



**Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach
Zakład Szkółkarstwa i Nasiennictwa
Pracownia Nasiennictwa**

Sprawozdanie z realizacji zadania w 2017 roku

Warzywnictwo w tym uprawa ziół metodami ekologicznymi - badania w zakresie optymalizacji produkcji nasiennej warzyw, ze szczególnym uwzględnieniem ograniczonego zakresu dozwolonych środków produkcji w uprawach ekologicznych. Wykorzystanie pożytecznych mikroorganizmów i środków ekologicznych do biologicznego zaprawiania nasion i materiału rozmnożeniowego (wysadki) oraz zwalczania fitopatogenów w uprawach nasiennych marchwi

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, mgr Agnieszka Czajka, mgr Paweł Trzciniński, mgr Ewa Chojnowska, mgr Renata Górska, Halina Januszkiewicz, Anna Gręda

WSTĘP

Celem badań było opracowanie nowej, skutecznej metody osłony biologicznej nasion, roślin i materiału rozmnożeniowego (wysadków) marchwi uprawianej na nasiona (dwuletni cykl uprawy) przed fitopatogenami, z wykorzystaniem antagonistycznego potencjału mikroorganizmów pożytecznych, zgromadzonych w SYMBIO BANKU Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz wybranych, komercyjnych środków mikrobiologicznych i biotechnicznych.

Opracowane zostały innowacyjne metody kompleksowej osłony biologicznej marchwi uprawianej w systemie ekologicznym dla dwuletniego cyklu produkcyjnego: nasion (dwóch odmian), materiału rozmnożeniowego (wysadków) oraz roślin nasiennych przed fitopatogenami z wykorzystaniem konsorcjów mikroorganizmów pożytecznych zgromadzonych w SYMBIO BANKU Pracowni Rizosfery Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz komercyjnych środków mikrobiologicznych i biotechnicznych.

Oceniony został wpływ nowo opracowanych metod biologicznej osłony na jakość i zdrowotność nasion, ich procesy metaboliczne, wschody i wzrost roślin w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, szklarniowych i uprawach polowych oraz możliwości ich stosowania w drugim roku uprawy marchwi na nasiona. W tym aspekcie **opracowano innowacyjną metodę biologicznej ochrony nasienników marchwi przed chorobami oraz stymulacji ich odporności na stres abiotyczny z wykorzystaniem bioproduktów Symbio Banku oraz komercyjnych preparatów biologicznych.** W badaniach potwierdzono także zasadność wdrożenia do produkcji opracowanej nowatorskiej technologii biologicznego zaprawiania nasion (przeznaczonych do produkcji ekologicznej), polegającej 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 marchwi i nasienników (w II roku uprawy) przed chorobami, wzbogacone o pożyteczne mikroorganizmy glebowe, otwierają innowacyjną linię produkcji nasiennej warzyw w systemach ekologicznych, zapewniającą kompleksową ochronę nasion roślin, nasienników i materiału rozmnożeniowego (wysadków) oraz indukcję ich odporności począwszy od nasion i stadium juwenilnego aż do dojrzałości zbiorczej. Przeprowadzono również **identyfikację i wyizolowano nowe szczepy bakterii, wykazujących właściwości stymulacji wzrostu roślin oraz biologicznej ochrony nasion i roślin marchwi uprawianych na nasiona.** Nowo opracowane technologie i bioprodukty mikrobiologiczne będą testowane w kolejnych latach badań na nowych kreacjach marchwi i innych dwuletnich roślinach warzywnych, ze względu na naglące potrzeby sektora nasiennego w tym zakresie (niedobór ekologicznych nasion roślin warzywnych a zwłaszcza roślin dwuletnich). Powinny też być 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. 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 wyjąłowionych gleb, a finalnie - poprawy potencjału plonotwórczego roślin.

Podzadanie 1. Selekcja nowych szczepów mikroorganizmów oraz doskonalenie składu bioproduktów i konsorcjów najbardziej skutecznych w biologicznej osłonie nasion i roślin nasiennych marchwi przed patogenami.

WSTĘP

W ostatnich latach podejmuje się działania związane ze strategią zrównoważonego rozwoju rolnictwa, w tym rolnictwa ekologicznego, którego celem jest uzyskiwanie wysokiej jakości plonów, przy zachowaniu równowagi biologicznej ekosystemów. Efektem rozwoju rolnictwa ekologicznego jest pojawienie się na rynku biopreparatów, w tym bionawozów, stymulatorów wzrostu i rozwoju roślin pochodzenia organicznego (roślinnego lub zwierzęcego), produkowanych między innymi na bazie naturalnych ekstraktów z roślin lądowych i wodnych oraz pożytecznych mikroorganizmów. Wykorzystywane są one w nawożeniu i w ochronie roślin, ponieważ zawierają żywe mikroorganizmy pasożytnicze, drapieżne lub antagonistyczne w stosunku do patogenów roślinnych. Liczne badania wskazują, że mikroorganizmy żyjące w naturalnej symbiozie z roślinami uwalniają składniki niezbędne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, zwierząt i ludzi. W tym kontekście, we wszystkich zbiorowiskach ważne są właściwe proporcje, rozwój i aktywność mikrobiologicznych komponentów ryzosfery, obejmującej nie tylko glebę otaczającą korzeń, ale także organizmy symbiotyczne t.j. bakterie ryzosferowe, grzyby mikroskopowe, grzyby saprotroficzne czy saprofityczne, drapieżne pierwotniaki i nicienie. Aktywność pożytecznej mikroflory w ryzosferze jest nie tylko jednym z czynników warunkujących prawidłowy wzrost roślin, ale także ważnym potencjalnym źródłem ich odporności na choroby infekcyjne. Symbiotyczne mikroorganizmy glebowe t.j. grzyby mikroskopowe i bakterie ryzosferowe stymulują wzrost i plonowanie roślin uprawnych. **Bakterie ryzosferowe z grupy PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)** wspomagają wzrost i rozwój roślin, poprawiają ich stan zdrowotny oraz indukują odporność roślin na choroby i szkodniki. Pożyteczne mikroorganizmy zasiedlające korzenie utrudniają kolonizację korzeni przez organizmy patogeniczne, inne zaś stanowią konkurencję pokarmową lub wydzielają do gleby antybiotyki i inne substancje hamujące rozwój patogenów glebowych. Wiele prowadzonych na świecie badań wykazuje pożyteczne oddziaływanie symbiotycznych mikroorganizmów w zwiększaniu efektywności pobierania z gleby składników mineralnych (głównie P, N, K, Zn, Mn, Cu, Mo), podaje, że chronią korzenie roślin uprawnych przed patogenami i szkodnikami, dzięki czemu mają również korzystny wpływ na wzrost i plonowanie roślin oraz na kiełkowanie nasion, zwłaszcza w warunkach stresu. Grzyby mikroskopowe zasiedlające ryzosferę aktywnie ograniczają liczebność niektórych patogenów w glebie (zjawisko nadpasożytnictwa), gdyż poprzez konkurencję o zasoby pokarmowe utrudniają rozwój innych patogenicznych gatunków grzybów. Niektóre gatunki grzybów strzępkowych, dzięki produkowanym związkom organicznym, udostępniają trudnodostępne dla roślin związki mineralne, m.in. fosfor, żelazo i inne pierwiastki biogenne.

Preparaty mikrobiologiczne dostępne na polskim rynku zarówno w formie preparatów płynnych jak i stałych substratów, zawierają szczepy wyizolowane z warunków klimatycznych innych niż warunki polskie. Opracowanie i wdrożenie do praktyki konsorcjum zawierającego rodzime szczepy bakterii ryzosferowych spowoduje poprawę wzrostu i plonowania roślin oraz właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych gleby, co pozwala na ograniczenie mineralnego nawożenia roślin.

Zastosowanie pożytecznych mikroorganizmów wykazujących właściwości antagonistyczne do grzybów patogenicznych może w znacznym stopniu ograniczyć porażenie nasion i siewek roślin przez patogeny, takie, jak np. grzyby z rodzajów *Fusarium* i *Verticillium*. Z tego powodu opracowywane są metody ochrony nasion i siewek marchwi przed patogenami

poprzez zastosowanie konsorcjów pożytecznych mikroorganizmów.

CEL BADAŃ

Celem badań była selekcja oraz identyfikacja nowych szczepów bakterii wykazujących właściwości stymulacji wzrostu roślin oraz biologicznej ochrony nasion i roślin marchwi uprawianych na nasiona. Równolegle doskonalono i wykonano analizy identyfikacji szczepów bakterii, które testowano w latach 2016-2017. W ramach prac przeprowadzono ponowną analizę antagonizmu bakterii *Paenibacillus* sp. (szczep SYMBIO BANKU: AF74AA) i *Lysobacter* sp. (szczep SYMBIO BANKU: 60.3AA) w stosunku do patogenicznych grzybów z rodzajów *Verticillium* i *Fusarium*. Wykonano testy skuteczności bakterii ryzosferowych w antagonistycznym oddziaływaniu przeciwko grzybom z rodzajów *Verticillium* i *Fusarium*.

MATERIAŁ I METODY

Zgromadzenie materiałów oraz harmonizacja zadania z wykonawcami planowanych doświadczeń laboratoryjnych i polowych

Do prac związanych z izolacją pożytecznych mikroorganizmów z gleby pozyskano próbki gleby z ekologicznych plantacji marchwi. Próbki gleby wymieszano w stosunku 1:3 z jałowym keramzytem, o wielkości ziaren ≤ 4 mm. Na tak przygotowane próbki gleby wysiano nasiona marchwi odmiany Nipomo (producent: Bejo) i kultywowano je w komorze wzrostowej przez 3 tygodnie, w temperaturze 25°C i fotoperiodzie 12/12, do momentu uzyskania roślin o wysokości ok. 2 cm. Rośliny pobrano w taki sposób, aby na powierzchni korzeni pozostawała cienka warstwa gleby ryzosferowej.

Korzenie roślin umieszczono w jałowej wodzie destylowanej i wytrząsano przez około 60 sekund przy prędkości ok. 3750 obrotów na minutę (RPM). Z uzyskanej zawiesiny przygotowano serie kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Z każdej rozcieńczonej próbki pobierano 100 μ l zawiesiny, którą rozprowadzano na powierzchni następujących pożywek agarowych: Burka, S1, Rose Bengal Chloramphenicol agar oraz agar z chityną koloidalną. Zainokulowane szalki umieszczono w temperaturze 26°C i przechowywano przez 72 godziny (pożywki Burka i S1), 5-7 dni (pożywka Rose Bengal Chloramphenicol Agar) lub przez 14 dni (agar z chityną koloidalną).

Kolonie bakteryjne i grzybowe, które uzyskano na w/w pożywkach pasażowano na szalki z pożywką tryptonowo sojową (dalej TSA), agar ziemniaczano-glukozowy (BTL) lub 10% TSA.

Selekcja najbardziej wartościowych szczepów bakterii oraz grzybów do biologicznej ochrony nasion i roślin marchwi uprawianych na nasiona

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 takich jak: fosforan wapnia (pożywka wg Pikovskiej).
- Syntezy sideroforów (pożywka CAS).
- Wiązania azotu atmosferycznego (pożywka Nfb).
- Syntezy kwasu indoliloctowego (IAA) z l-tryptofanu (płynna żywka tryptonowo sojowa z dodatkiem 5 mM l-tryptofanu. Do reakcji kolorymetrycznej użyto odczynnika Salkovskiego).

Do badań *in vitro* nad antagonizmem bakterii w stosunku do patogenicznych grzybów z rodzajów *Verticillium* i *Fusarium* zastosowano dwa szczepy bakterii ryzosferowych:

Paenibacillus sp. (szczep SYMBIO BANKU: AF74AA) i *Lysobacter* sp. (szczep SYMBIO BANKU: 60.3AA) oraz trzy szczepy grzybów patogenicznych: *Verticillium dahliae* (szczep uzyskany 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 tak przygotowane pożywki wyłożono krążki pożywek agarowych, na których hodowano bakterie ryzosferowe. Następnie szalki inkubowano przez 168 godzin, w temperaturze 26°C. Po inkubacji określano, w milimetrach, strefy zahamowania wzrostu testowanych grzybów.

Wyselekcjonowane izolaty bakterii wykazujące właściwości stymulacji wzrostu oraz biologicznej ochrony nasion i roślin marchwi zostały przygotowane do identyfikacji i przechowywane w temperaturze -80°C.

Opracowanie składu mikrobiologicznych konsorcjów do biologicznej osłony nasion i roślin marchwi uprawianych na nasiona.

W wyniku przeprowadzonych analiz opracowano nowe, innowacyjne konsorcja mikrobiologiczne, przeznaczone do biologicznej osłony nasion i roślin marchwi uprawianych na nasiona:

Konsorcjum nr 1

- 1 szczep należący do gatunku bakterii *Ensifer adhaerens* (nr szczepu SYMBIOBANKU: N121AB). Bakterie wiążące azot atmosferyczny należące do gatunku *Ensifer adhaerens* ograniczały w badaniach *in vitro* populację innych bakterii glebowych, w tym patogenów glebowych. Mechanizm działania polega na niszczeniu przez bakterie *Ensifer adhaerens* komórek bakterii patogenicznych poprzez lizę ściany komórkowej.
- 3 szczepy należące do rodzaju *Streptomyces* sp. (nr. szczepów SYMBIOBANKU: AF121AB1, AF121AC, AF121AC2) – w/w szczepy bakterii z rodzaju *Streptomyces* ograniczały populację patogenicznych grzybów w glebie. Mechanizm działania bakterii z rodzaju *Streptomyces* polega na produkcji enzymów chitynolitycznych oraz metabolitów wtórnych, toksycznych dla grzybów patogenicznych.

Konsorcjum nr 2

- 2 szczepy należące do gatunku *Bacillus cereus* (nr. szczepów SYMBIOBANKU: AF121AB2, AF121AB4). Bakterie należące do gatunku *Bacillus cereus* w warunkach *in vitro* ograniczały wzrost grzybów należących do *Fusarium* spp. Mechanizm działania polega na produkcji enzymów chitynolitycznych oraz metabolitów wtórnych toksycznych dla grzybów patogenicznych.
- 1 szczep należący do rodzaju *Phyllobacterium* (nr. szczepu SYMBIOBANKU: N121AA). Bakterie należące do rodzaju *Phyllobacterium* wiążą azot atmosferyczny zwiększając jego dostępność dla roślin.
- 1 szczep należący do rodzaju *Rhizobium* (nr. szczepu SYMBIOBANKU: N121AD). Bakterie należące do rodzaju *Rhizobium* wiążą azot atmosferyczny zwiększając jego dostępność dla

roślin.

Przygotowanie zawiesin bakteryjnych do badań (podzadanie 2 i 3):

Szczepy bakterii kultywowano na pożywce tryptonowo sojowej przez 48 godzin w temperaturze 28°C, następnie z tak przygotowanej hodowli przeniesiono ok. 10 µl komórek bakteryjnych do kolby Erlenmayera zawierającej 50% płynną pożywkę tryptonowo sojową. Szczepy bakterii inkubowano 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 i ochrony roślin nasiennych.

Metody Identyfikacji:

Bakterie identyfikowano na podstawie analizy utleniania związków węgla przy użyciu systemu Biolog (Biolog Inc.) oraz analizy sekwencji genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. W przypadku gdy wyniki analizy biochemicznej i sekwencji genu 16S rRNA nie umożliwiały identyfikacji gatunku, określano rodzaj bakterii.

Identyfikacja szczepów bakterii z użyciem technik molekularnych

Material i metody

W ramach Podzadania 1 ‘Selekcja nowych szczepów mikroorganizmów oraz doskonalenie składu bioproduktów i konsorcjów najbardziej skutecznych w biologicznej osłonie nasion i roślin nasiennych marchwi przed patogenami’ wyizolowano z gleby, a następnie wyselekcjonowano 10 szczepów bakterii, których właściwości wskazywały na przydatność do poprawy kiełkowania nasion poprzez biologiczną osłonę materiału siewnego przed patogenami oraz do poprawy wschodów roślin i stymulacji wzrostu warzywnych roślin nasiennych.

Identyfikację szczepów bakterii technikami molekularnymi przeprowadzono dla 10 izolatów wyselekcjonowanych ze względu na właściwości stymulacji wzrostu roślin lub ochrony roślin przed patogenami: N121AA, N121AB, N121AC, N121AD, AF121AB1, AF121AB2, AF121AB3, AF121AB4, AF121AC oraz AB121AC2. Materiałem biologicznym były kolonie bakterii kultywowane na pożywkach mikrobiologicznych. Ekstrakcję DNA przeprowadzono z użyciem zestawu komercyjnego GeneMatrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx) do izolacji DNA z bakterii i drożdży. Koncentrację DNA określono spektrofotometrycznie, przy długości fali 260 nm. Do analiz sporządzono rozcieńczenia 10ng/µl DNA.

Identyfikację izolatów bakterii oparto na analizie zróżnicowania mikroorganizmów w obrębie genu rybosomalnego 16S rRNA. Analiza genów kodujących rRNA umożliwia identyfikację rodzajów i gatunków bakterii oraz ocenę ich podobieństwa genetycznego (Mulet i in. 2011, Susilowati i in. 2010). Przydatność tej analizy do identyfikacji bakterii wynika z faktu, że geny kodujące rRNA występują powszechnie u mikroorganizmów i zawierają domeny zmienne i konserwowane (Janssen 2006, Větrovský i Baldrian 2013), a dostępna publicznie baza danych sekwencji małej podjednostki genu rybosomalnego 16S rRNA bakterii zawiera

ponad 4 miliony sekwencji (Yarza i in. 2014). Do rozróżniania izolatów bakterii zastosowano także technikę rep-PCR, która umożliwia identyfikację bakterii na poziomie podgatunku lub szczepu (Ishii i Sadowsky 2009).

Do testów opartych na analizie zróżnicowania genu kodującego 16S rRNA zastosowano technikę RFLP (ang. Restriction Fragments Length Polymorphism; polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) oraz analizę sekwencji. Amplifikację 16S rRNA przeprowadzono w 35 cyklach (94 °C x 1 min, 55 °C x 1 min, 72 °C x 2 min), z użyciem starterów 27/1492r (Lane 1991). Analizę restrykcyjną 16S rRNA przeprowadzono z użyciem enzymów FastDigest HaeIII, RsaI, TaqI oraz *MboI* (ThermoScientific®). Reakcje rep-PCR przeprowadzono z użyciem starterów ERIC i BOX (Louws i in. 1994), w następujących warunkach termicznych: ERIC-PCR – 42 cykle (94°C x 1 min., 52°C x 1.5 min., 65°C x 8 min.); BOX-PCR – 37 cykli (94°C x 1 min., 40°C x 2 min., 72°C x 2 min.). Łącznie przeprowadzono reakcje PCR z użyciem 3 par starterów (Tab. 1).

Produkty amplifikacji 16S rRNA oraz produkty reakcji rep-PCR rozdzielano w 1,6% żelu agarozowym. Fragmenty uzyskane techniką RFLP rozdzielano w 2,5% żelu agarozowym. Żele agarozowe barwiono w bromku etydydy i wizualizowano w świetle UV. Identyfikację szczepów bakterii na podstawie uzyskanych sekwencji przeprowadzono przez porównanie z danymi zgromadzonymi w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 1. Charakterystyka biochemiczna szczepów bakterii wykazujących przydatność do stymulacji wzrostu i rozwoju oraz biologicznej ochrony nasion i roślin marchwi.

Analiza Szczep	Antagonizm do <i>Fusarium</i> spp	Rozpuszczanie Ca ₃ (PO ₄) ₂	Synteza siedoforów	Wiązanie azotu atmosferycznego	Synteza IAA
N121AA	-	+	+	+	-
N121AB	-	+	+	+	-
N121AC	-	+	+	+	-
N121AD	-	+	+	+	-
AF121AB1	+	-	+	-	-
AF121AB2	+	-	+	-	-
AF121AB3	+	-	+	-	-
AF121AB4	+	-	+	-	-
AF121AC	+	-	+	-	-
AB121AC2	+	-	+	-	-

Optymalizacja składu nośników dla konsorcjów mikrobiologicznych do zaprawiania nasion i ochrony roślin nasiennych.

Z uwagi na to, że szczep bakterii *Ensifer adhaerens* nie przeżywał ‘wysuszenia’, nie było możliwe przygotowanie nośnika w formie stałej, zawierającego stabilną populację w/w bakterii. Z tego powodu zastosowano zaprawianie nasion z użyciem proponowanego konsorcjum poprzez zanurzanie nasion w zawiesinie bakteryjnej.

Tabela 2. Gęstość populacji bakterii uzyskana podczas hodowli w płynnych pożywkach.

Szczep	Hodowla w pożywce płynnej tryptonowo sojowej [jtk x 10 ⁹ x ml ⁻¹].	Hodowla w 20% pożywce płynnej tryptonowo sojowej [jtk x 10 ⁹ x ml ⁻¹].	Uwagi:
N121AB	0,82	0,65	-
AF121AB1,	0,0006*	0,02*	Gęstość populacji oszacowana po homogenizacji kultury bakteryjnej w mikserze laboratoryjnym.
AF121AC,	0,0007*	0,01*	Gęstość populacji oszacowana po homogenizacji kultury bakteryjnej w mikserze laboratoryjnym.
AF121AC2	0,0006*	0,01*	Gęstość populacji oszacowana po homogenizacji kultury bakteryjnej w mikserze laboratoryjnym.

Hodowla prowadzona w łaźni wodnej z wytrząsaniem; czas inkubacji: 72 godziny; temperatura hodowli 28°C

* - promieniowce hodowano w łaźni wodnej z wytrząsaniem; czas inkubacji: 120 godzin; temp. hodowli 28°C

Na podstawie testów wykonanych w latach 2016 i 2017 r. stwierdzono wysoką 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. Antagonistyczne właściwości testowanych szczepów bakterii w stosunku do grzybów patogenicznych *Verticillium dahliae* oraz *Fusarium* spp. umożliwiły włączenie ich do nowo opracowanego konsorcjum mikrobiologicznego. Konsorcjum to posłużyło do biologicznego zaprawiania nasion roślin warzywnych i wykazało dużą skuteczność ochrony nasion przed patogenami.

Tabela 3. Hamowanie wzrostu patogenicznego grzyba *Verticillium dahliae* przez bakterie ryzosferowe.

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]
<i>Lysobacter</i> sp. (60.3AA)	8,3 ± 1,5	12.5 ± 1.5	6,5 ± 1	5.7 ± 1
<i>Paenibacillus</i> sp (AF74AA)	9,3 ± 1,5	7.5 ± 1.5	6,5 ± 1	6.8 ± 1

Tabela 4. Hamowanie wzrostu patogenicznego grzyba *Fusarium* sp. (szczep: *Fusarium* AH) przez bakterie ryzosferowe.

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]
<i>Lysobacter</i> sp. (60.3AA)	8,3 ± 1,5	12.3 ± 1.5	3.5 ± 1.5	3.6 ± 1
<i>Paenibacillus</i> sp (AF74AA)	9,3 ± 1,5	7.7 ± 1.5	5.3 ± 1	4.3 ± 2

Tabela 5. Hamowanie wzrostu patogenicznego grzyba *Fusarium oxysporum*) (szczep: Phyto BD) przez bakterie ryzosferowe.

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]
<i>Lysobacter</i> sp. (60.3AA)	5,3 ± 1	4.0 ± 1.5	2 ± 1	2 ± 0.5
<i>Paenibacillus</i> sp (AF74AA)	6.3 ± 0.5	6.3 ± 1	4.3 ± 0.5	4.0 ± 0.5

Tabela 6. Profil biochemiczny bakterii *Ensifer adhaerens* (nr szczepu SYMBIO BANKU: N121AB)

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-Butyric 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	-				

Profil biochemiczny szczepu N121AB 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 marchwi. Pożywka: pożywka wg Burka.

Tabela 7. Profil biochemiczny bakterii *Ensifer adhaerens* (nr szczepu SYMBIO BANKU: N121AC)

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-Butyric 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	-				

Profil biochemiczny szczepu N121AC 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 marchwi (czarnoziem). Pożywka: pożywka wg Burka.

Tabela 8. Profil biochemiczny bakterii *Bacillus cereus* (nr szczepu SYMBIO BANKU: N121AB2)

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-Butyric 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	-				

Profil biochemiczny szczepu AF121AB2 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 marchwi (czarnoziem). Pożywka: agar z chityna koloidalną.

Tabela 9. Profil biochemiczny bakterii *Bacillus cereus* (nr szczepu SYMBIO BANKU: N121AB3)

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-Butyric 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	-				

Profil biochemiczny szczepu AF121AB3 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 marchwi. Pożywka: agar z chityna koloidalną.

Tabela 10. 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 (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-Butyric 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 11. 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. 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-Butyric 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 12. 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. 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-Butyric 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 13. 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. 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-Butyric 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 14. 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. Pożywka: pożywka z chityną koloidalną.

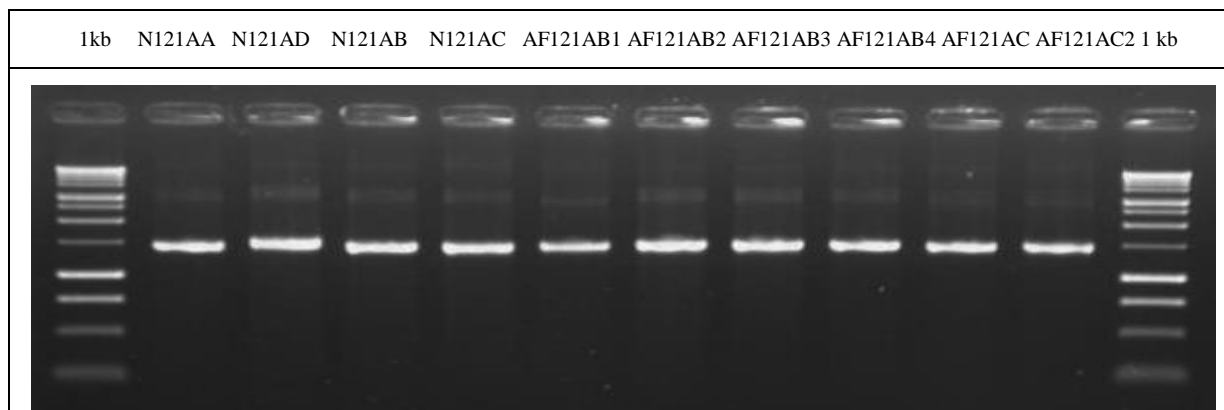
Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Utlenianie	Substrat	Wytwarzanie dehydrogenaz
Dextrin	+	Inosine	-	D-Gluconic Acid	+	pH 6	+
D-Maltose	+	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	-	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	+	Glucuronamide	-	1% NaCl	+
D-Cellobiose	+	D-Sorbitol	+	Mucic Acid	+	4% NaCl	-
Gentiobiose	+	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-Butyric 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 15. 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.

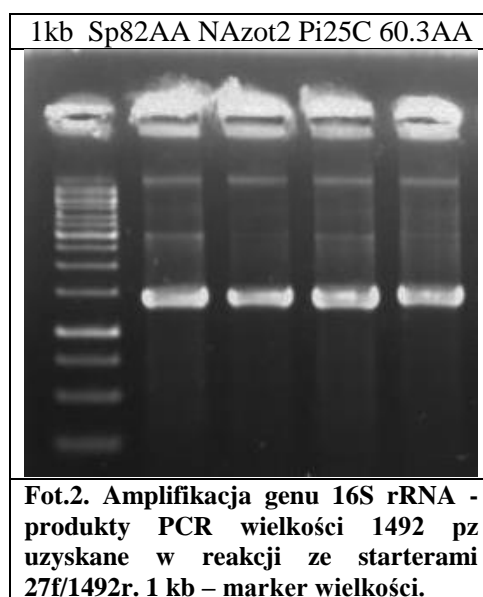
substrat	utlenianie	substrat	utlenianie	substrat	utlenianie	substrat	wytwarzanie dehydrogenaz
Dextrin	+	Inosine	-	D-Gluconic Acid	-	pH 6	+
D-Maltose	+	1% Sodium Lactate	+	D-Glucuronic Acid	-	pH 5	+
D-Trehalose	+	D-Serine	-	Glucuronamide	+	1% NaCl	+
D-Cellobiose	+	D-Sorbitol	+	Mucic Acid	-	4% NaCl	-
Gentiobiose	+	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-Butyric 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	-				

WYNIKI

W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR e starterami 27f/1492r uzyskano produkty wielkości ok. 1490 pz.



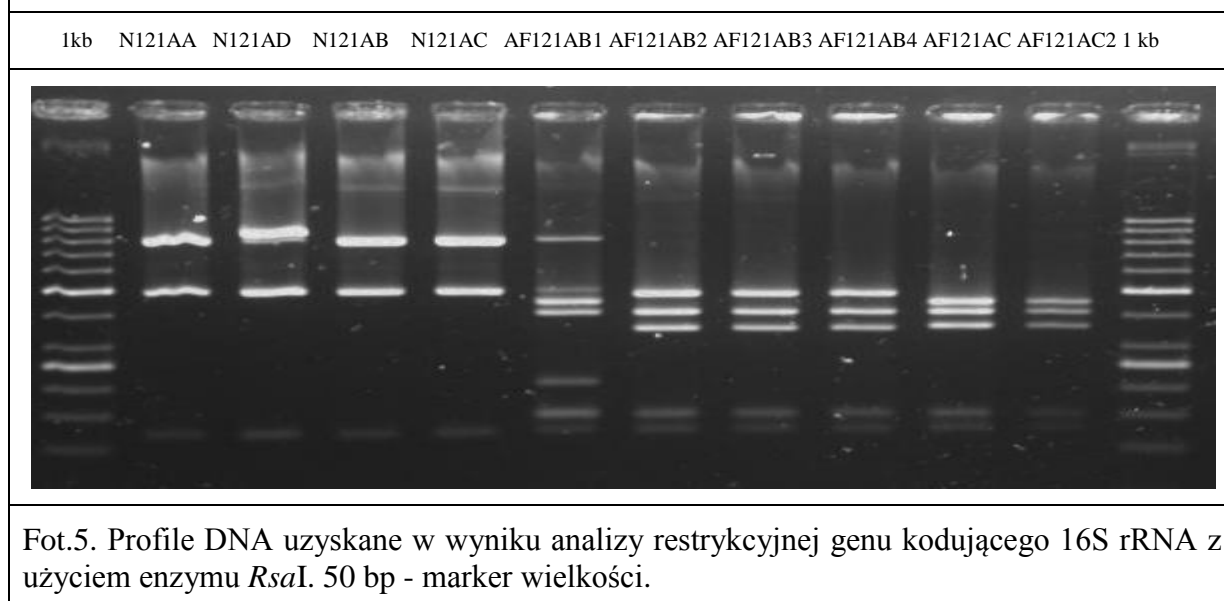
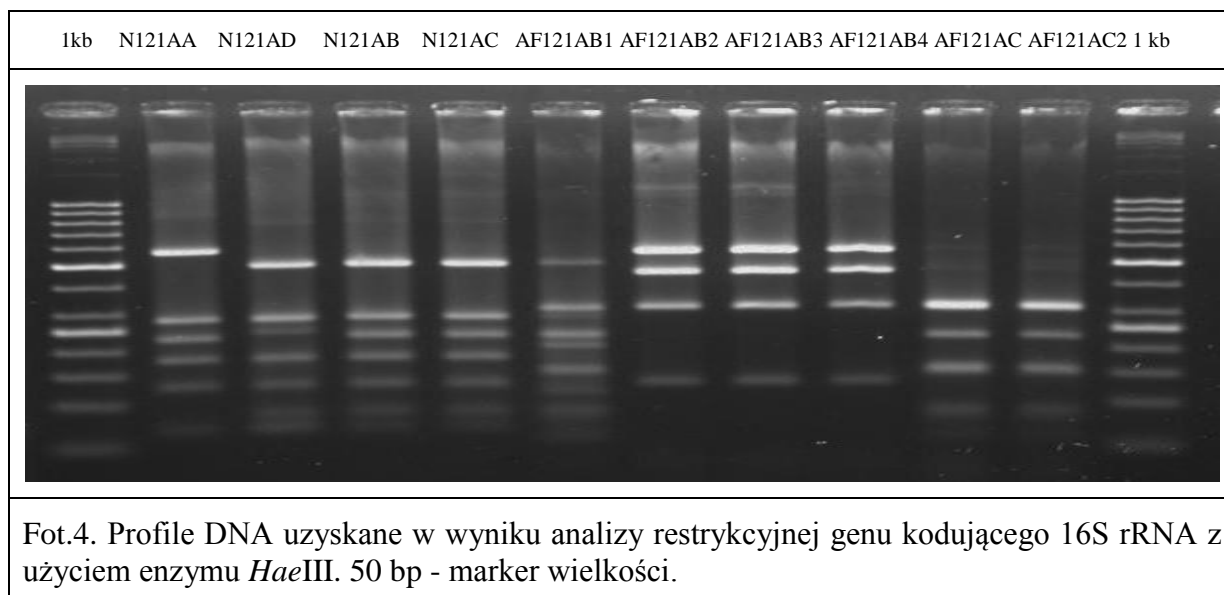
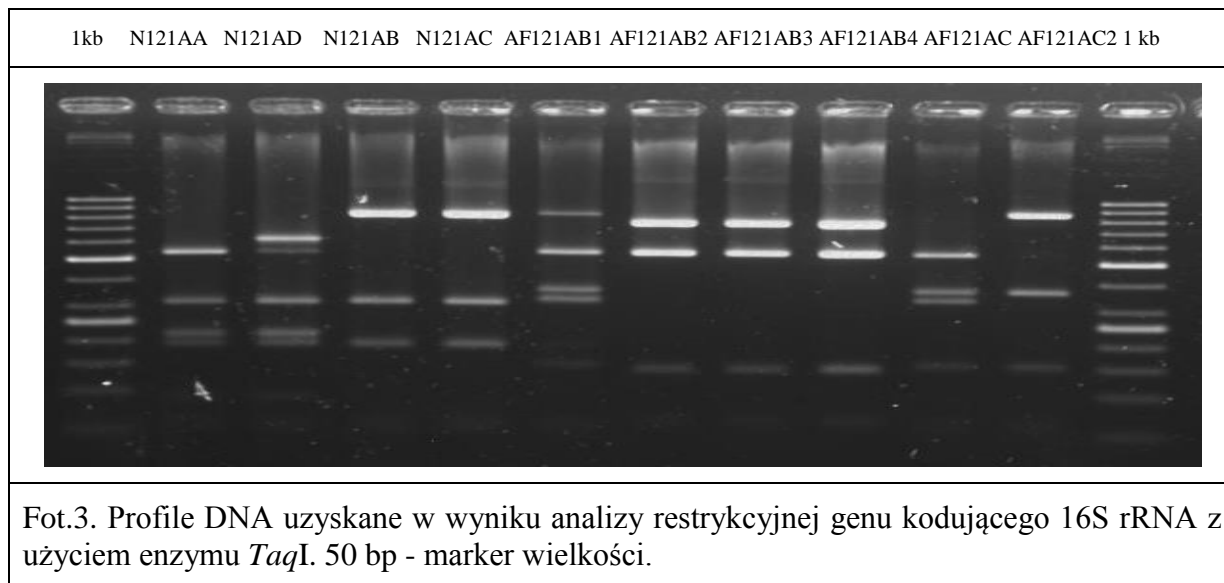
Fot.1. Amplifikacja genu kodującego 16S rRNA - produkty PCR wielkości 1492 pz uzyskane w reakcji ze starterami 27f/1492r. 1 kb – marker wielkości



Fot.2. Amplifikacja genu 16S rRNA - produkty PCR wielkości 1492 pz uzyskane w reakcji ze starterami 27f/1492r. 1 kb – marker wielkości.

Identyfikacja izolatów bakterii z użyciem techniki RFLP

W wyniku trawienia produktów amplifikacji genu 16S rRNA enzymami restrykcyjnymi *TaqI*, *HaeIII*, *RsaI*, oraz *MboI* uzyskano profile DNA charakteryzujące testowane izolaty. Przeprowadzona analiza umożliwiła podział izolatów na grupy zgodnie z uzyskanymi profilami. Zastosowanie enzymu *TaqI* umożliwiło uzyskanie największego zróżnicowania izolatów bakterii i podział ich na 7 grup (Tab. 7). Zastosowanie enzymu *HaeIII* umożliwiło podział izolatów na 6 grup. Najmniejsze zróżnicowanie izolatów i podział na 5 grup uzyskano po zastosowaniu każdego z enzymów *RsaI* lub *MboI*.



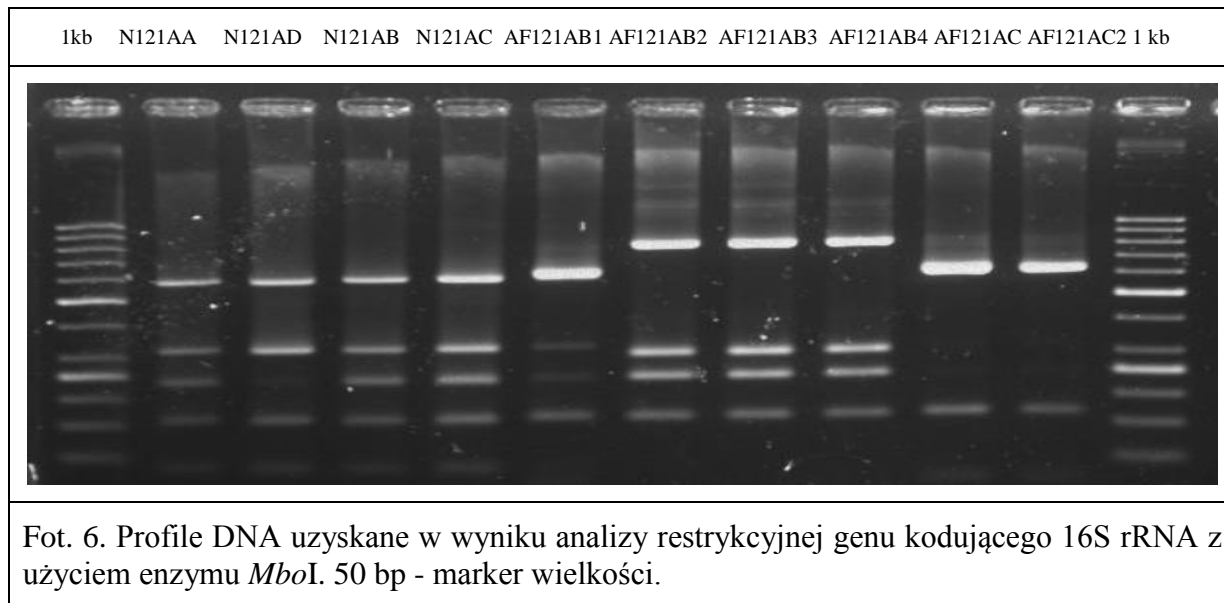


Tabela 16. Wzory RFLP izolatów bakterii uzyskane w wyniku analizy restrykcyjnej 16S rRNA

Enzym	Wzór RFLP	Izolaty
TaqI	A	N121AA
	B	N121AD
	C	N121AB, N121AC
	D	AF121AB1
	E	AF121AB2, AF121AB3, AF121AB4
	F	AF121AC
	G	AF121AC2
HaeIII	H	N121AA
	I	N121AD
	J	N121AB, N121AC
	K	AF121AB1
	L	AF121AB2, AF121AB3, AF121AB4
	M	AF121AC, AF121AC2
RsaI	N	N121AA, N121AB, N121AC
	O	N121AD
	P	AF121AB1

	R	AF121AB2, AF121AB3, AF121AB4
	S	AF121AC, AF121AC2
<i>MboI</i>	T	N121AA, N121AB, N121AC
	U	N121AD
	W	AF121AB1
	Y	AF121AB2, AF121AB3, AF121AB4
	Z	AF121AC, AF121AC2

Identyfikacja izolatów bakterii w oparciu o analizę sekwencji genu kodującego 16S rRNA

Uzyskane sekwencje 16S rRNA izolatów bakterii wykazały 91-100% podobieństwo do sekwencji w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), co umożliwiło identyfikację rodzaju lub gatunku testowanych izolatów bakterii.

Tabela 17. 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
AF121AB1	99	<i>Streptomyces</i> sp.
AF121AB2	100	<i>Bacillus cereus</i>
AF121AB3	100	<i>Bacillus cereus</i>
AF121AB4	99	<i>Bacillus cereus</i>
AF121AC	99	<i>Streptomyces</i> sp.
AF121AC2	99	<i>Streptomyces</i> sp.
N121AA	100	<i>Phyllobacterium</i> sp.
N121AB	100	<i>Ensifer adhaerens</i>
N121AC	100	<i>Ensifer adhaerens</i>
N121AD	91	<i>Rhizobium</i> sp.
Sp82AA	99	<i>Bacillus</i> sp.
NAzot2	99	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Pi25C	99	<i>Pseudomonas</i> sp.
60.3AA	99	<i>Lysobacter</i> sp.

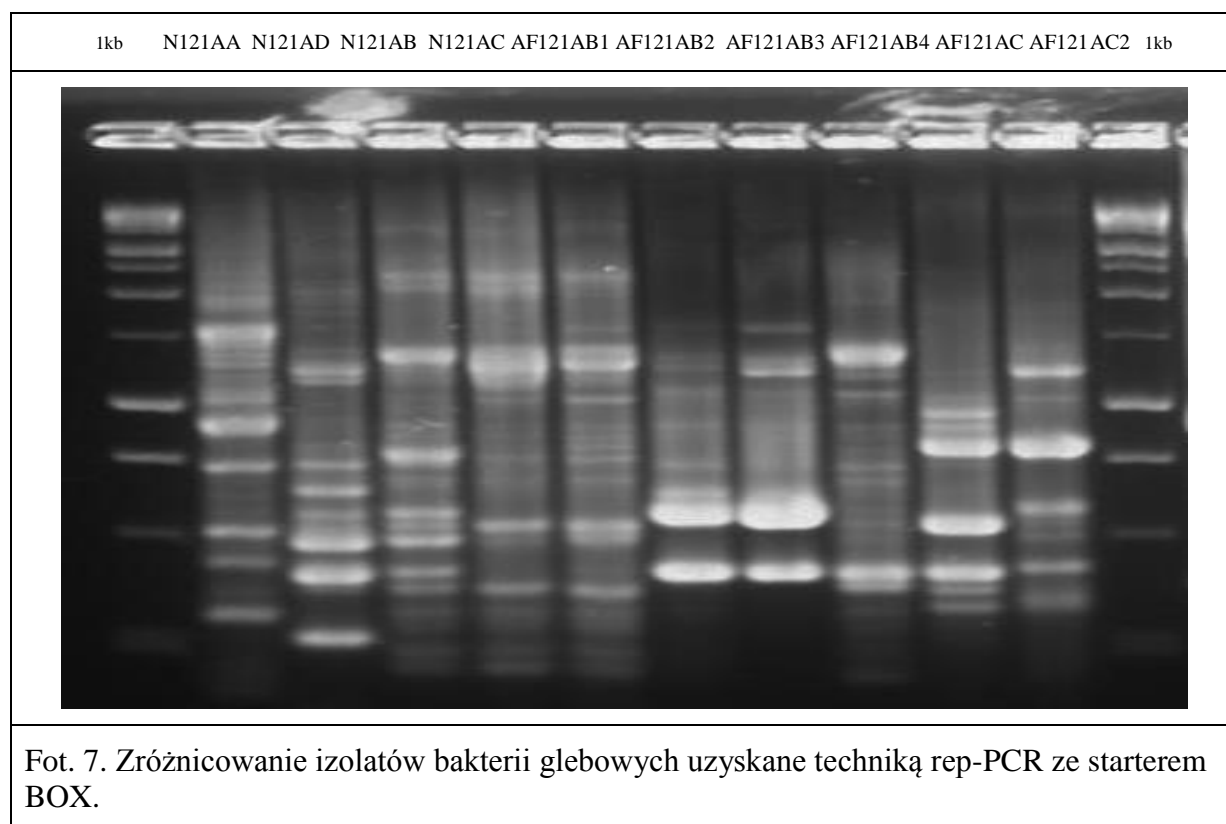
Wyniki uzyskane techniką RFLP oraz analiza sekwencji genu kodującego 16S rRNA pozwoliły zidentyfikować testowane izolaty i określić ich przynależność do 5 rodzajów bakterii: *Streptomyces*, *Bacillus*, *Phyllobacterium* oraz *Rhizobium*. Ponadto określono przynależność trzech izolatów do grupy bakterii *Bacillus cereus* oraz dwóch izolatów do gatunku *Ensifer adhaerens*.

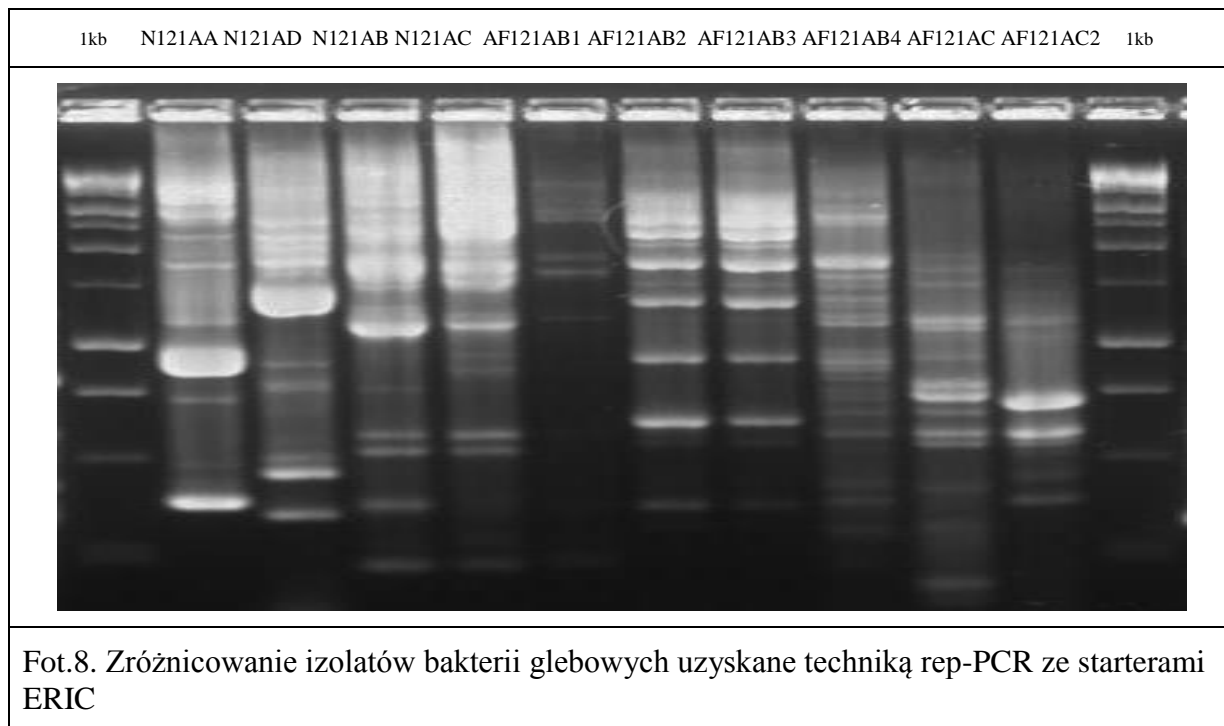
Tabela 18. Identyfikacja rodzaju/gatunku izolatów bakterii glebowych na podstawie techniki RFLP oraz analizy sekwencji genu kodującego 16S rRNA.

Grupa RFLP	Izolaty bakterii	Rodzaj/gatunek
I	N121AA	<i>Phyllobacterium</i> sp.
II	N121AD	<i>Rhizobium</i> sp.
III	N121AB, N121AC	<i>Ensifer adhaerens</i>
IV	AF121AB1	<i>Streptomyces</i> sp.
V	AF121AB2, AF121AB3, AF121AB4	<i>Bacillus cereus</i>
VI	AF121AC	<i>Streptomyces</i> sp.
VII	AF121AC2	<i>Streptomyces</i> sp.

Identyfikacja izolatów bakterii z użyciem techniki rep-PCR

W wyniku przeprowadzonych reakcji uzyskano takie same profile DNA dla izolatów bakterii AF121AB2 oraz AF121AB3, należących do grupy *Bacillus cereus*. Wynik ten wskazuje, że wymienione izolaty mogą należeć do tego samego szczepu bakterii. Dla pozostałych prób uzyskano odrębne profile DNA, co wskazuje, że należą one do różnych szczepów bakterii.





WNIOSKI

- Opracowane innowacyjne konsorcja mikrobiologiczne wykazały dużą skuteczność w biologicznej ochronie nasion i roślin marchwi uprawianych na nasiona.
- Opracowany sposób aplikacji wyselekcjonowanych szczepów bakterii poprzez zanurzenie nasion marchwi w płynnych zawiesinach bakterii jest skuteczny i łatwy do stosowania w rzeczywistych warunkach uprawy roślin.
- Przeprowadzone testy z użyciem technik biochemicznych i molekularnych umożliwiły identyfikację do rodzaju lub gatunku glebowych szczepów bakterii, wykazujących właściwości ochrony nasion przed patogenami oraz skutecznych w stymulacji wzrostu warzywnych roślin nasiennych.
- Testy molekularne wykazały dużą przydatność techniki PCR-RFLP oraz sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA do identyfikacji bakterii.
- Technika rep-PCR umożliwiła odróżnienie szczepów bakterii w obrębie rodzaju/gatunku.
- Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał ochronny wyselekcjonowanych szczepów bakterii ryzosferowych. Szczepy te mają zdolność do hamowania wzrostu grzybów patogenicznych *Verticillium dahliae* oraz *Fusarium* spp., przy różnej dostępności tlenu i substancji odżywczych.
- Bulion hodowlany był nośnikiem dla konsorcjów mikroorganizmów o działaniu ochronnym, zapewniającym odpowiednią gęstość populacji mikroorganizmów o korzystnych

właściwościach ochrony roślin.

- Uzyskane wyniki znajdują zastosowanie do opracowania wzbogaconych mikrobiologicznie biopreparatów przeznaczonych do poprawy kiełkowania nasion poprzez biologiczną osłonę materiału siewnego przed patogenami oraz do poprawy wschodów roślin i stymulacji wzrostu warzywnych roślin nasiennych.

LITERATURA

Ishii S., Sadowsky M.J. 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Env. Microbiol.* 11: 733-740.

Janssen P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(3): 1719-1728.

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

Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295.

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

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

Větrovský T., Baldrian P. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS one*, 8(2), e57923.

Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F. O., Ludwig W., Schleifer K. H., Rosselló-Móra R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Rev. Microbiol.*, 12(9): 635-645.

PODZADANIE 2

„Mikrobiologiczne zaprawianie nasion i materiału rozmnożeniowego w aspekcie ograniczenia chemicznych środków ochrony roślin, poprawy jakości, zdrowotności i metabolizmu roślin nasiennych oraz wartości siewnej reprodukowanych nasion marchwi”

WSTĘP

Jedną z głównych przyczyn niskiej zdolności kiełkowania nasion marchwi jest ich porażenie przez patogeny. Grzyby *Alternaria dauci* i *A. radicina* są głównymi patogenami przenoszonymi z nasionami tego gatunku i sprawcami najgroźniejszych chorób roślin marchwi. Rozwojowi chorób zapobiega wysiew nasion zdrowych lub zaprawianych. **Nasiona do produkcji ekologicznej muszą pochodzić z ekologicznych plantacji nasiennych**, na których nie dopuszcza się stosowania ochrony chemicznej roślin ani zapraw syntetycznych. Jednocześnie uprawy, w których nie stosuje się chemicznych środków ochrony roślin, mogą być potencjalnym źródłem nasion zakażonych patogenami. Nasiona przeznaczone do wysiewu na plantacjach ekologicznych powinny być mikrobiologicznie czyste i genetycznie odporne na choroby. Od gatunków i odmian przeznaczonych do upraw ekologicznych wymaga się również zwiększonej odporności na warunki stresowe, związane z niesprzyjającymi warunkami klimatycznymi. Dyrektywa Rady 2002/55/WE z dnia 13 czerwca 2002 roku w sprawie obrotu materiałem siewnym warzyw podaje minimalne zdolności kiełkowania dla marchwi i pietruszki na poziomie 65%, jednak producenci nasion oczekują kiełkowania na poziomie 80-90%. Witek i Chmielowiec (2004) wskazują, że produkcja nasienna w gospodarstwach ekologicznych jest możliwa i cieszy się coraz większym zainteresowaniem ze względu na corocznie rosnący popyt na nasiona ekologiczne. Wymusza to jednak konieczność opracowania innowacyjnych technologii produkcji materiału siewnego i ochrony upraw nasiennych marchwi w systemach ekologicznych. Konieczne jest opracowanie metod osłony biologicznej nasion w celu uzyskania wysokich parametrów jakościowych oferowanego, ekologicznego materiału siewnego. Wymaga to stosowania zabiegów przedsiewnych pozwalających na poprawę jakości mikrobiologicznej nasion.

Opracowane w projekcie innowacyjne metody kompleksowej ochrony nasion, roślin nasiennych i materiału rozmnożeniowego (wysadków) marchwi przed patogenami, przy pomocy wyselekcjonowanych mikroorganizmów antagonistycznych, tworzących wyspecjalizowane konsorcja o wielokierunkowych mechanizmach działania oraz wybranych środków biologicznych, zwiększą zdrowotność nasion i produktywność roślin w I roku uprawy oraz potencjał plonotwórczy roślin nasiennych w II roku produkcji. Przyczyni się to do poprawy opłacalności ekonomicznej i zachęci producentów do podejmowania ekologicznej produkcji nasion marchwi, których poszukują producenci ekologicznych warzyw.

CEL BADAŃ

Celem badań było określenie wpływu wybranych szczepów pożytecznych mikroorganizmów z zasobów Symbio Banku IO w Skierniewicach oraz preparatów biologicznych na jakość i zdrowotność komercyjnych, ekologicznych nasion marchwi (dwie odmiany), materiału rozmnożeniowego (wysadków), roślin w początkowym stadium wzrostu oraz wartość siewną reprodukowanych w doświadczeniach nasion, uzyskanych z ekologicznych wysadków.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania wykonano w Pracowni Nasiennictwa, zgodnie z założeniami metodyki zamieszczonej we wniosku aplikacyjnym. Doświadczenia prowadzono w warunkach laboratoryjnych (in vitro), w podłożach glebowych w warunkach szklarniowych (kontrolowane warunki temperatury i wilgotności), w kulturach wazonowych na kontenerowni oraz in vivo na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. **Materiałem badań były:**

- ekologiczne nasiona komercyjne dwóch odmian marchwi: Nantes 2 (hodowli Plantico, nr Certyfikatu PL-EKO-01-001915) i Napoli F1 (Bejo, nr Certyfikatu 102946) rekomendowane do produkcji ekologicznej,
- rośliny nasienne (nasienniki) dwóch odmian marchwi,
- wysadki (korzenie marchwi – materiał rozmnożeniowy) odmiany Napoli F1– uzyskane w badaniach własnych w I roku badań (2016 r.)
- nasiona reprodukowane z w doświadczeniach własnych (II rok badań – 2017 r.)
- pożyteczne mikroorganizmy z rodzaju *Bacillus* otrzymane z Symbio Banku IO oraz komercyjne środki biologiczne (Trianum, Biochicol)

Badania prowadzono w ramach czterech równoległych doświadczeń:

Doświadczenie 1. Przechowywanie materiału rozmnożeniowego marchwi (wysadków) odmiany Napoli F1, wyprodukowanego w 2016 roku na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach celem reprodukcji nasion w bieżącym roku. Wysadki otrzymano w doświadczeniach, gdzie stosowano analogiczne, jak zestawione w tabeli 1 bioprodukty pochodzące z Symbio Banku oraz biologiczne środki komercyjne. Wysadki przechowywano w klimatyzowanych komorach w temperaturze 4° C w drewnianych paletach w okresie od października 2016 do kwietnia 2017 roku, kiedy to przekazano je w ramach współpracy do Pracowni Fitopatologii.

Doświadczenie 2 (szklarniowe). Ocena wpływu mikrobiologicznego zaprawiania komercyjnych nasion ekologicznych marchwi odmiany Napoli F1 i Nantes 2 na ich jakość, zdrowotność, wigor i metabolizm oraz wschody roślin, ich wzrost i rozwój. Doświadczenie prowadzono w warunkach szklarniowych z kontrolowaną temperaturą i wilgotnością powietrza. **Badania polegały na** wysiewie zainokulowanych wymienionymi mikroorganizmami antagonistycznymi i traktowanych komercyjnymi środkami nasion marchwi do skrzynek wysiewnych, wypełnionych torfem firmy Klasmanna (podłoże ekologiczne) po 50 nasion z każdej kombinacji w trzech powtórzeniach. Wykonano :

- dynamikę wschodów roślin - liczono je począwszy od 29.06.2017 przez 14 kolejnych dni
- indeks zawartości chlorofilu – 02.08.2017
- pomiary fotosyntezy – 04.08.2017
- pomiary bimetryczne roślin (wysokość) w 4 terminach: 19.07, 02.08, 18.08, 01.09.2017

Doświadczenie 3 (polowe) polegało na wysiewie zaprawianych nasion marchwi odmiany Napoli F1 i Nantes 2 wprost do gruntu na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym IO. Prowadzono je w 3 powtórzeniach po 15 roślin na poletku. Monitorowano wzrost, rozwój i zdrowotność roślin marchwi. Zbiory korzeni wykonano 24.10.2017. Prowadzono:

- pomiary biometryczne roślin
- indeks zawartości chlorofilu
- pomiary fotosyntezy

Doświadczenie 4. (polowe) Monitoring plantacji nasiennej marchwi traktowanej mikroorganizmami pożytecznymi i komercyjnymi środkami biologicznymi (tab. 1) oraz ocena wartości siewnej i zdrowotności reprodukowanych nasion.

Schemat aplikacji mikroorganizmów pożytecznych z zasobów Symbio Banku IO oraz komercyjnych środków biologicznych w uprawach polowych marchwi nasiennej przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Schemat aplikacji mikroorganizmów pożytecznych Symbio Banku IO oraz komercyjnych środków biologicznych w uprawach polowych marchwi nasiennej

L.p.	Środek biologiczny/sposób aplikacji
1	Kontrola (nasiona i korzenie nietraktowane)
2	Standard I Trianum (zaprawianie, podlanie)
3	Standard II Serenade Aso (zaprawianie, podlanie)
4	Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp. (zaprawianie, podlanie)
5	Symbio Bank Sp 82 AA <i>Bacillus pumilus</i> (zaprawianie, podlanie)
6	NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (podlanie)
7	Pi25 G <i>Pseudomonas fluorescens</i> (oprysk 0,1%)
8	60.3AA <i>Lycobacter</i> sp. (oprysk 0,1%)
9	AF74AAPAE NI <i>Bacillus</i> sp. (oprysk 0,1%)
10	NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (oprysk 0,1%)
11	Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp (oprysk 0,1%)
12	Standard III Serenade Aso (oprysk 0,1%)

1. Badania jakości nasion

Badania prowadzono zgodnie z wymogami ISTA (Międzynarodowej Organizacji Oceny Nasion). Komercyjne - ekologiczne nasiona marchwi dwóch testowanych odmian poddano 20 minutowemu traktowaniu konsorcjum mikrobiologicznym Sp 82 AB *Bacillus* sp + Sp 82 AA *Bacillus pumilus*, pochodzącym z zasobów Symbio Banku z Pracowni Rizosfery IO oraz standardowymi zaprawami nasion: Trianum (zawiera antagonistyczne grzyby z rodzaju *Trichoderma*) i BetaChicol (chitozan). Otrzymano ok. 1000 ml szczepów bakterii *Bacillus pumilus* - wielkość populacji ok. 1.1×10^9 jtk/ml oraz *Bacillus weihenstephanensis* - wielkość populacji ok. $0,9 \times 10^9$ jtk/ml. Środki biologiczne aplikowano donasiennie w stężeniu 1%. W następnym etapie wysiewano zainokulowane nasiona do szalek Petriego na nasączone bibuły filtracyjne i inkubowano w termostatach w temperaturze 20 °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 odmian marchwi na kiełkowniki Jakobsena (z zastosowaniem bibuły filtracyjnych 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 (zgodnie z



wymogami ISTA). Istotnym parametrem jakości nasion z punktu widzenia praktyki, jest masa tysiąca nasion (MTN) – wyznacznik dorodności nasion, stąd w badaniach określono masę tysiąca nasion dla komercyjnych nasion ekologicznych marchwi oraz nasion reprodukowanych w doświadczeniach własnych, w których rośliny nasienne traktowano wymienionymi wyżej mikroorganizmami pożytecznymi i preparatami biologicznymi (12 kombinacji – tabela 1).

MTN (g) nasion komercyjnych - Napoli F1 – 1,711 g, Nantes 2 – 0,797 g

1.2. Ocena wpływu biologicznego zaprawiania nasion marchwi na ich jakość oraz wzrost roślin w warunkach stresu abiotycznego

W celu określenia wpływu biologicznej osłony na kiełkowanie nasion oraz wschody, wzrost, rozwój, zdrowotność i aktywność fizjologiczną siewek w **warunkach stresu abiotycznego**, badania przeprowadzono w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych w fitotronach oraz w polu. W warunkach laboratoryjnych **badania przeprowadzono w temperaturze suboptymalnej (5°C), optymalnej (20°C) oraz supraoptymalnej (35°C).**

Oceniono:

- dynamikę i zdolność kiełkowania nasion (wysianych w szalkach Petri'ego na bibułę nawilżoną wodą destylowaną), mierzoną na podstawie codziennej oceny liczby skiełkowanych nasion. Codzienne liczenie skiełkowanych nasion prowadzono przez 28 dni,
- przepuszczalność membran cytoplazmatycznych w zarodkach (elektroprzewodnictwo wód nastoinowych), mierzona przy pomocy konduktometru CC-551 Elmetron,
- dynamikę wzrostu siewek na podłożu bibułowym w zmodyfikowanych płytkach Phytotoxkit, mierzona na podstawie codziennych pomiarów wysokości części nadziemnych i długości korzeni zarodkowych,
- dynamikę wschodów i wzrostu siewek po wysianiu nasion do skrzynek wypełnionych standardowym substratem, mierzona na podstawie wielokrotnych pomiarów liczby wzeszłych siewek i ich wysokości. Pomiarów przeprowadzono co kilka dni w zależności od intensywności wschodów i wzrostu siewek,
- indeks zawartości chlorofilu w siewkach (p.3) mierzony aparatem Minolta SPAD-502, Konica Minolta
- aktywność wymiany gazowej w siewkach: fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa i stężenie międzykomórkowego CO₂, mierzone przy pomocy analizatora wymiany gazowej TPS-2, PP Systems, USA
- jakościowy i ilościowy skład mikoflory patogenicznej oceniany w testach z użyciem podłoży bibułowych i agarowych

3. Badanie wschodów roślin w podłożu glebowym

Badania polegały na wysiewie zainokulowanych mikroorganizmami antagonistycznymi z Symbio Banku IO i traktowanych komercyjnymi środkami nasion marchwi do skrzynek wysiewnych, wypełnionych torfem 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. Wyniki badań zestawiono na rysunkach i w tabelach.

Analizy mikologiczne i ocena zdrowotności nasion

Badania w zakresie zdrowotności prowadzono dwutorowo. Wykonano analizy mikologiczne dla komercyjnych, ekologicznych nasion marchwi (dwóch odmian) dla partii kontrolnej – nie

zaprawianej oraz po ich inokulacji (diagnostyka ilościowa i jakościowa mikopatogenów do rodzajów i gatunków), celem określenia wpływu aplikowanych donasiennie bioproduktów mikrobiologicznych i preparatów biologicznych na zasiedlenie nasion marchwi mikroflorą. Przeanalizowano także interakcje pomiędzy mikopatogenami zasiedlającymi nasiona a mikroorganizmami pożytecznymi użytymi do osłony biologicznej (inokulacji), 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 nadpasożytów. Ocenę zdrowotności nasion wykonano dwoma powszechnie stosowanymi metodami traktowanymi, jako porównawcze: 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°C - optymalnej do rozwoju mikroflory zasiedlającej nasiona. Kultury inkubowano przez 7 dób, a następnie identyfikowano przy pomocy mikroskopii świetlnej (mikroskop Leica) i dostępnych kluczy do rodzaju i gatunku. Metoda druga (pożywkowa) polegała na wysiewie nasion na selektywne pożywki agarowe i inkubacji analogicznej, 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 marchwi na mikroorganizmy pożyteczne (antagonistyczne) aplikowane donasiennie opisano i zestawiono w tabelach. Podczas trwania badań prowadzono również monitoring stabilności mikrobiologicznej nowo wprowadzanych inokulów i biopreparatów.

Analogiczne analizy mikologiczne wykonano dla nasion reprodukowanych na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym IO w Skierniewicach. Ich celem była ocena następczego stosowania wymienionych bioproduktów i środków biologicznych w uprawach marchwi nasiennej na zdrowotność i jakość reprodukowanych nasion. Wyniki zestawiono w tabelach.

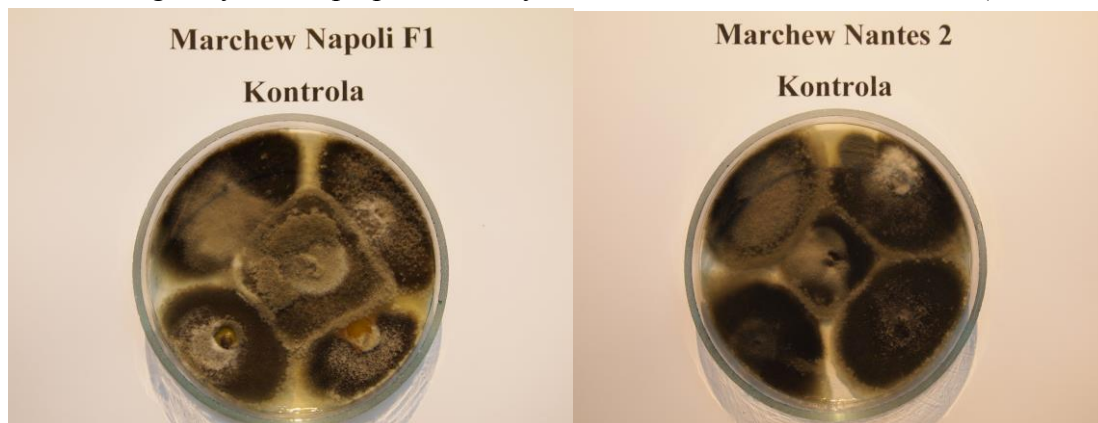
WYNIKI

Analizy mikologiczne

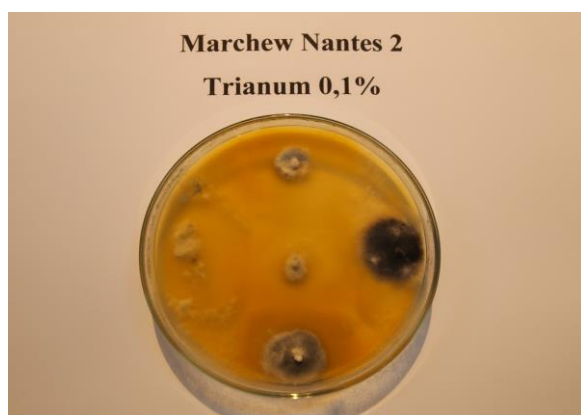
Badania zdrowotności komercyjnych nasion ekologicznych marchwi odmiany Napoli F1 i Nantes 2 (partii kontrolnej – nie zaprawianej) wykazały wysokie porażenie nasion przez mikopatogeny utrzymujące się na poziomie 85 – 94,8% w zależności od odmiany (tab.2-3). Analizy jakościowe i ilościowe składu populacji mikroflory wskazują na największy udział grzybów z rodzaju *Alternaria* a głównie gatunków *Alternaria alternata* i *Alternaria radicina* – patogenów przenoszonych z nasionami na rośliny potomne, przy czym gatunek *A. radicina* jest sprawcą czarnej zgnilizny korzeni marchwi a współtowarzyszący mu gatunek *Alternaria dauci* - alternariozy naci marchwi. Z innych grzybów charakteryzujących się wysoką patogennością, wyizolowano liczne gatunki z rodzaju *Fusarium* – sprawcy fuzaryjnego wędnięcia roślin oraz zgorzeli siewek, *Botrytis cinerea* – powodujący szarą pleśń i gnicie korzeni marchwi podczas przechowywania. Z nasion partii kontrolnej (nie traktowanej)

wyizolowano od 12 do nawet 14 gatunków zasiedlających ekologiczne, komercyjne nasiona obydwu analizowanych odmian marchwi. Identyfikację prowadzono tylko dla rodzajów i gatunków grzybów o największej patogenności lub występujących w największym nasileniu. Spermoplantę nasion powszechnie zasiedlały grzyby saprofityczne (*Epicoccum purpurascens*, *Ulocladium* sp., *Cladosporium* sp.) i przechowalnicze z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*.

Zastosowanie biologicznej osłony nasion przy użyciu konsorcjum bioproduktów mikrobiologicznych z zasobów Symbio Banku: **Sp82AA *Bacillus pumilus*** + **Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*** oraz preparatów biologicznych Trianum i Biochikol istotnie zmniejszyło zasiedlenie nasion mikoflorą patogeniczną. Konsorcjum dwóch szczepów bakteryjnych aplikowanych do nasion w postaci jednej zawiesiny mikroorganizmów, wykazywało istotnie większe oddziaływanie fungicydalne niż aplikowane w 2016 pojedyncze szczepy bakterii antagonistycznych *Bacillus pumilus* i *Bacillus weihenstephanensis*. Po jego zastosowaniu porażenie nasion przez patogeny zmniejszyło się o ponad 57% w porównaniu z kontrolą. Wysoka skuteczność ochronna konsorcjum bakterii antagonistycznych Symbio Banku przekładała się na redukcję ilościową i jakościową mikopatogenów oraz istotną poprawę zdrowotności nasion marchwi odmiany Napoli F1 i Nantes 2. Ważnym aspektem w ocenie zasiedlenia nasion mikoflorą po donasiennej aplikacji mikroorganizmów pożytecznych Symbio Banku i komercyjnych środków biologicznych było zwiększone zasiedlenie spermoflory nasion marchwi grzybami antagonistycznymi *Trichothecium roseum*, *Trichoderma* spp. i *Gonatotryps* sp. W badaniach interakcji pomiędzy poszczególnymi gatunkami mikrofory kontaminującej nasiona, wykazano ich inhibujący wpływ na wzrost grzybów patogenicznych, ograniczanie ich populacji poprzez antybiozę, lizę i fagocytozę. Wśród trzech wymienionych grzybów o właściwościach antagonistycznych, najbardziej ekspansywnymi nadpasożytami w stosunku do patogenów nasion marchwi okazały się grzyby z rodzaju *Trichoderma* i *Gonatotryps*. Fungistatyczne oddziaływanie pożytecznych szczepów bakterii z Symbio Banku oraz środków biologicznych 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 oraz testowanymi w badaniach mikroorganizmami pożytecznymi (bioproduktami mikrobiologicznymi) wskazują na ekspansywne nadpasożytnictwo oraz antagonistyczne oddziaływanie konsorcjum bakterii pożytecznych Symbio Banku (**Sp82AA *Bacillus pumilus*** + **Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis***) w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium* i *Alternaria*, co potwierdziło wyniki badań uzyskane przez autorów w 2016 roku. Wysoką skutecznością ochronną odznaczał się również preparat komercyjny Trianum. Nie stwierdzono fitotoksyczności badanych bioproduktów mikrobiologicznych i biopreparatów. Wyniki badań zestawiono w tabelach (2 - 5).



Fot. 1-2. Nasiona marchwi zasiedlone grzybami z rodzaju *Alternaria* + bakterie (bez osłony biologicznej) (pożywka PDA)



Fot 3. Nasiona marchwi po aplikacji Trianum

Tabela 2. Wpływ osłony biologicznej nasion marchwi odmiany Nantes 2 na ich zasiedlenie mikoflorą (procent w stosunku do ogółu izolatów)

Rodzaj/gatunek mikopatogena	Osłona biologiczna nasion marchwi odmiany Nantes 2			
	Kontrola	Sp82AA <i>Bacillus pumilus</i> + Sp82AB <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Trianum	Biochikol
<i>Alternaria alternata</i>	91,5	37,5	41,0	44,2
<i>Alternaria radicina</i>	4,2	2,0	2,5	2,8
<i>Alternaria dauci</i>	2,6	0,7	1,3	1,6
<i>Epicoccum purpurascens</i>	8,5	5,0	6,3	5,5
<i>Ulocladium sp.</i>	3,0	0,0	0,6	1,0
<i>Erysiphe heraclei</i>	2,0	1,0	0,8	1,2
<i>Botrytis cinerea</i>	3,7	1,2	0,7	1,0
<i>Fusarium sp.</i>	2,6	0,5	1,0	1,5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3,9	1,4	1,0	1,0
<i>Trichothecium roseum</i>	0,8	2,0	1,7	1,4
<i>Aspergillus sp.</i>	6,2	2,9	2,4	2,0
<i>Cladosporium sp.</i>	2,8	0,0	0,0	0,5
<i>Trichoderma sp.</i>	-	1,5	2,0	0,6
<i>Stemphyllium botryosum</i>	4,9	1,6	1,2	1,0
Porażenie nasion (%)	94,8	39,5	44,0	46,5

Tabela 3. Wpływ osłony biologicznej nasion marchwi odmiany Napoli F1 na zasiedlenie mikoflorą (procent w stosunku do ogółu izolatów)

Rodzaj/gatunek mikopatogena	Osłona biologiczna nasion marchwi odmiany Napoli F1			
	Kontrola	Sp82AA <i>Bacillus pumilus</i> + Sp82AB <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Trianum	Biochikol
<i>Alternaria alternata</i>	79,0	35,2	37,0	41,0
<i>Alternaria radicina</i>	3,2	1,7	1,9	1,9
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,9	0,3	0,8	1,0
<i>Erysiphe heraclei</i>	2,6	1,5	1,3	1,8

<i>Rhizoctonia</i> sp.	2,2	1,5	0,6	1,4
<i>Cladosporium herbarum</i>	2,0	0,5	0,5	1,0
<i>Verticillium</i> sp.	1,5	0,3	0,9	1,1
<i>Gonatoborys</i> .sp.	0,5	1,4	0,9	1,0
<i>Penicillium</i> sp.	4,2	1,7	2,0	2,0
<i>Trichoderma</i> sp.	0,6	1,5	2,4	0,9
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3,1	4,0	3,5	3,0
<i>Rhizopus nigricans</i>	5,0	2,9	2,5	2,3
Porażenie nasion (%)	85,0	41,5	43,0	44,5

Tabela 4. Następczy wpływ osłony biologicznej nasion i roślin marchwi nasiennej odmiany Nantes 2 na porażenie nasion reprodukowanych w doświadczeniach polowych mikopatogenami (%)

Oslona biologiczna nasion marchwi odmiany Nantes 2	Porażenie nasion (%)
1. Kontrola (nasiona i korzenie nietraktowane)	95,0
2. Standard I Trianum (zaprawianie, podlanie)	47,0
3. Standard II Serenade Aso (zaprawianie, podlanie)	45,5
4. Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp. (zaprawianie, podlanie)	47,0
5. Symbio Bank Sp 82 AA <i>Bacillus pumilus</i> (zaprawianie, podlanie)	44,8
6. NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (podlanie)	47,2
7. Pi25 G <i>Pseudomonas fluorescens</i> (oprysk 0,1%)	56,5
8. 60.3AA <i>Lycobacter</i> sp. (oprysk 0,1%)	52,5
9. AF74AAPAE NI <i>Bacillus</i> sp. (oprysk 0,1%)	50,2
10. NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (oprysk 0,1%)	49,5
11. Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp (oprysk 0,1%)	49,0
12. Standard III Serenade Aso (oprysk 0,1%)	48,5

Tabela 5. Następczy wpływ osłony biologicznej nasion i roślin marchwi nasiennej odmiany Napoli F1 na porażenie nasion reprodukowanych w doświadczeniach polowych mikopatogenami (%)

Oslona biologiczna nasion marchwi odmiany Nantes 2	Porażenie nasion (%)
1. Kontrola (nasiona i korzenie nietraktowane)	87,0
2. Standard I Trianum (zaprawianie, podlanie)	43,5
3. Standard II Serenade Aso (zaprawianie, podlanie)	41,5
4. Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp. (zaprawianie, podlanie)	44,0
5. Symbio Bank Sp 82 AA <i>Bacillus pumilus</i> (zaprawianie, podlanie)	39,5
6. NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (podlanie)	45,5
7. Pi25 G <i>Pseudomonas fluorescens</i> (oprysk 0,1%)	48,0
8. 60.3AA <i>Lycobacter</i> sp. (oprysk 0,1%)	46,2
9. AF74AAPAE NI <i>Bacillus</i> sp. (oprysk 0,1%)	46,0
10. NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (oprysk 0,1%)	45,5
11. Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp (oprysk 0,1%)	46,0
12. Standard III Serenade Aso (oprysk 0,1%)	46,0

Analizy jakości komercyjnych nasion marchwi odmiany Nantes 2 i Napoli F1, traktowanych bioproduktami mikrobiologicznymi *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz środkami biologicznymi (Betachicol i Trianum)

Celem analiz było określenie wpływu donasiennej aplikacji bioproduktów *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnych środków biologicznych Betachicol i Trianum na dynamikę i zdolność kiełkowania nasion w stresowych warunkach: temperatury optymalnej, sub- i supraoptymalnej, które mogą oddziaływać na kiełkujące nasiona w niekorzystnych warunkach agrometeorologicznych.

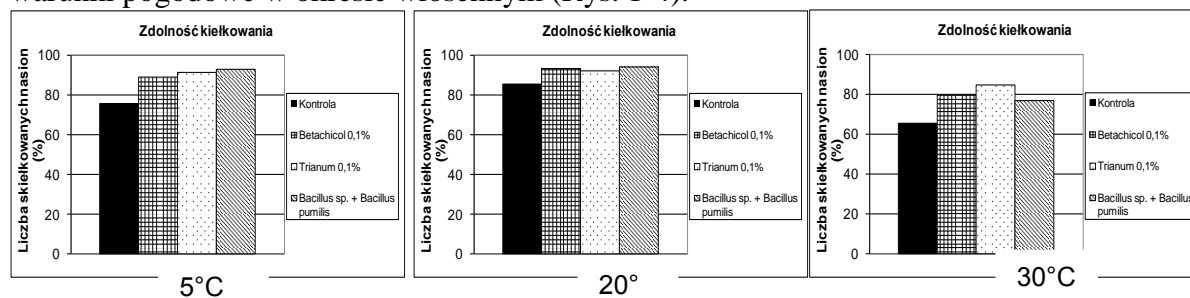
Metodyka

Nasiona traktowane komercyjnymi środkami biologicznymi (Betachicol i Trianum) oraz bioproduktami mikrobiologicznymi *Bacillus* sp.+ *Bacillus pumilus* wysiewano na zwilżoną wodą destylowaną bibułę filtracyjną w szalkach Petri'ego i umieszczano w inkubatorach w temperaturze optymalnej (20°C), suboptymalnej (5°C) i supraoptymalnej (30°C). Następnie codziennie liczone skielkowane nasiona i obliczano dynamikę i zdolność kiełkowania przy pomocy aparatu Seed Calculator (Wageningen, Holandia). Za skielkowane nasiona uważano te, w których korzeń zarodkowy przebił okrywą nasienną.

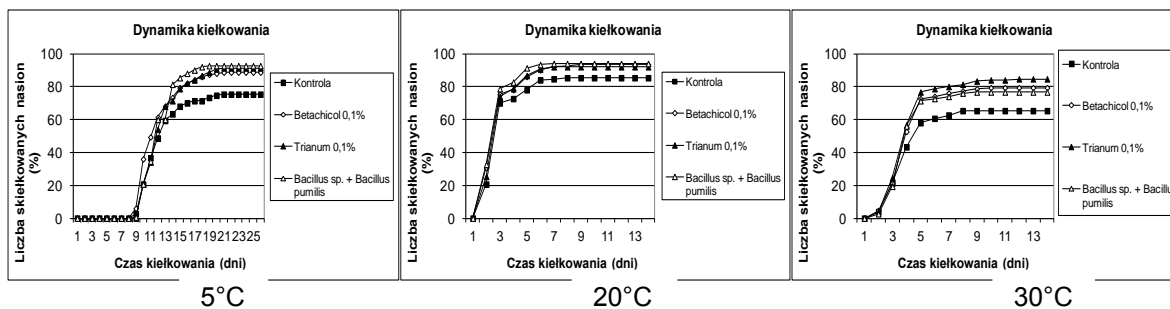
Wyniki

Uzyskane wyniki wskazują na korzystny wpływ donasiennej aplikacji stosowanych bioproduktów mikrobiologicznych i środków biologicznych na kiełkowanie nasion oraz wigor, marchwi odmiany Nantes 2 i Napoli F1. Aplikowane do nasion bioprodukty mikrobiologiczne wyselekcjonowane w Symbio Banku (*Bacillus* sp. + *Bacillus pumilis*) oraz komercyjne środki biologiczne (**Betachicol** i **Trianum**) zwiększyły zdolność i dynamikę kiełkowania. Ich skuteczność była uzależniona od indywidualnej reakcji poszczególnych odmian. W badaniach laboratoryjnych prowadzonych w optymalnych warunkach kiełkowania nasion, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy oddziaływaniem pożytecznych mikroorganizmów i komercyjnych środków na omawiany parametr jakości nasion i dynamikę kiełkowania.

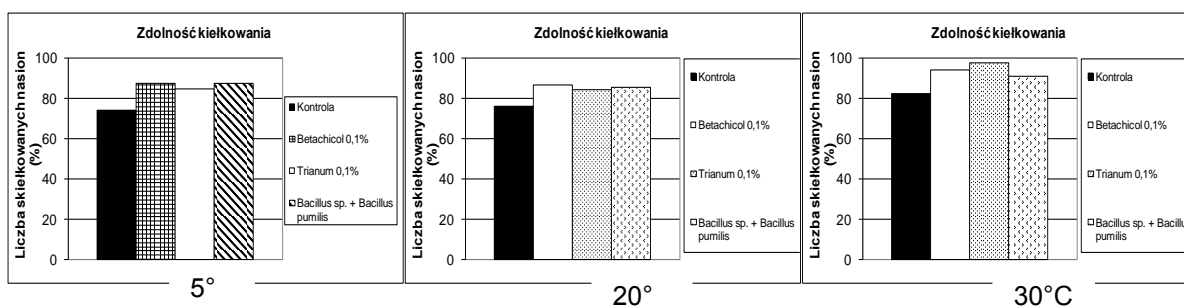
Różnice w ich oddziaływaniu ujawniały się natomiast w warunkach stresowych dla kiełkujących nasion. W porównaniu do kontroli, najlepsze efekty uzyskano w temperaturach suboptymalnej (5°C) i supraoptymalnej (35°C) po zastosowaniu bioproduktów mikrobiologicznych (*Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus*) oraz komercyjnych preparatów Betachicol i Trianum stosowanych w stężeniu 0,1%. Dane te wskazują na zasadność przedsięwzięcia traktowania nasion marchwi badanymi bioproduktami mikrobiologicznymi i testowanymi środkami biologicznymi w celu zwiększenia odporności roślin na niekorzystne warunki pogodowe w okresie wiosennym (Rys. 1-4).



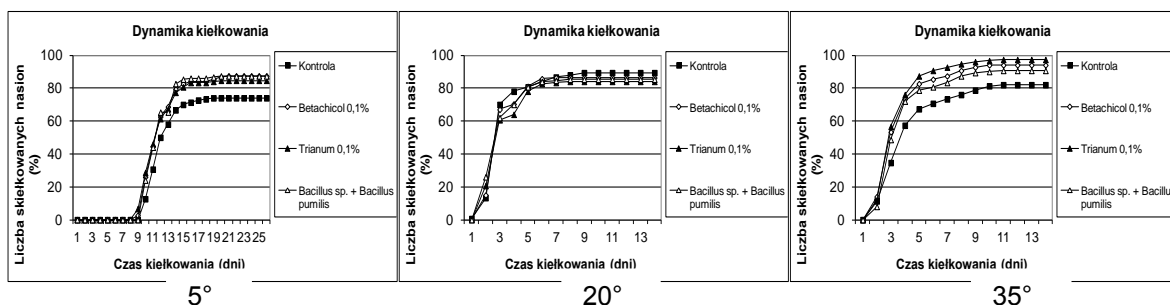
Rys. 1. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na zdolność kiełkowania nasion marchwi 'Nantes 2' w 5, 20 i 35°C w szalkach Petriego.



Rys. 2. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na dynamikę kiełkowania nasion marchwi 'Nantes 2' w 5, 20 i 35°C w szalkach Petriego.



Rys. 3. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na zdolność kiełkowania nasion marchwi 'Napoli F1' w 5, 20 i 35°C w szalkach Petriego.



Rys. 4. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na dynamikę kiełkowania nasion marchwi 'Napoli F1' w 5, 20 i 35°C w szalkach Petriego.

Ogólna aktywność dehydrogenaz w nasionach traktowanych bioproduktami mikrobiologicznymi *Bacillus sp.* i *Bacillus pumilus* oraz środkami biologicznymi (Betachicol i Trianum)

Celem pomiaru ogólnej aktywności dehydrogenaz w nasionach było określenie stanu wydajności oddechowej enzymów łańcucha oddechowego, zlokalizowanych w różnych organellach komórkowych roślin, a szczególnie w mitochondriach. Aktywność dehydrogenaz (enzymów oddechowych) uznawana jest powszechnie jako marker wigoru nasion i roślin.

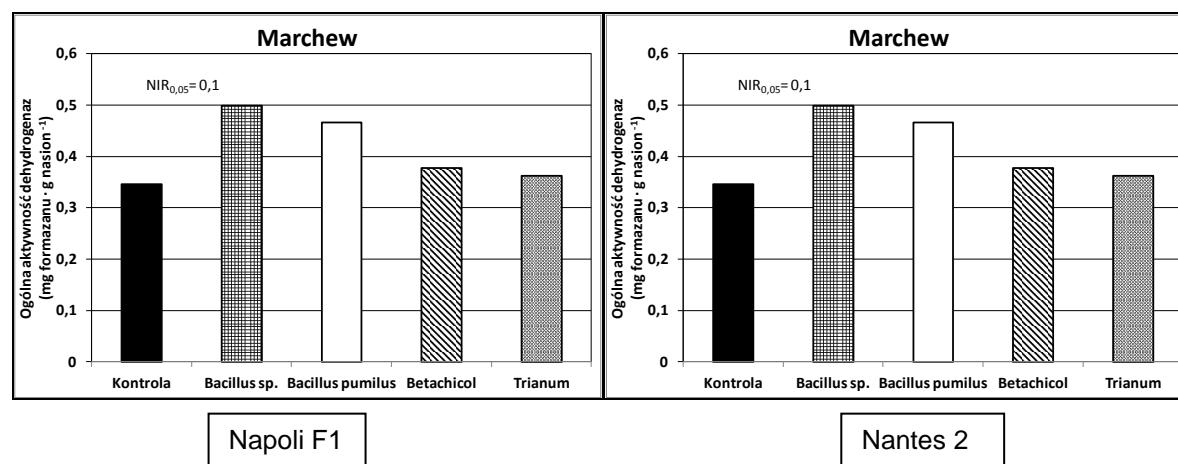
Metodyka

Nasiona marchwi traktowano przez 20 minut bioproduktami mikrobiologicznymi *Bacillus sp.* + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnymi środkami biologicznymi Betachicol 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 próbkach 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 próbkach 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. Absorbancję ekstraktu odczytywano przy 480 nm.

Wyniki

U obu odmian marchwi Napoli F1 i Nantes 2 odnotowano w nasionach zwiększenie ogólnej aktywności dehydrogenaz pod wpływem donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnych środków biologicznych Betachicol i Trianum. Najlepsze efekty w porównaniu z pozostałymi kombinacjami i około 40% wzrost aktywności oddechowej w nasionach stwierdzono po donasiennej aplikacji bioproduktów *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* (Rys.5).



Rys. 5. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na ogólną aktywność dehydrogenaz.

Elektroprzewodnictwo wód nastoinowych u nasion traktowanych bioproduktami mikrobiologicznymi *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz środkami biologicznymi (Betachicol i Trianum)

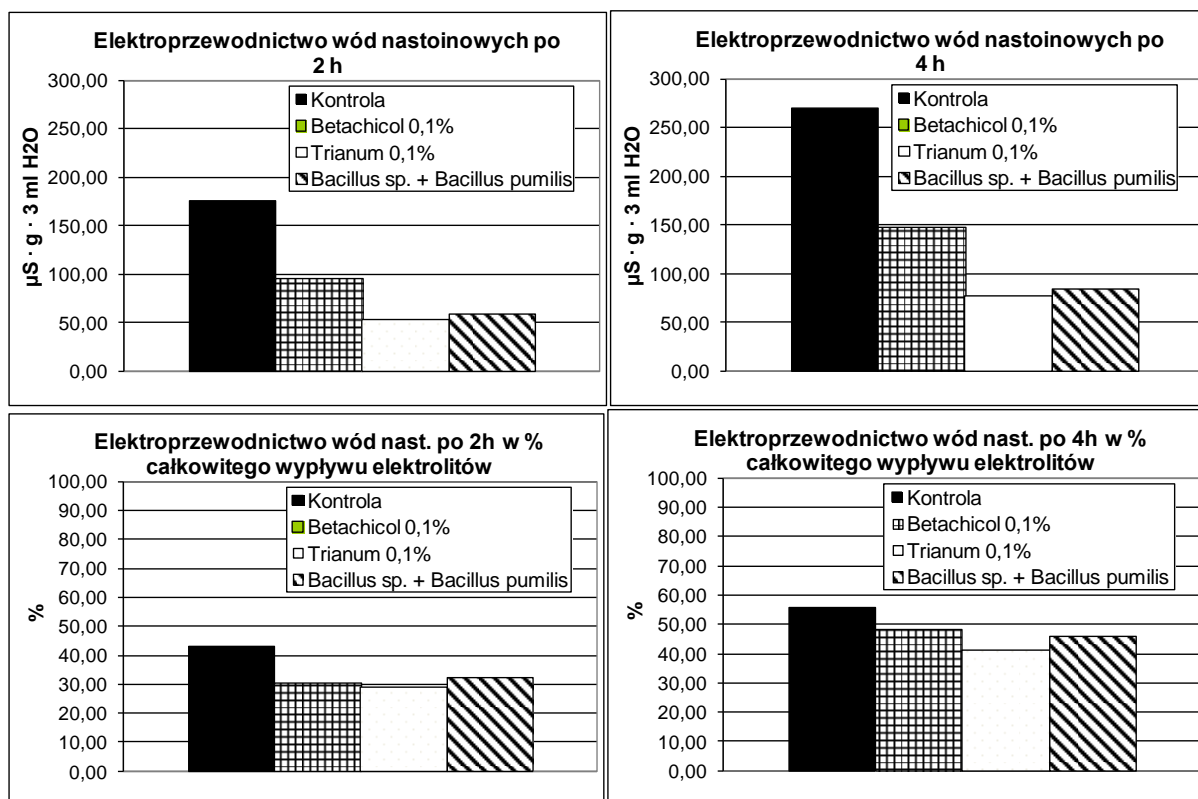
Celem badań było określenie przepuszczalności membran cytoplazmatycznych i wykazanie czy aplikowane do nasion bioprodukty mikrobiologiczne oraz środki biologiczne inicjują procesy reparacyjne i powodują zwiększenie integralności cytomembran, co skutkuje wyższą jakością nasion.

Metodyka

Określoną liczbę nasion moczone w ściśle odmierzonej ilości wody destylowanej i przetrzymywano w 20°C przez 2 i 4 godziny. Wyciek elektrolitów z nasion mierzono przy pomocy mikrokomputera Elmetron CC-551. Następnie tak przetrzymywane nasiona w wodzie destylowanej gotowano, w celu oceny całkowitego wycieku elektrolitów z nasion. Mniejsza wartość elektroprzewodnictwa wód nastoinowych po 2 i 4 godzinach przetrzymywania nasion w wodzie (wykazana w $\mu\text{S} \cdot \text{g} \cdot 3\text{ml} \text{H}_2\text{O}^{-1}$ oraz w % całkowitego wypływu elektrolitów) wskazuje na większą integralność membran cytoplazmatycznych i wyższą wartość siewną nasion.

Wyniki

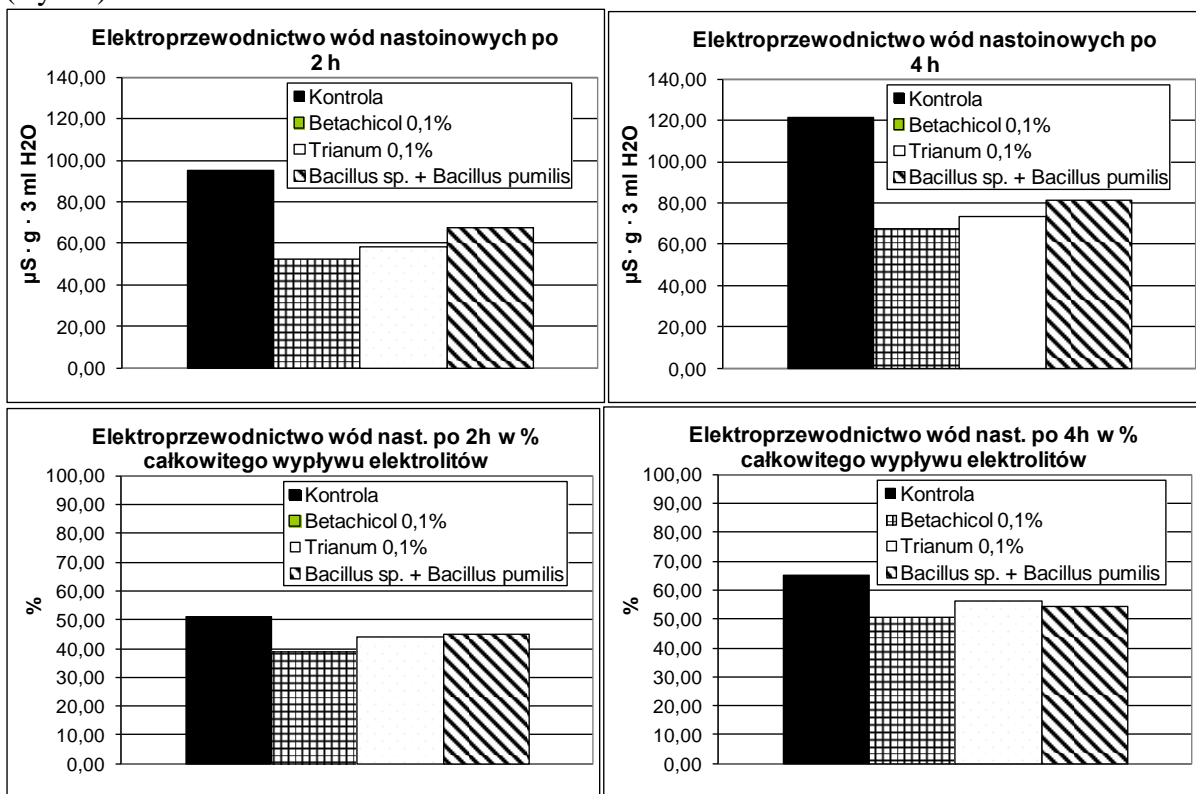
Uzyskane wyniki wskazują, że stosowane preparaty komercyjne i bioprodukty mikrobiologiczne zwiększyły integralność membran cytoplazmatycznych w nasionach marchwi odmiany Nantes 2, wyrażoną zmniejszonym wskaźnikiem elektroprzewodnictwa wód nastoinowych, badanym po 2 oraz 4 godzinach moczenia oraz w stosunku do całkowitego wycieku elektrolitów. Najkorzystniejszy wpływ zaobserwowano w wyniku stosowania środka biologicznego Trianum w stężeniu 0,1%. Zwiększona integralność membran cytoplazmatycznych ma istotne znaczenie w poprawie jakości nasion i wpływa korzystnie na zdolność i dynamikę kiełkowania nasion (Rys. 6).



Rys. 6. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na elektroprzewodnictwo wód nastoinowych nasion marchwi 'Nantes 2'.

W przypadku marchwi odmiany Napoli F1 stwierdzono również, że stosowanie Betachicolu 0,1%, Trianum 0,1% oraz *Bacillus sp.* + *Bacillus pumilis* korzystnie wpłynęło na integralność membran cytoplazmatycznych w nasionach. Najkorzystniejszy wpływ na zmniejszenie

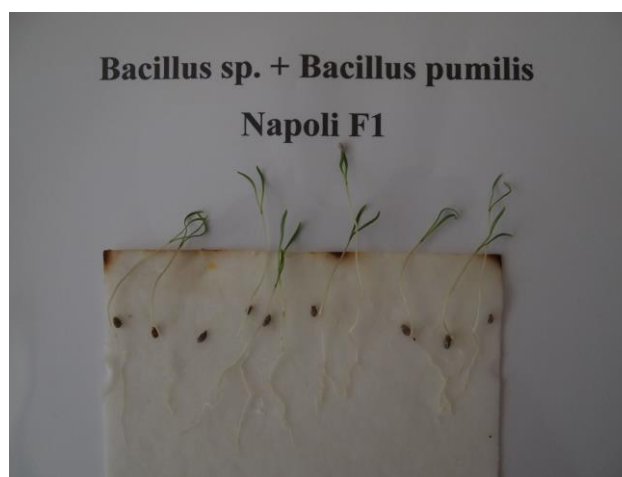
przepuszczalności cytomembran miał Biochicol w stężeniu 0,1%. Preparat stosowany w tym stężeniu poprawił o około 44% stan membran cytoplazmacyjnych wyrażony elektroprowadnictwem wód nastoinowych mierzonym po 2 i 4 godzinach moczenia nasion (Rys. 7).



Rys. 7. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na elektroprowadnictwo wód nastoinowych w nasionach marchwi 'Napoli F1'.

Pomiar długości korzeni zarodkowych i liści uzyskanych z nasion traktowanych środkami biologicznymi i bioproduktami mikrobiologicznymi w zmodyfikowanych płytkach Phytotoxkit



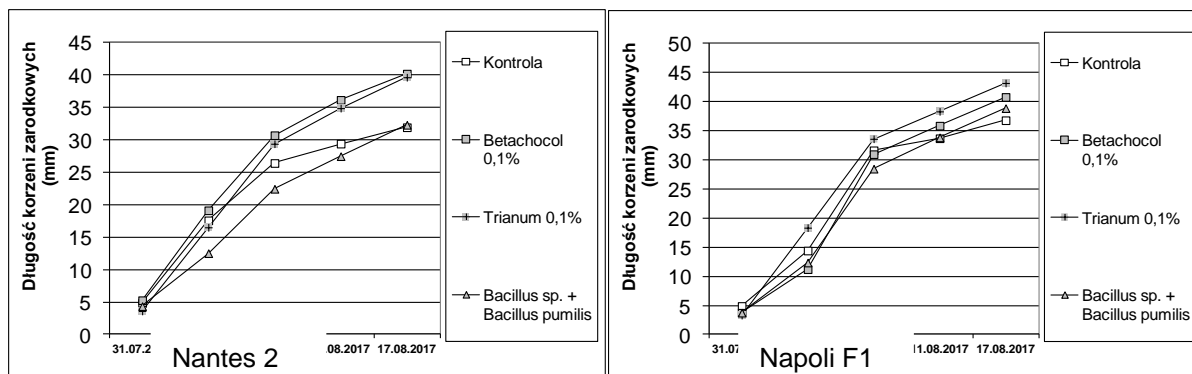


Fot. 4-6. Wzrost siewek marchwi na płytkach Phytotoxkit po inokulacji mikroorganizmami i traktowaniu preparatami biologicznymi

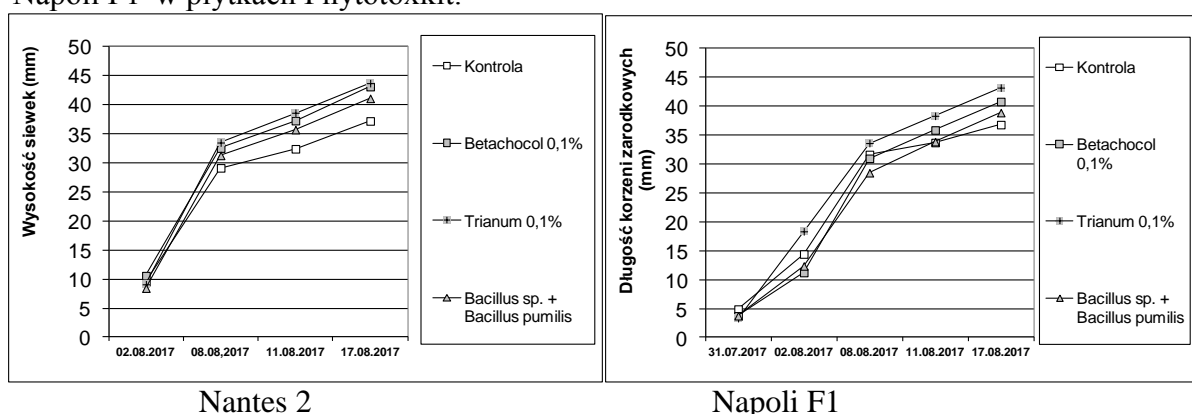
Celem pomiarów długości korzeni zarodkowych i liści było określenie dynamiki ich wzrostu i wigoru nasion, traktowanych bioproduktami *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilis* oraz biopreparatami Betachicol i Trianum. Traktowane przez 20 minut nasiona marchwi umieszczano w zmodyfikowanych płytkach Phytotoxkit 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

Przyspieszone kiełkowanie nasion pod wpływem zastosowanych aplikacji donasiennych spowodowało szybszy wzrost korzeni zarodkowych i liści w laboratoryjnym bioteście Phytotoxkit, który pozwala w krótkim czasie na przewidywanie rozwoju roślin w warunkach polowych i umożliwia obserwację rozwoju systemu korzeniowego, będącego uznanym wskaźnikiem wigoru roślin. W teście tym najbardziej skuteczną w przyspieszeniu wzrostu korzeni zarodkowych i początkowego wzrostu roślin u obu odmian marchwi okazała się donasienna aplikacja preparatów Trianum i Betachicol (0,1%) (Rys. 8, 9).



Rys. 8. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na długość korzeni zarodkowych marchwi 'Nantes 2' i 'Napoli F1' w płytkach Phytotoxkit.



Rys. 9. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wysokość siewek marchwi 'Nantes 2' i 'Napoli F1' w płytkach Phytotoxkit

Doświadczenia szklarniowe



Fot.7. Wzrost roślin marchwi traktowanych bioproduktami mikrobiologicznymi oraz komercyjnymi preparatami biologicznymi (szklarnia)

Wpływ traktowania nasion bioproduktami *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnymi środkami biologicznymi Betachicol i Trianum na wschody i wzrost roślin marchwi oraz zawartość chlorofilu i wymianę gazową w liściach w warunkach szklarniowych

Celem badań było wykazanie wpływu donasiennej aplikacji bioproduktów *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnych środków biologicznych Betachicol i Trianum na wschody i wzrost marchwi oraz zawartość chlorofilu i wymianę gazową w liściach w warunkach szklarniowych. Przeprowadzona badania umożliwiły przeprowadzenie, w krótszym czasie niż testy polowe, wstępnej oceny wpływu badanych aplikacji na wzrost roślin, która może być wykorzystana do założenia doświadczeń w gruncie.

Metodyka

Traktowane nasiona bioproduktami *Bacillus* sp. i *Bacillus pumilus* oraz komercyjnymi środkami biologicznymi Betachicol i Trianum wysiewano w szklarni do skrzynek wypełnionych substratem ogrodowym. Oceniono wschody i wzrost roślin marchwi oraz indeks zawartości chlorofilu przy pomocy aparatu SPAD-502 (Minolta, Japan) i wymianę gazową w liściach (fotosyntezę netto, transpirację, przewodność szparkową i zawartość międzykomórkowego CO₂) przy pomocy Analizatora Gazu TPS-2 (PP System, USA),

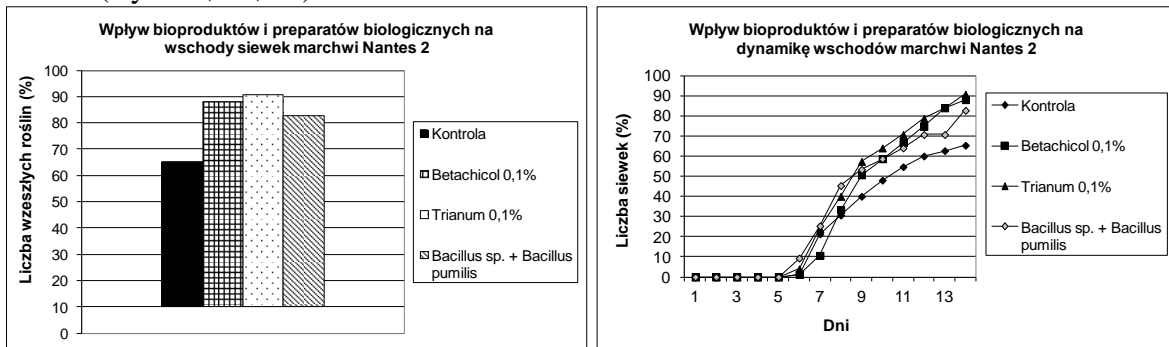


Fot.8. Wzrost roślin marchwi traktowanych bioproduktami mikrobiologicznymi oraz komercyjnymi preparatami biologicznymi (szklarnia)

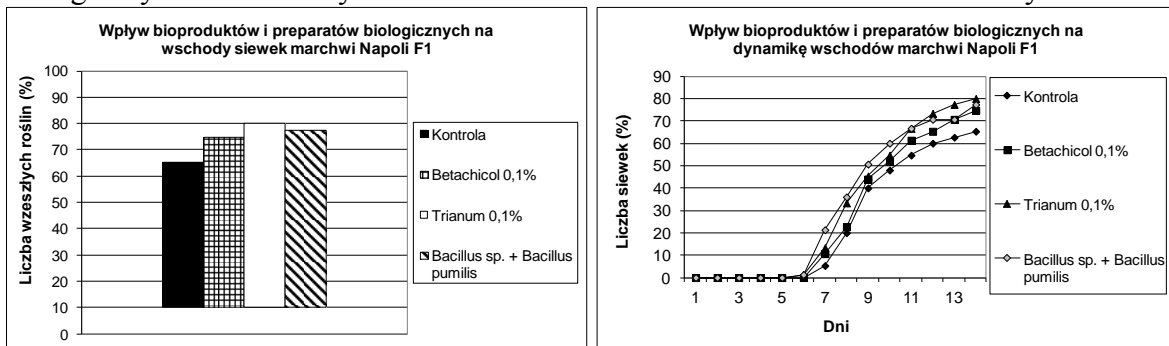
Wyniki

Przyspieszone kiełkowanie i zwiększona liczba siewkujących nasion pod wpływem wszystkich stosowanych aplikacji donasiennych skutkowało zwiększeniem dynamiki wschodów oraz liczby uzyskanych roślin, a także przyspieszeniem ich wzrostu i zwiększeniem zawartości chlorofilu oraz wymiany gazowej w liściach (fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej i zawartości międzykomórkowego CO₂) w warunkach szklarniowych. W tych warunkach, podobnie, jak w innych testach, aplikacja bioproduktów *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnych środków biologicznych Betachicol i Trianum zwiększyła dynamikę wschodów i wzrostu roślin oraz indeks zawartości chlorofilu i wymianę gazową. Największą skutecznością w poprawie dynamiki kiełkowania wykazał się preparat Trianum (0,1%), który spowodował zwiększenie liczby wschodów o 15% ('Napoli F1') i 25% ('Nantes 2') (Rys. 10, 11). Wpływ stosowanych aplikacji donasiennych na

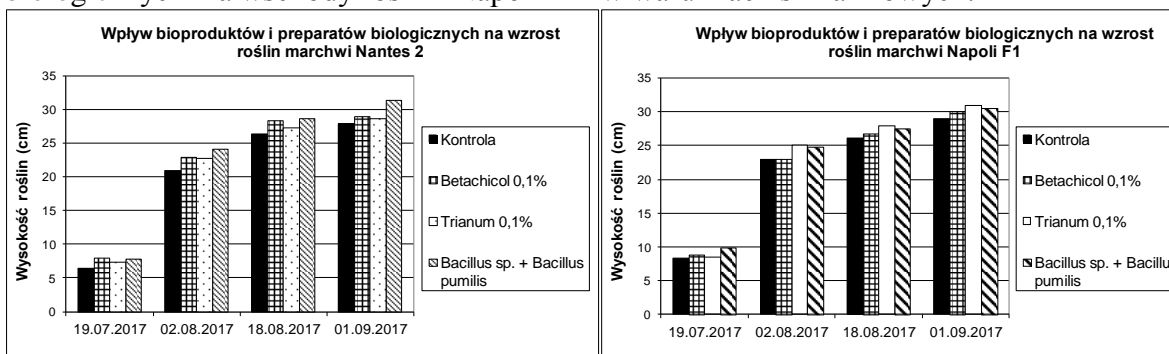
przyspieszenie wzrostu roślin był podobny (Rys. 12). Zastosowane bioprodukty i środki biologiczne spowodowały zwiększenie indeksu zawartości chlorofilu i wymiany gazowej w zróżnicowanym stopniu, jednak zaistniałe różnice w wielkości ocenianych parametrów nie były istotne (Rys. 13, 14, 15)



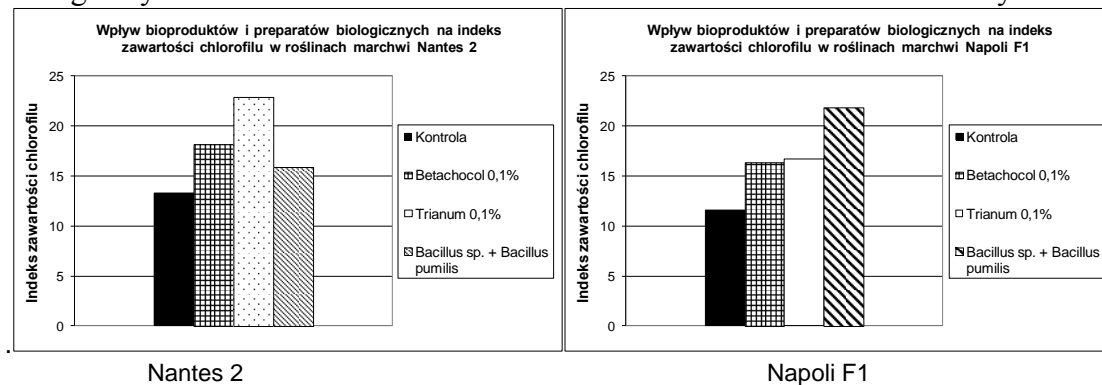
Rys. 10. Wpływ bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wschody roślin marchwi ‘Nantes 2’ w warunkach szklarniowych



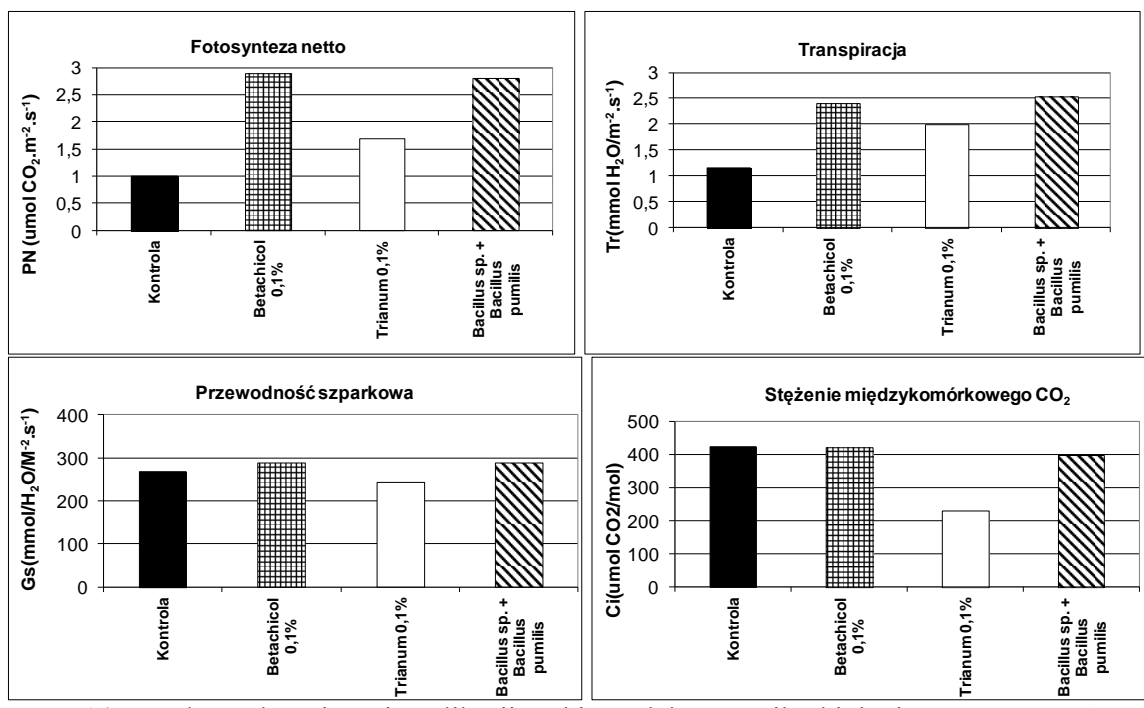
Rys. 11. Wpływ bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wschody roślin ‘Napoli F1’ w warunkach szklarniowych.



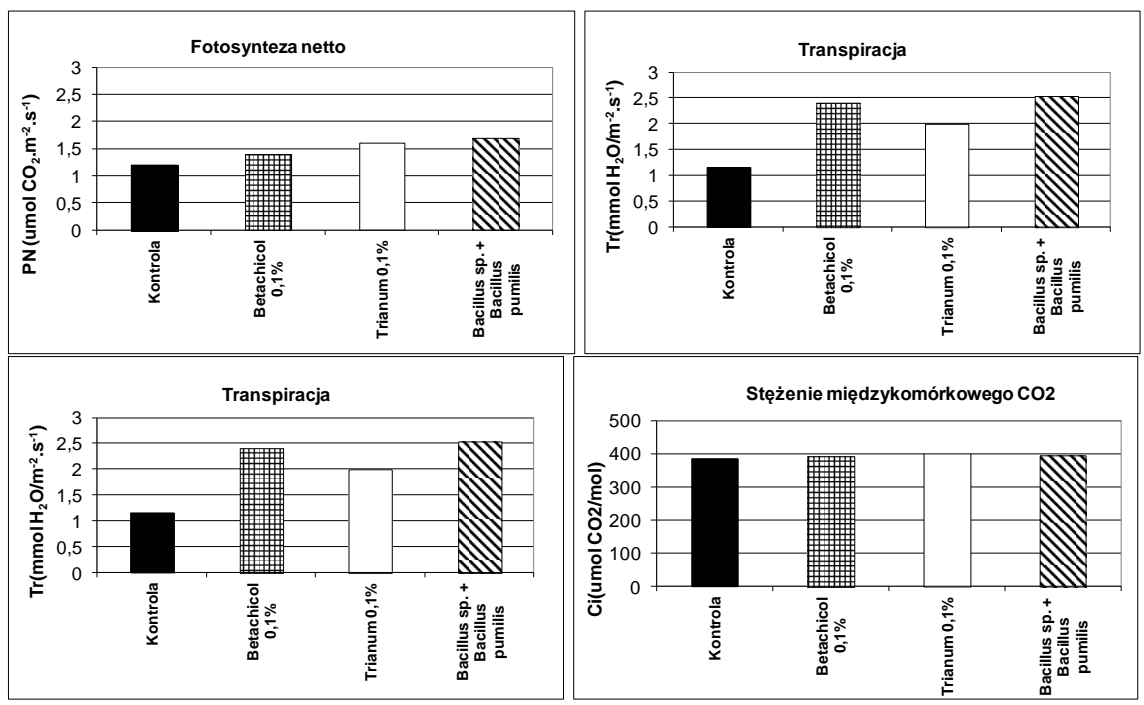
Rys. 12. Wpływ bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wzrost roślin marchwi ‘Nantes 2’ w warunkach szklarniowych.



Rys. 13. Wpływ bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na indeks zawartości chlorofilu w roślinach marchwi ‘Nantes 2’ i ‘Napoli F1’ w warunkach szklarniowych.



Rys. 14. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wymianę gazową w liściach roślin: fotosyntezę netto (A), transpirację (E), przewodność szparkową (Gs) i zawartość międzykomórkową CO₂ (Ci) w roślinach marchwi ‘Nantes 2’ w warunkach szklarniowych. Kontrolę stanowiły liście roślin nietraktowanych.



Rys. 15. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wymianę gazową w liściach roślin: fotosyntezę netto (A), transpirację (E), przewodność szparkową (Gs) i zawartość międzykomórkową CO₂ (Ci) w roślinach marchwi ‘Napoli F1’ w warunkach szklarniowych. Kontrolę stanowiły liście roślin nietraktowanych.

Doświadczenia polowe

Wpływ traktowania nasion bioproduktami *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnymi środkami biologicznymi Betachicol i Trianum na wzrost i jakość korzeni marchwi oraz zawartość chlorofilu i wymianę gazową w liściach w warunkach polowych

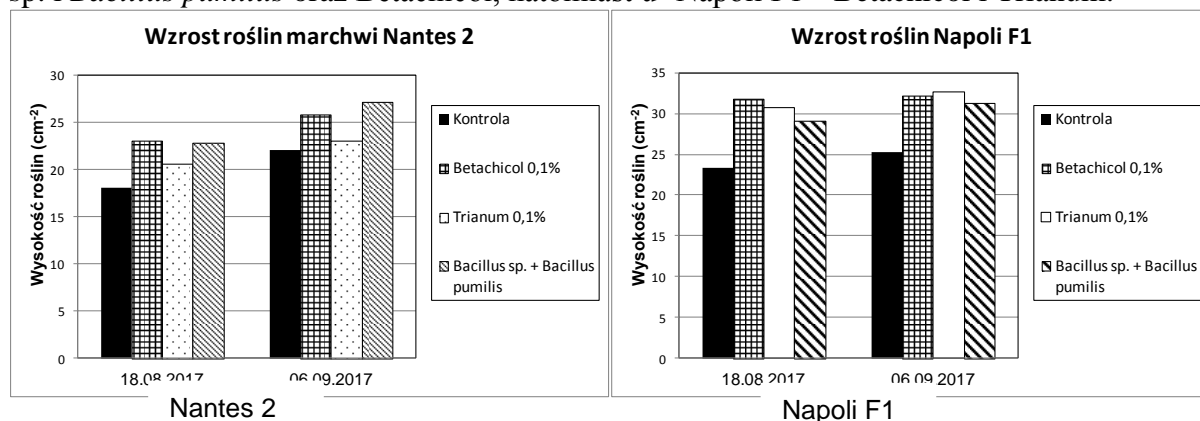
Celem badań było określenie wpływu donasiennej aplikacji bioproduktów *Bacillus* sp.+ *Bacillus pumilus* oraz komercyjnych środków biologicznych Betachicol i Trianum na wzrost marchwi, masę, długość i średnicę korzeni, a także zawartość chlorofilu i metabolizm roślin w warunkach polowych.

Metodyka

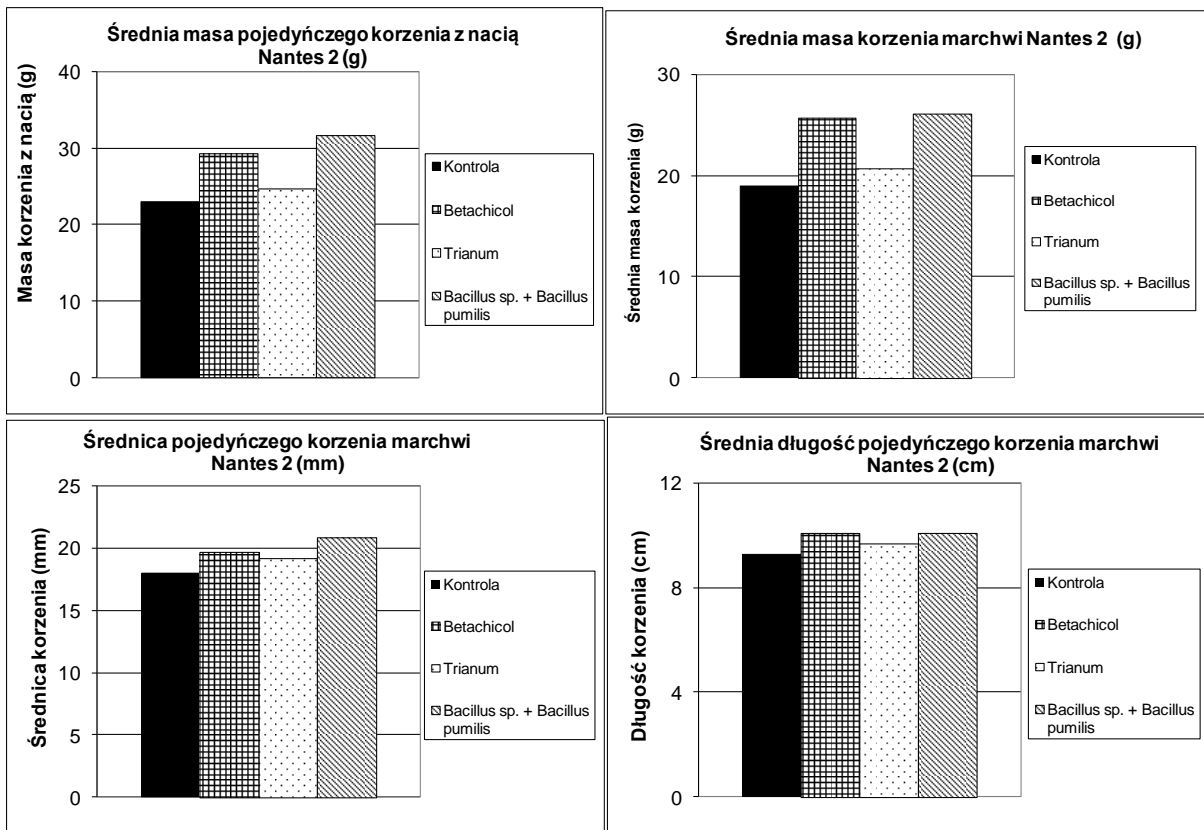
Traktowane nasiona bioproduktami *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnymi środkami biologicznymi Betachicol i Trianum wysiewano na poletkach Certyfikowanego Pola Ekologicznego Instytutu Ogrodnictwa. W okresie wegetacyjnym wykonywano dwukrotne pomiary biometryczne roślin marchwi, indeksu zawartości chlorofilu przy pomocy aparatu SPAD-502 (Minolta, Japan) oraz wymianę gazową w liściach (fotosyntezę netto, transpirację, przewodność szparkową i zawartość międzykomórkowego CO₂) przy pomocy Analizatora Gazu TPS-2 (PP System, USA). Po zbiorze korzeni oceniono średnicę, długość i masę korzeni z poszczególnych kombinacji.

Wyniki

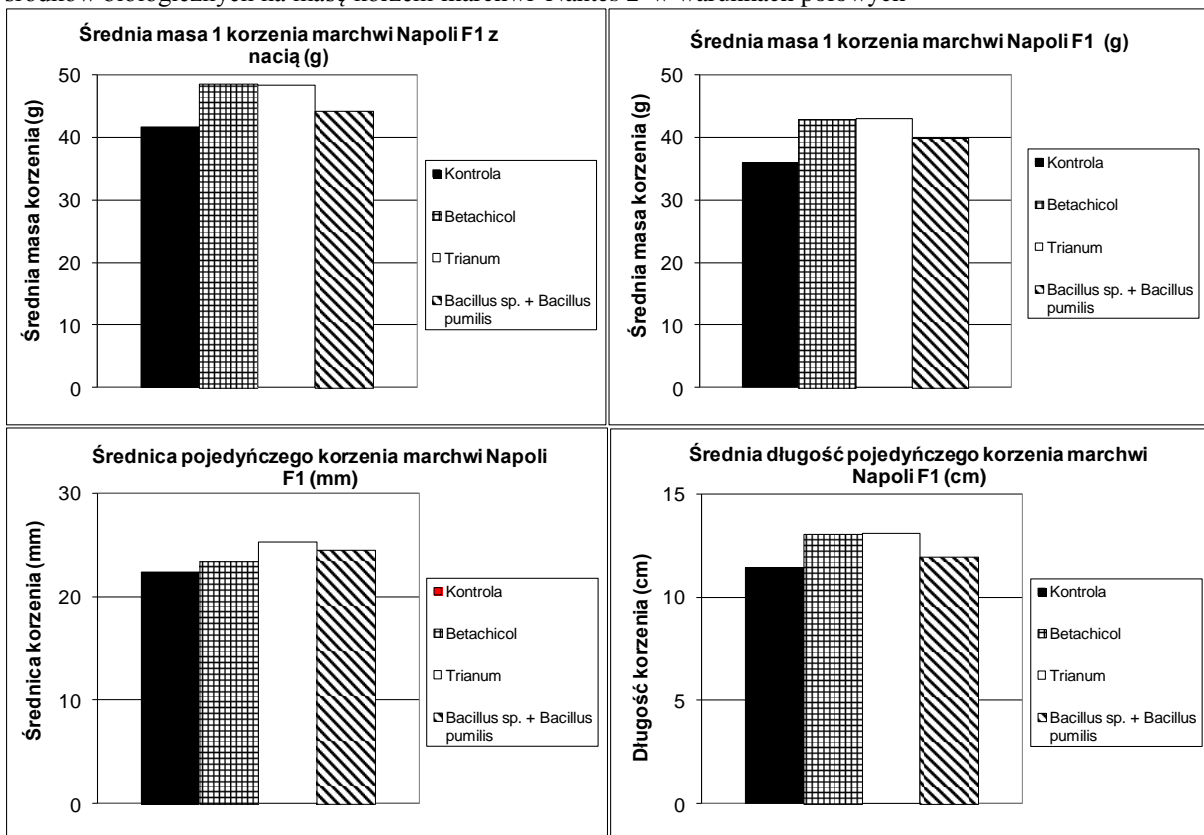
Uzyskane wyniki wskazały na korzystny wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus* oraz komercyjnych środków biologicznych Betachicol i Trianum na wzrost roślin marchwi obu badanych odmian, średnicę, długość i ciężar korzeni oraz indeks zawartości chlorofilu i wymianę gazową w liściach (fotosyntezę netto, transpirację, przewodność szparkową i zawartość międzykomórkowego CO₂) (Rys. 16-21). W przypadku odmiany Nantes 2 najkorzystniej na średnicę i długość korzeni oraz ich masę wpłynęły *Bacillus* sp. i *Bacillus pumilus* oraz Betachicol, natomiast u 'Napoli F1' -Betachicol i Trianum.



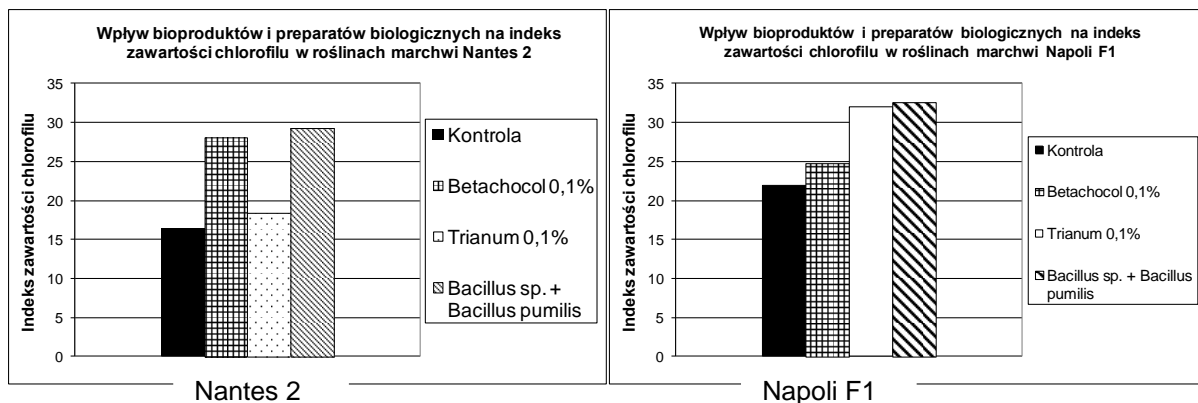
Rys. 16. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wysokość roślin marchwi 'Nantes 2' i 'Napoli F1' w doświadczeniu w warunkach polowych.



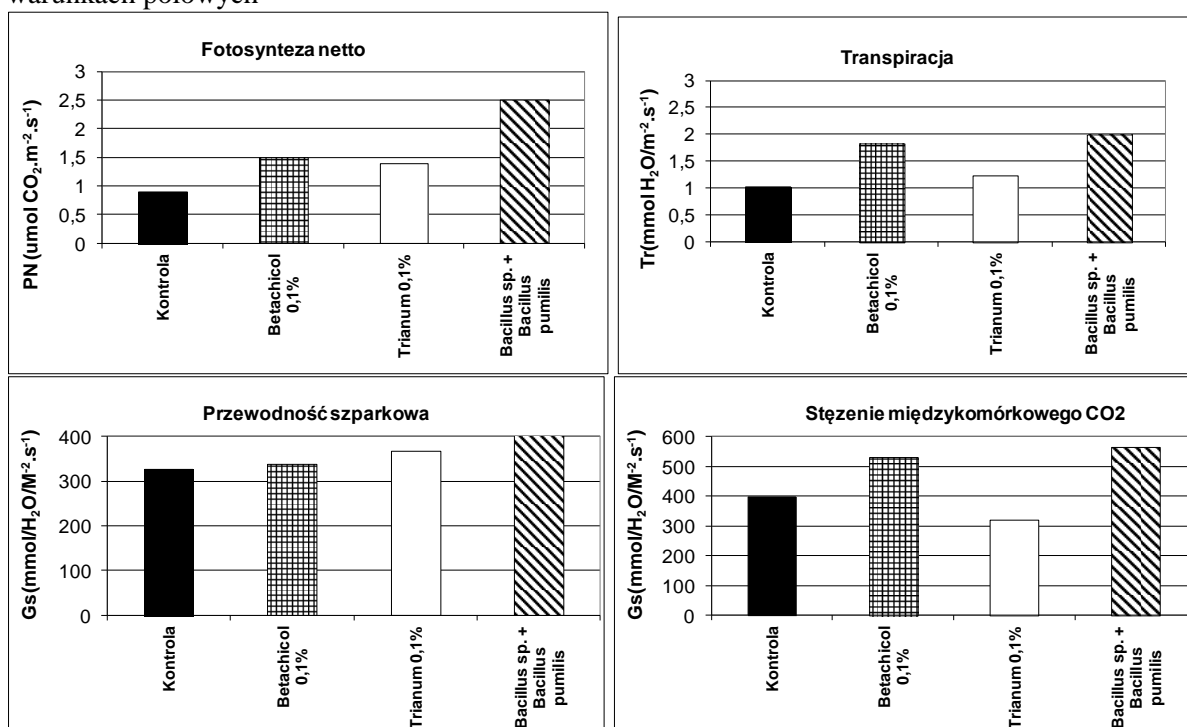
Rys. 17. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na masę korzeni marchwi 'Nantes 2' w warunkach polowych



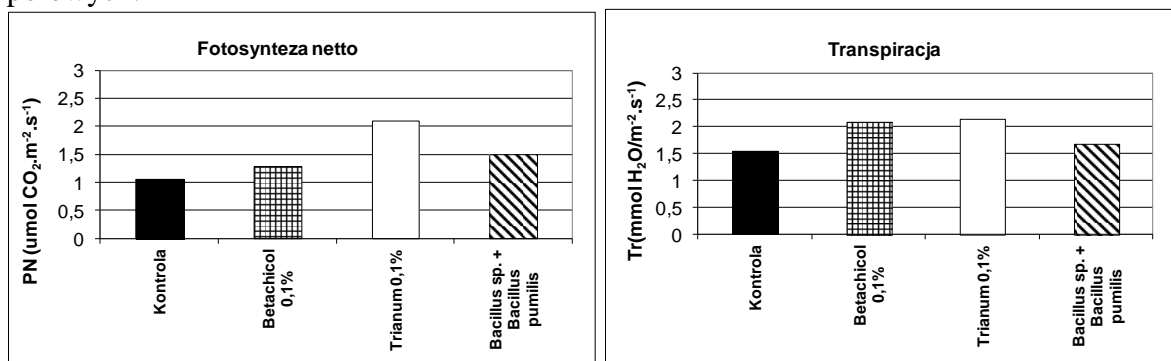
Rys. 18. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na plon roślin marchwi 'Napoli F1' w warunkach polowych

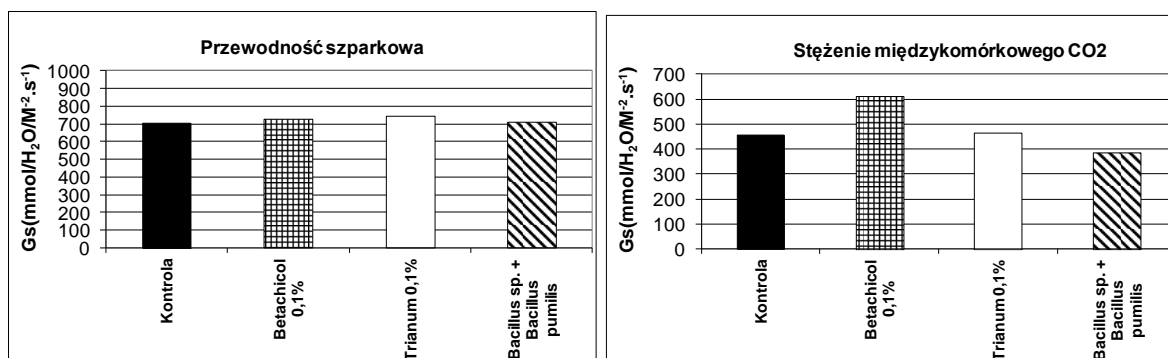


Rys. 19. Wpływ aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na indeks zawartości chlorofilu w roślinach marchwi 'Nantes 2' i 'Napoli F1' w warunkach polowych



Rys. 20. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wymianę gazową w liściach roślin: fotosyntezę netto (A), transpirację (E), przewodność szparkową (Gs) i zawartość międzykomórkową CO₂ (Ci) w roślinach marchwi 'Nantes 2'. Kontrolę stanowiły liście roślin nietraktowanych w warunkach polowych.





Rys. 21. Wpływ donasiennej aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych (Symbio Bank) i komercyjnych środków biologicznych na wymianę gazową w liściach roślin: fotosyntezę netto (A), transpirację (E), przewodność szparkową (Gs) i zawartość międzykomurkową CO₂ (Ci) w roślinach marchwi ‘Napoli F1’. Kontrolę stanowiły liście roślin nietraktowanych w warunkach polowych.

Wpływ aplikacji bioproduktów i komercyjnych środków biologicznych w uprawach nasiennych marchwi odmiany Napoli F1 na jakość i zdrowotność reprodukowanych nasion

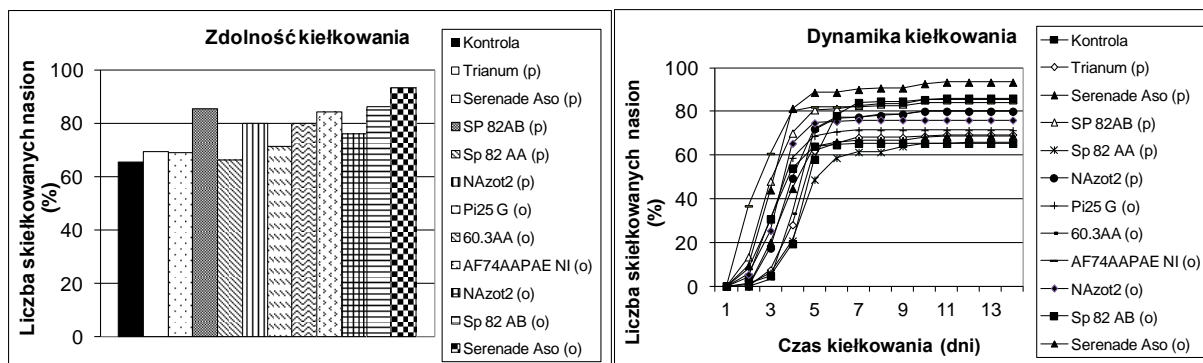
Celem badań było określenie wpływu donasiennej, dolistnej i doglebowej aplikacji bioproduktów i komercyjnych środków biologicznych (zestawionych w tabeli 1) na zdolność i dynamikę kiełkowania nasion oraz masę 1000 nasion reprodukowanych w doświadczeniach polowych.

Metodyka

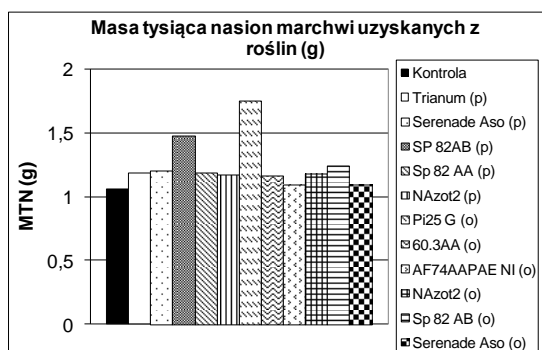
Nasienniki marchwi odmiany Napoli F1 uzyskane z wysadków wyprodukowanych w 2016 roku na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym zostały zebrane w fazie dojrzałości pełnej nasion i baldachów, dosuszone około 2 tygodni i natępnie poddane obróbce pozbiorczej przy pomocy zestawu maszyn młocących i doczyszczających Petkus. Oczyszczone nasiona poddano analizom jakości (energia i zdolność kiełkowania, masa tysiąca nasion i zdrowotności).

Wyniki

Uzyskane wyniki wskazały, że testowane bioprodukty mikrobiologiczne i komercyjne środki biologiczne aplikowane donasiennie, doglebowo i dolistnie w całym dwuletnim cyklu produkcyjnym, korzystnie wpływały na zdolność i dynamikę kiełkowania nasion oraz ich dorodność, wyrażoną masą 1000 nasion. Najkorzystniejszy wpływ na zdolność kiełkowania nasion i dynamikę kiełkowania miała donasienna aplikacja Serenade Aso i bioprodukty Sp 82 AB oraz SP 82 AB (Rys. 22). Dorodniejsze nasiona – o wyższej masie 1000 sztuk uzyskano natomiast po aplikacji bioproduktów Pi 25 G oraz SP 82 AB Symbio Banku (Rys 23).



Rys. 22. Wpływ aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych i komercyjnego środka biologicznego Trianium w uprawach nasiennych marchwi odmiany Napoli F1 na zdolność i dynamikę kiełkowania uzyskanych nasion



Rys. 23. Wpływ aplikacji bioproduktów mikrobiologicznych i komercyjnego środka biologicznego Trianium w uprawach nasiennych marchwi odmiany Napoli F1 na masę 100 nasion (MTN)

WYNIKI

Uzyskane wyniki upowszechniano producentom nasion ekologicznych w czasie wizyt i lustracji w ich gospodarstwach, między innymi: w Radominie, Pokrzydowie, Ciechocinie, Smogorzewie, Gronowie, Pędzewie, Przedsiębiorstwach Nasiennych m.in. Torseed w Toruniu, Polan w Krakowie, w przedsiębiorstwach zajmujących się przetwórstwem marchwi: Marwit oraz Biofood (z licznymi kontrahentami prowadzącymi produkcję ekologiczną marchwi) Weryfikowano je również podczas wyjazdów do wyspecjalizowanych laboratoriów oceny nasion (Centralne Laboratorium GIORiN w Toruniu). Inną formą upowszechniania były porady telefoniczne. Obecnie są przygotowywane publikacje naukowe.

Przedstawione zadania badawcze dotyczące biologicznego zaprawiania nasion obejmują drugi 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.

WNIOSKI

Badania wskazują na :

1. Ochronne efekty zastosowanych donasiennie w badaniach konsorcjów mikroorganizmów pożytecznych *Bacillus* sp. + *Bacillus pumilus*. W badaniach zasiedlenia nasion mikoflorą stwierdzono po ich aplikacji zmniejszenie udziału mikopatogenów w ogólnej populacji mikroorganizmów, jak również inhibicyjny wpływ na rozwój grzybów saprofitycznych. Nadparazytne zdolności wymienionych szczepów bakteryjnych w stosunku do najważniejszych patogenów marchwi,

przenoszonych z nasionami, potwierdzono w kulturach *in vitro* oraz w badaniach *in vivo*. Fungicydalne oddziaływanie charakteryzowała wysoka stabilność i długotrące efekty ochronne. W wielu kombinacjach efekty były porównywalne ze standardowymi preparatami biologicznymi (Triatum, Biochicol, Serenade), a w niektórych nawet lepsze.

2. Stworzenie warunków do rozwoju innych mikroorganizmów pożytecznych np. grzybów antagonistycznych wobec patogenów zasiedlających sfermosferę nasion i fylloplanę roślin marchwi.
3. Indukcję procesów kiełkowania i metabolizmu nasion marchwi w warunkach stresu abiotycznego. W temperaturach suboptymalnych i supraoptymalnych kiełkowania nasion, uzyskiwano pod ich wpływem zwiększenie parametrów jakości nasion (zdolności kiełkowania, masy tysiąca nasion).
4. Stymulację procesów fizjologicznych a tym samym wzrostu i rozwoju roślin marchwi w całym dwuletnim cyklu produkcyjnym.
5. Szerokie spektrum wielokierunkowego oddziaływania na rośliny nasienne marchwi (nasienniki) – stymulację poszczególnych faz rozwojowych a zwłaszcza kwitnienia i zawiązywania nasion. W rezultacie ich stosowania uzyskano nasiona o wyższej masie tysiąca nasion (dorodniejsze) i spełniające kryteria dopuszczenia do obrotu (zgodne z wymaganiami PN i WE).
6. Poprawę wartości przechowalniczej wysadków (materiału rozmnożeniowego) marchwi – są to jednoroczne, wstępne wyniki przechowywania wysadków produkowanych w 2016 roku. W porównaniu z obiektami kontrolnymi (nie traktowanymi) uzyskano istotnie lepszą zdrowotność korzeni. **Badania w tym zakresie są obiecujące i warte potwierdzenia oraz kontynuacji w kolejnych latach, ze względu na naglące problemy w tym zakresie producentów nasiennych roślin dwuletnich oraz przetwórców warzyw.**

LITERATURA

- Dorna H. 2007. Wybrane gatunki grzybów rodzaju *Alternaria* w nasionach marchwi – ich lokalizacja, toksynotwórczość, wpływ na wigor i kiełkowanie nasion oraz wschody. Roczn. AR Pozn. Rozpr. Nauk. 386, 98
- ISTA 2003. Blotter method for the detection of *Alternaria radicina* on *Daucus carota*. International Rules for Seed Testing. Aneks do rozdz. 7: Seed health testing methods. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Szwajcaria.
- Janas R., Grzesik M. 2011. Skuteczność wybranych preparatów biologicznych w uprawach ekologicznych roślin prozdrowotnych na nasiona. Journal Of Research And Applications In Agricultural Engineering. ISSN 1642-686X. V.56 (3). 152-157.
- Janas R., Grzesik M., Romanowska-Duda Z. 2016. Proekologiczne metody osłony nasion roślin warzywnych przed patogenami. W: Monografia „Wybrane zagadnienia ekologiczne we współczesnym rolnictwie”. PIMR Poznań (9): 72-77
- Janas R., Habdas H., Szafirowska A. 2000. Health status and cytological changes in matricconditioned seeds. *Phytopathologia Polonica* 19: 117-125
- Janas R., Robak J., Sobolewski J. 2006. Wpływ integrowanej metody ochrony upraw pietruszki nasiennej na jakość i zdrowotność materiału siewnego. *Progress in Plant Prot/ Postępy w Ochronie Roślin*, 46(1): 1229-1234
- Khan A.A., 1992. Preplant physiological seed conditioning. *Horticultural Reviews* 13, 131–181.
- Nowicki B. 1995. Patogeniczne grzyby zasiedlające nasiona marchwi. *Acta Agrobot.* 48 (2): 49–57.

Tylkowska K., Dorna H., Szopińska D. 2007. Patologia nasion. AR.Poznań

Wagner A., Strudzińska A., Struszczyk H. 2003. Effect of some natural compounds on *Alternaria alternata* Keiss. and *Botrytis cinerea* Pers. Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Scien. 51 (3): 287–290.

Witek Z., Chmielowiec P., 2004. Produkcja nasion do upraw ekologicznych, konieczność, możliwości i aspekty praktyczne. Wybrane zagadnienia z nasiennictwa roślin ogrodniczych. Monografia. AR. Kraków, 252–256.

Dyrektywa Rady 2002/55/WE z dnia 13 czerwca 2002 roku w sprawie obrotu materiałem siewnym warzyw (Dz.Urz. UE L 193 z 20.07.2002 r. s. 33 z późn. zm.; Dz.Urz. UE Polskie Wydanie Specjalne, rozdz. 3, t. 36, s. 313, z późn. zm.).

PODZADANIE 3

Wpływ biologicznego zaprawiania nasion marchwi środkami pochodzenia naturalnego na zdrowotność materiału rozmnożeniowego (wysadki) oraz roślin nasiennych.

WSTĘP

W Polsce istotnym problemem w ochronie roślin w rolnictwie ekologicznym jest brak lub niezbyt doskonały system ochrony warzyw, między innymi spowodowany bardzo małym asortymentem dostępnych środków ochrony. Od wielu lat poszukuje się skutecznych metod ochrony tej grupy roślin w rolnictwie ekologicznym. Właściwym kierunkiem doskonalenia ochrony roślin w systemie ekologicznym jest zabezpieczanie materiału siewnego przed patogenami poprzez produkcję nasion wolnych od patogenów, jak też ich przedsięwzięciem zaprawianiem. Oprócz uzyskiwania wysokiej zdrowotności nasion udowodniono także względy ekonomiczne, ponieważ zaprawianie nasion jest najtańszym zabiegiem ochroniarskim a stosowanie nasion wolnych od patogenów gwarantuje wysokie plonowanie roślin. Z doniesień literatury światowej oraz badań własnych wynika, że istnieje możliwość zabezpieczania nasion, zaprawiając je środkami pochodzenia naturalnego. Drugim kierunkiem zwiększającym zdrowotność materiału siewnego jest produkcja nasion ze zdrowych materiałów rozmnożeniowych (wysadki) oraz roślin nasiennych skutecznie chronionych przed epifitozami. Wskazują na to również badania autorów projektu, wykonane w ramach zadania w zakresie rolnictwa ekologicznego w 2016 roku. Wstępne wyniki doświadczeń wskazują na możliwość wykorzystania pożytecznych mikroorganizmów wyselekcjonowanych w Pracowni Rizosfery oraz naturalnych środków, które aplikowane na nasiona i rośliny warzywne powodowały zwiększanie ich zdrowotności.

CEL

Celem badań było określenie wpływu mikroorganizmów antagonistycznych (z zasobów Symbio Banku IO) oraz środków pochodzenia naturalnego na zdrowotność roślin nasiennych marchwi oraz materiału rozmnożeniowego (wysadków-korzeni).

METODYKA BADAŃ

Prace badawcze wykonano w Pracowni Fitopatologii Instytutu Ogrodnictwa. Dotyczyły one testowania mikroorganizmów antagonistycznych i środków pochodzenia naturalnego, stosowanych do traktowania wysadków oraz roślin nasiennych marchwi w okresie wegetacji. Prowadzono doświadczenia w kulturach wazonowych i polowe. W trakcie doświadczeń prowadzono monitoring chorób infekcyjnych roślin oraz dokonywana była ocena ich zdrowotności i porażenia.

1. Doświadczenia infekcyjne – wazonowe - przeprowadzono w kontenerach zawierających 2l podłoża mineralnego, infekowanego patogenami grzybowymi: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, patogenami grzybopodobnymi z rodzaju *Pythium* i *Phytophthora*. Inokulację wykonano zgodnie z metodykami obowiązującymi w badaniach fitopatologicznych.

Doświadczenie założono w układzie bloków losowanych. Wysiew nasion marchwi odmiany Nantaise 2 wykonano 19.06.2017 do kontenerów o wymiarach 30x25x7 cm, wypełnionych podłożem, pobranym z certyfikowanego pola ekologicznego Instytutu Ogrodnictwa. Nasiona wysiewano w 3 powtórzeniach, po 100 nasion do każdego kontenera. Nasiona zostały uprzednio zaprawione wybranymi izolatami bakteryjnymi oraz środkami referencyjnymi. Podłoże poddano analizie mikologicznej, która wykazała obecność grzybów z rodzaju

Fusarium, *Alternaria* oraz *Sclerotinia*. Dodatkowo wykonano inokulację gleby *Pythium* spp. poprzez wymieszanie zawiesiny tego organizmu w proporcji 10 ml *Pythium* spp. z 1 kg gleby mineralnej. Zawiesina inokulum była sporządzona zgodnie z ogólnie przyjętymi metodami i zawierała 5×10^6 oospor w 1ml.

Doświadczenie przeprowadzono w szklarni w kontrolowanej temperaturze 20°C. W trakcie wegetacji prowadzono selekcję negatywną roślin. Porażone siewki odkażano i wykładano na szalki z pożywką hodowlaną w celu wyizolowania organizmów patogenicznych.

Ocenę zdrowotności siewek prowadzono wg skali bonitacyjnej (0 – brak porażenia - 7° - 100% porażona powierzchnia rośliny), a następnie przeliczano na procentową powierzchnię roślin ze zmianami nekrotycznymi tkanki na skutek porażenia, zgodnie z przelicznikiem:

0° - 0% porażonej powierzchni

1° - 1% porażonej powierzchni

2° – 6% porażonej powierzchni

3° – 15% porażonej powierzchni

4° – 30% porażonej powierzchni

5° – 50% porażonej powierzchni

6° – 80% porażonej powierzchni

7° – 100% porażonej powierzchni

Podstawą prawidłowej oceny porażenia była szczegółowa diagnostyka sprawców chorób. W tym celu porażoną tkankę, pobraną z badanych roślin analizowano metodami tradycyjnymi na pożywkach hodowlanych i metodami biologii molekularnej. Ponadto oszacowano stopień wpływu badanych izolatów na fitotoksyczność siewek w skali 0-5° (0° - brak efektów fitotoksycznych, 5° - 100% uszkodzenia siewek). Wyniki opracowano analizą wariancji, istotność różnic oceniono testem Newman-Keuls'a $P=0,05$.

Badano następujące środki:

- Trianum (grzyb *Trichoderma harzianum*),
- Serenade Aso (bakteria *Bacillus subtilis*),
- Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus* sp),
- Symbio Bank Sp 82 AA (bakteria *Bacillus pumilis*).

Doświadczenie polowe



Fot. 1-2. Kwitnące nasienniki marchwi

Badania dotyczyły dwóch odmian marchwi i były realizowane w ramach dwóch doświadczeń polowych prowadzonych na Polu Ekologicznym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach.

W doświadczeniu 1 badano wpływ mikroorganizmów pożytecznych i środków referencyjnych na **zdrowotność korzeni marchwi**. Doświadczenie zakładano w 4 powtórzeniach, w układzie losowanych bloków z wyłączoną kontrolą i środkiem referencyjnym, aktualnie dopuszczonym do stosowania w rolnictwie ekologicznym. Nasiona marchwi odmiany Nantes 2 zaprawiono (zgodnie ze schematem badań) wybranymi izolatami bakteryjnymi oraz środkami referencyjnymi - Trianum (antagonistyczny grzyb z rodzaju *Trichoderma*) oraz Serenade Aso (bakteria *Bacillus subtilis*). i wysiano 28.06 bezpośrednio do gruntu na certyfikowanym Polu Ekologicznym IO w Skierniewicach, zgodnie z zaleceniami agrotechnicznymi. Nasiona stosowane w doświadczeniu posiadały aktualny certyfikat ekologiczny. Doświadczenie założono w układzie bloków losowanych. Poletka stanowiły 2 rzędy w rozstawie 40 cm. Wykonano 4 zabiegi z użyciem środków mikrobiologicznych. Szczegółowy schemat stosowanej ochrony biologicznej podano poniżej.

W ramach doświadczenia prowadzono również pomiary biometryczne uzyskanych korzeni marchwi (długość, średnica i masa korzeni). Ocenie biometrycznej poddawano 5 wybranych roślin z każdego poletka.

W doświadczeniu 2 określono następczy wpływ mikroorganizmów pożytecznych z zasobów Symbio Banku IO i biologicznych środków komercyjnych stosowanych w pierwszym roku badań (2016r.) na **zdrowotność i produktywność materiału rozmnożeniowego (wysadków)** oraz skuteczność środków stosowanych w roku sprawozdawczym (2017) w **aspekcie ochrony roślin nasiennych marchwi przed chorobami, jak również ich wpływ na wzrost i rozwój roślin (architekturę nasiennika, kwitnienie roślin)**. Wysadki marchwi odmiany Napoli F1 pozyskiwano z uprawy ekologicznej na Polu Ekologicznym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach realizowanej w ramach programu ekologicznego w roku 2016. Wysadki marchwi były wysadzane na poletka 30.05.2017. Doświadczenie założono w układzie bloków losowanych. Poletka stanowiły 4 rzędy po 20 sztuk w rzędzie w rozstawie 40 cm.

Pole zostało nawiezione zgodnie z założeniami upraw ekologicznych. Nie zastosowano żadnych dodatkowych nawozów doglebowych. Plantację deszczowano i regularnie odchwaszczano w czasie trwania doświadczenia. Jako środki referencyjne zastosowano: Trianum (zawierający antagonistyczny grzyb z rodzaju *Trichoderma*) i Serenade Aso (zawierający bakterię *Bacillus subtilis*). Środki referencyjne były użyte w formie zaprawy nasion i zawiesiny do zabiegów opryskiwania.

Wykonano 6 zabiegów z użyciem środków mikrobiologicznych wg schematu podanego poniżej:

- Trianum
- Serenade Aso
- Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus* sp),
- Symbio Bank Sp 82 AA (bakteria *Bacillus pumilis*),
- NAzot2 (bakteria *Klebsiella oxycota*),
- Pi25 G (bakteria *Pseudomonas fluorescens*),
- 60.3AA (bakteria *Lycobacter* sp),
- AF74AAPAE NI (bakteria *Bacillus* sp)

Zabiegi opryskiwania i/lub podlewania roślin badanymi środkami wykonywano co 7-10 dni z uwzględnieniem odpowiednich warunków pogodowych opryskiwaczem ręcznym, ciśnieniowym, wyposażonym w lancę z końcówką o strumieniu stożkowym. Opryskiwanie roślin wykonywano zgodnie z Dobrą Praktyką Ochrony Roślin.

Ocena porażenia roślin nasiennych prowadzono uwzględniając początek poszczególnych faz rozwojowych, zgodnie ze skalą BBCH 20, w odstępach, co 7-10 dni w zależności od presji

choroby. Porażone rośliny analizowano pod kątem określenia sprawcy choroby, zgodnie z dostępnymi kluczami identyfikacyjnymi oraz przy pomocy metod laboratoryjnych i biologii molekularnej. **Ocenę zdrowotności roślin** wykonano na 25 roślinach z każdego poletka. Stosowano skalę bonitacyjną 0° - brak objawów chorobowych, 7° - 100 % porażonej powierzchni rośliny a następnie przeliczano na procentową powierzchnię roślin ze zmianami tkanki na skutek porażenia zgodnie z przelicznikiem:

0° - 0% porażonej powierzchni

1° - 1% porażonej powierzchni

2° – 6% porażonej powierzchni

3° – 15% porażonej powierzchni

4° – 30% porażonej powierzchni

5° – 50% porażonej powierzchni

6° – 80% porażonej powierzchni

7° – 100% porażonej powierzchni

Podstawą prawidłowej oceny porażenia była szczegółowa diagnostyka sprawców choroby. W tym celu analizowano porażoną tkankę pobraną z badanych roślin metodą tradycyjną na pożywkach hodowlanych i metodami biologii molekularnej. Ponadto oszacowano stopień wpływu badanych izolatów na fitotoksyczność siewek w skali 0-5° (0° - brak efektów fitotoksycznych, 5° - 100% uszkodzenia siewek). Wyniki opracowano analizą wariancji, istotność różnic oceniono testem Newman-Keuls'a, P=0,05.

W ramach doświadczenia wykonano również pomiary biometryczne roślin (wysokość, liczba pędów I rzędu i II rzędu) oraz dynamikę kwitnienia nasienników. Ocenie biometrycznej poddawano 5 wybranych roślin z każdego poletka.

WYNIKI

1. Doświadczenie infekcyjne – wazonowe

Zaprawienie nasion marchwi badanymi izolatami: Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus* sp), Symbio Bank Sp 82 AA (bakteria *Bacillus pumilis*) wpłynęło na wzrost liczby siewek prawidłowo wykształconych (zdrowych) w porównaniu z kombinacją kontrolną (nasiona niezaprawione) (tab.1). Analizy mikologiczne siewek z objawami chorobowymi wykazały obecność grzybów z rodzaju *Fusarium*, *Alternaria* i *Pythium*. Zastosowane mikroorganizmy nie wywołały efektu fitotoksyczności na badanych siewkach marchwi.

Tabela 1. Wpływ preparatów biologicznych zastosowanych jako zaprawy nasion na zdrowotność siewek marchwi (Skierniewice 2017)

Preparat biologiczny	Doświadczenie wazonowe (siewki po 6 tyg. od siewu)			
	porażone*	niewzeszłe	zdrowe	fitotoksyczność
Kontrola	6,3 a	24,5 a	69,0 d	0
Standard I Trianum	3,4 bc	20,5 b	76,0 b	0
Standard II Serenade Aso	3,9 b	19,1 c	77,0 a	0
Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp	3,9 b	21,0 b	75,0 c	0
Symbio Bank Sp 82 AA <i>Bacillus pumilis</i>	3,7 b	20,5 b	75,8 bc	0

*Siewki porażone przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Alternaria* i organizm grzybopodobny *Pythium*.



Fot. 3. Wschody siewek marchwi w kontenerach (doświadczenie wazonowe)

2. Doświadczenie polowe

Monitoring chorób na plantacji ekologicznej marchwi nasiennej oraz marchwi z siewu wykazał objawy porażenia roślin przez grzyb *Alternaria dauci* - sprawcę alternariozy naci marchwi.

Badane mikroorganizmy pożyteczne Symbio Banku stosowane jako:

- zaprawy nasion Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus* sp), Symbio Bank Sp 82 AA (bakteria *Bacillus pumilis*)

- środki do traktowania (opryskiwania) roślin Symbio Bank Sp 82 AB (*Bacillus* sp), NAzot2 (*Klebsiella oxycota*), Pi25 G (*Pseudomonas fluorescens*), 60.3AA (*Lycobacter* sp.), AF74AAPAE NI (*Bacillus* sp.) wpłynęły na zmniejszenie nasilenia alternariozy (*Alternaria* sp.) w porównaniu kontrolą (rośliny nie traktowane). Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w ograniczeniu choroby w stosunku do środków referencyjnych (tab.2).

Tabela 2. Wpływ zaprawiania nasion, traktowania i opryskiwania roślin marchwi wybranymi mikroorganizmami na porażenie roślin grzybami z rodzaju *Alternaria* (%) (Skierniewice 2017)

Preparat biologiczny/sposób aplikacji	Doświadczenie polowe (marchew z siewu) % porażonej pow. roślin			Doświadczenie polowe (wysadki marchwi) % porażonej pow. roślin		
	Alternarioza (<i>Alternaria</i> sp.)			Alternarioza (<i>Alternaria</i> sp.)		
	07.08	22.08	29.09	14.07	28.07	28.08
1) Kontrola (nasiona i korzenie nietraktowane)	1,0 a	3,4 a	10,2 a	0,6 a	1,8 a	11,8 a
2) Standard I Trianium (zaprawianie, podlanie)	0,3 c	1,9 b	7,2 bcd	0 c	0,6 f	8,1 b
3) Standard II Serenade Aso (zaprawianie, podlanie)	0,4 bc	1,4 c	6,8 e	0 c	1,0 c	7,2 e
4) Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus</i> sp. (zaprawianie, podlanie)	0,5 bc	2,0 b	7,3 bc	0 c	1,0 c	7,8 cd
5) Symbio Bank Sp 82 AA <i>Bacillus pumilis</i> (zaprawianie, podlanie)	0,6 b	1,3 c	7,1 cde	0 c	0,9 d	7,6 d
6) NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (podlanie)	-	-	-	0,1 bc	0,8 e	7,8 cd
7) Pi25 G <i>Pseudomonas fluorescens</i> (oprysk 0,1%)	0,4 bc	1,5 c	7,2 bcd	0,2 b	0,8 e	6,9 f

8) 60.3AA <i>Lycobacter sp.</i> (oprysk 0,1%)	0,6 b	1,5 c	6,9 de	0,1 bc	0,9 d	7,1 e
9) AF74AAPAE NI <i>Bacillus sp.</i> (oprysk 0,1%)	0,5 bc	1,3 c	6,9 de	0 c	1,1 b	6,8 f
10) NAzot2 <i>Klebsiella oxycota</i> (oprysk 0,1%)	0,4 bc	1,4 c	7,3 bc	0,1 bc	0,8 e	7,8 cd
11) Symbio Bank Sp 82 AB <i>Bacillus sp</i> (oprysk 0,1%)	-	-	-	0 c	0,9 d	8,0 bc
12) Standard III Serenade Aso (oprysk 0,1%)	-	-	-	0,1 bc	0,9 d	8,0 bc



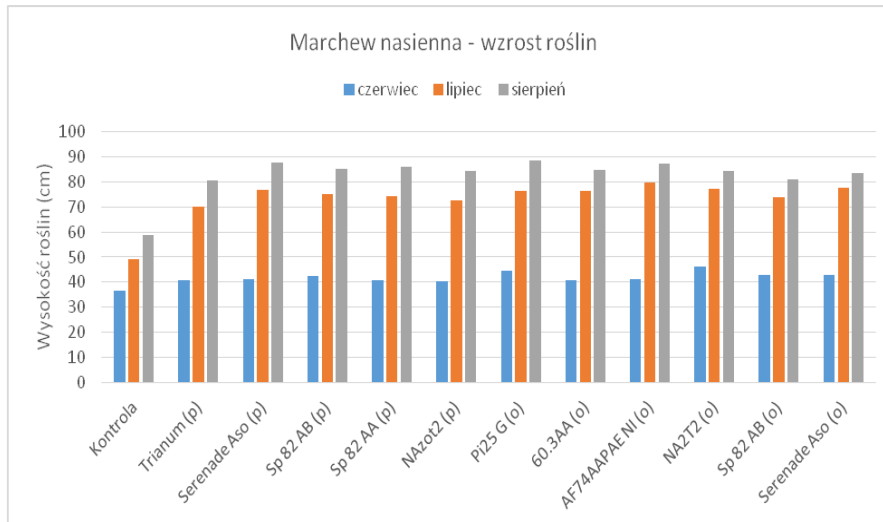
Fot. 4. Nać marchwi z obiektów kontrolnych z objawami porażenia mączniakiem



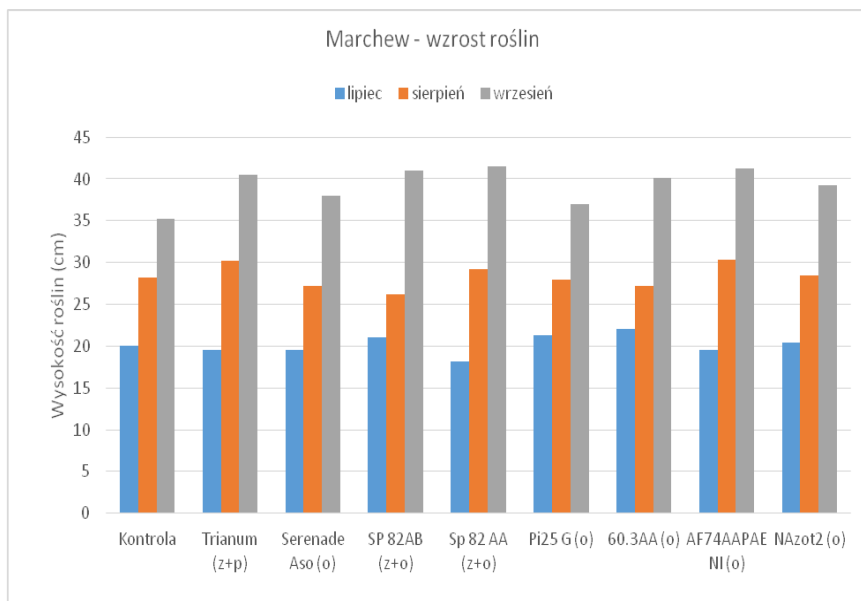
Fot. 5. Nać marchwi z obiektów kontrolnych porażona alternariozą naci (*Alternaria dauci*)

Wykonane pomiary biometryczne roślin marchwi z siewu wprost do gruntu, jak i marchwi nasiennej (produkcja z wysadków) traktowanych wymienionymi mikroorganizmami pożytecznymi Symbio Banku oraz środkami komercyjnymi wskazują na stymulację procesów wzrostu i rozwoju roślin marchwi. Testowane szczepy mikroorganizmów pożytecznych wykazały skuteczność w tym zakresie na poziomie środków komercyjnych. Różnice

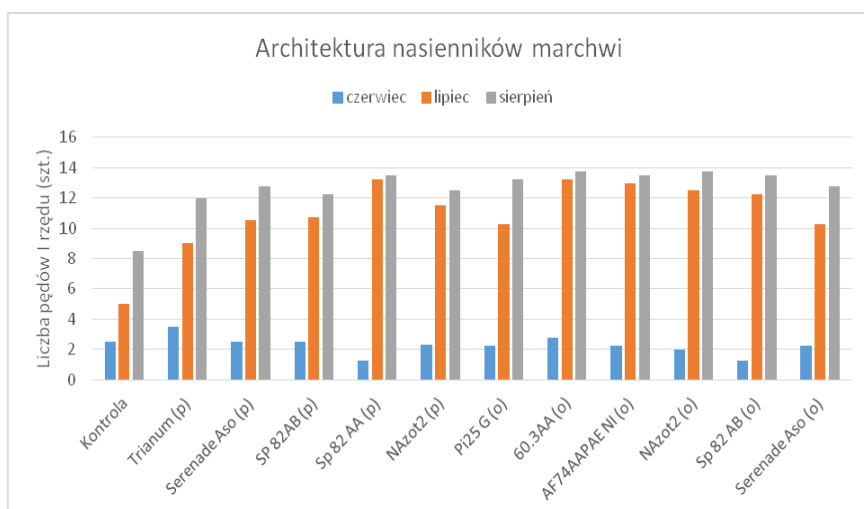
(nieistotne) były wynikiem indywidualnej reakcji odmianowej (rys.1-2). Analogiczną skuteczność bioproduktów Symbio Banku porównywalną z testowanymi środkami komercyjnymi odnotowano określając ich wpływ na tworzenie baldachów I i II rzędu na roślinach nasiennych (rys. 3-4) oraz dynamikę kwitnienia roślin nasiennych (rys.5). Wszystkie analizowane środki biologicznej osłony korzystnie wpływały na wzrost roślin i kwitnienie w porównaniu z kontrolą.



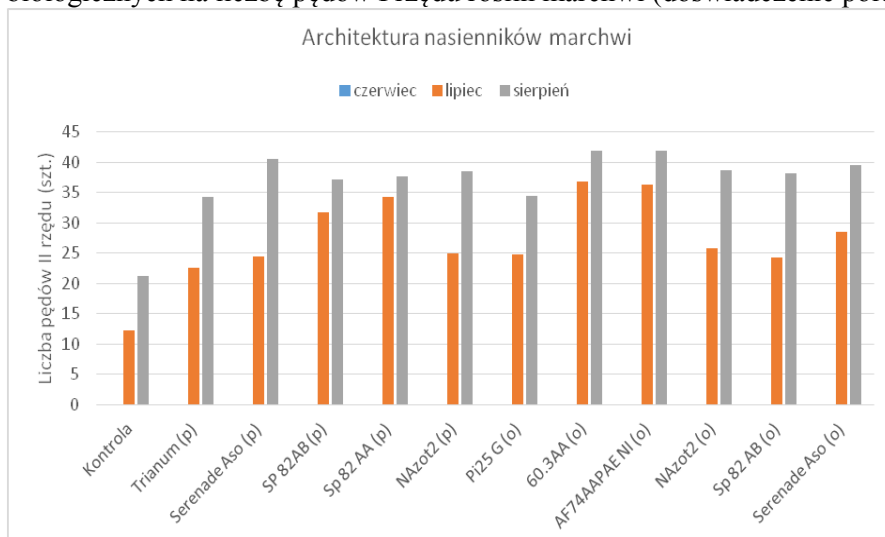
Rys 1. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na wzrost roślin nasiennych marchwi (doświadczenie polowe nr 2)



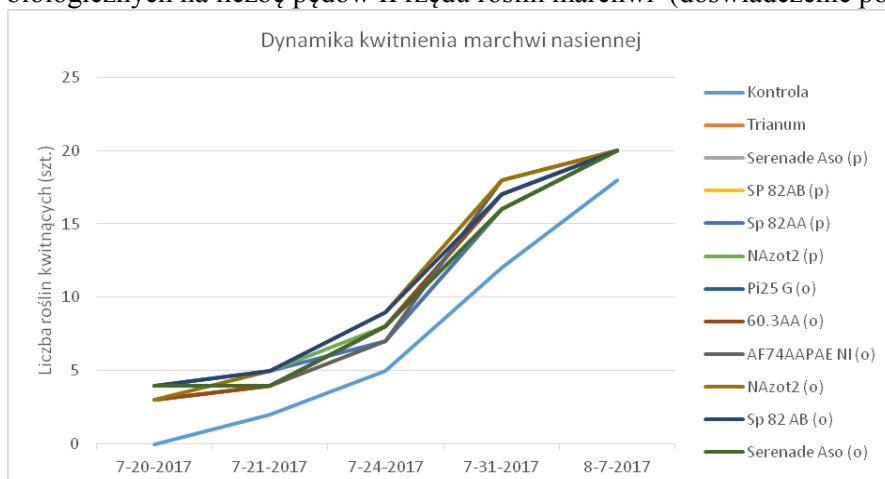
Rys 2. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na wzrost marchwi z siewu wprost do gruntu (doświadczenie polowe nr 1).



Rys 3. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na liczbę pędów I rzędu roślin marchwi (doświadczenie polowe nr 2).

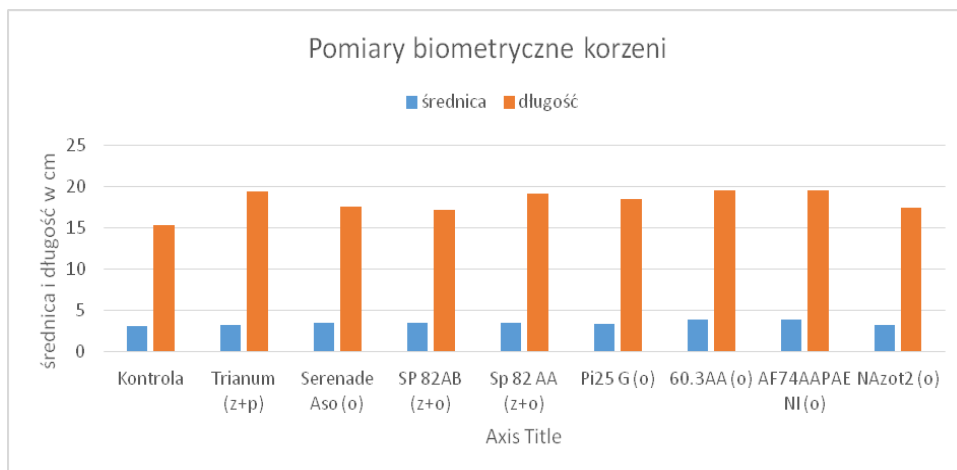


Rys 4. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na liczbę pędów II rzędu roślin marchwi (doświadczenie polowe nr 2).

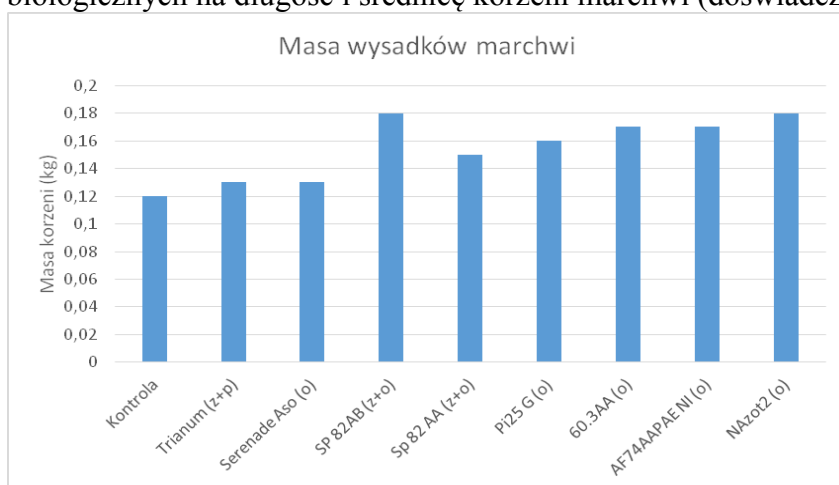


Rys 5. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na dynamikę kwitnienia marchwi (doświadczenie polowe nr 2).

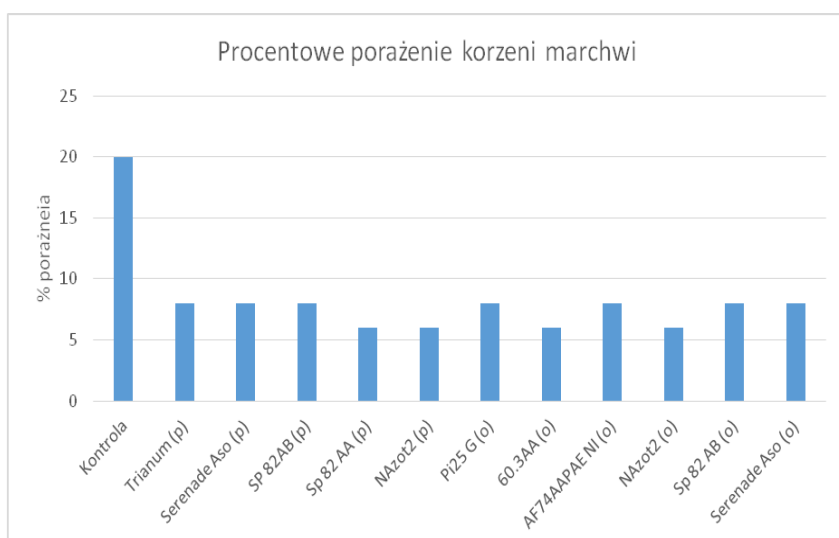
Po zastosowaniu mikroorganizmów pożytecznych i komercyjnych środków biologicznych stwierdzono istotny wzrost długości i średnicy korzeni marchwi uzyskanych z doświadczenia polowego nr 1 (z wysiewu nasion wprost do gruntu) w porównaniu z kontrolą (rys.6).



Rys 6. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na długość i średnicę korzeni marchwi (doświadczenie polowe nr 1).



Rys 7. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na masę korzeni (doświadczenie polowe nr 1).



Rys 8. Wpływ mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku oraz referencyjnych środków biologicznych na % porażenia wysadków (materiał rozmnożeniowy marchwi)

Stosowanie środków biologicznych i mikroorganizmów pożytecznych wpłynęło na wzrost masy korzeni marchwi z doświadczenia polowego nr 1 (2017), w porównaniu do obiektu

kontrolnego. Najwyższą skutecznością odznaczały się pożyteczne organizmy z Symbio Banku (Sp 82AB *Bacillus* sp. i NAzot2 *Klebsiella oxycota*). Pozostałe mikroorganizmy także wpływały na wzrost masy korzeni i w porównaniu z kontrolą uzyskane różnice istotne.

Uzyskane wyniki świadczą o wysokiej skuteczności ochronnej stosowanych mikroorganizmów – na poziomie komercyjnych środków biologicznych. W porównaniu z kontrolą uzyskiwano około 60% spadek porażenia roślin w obiektach traktowanych wymienionymi mikroorganizmami. Analizując oddziaływanie poszczególnych środków biologicznych i mikroorganizmów pożytecznych z Symbio Banku na zdrowotność korzeni (wysadków) nie stwierdza się istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi kombinacjami.



Fot. 6. Dosuszanie nasienników marchwi z doświadczeń polowych



Fot. 7. Nasienniki marchwi w fazie dojrzałości zbiorczej nasion

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 sp.*, *Fusarium sp.* i *Alternaria sp.* 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 *Alternaria sp.* integrowanej ochronie marchwi.
3. Rośliny traktowane mikroorganizmami: Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus sp*) i Symbio Bank Sp 82 AA (bakteria *Bacillus pumilis*), NAzot2 (bakteria *Klebsiella oxycota*), Pi25 G (bakteria *Pseudomonas fluorescens*), 60.3AA (bakteria *Lycobacter sp.*), AF74AAPAE NI (*Bacillus sp.*) wykazały się lepszym wzrostem, szybszym kwitnieniem i większą liczbą wytworzonych pędów w porównaniu do kombinacji kontrolnej.
4. Izolaty Symbio Bank Sp 82 AB (bakteria *Bacillus sp*) i Symbio Bank Sp 82 AA (bakteria *Bacillus pumilis*), NAzot2 (bakteria *Klebsiella oxycota*), Pi25 G (bakteria *Pseudomonas fluorescens*), 60.3AA (bakteria *Lycobacter sp.*), AF74AAPAE NI (*Bacillus sp.*) wykazały pozytywny wpływ na ograniczenie występowania alternariozy w uprawie marchwi.
5. 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 marchwi przed najgroźniejszymi chorobami

PODSUMOWANIE

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 marchwi 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, biologicznych środków ochrony roślin nasiennych a także nowych technologii aplikacji pożytecznych mikroorganizmów w nasiennej produkcji wielkotowarowej. Metody te są dostosowane do gatunku uprawianych roślin nasiennych oraz warunków ich wzrostu.

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 przedstawiania (konwersji) gospodarstw na ekologiczną produkcję nasion, zwiększy areal 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 kolejnych latach zwłaszcza w uprawach roślin dwuletних – marchwi i innych gatunków z rodziny *Apiaceae*, w których największym problemem produkcji nasiennej jest wysokie porażenie nasion patogenami, przenoszonymi z nasionami na rośliny potomne (m. in. pietruszka, seler).

Uzyskane wyniki upowszechniano producentom nasion ekologicznych w czasie wizyt i ilustracji w ich gospodarstwach, między innymi: w Radominie, Pokrzydowie, Ciechocinie, Smogorzewie, Gronowie, Pędzewie, Przedsiębiorstwach Nasiennych - m.in. Torseed w Toruniu, Polan w Krakowie, w przedsiębiorstwach zajmujących się przetwórstwem marchwi: Marwit oraz Biofood (z licznymi kontrahentami prowadzącymi produkcję ekologiczną marchwi). Weryfikowano je również podczas wyjazdów do wyspecjalizowanych laboratoriów oceny nasion (Centralne Laboratorium PIORiN w Toruniu). Inną formą upowszechniania były porady telefoniczne. Obecnie są przygotowywane publikacje naukowe.

Przedstawione zadania badawcze dotyczące biologicznego zaprawiania nasion obejmują drugi 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.

ZALECENIA DLA PRAKTYKI

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń laboratoryjnych, szklarniowych i polowych wskazują na:

- Skuteczność pożytecznych mikroorganizmów **Sp82AA *Bacillus pumilus* + Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*** oraz biologicznych preparatów **Trianum, Serenade i Biochicol** w poprawie jakości, zdrowotności i wigoru nasion marchwi odmiany Nantes 2 i Napoli F1 .
- Wysoką przeżywalność oraz właściwości antagonistyczne szczepów bakterii **Sp82AA *Bacillus pumilus* + Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*** wobec patogenów zasiedlających nasiona oraz rośliny marchwi.
- Stabilność mikrobiologiczną szczepów bakterii **Sp82AA *Bacillus pumilus* + Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*** oraz **Sp 82AB *Bacillus sp.* i NAzot2 *Klebsiella oxycota*** a ich efekty ochronne utrzymują się od początku aplikacji aż do zbiorów roślin.
- Możliwość zastosowania nowych bioproduktów mikrobiologicznych **Sp82AA *Bacillus pumilus* + Sp82AB *Bacillus weihenstephanensis*** oraz **biologicznych środków komercyjnych: Trianum, Serenade i Biochicol** do zaprawiania biologicznego nasion marchwi oraz **Sp 82AB *Bacillus sp.* i NAzot2 *Klebsiella oxycota*** w ochronie roślin marchwi w I i II roku uprawy.
- Możliwość zastosowania nowych bioproduktów mikrobiologicznych a zwłaszcza: **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.*)** oraz preparatów biologicznych **Trianum, Serenade i Biochicol** w uprawach w systemach ekologicznych i integrowanych
- Możliwość zwiększenia konkurencyjności i rozwoju firm sektora rolnictwa ekologicznego w Polsce.