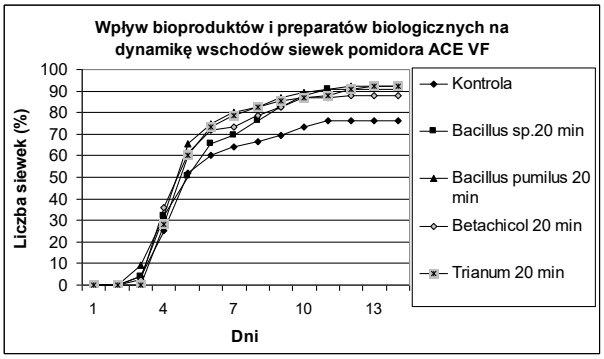
Pomidor odmiany ACE VF



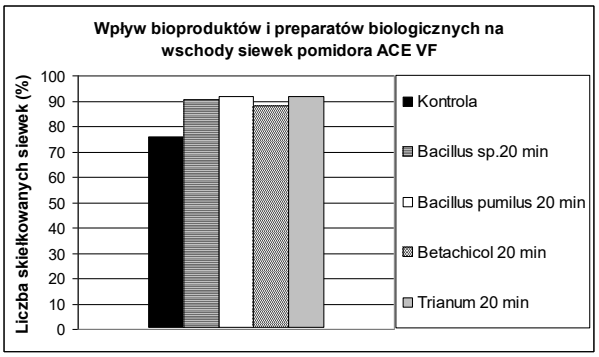
Rys 7.



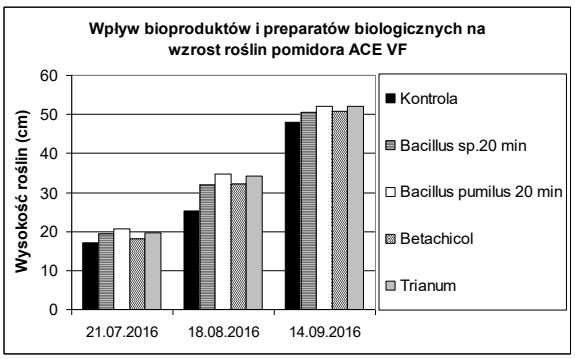
Rys.8.



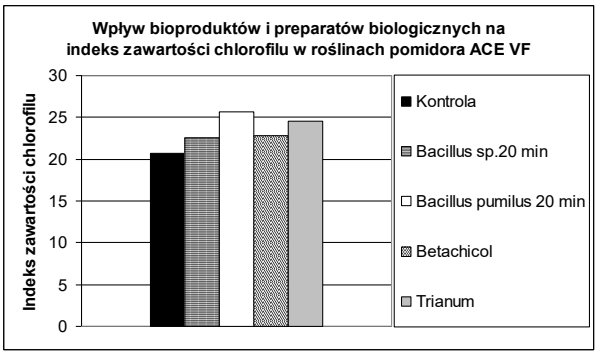
Rys. 9.



Rys.10.



Rys.11.



Rys.12.

Fot. 3. Wzrost roślin pomidora po aplikacji bioproduktów i środków biologicznych

Fot. 4. Wzrost roślin marchwi w podłożach glebowych po aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych i biopreparatów

Fot.5. Wzrost roślin pomidora po aplikacji bioproduktów i środków biologicznych

Wpływ bioproduktów i środków biologicznych na wigor i procesy starzenia się nasion

CEL

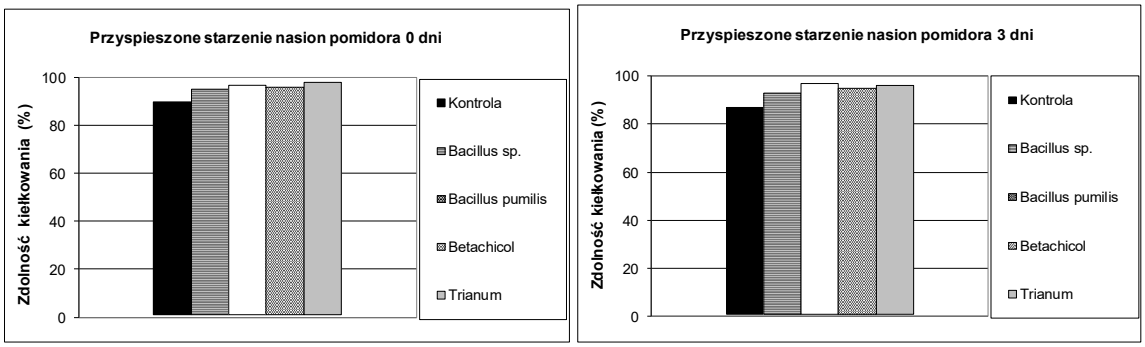
Celem badań było wykazanie wpływu stosowanych środków biologicznych na wigor i procesy starzenia nasion pomidora ‘ACE VF’ i marchwi 'Napoli F1'.

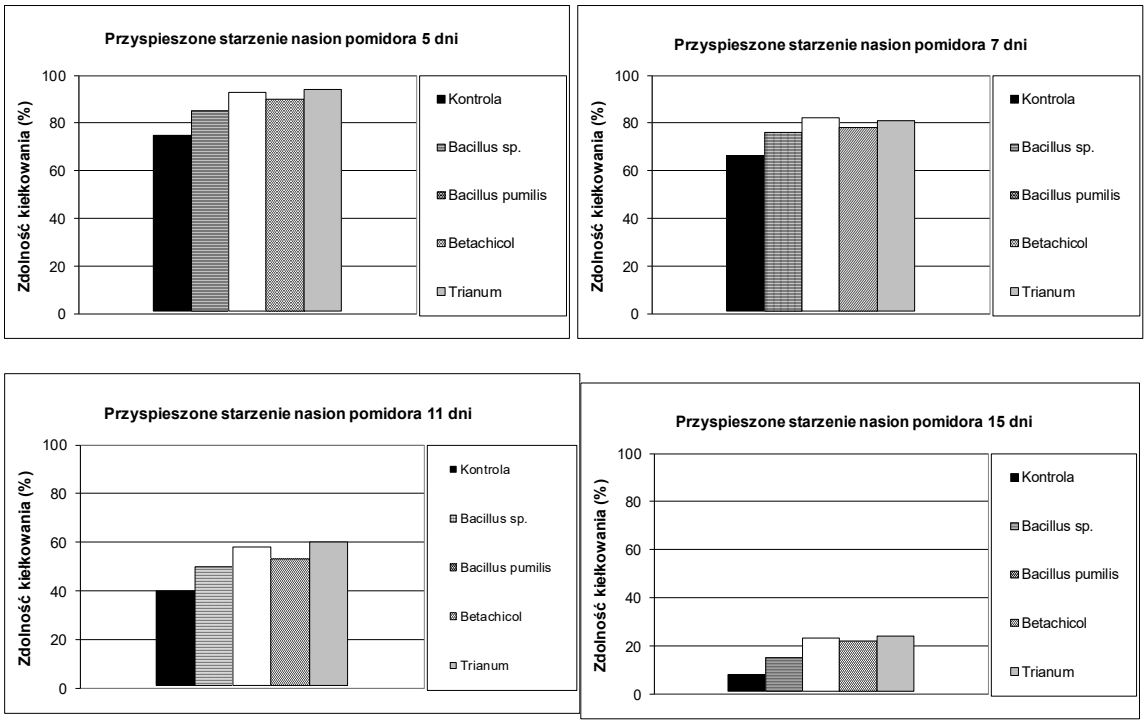
METODYKA

Nasiona pomidora ‘ACE VF’ i marchwi 'Napoli F1' moczono przez 20 minut w roztworach bioproduktów i środków biologicznych (*Bacillus* sp., *Bacillus pumilus,* Betachicol i Trianum) i następnie poddano testowi przyspieszonego starzenia, który wskazuje na zdolność przechowalniczą nasion. Test przyspieszonego starzenia polegał na inkubacji nasion w temperaturze 45^{o}C, nad wodą (w powietrzu o wilgotności 100%) w odpowiednio skonstruowanych hermetycznych pojemnikach, przez 0, 3, 5, 7, 11 i 15 dni. Po tym okresie oceniono dynamikę i zdolność kiełkowania nasion w 20^{o}C zgodnie z obowiązującą metodyką. W tym celu nasiona wysiewano do płytek Petriego (o średnicy 9 cm) na bibułę olejową zwilżoną wodą destylowaną i umieszczano w inkubatorach w temperaturze 20^{o}C. Codziennie, przez 14 dni, liczono liczbę skiełkowanych nasion, celem określenia dynamiki kiełkowania. Sumaryczna liczba skiełkowanych nasion była podstawą do obliczenia zdolności kiełkowania. Z każdej kombinacji doświadczenia wysiewano 50 sztuk nasion w trzech powtórzeniach.

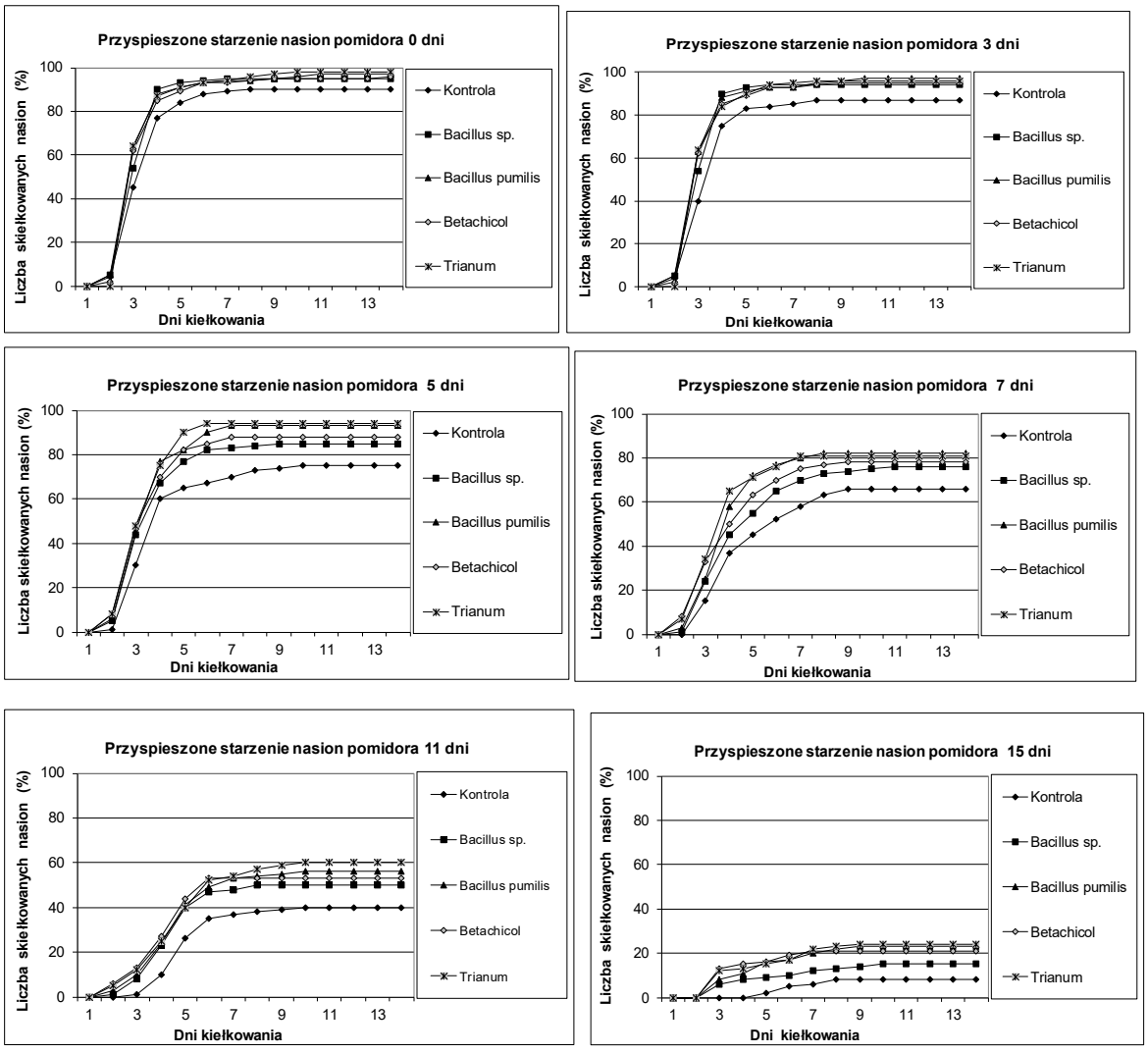
WYNIKI

Traktowanie nasion pomidora i marchwi przez 20 minut bioproduktami *Bacillus* sp. i *Bacillus pumilus* oraz środkami biotechnicznymi i biologicznymi Betachicol i Trianum spowolniło proces starzenia nasion. W porównaniu do kombinacji kontrolnej, nasiona traktowane wymienionymi czterema środkami biologicznymi kiełkowały szybciej i w wyższym procencie bezpośrednio po zabiegu oraz po kolejnych 3, 5, 7, 11 i 15 dniach inkubacji w 45^{o}C i 100% wilgotności względnej powietrza. Najbardziej skutecznymi w poprawie wigoru i spowalnianiu procesów starzenia nasion pomidora ‘ACE VF’ były szczepy *Bacillus pumilus* i preparat Trianum, natomiast marchwi ‘Napoli’ F1 -Betachicol i Trianum. Wskazuje to, że stosowane środki wpływają korzystnie na wigor nasion oraz wartość przechowalniczą.

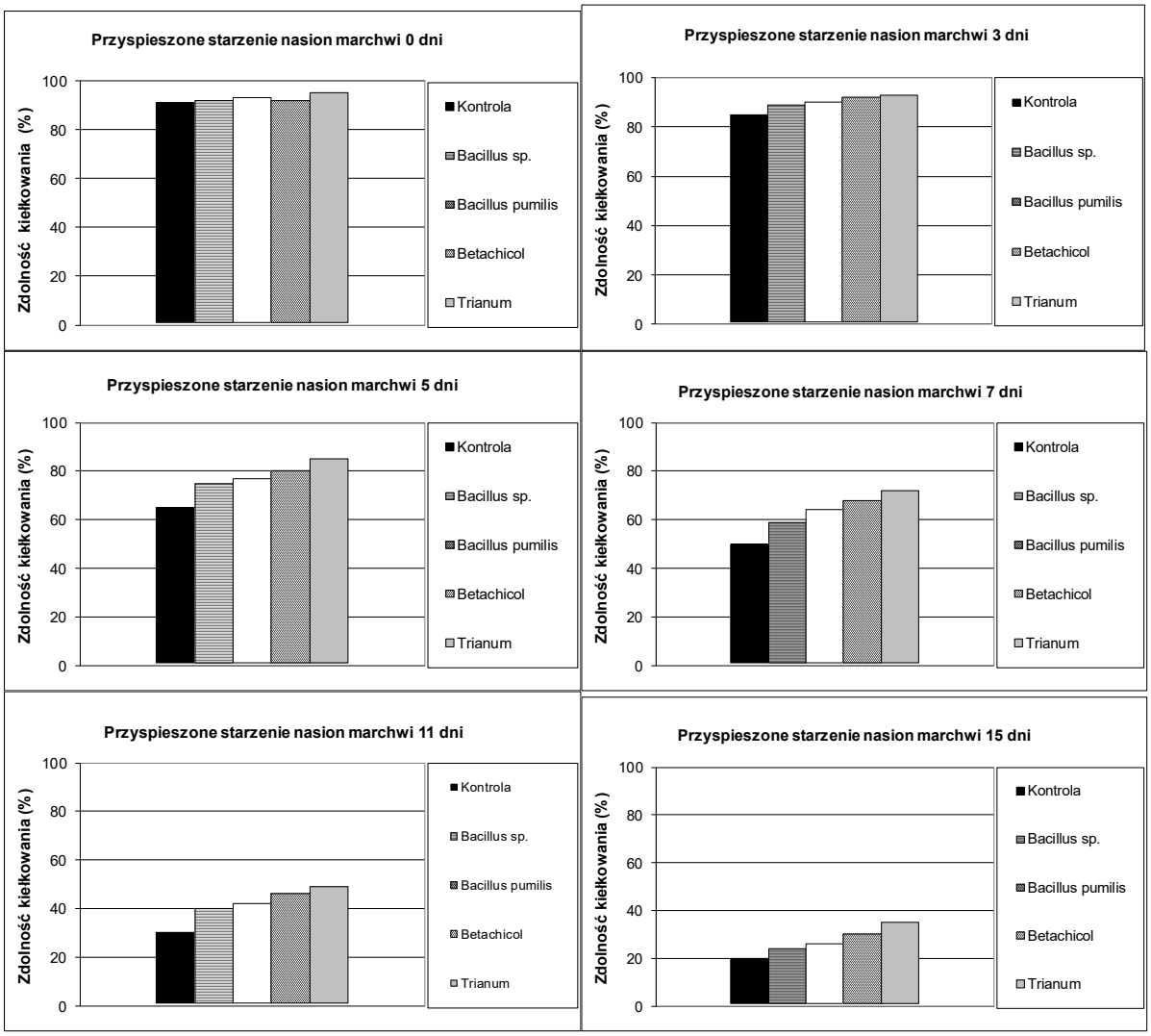




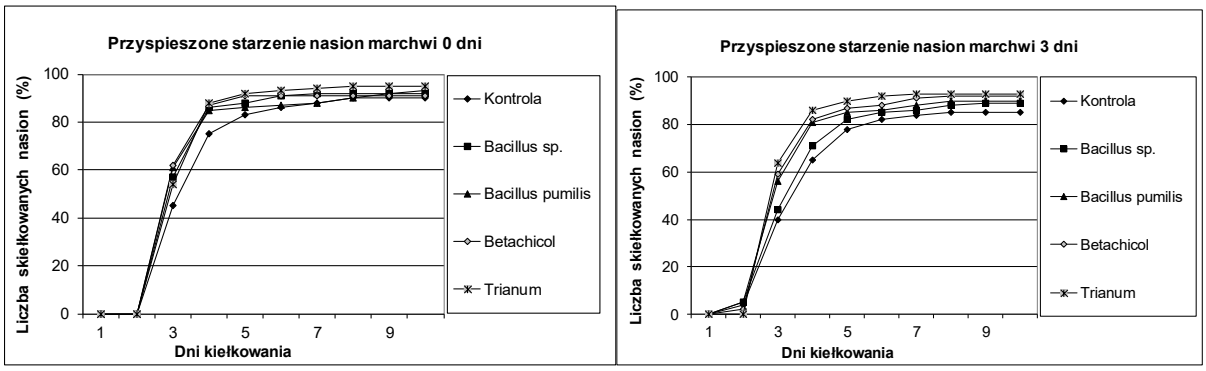
Rys. 13. Zdolność kiełkowania nasion pomidora ACE VF traktowanych przez 20 minut bioproduktami i środkami biologicznymi i następnie poddanych starzeniu w 45°C i wilgotności powietrza 100% przez 0, 3, 5, 7, 11 i 15 dni. $NIR_{0,05}$=3,9.

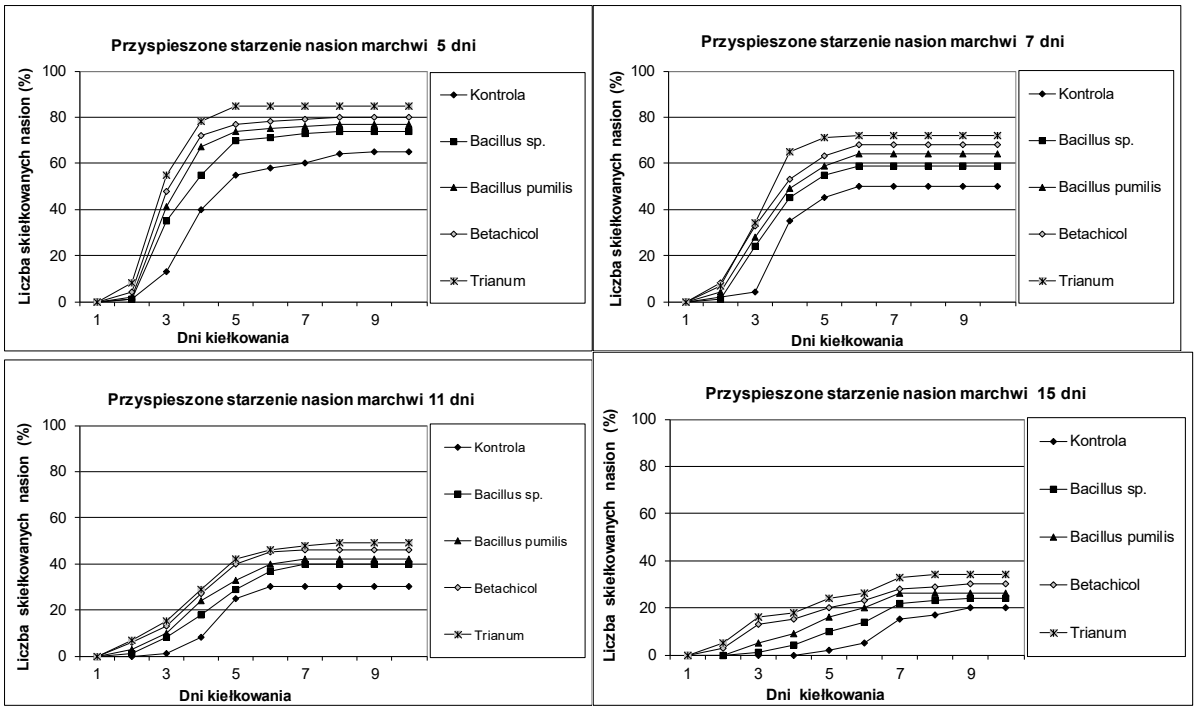


Rys. 14. Dynamika kiełkowania nasion pomidora ACE VF traktowanych przez 20 minut bioproduktami i środkami biologicznymi a następnie poddanych starzeniu w 45°C i wilgotności powietrza 100% przez 0, 3, 5, 7, 11 i 15 dni. $NIR_{0,05}$=3,9.



Rys. 15. Zdolność kiełkowania nasion marchwi 'Napoli F1' traktowanych przez 20 minut bioproduktami i środkami biologicznymi a następnie poddanych starzeniu w 45°C i wilgotności powietrza 100% przez 0, 3, 5, 7, 11 i 15 dni. $NIR_{0,05}$=3,8.





Rys. 16.. Dynamika kiełkowania nasion marchwi 'Napoli F1' traktowanych przez 20 minut bioproduktami i środkami biologicznymi a następnie poddanych starzeniu w 45^{o}C i wilgotności powietrza 100% przez 0, 3, 5, 7, 11 i 15 dni. $NIR_{0,05}$=3,8.

WNIOSKI

1. Traktowanie nasion pomidora odmiany ACE VF i marchwi odmiany Napoli F1 przez 20 minut bioproduktami *Bacillus* sp. i *Bacillus pumilus* oraz preparatami Betachicol i Trianum spowolnia ich proces starzenia, co wskazuje, na zwiększenie ich wigoru oraz wartości przechowalniczej.
2. Największą skutecznością w poprawie wigoru nasion pomidora odmiany ACE VF wykazał się szczep *Bacillus pumilus* i biopreparat Trianum, natomiast marchwi odmiany Napoli F1 – *Bacillus* sp. oraz Betachicol i Trianum.

Ogólna aktywność dehydrogenaz w nasionach

Celem pomiaru ogólnej aktywność dehydrogenaz w nasionach było określenie stanu wydajności oddechowej enzymów łańcucha oddechowego zlokalizowanych w różnych organellach komórkowych, a szczególnie w mitochondriach. Badanie aktywności dehydrogenaz (enzymów oddechowych) uznawane jest często jako indeks/ współczynnik oddechowy i metabolizmu komórek w nasionach, co pośrednio także określa ich wigor.

METODYKA

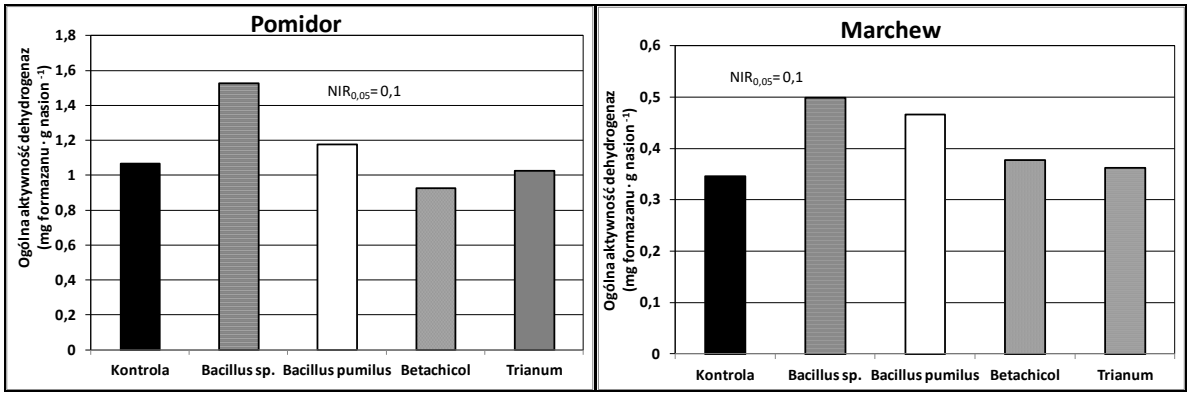
Nasiona marchwi i pomidora traktowano przez 20 minut bioproduktami *Bacillus* sp. i *Bacillus pumilus* oraz środkami biotechnicznymi i biologicznymi Betachikol i Trianum, a następnie inkubowano 16 godzin w szalkach Petri'ego o średnicy 90 mm w temperaturze 25 °C na bibule olejowej (pH 7,0 i gramatura 250 g x m^{-2}) nasyconej 6.5 ml wody destylowanej. Napęczniałe i przesuszone powierzchniowo nasiona w ilości 0,2 g umieszczano w czterech probówkach Eppendorf'a (powtórzenia) o pojemności 2.2 ml. Probówki zalewano 1 ml 0.1 M buforem

fosforanowym (pH 7.2) zawierającym 0.7% (w/v) TTC (chlorku trifenylotetrazoliowego). Zmielone nasiona w probówkach Eppendorf'a inkubowano w 25°C. Po 24 godzinach homogenat odwirowywano przez 5 min przy 5000 obr. x min^{-1}. Znajdujący się w nasionach, zredukowany przez dehydrogenazy i nierozpuszczalny w wodzie, formazan poddano wielokrotnej ekstrakcji w acetonie aż do całkowitego odbarwienia się nasion. Otrzymane frakcje supernatantu zlewano po odwirowaniu przez 2 min. przy 5000 obr. x min^{-1} do cylindrów miarowych, które w końcowej fazie dopełniano acetonem do stałej objętości. Zawartość formazanu (podaną w mg formazanu na g napęczniałych nasion; mg x g $nasion^{-1}$) określono na podstawie porównania absorpcji badanego ekstraktu oraz roztworu wzorcowego. Absorpcję ekstraktu odczytywano przy 480 nm.

WYNIKI

Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno w przypadku marchwi, jak i pomidora zaobserwowano istotnie większą aktywność dehydrogenaz pod wpływem donasiennej aplikacji bioproduktów *Bacillus* sp. oraz *Bacillus pumilus* w porównaniu z pozostałymi kombinacjami. W wyniku tych traktowań aktywność dehydrogenaz w nasionach marchwi wzrosła do 43% a w nasionach pomidora do 30 % w porównaniu do nasion kontrolnych (nie traktowanych).

Badania wskazują na stymulację aktywności procesów oddechowych w nasionach marchwi i pomidora pod wpływem szczepów bakterii *Bacillus* sp. oraz *Bacillus pumilus* (rys.17).



Rys.17. Wpływ osłony biologicznej nasion pomidora i marchwi na ich aktywność oddechową i wigor

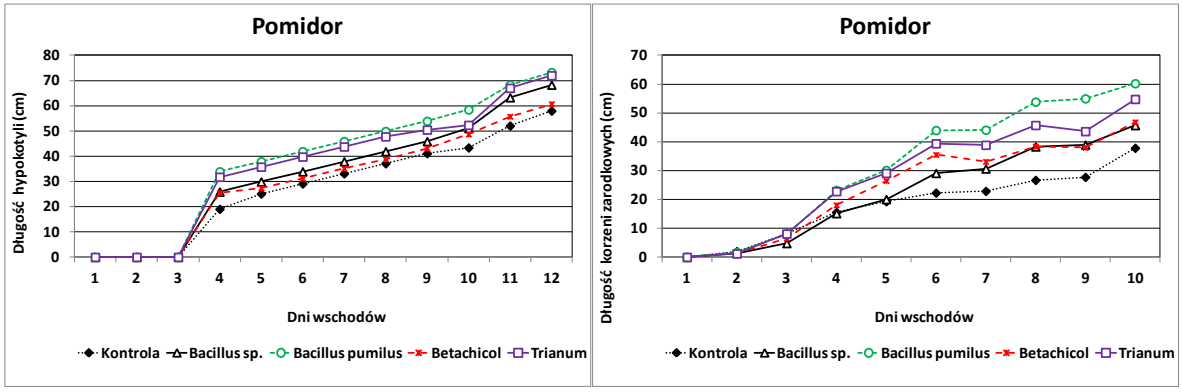
<u>Pomiar długość korzeni zarodkowych i hypokotyli</u> *w zmodyfikowanych płytkach Phytotoxkit*

Celem pomiarów długości korzeni zarodkowych i hipokotyli było określenie dynamiki ich wzrostu oraz wigoru nasion, traktowanych bioproduktami *Bacillus* sp. i *Bacillus pumilus* oraz biopreparatami Betachikol i Trianum. Traktowane przez 20 minut nasiona marchwi i pomidora umieszczano w zmodyfikowanych płytkach Phytotoxkit na bibule olejowej (pH 7,0 i gramatura 250 g x m^{-2}) nasyconej wodą destylowaną. Kontrolę stanowiły nasiona moczone w wodzie destylowanej. Pomiary długości korzeni zarodkowych i hipokotyli wykonywano codziennie przez 12 dni.

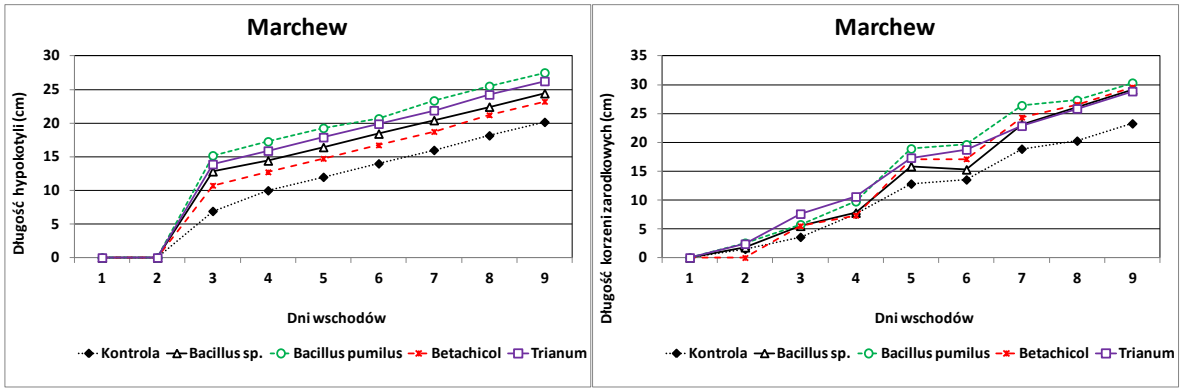
WYNIKI

Badania wykazały, że wszystkie stosowane biprodukty mikrobiologiczne i preparaty

biologiczne istotnie zwiększyły wzrost hypokotyli oraz korzeni siewek pomidora i marchwi w porównaniu do kontroli. Najkorzystniejszy wpływ miało 20 minutowe moczenie nasion w zawiesinie bioproduktu *Bacillus pumilus* oraz preparacie Trianum (rys. 18-19).



Rys.18. Wpływ osłony biologicznej nasion pomidora na wzrost hipokotyli i korzeni zarodkowych



Rys .19. Wpływ osłony biologicznej nasion marchwi na wzrost hipokotyli i korzeni zarodkowych

Literatura

Bending G.D., Hand P., Pink D., Whipps J.M. 2008. Phyllosphere microbiology with species reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1744–1755

Janas R. 2009. Możliwości wykorzystania Efektywnych Mikroorganizmów w ekologicznych systemach produkcji roślin uprawnych. Problemy Inżynierii Rolniczej 3(65): 111-119

Janas R. 2011. Wpływ środków biologicznych o różnych mechanizmach działania na metabolizm roślin i jakość nasion rokietty siewnej. Biul.IHAR 262: 197-206

Janas R., Grzesik M. 2005. Zastosowanie środków biologicznych do poprawy jakości nasion roślin ogrodniczych. Progress in Plant Prot/ Postępy w Ochronie Roślin 45, 1: 739-741

Janas R. Grzesik M. 2007. Charakterystyka najważniejszych parametrów jakości nasion i czynników determinujących jakość. Hodowla Roślin i Nasiennictwo 3:36-40

Janas R. 2013. Ocena możliwości poprawy zdrowotności nasion kopru ogrodowego i włoskiego uprawianego w systemach ekologicznych. J. of Res. and Applic.in Agric. Engin. 58 (3):226-228

Janas R., Grzesik M. 2012. Ocena skuteczności niechemicznych metod stosowanych przedsiewnie do poprawy wartości siewnej i zdrowotności nasion wybranych gatunków roślin z

rodziny *Apiaceae.* XVII Konf. Nauk.-Tech." Kierunki rozwoju technologii dla rolnictwa zrównoważonego. Kielce, 15-16 marca 2012:49-50.
Lindow S.E., Brandl M.T.2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol*. 69, 1875–1883 (2003)
Mastouri F., Björkman T., Harman G. E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, biotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. The American Phytopathological Society 100 (11):1213 – 1221
Sadowski Cz., Pańka D., Lenc L., Domoradzki M. 2005. Badania nad możliwością wykorzystania biopreparatów do otoczkowania nasion warzyw ekologicznych. [Research on possibility of biopreperations for organic vegetable seed coating]. Prog.Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 45 (2): 1055 - 1057.
Sobolewski J., Robak J., Ostrowska A., Gidelska A., Janas R. 2010. Weryfikacja aktualnego stanu zabezpieczenia siewek wybranych gatunków roślin warzywnych przed patogenami. Postępy w Ochronie Roślin/Progress in Plant Prot.: 741-747
Whipps J.M., Hand P., Pink D., Bending G.D. 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol*. 105: 1744–1755
Wu C.H., Bernard S.M., Andersen G.L., Chen W.2009. Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microb. Biotechnol.* 2, 428–440

Podzadanie 3. Wpływ biologicznego zaprawiania nasion wybranych gatunków roślin warzywnych środkami pochodzenia naturalnego na zdrowotność roślin nasiennych.

CEL

Celem badań było określenie wpływu bioproduktów mikrobiologicznych zawierających izolaty bakteryjne na zdrowotność roślin pomidora i marchwi w uprawach ekologicznych.

MATERIAŁ I METODY

Ocena zdrowotności roślin otrzymanych z nasion zaprawianych bioproduktami mikrobiologicznymi

Badania wykonano w Pracowni Chorób Roślin Warzywnych i Ozdobnych. Prace badawcze dotyczyły prowadzenia ocen porażenia siewek oraz roślin nasiennych, pochodzących z nasion zaprawianych mikroorganizmami antagonistycznymi i środkami pochodzenia naturalnego.
Materiałem badań były nasiona ekologiczne pomidora odmiany Ace Vf zakupione w firmie PlantiCo Zielonki (certyfikat No –EKO-01-001915,wydanie 7A z dnia 18.12.2015) oraz ekologiczne nasiona marchwi odmiany …. zakupione w firmie Bejo (numer świadectwa 100434). Nasiona obu wymienionych gatunków roślin warzywnych były uprzednio zaprawiane w Pracowni Nasiennictwa (w ramach podzadania 2) izolatami Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis* oraz standardowymi (referencyjnymi) zaprawami nasion: Trianum (zawiera antagonistyczny grzyb z rodzaju *Trichoderma*) i BetaChicol (chitozan).
1. Doświadczenia infekcyjne - wazonowe. Doświadczenia były prowadzone w kontenerach, zawierających po około 2 litry podłoża mineralnego, infekowanego patogenami grzybowymi: *Sclerotinia sclerotiorum, Botrytis cinerea, Fusarium* spp, patogenami grzybopodobnymi z rodzaju *Pythium* i *Phytophthora*. Inokulacji dokonywano metodami rutynowymi, zgodnie z metodykami obowiązującymi w badaniach fitopatologicznych.

Doświadczenia założono w układzie bloków losowanych. Wysiew zaprawionych nasion pomidora i marchwi wykonano 16.06 2016 do kontenerów o wymiarach 30 x 25 x 7 cm, wypełnionych glebą, pobraną z certyfikowanego pola ekologicznego Instytutu Ogrodnictwa przy ulicy Rybickiego. Nasiona wysiewano w trzech powtórzeniach, po 100 nasion w kontenerze. W przypadku pomidora, zdrowe siewki uzyskane w kontenerach przepikowano do wielodoniczek (54 oczka), celem produkcji rozsady. Podłoże glebowe poddano analizie mikologicznej, która wykazała obecność inokulum grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz *Sclerotinia*. Dodatkowego zakażenia gleby *Pythium* spp. dokonano poprzez wymieszanie zawiesiny tego organizmu grzybopodobnego w proporcji 10 ml *Pythium* spp. *z* 1 kg gleby mineralnej. Zawiesina inokulum była sporządzona zgodnie z ogólnie przyjętymi metodykami. Po 14 dniach inkubacji grzybni hodowanej na pożywce ziemniaczanej PDA (potato dextrose agar) w temperaturze 30 ^{o} C , dokonano homogenizacji pożywki z grzybnią przez 5 minut przy pomocy miksera. Uzyskana zawiesina inokulanta zawierała 5 x 10^{6} oospor w 1 ml.
Doświadczenie prowadzono w szklarni w kontrolowanej temperaturze 20 ^{o} C. W trakcie wegetacji prowadzono selekcję negatywną roślin. Chore siewki odkażano i wykładano do szalek na pożywki, w celu zapewnienia optymalnych warunków wzrostu grzybni badanych organizmów patogenicznych.
Ocenę zdrowotności siewek dokonywano według skali bonitacyjnej 0 - brak porażenia -7^{o} - 100 % porażona powierzchnia rośliny), a następnie przeliczano na procentową powierzchnię roślin ze zmianami nekrotycznymi tkanki na skutek porażenia, zgodnie z przelicznikiem:
0^{o} - 1% porażonej powierzchni
2^{o} - 6% porażonej powierzchni
3^{o} - 15% porażonej powierzchni
4^{o} - 30% porażonej powierzchni
5^{o} - 50% porażonej powierzchni
6^{o} - 80% porażonej powierzchni
7^{o} - 100% porażonej powierzchni
Podstawą prawidłowej oceny porażenia była szczegółowa diagnostyka sprawców chorób. W tym celu analizowano makroskopowo lub mikroskopowo porażoną tkankę pobraną z badanych roślin. Ponadto oszacowano stopień wpływu badanych izolatów na fitotoksyczność siewek według skali 0^{o}-5^{o} (0^{o}- brak efektów fitotoksycznych, 5^{o}-100 procent uszkodzenia siewek). Wyniki opracowano analizą wariancji, istotność różnic oceniono testem Newman-Keuls'a.

2. Doświadczenia polowe

Celem doświadczeń było określenie wpływu badanych mikroorganizmów aplikowanych donasiennie oraz dolistnie na zdrowotność roślin pomidora i marchwi.

Metodyka

Zaprawione mikrobiologicznie nasiona wysiewano na Certyfikowanym Polu Ekologicznym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach przy ul Rybickiego, zgodnie z zaleceniami agrotechnicznymi. Doświadczenia założono w układzie losowanych bloków. U marchwi poletko stanowiło 4 rzędy odległe co 40 cm, na poletku wysiano po 100 nasion. U pomidora poletko stanowiło 4 rzędy co 50 cm, na poletku wysadzano 20 roślin. Rozsadę wysadzono 8 07. 2016. Pole było nawożone standardowo, zgodnie z założeniami upraw ekologicznych. Nie stosowano żadnych dodatkowych nawozów doglebowych, zarówno w substracie torfowym do produkcji rozsady pomidora, jak i do gleby na polu. Nie deszczowano plantacji pomidora i marchwi, ponieważ gleba była dostatecznie uwodniona na skutek obfitych opadów deszczu.
Zabiegi pielęgnacyjne (pielenie) wykonywano ręcznie dwukrotnie w czasie wegetacji roślin.

Standardowymi (referencyjnymi) środkami były: Trianum (środek zawiera antagonistyczny grzyb z rodzaju *Trichoderma*) i BetaChicol zawierający chitozan. Referencyjne środki były użyte w dwóch różnych formach aplikacyjnych, jako zaprawy nasion i zawiesiny do zabiegów opryskiwania.

Ocenę porażenia prowadzono od momentu pojawienia się 50 % siewek na poletkach co 4-5 dni. Uwzględniono następujące parametry: siewki porażone, małe, uszkodzone (fitotoksyczność) i nie wzeszłe. Porażone siewki i rośliny nasienne były analizowane pod kątem określenia sprawcy porażenia, zgodnie z dostępnymi kluczami do określania patogenów. Wykonano trzy zabiegi z użyciem środków mikrobiologicznych. Poszczególne środki biologiczne aplikowano w następujących terminach: 18. 07, 25. 07 oraz 19. 08. 2016

- Trianum
- BioChicol
- Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus sp),*
- NA2T2 (bakteria *Klebsiella oxycota*),
- Pi25 G (bakteria *Pseudomonas fluorescens*), 60.3AA (bakteria *Lycobacter sp.),*
- AF74AAPAE NI (Bacillus *sp*.) -

Ocenę zdrowotności roślin wykonano dwukrotnie, według skali bonitacyjnej 0 (brak porażenia -7^{o} 100 % porażona powierzchnia rośliny) a następnie przeliczano na procentową powierzchnię roślin ze zmianami tkanki na wskutek porażenia zgodnie z przelicznikiem:

0^{o} - 1% porażonej powierzchni
2^{o} - 6% porażonej powierzchni
3^{o} - 15% porażonej powierzchni
4^{o} - 30% porażonej powierzchni
5^{o} - 50% porażonej powierzchni
6^{o} - 80% porażonej powierzchni
7^{o} - 100% porażonej powierzchni

Podstawą prawidłowej oceny porażenia była szczegółowa **diagnostyka sprawców chorób**. W tym celu analizowano makroskopowo lub mikroskopowo porażoną tkankę pobraną z badanych roślin. Ponadto szacowano stopień wpływu badanych izolatów na **fitotoksyczność** siewek, według skali 0^{o}-5^{o} (0^{o}- brak efektów fitotoksycznych, 5^{o}-100 procent uszkodzenia siewek). Wyniki opracowano analizą wariancji, istotność różnic oceniono testem Newman-Keuls'a.

WYNIKI

1. Doświadczenia infekcyjne – wazonowe

Marchew

Wykazano, że zaprawianie nasion marchwi badanymi izolatami: Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis* spowodowało istotny wzrost liczebności siewek zdrowych w stosunku do kombinacji kontrolnej, w której wysiewano nasiona niezaprawiane (Tabela 1). Na porażonych siewkach stwierdzono grzyby z rodzaju *Fusarium, Rhizoctonia*, i organizm grzybopodobny *Pythium.* Zastosowane mikroorganizmy nie wywołały efektu fitotoksyczności na badanych roślinach marchwi.

Uszkodzone siewki marchwi – zgorzel siewek

Pomidor

Podobnie, jak w przypadku marchwi, wykazano, że zaprawianie nasion pomidora badanymi izolatami: Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis* spowodowało istotny wzrost liczebności siewek zdrowych w stosunku do kombinacji kontrolnej, w której wysiewano nasiona niezaprawiane (Tabela 2). Na porażonych siewkach stwierdzono grzyby z rodzaju *Fusarium, Rhizoctonia*, i organizm grzybopodobny *Pythium.* Aplikowane mikroorganizmy nie wywołały efektu fitotoksyczności na badanych roślinach.

2.Doświadczenia polowe

Badane mikroorganizmy stosowane jako:
- zaprawy nasion
Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp*
Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis*
- środki do opryskiwania roślin

- Symbio Bank Sp 82 AB oprysk 0,1% (*Bacillus sp)*
- NA2T2 oprysk 0,1% (bakteria *Klebsiella oxycota*)
- Pi25 G oprysk 0,1% (bakteria *Pseudomonas fluorescens*)
- 60.3AA oprysk 0,1% (bakteria *Lycobacter sp.)*
- AF74AAPAE NI oprysk 0,1% (*Bacillus sp*.)

istotnie wpłynęły na zmniejszenie nasilenia alternariozy (*Alternaria dauci*) i mączniaka prawdziwego (*Erysiphe heraclei*) na badanych roślinach w stosunku do roślin nietraktowanych. W stosunku do środków referencyjnych nie wykazano istotnych różnic w ograniczeniu chorób (Tabela 1). W przypadku pomidora wymienione mikroorganizmy wykazały istotne ograniczenie *Phytophthora infestans* w stosunku do roślin kontrolnych, nietraktowanych żadnymi środkami (Tabela 2).

Mączniak prawdziwy marchwi w obiekcie nie traktowanym (kontrola)

Zaraza ziemniaka na liściach pomidora - liść górna strona

Zaraza na spodniej stronie liści pomidora z lewej po zabiegu z prawej bez opryskiwania

Z lewej kontrola z prawej aplikacja środków mikrobiologicznych w ochronie pomidorów przed zarazą ziemniaka

WNIOSKI

1. Wybrane izolaty Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis*. zastosowane do osłony nasion marchwi, chronią jej siewki przed porażeniem przez *Pythium* spp. *Fusarium* spp i *Rhizoctonia solani.* Izolaty nie powodowały efektów fitotoksyczności
2. Wybrane izolaty Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis* mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie do zabezpieczenia siewek przed patogenami, głównymi sprawcami zgorzeli siewek: *Pythium* spp. *Fusarium* spp i *Rhizoctonia solani* **w** integrowanej ochronie marchwi.
3. Wybrane izolaty Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis*. zastosowane do zaprawiania nasion pomidora chronią siewki przed porażeniem

przez *Pythium* spp. *Fusarium* spp i *Rhizoctonia solani.* Izolaty nie powodowały efektów fitotoksyczności

4. Wybrane izolaty Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis* mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie do zabezpieczenia siewek pomidora przed patogenami, głównymi sprawcami zgorzeli siewek: *Pythium* spp. *Fusarium* spp i *Rhizoctonia solani* w integrowanej ochronie pomidora.
5. Wybrane izolaty stosowane do zaprawiania nasion: Symbio Bank Sp 82 AB (*Bacillus sp) i* Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis* oraz stosowane do opryskiwania roślin: Symbio Bank Sp 82 AB oprysk 0,1% (*Bacillus* sp*),* NA2T2 oprysk 0,1% (bakteria *Klebsiella oxycota*), Pi25 G oprysk 0,1% (bakteria *Pseudomonas fluorescens*), 60.3AA oprysk 0,1% (bakteria *Lycobacter sp.),*AF74AAPAE NI oprysk 0,1% (*Bacillus sp*.) spowodowały ograniczenie *Alternaria dauci* i *Erysiphe heraclei* na marchwi *oraz Phytophthora infestans* na pomidorach
6. Mikroorganizmy Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus sp) i* Symbio Bank Sp 82 AA (bakteria *Bacillus pumilis)* oraz stosowane do opryskiwania roślin: Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus sp),* NA2T2 (bakteria *Klebsiella oxycota*), Pi25 G (bakteria *Pseudomonas fluorescens*), 60.3AA (bakteria *Lycobacter sp.),* AF74AAPAE NI oprysk 0,1% (*Bacillus sp*.) mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie w ekologicznej i integrowanej ochronie pomidora i marchwi przed najgroźniejszymi chorobami.

Tabela 1. Wpływ zaprawiania nasion i opryskiwania roślin marchwi wybranymi mikroorganizmami na ich zdrowotność (Skierniewice 2016)

Środek biologiczny/sposób aplikacji	Doświadczenie wazonowe siewki po 6 tyg. od siewu				Doświadczenie polowe % porażonej pow. roślin			
					mączniak prawdziwy		alternarioza	
	porażone*	niewzeszłe	zdrowe	fitot ok.	19.08	20 .09	26.08	27.09
1. Kontrola	5,3 a	21,3 a	72,0 e	0	3,9 a	16,5 a	6,1 a	9,8 a
2. Standard I Trianum zaprawianie nasion	3,5 b	17,5 c	79,0 a	0	2,1 b	14,6 b	4,2 b	7,3 b
3. Standard II Beta chicol zaprawianie nasion	3,8 b	19,3 b	77,0 b	0	2,2 b	14,2 b	4,4 b	7,3 b
4. Zaprawianie nasion Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp*	3,8 b	21,0 ab	73,0 d	0	2,1 b	14,2 b	4,4 b	7,3 b
5. Zapr. nasion Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis*	3,8 b	20,0 b	74,8 c	0	2,0 b	14,6 b	4,1 b	7,4 b
6. Standard III Oprysk Trianum 2,4 g na 2 l	-	-	-	0	2,1 b	14,9 b	4,2 b	7,4 b
7. Standard IV Oprysk roślin BetaChicol 1,0 %	-	-	-	0	2,1 b	14,7 b	4,3 b	7,4 b
8. Symbio Bank Sp 82 AB oprysk 0,1% (*Bacillus sp)*	-	-	-	0	2,0 b	14,7 b	4,2 b	7,4 b
9. NA2T2 oprysk 0,1% (bakteria *Klebsiella oxycota*)	-	-	-	0	2,2 b	14,7 b	4,2 b	7,3 b
10.Pi25 G oprysk 0,1% (bakteria *Pseudomonas fluorescens*)	-	-	-	0	2,1 b	14,6 b	4,3 b	7, 3 b
11. 60.3AA oprysk 0,1% (bakteria *Lycobacter sp.)*	-	-	-	0	2,0 b	14,8 b	4,1 b	7,4 b
12.AF74AAPAE NI oprysk 0,1% (*Bacillus sp*.)	-	-	-	0	2,0 b	14,5 b	4,2 b	7,4 b

* siewki porażone przez grzyby z rodzaju *Fusarium, Rhizoctonia*, i organizm grzybopodobny *Pythium*

Tabela 2. Wpływ zaprawiania nasion i opryskiwania roślin pomidora wybranymi mikroorganizmami na ich zdrowotność (Skierniewice 2016)

Środek biologiczny/sposób aplikacji	Doświadczenie wazonowe siewki po 6 tygodniach od siewu				Doświadczenie polowe zaraza ziemniaka % porażonej pow. roślin	
	porażone*	niewzeszłe	zdrowe	fitotoks..	19.08	20 .09
1. Kontrola	2,5 a	9,5a	86 a	0	3,2 a	6,3 a
2. Standard I Trianum zaprawianie nasion	0,5 b	5,3 b	94,3 b	0	1,9 b	4,8 b
3. Standard II Beta chicol zaprawianie nasion	0,8 b	5,5 b	93,8 b	0	1,4 b	4,2 b
4. Zaprawianie nasion Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp*	0,4 b	6,3 b	93,8 b	0	1,5 b	4,3 b
5. Zapr. nasion Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilis*	0,4 b	5,8 b	94,8 b	0	2,0 b	4,8 b
6. Standard III Oprysk roślin Trianum 2,4 g na 2 l wody	-	-	-	0	2,0 b	4,8 b
7. Standard IV Oprysk roślin BetaChcol 1,0 %	-	-	-	0	1,9 b	4,7 b
8. Symbio Bank Sp 82 AB oprysk 0,1% (bakteria *Bacillus sp)*	-	-	-	0	1,9 b	4,7 b
9. NA2T2 oprysk 0,1% (bakteria *Klebsiella oxycota*)	-	-	-	0	2,0 b	4,7 b
10.Pi25 G oprysk 0,1% (bakteria *Pseudomonas fluorescens*)	-	-	-	0	1,9 b	4,6 b
11. 60.3AA oprysk 0,1% (bakteria *Lycobacter sp.)*	-	-	-	0	1,9 b	4,8 b
12.AF74AAPAE NI oprysk 0,1% (bakteria *Bacillus sp*.)	-	-	-	0	1,9 b	4,8 b

* siewki porażone przez grzyby z rodzaju *Fusarium, Rhizoctonia*, i organizm grzybopodobny *Pythium*

PODZADANIE 4.

Opracowanie wyników oraz zaleceń mikrobiologicznego zaprawiania nasion oraz aplikacji pożytecznych mikroorganizmów w uprawach nasiennych badanych gatunków roślin warzywnych

WSTĘP

Badania wychodzą naprzeciw oczekiwaniom producentów nasion roślin warzywnych w systemach ekologicznych. Opracowany skład jakościowy i ilościowy kompleksowych zapraw mikrobiologicznych, charakteryzujących się długotrwałym i skutecznym ochronnym fungistatycznym oddziaływaniem, poszerzy asortyment środków biologicznych niezbędnych w uprawach metodami ekologicznymi, zwiększy ekonomiczną opłacalność produkcji nasion oraz ich potencjał plonotwórczy. Wyniki uzyskane w ramach projektu zostaną wykorzystane w produkcji nasion metodami ekologicznymi, co zwiększy jej opłacalność i konkurencyjność na rynku europejskim. Pro-środowiskowe cele projektu są zgodne z priorytetami Komisji Europejskiej w zakresie ograniczenia stosowania pestycydów i ochrony środowiska naturalnego. Innowacyjnym i rozwojowym działaniem w ramach projektu jest opracowanie nowych bioproduktów mikrobiologicznych przydatnych w produkcji zapraw biologicznych, substratów i komponentów wykorzystywanych w otoczkowaniu nasion a także nowych technologii aplikacji pożytecznych mikroorganizmów w nasiennej produkcji wielkotowarowej. Metody te są dostosowane do gatunku uprawianych roślin nasiennych oraz warunków ich wzrostu. Ważnym aspektem zadania było określenie praktycznych zaleceń stosowania mikrobiologicznych zapraw nasiennych oraz nowych bioproduktów (dawki, terminy i częstotliwość ich stosowania) dla badanych nasiennych gatunków roślin warzywnych.

METODYKA

Zgodnie z harmonogramem zestawiono wyniki analiz laboratoryjnych oraz doświadczeń polowych i szklarniowych. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu analizy wariancji R.A. Fishera zgodnie z układem doświadczeń. Do oceny różnic między średnimi, uzyskanymi w doświadczeniach polowych, użyto wielokrotnego testu t-Duncana przyjmując poziom istotności 5%. Na podstawie zestawień wyników uzyskanych w podzadaniach 1-3 określono parametry stosowania i sposoby aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych i biopreparatów w produkcji nasiennej pomidora odmiany ACE VF i marchwi odmiany Napoli F1 w pierwszym roku uprawy.

Opracowano zalecenia stosowania biologicznego zaprawiania nasion oraz aplikacji pożytecznych mikroorganizmów na plantacjach nasiennych badanych gatunków roślin warzywnych. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono raport z realizacji zadania.

WYNIKI

1. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń laboratoryjnych i polowych wykazano: Korzystne oddziaływanie nowo zastosowanych mikroorganizmów pożytecznych Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilus* na jakość i zdrowotność nasion marchwi odmiany Napoli F1 oraz pomidora ACE VF, ich metabolizm oraz aktywność fizjologiczną oraz wartość przechowalniczą (poprzez spowalnianie procesów starzenia nasion). Mogą one z powodzeniem być składnikami komercyjnych zapraw mikrobiologicznych. po przeprowadzeniu testów w drugim roku uprawy.
2. Bioprodukty mikrobiologiczne Symbio Bank Sp 82 AB *Bacillus sp* i Symbio Bank Sp 82 AA *Bacillus pumilus* zastosowane do osłony nasion marchwi i pomidora chronią ich siewki przed porażeniem przez *Pythium* spp., *Fusarium* spp. i *Rhizoctonia solani* - głównymi sprawcami zgorzeli siewek. Mogą one znaleźć zastosowanie w przyszłości jako komponent zapraw biologicznych w ekologicznej i integrowanej ochronie marchwi i pomidora. Należy je aplikować donasiennie, mocząc nasiona wymienionych gatunków warzyw w zawiesinie izolatów bakterii przez 20 minut w temperaturze 20^{o}C.
3. Wykazano perspektywiczne możliwości zastosowania wybranych izolatów Symbio Bank Sp 82 AB (*Bacillus* sp*),* NA2T2 (bakteria *Klebsiella oxycota*), Pi25 G (bakteria *Pseudomonas fluorescens*), 60.3AA (bakteria *Lycobacter sp.),* AF74AAPAE NI (*Bacillus sp*.) w ekologicznej i integrowanej ochronie roślin marchwi i pomidora przed najgroźniejszymi chorobami. U marchwi ograniczały występowanie *Alternaria dauci* – sprawcy alternariozy naci marchwi oraz *Erysiphe heraclei* – sprawcy mączniaka prawdziwego. U pomidora hamowały rozwój *Phytophthora infestans* – sprawcy zarazy ziemniaka. Najskuteczniejszym sposobem aplikacji izolatów okazał się trzykrotny oprysk roślin zawiesiną bioproduktów w stężeniu 0,1%
4. Izolaty nie powodowały efektów fitotoksyczności, odznaczały się stabilnością mikrobiologiczną. Efekty ochronne utrzymywały się od początku aplikacji aż do zbiorów roślin.

Uzyskane wyniki upowszechniano producentom nasion ekologicznych w czasie wizyt i lustracji w ich gospodarstwach, między innymi w Gospodarstwie Ekologicznym w Pacynie Remki oraz Gospodarstwie Ekologicznym Góra woj. Dolnośląskie. Weryfikowano je również podczas wyjazdów do wyspecjalizowanych w tym zakresie laboratoriów oceny nasion i poprawą ich jakości metodami ekologicznymi. Inną formą upowszechniania były porady telefoniczne. Obecnie są przygotowywane publikacje naukowe.

Przedstawione zadania badawcze dotyczące biologicznego zaprawiania nasion obejmują pierwszy etap badań. Pełną realizację badań zaplanowano na okres trzech lat. Przewiduje się

więc kontynuację podjętej tematyki, aby w pełni ocenić potencjał biotechnologiczny pożytecznych mikroorganizmów w ochronie nasion roślin warzywnych.

PODSUMOWANIE

Nowo opracowane metody i technologie osłony nasion roślin warzywnych przed chorobami, wzbogacone o pożyteczne mikroorganizmy glebowe, otwierają innowacyjną linię produkcji nasiennej warzyw w systemach ekologicznych, zapewniającą kompleksową ochronę nasion i roślin warzywnych oraz indukcję ich odporności począwszy od nasion i stadium juwenilnego aż do dojrzałości zbiorczej. Nowo opracowane technologie i bioprodukty mikrobiologiczne będą testowane w kolejnych latach badań na nasiennikach marchwi (drugi rok uprawy) i przekształcone w produkty komercyjne. Ze względu na niedobór skutecznych zapraw biologicznych i środków biologicznych do ochrony plantacji nasiennych, istnieje pilna potrzeba wprowadzenia do obrotu tego typu bioproduktów, które są konkurencyjne i bardziej skuteczne od istniejących na rynku preparatów zagranicznych. Oczekują tego zarówno producenci warzyw tzw. konsumpcyjnych, jak i polski sektor nasienny.

Wyniki uzyskane w ramach realizacji zadania pozwolą producentom biologicznych środków ochrony w tym zapraw biologicznych na zwiększenie produkcji i poszerzenie asortymentu oferowanych biopreparatów o środki nowej generacji, wzbogacone mikrobiologicznie w konsorcja szczepów bakterii oddziałujących kompleksowo – ochronnie i stymulująco na odporność i wzrost roślin w warunkach stresowych, już od najwcześniejszych stadiów rozwojowych (kiełkowanie, faza siewki i formowanie pierwszych liści właściwych). Wymiernym efektem dla producentów roślin warzywnych na nasiona będzie wzrost plonów roślin w pierwszym roku produkcji (faza wegetatywna) oraz plonu nasion a w rezultacie zwiększenie opłacalności ekonomicznej produkcji nasion roślin warzywnych. Wdrożenie innowacyjnych biopreparatów i wprowadzenie nowych skutecznych zapraw wzbogaconych mikrobiologicznie do ekologicznej produkcji nasiennej warzyw, zwiększy konkurencyjność ekologicznych producentów nasion i przedsiębiorstw nasiennych, zachęci nowych producentów do przestawiania (konwersji) gospodarstw na ekologiczną produkcję nasion, zwiększy areał upraw nasiennych oraz potencjał plonotwórczy roślin.

Zaproponowane i zrealizowane zadanie wpisuje się w strategię rozwoju rolnictwa ekologicznego poprzez opracowanie innowacyjnych bioproduktów i technologii dla poprawy jakości i zdrowotności nasion oraz roślin matecznych (nasienników) w ekologicznych uprawach roślin warzywnych.

Istnieje potrzeba dalszego testowania bioproduktów mikrobiologicznych w drugim roku uprawy roślin dwuletnich – marchwi i innych gatunków z rodziny *Apiaceae,* w których największym problemem produkcji nasiennej jest wysokie porażenie nasion patogenami, przenoszonymi z nasionami na rośliny potomne.

ZALECENIA DLA PRAKTYKI

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń laboratoryjnych i polowych wskazują na:

● Skuteczność zastosowanych pożytecznych mikroorganizmów w poprawie jakości i zdrowotności nasion pomidora odmiany ACE VF i marchwi odmiany Napoli F1 oraz metabolizmu nasion i ich wartości przechowalniczej (poprzez spowolnienie procesów starzenia).

● Wysoką przeżywalność oraz właściwości antagonistyczne zastosowanych szczepów bakterii, wobec patogenów zasiedlających nasiona oraz rośliny marchwi i pomidora.

● Stabilność mikrobiologiczną, efekty ochronne utrzymują się od początku aplikacji aż do zbiorów roślin.

● Możliwość zastosowania nowych bioproduktów mikrobiologicznych do zaprawiania biologicznego nasion marchwi i pomidora oraz ochrony roślin w uprawach w systemach ekologicznych i integrowanych

● Możliwość wykorzystania nowo opracowanych bioproduktów jako skutecznych i ekonomicznie opłacalnych metod ochrony roślin warzywnych.

● Możliwość zwiększenie konkurencyjności i rozwoju firm sektora rolnictwa ekologicznego w Polsce.