

SPRAWOZDANIE

z badań podstawowych prowadzonych w 2020 roku
na rzecz rolnictwa ekologicznego

Kierownik Projektu: dr Małgorzata Tartanus

Koordynator projektu: dr hab. Eligio Malusá prof. IO

Sadownictwo metodami ekologicznymi: badania w zakresie wykorzystania substancji podstawowych w ochronie ekologicznych upraw sadowniczych

na podstawie § 8 ust.1 pkt 2, ust.2 pkt 2 i ust.10 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170, z 2016 r. poz. 1614, z 2017 r. poz. 1470 oraz z 2019 r. poz. 901 i poz. 1522)

decyzja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi
z dnia 08.04.2020 r., nr PJ.re.027.1.2020

DYREKTOR
INSTYTUTU OGRODNICTWA

Dorota Konopacka
prof. dr hab. Dorota Konopacka

Prof. dr hab. Dorota Konopacka

Wykonawcy: dr Małgorzata Tartanus, dr hab. Eligio Malusá prof. IO, dr Ewa Furmańczyk, mgr Wojciech Piotrowski, mgr Witold Danelski, dr Małgorzata Sekrecka, dr Dawid Kozacki, dr Monika Kałużna, mgr Anna Poniatońska, mgr Monika Michalecka, Pracownicy Zakładu Ochrony Roślin przed Szkodnikami, Pracowni Analiz Chemicznych i inni

Skierniewice, 2020



Wstęp i cel badań

Wychodząc naprzeciw potrzebom i problemom producentów truskawki i roślin prozdrowotnych takich jak: czereśnia, malina, róża pomarszczona czy rokitnik, nadrzędnym celem badań prowadzonych w projekcie było poszukiwanie nowych innowacyjnych metod ograniczania populacji takich szkodników, jak pędraki, mszyce i nasionnice, z wykorzystaniem substancji podstawowych. W projekcie realizowano cztery główne cele:

- a) prace nad dostosowaniem metody „Attract and kill” („Przywab i zabij”) w ograniczaniu populacji chrabąszcza majowego z wykorzystaniem czynników biologicznego zwalczania (grzybów entomopatogenicznych) dla osobników dorosłych i larw;
- b) rozpoznanie możliwości wykorzystania środków zawierających substancje roślinne oraz substancje podstawowe do ograniczania nasionnic i mszyc;
- c) upowszechnianie metod wspomagających stwierdzenie obecności szkodników oraz zwalczania wybranych szkodników;
- d) przekazanie zdobytej wiedzy producentom ekologicznym.

Wykonywane w projekcie doświadczenia prowadzono na plantacjach i przy współpracy producentów truskawki z **Grupy producentów produktów ekologicznych BrzostEko z Brzostówki**, z producentami owoców róży pomarszczonej, między innymi w gospodarstwie ekologicznym **Bożeny i Ryszarda Jaszczyńskich**, którzy należą do **Polskiej Izby Produktu Regionalnego i Lokalnego** oraz **Stowarzyszenia Producentów Żywności Metodami Ekologicznymi EKOLAND**, na plantacjach **dr Mirosława Angielczyka – Dary Natury**, **Agnieszki Michalskiej - Róża Polska** oraz na plantacjach **rokitnika** między innymi **p. Piotra Dibowskiego**, **p. Waldemara Sak**, **Grzegorza Maryniowskiego - BioGrim**, **p. Stanisława Trzonkowskiego** największego plantatora rokitnika w Polsce, co umożliwiło również bezpośrednie przekazywanie wyników badań i wprowadzanie ich bezpośrednio do produkcji w zainteresowanych jednostkach.

Larwy owadów żyjące w glebie, między innymi larwy chrząszczy, wyrządzają duże szkody w produkcji roślinnej. Pomimo, iż przez lata opracowywano i stosowano już wiele metod walki ze szkodnikami żyjącymi w glebie, to nadal ich populacja jest liczna i powodują one liczne szkody, zarówno w uprawach ogrodniczych, jak i w leśnictwie. Szkody wyrządzane w naszym kraju przez pędraki, głównie larwy chrabąszcza majowego – notowane są w większości rejonów, w różnych uprawach, ale szczególnie niebezpieczne są w uprawach truskawki. Problem ograniczania liczebności, zarówno chrząszczy chrabąszcza majowego, jak i jego larw (pędraków) należy do najtrudniejszych zagadnień ochrony roślin w uprawach sadowniczych, szczególnie w produkcji ekologicznej.

W bieżącym sezonie prowadzono badania nad dostosowaniem metody „Attract and kill” („Przywab i zabij”) do ograniczania osobników dorosłych i larw z wykorzystaniem czynników biologicznego zwalczania, roztworów roślinnych wykazujących działanie allelopatyczne oraz dwutlenku węgla. Wykonano również badanie określenia substancji lotnych wydzielanych przez korzenie roślin truskawki zarówno uszkodzonych przez pędraki jak i nieuszkodzonych, oraz zawartości tych substancji w glebie. Określono skład fenolowy i triterpenoidowy badanych alkoholowych ekstraktów roślinnych i biostymulację wzrostu roślin pod wpływem badanych ekstraktów na różne odmiany truskawki.

Wychodząc naprzeciw potrzebom producentów roślin sadowniczych i prozdrowotnych: czereśni, wiśni, róży pomarszczonej (*Rosa rugosa*) i rokitnika zwyczajnego

(*Hippophae rhamnoides*) w systemie ekologicznym w rozwiązywaniu problemów ze szkodnikami uszkadzającymi owoce (nasionnice) prowadzono monitoring występowania szkodników szczególnie nasionnic: trześniówki (*Rhagoletis cerasi*), wschodniej (*Rhagoletis cingulata*) na czereśni i wiśni, różówki (*Rhagoletis alternata*) na róży pomarszczonej i rokitnikowej (*Rhagoletis batava*) na rokitniku oraz możliwości ich ograniczania i zwalczania. Przygotowano i przeprowadzono próby terenowe nowych atraktantów do odłowu nasionnic z potencjalnym wykorzystaniem w metodzie masowych odłowów. Prowadzono również badania nad znalezieniem odpowiednich substancji, które oddziaływałyby niekorzystnie na wybrane szkodniki, przyniosłyby wyraźną poprawę w ochronie roślin i zwiększyły opłacalność produkcji niektórych owoców.

W ramach projektu przeprowadzono również wstępny etap badań ekotoksyczności czyli opis procedur analitycznych do wykrywania i identyfikacji substancji (quassin) w wyciągu z kory *Quassia amara*, co będzie przyczynkiem do podjęcia przygotowania i sformalizowania wytycznych i działań podejmowanych w celu określenia możliwości stosowania środków zawierających tę substancję.

ZADANIE 1

Badania w zakresie wykorzystania substancji podstawowych w ochronie ekologicznych upraw sadowniczych (truskawki, czereśni lub wiśni, rokitnika, róży pomarszczonej i maliny) przeciwko wybranym szkodnikom

W projekcie realizowano trzy główne cele: a) dalsze prace nad dostosowaniem metody „Attract and kill” („Przywab i zabij”) z wykorzystaniem czynników biologicznego zwalczania (grzybów entomopatogenicznych) do ograniczania osobników dorosłych i pędraków; b) rozpoznanie możliwości wykorzystania substancji roślinnych i podstawowych do ograniczania nasionnic i mszyc; c) upowszechnianie metod monitorowania obecności tych szkodników oraz ich zwalczania.

Prace nad dostosowaniem metody „Attract and kill” („Przywab i zabij”) z wykorzystaniem czynników biologicznego zwalczania (grzybów entomopatogenicznych) do ograniczania osobników dorosłych i pędraków;

1A. Zastosowanie i ocena metody „Attract and kill” do ograniczania osobników dorosłych i larw (pędraków) *Melolontha melolontha*

W tym podzadaniu badano kilka elementów składowych innowacyjnej metody „Attract and kill” zastosowanej do ograniczania populacji osobników dorosłych oraz larw chrabąszcza majowego. Aby metoda ta mogła być polecana w praktyce należy stwierdzić efektywność wszystkich jej elementów: „Attract”, czyli czynnika wabiącego oraz „kill”, czyli czynnika zabijającego.

Ocena metody zastosowanej przeciwko osobnikom dorosłym

W bieżącym sezonie oceniano cztery elementy tej metody w stosunku do osobników dorosłych czyli chrząszczy:

- 1) Efektywność odłowu w pułapki świetlne przy użyciu różnego typu świetlówek w warunkach polowych
- 2) Efektywność substancji podstawowych (liście dębu i kora dębu) w przedłużaniu obecności chrząszczy w pułapkach
- 3) Efektywność porażania chrząszczy przez grzyby entomopatogeniczne (*Beauveria brongniartii*)
- 4) Efektywność substancji podstawowych (otręby i hydrożel) wzmacniających wzrost oraz przedłużających aktywność grzybów entomopatogenicznych

Doświadczenie I

Doświadczenie oceniające efektywność pułapek świetlnych (Fot.1) oraz rodzaju użytej świetlówki emitującej dwa rodzaje światła (białe i czarne) (Fot.2) przeprowadzono w okresie lotu chrząszczy w miejscowości Brzostówka (woj. lubelskie) i Nowy Dwór (woj. łódzkie).



Fot.1. Pułapka świetlna z czarnym światłem



Fot. 2. Lampy typu świetlówka UV emitująca czarne (na górze), białe (na dole), zasilanie 12V zastosowane w pułapkach

Doświadczenia przeprowadzono w 2 powtórzeniach. Pod koniec kwietnia wywieszono pułapki świetlne po dwie dla każdego rodzaju światła. Następnie do pierwszych dni czerwca regularnie raz w tygodniu kontrolowano pułapki licząc odłowione chrząszcze. Zestawienie uzyskanych wyników przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Odłowu chrząszczy w pułapkach świetlne ze zróżnicowanym rodzajem światła w przeciągu całego okresu lotu chrząszczy (28.04 – 8.06.2020)

Płeć	Liczba odłowionych chrząszczy					
	Brzostówka			Nowy Dwór		
	Światło białe	Światło czarne	Razem	Światło białe	Światło czarne	Razem
samice	37	225	262	132	138	270
samce	508	1171	1679	777	646	1423
Razem	545	1396	1941	909	784	1693

W bieżącym roku (tak jak w poprzednim), w pułapki odławiały się zarówno samice jak i samce, chociaż odnotowano duże różnice między nimi w obu lokalizacjach. W sumie, w Brzostówce odnotowano prawie 8 razy, a w Nowym Dworze 7 razy więcej samców niż samic. Trudno jest również jednoznacznie określić przyczynę tak dużej liczby samców (w poprzednich latach nie notowano tak dużych różnic), ale być może wpływ miały warunki atmosferyczne (dość duża liczba dni z opadami deszczu) przyczyniała się, że samce w dni sprzyjające były bardziej mobilne w poszukiwaniu samic, co mogło sprzyjać większemu zainteresowaniu pułapkami. Odnotowano również różnice w odłowach pod względem rodzaju światła, a mianowicie w lokalizacji Brzostówka 2-krotnie więcej chrząszczy stwierdzono w pułapkach z czarnym światłem. Natomiast w lokalizacji Nowy Dwór więcej chrząszczy odłowiły pułapki z białym światłem. W poprzednich latach badań, zdecydowanie lepiej odławiały pułapki z czarnym światłem. W obu przypadkach więcej samic zanotowano w pułapkach z czarnym światłem.

Doświadczenie II

Oceny efektywności substancji podstawowych (liści dębu i kory dębu) w przedłużaniu czasu przebywania chrząszczy w pułapkach dokonano w doświadczeniu przeprowadzonym w laboratorium. Na początku prowadzenia tego doświadczenia przygotowano z substancji podstawowych (liści i kory dębu) odpowiednio wyciąg alkoholowy poprzez zalanie 1 kg świeżych liści dębu 2 l alkoholu (70%) lub 50 g kory dębu (*Quercus cortex*) (produkt gotowy) zalanej 200 ml alkoholu (70%) oraz odwar z 50 g kory dębu (*Quercus cortex*) zalanej 250 ml wody i gotowanym przez 5 min, a następnie przefiltrowany po 2 godzinach. Przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu przeprowadzone wstępne próby wpuszczania i wychodzenia chrząszczy z pułapki w celu ustalenia czasu obserwacji. We wszystkich wstępnych próbach większa część chrząszczy opuszczała pułapkę w przedziale 6-9 minut. Właściwe doświadczenie przeprowadzono w dwóch seriach po 4 próby.

W odpowiednio przygotowane pułapki zawierające: 200 g czynnika biologicznego zwalczania (*B.brongniartii* mnożona na ziarnie pszenicy), 200 g gleby, 5 g hydrożelu (produkt komercyjny) oraz 50 ml odwaru z kory dębu lub 50 ml roztworu alkoholowego z liści dębu rozcieńczonego wodą w stosunku 1:1, wpuszczano po 50 chrząszczy (oddzielnie samice i samce) i notowano ile chrząszczy opuści pułapkę w ciągu 10 minut. Wykonano również jeden test, w którym jednocześnie (do jednej pułapki) wpuszczono 50 samców i 50 samic. Pierwszą serię wykonano 20 maja 2020 w godzinach od 11.00 do 13.00, drugą w dniu 21 maja w godzinach 10.30 do 13.00 na chrząszczach bezpośrednio strąśniętych z drzew (wszystkie próby przeprowadzano na innych chrząszczach). Wyniki przedstawia Wykres 1 i Tabela 2.



Fot. 3. Otwór wyjściowy w pułapce



Fot. 4. Chrząszcze w testowej pułapce

Wykres. 1. Liczba chrząszczy, które opuściły pułapkę w ciągu 10 min

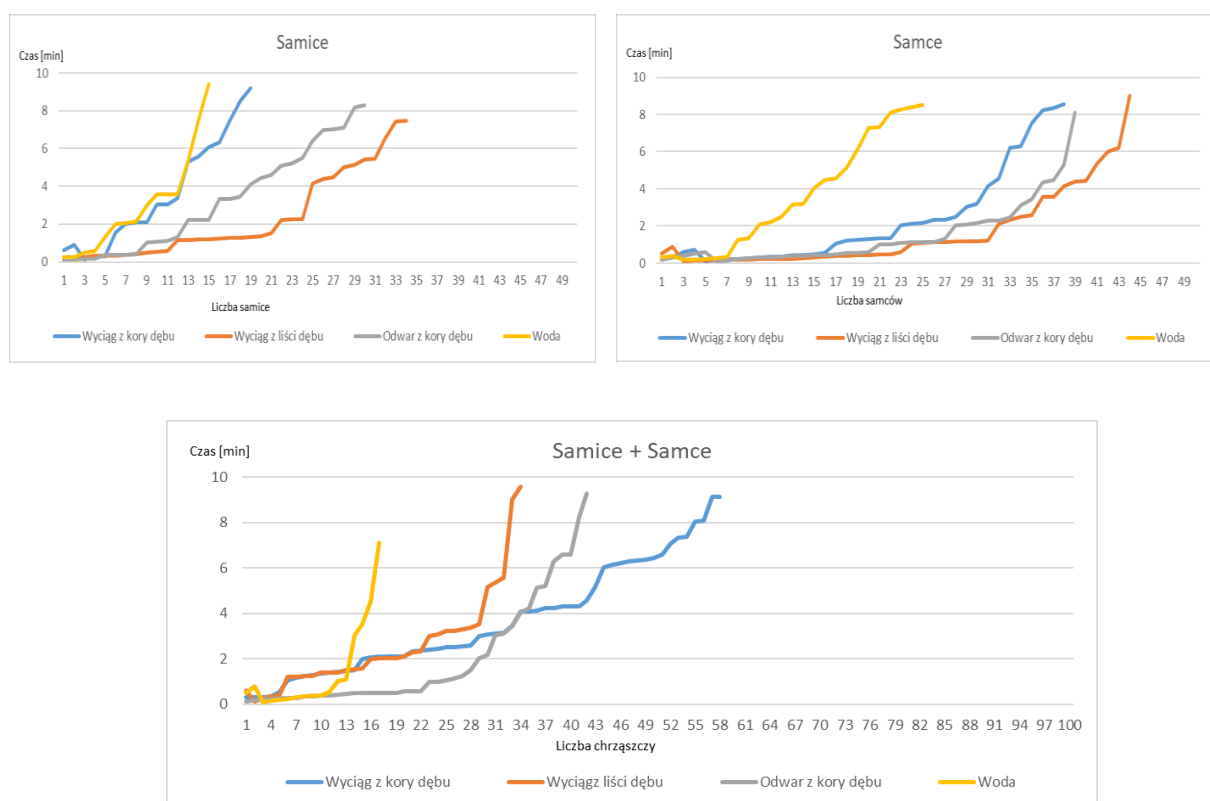


Tabela 2. Chrząszcze (wyrażone w %%), które opuściły pułapkę w ciągu 10 minut oraz mediana czasu opuszczania pułapki

	Chrząszcze [%], które opuściły pułapkę w ciągu 10 minut	Mediana czasu opuszczania pułapki [min] oraz odchylenie standardowe
Samice 50 szt.		
Wyciąg z kory dębu	62	2,30±2,5
Wyciąg z liści dębu	60	1,72±2,2
Odwar z kory dębu	44	1,57±2,9
Woda	30	1,56±2,4
Samce 50 szt.		
Wyciąg z kory dębu	82	1,16±2,2
Wyciąg z liści dębu	80	1,64±3,0
Odwar z kory dębu	53	1,49±2,4
Woda	49	2,27±2,6
Samice 50 szt. + Samce 50 szt.		
Wyciąg z kory dębu	58	3,05±2,4
Wyciąg z liści dębu	34	2,03±2,2
Odwar z kory dębu	42	0,56±2,4
Woda	17	0,50±2,0

Zdecydowana większość chrabąszczy opuszczała pułapkę przed upływem 10 minut. Samice od 30 do 62%, a samce 49% do 82% zależnie od zastosowanego roztworu. Okazuje się, że samice najkrócej przebywały w pułapce, z dodatkiem wody, a najdłużej na wywarze z kory dębu, natomiast samce odwrotnie (Tabela 2 i Wykres 1 – dwa górne diagramy). Mediana czasu przebywania dla samic to od 1,56 (woda) do 2,30 (wywar z kory dębu), a dla samców od 1,16 (wywar z kory dębu) do 2,27 (woda). Zwiększenie jednocześnie liczby chrząszczy do 100 szt. (50 samic + 50 samców) spowodowało, że pułapkę w ciągu 10 minut opuściło od 17% do 48%, natomiast mediana czasu przebywania wyniosła 0,50 minuty w pułapce z wodą i 3,05 minuty z wywarem z kory dębu (Tabela 2 i Wykres 1 – dolny diagram). Po wykonaniu jednorocznych testów i tylko na jednej populacji chrząszczy nie można jednoznacznie zinterpretować wyników tego doświadczenia. Z jednej strony pułapki z wszystkimi roztworami chrząszcze opuszczały dość szybko, prawie w każdym przypadku powyżej 50% w ciągu 10 minut. Mediana czasu przebywania wskazuje na to, iż są różnice między roztworami, szczególnie, gdy w pułapce jednocześnie przebywały razem samce i samice. W pułapce z wywarem z kory dębu i wywarem liści dębu przebywały one 2-3-krotnie dłużej niż w innych pułapkach. Na otrzymane wyniki mogła mieć wpływ pora dnia, w której został wykonywany test i stres chrząszczy. W dalszych badaniach należałoby wyznaczyć optymalną dawkę zastosowanych roztworów, zbyt niska, ale i zbyt wysoka, może wpływać niekorzystnie na reakcję chrząszczy.

Doświadczenie III

Efektywność porażania chrząszczy przez grzyby entomopatogeniczne *Beauveria brongniartii* na mrożone na ziarnie pszenicy (czynnik biologicznego zwalczania CBZ) badano również w doświadczeniu laboratoryjnym. Wykonano 2 testy po 2 powtórzenia. Do zamkniętych pojemników imitujących pułapki zawierające po 200 g CBZ oraz 100 g gleby i 50 ml wody wpuszczano 20 osobników dorosłych chrabąszcza majowego. Następnie w godzinnych odstępach (po 1, 2, 3, 4 godzinach) wyjmowano po 5 chrząszczy z każdego pojemnika. Przekładano je pojedynczo do sterylnych pojemników w celu obserwacji ewentualnego rozwoju grzybów entomopatogenicznych. Pierwszy test wykonano 26 maja 2020 roku, a kolejny 10 czerwca 2020 roku. Wyniki zestawiono w Tabeli 3.



Fot. 5. Chrząszcze porażone grzybem *Beauveria brongniartii* oraz pojemniki w jakich były hodowane po okresie infekcji grzybami

Tabela 3. Efektywność porażania chrząszczy

Test I					Test II				
Data	Chrząszcze wyjęte z pułapki po				Data	Chrząszcze wyjęte z pułapki po			
	1	2	3	4		1	2	3	4
	Liczba martwych [szt.]					Liczba martwych [szt.]			
27.05.2020			1		12.06.2020	1		1	1
28.05.2020	2	3	1	1	14.06.2020	3	4	2	1
29.05.2020	2	1	4	5	15.06.2020	5	4	3	5
01.06.2020	4	6	2	4	17.06.2020	1	2	4	3
05.06.2020	2	1			Razem (suma z powtórzeń)	10	10	10	10
06.06.2020			1						
Razem (suma z powtórzeń)	10	10	10	10	Potwierdzone porażenie*	1	3	1	1
Potwierdzone porażenie*	1		1	1					

* Chrząszcze na których wizualnie rozwinął się grzyb

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują na to, że chrząszcze chrabąszcza majowego mogą być efektywnie porażane przez grzyby entomopatogeniczne. Już po godzinie przebywania w pojemniku z CBZ stwierdzono po okresie hodowli efektywne porażenie na chrząszczach. W sumie w pierwszym teście porażenie potwierdzone wzrostem grzybni na chrząszczach stwierdzono w 3 przypadkach (2 samice i 1 samiec), a w drugim 6 (4 samice i 2 samce). Jednak nie zostało dokładnie określone, jak długo musi przebywać chrząszcz w środowisku grzybów entomopatogenicznych, aby był efektywnie porażony. Największą liczbę chrząszczy z wizualnie widocznym porażeniem przez grzyb *B. brongniartii* odnotowano w teście II, po dwóch godzinach przebywania chrząszczy w pojemniku, ale stwierdzano je również, chociaż w mniejszej liczbie, już po godzinie.

Doświadczenie IV

Efektywność substancji podstawowych (otręby i hydrożel) wzmacniających wzrost oraz przedłużających aktywność grzybów entomopatogenicznych przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych. Doświadczenie przeprowadzono w 2 testach po 2 powtórzenia. Czynniki biologicznego zwalczania (CBZ) – *B. brongniartii* w ilości 30 g umieszczano w pojemnikach ze 100 g gleby, a następnie dodawano substancję podstawową (otręby pszenne) w ilości 30 g same, lub z hydrożelem (produkt komercyjny) – 10 g. Zastosowano następujące kombinacje:

1. *B. brongniartii*
2. *B. brongniartii* + otręby
3. *B. brongniartii* + otręby + hydrożel
4. *B. brongniartii* + hydrożel

Następnie odstawiano je na czas inkubacji do zaciemnionego pomieszczenia z temperaturą powyżej 25°C. Systematycznie co 5 dni kontrolowano wzrost grzybów (ewentualnie przy

stwierdzeniu niskiej wilgotności zwilżano je wodą. Jeden test trwał ok. 1 miesiąca. Wykonano 3 serie testów.

Tabela. 4. Wzrost grzybów po dodaniu substancji podstawowych

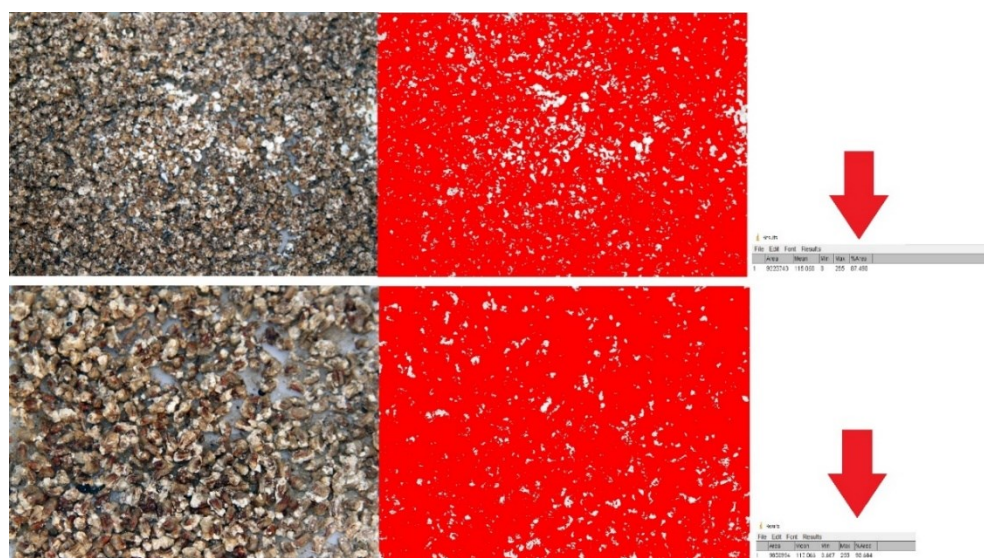
Kombinacja 1	Kombinacja 2
	
Kombinacja 3	Kombinacja 4
	

Wydawało się, że zastosowanie otręb powinno zwiększać wzrost grzybów entomopatogenicznych, ponieważ w niektórych preparatach biologicznych opartych na tych grzybach są namnażane na ziarnach zbóż i wykazują wysoką efektywność. Natomiast dodanie hydrożelu miało na celu ustabilizować wilgotność podłoża, co jest bardzo istotne przy rozwoju grzybów entomopatogenicznych. Jednak w żadnym z przeprowadzonych testów, dodanie otręb i hydrożelu solo, lub jako mix wraz z grzybem *B. brongniartii*, wyraźnie nie zwiększyło jego wzrostu Tabela 4 – kombinacja 2, 3 i 4. Nie można wykluczyć, że zastosowanie tych produktów w innym stosunku ilościowym, lub w innym układzie mogłoby przynieść lepsze rezultaty. Wydaje się jednak, że otręby nie będą zwiększały szybkiego

wzrostu grzybów. Jednak kierunek badań w poszukiwaniu takich substancji wydaje się słuszny, gdyż dodanie roztworów testowanych wcześniej na chrząszczach, co najmniej nie zmniejszyło efektywności wzrostu grzybów, co ilustruje Tabela 5. Potwierdza to również przykładowa analiza obrazu z kombinacji *B.brongniartii* + hydrożel (6,3% pokrycia powierzchni grzybem) oraz *B.brongniartii* + hydrożel + odwar z kory dębu (12,5% pokrycia powierzchni grzybem) wykonana w programie ImageJ wersja: 1.52a (Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012). Fot. 6.

Tabela. 5. Wzrost grzybów po dodaniu substancji podstawowych

B.brongniartii + hydrożel	B.brongniartii + hydrożel + wyciąg z liści dębu	B.brongniartii + hydrożel + odwar z kory dębu
		



Fot. 6. Przykładowa analiza obrazu dla dwóch zastosowanych kombinacji

Ocena metody zastosowanej przeciwko pędrakom

W bieżącym roku w metodzie „Attract and kill” w stosunku do larw chrabąszcza majowego oceniano jej cztery elementy:

- 1) Efektywność właściwości allelopatycznych roztworów roślinnych w stosunku do larw
- 2) Efektywność porażenia przez czynniki biologicznego zwalczania larw pędraków
- 3) Interakcja między roztworami roślinnymi, a czynnikiem biologicznego zwalczania
- 4) Ocena zastosowania dwutlenku węgla wraz z czynnikami biologicznego zwalczania

Przygotowanie roztworów alkoholowych

Ekstrakty alkoholowe przygotowano z roślin gryki (*Fagopyrum esculentum*), nagietka (*Calendula officinalis*), szalwii (*Salvia officinalis* sp.), Aksamitki (*Tagetes* spp.) i mniszka lekarskiego (*Taraxacum officinale*) (tylko korzenie). Po przygotowaniu odpowiednich materiałów roślinnych zalano je w stosunku 1:5 przygotowanym roztworem wodno-alkoholowym (1:2 v/v). Następnie po okresie maceracji roztworów wykonano analizę multimetodą do oznaczania pozostałości pestycydów z zastosowaniem analizy opartej na GC i LC po ekstrakcji/podziale acetonitrylem i oczyszczaniu metodą dyspersyjnej SPE (Metoda modułowa QuEChERS) zgodna z normą PN-EN 15662:2018. Chromatografia gazowa GC-MS/MS - 280 substancji. Chromatografia cieczowa LC-MS/MS – wykrywająca 224 substancje.

Tabela 6. Wyniki analiz pozostałości pestycydów w przygotowanych wyciągach

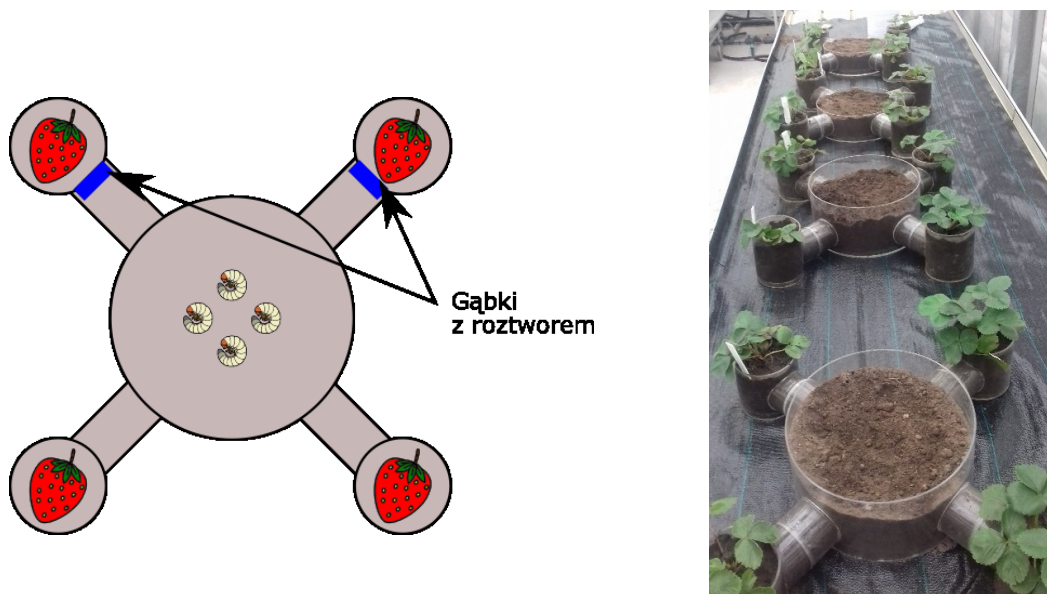
	Nazwa związku	Wynik [mg/kg]
Aksamitka	ND	
Szałwia	azoksystrobina	0,046
Gryka	ND	
Korzeń mniszka	ND	
Nagietek	ND	
Koszyczek nagietka	ND	

Jak wynika z przedstawionych wyników tylko w wyciągu z szalwii, która została pozyskana z plantacji nie ekologicznej wykryto azoksystrobinę, związek który jest zawarty między innymi w fungicydach. Pozostałe roztwory były wolne od pozostałości.

Doświadczenie I

W tym przypadku badania reakcji pędraków na alkoholowe ekstrakty roślinne z: aksamitki, nagietka, gryki i mniszka (korzeń) przeprowadzono 3 serie testów. Czas trwania każdego testu to: Seria I - 22.09 - 25.09.20; Seria II - 29.09 – 2.10.20; Seria III – 6.10 – 9.10.20. Wszystkie serie wykonano w specjalnie to tego celu przygotowanych olfaktometrach. Na 4-5 dni przed rozpoczęciem każdej serii sadzono rośliny truskawek do pojemników olfaktometrów Fot. 7. W każdym dniu rozpoczęcia serii w dwóch pojemnikach z roślinami umieszczano gąbki wielkości 5x3 cm nasączone odpowiednimi roztworami po 8 ml

na każdą gąbkę. Fot. 7. Następnie w każdej arenie, do jej środka wypuszczano 4 pędraki. W kolejnych dniach (2 i 3-cim) doświadczenia przeglądano arenę i sprawdzano obecność pędraków, te, które nie wykazywały aktywności zostawiano w miejscu, w którym je znaleziono oraz dokładano kolejne 4 pędraki. Uzupełniano również gąbki z roztworem kolejnymi 8 ml roztworu. Czwartego dnia każdej serii wszystkie elementy olfaktometru były przeglądane i notowano liczbę znalezionych w każdej z nich pędraków. Wyniki zestawiono w Tabeli 7.



Fot. 7. Schemat doświadczenia (po lewej); olfaktometry użyte w doświadczeniu (po prawej)

Tabela. 7. Liczba znalezionych pędraków w poszczególnych częściach olfaktometru (suma ze wszystkich serii)

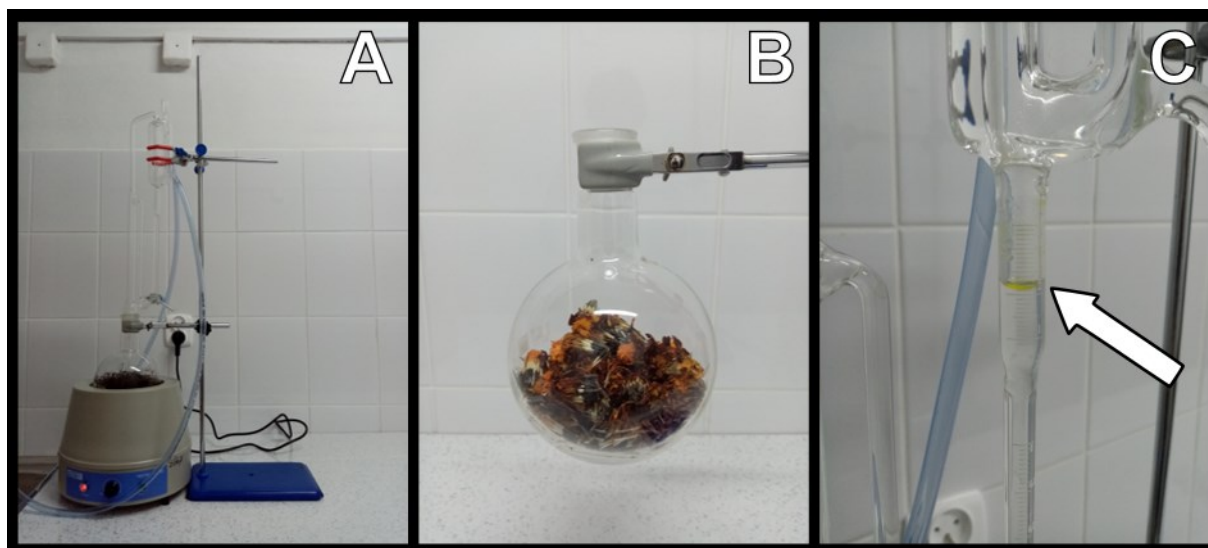
Roztwór z	Liczba wprowadzonych pędraków	Liczba i miejsce znalezienia pędraków			Pędraki reagujące na roztwory [%]
		Bez reakcji	Truskawka	Truskawka + roztwór	
Aksamitki	36	9	6	21	58,3
Nagietka	36	8	6	22	61,1
Gryki	36	9	8	19	52,8
Mniszka	36	16	8	12	33,3
Razem	144	42	28	74	

W sumie w eksperymencie przebadano 144 pędraki. W większości (około 51% pędraków) reagowało na roztwory, ale w różnym stopniu. Najsilniej, podobnie jak w poprzednim roku, reagowały na roztwór z nagietką (61,1%), a najsłabiej na roztwór z korzeni mniszka (33,3%). Jednak około 30% pędraków nie wykazało żadnej reakcji, ani na roztwór, ani na truskawkę. W dużej mierze reakcja pędraków może być uzależniona od jego stadium lub też terminu wykonania testów, chociaż w literaturze znaleziono, że w warunkach laboratoryjnych pędraki są aktywne nawet w listopadzie.

Doświadczenie II

Jako doświadczenie uzupełniające postanowiono przetestować możliwość samodzielnego uzyskania olejku eterycznego z aksamitki. Chociaż w bieżącym sezonie pędraki pozytywnie reagowały na wyciąg z aksamitki (poprzednie doświadczenie), to wyniki z poprzednich lat sugerują, że mogą one wpływać niekorzystnie na rozwój pędraków. Przetestowanie metody uzyskiwania olejku znacząco poszerzy portfolio form substancji pochodzenia naturalnego, które mogą znaleźć zastosowanie w zwalczaniu chrabąszcza majowego.

Jako surowiec do pozyskania olejku posłużyła część nadziemna wraz z kwiatami. Rośliny zebrano z terenu ekologicznego sadu jabłoniowego należącego do Instytutu Ogrodnictwa. Następnie surowiec wysuszono w temperaturze 45°C. Około 50 g materiału roślinnego rozdrobniono w moździerzu, następnie przeniesiono do kolby okrągłodennej (Fot. 8) zalano 1000 ml wody destylowanej i poddano destylacji w Aparacie Derynga (Fot. 8). Destylację prowadzono przez 4 godziny od momentu wrzenia. Następnie oznaczono ilość uzyskanego olejku eterycznego. Z 50 g materiału roślinnego uzyskano około 0,1 ml olejku (Fot. 8), który posłużył do wstępnego określenia wpływu olejku na zachowanie pędraków *Melolontha* spp.



Fot. 8. Poszczególne etapy uzyskiwania olejku eterycznego. A- Złożony Aparat Derynga. B- Materiał roślinny w kolbie. C- Uzyskany destylat, strzałka zaznacza olejek eteryczny, który oddziela się od cięższej warstwy wodnej.

Doświadczenie nad badaniem reakcji pędraków na olejek eteryczny pozyskany z aksamitki wykonywano w specjalnie przygotowanej komorze o wymiarach 80 cm x 25 cm x 3 cm (długość x wysokość x głębokość), którą podzielono na kwadratowe segmenty o boku równym 5 cm (Rysunek 1). Jednocześnie testowano zachowanie 10 pędraków. Komorę wypełniano ziemią, a w segmentach oznaczonych odpowiednio B4 i O4 umieszczano bibułę nasączoną 1 ml roztworu kontrolnego lub badanego (10% roztwór alkoholu etylowego bądź 0,1% roztwór olejku eterycznego w 10% alkoholu etylowym w wodzie). Pędraki umieszczano w obszarze neutralnym (kolumny G-J). Następnie doświadczenie prowadzono przez 3

Diagram illustrating the experimental setup for testing the effect of eucalyptus oil on the behavior of *Physa* snails. The arena is a 5x16 grid divided into two segments: **segment repelentu** (columns A-F) and **segment atraktantu** (columns K-P). The grid is divided into 5 rows (1-5) and 16 columns (A-P). A 3x3 gray shaded area is centered in the grid (rows 2-4, columns G-I). A purple square is located at (4, B) and a yellow square is at (4, O). Small snail icons are placed in the following cells: (2, G), (2, H), (2, I), (2, J), (3, G), (3, I), (4, G), (4, H), (4, I), (4, J).

Legend:

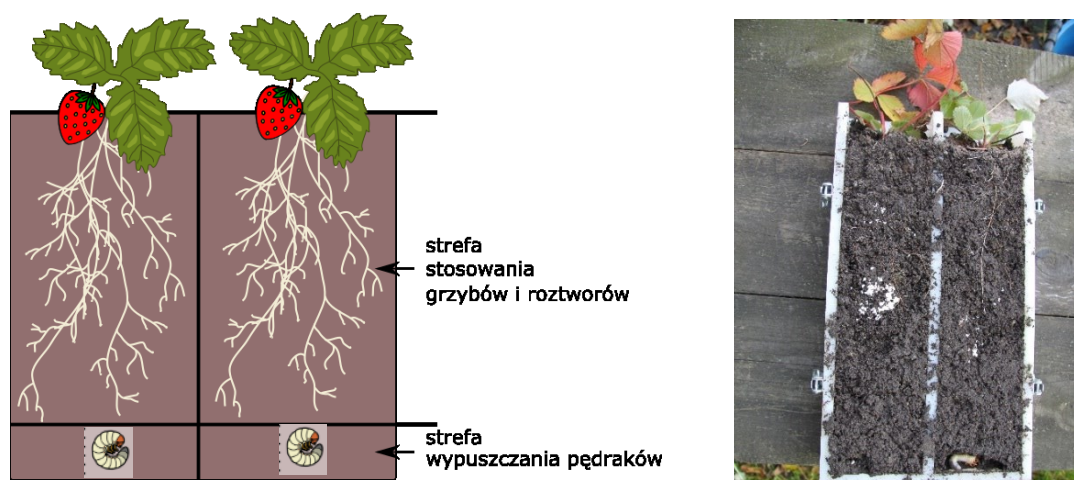
- bibula nasączona roztworem kontrolnym/ roztworem olejku eteryicznego
- miejsce wypuszczania pędraków

Tabela 8. Zachowanie pędraków *Melolontha* spp. pod wpływem olejku eterycznego z aksamitki (*Tagetes* sp.) (suma z czterech powtórzeń).

Wyniki eksperymentu wyraźnie pokazują, że w przypadku stosowania 0,1% olejku eterycznego z aksamitki, czas trzech godzin jest zbyt krótki, aby wzbudzić odpowiedź pędraka (2/3 pędraków pozostało w strefie neutralnej). Po 24-godzinnej inkubacji pędraków w komorze odsetek pędraków, które pozostały w segmencie neutralnym zmniejszył się do 40%. Być może tak wysoki udział pędraków pozostających w strefie neutralnej wynikał z ich kondycji (eksperymenty przeprowadzone w październiku i na początku listopada) lub też ze źle dobranego stężenia olejku eterycznego (0,1% wybrano jako jedno z częściej używanych rozcieńczeń roboczych olejków eterycznych). Jednakże uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne określenie wpływu olejku eterycznego z aksamitki na zachowanie pędraków *Melolontha* spp.

W celu oceny skuteczności czynnika biologicznego zwalczania (*B. brongniartii*) oraz interakcji między badanymi ekstraktami roślinnymi wykonano doświadczenie laboratoryjne z

zastosowaniem specjalnie to tego celu przygotowanych rizoboksów. Na 2 tygodnie przed założeniem doświadczenia posadzono rośliny truskawki odm. Matis po 2 do 1 rizoboksu. Schemat doświadczenia przedstawia Fot. 9.



Fot. 9. Schemat rizoboksu (po lewej), rizoboks z pędrakiem i wyraźnie widocznym rozwojem grzyba (po prawej)

W dniu 10.08.20 zastosowano grzyby owadobójcze w postaci zarodników namnożonych na ziarnie w dawce - 20 g grzybów (Melocont) na 1 rizoboks (ok. 0,6 m²). Doświadczenie założono w 4 powtórzeniach, gdzie 1 powtórzenie stanowił jeden rizoboks. Zastosowano następujące kombinacje:

1. *B.brongniartii*
2. *B.brongniartii* + ekstrakt z nagietka
3. *B.brongniartii* + ekstrakt z aksamitki
4. *B.brongniartii* + ekstrakt z mniszka (korzeń)
5. *B.brongniartii* + ekstrakt z gryki

W dniu 22.08.2020 roku wpuszczono w dolnej części rizoboksu pędraki, po 1 na każdą jego połowę. Roztwory roślinne zastosowano trzykrotnie 20.08.2020, 24.08.2020 i 31.08.2020 roku po 140 ml na rizoboks. Oceny skuteczności grzybów owadobójczych dokonano 8.10.2020 roku licząc porażone pędraki oraz określając, jakim rodzajem grzyba zostały zainfekowane oraz dokonano określenia kondycji korzeni roślin i interakcje między roztworami roślinnymi, a grzybami entomopatogenicznymi. Wyniki zestawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Liczba żywych i porażonych przez *B.brongniartii* pędraków oraz kondycja korzeni i grzybów entomopatogenicznych

Roztwory	Pędraki [szt.]			Uszkodzone korzenie	Widoczna grzybnia
	porażony	martwy	żywy		
<i>B.brongniartii</i>	0	0	2	Tak	Tak
	1	0	1	Tak	Tak
<i>B.brongniartii</i>	2	0	0	Nie	Tak

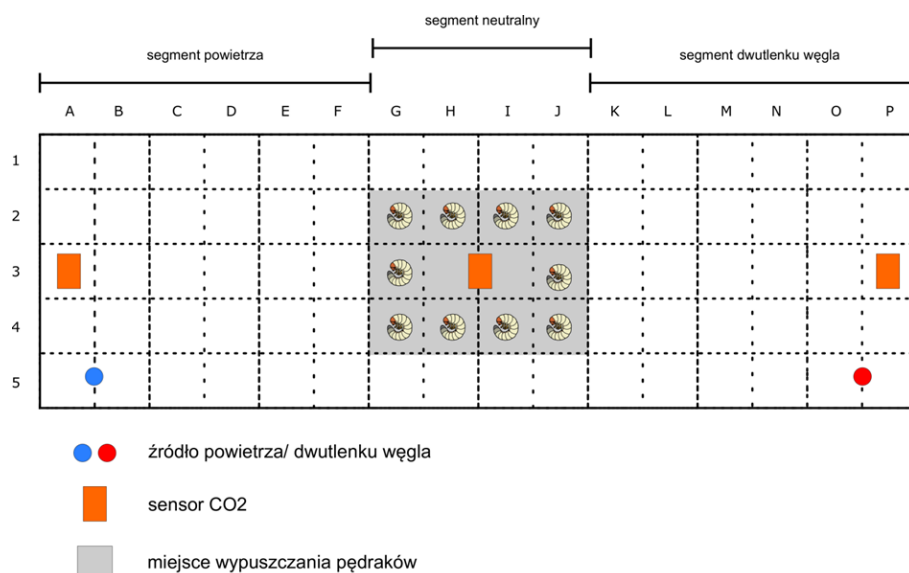
+ alkohol	0	0	2	Tak	Tak
<i>B.brongniartii</i>	1	0	1	Tak	Nie
+ aksamitka	0	0	2	Tak	Tak
<i>B.brongniartii</i>	1	0	1	Tak	Tak
+ gryka	1	0	1	Tak	Tak
<i>B.brongniartii</i>	1	0	1	Tak	Nie
+ mniszek	0	2	0	Nie	Tak
<i>B.brongniartii</i>	2	0	0	Nie	Nie
+ nagietek	1	0	1	Tak	Nie
Razem	10	2	12		

Po wykonaniu całkowitej oceny w doświadczeniu, sumarycznie z wszystkich kombinacji, ok. 42% pędraków zostało efektywnie porażonych. Ale 50% było nadal żywych bez objawów porażenia, a 8% było martwych, ale również bez objawów porażenia. Doświadczenie trwało ok. 2 miesiące, nie wiadomo, czy gdyby trwało jeszcze dłużej, mogłoby być więcej porażonych pędraków. Uszkodzone korzenie w obu powtórzeniach stwierdzono na kombinacji gdzie stosowano samą *B.brongniartii*, *B.brongniartii* + aksamitka, *B.brongniartii* + gryka, na tych kombinacjach stwierdzono również od 50 do 75% żywych pędraków. Na pozostałych kombinacjach wyniki były niejednoznaczne. Wizualnie widoczne strzępki rozwijających się grzybów entomopatogenicznych stwierdzono prawie na wszystkich kombinacjach oprócz *B.brongniartii* + aksamitka i *B.brongniartii* + mniszek.

Doświadczenie IV

Ocena zachowania larw *Melolontha* spp. wobec dwutlenku węgla wraz z czynnikiem biologicznego zwalczania (szczep *Beauveria brongniartii* namnożony na ziarnie)

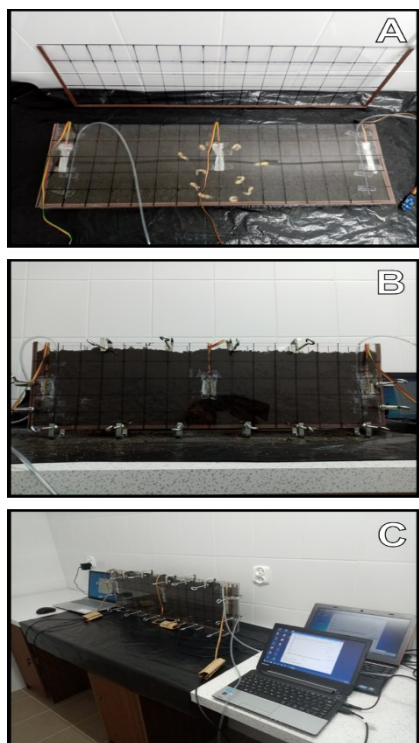
Do badania monitoringu zachowania larw *Melolontha* spp. wobec dwutlenku węgla wraz z czynnikiem biologicznego zwalczania CBZ (szczep *Beauveria brongniartii*) namnożony na ziarnie) skonstruowano specjalną komorę z pleksi o wymiarach 80 cm x 25 cm x 3 cm (długość x wysokość x szerokość). Obiekt podzielono na trzy segmenty: pierwszy - gdzie dostarczano powietrze, drugi - gdzie znajdowało się źródło dwutlenku węgla (2% w powietrzu), oraz trzeci – neutralny, gdzie wypuszczano pędraki. Obydwa gazy dostarczano w przepływie ok. 20 ml/min, co pozwalało na ich powolne rozprzestrzenianie wewnątrz komory na zasadzie swobodnej dyfuzji. Stężenie dwutlenku węgla monitorowano za pomocą specjalnych czujników CDM7160-C00 firmy Figaro umieszczonych w pobliżu źródła gazów w komorze oraz w samym środku komory. Każdy czujnik co dwie sekundy przesyłał do komputera informację o notowanym stężeniu dwutlenku węgla. Jak pokazały próby wewnętrznej kalibracji, czujniki te są w stanie pracować w pełnym zakresie stężeń dwutlenku węgla możliwych do osiągnięcia w eksperymencie (do około 2% CO₂). Dodatkowo na całą komorę naniesiono siatkę kwadratów o boku 5 cm, która miała ułatwiać notowanie położenia pędraków (Rysunek 2). Proces przygotowywania eksperymentu z użyciem komory zilustrowano na Fot. 10.



Rysunek 2. Schemat komory do monitorowania zachowania pędraków w glebie pod wpływem dwutlenku węgla.

W zaprojektowanym układzie przetestowano trzy warianty eksperymentalne:

- Pędraki umieszczono w wilgotnej niesterylnej glebie, z jednej ze stron dostarczano powietrze, z drugiej dwutlenek węgla.
- Pędraki umieszczono w wilgotnej wyjałowionej glebie (inkubacja w 150°C przez 3 godziny), z jednej ze stron dostarczano powietrze, z drugiej dwutlenek węgla.
- Pędraki umieszczano w wilgotnej niesterylnej glebie, z jednej ze stron dostarczano powietrze, z drugiej dwutlenek węgla. W bezpośredniej bliskości źródła dwutlenku węgla (kwadrat O5 na schemacie na Rysunku 2.) umieszczano 10 g CBZ.



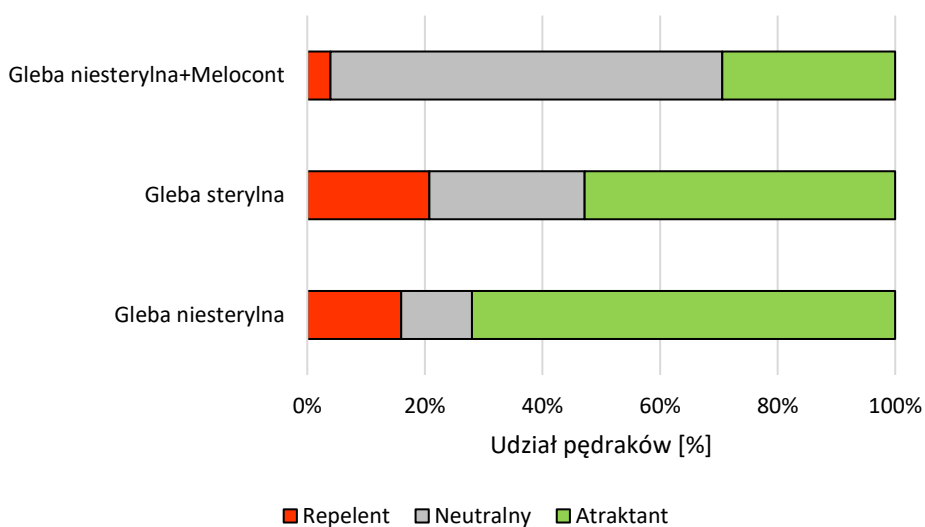
Fot. 10. Ilustracja układu do monitoringu zachowania pędraków pod wpływem dwutlenku węgla. **A** – Proces składania komory, umieszczania pędraków w układzie. Sensory monitorujące stężenie dwutlenku węgla przymocowane są od wewnętrznej strony dużej zdejmowanej ściany komory. Gazy (dwutlenek węgla bądź powietrze) są doprowadzone do wnętrza komory za pomocą specjalnych rurek. Ściana połączona jest z resztą komory za pomocą regulowanych ścisków. **B** – Złożona i gotowa do pracy komora. **C** – Układ rejestrujący stężenie dwutlenku węgla w glebie – każdy czujnik wyposażony jest w osobny komputer, który rejestruje zmiany stężenia dwutlenku węgla w czasie trwania eksperymentu w odpowiednim przedziale komory.

W każdym przypadku jednorazowo w komorze umieszczano 10 osobników larw *Melolontha* spp. Eksperyment prowadzono przez pięć godzin monitorując stężenie dwutlenku węgla w glebie oraz notując położenie pędraków na koniec eksperymentu. W sumie każdy wariant eksperymentalny przeprowadzono w pięciu powtórzeniach, co pozwoliło na obserwację zachowania 50 pędraków na testowane bodźce. Wyniki podsumowano w Tabeli 9, a samą odpowiedź pędraków *Melolontha* spp. na Wykresie 2.

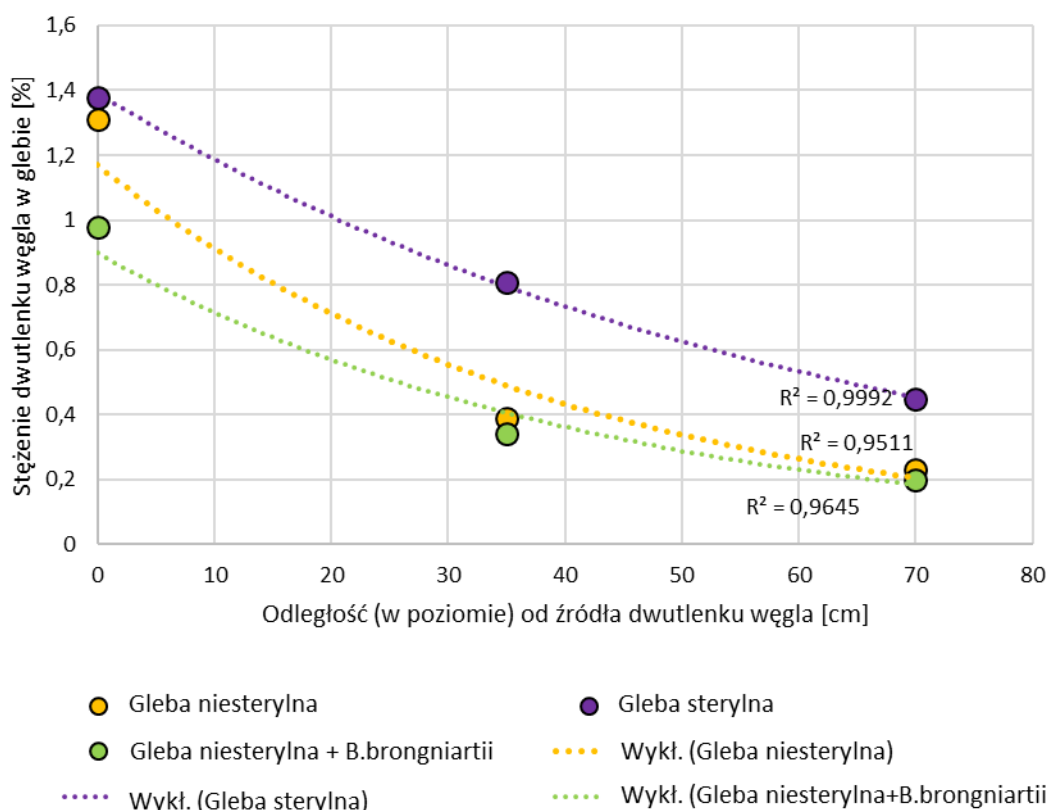
Tabela 9. Wyniki testów behawioralnych pędraków *Melolontha* spp. z zastosowaniem dwutlenku węgla. (Podsumowanie pięciu powtórzeń dla każdego wariantu eksperymentu)

Gleba niesterylna			Gleba sterylna			Gleba niesterylna + Melocont		
Stężenie CO ₂ [%] - Przedział komory			Stężenie CO ₂ [%] - Przedział komory			Stężenie CO ₂ [%] - Przedział komory		
Powietrze	Środek	CO ₂	Powietrze	Środek	CO ₂	Powietrze	Środek	CO ₂
0,23±0,05	0,39±0,04	1,31±0,24	0,45±0,16	0,81±0,28	1,38±0,32	0,20±0,06	0,34±0,08	0,98±0,04
Suma pędraków w przedziale			Suma pędraków w przedziale			Suma pędraków w przedziale		
Powietrze	Środek	CO ₂	Powietrze	Środek	CO ₂	Powietrze	Środek	CO ₂
8	6	36	11	14	23	2	34	15
Procent pędraków w przedziale			Procent pędraków w przedziale			Procent pędraków w przedziale		
Powietrze	Środek	CO ₂	Powietrze	Środek	CO ₂	Powietrze	Środek	CO ₂
16%	12%	72%	22%	28%	56%	4%	68%	30%

Wykres 2. Rozkład klasyfikacji odpowiedzi pędraków wobec dwutlenku węgla.



Wykres 3. Stężenia dwutlenku węgla obserwowane w poszczególnych częściach komory podczas wszystkich wariantów eksperymentu. (Średnia pięciu powtórzeń).



Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły wyciągnąć kilka wniosków:

- rozprzestrzenianie się dwutlenku węgla zależy od sterylności samej gleby – na Wykresie 3 przedstawiono uśrednione stężenia dwutlenku węgla obserwowane w poszczególnych segmentach komory (zobrazowane jako odległość sensora od źródła dwutlenku węgla w poziomie). Próba wyznaczenia linii trendu pokazała, że rozprzestrzenianie się dwutlenku węgla w glebie doświadczeń z glebą sterylną przypadku gleby sterylnej). Takie wyniki mogą być rezultatem obranego sposobu przygotowywania eksperymentu. Gleba, czy to jałowa, czy niesterylna, była za każdym razem nawilżana wodą (do poziomu 5-10% wilgotności) bezpośrednio przed rozpoczęciem samego eksperymentu. Należy pamiętać, że gleba jałowa była sterylizowana poprzez inkubację w temperaturze 150°C, a więc wyprężana, co prowadziło do całkowitej eliminacji wody z gleby. Prawdopodobnie proces nawilżania gleby jałowej i niejłowej zachodzi inaczej ze względu na różnicę w strukturze gleby zupełnie suchej (sympkiej) a chociaż minimalnie nawilżonej (gleba niejłowa).

Dwutlenek węgla dużo lepiej przenosi się w wodzie niż w powietrzu (różnice w rozpuszczalności), co może mieć również wpływ na obserwowane różnice. Drugą przyczyną obserwowanych zmian może być związana z obecnością i metabolizmem mikroorganizmów, których brak jest w glebie sterylnej. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań. Niemniej jednak rodzaj gleby nie miał dużego wpływu na stężenia dwutlenku węgla obserwowane w końcowym etapie eksperymentu bezpośrednio przy źródle gazu. Założeniem projektu było badanie wpływu dwutlenku węgla na zachowanie pędraków w układzie maksymalnie możliwie zbliżonym do naturalnych warunków, w związku z tym dodatek

ziarna z namnożonym szczepem *B. brongniartii* testowano jedynie w glebie niejałowej. W tym wariancie obserwowano najniższe stężenia dwutlenku węgla w segmencie najbliższym do źródła gazu. Może być to wynikiem liczby pędraków obserwowanych w tym przedziale. W eksperymentach bez dodatku preparatu ponad połowa pędraków ostatecznie znajdowała się w segmencie będącym źródłem dwutlenku węgla podczas gdy w wariancie uzupełnionym o dodatek *B. brongniartii* jedynie 30% spośród wszystkich badanych pędraków notowano w tej lokalizacji. Zarówno pędraki, jak i grzyby entomopatogeniczne, w wyniku swojego metabolizmu wydzielają do otoczenia pewne ilości dwutlenku węgla. Są to zmiany niewielkie, o charakterze lokalnym, które jednak mogą być rejestrowane przez czułe sensory użyte do budowy układu. Nagromadzenie pędraków w bezpośredniej bliskości sensora może doprowadzić do różnic w odczycie. Podczas obserwacji prowadzonych w trakcie trwania poszczególnych eksperymentów zauważono pewną prawidłowość – pojawienie się pędraków w bezpośredniej odległości sensora (ok. 5 cm) znacząco wpływało na stabilność odczytu sygnału – zwiększało fluktuacje pomiędzy pomiarami. Może to być wynikiem metabolizmu samego pędraka, jak i przesuwania, obsuwania się gleby (zmiany powierzchni oddziaływującej z sensorem itp.), powodowanej bezpośrednio przez ruch pędraka.

- **dwutlenek węgla jest dla larw *Melolontha* spp. atraktantem** - w wariancie z gleba niesterylną 36 pędraków (72% testowanych osobników) przemieszczało się aktywnie w stronę źródła gazu, a wiele z nich odnotowano w bezpośredniej bliskości ujścia rurki wtłaczającej CO₂ do gleby (0-10 cm od rurki).

- **obecność mikroorganizmów, a więc najprawdopodobniej emitowane, wydzielane przez nie metabolity, mogą modulować działanie dwutlenku węgla jako atraktantu** – odsetek pędraków, które kierowały się w stronę dwutlenku węgla w glebie sterylnej był znacząco niższy (56%) niż w glebie niesterylnej (72%). W literaturze światowej coraz bardziej popularne jest stanowisko, że dwutlenek węgla stanowi jedynie podstawowy czynnik wabiący dla owadów lub jest jedynie nośnikiem dla innych związków, czy substancji zapachowych obecnych w środowisku, które dopiero w obecności CO₂ są zdolne przemieszczać się na znacznie większe odległości [Guerenstein i Hilderbrand 2008]. Nasze wyniki również sugerują podobne wnioski w przypadku larw *Melolontha* spp.

- **obecność *B. brongniartii* w formie namnożonej na ziarnie w glebie osłabia odpowiedź pędraków *Melolontha* spp. względem dwutlenku węgla** – w przypadku dodania do gleby szczepu *B. brongniartii* obserwuje się znaczny spadek udziału pędraków, które aktywnie kierują się w stronę dwutlenku węgla (30% w porównaniu do 72% w przypadku gleby niejałowej), wzrasta natomiast liczba pędraków w segmencie neutralnym (68% badanych osobników, Wykres 3). Może być to zasługą substancji emitowanych przez sam szczep grzyba, jak i ziarno użyte do jego namnażania. Niemniej jednak, pewne jest, że zastosowanie *B. brongniartii* osłabiło migrację pędraków w kierunku dwutlenku węgla.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie metody „Attract and kill”, do ograniczania populacji chrząszczy chrabąszcza majowego może przynieść efektywne jej ograniczenie. W prowadzonych w tym sezonie, jak i w poprzednich doświadczeniach, stwierdzono wysoką efektywność odławiania w pułapki świetlne emitujące światło czarne jak i białe, a zatem mogą się one sprawdzić jako

czynnik wabiący w omawianej metodzie. Jako czynnik zabijający zaplanowano i przebadano w tym roku grzyb entomopatogeniczny *B.brongniartii* namnożony na ziarnie. Zastosowanie takiego czynnika jest bardzo bezpieczne, bez skutków ubocznych dla środowiska. Oprócz tych chrząszczy, które zostaną bezpośrednio porażone przez grzyby w pułapce, można się spodziewać, że będą one przenosiły zarodniki grzybów na inne osobniki, na przykład podczas kopulacji, a także do gleby przez samice przy składaniu jaj, gdzie mogą się namnażać i atakować młode larwy wylęgłe z jaj. Aby metoda ta mogła skutecznie oddziaływać, należy zoptymalizować działanie grzybów lub spowodować, aby chrząszcze przebywały w pułapkach przez taki okres czasu, aby zostały porażone. Z wyników wykonanych doświadczeń wiadomo, że z chrząszczy, które przebywały w pojemniku z grzybami entomopatogenicznymi ok. 1 godziny pojedyncze z nich zostały efektywnie porażone. Ale z wyników doświadczenia, w którym określano czas opuszczenia pułapki przez chrząszcze – większość z nich opuszczała ją w przeciągu 10 minut. A zatem potrzeba jest znalezienia takich czynników, które mogą wpływać na dłuższe pozostanie chrząszczy w pułapce lub czynników wzmacniających aktywność grzybów entomopatogenicznych w pułapce.

W bieżącym projekcie prowadzono doświadczenia nad wykryciem substancji, które powodowałyby dłuższe przebywanie w pułapce chrząszczy, a jednocześnie nie wpływałyby negatywnie na rozwój grzybów w niej zastosowanych. Niestety, ani wyciąg alkoholowy ze świeżych liści oraz kory dębu, ani odwar z kory dębu nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, jak również nie zwiększało w pułapkach aktywności grzybów entomopatogenicznych dodanie do nich otrąb. W przeprowadzonych doświadczeniach nie stwierdzono jednoznacznie wpływu (negatywnego lub pozytywnego) hydrożelu, który utrzymując wilgotność w pułapkach miał ułatwić rozwój grzybów. Jednak być może wpływ na taki wynik miały źle dobrane dawki stosowanych substancji lub pora dnia, w jakiej wykonywano testy. W dalszych badaniach warto byłoby uwzględnić te czynniki.

Zastosowanie metody „Attract and kill” do ograniczania populacji larw w glebie poprzez wykorzystanie jako czynnika wabiącego właściwości allelopatycznych roztworów roślinnych lub dwutlenku węgla, a jako czynnika zabijającego, jak w przypadku pułapek grzybów entomopatogenicznych, mogłoby zwiększać możliwości ich zwalczania. Jak pokazują wyniki doświadczeń roztwory z nagietka, aksamitki i gryki powodowały, że ponad 50% badanych pędraków wybierało rośliny z tym roztworem. Z drugiej strony gryka jest powszechnie uważana za roślinę nie sprzyjającą rozwojowi pędraków, a zatem nie jest łatwo wykluczyć lub potwierdzić losowość wyboru badanych pędraków. Natomiast aksamitka została wykorzystana w kolejnym doświadczeniu w formulacji olejku eterycznego, gdzie również nie udało się jednoznacznie potwierdzić działania allelopatycznego (atraktant lub repelent). Jednak w obu przypadkach istnieją czynniki wpływające na jakość wyników testu, dlatego też w kolejnych badaniach należałoby zbadać ich wpływ. Na przykład ustalenie optymalnego zakresu stężeń olejku eterycznego, ponieważ jak wiadomo, bodziec dostarczany w za małych ilościach, jak i w za dużych, może nie działać oraz zbadanie wpływu rozcieńczenia olejku na zachowanie pędraków. Podobnie jak w roku poprzednim, potwierdzono efektywność porażania przez grzyby entomopatogeniczne (*B.brongniartii*) pędraków oraz interakcję stosowanych alkoholowych roztworów roślinnych z grzybami. W tym roku stwierdzono mały wpływ stosowanych roztworów na wzrost grzybów. W wyniku prowadzonych badań można

przypuszczać, że dwutlenek węgla może być atraktantem dla larw chrabąszcza majowego, ale w literaturze światowej coraz bardziej popularne jest stanowisko, że dwutlenek węgla stanowi jedynie podstawowy czynnik wabiący dla owadów lub jest jedynie nośnikiem dla innych związków, czy substancji zapachowych obecnych w środowisku, które dopiero w obecności CO₂ są zdolne przemieszczać się na znacznie większe odległości. Stwierdzono również, że obecność *B.brongniartii* może osłabiać migrację pędraków w kierunku dwutlenku węgla. Może być to zasługą substancji emitowanych przez sam szczep grzyba, jak i ziarno użyte do jego namnażania. Uzasadnione jest więc poszukiwanie związków, które wzmacniałyby wabiący efekt dwutlenku węgla przy obecności w podłożu szczepów entomopatogenicznych namnożonych na ziarnie.

1B. Określenie składu metabolitów wtórnych w wyciągach roślinnych i określenie związków lotnych oraz innych substancji wydzielanych przez korzenie roślin

W tej części projektu prowadzono badania nad określeniem składu ilościowego i jakościowego niektórych metabolitów wtórnych, w celu określenia związków, które mogą działać jako repelenty lub jako kairomony w stosunku do pędraków chrabąszcza majowego. Również dokonano oceny działania wyciągów na biostymulację roślin truskawki. Wyciągi przygotowano według procedury opisanej powyżej.

Biostymulacja wzrostu różnych odmian truskawki poprzez podlewanie różnymi wyciągami roślinnymi

Doświadczenie I

W eksperymencie przeprowadzonym w warunkach zbliżonych do naturalnych testowano wpływ pięciu różnych wyciągów roślinnych na stymulację wzrostu pięciu odmian truskawki (dokładne dane w Tabeli 10).

Tabela 10. Wykaz testowanych odmian truskawki i wyciągów roślinnych.

Testowane odmiany	Materiał roślinny z którego sporządzono wyciąg alkoholowy
Albion	Aksamitka- cała roślina
Florence	Mniszek – korzeń
Magnum	Nagietek – cała roślina
Rumba	Nagietek - koszyczek
San Andreas	Szałwia – cała roślina

Pierwszym krokiem była analiza składu mikro- i makroskładników zawartych w wytypowanych do badania wyciągach roślinnych. Zawartość poszczególnych składników przedstawia Tabela 11.

Tabela 11. Zawartość makro- i mikroelementów w badanych wyciągach roślinnych.

Oznaczenie [mg/l]	Aksamitka	Korzeń mniszka	Nagietek	Koszyczek nagietka	Szałwia
P-PO ₄ ⁻³	10,5	47,2	19,3	206	43,9
K ⁺	665	563	709	3560	1160
Ca ⁺²	280	130	279	289	173
Mg ⁺²	94,9	53,0	81,4	330	130
Na ⁺	35,6	28,3	110	851	19,2
SO ₄ ⁻²	365	83,5	113	430	345
Fe	1,19	1,06	0,98	5,59	1,03
Mn	0,31	0,29	0,25	1,91	0,36
Cu	0,18	0,27	0,16	1,19	0,20
Zn	1,88	0,53	0,44	2,98	0,84
Mo	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Cd	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Pb	0,04	<0,02	0,04	<0,02	<0,02
Cr	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02
Ni	<0,02	<0,02	<0,02	0,04	<0,02
Hg	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02

Analiza makro- i mikroelementów pokazała wyraźnie, że ekstrakt z koszyczka nagietka zawiera najwięcej elementów, które mogą zwiększać pulę składników odżywczych dostępnych dla roślin. Różnice pomiędzy pozostałymi wyciągami, zwłaszcza biorąc pod uwagę wyniki dla ekstraktu z koszyczka nagietka, nie są tak wyraźne i istotne.

W dalszym etapie przystąpiono do zbadania bezpośredniego wpływu wyselekcjonowanych ekstraktów na wzrost truskawki. Rośliny posadzono w doniczki 22.04.2020. Eksperyment biostymulacji polegał na podlewaniu roślin (po trzy rośliny w każdym testowanym wariancie) odpowiednio rozcieńczonymi wyciągami roślinnymi (10%) w objętości 50 ml na roślinę przez pięć kolejnych dni (06.07.2020-10.07.2020). Następnie rośliny dalej hodowano w warunkach naturalnych. Eksperyment zakończono 04.08.2020 i dokonano obserwacji makroskopowej, analizy wagowej, a następnie analizy systemu korzeniowego (zeskanowanych obrazów) za pomocą programu WinRHIZO [Arsenault i wsp. 1995]. Wyniki dotyczące pomiarów: świeżej masy całych roślin i poszczególnych części oraz stosunku wagowego części nadziemnej do korzenia w przypadku truskawek różnych odmian podlewanych roztworem kontrolnym przedstawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Średnia waga poszczególnych części roślin badanych odmian truskawki wraz z udziałem procentowym w ogólnej masie rośliny. (Średnia z trzech powtórzeń.)

Odmiana truskawki	Waga [g]		Procentowy udział w wadze całej rośliny [%]	
	cz. nadziemnej	korzenia	cz. nadziemnej	korzenia
Albion	5,06	2,29	68,9	31,1
Florence	12,45	15,15	45,1	54,9
Magnum	6,13	5,66	52,0	48,0
Rumba	6,67	6,21	51,8	48,2
San Andreas	8,93	7,00	56,0	44,0

Już wstępne wyniki sugerują, że badane rośliny truskawki różnią się między sobą osiąganą masą rośliny. Najlepszym wzrostem odznacza się odmiana Florence, zaś najmniejsze rośliny obserwowano w przypadku odmiany Albion. Jednocześnie odmiana Florence wykazywała największy udział systemu korzeniowego w ogólnej masie rośliny, podczas gdy odmiana Albion wykazywała najmniejszy udział masy korzenia w ogólnej masie rośliny. Pozostałe odmiany (Magnum, Rumba i San Andreas) charakteryzowały się równomiernym rozwojem części nadziemnej i systemu korzeniowego. W związku z wyraźnie odmiennym wzrostem badanych odmian dalsze parametry świadczące o stymulacji rozwoju korzeniowego pod wpływem podlewania wybranymi wyciągami roślinnymi rozpatrywano w obrębie danej odmiany. Dane dotyczące masy roślin i poszczególnych ich części podlewanych różnymi wyciągami roślinnymi przedstawia Tabela 13.

W przypadku odmiany Albion obserwowano dodatni wpływ podlewania wyciągiem z aksamitki, nagietka czy korzeni mniszka na pokrój ogólny rośliny. Truskawki Albion podlewane wyciągiem z koszyczka nagietka nie różniły się zauważalnie od roślin kontrolnych. Obserwowano ujemny wpływ podlewania wyciągiem szalwii na rozwój tej odmiany truskawki. W przypadku kombinacji podlewanej wyciągiem z szalwii i korzenia nagietka masa korzenia stanowiła większy procent w ogólnej masie rośliny niż w roślinach kontrolnych.

W przypadku odmiany Florence obserwowano pozytywny wpływ wyciągów z aksamitki i koszyczka nagietka na ogólną masę sadzonek. W przypadku podlewania tych roślin wyciągiem z nagietka nie obserwowano wyraźnych różnic w porównaniu z kontrolą. W przypadku stosowania wyciągów z mniszka i szalwii obserwowane masy roślin były wyraźnie niższe niż w przypadku kontroli. Tylko w przypadku podlewania wyciągiem z aksamitki, bądź korzenia mniszka, miało to przełożenie na udział masy korzenia w masie całkowitej rośliny (odpowiednio zmniejszało bądź zwiększało udział systemu korzeniowego w masie ogólnej).

W przypadku odmiany Magnum obserwowano pozytywny wpływ wyciągów z nagietka i koszyczka nagietka na ogólną masę sadzonek. Rośliny podlewane wyciągiem z szalwii czy mniszka nie różniły się istotnie od roślin kontrolnych, zaś rośliny podlewane ekstraktem z aksamitki wykazywały słabszy wzrost. W przypadku tej odmiany podlewanie wyciągami roślinnymi nie miało w zasadzie wpływu na udział masy korzenia w ogólnej masie rośliny, za wyjątkiem ekstraktu z koszyczka nagietka, który redukowało udział korzenia w ogólnej masie truskawki.

Rośliny odmiany Rumba podlewane roztworami z szalwii i nagietka wykazywały silniejszy wzrost niż rośliny kontrolne. W przypadku pozostałych ekstraktów obserwowane fluktuacje masy ogólnej nie były istotne. Co ciekawe, praktycznie wszystkie rośliny, za wyjątkiem tych podlewanych wyciągiem z korzeni mniszka, odznaczały się słabszym udziałem korzenia w ogólnej masie rośliny. Truskawki podlewane wyciągiem z korzeni mniszka nie różniły się pod tym względem od roślin kontrolnych.

W przypadku odmiany San Andreas obserwowano pozytywny wpływ wyciągów z aksamitki, korzeni mniszka, nagietka czy koszyczka nagietka na ogólną masę sadzonek. Jedynie rośliny podlewane szalwią nie różniły się pod tym względem od roślin kontrolnych. W przypadku roślin podlewanych wyciągiem z aksamitki czy koszyczka nagietka nie

Tabela 13. Średnia masa roślin poszczególnych odmian truskawki podlewanych różnymi wyciągami wraz z procentowym udziałem masy systemu korzeniowego w masie całkowitej rośliny. (Średnia z trzech powtórzeń.)

Wariant	Średnia masa rośliny [g]	Udział korzenia w ogólnej masie [%]
Albion		
Kontrola	7,35	31,2%
Aksamitka	10,34	29,8%
Korzeń mniszka	11,03	33,4%
Nagietek	10,79	29,9%
Koszyczek nagietka	7,30	38,2%
Szałwia	5,75	37,9%
Florence		
Kontrola	27,60	54,9%
Aksamitka	39,88	44,0%
Korzeń mniszka	21,60	61,8%
Nagietek	26,98	53,3%
Koszyczek nagietka	40,10	54,9%
Szałwia	20,54	55,9%
Magnum		
Kontrola	11,79	48,0%
Aksamitka	8,93	48,0%
Korzeń mniszka	11,58	51,5%
Nagietek	15,73	54,7%
Koszyczek nagietka	18,99	37,8%
Szałwia	13,09	46,3%
Rumba		
Kontrola	12,88	48,2%
Aksamitka	13,32	35,2%
Korzeń mniszka	12,19	43,4%
Nagietek	20,41	38,4%
Koszyczek nagietka	12,42	39,4%
Szałwia	15,61	41,3%
San Andreas		
Kontrola	15,93	43,9%
Aksamitka	16,97	40,1%
Korzeń mniszka	19,44	32,9%
Nagietek	28,38	33,2%
Koszyczek nagietka	25,31	38,3%
Szałwia	16,26	30,2%

obserwowano zmian w stosunku masowym korzeń/cała roślina. Rośliny podlewane pozostałymi wyciągami odznaczały się słabszym wzrostem korzenia w odniesieniu do całkowitej masy rośliny.

Następnie przeprowadzono kompleksową analizę systemów korzeniowych sadzonek truskawek. Analiza ta pozwala na bliższe przyjrzenie się strukturze systemu korzeniowego badanych roślin, którego zaawansowanie nie musi koniecznie iść w parze ze wzrostem wagi samego korzenia. W tym celu zeskanowano system korzeniowy każdej rośliny, a następnie przeanalizowano otrzymane obrazy (przykładowe zestawienie skanów na Fot. 11.) przy użyciu programu WinRHIZO. Oprogramowanie to umożliwia ocenę w obrębie takich parametrów jak: długość systemu korzeniowego, średnią powierzchnię systemu korzeniowego, średnią średnicę systemu korzeniowego, objętość systemu korzeniowego oraz liczbę wierzchołków korzeni, co podsumowano w Tabeli 14.

Analiza ta dowiodła po raz kolejny, że truskawki odmiany Florence odznaczają się wyjątkowo rozwiniętym systemem korzeniowym o czym świadczy chociażby odnotowana długość korzeni czy pole powierzchni przez nie zajmowane. Za odmiany o słabszym systemie korzeniowym należy uznawać Albion, Magnum czy San Andreas. Truskawki odmiany Rumba odznaczają się średnio rozwiniętym systemem korzeniowym w porównaniu do wszystkich badanych odmian. Jest to także odmiana, która najslabiej zareagowała na podlewanie różnymi ekstraktami roślinnymi (najmniejsze fluktuacje analizowanych cech). Za najbardziej zmienny parametr można uważać liczbę wierzchołków korzeni (wahania w zakresie 1002-3973). Z kolei wydaje się, że najmniej zmiennym parametrem spośród cech analizowanym w programie WinRHIZO jest średnica korzeni, która waha się przeciętnie w zakresie 0,46-0,66 mm. Wyjątek stanowią tu truskawki odmiany Magnum podlewane ekstraktem z nagietka, gdzie średnica korzeni została określona na 0,92 mm. Należy jednak zaznaczyć, że były to truskawki o bardzo zwartym i słabo rozwiniętym systemie korzeniowym (relatywnie mała powierzchnia, niewielka długość), być może sama analiza została zaburzona przez stosunkowo duży odsetek korzeni starych, zdrewniałych o większej średnicy. Na podstawie analizy wykonanej programem WinRHIZO nie można wykazać jednoznacznej zależności pomiędzy podlewaniem określonym ekstraktem a stymulacją wzrostu truskawki. Każda odmiana reaguje w odmienny sposób. Oczywiście eksperyment ten wymaga powtórzenia na większą skalę, jednak należy przypuszczać, że sam dobór odmiany będzie miał wpływ na osiągnięte rezultaty, co jest ważne z punktu widzenia plantatora. Analiza obrazów sugeruje, że w przypadku odmiany Albion stymulująco na rozwój systemu korzeniowego wpływa podlewanie wyciągiem z aksamitki czy korzenia mniszka (co częściowo potwierdza nasze wyniki z roku ubiegłego), zaś pozostałe ekstrakty mają mniejszy wpływ na rozwój systemu korzeniowego (szałwia praktycznie bez efektu). Odmiana Florence najlepiej zareagowała na podlewanie wyciągiem z koszyczka nagietka, który jak wykazaliśmy jest najbardziej zasobny w mikro- i makroelementy. Podlewanie wyciągiem z aksamitki nie stymulowało rozwoju systemu korzeniowego tej odmiany truskawki, a podlewanie wyciągami z korzenia mniszka, nagietka czy szalwii miało nawet efekt hamujący. Jeżeli chodzi o odmianę Magnum, to po raz kolejny wzrost rozwoju systemu korzeniowego stymulowało podlewanie wyciągiem z koszyczka nagietka, a także korzenia mniszka. Pozostałe wyciągi stymulowały wzrost systemu korzeniowego w dużo

Fot. 11. Zestawienie skanów systemów korzeniowych różnych odmian truskawek podlewanych badanymi wyciągami roślinnymi.

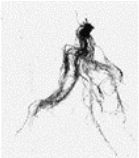
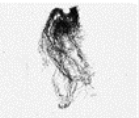
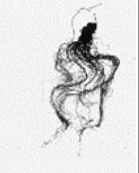
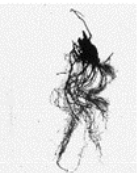
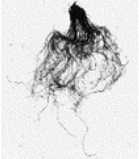
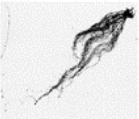
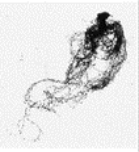
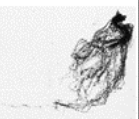
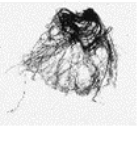
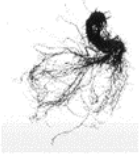
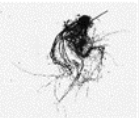
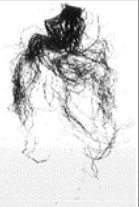
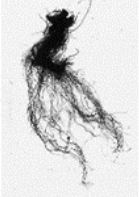
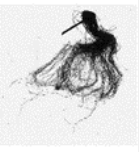
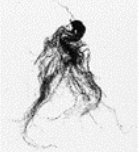
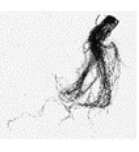
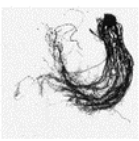
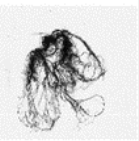
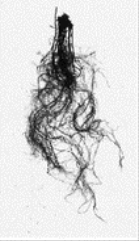
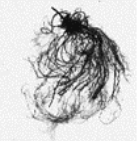
	KONTROLA	AKSAMITKA	KORZEŃ MNISZKA	NAGIETEK	KOSZYCZEK NAGIETKA	SZAŁWIA
ALBION						
FLORENCE						
MAGNUM						
RUMBA						
SAN ANDREAS						

Tabela 14. Parametry systemu korzeniowego poszczególnych odmian truskawki określone przy użyciu programu WinRHIZO. (Średnia z trzech powtórzeń.)

Wariant	Długość korzeni [cm/l gleby]	Pole powierzchni korzeni [cm ² /l gleby]	Średnica korzeni [mm]	Objętość korzeni [cm ³ /l gleby]	Liczba wierzchołków korzeni [szt./l gleby]
Albion					
Kontrola	442,05	76,89	0,58	1,09	1108
Aksamitka	783,93	132,59	0,53	1,82	1786
Korzeń mniszka	698,48	117,98	0,55	1,6	1496
Nagietek	501,09	105,48	0,66	1,79	1474
Koszyczek nagietka	484,35	98,86	0,64	1,64	1179
Szałwia	431,47	75,12	0,56	1,05	1002
Florence					
Kontrola	1169,18	165,57	0,46	1,88	2877
Aksamitka	1243,87	193,87	0,49	2,43	2663
Korzeń mniszka	880,24	150,44	0,54	2,05	1844
Nagietek	985,19	174,07	0,56	2,46	2052
Koszyczek nagietka	1857,29	310,53	0,53	4,17	3150
Szałwia	769,2	142,41	0,64	2,26	1649
Magnum					
Kontrola	396,87	75,72	0,64	1,18	2368
Aksamitka	552,09	110,33	0,63	1,76	1329
Korzeń mniszka	775,72	131,29	0,52	1,78	2014
Nagietek	424,17	96,63	0,92	1,87	1867
Koszyczek nagietka	796,34	122,81	0,49	1,52	3973
Szałwia	472,96	91,79	0,61	1,48	2478
Rumba					
Kontrola	835,12	155,62	0,6	2,36	1906
Aksamitka	790,39	135,58	0,54	1,88	1724
Korzeń mniszka	881,69	145,13	0,53	1,91	1958
Nagietek	1043,52	183,39	0,55	2,7	2067
Koszyczek nagietka	905,28	162,89	0,58	2,38	1391
Szałwia	885	169,27	0,6	2,73	1866
San Andreas					
Kontrola	412,4	71,95	0,56	1,01	1269
Aksamitka	480,87	78,48	0,53	1,02	1394
Korzeń mniszka	351,9	71,21	0,65	1,16	1112
Nagietek	560,49	106,61	0,61	1,71	1539
Koszyczek nagietka	801,46	128,31	0,52	1,64	2046
Szałwia	552,96	78,79	0,47	0,9	1514

mniejszym stopniu. W przypadku odmiany Rumba najlepsze efekty stymulacji wzrostu systemu korzeniowego obserwowano po podlewaniu ekstraktem z nagietka i koszyczka nagietka. Pozostałe wyciągi stymulowały wzrost systemu korzeniowego w dużo mniejszym stopniu. Również w przypadku odmiany San Andreas, truskawki podlewane wyciągiem z koszyczka nagietka wykazywały najlepszy wzrost systemu korzeniowego. Podlewanie wyciągiem z nagietka czy szalwii stymulowało wzrost w mniejszym stopniu, stosowanie ekstraktu z aksamitki nie powodowało istotnych zmian w strukturze systemu korzeniowego, zaś podlewanie wyciągiem z korzeni mniszka miało niewielki wpływ hamujący na wzrost korzeni, nie wpływało jednak negatywnie na pozostałe analizowane parametry.

Pomimo tego, że każda odmiana truskawki reagowała w trochę inny sposób można zauważyć pewien pozytywny trend pomiędzy podlewaniem roślin wyciągiem z koszyczka nagietka, a stymulacją wzrostu korzenia truskawki. Aż cztery z pięciu testowanych odmian zareagowały pozytywnie na ten ekstrakt. Należy podkreślić, że żadna z odmian nie zareagowała negatywnie (w przypadku odmiany Albion ekstrakt ten był obojętny dla roślin). Najsłabsze właściwości stymulujące spośród badanych ekstraktów przejawiał wyciąg z szałwii – w trzech wypadkach powodował słabą stymulację wzrostu systemu korzeniowego, a w dwóch przypadkach prowadził nawet do spowolnienia wzrostu systemu korzeniowego roślin truskawki. Tegoroczne badania pokazały również, że stymulacja wzrostu korzenia truskawki przez podlewanie wyciągiem z korzenia mniszka jest cechą swoistą dla konkretnych odmian (np. Albion, Magnum). Niektóre odmiany reagują zaś negatywnie na takie zabiegi np. Florence czy San Andreas.

Doświadczenie II

Określenie składu metabolitów wtórnych

Ze względu na pozytywne w poprzednim roku wyniki biostymulacji korzeni roślin, do eksperymentu wybrano alkoholowy wyciąg z mniszka przygotowany z korzeni tej rośliny oraz rośliny 5 odmian truskawek (Albion, Florence, Magnum, Rumba, San Andrea), rosnące w standardowych doniczkach, które podlewano odpowiednio rozcieńczonym wyciągiem z mniszka lekarskiego (10%) w objętości 50 ml na roślinę przez pięć kolejnych dni (06.07.2020-10.07.2020). Następnie rośliny dalej hodowano w warunkach naturalnych. Po około tygodniu z roślin wszystkich odmian pobrano materiał do badań: liście oraz korzenie truskawek. Oznaczono suchą masę organów roślinnych oraz wykonano dokumentację fotograficzną. W materiale oznaczono zawartość i skład różnych klas związków fenolowych oraz triterpenoidów, zarówno frakcji tetracyklicznych steroidów, jak i związków pentacyklicznych.

Analiza związków fenolowych w ekstraktach etanolowych z liści i korzeni truskawki

We wszystkich frakcjach materiału roślinnego oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych, całkowitą zawartość antocyjanin oraz identyfikowano główne związki fenolowe.

Oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych

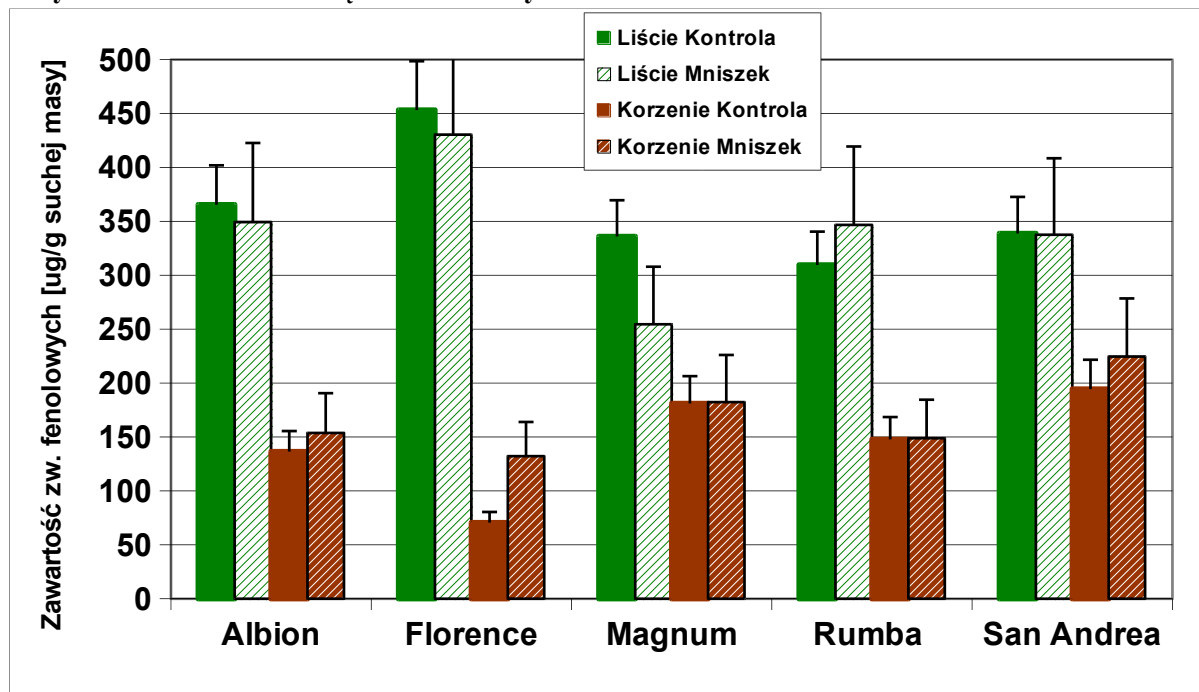
Powietrznie suche liście i korzenie truskawek poddano ekstrakcji 80% etanolem, zawierającym 2% eteru etylowego. Podczas 8-godzinnej ekstrakcji próby delikatnie wstrząsano. Uzyskaną frakcję wolnych związków fenolowych i ich glikozydowych oraz estrowych pochodnych poddano dalszym badaniom - oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych przy użyciu metody Folina i Ciocalteu'a.

Do próbek odpipetowano po 15 µl roztworów etanolowych, zawierających związki fenolowe (w 3 powtórzeniach). Próby uzupełniono wodą dejonizowaną do 250 µl, do próby kontrolnej dodano samą wodę dejonizowaną. Po tych czynnościach dodano 250 µl odczynnika Folina i Ciocalteu'a (rozcieńczonego dwukrotnie). Inkubowano dokładnie 3 min. w temperaturze pokojowej. Kolejno dodano 500 µl nasyczonego roztworu Na₂CO₃ i inkubowano w temperaturze około 30°C przez 1 godz. Zmierzono absorbancję próbek w

spektrofotometrze Shimadzu 160A przy $\lambda = 750$ nm.

Całkowitą zawartość związków fenolowych obliczano, korzystając z krzywej wzorcowej, wykonanej dla kwasu ferulowego w zakresie 0,5 - 100 μg . Wynik podano w $\mu\text{g/g}$ suchej masy prób (Wykres 4).

Wykres 4. Zawartość związków fenolowych w liściach i korzeniach roślin 5 odmian truskawki.



Stwierdzono, że całkowita zawartość związków fenolowych była zbliżona lub nieco niższa (odmiana Magnum) w liściach roślin podlewanych ekstraktem z mniszka w porównaniu do roślin kontrolnych. Podobny trend obserwowano w poprzednich badaniach. Zawartość fenoli w korzeniach była 2-3-krotnie niższa niż w liściach. Zwiększała się o ok. 80% po podlewaniu ekstraktem z mniszka w korzeniach roślin odmiany Florence, w pozostałych odmianach była zbliżona do obserwowanej w roślinach kontrolnych.

Hydroliza związków fenolowych z ekstraktów metanolowych

Do próbek dodano 500 μl ekstraktów etanolowych zawierających związki fenolowe z liści i korzeni truskawek. Następnie dodano 10 ml wody destylowanej i 1 ml 4 M kwasu trójfluorooctowego. Probówki lekko zakręcono i wstawiono na 30 min. do suszarki o temp. 110°C. Po zakończonej hydrolizie, probówki ostudzono pod zimną wodą. Przeprowadzono trzykrotną ekstrakcję octanem etylu. Połączone ekstrakty odparowano do sucha. Na końcu wolne związki fenolowe rozpuszczono w 1 ml metanolu do HPLC.

Uzyskane w wyniku hydrolizy kwasowej wolne związki fenolowe z liści i korzeni, poddano analizie z użyciem HPLC. Analizę HPLC wykonano przy użyciu chromatografu Shimadzu LC-20AD (Shimadzu). Rozdział prowadzono na kolumnie COSMOSIL(R) Cholesterol Packed Column 4.6mm, I.D. x 250mm z prekolumną Bionacom Filter Column Protector; 316 Stainless Steel, 2 microns. Dla tego typu związków zastosowano odmienną fazę ruchomą: eluent A (0,1% kwas mrówkowy w wodzie) oraz B (acetonitryl) w układzie: 90–

75% A do 30 min; następnie 75–40% A od 30 to 45 min, przy przepływie 1 ml/min. Temperatura rozdźiału wynosiła 30°C. Rejestrację prowadzono przy 254 nm. Wyniki przedstawiono w Tabeli 15.

Stwierdzono że w liściach i korzeniach odmian truskawki występują flawonoidy: katechiny (różne formy), w tym galusan katechiny, kempferol, kwercetyna oraz kwasy: ferulowy, galusowy, chlorogenowy, *p*-kumarowy, protokatechusowy, *t*-cynamonowy, wanilinowy, elagowy oraz kawowy. Zawartość ich jest zmienna i wydaje się, że nie można stwierdzić występowania wyraźnego trendu zmian pod wpływem ekstraktu z mniszka.

Oznaczanie całkowitej zawartości antocyjanin

Z innych prób materiału roślinnego wyodrębniono antocyjaniny. Procedura ta była niezbędna ze względu na odmienną metodę ekstrakcji: tkanki zalewano 1% HCl w metanolu, zostawiano na 3 godziny (delikatnie wstrząsając) i wirowano przy 10 000 x g przez 15 min. Następnie mierzono absorbancję próbek w spektrofotometrze Shimadzu 160A przy $\lambda = 525$ nm. Zawartość antocyjanin obliczano, korzystając z krzywej wzorcowej dla peoniny (w zakresie 5-50 μg). Wynik wyrażano w μg antocyjanin /g suchej masy prób (Wykres 5).

Zawartość antocyjanin w roślinach truskawek była niska w porównaniu do związków fenolowych i była wyższa w liściach niż w korzeniach. Stężenie antocyjanin w zasadzie nie zmieniało się pod wpływem podlewania ekstraktem z mniszka. Wydaje się, że podobnie jak w poprzednich badaniach, antocyjaniny, w przeciwieństwie do innych związków fenolowych nie odpowiadają na sygnały związane z podlewaniem ekstraktami zawierającymi fenole i/lub triterpenoidy.

Wykres 5. Zawartość antocyjanin w liściach i korzeniach roślin truskawki.

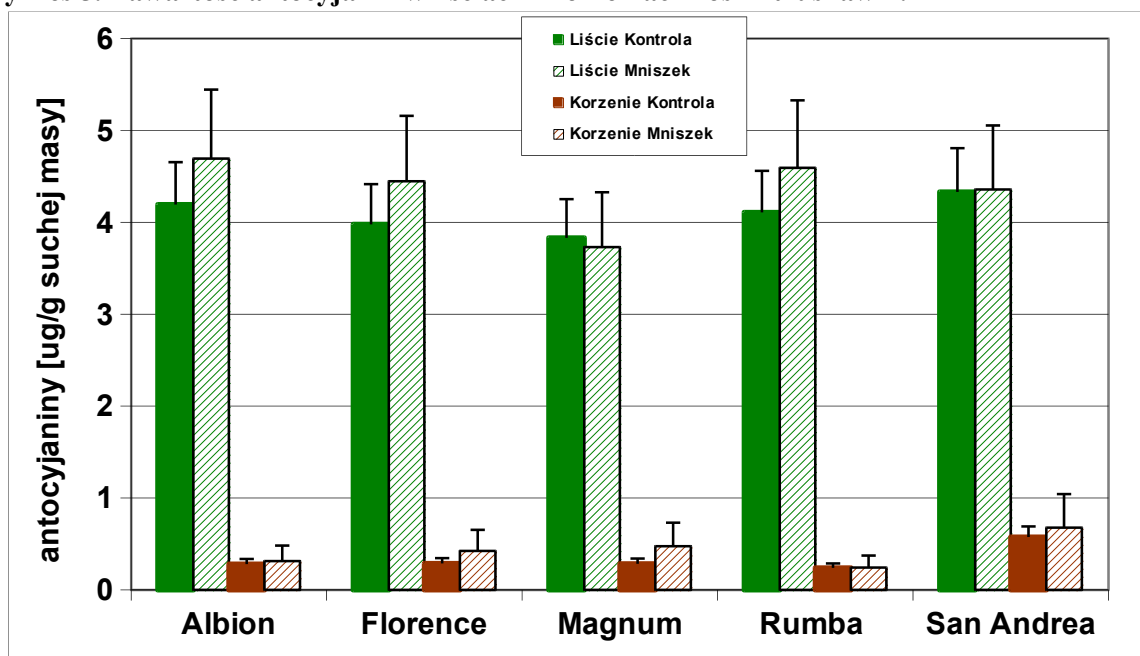


Tabela 15. Identyfikacja składników fenolowych w liściach (L) i korzeniach (K) truskawek kontrolnych lub podlewanych ekstraktem z mniszka lekarskiego

Zw. fenolowy	Albion				Florence				Magnum				Rumba				San Andrea			
	Kontrola		Mniszek		Kontrola		Mniszek		Kontrola		Mniszek		Kontrola		Mniszek		Kontrola		Mniszek	
	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K	L	K
Galusan katechiny	11,50		17,89	0,51	8,25	1,35	11,90		11,50		21,50		5,84		0,89	śl	6,31		5,52	
Katechiny	32,5		11,40		38,44		68,7	śl	33,90		32,53	32,16	33,90		4,14		32,53			3,14
Kempferol	38,16		14,50		5,35		3,31	śl	śl	4,14		5,14		1,54	5,35	4,19	8,31		śl	
Kwercetyna	4,08		3,31		29,87		33,90		19,87		37,90		23,90		65,52		33,45		21,50	
Kwas ferulowy	0,39		5,35		3,16		1,15		śl		2,50			2,17		2,28				
Kwas galusowy	4,14		11,51						15,50	4,14		3,14			5,32	5,35	7,52			1,35
Kwas chlorogenowy		5,35				5,35	5,52	śl	33,90		śl		32,16	śl		3,31		śl		śl
Kwas <i>p</i> -kumarowy		2,35		1,75		śl				5,38			1,35		3,35	21,50	33,16		4,35	
Kwas protokatechusowy	1,08		3,01		9,84		3,90		1,87		7,90		2,90		5,52		3,45		1,50	
Kwas <i>t</i> -cynamonowy	śl	śl		śl		2,16	śl	1,35	śl	5,35	1,50	śl		1,01	śl	4,14	śl		śl	
Kwas wanilinowy			32,16		5,52					4,31										śl
Kwas elagowy	4,14		3,36		14,78		22,17				śl		3,57			4,46	śl			
Kwas kawowy		śl		4,28	śl	3,31		11,50		6,35					śl		34,17			

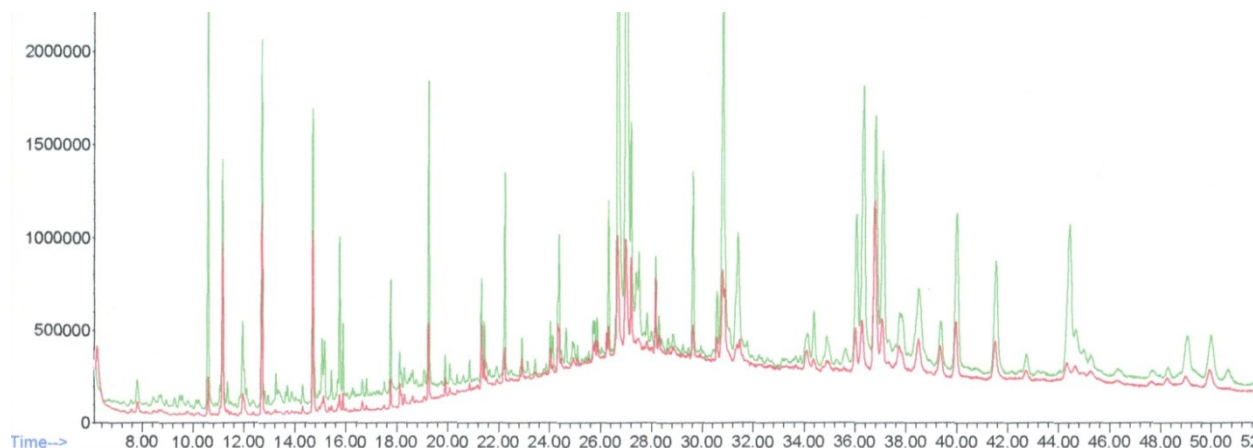
Analiza związków triterpenoidowych w ekstraktach eterowych z liści i korzeni truskawki

Próbki liści i korzeni truskawek analizowanych odmian wysuszono, zważono, rozdrobniono i poddano ekstrakcji eterem dietylowym. Ekstrakty rozfrakcjonowano metodą preparatywnej adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym stosując układ rozwijający chloroform:metanol 97:3. Uzyskano frakcje tzw. triterpenoidów obojętnych (niekwasowych) czyli steroidów oraz alkoholi i ketonów pentacyklicznych w postaci wolnej, oraz kwasów triterpenoidowych. Skład otrzymanych frakcji analizowano metodą chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS) przy użyciu chromatografu gazowego 7890A Agilent Technologies sprzężonego ze spektrometrem masowym 5975C i wyposażonego w autosampler G4513A w programie temperaturowym o sekwencji: temperatura kolumny 160°C przez 2 min., następnie wzrost temperatury do 280°C przy szybkości 5°C/min. i temperatura 280°C przez kolejne 65 min. Inne parametry robocze: kolumna HP-5MS o wymiarach 30 m x 0.25 mm, szybkość przepływu gazu nośnego (helu) 1 ml/min, temperatura dozownika (split 10:1) i detektora FID 290°C, temperatura kwadrupola 150°C, temperatura źródła jonów 230°C, energia jonizacji (EI) 70 eV, m/z 33-500 w trybie TIC, przepływ gazów w FID H₂ 30 ml/min (generator Peak), powietrza 400 ml/min. Poszczególne związki zidentyfikowano przez porównanie ich czasów retencji i uzyskanych widm masowych z wzorcami oraz danymi z baz Wiley 9th ED. & NIST 2008 Lib. SW (Version 2010).

W liściach i korzeniach wszystkich odmian truskawek wykazano obecność grupy typowych fitosteroli steroli roślinnych: sitosterolu, kampesterolu i stigmasterolu, grupy prekursorów steroli (cykloartanolu i 24-metylenocykloartanolu), nasyconej formy dominującego sitosterolu (czyli sitostanolu) oraz utlenionych pochodnych ketonowych steroli (tremulonu, czyli stigmasta-3,5-dien-7-onu, stigmast-4-en-3-onu (czyli sitostenonu) i 2,2-dimetylocholest-4-en-3-onu (dimetylocholestenonu). Wykazano też obecność monohydroksylowych alkoholi należących do grupy triterpenoidów pentacyklicznych o szkieletcie oleananu i ursanu, czyli α - i β -amyryny, a także ketonu- α -amyrenonu; oraz odpowiadających im kwasów, czyli kwasu oleanolowego i ursolowego.

Biostymulacja roślin za pomocą podlewania ekstraktem z mniszka spowodowała u wszystkich odmian niewielki wzrost zawartości związków triterpenoidowych w liściach (średnio 20%) i korzeniach (5-10%), co może świadczyć o pozytywnym wpływie tej metody na potencjał obronny roślin (triterpenoidy pentacykliczne są uważane za metabolity wyspecjalizowane, zaangażowane w chemiczną odpowiedź obronną roślin). Nie zaobserwowano spektakularnych zmian w biosyntezie steroli w liściach - z wyjątkiem odmiany Magnum, u której nastąpił wzrost zawartości tych związków o około 30%. Natomiast całkowita zawartość steroli wzrosła w korzeniach wszystkich odmian (od 10% w odmianie San Andrea, do 65% w odmianie Albion i 80% w odmianie Florence, przykład na Wykresie 6), co może świadczyć o pobudzeniu rozrostu systemu korzeniowego (sterole są niezbędnymi składnikami błon komórkowych, zatem wzrost ich zawartości świadczy o namnażaniu się komórek) oraz wzrostu odporności (sterole biorą udział w odpowiedzi roślin na niektóre typy stresów biotycznych i abiotycznych, regulując płynność błon komórkowych oraz aktywność enzymów związanych z błonami).

Wykres 6. Chromatogram GC ekstraktów zawierających sterole i triterpenoidy obojętne z korzeni truskawki odmiany Florence (linia różowa – kontrola, linia zielona – próbka korzeni poddanych biostymulacji). Frakcja steroli i triterpenoidów obojętnych obejmuje szczyty lokujące się w zakresie czasów retencji 32-50 min.



Biostymulacja wzrostu roślin truskawek pod wpływem badanego ekstraktu

Obserwacja makroskopowa i analiza wagowa roślin truskawek wskazuje, że zastosowanie badanego ekstraktu może powodować biostymulację wzrostu roślin truskawek, wyrażonego jako przyrost suchej masy, zwłaszcza części korzeniowej (Wykres 7). Dotyczy to przede wszystkim odmian Albion i Florence (po ok. 30%) oraz Magnum i Rumba (po ok. 20%). Takiego efektu nie obserwowano u odmiany San Andrea.

W niektórych przypadkach sucha masa korzeni czy liści nie odzwierciedlała wyglądu świeżych lub wysuszonych roślin truskawki (Tabela 16 i Tabela 17).

Wykres 7. Sucha masa liści i korzeni roślin 5 odmian truskawki.

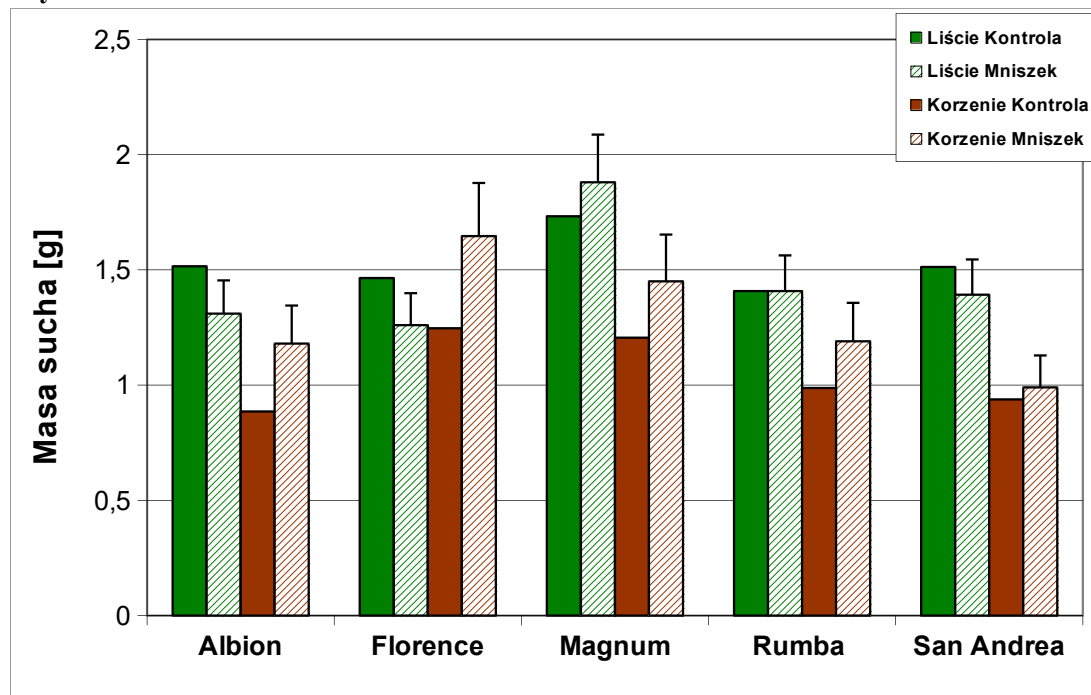


Tabela 16. Rośliny świeże: kontrolne i podlewane ekstraktem z mniszka

	Kontrola	Ekstrakt
Albion		
Florence		
Magnum		
Rumba		
San Andrea		

Tabela 17. Rośliny suche: kontrolne i podlewane ekstraktem z mniszka

	Kontrola	Ekstrakt
Albion		
Florence		
Magnum		
Rumba		
San Andrea		

Ocena substancji lotnych wydzielanych przez korzenie roślin truskawki

Doświadczenie I

W doświadczeniu wykorzystywano truskawki odmiany Matis posadzone 22 kwietnia 2020 i przechowywane w warunkach naturalnych. Dokonano analizy substancji lotnych obecnych w glebie dla następujących wariantów:

- gleby jałowej
- gleby niejałowej
- truskawki w glebie
- truskawki w glebie z pędrakami (analiza po 1, 2 i 3 tygodniach od umieszczenia pędraków w glebie)
- pędraków głodnych nieżerujących w glebie
- sadzonki ziemniaka w glebie

Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Do analizy wykorzystano technikę Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE, Twister PDMS firmy Gerstel (<https://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>) sorbent umieszczony na szklanym rdzeniu. Za każdym razem sorbent umieszczono w 5 cm dołku w doniczce/pojemniku i pozostawiono na 24 godziny, po tym czasie dokonano termicznej desorpcji analitów. Program temperaturowy desorbera: od 50°C do 240°C z narostem temperatury 6°C/sekundę. Próbkę desorbowaną była z przepływem gazu nośnego 50ml/min. Anality osadzane były na węglu aktywnym umieszczonym w linerze dozownika chromatografu gazowego (CIS4, Gerstel) i chłodzone do -30°C. Analizy wykonano na aparacie GC-MS Pegasus 4D firmy Leco, na kolumnie Stabilwax-DA.

Wstępne analizy próbek gleby i sadzonek truskawek potwierdziły możliwość detekcji związków emitowanych przez korzenie roślin. Sumarycznie zidentyfikowano 68 związków. W glebie sterylnej zidentyfikowano tylko 10 substancji lotnych, a więc pozostałe związki obecne i identyfikowane w glebie niesterylnej są wynikiem działalności mikroorganizmów glebowych.

Mikroorganizmy mogą więc być także w dużym stopniu odpowiedzialne za modulację zachowania innych organizmów (roślin i zwierząt, w tym owadów) bytujących w glebie. **W wyniku przeprowadzonych analiz wyselekcjonowano dwa związki, które mogą być emitowane przez korzenie truskawek, ponieważ nie występują one w próbkach gleby: bursztynian etylu i trans-cynamonian etylu.**

Analizy sadzonek truskawek z pędrakami i bez po: jednym, dwóch lub trzech tygodniach inkubacji larw z roślinami nie wykazały istotnych różnic w porównaniu do roślin kontrolnych. Z każdym tygodniem identyfikowano co prawda więcej związków lotnych, odpowiednio 13, 28 i 54 związki, jednak profile lotnych związków wydzielanych przez zdrowe truskawki i truskawki narażone na atak pędraków nie różniły się. Chociaż w pierwszym terminie przeprowadzonych obserwacji profile lotnych związków roślin z pędrakami i bez różniły się jednym związkiem (Formamide, N,N-dibutyl-), to nie potwierdziło się to w następnych obserwacjach. Generalnie jednak wydaje się, że korzenie

truskawki bez pędraków wydzielały więcej ilościowo poszczególnych związków niż korzenie truskawek z pędrakami odpowiednio w terminie pierwszym 10 związków i więcej o od 1,2% do 80,8%, w drugim 24 w zakresie od 7,1% do 68,8% i w trzecim 38 od 4,3% do 66,1%. Natomiast rośliny z pędrakami wydzielały ilościowo więcej 3 związki o od 2,0% do 13,6% (pierwszy termin), 4 związki od 17,9% do 66,2% (drugi) i 18 związków o od 0,7% do 62,4% (trzeci termin).

Analizy gleby z pędrakami niekarmionymi i karmionymi, gdzie zidentyfikowano w sumie 39 substancji lotnych, wykazały różnice przypadku dwóch związków obecnych w glebie z pędrakiem niekarmionym - 4,4-dimetylokrotonolaktanu i 4-terpineolu. Podobnie jak poprzednio odnotowano różnice ilościowe w wydzielaniu związków, w 30 przypadkach więcej związków lotnych wydzielały korzenie truskawki z pędrakami karmionymi o od 2,8% do 75,9%, a w pozostałych 9 przypadkach więcej związków wydzielały korzenie truskawki z pędrakami niekarmionymi o od 0,1% do 93,5%. W tym przypadku warto byłoby określić, jaką rolę pełnią te związki w roślinie. Można przypuszczać, że pędraki niekarmione szybciej atakowały rośliny i być może wydzielone związki większej ilości niż na innych roślinach są związkami należącymi do substancji obronnych i była to odpowiedź rośliny na pędraki.

Ze względu na to, że pędraki dość intensywnie żerowały na bulwach ziemniaków podawanych im w zachowawczej hodowli laboratoryjnej, zdecydowano o przeprowadzeniu badań związków lotnych wydzielanych przez korzenie roślin ziemniaków i porównanie ze związkami lotnymi wydzielanymi przez korzenie truskawki. W celu potencjalnej identyfikacji związków wydzielanych przez korzenie ziemniaka przeanalizowano także lotne metabolity obecne w glebie w trakcie hodowli ziemniaka. Doprowadziło to do identyfikacji 9 substancji spośród których sześć zidentyfikowano jako związki lotne obecne w glebie niesterylnej jak i glebie z truskawką, co sugeruje, że są to związki powszechnie występujące w glebie. Jedynie 3-metylofenol (m-krezol, środek, wykorzystywany do produkcji pestycydów) oraz kwas mirystynowy, 4-etylo-1,2-dimetoksybenzen (oba zidentyfikowane tylko w jednej z trzech próbek) były charakterystyczne tylko dla sadzonki ziemniaka. Nie można wykluczyć, że m-krezol pochodził z pozostałości pestycydów skumulowanych w glebie z poprzednich lat, w obecnym czasie w uprawie ziemniaka, z której pochodziły próbki nie stosowano żadnych pestycydów. Przykładowe chromatogramy z badań przedstawiono na Rysunku 3.

Wszystkie przeprowadzone analizy pokazały, że gleba stanowi środowisko niezwykle niejednorodne, co niekiedy przekłada się na dużą różnorodność pomiędzy powtórzeniami tego eksperymentu.

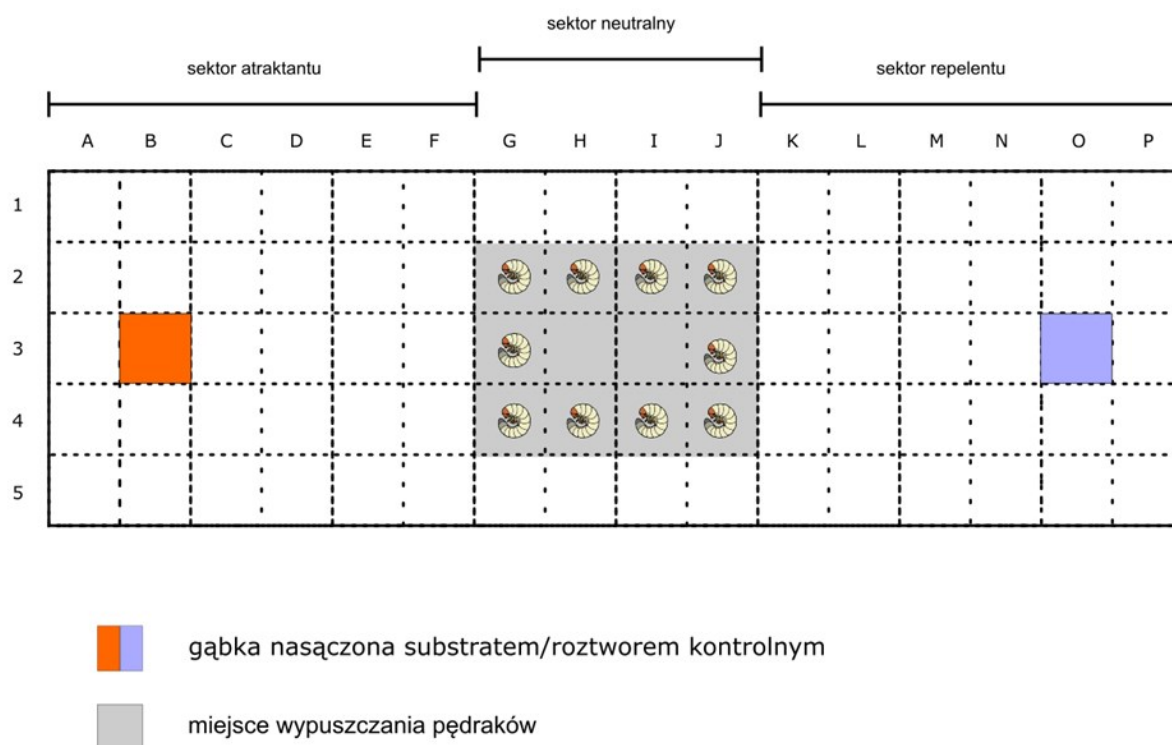
W związku z tym, najpierw postanowiono się skupić na analizie zachowania pędraków wobec jednego z pierwszych zdefiniowanych związków zidentyfikowanych w glebie, w której rosła zdrowa sadzonka truskawki, czyli **trans-cynamonianu etylu** oraz **eugenolu** - związku znanego z literatury jako atraktant dorosłych form różnych chrabąszczy.

Doświadczenie II

W celu oceny zachowania larw *Melolontha* spp. pod wpływem wytypowanych związków – trans-cynamonianu etylu oraz eugenolu wykorzystano specjalnie przygotowaną komorę o wymiarach 80 cm x 25 cm x 3 cm (długość x wysokość x głębokość), którą podzielono na kwadratowe segmenty o boku równym 5 cm (Rysunek 4.). Jednocześnie testowano

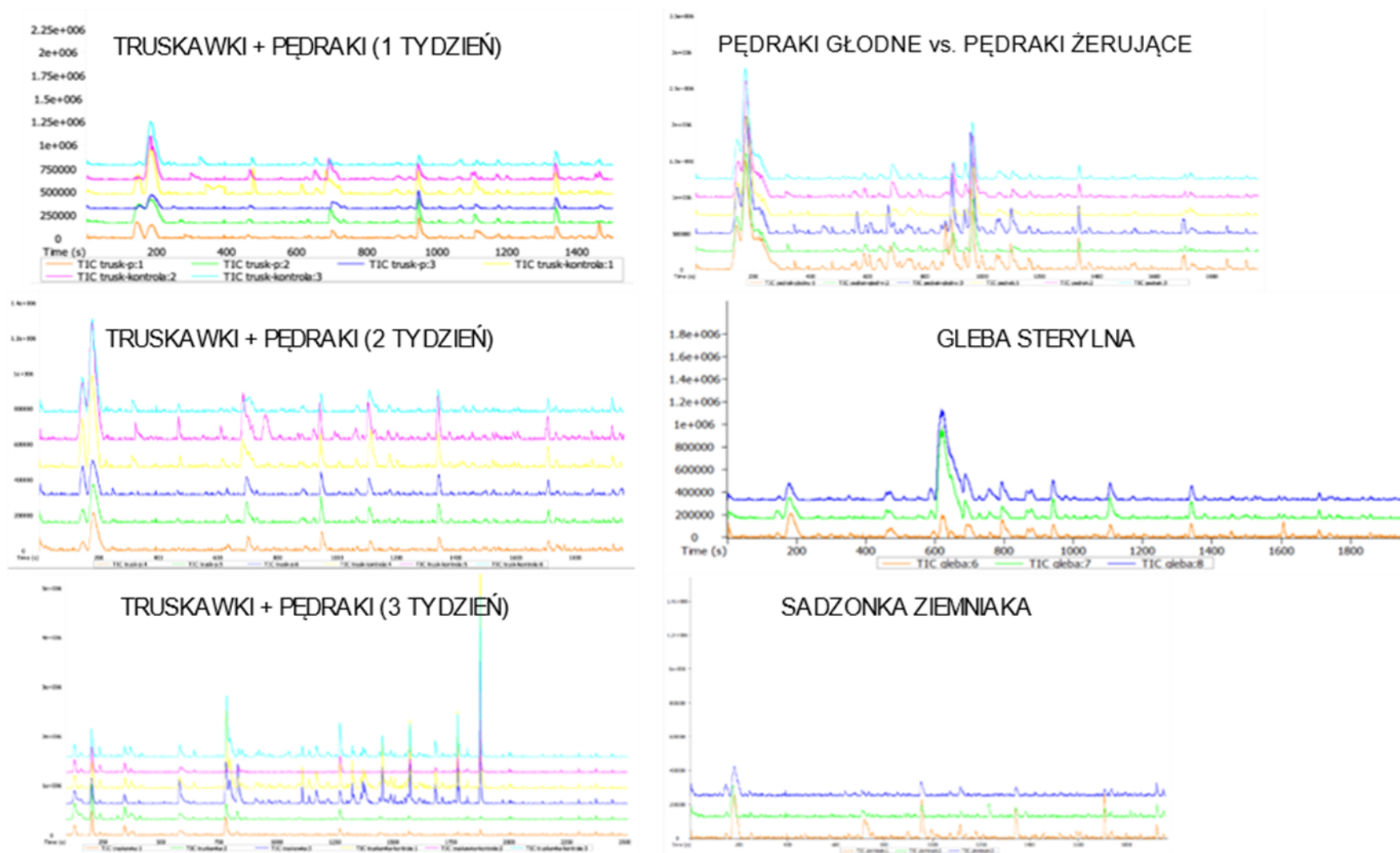
zachowanie 10 pędraków. Komorę wypełniano ziemią, a w segmentach oznaczonych odpowiednio B3 i O3 umieszczano gąbkę nasączoną 10 ml roztworu kontrolnego lub badanego (5% roztwór alkoholu lub 0,1% badanego związku w 5% alkoholu).

Pędraki umieszczano w obszarze neutralnym (kolumny G-J). Następnie doświadczenie prowadzono przez 3 godziny bądź przez 24 godziny w temperaturze pokojowej w ciemności. Po tym czasie odnotowywano położenie pędraków w komorze. Obecność pędraków w kolumnach A-F traktowano jako pozytywną reakcję na badany bodziec, zaś obecność w kolumnach K-P za negatywną reakcję na badany bodziec. Pędraki które znajdowały się na środku komory (kolumny G-J) traktowano przejaw neutralnej reakcji na badany związek.



Rysunek 4. Schemat komory do testowania zachowania pędraków chrabąszcza majowego.

Rysunek 3. Chromatogramy uzyskane podczas analizy substancji lotnych w glebie w wybranych warunkach eksperymentalnych.



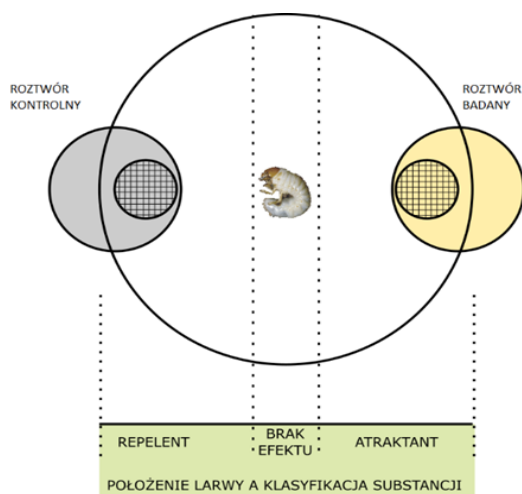
W doświadczeniu 3-godzinny przetestowano 40 osobników chrabąszcza majowego, w wariacie 24-godzinny 30 osobników. Wyniki przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Wyniki testów behawioralnych przeprowadzonych w komorze do badania wpływ eugenolu i cynamonianu etylu na zachowanie pędraków.

Liczba pędraków (wartość procentowa)			
Eugenol			
Wariant	Atraktant	Neutralny	Repelent
3 h (N=40)	14 (35,0%)	9 (22,5%)	17 (42,5%)
24 h (N=30)	6 (20,0%)	10 (33,3%)	14 (46,7%)
Cynamonian etylu			
Wariant	Atraktant	Neutralny	Repelent
3 h (N=40)	13 (32,5%)	18 (45,0%)	9 (22,5%)
24 h (N=30)	8 (26,7%)	8 (26,7%)	14 (46,7%)

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów nie można jednoznacznie zweryfikować wpływu badanych związków na zachowanie pędraków chrabąszcza majowego. Przeprowadzona analiza statystyczna w żadnym wypadku nie pozwala na stwierdzenie, że zachowanie pędraków nie ma charakteru losowego. Można jedynie próbować obserwować pewne łagodne trendy (negatywny wpływ eugenolu). Sama komora sprawdza się w podobnych eksperymentach badających wpływ dwutlenku węgla na zachowanie pędraków.

Drugie stosowane podejście polegało na testowaniu pojedynczych osobników chrabąszcza majowego w teście szalkowym. Do testu wykorzystano szalki plastikowe o średnicy 15 cm w których wieczku naprzeciw siebie przy brzegu szalki (w jednakowej odległości od środka szalki) wywiercono otwory o średnicy 25 mm, które następnie zabezpieczono siatką PCV (schemat na Rysunku 5). Szalki napełniano wilgotną ziemią. Na środku każdej z szalki, w metalowej klatce (3,0 cm x 3,0 cm x 1,8 cm) umieszczano pędraka chrabąszcza majowego (stadium L3).



Rysunek 5. Schemat testu szalkowego.

Po minimum 15 godzinnej inkubacji w ciemności w temperaturze około 22°C przystępowano do eksperymentu. Pędraka uwalniano z klatki, szlakę obracano do góry dnem, a pod otworami umieszczano mniejsze szalki (średnicy 55 mm) zawierające ok. 100 µl roztworu badanego związku lub roztworu kontrolnego (jak w eksperymencie z użyciem komory). Po trzygodzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji w ciemności w temperaturze 22°C odnotowywano pozycję pędraka i na jej podstawie określano stosunek larwy do badanego związku. Dla każdego związku przebadano odpowiedź 42 pędraków chrabąszcza. Wyniki doświadczeń podsumowano w Tabeli 19.

Tabela 19. Wyniki testów szalkowych dla cynamonianu etylu oraz eugenolu.

Liczba pędraków (wartość procentowa)			
Cynamonian etylu			
Wariant	Atraktant	Obojętny	Repellent
3 h	19 (45,24%)	16 (38,10%)	7 (16,67%)
24 h	14 (33,33%)	19 (45,24%)	9 (21,43%)
Eugenol			
Wariant	Atraktant	Obojętny	Repellent
3 h	12 (28,57%)	12 (28,57%)	18 (42,86%)
24 h	18 (42,86%)	11 (26,19%)	13 (30,95%)

Uzyskane wyniki, podobnie jak w testach z użyciem komory, nie pozwalają na jednoznaczne określenie wpływu badanych związków na zachowanie pędraków chrabąszcza majowego. Widać różnice pomiędzy odpowiedzią krótkotrwałą (3 h) a nocną inkubacją (24 h) w środowisku z badanym związkiem. Nie można jednak, ponownie, wykluczyć wpływu przypadkowości na wyniki doświadczenia. Niemniej jednak, można mówić o pewnym trendzie, który powoduje wzmożony ruch pędraków w stronę źródła cynamonianu etylu. Zastanawiający jest fakt dużej liczebności grupy pędraków, która ostatecznie nie podjęła decyzji. Może być to związane ze źle dobranym stężeniem testowanych związków lub ze złą kondycją fizjologiczną pędraków, na co nie mamy do końca wpływu.

PODSUMOWANIE

Z wyników przeprowadzonych badań wynika, że różne wyciągi roślinne mogą różnie oddziaływać na rośliny, mogą hamować lub stymulować wzrost różnych ich organów. W pierwszym etapie prowadzonych badań przetestowano 5 roztworów i 5 odmian roślin truskawek. Już po wykonaniu analizy zawartości makro- i mikro elementów stwierdzono, że wyciąg z koszyczka nagietka był najbardziej zasobny w te związki. Badania bezpośredniego wpływu tych wyciągów na różne odmiany truskawki wykazały różnice między innymi w ogólnej masie roślin i w masie systemu korzeniowego.

Analiza takich parametrów jak długość systemu korzeniowego, średnia powierzchnia systemu korzeniowego, średnia średnica systemu korzeniowego, objętość systemu korzeniowego oraz liczba wierzchołków korzeni w programie WinRHIZO również wskazuje na różnice w reakcji

odmian truskawki w biostymulacji ich korzeni badanymi roztworami roślinnymi. Wydaje się, że najlepiej na biostymulację reagowała odmiana Florence. Ze względu na dużą zmienność obserwowanych reakcji wskazane wydaje się powtórzenie doświadczenia na większą skalę, w przyszłości także polową oraz rozszerzenie portfolio badanych odmian. Niemniej jednak dotychczasowe wyniki pokazują duży potencjał ekstraktów roślinnych jako naturalnych stymulatorów wzrostu roślin truskawki. Wykształcenie efektywnego systemu korzeniowego powoduje zwiększenie możliwości pobierania z gleby składników pokarmowych czy wody (może w pewnym stopniu zabezpieczać przed stresem suszy), co jest pierwszym krokiem do zwiększenia przyszłych plonów, co może być ważne z punktu widzenia plantatora.

Określono również skład metabolitów wtórnych w roślinach 5 odmian truskawki podlewanych wyciągiem z mniszka lekarskiego. Tak jak w poprzednim roku, tak i w tym roku stwierdzono na przykład 2-3-krotnie wyższą zawartość fenoli w korzeniach, niż w liściach. Wyników tych badań wykazują, że podlewanie ekstraktem z mniszka może wpływać zarówno w liściach, jak i korzeniach, na wzrost zawartości związków triterpenoidowych, które uważane są za metabolity wyspecjalizowane, zaangażowane w chemiczną odpowiedź obronną roślin. Podobnie jak w przypadku wyników z poprzedniego doświadczenia, w przypadku wyciągu z mniszka stwierdzono różną reakcję odmian truskawek na biostymulację tym ekstraktem.

Wykonanie analizy substancji lotnych wydzielanych przez korzenie roślin oraz przez samą glebę wykazało tylko różnicę 2 związków (bursztynian etylu i trans-cynamonian etylu) między tłem substancji wydzielanych przez korzenie roślin a samą glebą. Analiza tych substancji w korzeniach roślin z pędrakami i bez nich nie wykazała istotnych różnic między tymi dwoma kombinacjami. W analizie gleby z pędrakami niekarmionymi i karmionymi wykryto również różnicę 2 związków (4,4-dimetylokrotonolaktonu i 4-terpineolu), które wystąpiły w glebie z pędrakami niekarmionymi. Wszystkie przeprowadzone analizy pokazały, że gleba stanowi środowisko niezwykle niejednorodne. W przeprowadzonym dodatkowo badaniu zachowania larw *Melolontha* spp. pod wpływem wytypowanych związków – **trans-cynamonianu etylu** oraz **eugenolu**, nie można było jednoznacznie stwierdzić reakcji pędraków na te związki. Jednak przyczyną mogło być złe dobranie stężenia do stosowania. Można więc zakładać, że kluczowym elementem jest odnalezienie właściwego przedziału stężeń dla badanych związków. Wiadomo bowiem, że reakcja owadów na pewne substancje zależy właśnie od stężenia badanych związków.

1C. Monitoring występowania i możliwości ograniczania nasionnic na rokitniku, róży pomarszczonej i czereśni lub wiśni

W projekcie podjęto badania polegające na opracowaniu odpowiednich polskich atraktantów do odłowu różnych gatunków nasionnic oraz przeprowadzenie prób terenowych z wyselekcjonowanymi atraktantami.

Przygotowanie atraktantów do odławiania nasionnic

Na podstawie przeglądu publikacji dotyczących kompozycji oraz efektywności feromonów wabiących *Rhagoletis cerasi* oraz substancji zwiększających skuteczność odławiania utworzono 4 kompozycje nowych atraktantów wabiących. W oparciu o wyniki wstępnych testów mających na celu optymalizację formy użytkowej dyspenserów feromonowych, w eksperymentalnych produktach zastosowano ampulkę polimerową wraz z mineralnym nośnikiem w celu optymalizacji uwalniania substancji aktywnych i wydłużenia czasu efektywnej ekspozycji.



Fot. 12. Badane atraktanty

Systematyczny monitoring liczebności poszczególnych gatunków nasionnic oraz testy nowych atraktantów

Monitoring występowania nasionnic

Monitoring występowania nasionnic na różnych gatunkach roślin przeprowadzono w 3 sadach czereśniowych i w 3 sadach wiśniowych położonych w Polsce centralnej. Na 3 plantacjach róży pomarszczonej (1 plantacja Polska północno-zachodnia, 2 Polska wschodnia i 1 Polska południowo-zachodnia) oraz na 3 plantacjach rokitnika (1 Polska centralna, 1 Polska północna, 1 Polska wschodnia). W bieżącym sezonie monitorowano również obecność nasionnicy trześniówki na 2 plantacjach jagody kamczackiej, której larwy są notowane w owocach tej rośliny od kilku lat. Do monitorowania obecności nasionnic użyto żółtych pułapek lepowych. Wyniki zestawiono w Tabeli 20.

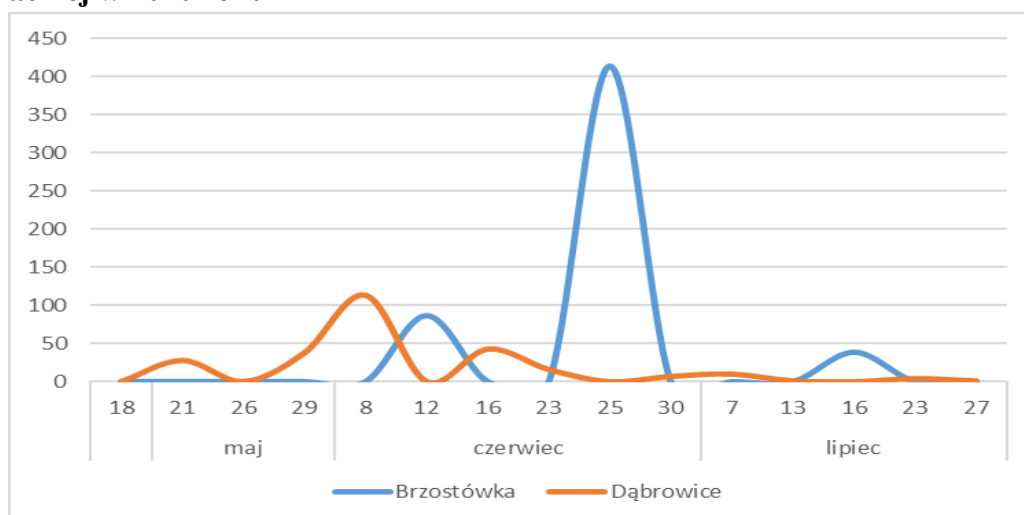
Tabela 20. Odłow różnych gatunków nasionnic w pułapki lepowe

	Rejon Polski	Początek lotu	Gatunek nasionnicy	Liczba odłowionych osobników
Czereśnia				
Dąbrowice	centralny	25.05	<i>R.cerasi</i>	258
		23.07	<i>R.cingulata</i>	5
Skierniewice	centralny	25.05	<i>R.cerasi</i>	435
		23.07	<i>R.cingulata</i>	1
Falbogi	centralny	18.05	<i>R.cerasi</i>	6
Wiśnia				
Dąbrowice	centralny	8.06	<i>R.cerasi</i>	52
		23.07	<i>R.cingulata</i>	3
Józefatów	centralny	8.06	<i>R.cerasi</i>	273
		23.07	<i>R.cingulata</i>	8

Dębowa Góra	centralny	8.06	<i>R.cerasi</i>	81
Rokitnik				
Przezmark	północny	20.06	<i>R.batava</i>	3455
Pereszczówka	wschodni	13.06	<i>R.batava</i>	1140
Dąbrowice	centralny	3.06	<i>R.batava</i>	87
Róża pomarszczona				
Dolice		-	<i>R.alternata</i>	0
Lądek Zdrój	południowo-zachodni	-	<i>R.alternata</i>	0
Koryciny I	wschodni	15.06	<i>R.alternata</i>	2
Koryciny II	wschodni	15.06	<i>R.alternata</i>	52

Na wiśni i czereśni, podobnie jak w latach ubiegłych, wystąpiły dwa gatunki nasionnic: *Rhagoletis cerasi* (nasionnica trześniówka) i *Rhagoletis cingulata* (nasionnica wschodnia). Ten drugi gatunek w obecnym sezonie wystąpił mniej licznie w obu uprawach. Muchy nasionnicy trześniówki na czereśni swój lot w Polsce centralnej rozpoczęły pod koniec maja, natomiast nasionnicy wschodniej na początku lipca. Na wiśni pierwsze muchy *R. cerasi* pokazały się na początku czerwca, natomiast *R.cingulata*, w zależności od sadu, na początku lipca (Tabela. 18). W obecnym sezonie odnotowano mniejszą liczebność nasionnicy różówki (*Rhagoletis alternata*), prawie we wszystkich rejonach objętych badaniami. Najwięcej much tego gatunku odłowiono we wschodnim rejonie kraju (Tabela 20). Praktycznie nie odłowiono much tego gatunku nasionnicy w lokalizacji Dolice oraz Lądek Zdrój. W tych lokalizacjach na plantacjach róży pomarszczonej prowadzono w ciągu 2-3 lat doświadczenia z masowym odłowem much tego gatunku nasionnicy. Można przypuszczać, że taka metoda może być skuteczna, ale musi być prowadzona przez kilka lat, w zależności od wielkości populacji. Podobnie jak w roku poprzednim, bardzo licznie wystąpiła nasionnica rokitnikowa (*Rhagoletis batava*), i to prawie na wszystkich plantacjach wytypowanych do badań. Jedynie na plantacji w Dąbrowicach odnotowano 67/pułpkę/sezon. Na pozostałych plantacjach odławiano średnio od 1140 do prawie 3500 szt. na pułpkę/sezon. (Tabela 20).

Wykres 8. Dynamika lotu nasionnicy trześniówki na dwóch plantacjach jagody kameczackiej w 2020 roku



W ramach projektu podjęto badania nad monitoringiem występowania na plantacjach jagody kamczackiej nasionnicy trześniówki. W zdecydowanej większości plantacje jagody kamczackiej prowadzone są w systemie ekologicznym. Jednak od kilku lat w owocach stwierdzano larwy. W obecnym sezonie ustalono, że są to larwy nasionnicy trześniówki i dlatego na 2 plantacjach wywieszono żółte pułapki lepowe. Jak wynika z Wykresu 8, podobnie jak na innych uprawach, nasionnica trześniówka na plantacjach jagody kamczackiej swój lot rozpoczyna w zależności od regionu. W lokalizacji Dąbrowice (Polska centralna) pierwsze muchy pojawiły się ok. 18 maja, a w lokalizacji Brzostówka (Polska wschodnia) koło 8 czerwca. Zanotowano również różnice w intensywności lotu oraz wielkości populacji.

Badanie skuteczności nowych atraktantów

W projekcie badano atraktanty do odłowu różnych gatunków nasionnic w celu wyselekcjonowania najlepszego, który może być użyty do masowych odłowów tych szkodników. Do badania stosowano przygotowane wcześniej atraktanty: 1A1, 2B1, 1B1, 2B1 jako produkt referencyjny zastosowano atraktant dla *Ceratitis capitata* (firmy ProboDelt) oraz pułapkę butelkową z 4% roztworem nawozu NP+S na bazie fosforanu amonu. Atraktanty testowano z różnymi pułapkami: pułapka lepowa, pułapka kubelkowa (wypełniona 4% roztworem nawozu NP+S na bazie fosforanu amonu - czynniki zabijający), pułapka stożkowa (czynnik zabijający – pyretroid w wieczku pułapki). Pułapki stosowano w tych samych sadach i plantacjach (oprócz jagody kamczackiej), w których prowadzono monitoring występowania. Wyniki zestawiono w Tabelach 21-24.

Tabela 21. Odłowy much *R. cerasi* i *R. cingulata* na czereśnia w zależności od typu pułapki i atraktantu

Rodzaj pułapki	Atraktant	Liczba odłowionych much średnio na 1 pułapkę				
		Dąbrowice		Skierniewice		Falbogi
		<i>R.cerasi</i>	<i>R.cingulata</i>	<i>R.cerasi</i>	<i>R.cingulata</i>	<i>R.cerasi</i>
Butelkowa		8	1	301		5
Lepowa		229		435	1	6
Lepowa z	1A1	38		504	2	1
	1B1	89		433		17
	2A1	174		347		2
	2B1	125		242		2
Stożkowa	referencyjny	36		294	1	0
Stożkowa z	1A1	23		104		0
	1B1	13		76		0
	2A1	31		212	0	0
	2B1	8		66		0
Kubelkowa		33	7			
Kubelkowa z	1A1	27	1			
	1B1	135	17			
	2A1	60	11			
	2B1	32	10			

Wszystkie badane atraktanty ze wszystkimi typami pułapek odławiały muchy *R. cerasi* i *R. cingulata* na czereśni, jednak nie wszystkie w takiej samej liczbie i różnie w różnych sadach. W sadzie czereśniowym w Dąbrowicach z nowych atraktantów najlepiej *R. cerasi* odławiał atraktant 2A1 z pułapką lepową, ale trochę mniej odłowił atraktant 1B1 z pułapką kubelkową, natomiast ten właśnie atraktant odławiał najwięcej *R. cingulata* z pułapką kubelkową w tym sadzie. W pozostałych sadach największą liczbę much *R. cerasi* odłowili 1A1 i 1B1. Chociaż w lokalizacji Skierniewice równie dobrze muchy tego gatunku odławiał 1B1. Wszystkie wymienione atraktanty odławiały lepiej niż atraktanty referencyjne (produkt komercyjny i przygotowany samodzielnie), ale w lokalizacji Dąbrowice nieco więcej odловиła sama pułapka lepowa.

Tabela 22. Odłowu much *R. cerasi* i *R. cingulata* na wiśni w zależności od typu pułapki i atraktantu

Rodzaj pułapki	Atraktant	Liczba odłowionych much średnio na 1 pułapkę					
		Dąbrowice		Józefatów		Dębowa Góra	
		<i>R.cerasi</i>	<i>R.cingulata</i>	<i>R.cerasi</i>	<i>R.cingulata</i>	<i>R.cerasi</i>	<i>R.cingulata</i>
Butelkowa		14		20	12	12	
Lepowa		52	3	273	8	81	
Lepowa z	1A1	69		115	5	129	
	1B1	44		92	3	41	
	2A1	107		121	8	123	
	2B1	65		58	2	82	
Stożkowa	referencyjny	43		59	32	15	
Stożkowa z	1A1	4		40	2	15	
	1B1	18		30	4	16	
	2A1	13		28	0	3	
	2B1	23		25	1	10	
Kubelkowa				65	74		
Kubelkowa z	1A1			155	147		
	1B1			117	53		
	2A1			83	68		
	2B1			56	95		

Na wiśni, podobnie jak na czereśni, wszystkie atraktanty odławiały nasionnice *R. cerasi*. W lokalizacji Dąbrowice najwięcej odłowił atraktant 2A1 z pułapką lepową. Natomiast w lokalizacji Józefatów atraktant 1A1 z pułapką kubelkową, nieco mniej atraktant 1A1, a w trzeciej lokalizacji Dębowa Góra atraktant 1A1 i 2A1. *R.cingulata* w lokalizacji Józefatów odławiał atraktant 1A1 z pułapką kubelkową. Ogólnie, nasionnica wschodnia odławiała się zdecydowanie lepiej w pułapki kubelkowe, zarówno na czereśni jak i na wiśni. Być może spowodowane było to tym, że w pułapkach kubelkowych jako czynniki zabijający zastosowany był, podobnie jak w pułapkach butelkowych, wodny roztwór nawozu fosforo-amonowego.

Tabela 23. Odłowu much *R. alternata* na róży pomarszczonej w zależności od typu pułapki i atraktantu

Rodzaj pułapki	Atraktant	Liczba odłowionych much/ 1 pułapkę		
		Lądek Zdrój	Koryciny I	Koryciny II
Butelkowa				2
Lepowa			2	52
Lepowa z	1A1		19	19
	1B1		9	51
	2A1		3	27
	2B1		3	30
Stożkowa	referencyjny		1	2
Stożkowa z	1A1	1	4	0
	1B1		3	0
	2A1	2	0	0
	2B1		5	4
Kubelkowa			4	
Kubelkowa z	1A1		0	
	1B1		28	
	2A1		4	
	2B1		0	

W obecnym sezonie wegetacyjnym odnotowano bardzo słaby wylot much nasionnicy różówki (*R. alternata*) we wszystkich lokalizacjach, w których prowadzono badania. Tym niemniej w lokalizacji Koryciny I i II z pułapką lepową nasionnicę różówkę dobrze odławiał atraktant 1A1 i 1B1. Ten ostatni atraktant odławiał również dobrze ten gatunek z pułapką kubelkową.

Tabela 24. Odłowu much *R.batava* na rokitniku w zależności od typu pułapki i atraktantu

Rodzaj pułapki	Atraktant	Liczba odłowionych much/ 1 pułapkę		
		Pereszczówka	Przezmark	Dąbrowice
Butelkowa		18	54	21
Lepowa		1140	3455	87
Lepowa z	1A1	1279	633	44
	1B1	1332	2510	30
	2A1	970	2263	169
	2B1	1448	1356	108
Stożkowa	referencyjny	75	175	4
Stożkowa z	1A1	25	4	4
	1B1	165	12	12
	2A1	126	7	7
	2B1	116	4	4
Kubelkowa		191	296	
Kubelkowa z	1A1	118	342	

	1B1	23	404	
	2A1	70	318	
	2B1	47	328	

Na rokitniku muchy *R. batava* w lokalizacji Pereszczówka najlepiej odławiał atraktant 2B1 z pułapką lepową, nieco mniej, ale nadal lepiej niż sama pułapka lepowa, 1A1 i 1B1, również lepiej niż atraktant referencyjny odławiał atraktant 1B1, 2A1 i 2B1 z pułapkami stożkowymi. W lokalizacji Przezmark dobrze odławiał 1B1 i 2A1, ale odłowił nieco mniej, niż sama pułapka lepowa, ale w tej lokalizacji wszystkie atraktanty zastosowane z pułapką kubelkową odławiały lepiej, niż sama pułapka kubelkowa. W lokalizacji Dąbrowice najlepiej odławiał atraktant 2A1, a nieco słabiej 2B1 z pułapką lepową, lepiej niż sama pułapka lepowa.

Tabela 25. Efektywność badanych atraktantów

	Gatunek nasionnicy	Liczba odłowionych much/średnio na atraktant/sezon					
		referencyjny	nawóz	1A1	1B1	2A1	2B1
Czereśnie							
Dąbrowice	<i>R.cerasi</i>	36	33	29,3	79	88,3	55
	<i>R.cingulata</i>	0	7	1	17	11	10
Skierniewice	<i>R.cerasi</i>	294	0	304	254,5	279,5	154
	<i>R.cingulata</i>	1	0	2	0	0	0
Falbogi	<i>R.cerasi</i>	0	0	0,5	8,5	1	1
Wiśnie							
Dąbrowice	<i>R.cerasi</i>	43	0	36,5	31	60	44
Józefatów	<i>R.cerasi</i>	59	65	103,3	79,7	77,3	46,3
	<i>R.cingulata</i>	32	74	51,3	20	25,3	32,7
Dębowa Góra	<i>R.cerasi</i>	15	0	72	28,5	63	46
Rokitnik							
Dąbrowice	<i>R. batava</i>	4	0	24	21	88	56
Pereszczówka	<i>R. batava</i>	75	191	474	506,7	388,7	537
Przezmark	<i>R. batava</i>	175	296	369,3	1021,7	901,7	654,3
Róża pomarszczona							
Lądek Zdrój	<i>R. alternata</i>	0	0	1	0	2	0
Koryciny	<i>R. alternata</i>	3	4	8,6	19,4	7,9	9,8

Sumując odłowienia dla każdego atraktantu niezależnie od zastosowanej pułapki można stwierdzić, że większość z badanych atraktantów odławiała lepiej prawie wszystkie gatunki nasionnic, niż atraktant referencyjny i pułapka nawozowa. Szczególnie efektywnie badane atraktanty odławiały *R. batava* na rokitniku. Jednak trudno jest jednoznacznie określić zestaw pułapka-atraktant dla każdego z gatunku nasionnicy. Dalsze badania powinny być prowadzone w kierunku ustalenia najbardziej optymalnego komponentu dla poszczególnych gatunków nasionnic oraz optymalizacji składu i uwalniania atraktantu.

Zastosowanie gotowych produktów do ograniczania populacji

W tym sezonie wykonano doświadczenie polegające na zastosowaniu olejków: goździkowym, anyżowym lub cynamonowym do zwalczania much nasionnicy rokitnikowej. Podczas lotu much wykonano 3 zabiegi zwalczające w dniach: 8.07.20, 17.07.20 i 27.07.20. opryskiwaczem motoro-plecakowym Stihl zużywając 750 l cieczy roboczej na 1 ha. Jedną z kombinacji było również zastosowanie olejku goździkowego wraz z pułapkami stożkowymi (gotowy produkt handlowy – firmy Probodelt). W dwóch lokalizacjach Przezmark i Pereszczówka do masowych odłowów much *R.batava* oraz w lokalizacji Dolice do odłowu *R.alternata* zastosowano pułapki komercyjne firmy Probodelt i pułapki butelkowe z 4% roztworem nawozu fosforo-amonowego. Doświadczenia wykonano metodą bloków losowych w dwóch powtórzeniach. Oceny skuteczności dokonano podczas zbioru owoców 12.08.2020 roku. Wyniki zestawiono w Tabeli 26.

Tabela. 26. Efektywność zastosowanych metod ograniczania much *R.batava* na rokitniku i *R.alternata* na róży pomarszczonej

	Liczba odłowionych much/pułapkę/sezon	Liczba uszkodzonych owoców (w próbie 100 szt.)
Przezmark I - rokitnik		
Pułapki stożkowe + olejek goździkowy	327,1	75,1
Pułapki stożkowe	139,8	56,1
Olejek goździkowy	268,5???	73,9
Olejek anyżowy		72,0
Olejek cynamonowy		85,5
Kontrola		92,7
Przezmark II - rokitnik		
Stożkowe	228,1	70,9
Butelkowe	238,1	75,0
Kontrola		95,2
Pereszczówka – rokitnik		
Stożkowe	101,4	52,5
Butelkowe	56,9	70,2
Kontrola		93,5
Dolice – róża pomarszczona		
Stożkowa	0,8	0,0
Butelkowe	0,0	0,0
Kontrola		1,0

Z analizy wyników można stwierdzić, że zastosowanie olejku goździkowego i pułapek stożkowych, mimo że zwiększyło liczbę odłowionych much prawie dwukrotnie w stosunku do stosowania samych pułapek, to nie miało to odzwierciedlenia w liczbie uszkodzonych owoców. Zastosowanie oleju anyżowego i cynamonowego ograniczyło liczbę uszkodzonych owoców w stosunku do owoców uszkodzonych w kontroli, ale ich skuteczność nie była wystarczająca. Podobnie pułapki stożkowe i butelkowe zastosowane do masowych odłowów

much dość skutecznie odławiały muchy nasionnicy *R.batava* i na tych poletkach stwierdzono mniej uszkodzonych owoców przez tego szkodnika, ale skuteczność była jeszcze nie wystarczająca.

PODSUMOWANIE

Badania w tej części projektu koncentrowały się głównie na prowadzeniu monitoringu nasionnic na różnych uprawach oraz na ocenie nowych polskich atraktantów do odłowu osobników dorosłych czyli muchówek nasionnic.

Monitoring prowadzony w tym roku potwierdził obecność nasionnicy trześniówki i nasionnicy wschodniej na wiśni i czereśni, nasionnicy rokitnikowej na rokitniku i nasionnicy różówki na róży pomarszczonej. Po raz pierwszy w tym sezonie zanotowano muchy nasionnicy trześniówki na plantacjach jagody kamiczackiej.

Podobnie jak w poprzednich latach, odnotowano różnice w rozpoczęciu lotu osobników dorosłych, zarówno w zależności od gatunku nasionnicy jak i regionu kraju oraz w liczebnościach populacji. Najliczniej występowała nasionnica rokitnikowa na rokitniku.

Na dwóch plantacjach róży pomarszczonej, na których prowadzono monitoring nasionnicy różówki stwierdzono bardzo niską populację lub wręcz jej nieobecność. Jednak w tych lokalizacjach na plantacjach róży pomarszczonej prowadzono w ciągu 2-3 lat doświadczenia z masowym odłowem much tego gatunku nasionnicy. Można przypuszczać, że taka metoda może być skuteczna, ale musi być prowadzona przez kilka lat, w zależności od wielkości populacji.

Nadrzędnym celem tej części projektu była ocena nowych polskich atraktantów w efektywności odławiania muchówek nasionnic. Wszystkie przygotowane i badane w tym sezonie atraktanty odławiały wszystkie gatunki nasionnic, ale z różną intensywnością. Zastosowanie ich z różnymi rodzajami pułapek spowodowało, że niektóre z nich odławiały lepiej niż produkt referencyjny (atraktant firmy Probodelt). Po ustaleniu w dalszych badaniach najbardziej optymalnego komponentu dla poszczególnych gatunków nasionnic oraz optymalizacji składu i uwalniania atraktantu, mogą być wykorzystywane do masowych odłowów.

Zastosowanie pułapek do masowych odłowów pułapki stożkowej - komercyjny produkt, jak i pułapek butelkowych z 4% roztworem nawozu fosforo-amonowego - przygotowane samodzielnie poprzez odławianie osobników dorosłych ograniczyło liczbę uszkodzonych owoców na rokitniku, ale nadal na obu plantacjach, gdzie prowadzono badania nie było ono wystarczające. Wynikać to może również z tego, że na obu plantacjach populacje tego szkodnika są bardzo wysokie i ich ograniczenie stosując tę metodę musi być prowadzone przez kilka lat, wspierane innymi metodami. Po stosowaniu metody masowych odłowów na jednej z plantacji róży pomarszczonej w obecnym sezonie praktycznie nie odnotowano w pułapkach much tego gatunku, ani uszkodzonych owoców.

Zastosowanie olejków anyżowego, cynamonowego i goździkowego w formie rozpuszczonego w wodzie do zwalczania (odstraszania) much nasionnicy rokitnikowej nie przyniosło oczekiwanych rezultatów – notowano duży procent uszkodzonych owoców na tych poletkach. Jednak mogła się do tego przyczynić trudność rozpuszczenia olejków w wodzie podczas przygotowania cieczy użytkowej. Pewnym rozwiązaniem, w kierunku

którego powinno prowadzić się dalsze badania są ciecze nanodyspersyjne, które zapewniają dobrą rozpuszczalność olejku w wodzie.

Zastosowanie równocześnie na poletkach pułapek do masowych odłowów (produkt komercyjny) i olejku goździkowego przyczyniło się do odłowienia większej liczby much nasionnicy rokitnikowej, jednak nadal na tych poletkach notowano wysoki procent uszkodzonych owoców. Być może zwiększenie stężenia zastosowanego olejku mogłoby spowodować, że muchy częściej i trafniej wybierałyby pułapki niż owoce. Jednak wymaga to dalszych badań, również laboratoryjnych.

1D. Monitoring występowania i możliwości ograniczania mszyc i muszki plamoskrzydłej na czereśni lub wiśni i malinie

W tym celu zostały wyznaczone: 1 sad czereśniowy do monitoringu mszycy czereśniowej oraz 3 plantacje maliny do monitoringu mszycy występującej na malinie oraz muszki plamoskrzydłej (*Drosophila suzukii*) za pomocą pułapek z atraktantem. Przeprowadzono również testy allelopatii olejków eterycznych względem osobników dorosłych muszki plamoskrzydłej. Ze względu na to iż w sezonie wegetacyjnym na obserwowanych plantacjach maliny nie wystąpiły mszyce, przeprowadzono dodatkowe doświadczenie laboratoryjne na mszycy jabłoniowo-babkowej.

Mszyce

W celu określenia skuteczności biopreparatów w zwalczaniu mszyc wykonano dwa doświadczenia: jedno laboratoryjne (mszyca jabłoniowo-babkowa) i drugie polowe (mszyca czereśniowa)

Doświadczenie laboratoryjne

Badania laboratoryjne były prowadzone w kontrolowanych warunkach temperatury (200C), wilgotności (65%) i fotoperiodu (16D:8N). Przed założeniem doświadczenia z kwatery jabłoni odm. Jonagold pobrano długopędy zasiedlone przez mszycę jabłoniowo-babkową, a także liście bez widocznych oznak uszkodzeń przez choroby i szkodniki. Pobrane próbki długopędów i liści przewieziono następnie do laboratorium. Liście zostały umieszczone na wilgotnej wacie w szalkach Petriego o średnicy 10 cm. Następnie z pobranych długopędów delikatnie przeniesiono na liście mszycę jabłoniowo-babkową. Jedną kombinację doświadczalną stanowiły 3 szalki. W każdej szalce znajdował się 1 liść z naniesionymi mszycami. Następnie krążki opryskano w wieży Pottera wodnymi roztworami preparatów zużywając 2 ml cieczy roboczej na szalkę. Kombinację kontrolną stanowiły liście opryskane wodą wraz z naniesionymi na nie mszycami. W celu określenia wpływu preparatów na przeżywalność mszycy jabłoniowo-babkowej przez 7 kolejnych dni po aplikacji liczono na liściach żywe mszyce.

W doświadczeniu aplikowano następujące środki biologiczne: Tandexir Plus – wyciąg z czosnku z olejem mineralnym, Palizin – mydło ogrodnicze z olejem kokosowym i alkoholem amidowym (gotowe produkty), Limocide (60 g/l olejku pomarańczowego), Olejek cynamonowy, Olejek anyżowy, Olejek goździkowy, Mydło Himal (20% mydła potasowego). Uzyskane wyniki (Tabela 27) opracowano statystycznie przy użyciu Anova, $\alpha=0,05$; testu

Tukeya dla obliczenia różnic pomiędzy średnimi. Zastosowano transformację $y=\log(x+1)$ dla terminu 3 DAA, pozostałe terminy Anova bez transformacji. Jednorodność wariancji sprawdzona została testem Cochra i Bartletta. Skuteczność zastosowanych preparatów oceniono według wzoru Abbota.

Tabela 27. Wpływ wybranych środków na przeżywalność mszycy jabłoniowo-babkowej (stadia larwalne).

Kombinacje (stężenie w %)	Liczebność mszyc na jednym liściu			Skuteczność wg. wzoru Abbota (%)	
	przed aplikacją 10.06.20	3 DAA* 13.06.20	7 DAA 17.06.20	3 DAA 13.06.20	7 DAA 17.06.20
Kontrolna	53,7 a	49,0 f	3,0 b	-	-
Tondexir Plus (0,25)	57,0 a	32,0 de	0,7 ab	34,7	82,2
Palizin (0,2)	52,3 a	0,0 a	0,0 a	100,0	100,0
Limocide (0,2)	52,7 a	5,7 b	0,0 a	88,5	100,0
Olejek cytrynowy (0,1)	54,0 a	42,0 ef	1,7 ab	13,6	57,8
Olejek anyżowy (0,1)	55,0 a	39,7 ef	1,3 ab	17,1	33,3
Olejek goździkowy (0,1)	58,7 a	47,7 f	0,3 ab	3,4	88,9
Mydło ogrodnicze (2,0)	56,7 a	23,0 cd	0,0 a	52,1	100,0

*dni po aplikacji

W doświadczeniu laboratoryjnym najwyższą skuteczność obserwowano na liściach opryskanych preparatem Palizin (100% śmiertelności w 3 dniu po aplikacji). Podobnie wysoką efektywność działania obserwowano na liściach opryskanych preparatem Limocide (od 88,5% w 3 DAA do 100% w 7 DAA). Nieznacznie słabszą skuteczność notowano po zastosowaniu mydła ogrodniczego. W zależności od terminu obserwacji i u wahala się ona od 52,1% w 3 DAA do 100% w 7 DAA. Tondexir Plus oraz olejek goździkowy wykazywały początkowo słabe działanie na wzrost śmiertelności mszyc, ale w 7 DAA ich skuteczność wyniosła ponad 80%. Natomiast zdecydowanie najwięcej żywych mszyc obserwowano na krążkach opryskanych olejkiem cytrynowym (57,8% skuteczności w 7 DAA) oraz olejkiem anyżowym (33,3% skuteczności w 7 DAA) (Tabela 27).

Doświadczenie polowe

Doświadczenie wykonano w ekologicznym sadzie IO w Nowym Dworze na 17-letnich drzewach czereśni rosnących w rozstawie 7x4,5 m. Po pojawieniu się w sadzie mszyc zostały wykonane 3 opryskiwania w odstępach tygodniowych (18.05; 25.05; 1.06.2020 roku). Zabieg wykonano opryskiwaczem ciągnikowym zużywając ok. 700 l cieczy roboczej na ha. W doświadczeniu zastosowano nowe biopreparaty: Tandexir Plus – wyciąg z czosnku z olejem mineralnym oraz Palizin – mydło ogrodnicze z olejem kokosowym i alkoholem amidowym (oba produkty gotowe). Oceny skuteczności zabiegów dokonywano w terminie T0 – przed pierwszym zabiegiem, następnie przed każdym kolejnym zabiegiem (T1 i T2) oraz po

ostatnim zabiegu (T3) licząc kolonie z żywymi mszycami. Następnie obliczono różnicę między poszczególnymi terminami tak zwany przyrost kolonii mszyc. Wyniki zestawiono w Tabeli 28.

Tabela 28. Efektywność zastosowanych biopreparatów do zwalczania mszycy czereśniowej na czereśni

Kombinacja	Stężenie [%]	Liczba kolonii z mszycami				Przyrost kolonii mszyc między obserwacjami		
		T0	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Kontrolna	-	17	32	50	156	15	18	106
Tandexir Plus	0,25	19	47	75	163	28	28	88
Palizin	0,15	20	23	41	57	3	18	16

Jak wynika z tabeli efektywniejszy okazał się produkt zawierający mydło ogrodnicze i olej kokosowy we wszystkich terminach obserwacji przyrost kolonii mszyc na poletkach z tym produktem był równy lub mniejszy 5-6 krotnie niż na poletkach kontrolnych. Natomiast na poletkach, gdzie zastosowano drugi produkt oparty na wyciągu z czosnku z olejem mineralnym, tylko w ostatniej obserwacji przyrost kolonii mszyc był mniejszy niż na poletkach kontrolnych.

Muszka plamoskrzydła

Monitoring występowania

Monitoring muszki plamoskrzydłej (*Drosophila suzukii*) prowadzono w 5 lokalizacjach w trzech sadach czereśniowych i dwóch wiśniowych. Sady były zlokalizowane w województwie kujawsko-pomorskim tj. w miejscowościach Kcynia, Złotniki Kujawskie, Sicienko, Włocławek i Łobżenica. Obiekty doświadczalne miały wielkość od 3,5 do 12,5 ha. Monitoring muszki plamoskrzydłej (*Drosophila suzukii*) prowadzono w 3 lokalizacjach na plantacjach malin. Plantacje były zlokalizowane w województwie łódzkim tj. w miejscowościach Jasień (Glen Ample), Lnisno (Glen Ample) i Skierniewice (Polka). Obiekty doświadczalne miały wielkość od 0,2 do 1,8 ha. Pułapki z atraktantem zapachowych zawieszono na czereśni i wiśni na początku czerwca, a malin na początku lipca, na obrzeżach sadów lub plantacji. Kontrolowano je 2-3 razy w miesiącu, precedzając przez sitko odłowione owady i przesyłano je do Instytutu Ogrodnictwa w celu identyfikacji gatunkowej.

Tabela 29. Odłowy muchówek muszki plamoskrzydłej w poszczególnych lokalizacjach.

Miesiące	Kcynia (czereśnia)	Złotniki Kujawskie (czereśnia)	Sicienko (czereśnia)	Włocławek (wiśnia)	Łobżenica (wiśnia)
Czerwiec	9	3	0	0	0
Lipiec	255	198	152	56	48
Sierpień	985	699	559	452	359
Wrzesień	325	258	128	356	229
Październik	112	99	56	32	53
Listopad	0	0	0	0	0

Pierwsze odłowy muszki plamoskrzydłej miały miejsce w połowie czerwca w miejscowościach Kcynia i Złotniki Kujawskie. W pozostałych lokalizacjach pierwsze muchówki *D. suzukii* notowano w pułapkach na początku lipca. Szczyt odłowów szkodnika miał miejsce w sierpniu we wszystkich lokalizacjach (Tab. 29). Mimo zastosowania techniki masowego wylapywania muchówek notowano larwy w owocach, a straty w plonie wyniosły w zależności od odmiany od 10-30%.

Tabela 30. Odłowy muchówek muszki plamoskrzydłej w poszczególnych lokalizacjach.

Miesiące	Jasień	Lnisno	Skierniewice
Lipiec	0	0	0
Sierpień	32	0	0
Wrzesień	443	100	165
Październik	198	15	124

Pierwsze odłowy muchówek muszki plamoskrzydłej miały miejsce w połowie sierpnia w miejscowości Jasień. W pozostałych lokalizacjach muchówki *D. suzukii* notowano w pułapkach na początku września. Średnie ich odłowy wahały się od 8 do 198 na pułapkę na tydzień (Tabela 30). Najgorsza sytuacja była w miejscowości Jasień, gdzie na początku września przerwano zbiory przez to że niemal w każdym owocu notowano po kilka larw muszki plamoskrzydłej.

Zastosowanie gotowych produktów do ograniczania populacji

Oceniano wpływ wywarów z ziół: ziele rdestu ostrolistnego, liść mięty pieprzowej oraz olejku z drzewa herbacianego na intensywność składania jaj przez muchówki *Drosophila suzukii* do owoców borówki wysokiej odmiany ‘Bluecrop’ oraz olejku cynamonowego i goździkowego w formie cieczy nanodyspersyjnej na ciemnych owocach winorośli. Do badania wybrano owoce, które pozwoliły na wydłużenie obserwacji w czasie (owoce, które dłużej utrzymują jędrność skórki i są wytrzymalsze na procesy gnilne).

W pierwszym etapie z wyżej wymienionych ziół i olejku roślinnego przygotowano wywary, a z produktów gotowych (ciecze nanodyspersyjne) przygotowano odpowiednie (3%) stężenia. Następnie w laboratorium Zakładu Ochrony Roślin przed Szkodnikami (ZORpS) zanurzano owoce przez 3 sekundy. Zabiegi te wykonywano, gdy owoce (borówki wysokiej lub winorośli) były tuż przed osiągnięciem dojrzałości zbiorczej, a więc gdy stają się one atrakcyjne do składania w nie jaj przez muchówki *Drosophila suzukii* (borówka – 17.08.20 i winorośl – 28.09.20). Po wyjęciu owoców z przygotowanych cieczy pozostawiano je na 2h w celu odparowania cieczy (wyschnięcia), a następnie wykładano je na szalki Petriego i umieszczono w klatkach hodowlanych typu BugDorm do których wcześniej wpuszczono muchówki *D. suzukii* (5 samic i 5 samców). Doświadczenia założono w 4 powtórzeniach, po 1 klatce na powtórzenie. W każdej klatce znajdowały się po 10 sztuk owoców tj. traktowane wodą i pojedynczy badany produkt, aby muchówki miały wybór. Po 1, 3 i 4-5 dniach, owoce wyjmowano z klatek i liczono pod mikroskopem stereoskopowym złożone do nich jaja.

Tabela 31. Wpływ wywarów roślinnych na składanie jaj do owoców borówki wysokiej przez muchówki *Drosophila suzukii*. Skierniewice, 2020

Kombinacje	Liczba jaj na 1 owoc		
	po 1 dniu	po 3 dniach	po 5 dniach
Kontrolna	6,4	14,0	21,3
Ziela rdestu ostrolistnego (25 g/ 1,0l wody)	19,0	24,9	29,9
Kontrolna	7,7	9,9	13,2
Liść mięty pieprzowej (10 g/ 1,0l wody)	6,0	10,1	12,1
Kontrolna	12,3	20,9	27,6
Olejek z drzewa herbacianego (2 ml/1,0l wody)	0,0	0,2	0,9 b

Tabela 32. Wpływ olejku goździkowego i cynamonowego w formie cieczy nanodispersyjnej na składanie jaj do owoców winorośli

Kombinacje	Dawka	Liczba jaj na 1 owoc			
		po 1 dniu	po 2 dniach	po 3 dniach	po 5 dniach
Kontrolna	-	0,2	0,2	0,3	0,5
Olejek goździkowy	3%	0,0	0,1	0,1	0,1
Kontrolna	-	0,0	0,1	0,2	0,5
Olejek cynamonowy	3%	0,0	0,0	0,0	0,0

Na podstawie uzyskanych wyników badane produkty można by podzielić na grupy:

1. Przywabiające muchówki

Liczba jaj złożonych przez muchówki *Drosophila suzukii* do owoców borówki wysokiej po ich traktowaniu wywarem z ziela rdestu ostrolistnego była znacznie wyższa niż do owoców na kombinacji kontrolnej, traktowanych wodą. Uzyskane wyniki wskazują, że wywar z wymienionej rośliny może przywabić muchówki do owoców nimi traktowanych.

2. Obojętne dla muchówek

Liczba jaj złożonych do owoców traktowanych wywarem liści mięty pieprzowej była podobna jak w owocach kontrolnych, nie notowano istotnych statystycznie różnic. Uzyskane wyniki wskazują, że wywar ten nie ma wpływu na liczbę składanych jaj do owoców traktowanych w porównaniu z kontrolą. Można więc uznać, że jest on obojętne dla muchówek *D. suzukii*.

3. Odstraszające muchówki

Największe różnice pomiędzy kombinacjami traktowanymi wodą a wywarami odnotowano w kombinacji z olejkiem z drzewa herbacianego, na którym nie notowano lub notowano tylko pojedyncze jaja *D. suzukii*. Może on więc działać odstraszająco na muchówki *D. suzukii*. Liczba jaj złożonych do owoców przez *D. suzukii* po 3 i 5 dniach od ich traktowania olejkiem z drzewa herbacianego była nadal dużo niższa niż w owocach kontrolnych. Podobnie na olejku goździkowym i cynamonowym zastosowanych w postaci cieczy nanodispersyjnej notowano bardzo małą liczbę jaj. Jednak w tym przypadku na liczbę złożonych jaj mogą mieć

zbyt twarda skórka owocu, co mogło utrudniać samicom składanie jaj, świadczyć może o tym fakt, że na kombinacji kontrolnej również notowano małą liczbę złożonych jaj. (Tabela 31 i 32)

Należy jednak podkreślić, że choć wywar z drzewa herbacianego odstraszał muchówki to miał niekorzystny wpływ na jakość owoców: traciły one typowy dla owoców borówki nalot, błyszczały i czarnały, a dodatkowo na owocach pozostawał dość intensywny zapach, który może nie być akceptowany przez konsumentów. Podobnie olejki goździkowy i cynamonowy.



Fot. 13. Na lewo owce traktowane wodą, na prawo olejkim cynamonowym goździkowym



Fot. 14. Po lewo owoce traktowane wodą, po prawo olejkim

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania laboratoryjne w zwalczaniu mszycy jabłoniowo-babkowej wydają się być obiecujące. Wymagają one jednak powtórzenia w warunkach polowych. Wyniki tych badań będą mogły stanowić w przyszłości podstawę do włączenia wybranych środków do programu ochrony sadowniczych upraw ekologicznych przed mszycą jabłoniową-babkową.

Zastosowanie wyciągu z czosnku z olejem mineralnym oraz mydła ogrodniczego z olejem kokosowym i alkoholem amidowym w formie biopreparatów odpowiednio: Tandexir Plus –oraz Palizin do zwalczania mszycy czereśniowej wykazały niską skuteczność. Być może powodem było to, iż mszyca czereśniowa w czasie swojego rozwoju i żerowania dość szybko powoduje mocne skręcanie liści i dlatego dotarcie cieczy użytkowej jest mniej efektywne.

W obecnym sezonie wegetacyjnym muszka płamoskrzydła wystąpiła we wszystkich badanych obiektach zarówno na czereśni, wiśni jak i malinie. Na czereśni pierwsze muchy w województwie kujawsko-pomorskim odnotowano już w czerwcu, natomiast na wiśni w tym samym rejonie na początku lipca i odławiały się do października. Na malinie w rejonie centralnym pierwsze muchówki odnotowano w sierpniu i również odławiano je do października. W tym roku po raz pierwszy odnotowano na wszystkich uprawach liczne uszkodzenia (larwy w owocach) powodowane przez tego szkodnika.

Zastosowanie ziela rdestu ostrolistnego, liści mięty pieprzowej w formie wyciągów, olejku z drzewa herbacianego, olejku goździkowego i cynamonowego w formie cieczy nanodyspersyjnej wykazało, że substancje te mogą wpływać na zachowanie się samic muszki

(odstraszająco lub wabiąco). Ale problemem pozostał zapach osiadający na owocach, co miało wpływ na konsumpcję tych owoców.

Pozyskiwanie osobników do ustalenia lub potwierdzenia przynależności gatunkowej

W bieżącym sezonie nie istniała potrzeba identyfikacji lub potwierdzenia przynależności gatunkowej, żadnego z występujących szkodników. Wszystkie znalezione okazy zidentyfikowano we własnym zakresie. Natomiast w bieżącym roku wystąpił bardzo duży problem z opadaniem i gniciem owoców z rokitnika i jak stwierdzono we wstępnym etapie przyczyną nie były larwy nasionnicy rokitnikowej. Podjęto więc próbę określenia tej przyczyny ze strony patogenów grzybowych lub bakteryjnych. Dlatego też podjęto dodatkowe badania. W okresie od sierpnia do września 2020 roku przeprowadzono monitoring 3 plantacji rokitnika w celu zidentyfikowania sprawców gnicia owoców. W warunkach laboratoryjnych przeprowadzono izolację czynników sprawczych z materiału roślinnego na pożywkę PDA. Uzyskane kultury zidentyfikowano na podstawie ich cech morfologicznych oraz przy użyciu technik molekularnych (sekwencjonowanie regionu rDNA-ITS). Na 2 z 3 monitorowanych plantacji stwierdzono obecność grzyba *Botrytis cinerea* sprawcy między innymi szarej pleśni owoców. Patogena wyizolowano z owoców z objawami gnicia pobranych z plantacji zlokalizowanych w Przezmarku i Ostrowie Północnym. Na plantacji w Przezmarku stwierdzono także obecność grzybów z rodzaju *Diaporthe*. Wykonano także analizę laboratoryjną, obejmującą izolacje pod kątem obecności bakterii fitopatogenicznych na pożywki mikrobiologiczne King B i NA oraz testy patogeniczności, wykazała ona obecność bakterii pektynolitycznych (rozkładających tkankę) oraz bakterii patogenicznych. Identyfikacja, wykonana na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA, wykazała największe podobieństwo izolatów, do bakterii rodzaju *Lelliottia* sp. oraz do bakterii rodzaju *Pseudomonas* spp. **Aby w pełni zinterpretować otrzymane w tym roku wyniki tych analiz i opracować zalecenia zapobiegania chorobom powodowanym przez te patogeny istnieje potrzeba kontynuowania tych prac w kolejnych latach.**

Ze względu na to, iż w badaniach skuteczności, również w poprzednich latach, w ograniczaniu szkodników żerujących w glebie i innych szkodników, środek zawierający wyciąg z kory *Quassia amara* wykazał wysoką efektywność i może być on przydatnym środkiem ochrony w produkcji ekologicznej, wykonano pierwszy etap badań ekotoksyczności dla tej substancji. Jest to opis procedury (procedur) analitycznych do wykrywania i identyfikowania substancji *Quassia* w wyciągu z kory. Procedury zawierają metodę przygotowania próbek do pozyskania wyciągu oraz opis analiz do identyfikacji tego związku. (sprawozdanie w załączeniu – Załącznik 4).

1E. Transfer wiedzy i upowszechnianie wyników

Przygotowano materiały upowszechnieniowe w formie 2 broszur i filmu instruktażowego zawierające zalecenia dla producentów z bieżącego projektu oraz z poprzednich lat, a także zorganizowano warsztaty z udziałem zainteresowanych producentów.

Spotkanie warsztatowe

Ze względu na pandemię zaplanowane spotkanie odbyło się w formie on-line w dniu 4.11.2020 w Skierniewicach. Udział w spotkaniu zadeklarowało 200 osób, a uczestniczyło w nim 110 osób. Spotkanie odbywało się poprzez prezentację przygotowanych materiałów przez kanały Instytutu Facebook i Youtube. Dyskusja odbywała się w czasie rzeczywistym poprzez program TrueConf (na licencji Instytutu). Zaprezentowano między innymi film dotyczący ograniczania pędraków chrabąszcza majowego wyprodukowany w ramach projektu oraz został wygłoszony referat na temat ograniczania nasionnic na różnych uprawach. Linki do warsztatów:

<https://www.youtube.com/watch?v=Az1VPGbqhvI>;

<https://www.facebook.com/InstytutOgrodnictwa/>

W dniu 10.09.2020 w Kalinowej (woj. łódzkie) odbyło się szkolenie dla producentów selerów i kapusty, na którym zaprezentowano wyniki projektu dotyczące ograniczania populacji larw chrabąszcza majowego. W szkoleniu wzięło udział ok. 50 producentów.



Film instruktażowy

W ramach projektu wyprodukowano krótki film instruktażowy na temat metod ograniczania pędraków chrabąszcza majowego na plantacjach truskawek. Materiał dołączony do sprawozdania.

Materiały upowszechnieniowe (broszurki)

Przygotowano 2 broszurki w formacie .pdf (do samodzielnego wydruku przez zainteresowane osoby). Jedna na temat metod ograniczania pędraków chrabąszcza majowego, a druga na temat monitoringu nasionnic na czereśni i wiśni, rokitniku i róży pomarszczonej. Materiały dołączone do sprawozdania.

W celu większej popularyzacji materiałów (film i ulotki) opracowanych w ramach projektu zostaną one zamieszczone na stronie Instytutu Ogrodnictwa wraz ze sprawozdaniem oraz w

Inna działalność upowszechnieniowa w 2020

Małgorzata TARTANUS, Witold DANIELSKI, Elżbieta ROZPARA and Eligio MALUSÀ, 2019
Possibility limiting the number of black cherry aphid *Myzus cerasi* (F.) in organic cultivation n
of sweet cherry (Możliwości organiczania liczebności mszycy czereśniowej *Myzus cerasi* (F.) w
ekologicznej uprawie czereśni). *Journal of Research and Applications in Agricultural
Engineering*, Vol. 64(4): 7-13.

Eligio Malusà, Małgorzata Tartanus, Grażyna Soika, 2019. Monitoring and possibilities of controlling
nematodes and fruit damaging pests of *Rosa* spp. with microbial-derived products. *Journal of
Plant Protection Research*, Vol. 59, No. 3: 334–340, 2019. DOI: 10.24425/jppr.2019.129753

Malusà, E., Tartanus, M., Furmanczyk, E.M. & Barbara H. Łabanowska. 2020. Holistic
approach to control *Melolontha* spp. in organic strawberry plantations. *Org. Agr.*
(2020). <https://doi.org/10.1007/s13165-020-00295-2>

Tartanus M., Malusa E., Furmańczyk E.M., 2020, Pędraki nadal groźne. Truskawka, Maliny,
Jagody 3:13-15

Łabanowska B.H., Piotrowski W., Tartanus M., 2020 Szkodniki w sadach czereśniowych
MPS Sad 5:42-48.

Oferta wdrożeniowa Instytutu Ogrodnictwa 2020: Pułapki świetlne do odłowu chrząszczy
chrabąszcza majowego.

http://www.inhort.pl/files/wdrozenia/wdrozenia_2020/OfertaWdrozeniowaPulapki2020IS.pdf

Literatura:

Arsenault J.L., Poulcur S., Messier C., Guay R. 1995. *WIN-RHIZO a root-measuring system
with a unique overlap cor-rection method*. *HortSci*. 30:906

Guerenstein, P. i Hilderbrand J.G. 2008. *Roles and effects of environmental carbon dioxide in
insects life*. *Ann Rev Entomol*. 53:161-178

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. 2012. *NIH Image to ImageJ: 25 years of
image analysis*. *Nature Methods* 9, 671-675

Aneks I

Poniższe zalecenia, zostały zilustrowane w formie krótkiego filmu instruktażowego oraz ulotek załączonych do sprawozdania:

Załącznik 1 – Ograniczanie larw chrabąszcza majowego – film

Załącznik 2 – Nasionnice: monitorowanie i zwalczanie w ekologicznych sadach czereśniowych i wiśniowych oraz plantacjach różnych gatunków roślin jagodowych - ulotka

Załącznik 3 – Pędraki wciąż groźne nie tylko na ekologicznych plantacjach truskawek - ulotka

Zalecenia dla sadownictwa ekologicznego

Wyniki badań i obserwacji polowych wskazują, że straty powodowane przez pędraki w uprawach ogrodniczych, w tym prowadzonych zgodnie z zasadami produkcji ekologicznej w wielu rejonach Polski, są bardzo duże. Z roku na rok przybywa upraw, na których występują pędraki. Przyczyn wzrostu zagrożenia należy upatrywać również w bardzo ograniczonych możliwościach zwalczania chrząszczy i pędraków chrabąszcza majowego - *Melolontha melolontha*, także w lasach oraz w innych uprawach sadowniczych czy rolnych. Ponadto prowadzone badania i obserwacje wskazują, że szkodniki żyjące w glebie bardzo łatwo aklimatyzują się na „nowych” dla nich uprawach. Z badań i doświadczeń wykonanych w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach wynika, że walka z chrabąszczem majowym i jego larwami, powszechnie zwanymi pędrakami, powinna być prowadzona kompleksowo, z wykorzystaniem wszystkich dostępnych metod i sposobów. Ochrona powinna być prowadzona we wszystkich rejonach występowania szkodnika i na wszystkich uprawach, na których występuje, na dużych powierzchniowo obszarach. Tylko kompleksowe i systematyczne zwalczanie szkodników żyjących w glebie może przynieść oczekiwane rezultaty w ograniczeniu ich liczebności i uszkodzeń przez nie powodowanych.

Taki sposób rozwiązania lub przynajmniej zmniejszenia problemu, podyktowany jest przebiegiem cyklu rozwojowego chrabąszcza majowego. Przez 3-4 lata larwy żyją i rozwijają się w glebie i dopiero po osiągnięciu ostatniego stadium rozwojowego (czerwiec-lipiec) schodzą do głębszych warstw gleby, przepoczwarzając się. Wkrótce wychodzą owady dorosłe czyli chrząszcze, ale pozostają one w glebie do wiosny następnego roku. Pod koniec kwietnia i w maju wychodzą z gleby, następuje kopulacja i zapłodnione samice składają jaja do wierzchniej warstwy gleby, w grupach (złożach) po kilka-kilkanaście sztuk dając początek nowemu pokoleniu.

Ponadto trzeba mieć świadomość, że chrabąszcz majowy jest gatunkiem polifagicznym, czyli jego larwy (pędraki) żerują i rozwijają się na korzeniach wielu różnych roślin. Prawidłowe podejście do walki z tym szkodnikiem wymaga od rolnika, np. producenta owoców truskawki czy innych roślin, znajomości biologii szkodnika oraz wiedzy teoretycznej i technicznej o możliwości stosowania metod ich ograniczania. Podkreślenia wymaga również fakt, że kompleksowe stosowanie różnych metod zwalczania chrabąszczy i pędraków wymaga dużych nakładów, zarówno finansowych, jak i pracy ludzkiej.

W celu efektywnego ograniczenia szkód wyrządzanych przez pędraki chrabąszczy na podstawie badań prowadzonych w 2020 roku oraz wyników wcześniejszych doświadczeń zaleca się podejmować następujące działania:

Przed założeniem plantacji

- w rejonach występowania pędraków, które stanowią duże lub bardzo duże zagrożenie dla prowadzonych upraw, należy wstępnie kontrolować glebę w celu określenia obecności i zagęszczenia szkodników na polu przed założeniem plantacji. Ocenę liczebności pędraków w glebie należy prowadzić stosując metodę pobierania prób gleby z minimum 32 dołków o wymiarach 25cmx25cm, głębokości 30 cm, co stanowi 2 m² z 1ha powierzchni pola). Dla upraw ogrodniczych jako próg zagrożenia przyjęto zagęszczenie na poziomie **1 pędrak na 2m²** powierzchni pola.
- bardzo ważne jest, by prowadzić kompleksową walkę z pędrakami chrabąszcza majowego podczas przygotowania gleby pod plantację stosując metodę mechaniczną (użycie do uprawy gleby maszyn z ostrymi elementami np. glebogryzarka, kultywator). Taka uprawa powinna być wykonana w okresie, kiedy larwy (pędraki) obecne są w górnej warstwie gleby, a użycie maszyn z wirującymi elementami zwiększa liczbę uszkodzonych larw. Warto też zwracać uwagę na warunki glebowo-klimatyczne (tj. temperatura i wilgotność gleby), które sprzyjają przebywaniu larw w górnej warstwie gleby i niszczeniu ich w sposób mechaniczny.
- dodatkową praktyką, którą należy wprowadzić i stosować w połączeniu z uprawkami mechanicznymi, jest zbieranie pędraków podczas orki, bezpośrednio po przejściu pługa, co istotnie redukuje (w doświadczeniach było to około 50%) liczebność pędraków chrabąszczy w glebie. Wiadomo jednak, że niektóre z nich pozostają nieuszkodzone i nadal żerują na korzeniach. Metoda ta jest jednak pracochłonna, a znacznie lepsze efekty uzyskuje się na mniejszych powierzchniach, gdzie orkę przeprowadza się przy pomocy pługów jedno-dwuskbowych a nie stosuje się pługów wieloskbowych.
- należy stosować także metodę fitosanitarną, a głównie właściwy przedplon, czyli uprawiać rośliny działające niekorzystnie na rozwój populacji pędraków w glebie. W badaniach potwierdzono największy wpływ gryki (zawarte w niej taniny hamują rozwój pędraków). Wyniki wstępnych doświadczeń wskazują także na korzystny wpływ gorczycy, ale wymaga to dalszych badań i obserwacji. Ważne jest, aby ta roślina zakwitła, a wówczas jej części nadziemne należy rozdrobnić i przyorać.

Podczas prowadzenia plantacji

- Stosować metodę fizyczną polegającą na wabieniu i odławianiu chrabąszczy, a następnie utylizacji odłowionych osobników. Do odławiania lub wabienia chrząszczy można stosować:
 - Pułapki świetlne (ekrany) do odłowu chrząszczy, wykorzystujące światło lampy do wabienia chrząszczy, dodatkowo ekrany mogą być pokryte odpowiednim klejem, co nie pozwoli chrząszczom odlatywać z ekranu.
 - Pułapki świetlne (samołówki) do odłowu chrząszczy, z wykorzystaniem świetlówek, które emitują światło białe lub czarne.
 - Strząsanie chrząszczy z drzew, na których odbywają dzienny żer uzupełniający.

W ten sposób skutecznie ogranicza się populację chrabąszcza majowego, ale najlepiej metodę tę stosować od początku lotu chrabąszczy, bezpośrednio po ich wylocie, by

zniszczyć je zanim samice złożą jaja do gleby. Na przykład w jedną pułapkę świetlną (ekran) można odłowić do 400 osobników dorosłych w ciągu zaledwie 2 godzin wieczornych, samołówka (ok. 50 dziennie) lub jednego godzinnego strząsania chrząszczy z drzew, na których prowadzą dzienny żer uzupełniający można zebrać ok. 1000 chrząszczy. Redukcja chrząszczy, to mniej złożonych jaj przez samice, a tym samym mniejsze zagęszczenie pędraków na polach uprawnych. By uzyskać jak najlepszy efekt, metody odławiania chrząszczy wskazane byłoby stosować również:

- na sąsiadujących plantacjach, by objąć nią większą powierzchnię;
 - odławiać je od początku lotu chrząszczy chrabąszcza majowego, który to wylot zaczyna się zależnie od warunków atmosferycznych, pod koniec kwietnia lub na początku maja i trwa do pierwszych dni czerwca (termin stosowania pułapek odławiających musi być ustalany indywidualnie dla danego sezonu);
 - rozstawianie pułapek w pobliżu lasów lub nawet pojedynczych drzew dębów, ponieważ chrząszcze (osobniki dorosłe) bardzo często przebywają na tych drzewach, prowadząc żer uzupełniający i jest duże prawdopodobieństwo odłowienia ich w pułapki.
- stosować metodę fizyczną polegającą na rozkładaniu agrowłókniny na powierzchni pola, obejmując rośliny i glebę na początku sezonu (koniec kwietnia- maj), przed spodziewanym wylotem chrabąszczy. Metoda jest dość kosztowna, ale bywa coraz częściej stosowana, do przyspieszania wzrostu i owocowania roślin. W takim przypadku zmniejsza się liczba złożonych jaj przez samice (nie mogą przedostać się pod agrowłókninę), a tym samym mniejsze jest zagęszczenie pędraków na polach uprawnych.
 - stosować metodę mechaniczną polegającą na usuwaniu pędraków spod uszkodzonych roślin podczas ręcznego odchwaszczania plantacji. Roślina, która ma mocno uszkodzony system korzeniowy w początkowym okresie dość szybko więdnie, w ten sposób niekiedy łatwo rozpoznać, pod którymi roślinami mogą być pędraki.
 - stosować metodę biologiczną, wykorzystując czynniki biologicznego zwalczania (CBZ), które mogą z dobrym skutkiem ograniczyć populację pędraków w glebie. Obecnie są dwie grupy CBZ: nicienie entomopatogeniczne i grzyby entomopatogeniczne:
 - A) Nicienie entomopatogeniczne są już dostępne na rynku na przykład *Steinernema kraussei* oraz *Heterorhabditis bacteriophora*, i mogą być stosowane przez plantatorów. Należy je wprowadzać do gleby zgodnie z instrukcją podaną na opakowaniu, przestrzegając proponowanych dawek, sposobów stosowania oraz terminów zalecanych przez producentów. Jednak skuteczność CBZ w dużym stopniu zależy od warunków fizyko-chemicznych gleby: jej struktury, temperatury i wilgotności względnej (zawartości wody). Nicienie mogą być podatne na wysokie temperatury i ograniczoną zawartość wody w glebie, co może niekorzystnie wpływać na liczebność populacji (może być notowane jej zmniejszanie). Struktura gleby może być przyczyną zwiększenia śmiertelności nicieni: w glebach piaszczystych, które są bardziej wrażliwe na brak wody, następuje większa śmiertelność nicieni, ze względu na szybkość i stopień wysuszenia. Dlatego też rolnicy muszą utrzymywać wystarczający poziom wilgotności gleby, która

odgrywa bardzo ważną rolę w przemieszczaniu się nicieni w kierunku larw i kolonizowania ich, co bezpośrednio wpływa na skuteczność biologicznego zwalczania szkodników żyjących w glebie.

B) grzyby entomopatogeniczne, by mogły być polecane do stosowania w praktyce, muszą uzyskać rejestrację. Jednak działanie tego rodzaju CBZ wymaga dłuższego okresu czasu (czas na zwiększenie zagęszczenia przez namnożenie się grzybów w glebie, oraz czasu na znalezienie i skolonizowanie żywiciela, czyli pędraka i jego zniszczenie. Również i w tym przypadku, podobnie jak u pierwszej grupy CBZ (nicieni), dużą rolę odgrywają warunki fizyko-chemiczne gleby.

- w celu zwiększenia skuteczności działania stosowanych metod zwalczania (szczególnie metody biologicznej), należy wykorzystywać wszelkie dostępne sposoby np. przykrywanie gleby z pominięciem roślin, na czas lotu chrabąszczy (co uniemożliwia składanie jaj przez samice), a pozostawienie okrywy dłużej, może również zwiększać wilgotność gleby potrzebną do namnażania się nicieni entomopatogenicznych i grzybów owadobójczych.
- zwracać baczniejszą uwagę na jakość i strukturę gleby oraz zawartość składników pokarmowych dla roślin, co może pomóc w doborze zastosowanej metody oraz pozwolić na lepszą regenerację częściowo uszkodzonych roślin (w małym stopniu dotyczy to truskawki, w większym krzewów i drzew, gdzie niecały system korzeniowy jest zniszczony przez pędraki w krótkim czasie).
- stosowanie metody allelopatycznej może również przyczyniać się do ochrony plantacji przed pędrakami, ale wymaga dalszych badań, w celu wytypowania najbardziej skutecznych substancji. Allelopatia odnosi się głównie do substancji chemicznych wydzielanych przez rośliny do podłoża, które wpływają na wzrost innych organizmów w bezpośrednim otoczeniu. Na podstawie badań zawartości związków fenolowych i antocyjanin (w bieżącym roku i w latach poprzednich) w wyciągach alkoholowych z mniszka lekarskiego, gryki i aksamitki, nagietka i szalwii można stwierdzić, że wyciągi te mogą również niekorzystnie wpływać na rozwój pędraków, a na podstawie tegorocznych badań można wnioskować, że ekstrakty z mniszka i szalwii mogą również stymulować rośliny do lepszego wzrostu, a także wytwarzania mechanizmów obronnych przeciw pędrakom. Jednak, aby można było to wykorzystywać w dalszej praktyce, należy dokładnie określić jakie związki mają wpływ na rozwój pędraków i jaki jest mechanizm tego działania, a następnie przygotować odpowiednie produkty.
- w zagrożonych rejonach do ograniczenia populacji chrabąszczy i pędraków wprowadzić do praktyki stosowanie na szeroką skalę (obejmować większe rejony) **zintegrowane metody zwalczania**, które obejmują metody ukierunkowane zarówno na ograniczanie populacji owadów dorosłych (chrabąszczy), jak i larw (pędraków) obecnych w danej uprawie/plantacji i ich sąsiedztwie (jeśli to możliwe). Tylko przy takim podejściu jest szansa na skuteczne zmniejszenie szkód. Jednak podstawowym wymogiem jest prowadzenie tej walki systematycznie przez kilka kolejnych lat, co wynika z cyklu rozwojowego szkodnika. Stosując metody zwalczania szkodników żyjących w glebie w sposób zintegrowany, zwiększa się efektywność ich redukcji.

Roślinom prozdrowotnym, takim jak czereśnia, wiśnia, malina, róża pomarszczona i rokitnik w różnych sezonach mogą zagrażać różne szkodliwe owady. Prowadzenie systematycznych obserwacji jest dobrym sposobem sprawdzania obecności przede wszystkich szkodników. Jednak, aby prawidłowo zdefiniować występujący na plantacji problem, plantator musi posiadać wiedzę na temat objawów żerowania, terminów występowania, czy też fenologii danego szkodnika. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że dużym problemem są, lub w najbliższym czasie będą oraz wymagają, lub będą wymagać rozwiązań nasionnice uszkadzające owoce czereśni, wiśni, róży pomarszczonej i rokitnik.

W naszym kraju na czereśni i wiśni występuje nasionnica trześniówka (*Rhagoletis cerasi*) i nasionnica wschodnia (*Rhagoletis cingulata*), na róży pomarszczonej nasionnica różówka (*Rhagoletis alternata*) oraz na rokitniku nasionnica rokitnikowa (*Rhagoletis batava*). **Po raz pierwszy w tym roku stwierdzono muchy nasionnicy trześniówki na plantacjach jagody kamczackiej oraz owoce uszkodzone przez jej larwy.**

Producenci tych owoców muszą prowadzić coroczny monitoring występowania tych szkodników na swoich plantacjach i w sadach. W monitoringu wszystkich gatunków nasionnicy bardzo pomocne są żółte pułapki lepowe. Natomiast do ograniczenia populacji tych szkodników dobre działanie wykazują pułapki z atraktantem do masowego odłowu owocanki południówki *Ceratitis capitata* oraz po wprowadzeniu do handlu również z atraktantem dla nasionnicy trześniówki *Rhagoletis cerasi*. Jednak według zaleceń producenta na 1 ha sadu należy wywiesić ok. 75-80 szt. pułapek.

- W przyszłości będą miały również zastosowanie (jeszcze muszą przejść ponowne testy) pułapki przygotowywane samodzielnie na bazie rozpuszczonego nawozu zawierającego fosforan amonu, które także odławiały wszystkie gatunki nasionnic oraz nowe polskie atraktanty przygotowane w ramach projektu przez firmę Tomasz Miśkiewicz BCHEM.
- Należy zwrócić uwagę na wysokość, na jakiej wywieszane są pułapki, zarówno do monitoringu, jak i masowych odłowów. W sadach, w których rosną wysokie drzewa pułapki powinny być wywieszane w górnych partiach korony.
- Na mniejszych arealach plantacji lub sadu (szczególnie róży pomarszczonej i czereśni) ważne jest zbieranie porażonych owoców, szczególnie wtedy, kiedy żerują w nich jeszcze larwy, aby uniemożliwić im schodzenie na zimowanie i rozwój następnego pokolenia.
- W przypadku bardzo wysokiej populacji nasionnicy rokitnikowej na rokitniku, pewnym rozwiązaniem może być silne przycięcie drzew, aby sprzyjać dynamicznemu wzrostowi roślin, ale bez owocowania przez co najmniej 1 rok, a nawet lepiej dwa, ponieważ zimująca forma owada (poczwarka) może przetrwać w glebie nawet kilka lat. W okresie, kiedy krzewy nie będą owocować należy również bacznie monitorować występowanie nasionnicy, a także prowadzić jej zwalczanie lub wyłapywanie w pułapki.