

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **226445**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **409340**

(51) Int.Cl.  
**C12N 1/14 (2006.01)**  
**C12R 1/885 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **01.09.2014**

---

(54) **Podłoże, sposób przygotowania podłoża oraz zastosowanie podłoża do namnażania grzyba z rodzaju Trichoderma i ograniczania populacji grzybów patogenicznych Sclerotinia sclerotiorum**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**14.03.2016 BUP 06/16**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.07.2017 WUP 07/17**

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT OGRODNICTWA, Skierniewice, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**URSZULA SMOLIŃSKA, Sochaczew, PL**

**BEATA KOWALSKA, Skierniewice, PL**

**MAGDALENA SZCZECH, Skierniewice, PL**

**WALDEMAR KOWALCZYK, Skierniewice, PL**

**ALEKSANDRA MURGRABIA, Strzyboga, PL**

---

**PL 226445 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest podłoże, sposób przygotowania podłoża oraz zastosowanie podłoża do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma* i ograniczania populacji grzybów patogenicznych *Sclerotinia sclerotiorum*.

Znane jest z polskiego zgłoszenia patentowego nr P.402840 Podłoże, sposób przygotowania podłoża oraz zastosowanie podłoża do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma* i uprawy roślin. Podłoże zawiera wysuszone łuski cebuli, wysuszone wytlóczy z jabłka, wysuszone wytlóczy z truskawki oraz wysuszone wytlóczy z rzepaku zmieszane ze sobą w stosunku 1:1:1:1, przy czym łuski cebuli są rozdrobnione na cząstki o długości od 0,2 do 0,5 cm, przy czym wysuszone łuski cebuli, wysuszone wytlóczy z jabłka, wysuszone wytlóczy z truskawki oraz wysuszone wytlóczy z rzepaku są zmieszane ze sobą z dodatkiem wody w stosunku 1 dm<sup>3</sup> wody na 40 dm<sup>3</sup> mieszanki oraz poddane granulacji. Sposób przygotowania podłoża polega na tym, że wysuszone łuski cebuli, wysuszone wytlóczy z jabłka, wysuszone wytlóczy z truskawki oraz wysuszone wytlóczy z rzepaku miesza się ze sobą, korzystnie w stosunku 1:1:1:1, następnie dodaje się wodę, korzystnie w ilości 1 dm<sup>3</sup> wody na 40 dm<sup>3</sup> mieszanki, miesza się wszystkie składniki do uzyskania masy o jednolitej konsystencji, następnie w czasie korzystnie do 3 godzin po wymieszaniu uzyskaną masę poddaje się granulacji, po czym uzyskany granulata suszy się w temperaturze 20–25°C przez okres do 10 dni. Zastosowanie podłoża do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma*, przy czym namnażanie grzyba z rodzaju *Trichoderma* przeprowadza się na podłożu umieszczonym w perforowanych workach, korzystnie polipropylenowych, podłoże w workach zwilża się wodą, do zwilżonego podłoża dodaje się uzyskaną w dowolny sposób wodną zawiesinę zarodników grzyba z rodzaju *Trichoderma*, a ponadto podłoże zawierające zawiesinę zarodników grzyba *Trichoderma* inkubuje się w temperaturze 18–26°C przez okres 12–16 dni. Zastosowanie podłoża do uprawy roślin poprzez dodawanie określonej ilości podłoża przerośniętego izolatami grzyba z rodzaju *Trichoderma* do podłoża uprawowego.

Znany jest z polskiego opisu patentowego nr PL 168032 Sposób otrzymywania enzymów celulozowych charakteryzujący się tym, że hodowlę prowadzi się przy użyciu wyselekcjonowanego szczepu *Trichoderma reesei* Tch. r. 12 lub jego kolejnych mutantów, korzystnie metodą dolewową, w czasie od 192 do 360 godzin, stosując jako źródło węgla w podłożu produkcyjnym 1,5–4% wagowych celulozy pochodzącej z surowca roślinnego pozbawionego pentozanów poprzez przeprowadzenie ich w lotne pochodne, korzystnie furfural, oraz ewentualnie częściowo zdelignifikowanego, przy czym od 40. do 60. godziny hodowli podłoże uzupełnia się nowymi składnikami pokarmowymi zawierającymi surowiec celulozowy, sole mineralne, pepton i mikroelementy, z częstotliwością od 3 do 8 godzin, a ponadto surowiec roślinny stanowią odpady z roślin jednorocznych lub wieloletnich pozbawione pentozanów, korzystnie odpady po produkcji furfuralu, a ponadto częściową delignifikację surowca roślinnego pozbawionego pentozanów prowadzi się metodą parowania, korzystnie w temperaturze od 110 do 120°C, z dodatkiem katalizatorów, korzystnie ługu sodowego lub siarczanów sodu lub siarczynów sodu.

Produkcja warzyw wysokiej jakości wymaga odpowiednich metod ochrony przed patogenami. Systematycznie zmniejszający się asortyment dostępnych środków utrudnia właściwą ochronę i powoduje, że coraz trudniej uzyskać wysokie plony i odpowiednią jakość warzyw, a także zapewnić przemiennosc stosowania środków (zapobiegającą uodparnianiu się patogenów). Szczególne znaczenie mają metody umożliwiające ograniczenie występowania chorób roślin uprawnych przy jak najmniejszym zużyciu syntetycznych środków chemicznych.

W wyniku stosowania intensywnych metod uprawy w wielu rejonach kraju następuje nagromadzenie w glebach form przetrwalnych patogenów atakujących wiele ważnych gospodarczo gatunków roślin np. grzybów z gatunku *Sclerotinia sclerotiorum*. Obecność tych patogenów w glebie w wielu wypadkach uniemożliwia uprawę roślin przez kilka lat. Ograniczenia te przy wysokiej specjalizacji produkcji są ogromnym utrudnieniem i powodują duże straty ekonomiczne. Stosowanie chemicznej lub termicznej dezynfekcji gleby jest kosztowne, szkodliwe dla środowiska i nie we wszystkich warunkach możliwe do przeprowadzenia. Nie ma obecnie żadnych całkowicie skutecznych i ekonomicznie opłacalnych metod mogących wyeliminować te mikroorganizmy z pól uprawnych. Z tego powodu opracowanie skutecznych metod umożliwiających obniżenie populacji tych patogenów w glebie i skrócenie okresu przerwy w uprawie jest bardzo ważne.

Grzyb *Sclerotinia sclerotiorum* jest patogenem polifagicznym występującym powszechnie na wielu gatunkach roślin uprawnych, warzywach, na roślinach przemysłowych. Wywołuje chorobę zwaną zgnilizną twardzikową. Części roślin zaatakowane przez ten patogen brunatnieją i przedwcześnie

zamierają. Zgnilizna rozwija się bardzo szybko. Wewnątrz porażonych roślin, a w warunkach wysokiej wilgotności także na zewnątrz, pojawia się biały nalot, który zawiera formy przetrwalne grzyba, czyli sklerocja. Początkowo sklerocja są szare, a następnie czarne o średnicy ok 0,5–1 cm i nieregularnych kształtach. Szkodliwość tej choroby jest wysoka, ponieważ patogen może przetrwać w glebie wiele lat. Rozprzestrzenianie się choroby odbywa się przez fragmentację grzybni i sklerocja (Kora, 2003; Dwayne, 2005). Sklerocja zbudowane są ze zwartej plektenchymy, mają obniżoną zawartość wody i zgromadzone substancje zapasowe. Formy te są odporne na niekorzystne warunki, np. suszę. W warunkach sprzyjających rozwojowi wyrasta z nich grzybnia lub tworzą się na nich owocniki. *S. sclerotiorum* zimuje w postaci sklerocjów. W ostatnich latach z powodu specjalizacji produkcji rolniczej i braku metod fumigacji gleby występuje coraz większy problem z tym patogenem. Powoduje ogromne straty w produkcji wielu gatunków roślin uprawnych, m.in. sałaty, fasoli, marchwi, pietruszki, papryki. Na przestrzeni ostatnich lat coraz częściej można zaobserwować zgniliznę twardzikową na ziemniakach.

W zwalczaniu chorób wywołanych przez *S. sclerotiorum* stosowane są metody biologiczne z wykorzystaniem grzybów z rodzaju *Trichoderma* (Elad Y., 2000; Howell 2004; Vinale 2006; Marcinkowska 2003; Chaverr P., 2003, Huang i in. 2005; Zaher i in. 2013; Teixeira i in. 2013). Grzyby z rodzaju *Trichoderma* często wykazują właściwości korzystne dla roślin uprawnych i wyselekcjonowane izolaty są stosowane w biologicznej ochronie. Cecha tych grzybów, która jest powodem zainteresowania w przypadku tych badań, to zdolności pasożytnicze w stosunku do wielu innych gatunków grzybów (Chet i in. 1998, Kaur 2005, Zeilinger i Omann 2007). Pasożytowanie różnych form rozwojowych grzybów patogenicznych przez antagonistyczne *Trichoderma* wykazali także w swoich badaniach Benitez (1998), Monte (2001), Limón (2004) i inni. *Trichoderma* powoduje rozpad ściany komórkowej patogenów, co związane jest m.in. z właściwościami chitynolitycznymi enzymów syntetyzowanych przez te grzyby. Potwierdzają to w swoich badaniach również Sivan i Chet (1988), którzy badali enzymy produkowane przez *Trichoderma* powodujące degradację ścian komórkowych innych grzybów. El-Katatny (2001) oraz Benitez (2004) wśród enzymów *Trichoderma* rozkładających ściany patogenów zidentyfikowali m.in. chitynazy, glukanazy i celulazy. Ekspansywność tych grzybów wynika także z faktu, że są one silnie konkurencyjne w stosunku do innych mikroorganizmów zasiedlających środowisko glebowe. Zdolność do wydzielania różnorodnych związków aktywnych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* jest bardzo zróżnicowana w zależności od gatunku, a także różnych izolatów w obrębie gatunku. Dlatego na całym świecie trwają badania nad poszukiwaniem najbardziej efektywnych szczepów.

Aby mikroorganizm antagonistyczny był skuteczny, musi być wprowadzany do środowiska w odpowiednio dużej ilości. Niestety ich skuteczność często jest niewielka ze względu na stosunkowo małą liczebność wprowadzanego antagonisty w porównaniu do całej masy drobnoustrojów zasiedlających glebę. Mikroorganizmy wprowadzane w postaci szczepionek zwykle nie przeżywają długo ze względu na intensywną konkurencję o pokarm ze strony rodzimych drobnoustrojów. Korzystne jest wprowadzenie mikroorganizmów antagonistycznych do gleby na substancji organicznej, która odpowiednio skomponowana będzie dodatkowo, w dłuższym czasie po wprowadzeniu na pole, stymulowała rozwój grzyba.

Przemysł przetwórstwa rolno-spożywczego wytwarza bardzo dużo odpadów. Ze względu na charakter odpadu nie zawsze jest możliwe ich bezpośrednie wykorzystanie. Część z nich wywożona jest bezpośrednio na wysypiska. Problemem są ogromne ilości odpadów powstających po sezonie produkcyjnym. Główną masę odpadową z procesów technologicznych przy produkcji soków i napojów stanowią wyłoki, których ilość może dochodzić do 25% przerabianego surowca (Frąc i Nawirska 1994). Polska jest dużym producentem owoców, zwłaszcza jabłek. Spośród krajów europejskich jest największym producentem zagęszczonego soku jabłkowego. Przy tak intensywnej produkcji powstaje znaczna ilość wyłoczyn. Polska jest na drugim miejscu w Europie pod względem produkcji truskawek. W zakładach produkujących przetwory z owoców miękkich dostępne są także odpady z innych owoców (truskawek, malin, porzeczek, aronii), których ilość także jest znacząca.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wyłoki owocowe odpowiednio przygotowane, o odpowiednim składzie i zgranulowane są doskonałym podłożem do namnażania grzybów *Trichoderma*. Stwierdzono także, że wprowadzone na nich do gleby wyselekcjonowane izolaty *Trichoderma* w istotny sposób ograniczają przeżywalność *S. sclerotiorum* w glebie.

Przedmiotem wynalazku jest podłoże służące do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma*, charakteryzujące się tym, że zawiera wyłoczyny z aronii, wyłoczyny z jabłek, wyłoczyny z malin, wyłoczyny z porzeczek i wyłoczyny z truskawek.

Korzystnie, gdy podłoże zawiera wysuszone wyłoczyny z aronii, wysuszone wyłoczyny z jabłek, wysuszone wyłoczyny z malin, wysuszone wyłoczyny z porzeczki i wysuszone wyłoczyny z truskawek zmieszane ze sobą w stosunku 1:1:1:1:1.

Korzystnie, gdy wysuszone wyłoczyny z aronii, wysuszone wyłoczyny z jabłek, wysuszone wyłoczyny z malin, wysuszone wyłoczyny z porzeczki i wysuszone wyłoczyny z truskawek są zmieszane ze sobą z dodatkiem wody w stosunku 1 dm<sup>3</sup> wody na 25 dm<sup>3</sup> mieszanki oraz poddane granulacji.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób przygotowania podłoża służącego do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma*, polegający na tym, że wysuszone wyłoczyny z aronii, wysuszone wyłoczyny z jabłek, wysuszone wyłoczyny z malin, wysuszone wyłoczyny z porzeczki i wysuszone wyłoczyny z truskawek miesza się ze sobą w stosunku 1:1:1:1:1, następnie dodaje się wodę, korzystnie w ilości 1 dm<sup>3</sup> wody na 25 dm<sup>3</sup> mieszanki, miesza się wszystkie składniki do uzyskania masy o jednolitej konsystencji, następnie w czasie korzystnie do 2–3 godzin po wymieszaniu uzyskaną masę poddaje się granulacji, po czym uzyskany granulaturę suszy się w temperaturze 20–25°C przez okres do 10 dni.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie podłoża do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma* i ograniczania populacji grzybów patogenicznych *Sclerotinia sclerotiorum*.

Korzystnie namnażanie grzyba z rodzaju *Trichoderma* przeprowadza się w ten sposób, że wcześniej zamrożone fragmenty grzybni przechowywane w glicerolu przekłada się na przygotowaną na szalkach Petriego pożywkę ziemniaczaną (PDA), następnie świeży fragment kolonii namnaża się na pożywce MEA, a szalki inkubuje się przez okres do 7 dni w temp. 25°C, po czym grzybnię z szalki porośniętej izolatem *Trichoderma* miksuje się z dodatkiem 50 ml NaCl (0,85%) i inokuluje podłoże, korzystnie w stosunku 25 ml zawiesiny na 5 dm<sup>3</sup> podłoża, z dodatkiem wody w ilości 150 ml na 1 dm<sup>3</sup> podłoża, a następnie podłoże inkubuje się w temperaturze pokojowej, na świetle, przez okres do 18 dni.

Poniżej przedstawiono przykład realizacji wynalazku.

#### Przykład 1

##### Etap 1. Przygotowanie podłoża

Wysuszone wyłoczyny z aronii, wysuszone wyłoczyny z jabłek, wysuszone wyłoczyny z malin, wysuszone wyłoczyny z porzeczki i wysuszone wyłoczyny z truskawek zmieszano ze sobą w stosunku 1:1:1:1:1, następnie dodano wody w ilości 1 dm<sup>3</sup> wody na 25 dm<sup>3</sup> mieszanki, zmieszano wszystkie składniki do uzyskania masy o jednolitej konsystencji, następnie w ciągu 3 godzin po wymieszaniu uzyskaną masę poddano granulacji, po czym uzyskany granulaturę suszono w temperaturze 20–25°C przez okres 10 dni.

Zbadano skład chemiczny uzyskanego podłoża. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1  
Skład chemiczny podłoża

<i>Badana cecha (makroskładniki, formy łatwo rozpuszczalne)</i>	<i>Jednostka</i>	<i>Wynik</i>
1	2	3
N-NO <sub>3</sub> (azot-azotanowy)	mg/kg s.m.	<10
P-PO <sub>4</sub> (fosfor)	mg/kg s.m.	1900
K (potas)	mg/kg s.m.	5832
Ca (wapń)	mg/kg s.m.	3430
Mg (magnez)	mg/kg s.m.	1509
<i>Badana cecha (zawartości ogólne)</i>	<i>Jednostka</i>	<i>Wynik</i>
N (azot)	% s.m.	2,23
P (fosfor)	% s.m.	0,31
K (potas)	% s.m.	0,62
Ca (wapń)	% s.m.	0,4
Mg (magnez)	% s.m.	0,15
Na (sód)	% s.m.	0,01
S-SO <sub>4</sub> (siarka)	% s.m.	0,13

cd. tabeli 1

1	2	3
Fe (żelazo)	mg/kg s.m.	859
Mn (mangan)	mg/kg s.m.	50,9
Cu (miedź)	mg/kg s.m.	12,4
Zn (cynk)	mg/kg s.m.	33,2
B (bor)	mg/kg s.m.	4,09
<i>Badana cecha (właściwości fizyczne)</i>	<i>Jednostka</i>	<i>Wynik</i>
Sucha masa	%	87,8
Zawartość substancji organicznej	% m/m	78,4
Zawartość popiołu	% m/m	21,6
C (węgiel ogólny)	% m/m	39,2

Analizy chemiczne materiałów organicznych przeprowadzono dwiema metodami: ekstrakcji makroskładników rozpuszczalnych w 2% kwasie octowym (N, P, K, Ca, Mg); mineralizacji mikrofalowej w stężonym kwasie azotowym w układzie zamkniętym (P, K, Ca, Mg, Na, S, Cl, Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo) i mineralizacji w stężonym kwasie siarkowym (N ogólny). Analizowane składniki mineralne oznaczano metodami spektrometrii plazmowej, absorpcji atomowej oraz metodami kolorymetrycznymi tzw. segmented flow system. Właściwości fizyczne materiałów organicznych określano zgodnie z procedurami wg norm PN-EN 1339, PN-EN 1340, PN-EN 1341 przy wykorzystaniu aparatu piaskowo/kaolinowego firmy Eijkelkamp, suszarki i pieca do spalań (C, zawartość popiołu).

#### Etap 2. Namnażanie szczepów grzyba *Trichoderma* na podłożu

Do namnażania zastosowano następujące izolaty grzybów *Trichoderma*: *T. virens* (izolat TRS 114), *T. atroviride* (izolat TRS 25), *T. gamsii* (izolat TRS 123). Grzyby te w doświadczeniach laboratoryjnych wykazywały właściwości antagonistyczne w stosunku do *S. sclerotiorum*, pasożytując sklerocja tego grzyba.

W celu namnożenia grzybów wyjęto zamrożone fragmenty grzybni z glicerolu i przełożono na przygotowaną na szalkach Petriego pożywkę ziemniaczaną (PDA). Następnie świeży fragment kolonii namnażano na pożywce MEA. Szalki inkubowano przez 5–7 dni w temp. 25°C w termostatach. Następnie grzybnię z szalki porośniętej izolatem *Trichoderma* zeskrobano z powierzchni i zmiksowano z 50 ml NaCl (0,85%). Zawiesina grzybni i zarodników w ilości 25 ml wystarczała do inokulacji 5 litrów granulatu. W celu zapewnienia odpowiednich warunków do rozwoju grzybów *Trichoderma*, do wysuszonego granulatu dodawano wodę wodociągową w ilości 150 ml/dm<sup>3</sup> podłoża. Podłoża inkubowano w temperaturze pokojowej, na świetle, przez 10–18 dni. Po tym czasie uzyskiwano całkowite przerośnięcie grzybnią podłoża i intensywne zarodnikowanie. Metodą posiewów na pożywkę Martina określano liczebność grzybów *Trichoderma* w podłożu. Stwierdzono, że w 1 g podłoża znajdowało się ok. 10<sup>9</sup> jednostek propagacyjnych grzyba *Trichoderma*, przedstawionych jako jednostki tworzące kolonie (jtk).

#### Etap 3. Wytwarzanie sklerocjów *S. sclerotiorum*

Grzyby *S. sclerotiorum* namnażano w kolbach (poj. 1 dm<sup>3</sup>) na podłożu z marchwią. Świeżą marchew umyto, obrano, pokrojono i umieszczono w kolbach (0,25 objętości) z 50 ml wody destylowanej. Następnie autoklawowano dwukrotnie w temp. 121°C przez 20 minut. Potem w każdej kolbie umieszczono po 3 krążki (śr. 0,5 cm) wycięte z pożywki porośniętej grzybnią *S. sclerotiorum*. Po 4-tygodniowej inkubacji w temperaturze 25°C w kolbach wytworzyły się sklerocja *S. sclerotiorum*. Pożywkę wraz z grzybnią i sklerocjami przemywano przez sito o średnicy oczek 1,25 mm i izolowano sklerocja. Sklerocja suszono przez kilka dni w temperaturze pokojowej, a następnie przechowywano w zamkniętym pojemniku w temperaturze ok. 5–8°C.

#### Etap 4. Ocena wpływu podłoża przerośniętego grzybami *Trichoderma* na przeżywalność sklerocjów *S. sclerotiorum*

##### Doświadczenie 1

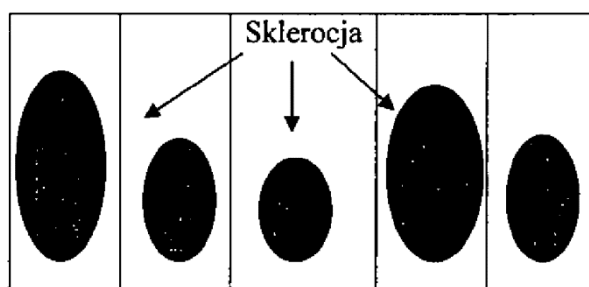
Przeprowadzono doświadczenie w 3-litrowych pojemnikach wypełnionych glebą o następujących właściwościach: pH 6,6; zasolenie 0,18 g NaCl/litr gleby; N-NO<sub>3</sub> – 21; P – 3331; K – 226; Mg – 73; Ca – 1040; N-NH<sub>4</sub> – 2,30 mg/litr gleby. Do gleby dodano podłoże przerośnięte izolatami

*Trichoderma*: TRS 25, TRS 114, TRS 123 w ilości 1%. W każdej doniczce umieszczono woreczki z siatki nylonowej (6x4 cm), podzielonej na kieszonki zawierające po 5 sklerocjów *S. sclerotiorum* (każde sklerocjum w oddzielnej kieszonce – schemat 1). W każdej doniczce umieszczono po 3 takie woreczki (3x5 = 15 sklerocjów). Przygotowano po 3 doniczki dla każdego powtórzenia. Kontrolę stanowiła gleba bez dodatków. Przygotowano także kombinacje z podłożem nieprzerośniętym grzybami *Trichoderma*.

Zbadano następujące kombinacje:

- 1) kontrola – gleba bez dodatków;
- 2) gleba + podłoże;
- 3) gleba + podłoże + TRS 25;
- 4) gleba + podłoże + TRS 123;
- 5) gleba + podłoże + TRS 114.

Schemat 1. Woreczek ze sklerocjami



#### Doświadczenie 2

W celu weryfikacji poprzednich obserwacji dotyczących toksycznego wpływu podłoża przerośniętego grzybem *Trichoderma* na *S. sclerotiorum* przeprowadzono doświadczenie w 10-litrowych pojemnikach wypełnionych glebą o następujących właściwościach: pH 7,4; zasolenie 0,16 g NaCl/litr gleby; N-NO<sub>3</sub> – 18; P – 56; K – 57; Mg – 81, Ca – 1180 mg/litr gleby. Do gleby dodano podłoże przerośnięte i nieprzerośnięte izolatem *Trichoderma* TRS 25 w ilości 1%. W kombinacji 4, bez podłoża, izolat *Trichoderma* TRS 25 dodano w postaci zawiesiny w ilości odpowiadającej wprowadzeniu tego grzyba wraz z podłożem. W każdym pojemniku umieszczono po 3 woreczki, zawierające po 5 sklerocjów *S. sclerotiorum*. Po wymieszaniu gleby z poszczególnymi składnikami i doprowadzeniu do jednokowej wilgotności ok. 60% pojemniki przykryto zapewniając dopływ powietrza. Wilgotność utrzymywano na podobnym poziomie w trakcie całego okresu inkubacji w temp. pokojowej ok. 20–22°C. Dla każdej kombinacji przygotowano po 3 pojemniki.

Zbadano następujące kombinacje:

- 1) kontrola – gleba bez dodatków + sklerocja *S. sclerotiorum*;
- 2) gleba + podłoże + sklerocja *S. sclerotiorum*;
- 3) gleba + podłoże + TRS 25 + sklerocja *S. sclerotiorum*;
- 4) gleba + TRS 25 + sklerocja *S. sclerotiorum*.

Etap 5. Ocena przeżywalności sklerocjów *S. sclerotiorum* w glebie z dodatkiem podłoża i izolatów *Trichoderma*

Po okresie inkubacji woreczki wyjęto z gleby i określono liczbę pozostałych sklerocjów (sklerocja „odzyskane”). Następnie sklerocja wysterylizowano w 70% etanolu przez 3 minuty, dwukrotnie wypłukano w sterylnej wodzie destylowanej i wyłożono na szalki z pożywką ziemniaczaną (PDA-Merck) z dodatkiem antybiotyków: streptomycyny i rifampicyny. Sklerocja wyłożono po 2 lub 3 sztuki na szalkę w doświadczeniu 1 i po 1 sztuce na szalkę w doświadczeniu 2. Po 10 dniach inkubacji w temperaturze 25°C zaobserwowano wyrastającą ze sklerocjów grzybnię. Identyfikacja grzybów *S. sclerotiorum* była stosunkowo łatwa, ponieważ na wyrastającej z żywych sklerocjów grzybni bardzo szybko, w ciągu ok. 6–10 dni, wytworzyły się nowe, bardzo charakterystyczne sklerocja.

Analizę statystyczną wyników wykonano na podstawie analizy wariancji. Porównano średnie w poszczególnych seriach doświadczeń przy wykorzystaniu testu Newmana-Keuls'a o czynniku alfa<0,05.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu 1 wykazały, że zastosowane w doświadczeniach izolaty *Trichoderma* (TRS 123, TRS 25, TRS 114), wniesione wraz z podłożem, zmniejszyły przeżywalność

sklerocjów patogena *S. sclerotiorum*. Liczby sklerocjów spasożytowanych przez grzyby *Trichoderma* były nieco zróżnicowane w zależności od zastosowanego izolatu i doświadczenia, jednak we wszystkich przypadkach obserwowano obniżenie przeżywalności patogena. Zastosowano 3 różne gatunki grzybów *Trichoderma*: *T. atroviridae*, *T. virens* i *T. gamsii*. Istotne jest, że opracowane podłoże jest dobre dla różnych gatunków *Trichoderma* i jest skuteczne w zwalczaniu patogena bez względu na gatunek *Trichoderma*.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu 2 wykazały, że wzbogacenie gleby o podłoże oraz podłoże z izolatem *Trichoderma* obniżało przeżywalność sklerocjów patogena *S. sclerotiorum* o 26–35% w stosunku do gleby kontrolnej bez dodatków. Zaobserwowano także, że obecność podłoża znacznie obniżała kondycję sklerocjów, które „przeżyły”. W wielu przypadkach sklerocja te wytwarzały bardzo delikatną grzybnię, a następnie, znacznie później, sklerocja w śladowej ilości. Dodatek samego izolatu *Trichoderma* był w tym przypadku znacznie mniej skuteczny.

Przeżywalność sklerocjów *S. sclerotiorum* obniżała się także w kombinacjach wzbogaconych w samo podłoże. Należy jednak podkreślić, że podłoża zawierające izolaty *Trichoderma* były skuteczniejsze. Obydwa te czynniki: podłoże z wyłoków i grzyby *Trichoderma* pasożytujące sklerocja, działały synergistycznie. Wyłoki owocowe zawierają w swoim składzie związki biologicznie aktywne, np. związki fenolowe – kwasy fenolowe, flawonoidy, ligniny, polimeryczne taniny i inne (Alberto i in. 2006; Velicanski i in. 2012; Kosmala i in. 2013). Wg Tarko i in. (2012) zawartość polifenoli w odpadach owocowych jest ok. 5 razy większa niż w wyłokach buraczanych czy marchwiowych. Związki zawarte w wyłokach, wchodzących w skład podłoża, wraz z powstającymi w trakcie jego rozkładu w glebie innymi związkami działającymi allelopatycznie (kwasy organiczne, amoniak i inne) mogą uszkadzać zewnętrzne komórki sklerocjum *S. sclerotiorum* i ułatwiać ich pasożytowanie przez grzyby *Trichoderma*. Ekspozycja patogena *S. sclerotiorum* na związki wydzielające się z rozkładu materiału organicznego najprawdopodobniej zwiększała także efektywność ich zasiedlenia przez inne grzyby glebowe. Podobne zjawisko zostało opisane w przypadku innego grzyba tworzącego sklerocja *Sclerotium cepivorum* (Smolińska 2004) oraz microsklerocjów *Verticillium dahliae* (Smolińska i in. 2010) po dodaniu do gleby materiału z roślin *Brassicaceae*.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Podłoże, zawierające substancje organiczne, służące do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma*, **znamiennie tym**, że zawiera wyłoczyny z aronii, wyłoczyny z jabłek, wyłoczyny z malin, wyłoczyny z porzeczki i wyłoczyny z truskawek.
2. Podłoże według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że zawiera wysuszone wyłoczyny z aronii, wysuszone wyłoczyny z jabłek, wysuszone wyłoczyny z malin, wysuszone wyłoczyny z porzeczki i wysuszone wyłoczyny z truskawek zmieszane ze sobą w stosunku 1:1:1:1:1.
3. Podłoże według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że wysuszone wyłoczyny z aronii, wysuszone wyłoczyny z jabłek, wysuszone wyłoczyny z malin, wysuszone wyłoczyny z porzeczki i wysuszone wyłoczyny z truskawek są zmieszane ze sobą z dodatkiem wody w stosunku 1 dm<sup>3</sup> wody na 25 dm<sup>3</sup> mieszanki oraz poddane granulacji.
4. Sposób przygotowania podłoża, jak zdefiniowano w zastrz. 1, polegający na mieszaniu składników organicznych, **znamiennie tym**, że wysuszone wyłoczyny z aronii, wysuszone wyłoczyny z jabłek, wysuszone wyłoczyny z malin, wysuszone wyłoczyny z porzeczki i wysuszone wyłoczyny z truskawek mieszają się ze sobą w stosunku 1:1:1:1:1, następnie dodaje się wodę, korzystnie w ilości 1 dm<sup>3</sup> wody na 25 dm<sup>3</sup> mieszanki, mieszają się wszystkie składniki do uzyskania masy o jednolitej konsystencji, następnie w czasie korzystnie do 2–3 godzin po wymieszaniu uzyskaną masę poddaje się granulacji, po czym uzyskany granulaturę suszy się w temperaturze 20–25°C przez okres do 10 dni.
5. Zastosowanie podłoża, jak zdefiniowano w zastrz. 1, do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma* i ograniczania populacji grzybów patogenicznych, w szczególności *Sclerotinia sclerotiorum*.
6. Zastosowanie według zastrz. 5, w którym zamrożone fragmenty grzyba z rodzaju *Trichoderma* przechowywane w glicerolu przekłada się na pożywkę ziemniaczaną (PDA), następnie świeży fragment grzyba namnaża się na pożywce MEA i inkubuje się przez okres do 7 dni w temp. 25°C, po czym uzyskany grzyb *Trichoderma* miksuje się z dodatkiem 50 ml

NaCl (0,85%) i wprowadza do podłoża, korzystnie w ilości 25 ml zawiesiny na 5 dm<sup>3</sup> podłoża, z dodatkiem wody w ilości 150 ml na 1 dm<sup>3</sup> podłoża, następnie podłoże zawierające zawiesinę inkubuje się w temperaturze 18–26°C przez okres do 18 dni.