



Ministerstwo Rolnictwa
i Rozwoju Wsi

InHort
INSTYTUT OGRODNICTWA

OCENA PRZYDATNOŚCI SUBSTANCJI PODSTAWOWYCH W OGRANICZANIU PLAMISTOŚCI BAKTERYJNEJ W UPRAWIE BOCZNIAKA I ZIELONEJ PLEŚNI W UPRAWIE PIECZARKI

Autor:

dr inż. Joanna Szumigaj-Tarnowska

Zespół wykonujący doświadczenia: dr inż. Joanna Szumigaj-Tarnowska, mgr inż. Zbigniew Uliński,
mgr Patrycja Kotańska, Alina Lichman, Halina Łągiewska

Opracowanie przygotowane w Instytucie Ogrodnictwa – PIB
w ramach zadania celowego nr 7.2: „**Opracowanie technologii produkcji warzyw i grzybów
jadalnych w systemie ekologicznym**”

finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice, 2024

Cel zadania

Celem badań prowadzonych w roku 2024 była ocena skuteczności substancji podstawowych (nadtlenek wodoru) w ograniczaniu plamistości bakteryjnej w uprawie boczniaka i zielonej pleśni w uprawie pieczarki. Ponadto badano wrażliwość izolatów grzyba *Trichoderma aggressivum*, wywołujących zieloną pleśń, oraz bakterii *Pseudomonas 'gingeri'*, wywołujących plamistość bakteryjną, na nadtlenek wodoru w warunkach laboratoryjnych.

1. Boczniak

Metodyka

Badania laboratoryjne

Skuteczność nadtlenku wodoru w hamowaniu rozwoju izolatów *P. 'gingeri'* określano w pożywce płynnej (bulion odżywczy), w której przygotowano odpowiednie stężenia nadtlenku wodoru, tj. 60; 100; 120; 180 ppm. Do badań wytypowano pięć izolatów bakterii. Do pożywki następnie dodawano 100 µl zawiesiny komórek bakterii o inokulum $1,0 \times 10^6$ jtk/ml. Hodowle inkubowano w temperaturze 24-25°C, a po 24 godzinach wysiewano je na agar odżywczy metodą rozcieńczeń w celu określenia liczby komórek bakteryjnych. Następnie liczono wyrosłe kolonie bakteryjne.

Ponadto określono wrażliwość grzybni boczniaka na nadtlenek wodoru na agarowej pożywce ziemniaczanej zawierającej takie same stężenia substancji, jak w pożywce płynnej dla bakterii.

Badania uprawowe

Uprawę boczniaka przeprowadzono w hali uprawowej. Na regałach uprawowych umieszczono 36 kostek podłoża boczniakowego przerośniętego grzybnią. W hali utrzymywano temperaturę 17-19°C, wilgotność 85-90% i światło o natężeniu 300-500 lx przez 12 godzin na dobę. W okresie dorastania owocników wilgotność obniżono do 80%. Zapewniono dobre wietrzenie hali, tak aby stężenie dwutlenku węgla nie przekraczało 800 ppm (fot. 1).

Doświadczenie obejmowało następujące kombinacje: kontrolna, nadtlenek wodoru, 5 kombinacji infekowanych komórkami bakterii *P. 'gingeri'* (5 izolatów) oraz 5 kombinacji badanych (5 izolatów i nadtlenek wodoru). Każdą kombinację założono w trzech powtórzeniach. Kostki boczniaka w miejscu naciętych otworów infekowano zawiesiną komórek bakterii o inokulum $1,0 \times 10^5$ jtk/ml w ilości 100 µl na otwór. Do badań wykorzystano pięć izolatów, wywołujących objawy plamistości imbirowej. Następnie miejsce infekcji traktowano roztworem nadtlenku wodoru o stężeniu 120 ppm. W pierwszym i drugim rzucie owocników oceniano plon i rozwój choroby w uprawie.



Fot. 1. Uprawa boczniaka w hali uprawowej

Wyniki

Wyniki wpływu różnych stężeń nadtlenu na wzrost grzybni bocznika oraz pięciu izolatów *P. 'gingeri'* przedstawiono w tabeli 1. Stężenie nadtlenu wodoru 120 ppm w pożywce istotnie zahamowało rozwój grzybni bocznika. Wzrost bakterii był ograniczony przy stężeniu nadtlenu wodoru 60-120 ppm. W stężeniu 120 ppm stwierdzono o 4 rzędy wielkości mniejszą liczbę komórek bakterii niż w próbkach kontrolnych, ale badane izolaty bakterii nadal wykazywały wzrost (najmniejsze stężenie bakteriostatyczne) (tabela 1).

Tabela 1. Wpływ różnych stężeń nadtlenu bocznika na wzrost *in vitro* grzybni bocznika *Pleurotus ostreatus* oraz izolatów *Pseudomonas 'gingeri'*

Kombinacja	Stężenie nadtlenu wodoru w pożywce agarowej				
	0,0	60 ppm	100 ppm	120 ppm	180 ppm
Bocznik <i>P. ostreatus</i>	40,0 A	36,0 AB	33,0 AB	27,0 B	20,0 B
<i>P. 'gingeri'</i> MO	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^5$	-	-	-
<i>P. 'gingeri'</i> B1.10	$3,2 \times 10^8$	$6,4 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	-
<i>P. 'gingeri'</i> B08-7	$4,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	-
<i>P. 'gingeri'</i> B3.20	$2,2 \times 10^8$	$4,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	-
<i>P. 'gingeri'</i> B17.03	$1,5 \times 10^8$	$6,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$	-

Do ochrony bocznika przed rozwojem bakterii *P. 'gingeri'* zastosowano nadtlenek wodoru w stężeniu 120 ppm. Mimo, że w tym stężeniu wzrost grzybni bocznika został ograniczony, było to najmniejsze stężenie bakteriostatyczne określone w badaniach *in vitro*. Założono również, że w warunkach laboratoryjnych wrażliwość grzybni bocznika na nadtlenek wodoru jest większa, z uwagi na stałą obecność substancji w pożywce, natomiast w podłożu uprawowym, optymalnym dla wzrostu grzybni, jest ona bardziej odporna na substancje chemiczne.

Po zainfekowaniu podłoża bocznikowego komórkami bakterii, objawy choroby (żółto-brązowe plamy) wystąpiły w niewielkim nasileniu i w ilości, które nie miały wpływu na plon owocników (tabela 2). Poza tym wystąpiły w kostce, która została zainfekowana izolatem B3.20 oraz potraktowana roztworem nadtlenu wodoru (fot. 2-4). Stwierdzono, że zastosowanie nadtlenu wodoru nie ograniczyło rozwoju bakterii w uprawie bocznika. Ponadto plon owocników z kostek traktowanych roztworem badanej substancji był istotnie niższy niż plon z kostek kontrolnych bez nadtlenu wodoru (tabela 2).

Na podstawie przeprowadzanych badań stwierdzono, że wystąpienie plamistości imbirowej zależy nie tylko od czynnika sprawczego (patogenicznych bakterii), ale przede wszystkim od warunków uprawowych, w tym wilgotności powietrza. Zbyt wysoka wilgotność w trakcie tworzenia owocników oraz kondensacja pary na kostkach są główną przyczyną chorób bakteryjnych w uprawie bocznika.

Tabela 2. Plon owocników bocznika (kg/kostka) w uprawie infekowanej bakteriami *Pseudomonas 'gingeri'* i po zastosowaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 120 ppm.

Rzut	Kombinacja	Bez infekcji	B1.10	B3.20	MO	B08-7	B.17.03	Średnia
I	Kontrola	3,14 a*	3,33 a	2,97 a	3,08 a	2,81 a	3,26 a	3,11 A**
	H ₂ O ₂	2,90 a	3,20 a	2,56 a	2,41 a	2,90 a	2,55 a	2,75 B
II	Kontrola	1,70 ab	1,65 b	2,24 a	2,05 a	2,29 a	1,98 a	1,98 A
	H ₂ O ₂	1,88 a	2,06 a	1,96 a	1,86 a	1,95 a	2,06 a	1,97 A
III	Kontrola	0,96 a	0,87 a	0,90 a	0,79 a	0,95 a	0,97 a	0,91 A
	H ₂ O ₂	0,75 a	0,80 a	0,75a	0,83 a	0,87 a	1,02 a	0,83 A
Razem	Kontrola	5,79 a	5,85 a	6,11 a	5,94 a	6,06 a	6,22 a	6,00 A
	H ₂ O ₂	5,53 a	6,06 a	5,26 a	5,10 a	5,70 a	5,63 a	5,55 B

*średnie w rzędach, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

** średnie kolumnach, w obrębie rzutu, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta



Fot. 2-3. Objawy plamistości imbirowej na owocniku bocznika



Fot. 4. Objawy plamistości imbirowej na owocniku bocznika

2. Pieczarka

Metodyka

Badania laboratoryjne

Badania skuteczności nadtlenu wodoru oraz dodatkowo preparatów biologicznych Serenade ASO, Serifel i Limocide w hamowaniu rozwoju dziesięciu izolatów *T. aggressivum* przeprowadzono na agarowej pożywce ziemniaczanej (PDA) w temperaturze 23°C. Skład badanych substancji i stężenia wykorzystane w badaniach przedstawia tabela 3.

Roztwór nadtlenu wodoru oraz biopreparatów przygotowywano w sterylnej wodzie destylowanej, a następnie dodawano do pożywki w odpowiednich stężeniach. Po zastygnięciu pożywki, w centralnej części płytki wykładano aktywną grzybnię *T. aggressivum*, a następnie inkubowano w temperaturze 23-24°C. Wzrost izolatów określano na podstawie średnicy kolonii. Kombinację kontrolną stanowiła pożywka bez preparatów. Wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem testu t-Studenta, przy poziomie istotności $\alpha=0,05$.

Tabela 3. Substancje podstawowe oraz biopreparaty wykorzystane w badaniach.

Rodzaj	Skład	Stężenie
Nadtlenek wodoru	30% nadtlenu wodoru	100; 200; 300; 400 ppm
Limocide	60 g/l (6,0 %) olejek pomarańczowy (związek z grupy olejków eterycznych)	0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0%

Serifel	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> szczep MBI600 ($5,5 \times 10^{10}$ jtk/g)	0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1%
Serenade ASO	<i>Bacillus subtilis</i> szczep QST 713 – 13,96 g/l (minimalne stężenie $1,04 \times 10^{12}$ jtk/l)	0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1%

Badania uprawowe

Ocenę skuteczności biopreparatów w zwalczaniu zielonej pleśni prowadzono w uprawie pieczarki z wykorzystaniem izolatów *Trichoderma* sp. Izolaty zostały pozyskane ze środowiska uprawowego pieczarki, a ich patogeniczność została potwierdzona. Doświadczenie założono w doniczkach wypełnionych podłożem pieczarkowym (1,7 kg) nieprzerośniętym grzybnią pieczarki (podłoże z fazy II) bądź przerośniętym grzybnią pieczarki (podłoże z fazy III).

Do podłoża fazy II wprowadzono grzybnię pieczarki (w ilości 0,8%) na ziarniakach zboża, a następnie podłoże zainfekowano zarodnikami *Trichoderma*, wprowadzając do podłoża zawiesinę zarodników o inokulum 10^4 /ml i 10^3 /ml, w ilości 2,5 ml na doniczkę, co dawało odpowiednio, 12,5 i 1,25 zarodników na 1 g podłoża. Następnie podłoże traktowano badanymi biopreparatami w stężeniach przedstawionych w tabeli 4. Założono 68 następujących kombinacji: 4 kombinacje kontrolne (nietraktowana, Limocide, Serifel i Serenade ASO), 16 kombinacji infekowanych zarodnikami *Trichoderma* (8 izolatów i dwie zawiesiny zarodników) i 48 kombinacji z zarodnikami i preparatami (8 izolatów, dwie zawiesiny zarodników i 3 biopreparaty). Doświadczenie przeprowadzono dwukrotnie, a każda kombinacja była założona w czterech powtórzeniach.

W czasie przerostu podłoża grzybnią pieczarki, w hali utrzymywano temperaturę 22–23°C, stężenie dwutlenku węgla na poziomie 3800 mg/l i względną wilgotność powietrza 92–95%. Przez dwa tygodnie prowadzono ocenę przerostu grzybni pieczarki w podłożu i rozwój *Trichoderma* sp. według następującej skali: 0–brak przerostu podłoża przez grzybnię pieczarki, rozwój zielonej pleśni; 1–słaby rozwój grzybni pieczarki, rozwój zielonej pleśni; 2–niedostateczny rozwój grzybni pieczarki; 3–prawidłowy rozwój grzybni pieczarki, podłoże przerośnięte w całej objętości.

Tabela 4. Stężenia i dawki biopreparatów zastosowanych w badaniach uprawowych.

Biopreparat	Stężenie	Dawka
Limocide	0,5%	220 ml / 10kg
Serifel	2,5 g preparatu / 27,5 ml H ₂ O ($5,5 \times 10^{10}$ komórek <i>B. amyloliquefaciens</i> / 1 g preparatu)	2,5 g / 10 kg 1 x 10 ⁷ komórek / 1 g podłoża
Serenade ASO	$1,0 \times 10^{12}$ komórek <i>B. subtilis</i> / 1000 ml preparatu	100 ml na 10 kg $1,0 \times 10^7$ komórek na 1 g podłoża

Następnie na przerośnięte podłoże nakładano warstwę ziemi torfowej o grubości 4 cm. Uprawę podlewano przez 3-4 dni, aż do osiągnięcia odpowiedniej ilości wody, tj. 10-12 l/m². Przez kolejne 10 dni obserwowano przerost okrywy przez grzybnię pieczarki, a ocenę dokonano według następującej skali: 0–brak przerostu okrywy przez grzybnię pieczarki, rozwój zielonej pleśni; 1–słaby rozwój grzybni pieczarki i rozwój zielonej pleśni; 2–niedostateczny rozwój grzybni pieczarki, brak zawiązków; 3–niedostateczny rozwój grzybni, mało zawiązków; 4–dobry rozwój grzybni pieczarki, obecne zawiązki; 5–prawidłowy rozwój grzybni i zawiązków na powierzchni okrywy.

Podłoże fazy III zainfekowano zarodnikami *Trichoderma* sp. analogicznie jak podłoże fazy II, następnie do podłoża zaaplikowano biopreparaty w stężeniach jak podano w tabeli 4. Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem czterech izolatów *Trichoderma* sp. Po nałożeniu okrywy torfowej postępowano jak z fazą II. Doświadczenie obejmowało 36 kombinacji: 4 kombinacje kontrolne (nietraktowana, Limocide, Serifel i Serenade ASO), 8 kombinacji infekowanych zarodnikami *Trichoderma* (4 izolaty i dwie zawiesiny zarodników) i 24 kombinacje z zarodnikami i preparatami (4 izolaty, dwie zawiesiny zarodników i 3 biopreparaty). Każda kombinacja była założona w czterech powtórzeniach. W pierwszym i drugim rzucie owocników określano przebieg rozwoju zielonej pleśni na podstawie stopnia nasilenia objawów, terminu pojawienia się pierwszych objawów choroby oraz plonu owocników.

Przeprowadzono również ocenę rozwoju zielonej pleśni w temperaturze 21°C w uprawie po zainfekowaniu zarodnikami *T. aggressivum*.

Wyniki

Badania laboratoryjne

Nadtlenek wodoru w stężeniu 300 ppm po 5 dniach inkubacji zahamował wzrost izolatów *T. aggressivum* o ponad 30%, a w stężeniu 400 ppm - o ponad 75% (tabela 5). W miarę wydłużania czasu inkubacji na pożywkach z nadtlakiem wodoru nastąpił rozwój izolatów *Trichoderma* sp.

Tabela 5. Wpływ różnych stężeń nadtlaku wodoru na wzrost *in vitro* izolatów *Trichoderma aggressivum* (średnica kolonii w mm / zahamowanie rozwoju w %) po 5 dniach inkubacji.

Izolat	Stężenie nadtlaku wodoru w pożywce (ppm)				
	0,0	100	200	300	400
T. CBS	85,0 a	85,0 a / 0,0	85,0 a / 0,0	65,0 a / 23,5	10,0 b / 88,2
T. CNC	85,0 a	45,0 b / 47,1	28,0 c / 67,1	0,0 d / 100,0	0,0 e / 100
T.11.02.	85,0 a	85,0 a / 0,0	80,0 a / 5,9	65,0 a / 23,5	30,0 a / 64,7
T.22.07	85,0 a	85,0 a / 0,0	80,0 a / 5,9	68,0 a / 20,0	5,0 b / 94,1
T.3.2	85,0 a	85,0 a / 0,0	85,0 a / 0,0	60,0 a / 29,4	10,0 b / 88,2
T.5.11	85,0 a	85,0 a / 0,0	75,0 a / 0,0	60,0 a / 29,4	20,0 b / 76,5
T. 3.9	85,0 a	85,0 a / 0,0	80,0 a / 5,9	50,0 a / 41,2	30,0 b / 64,7
T.26.05	80,0 a	80,0 a / 0,0	76,0 a / 5,0	65,0 a / 23,5	10,0 / 88,2
T.20	85,0 a	85,0 a / 0,0	85,0 a / 0,0	70,0 a / 17,6	60,0 a / 29,4
P23	85,0 a	85,0 a / 0,0	80,0 a / 5,9	70,0 a / 17,6	30,0 a / 64,7
średnia	84,5 a	80,5 a / 4,7	75,9 a / 10,7	57,3 a / 32,6	20,5 b / 75,9

średnie w rzędach w obrębie izolatów, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

Wykazano wysoką wrażliwość *Trichoderma* sp. na preparat Limocide, gdyż stężenie 0,1% istotnie obniżyło wzrost wszystkich badanych izolatów, a średnie zahamowanie wzrostu wyniosło prawie 63% (tabela 6). Ograniczone było również zarodnikowanie grzybów na pożywce z dodatkiem preparatu. Przy stężeniu 0,5% wzrost większości izolatów był zahamowany w ponad 80%.

Tabela 6. Wpływ różnych stężeń preparatu Limocide na wzrost *in vitro* izolatów *Trichoderma aggressivum* (średnica kolonii w mm / zahamowanie rozwoju w %) po 5 dniach inkubacji.

Izolat	Stężenie preparatu Limocide (%)					
	0,0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
T. CBS	85,0 a	35,0 b / 58,8	20,0 / 76,5	17,0 / 80,0	16,0 / 81,2	8,0 / 90,6
T. CNC	85,0 a	25,0 b / 70,6	18,0 b / 78,8	14,0 b / 83,5	10,0 bc / 88,2	0,0 c / 100
T. 11.02.	85,0 a	16,0 b / 81,2	13,0 b / 84,7	12,0 b / 85,9	10,0 bc / 88,2	8,0 c / 90,6
T. 22.07	85,0 a	40,0 b / 52,9	34,0 b / 60,0	20,0 c / 76,5	12,0 c / 85,9	0,0 d / 100
T. 3.2	85,0 a	25,0 b / 70,6	18,0 bc / 78,8	15,0 c / 82,4	10,0 c / 88,2	5,0 d / 94,1
T. 3.9	85,0 a	34,0 b / 40,0	22,0 c / 74,1	21,0 c / 75,3	18,0 cd / 78,8	12,0 d / 85,9
T 5.11	85,0 a	40,0 b / 52,9	30,0 b / 64,7	24,0 bc / 71,7	20,0 c / 76,5	10,0 c / 88,2
T.26.05	80,0 a	36,0 b / 55,0	25,0 bc / 68,7	20,0 cd / 75,0	15,0 d / 81,2	10,0 d / 87,5
T. P23	85,0 a	33,0 b / 61,2	19,0 c / 77,6	16,0 c / 81,2	14,0 cd / 83,5	8,0 d / 90,6
średnia	84,4 a	31,6 b / 62,6	22,1 bc / 73,8	17,1 c / 79,0	13,9 c / 83,5	6,8 d / 92,0

średnie w rzędach w obrębie izolatów, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

Stwierdzono bardzo wysoką skuteczność preparatu Serenade ASO w hamowaniu rozwoju *T. aggressivum*. Stężenie 0,005% ograniczyło rozwój izolatów o ponad 60%, a stężenie 0,05% - o ponad 80% (tabela 7).

Tabela 7. Wpływ różnych stężeń preparatu Serenade ASO na wzrost *in vitro* izolatów *Trichoderma aggressivum* (średnica kolonii w mm / zahamowanie rozwoju w %) po 5 dniach inkubacji.

Izolat	Stężenie preparatu Serenade ASO (%)					
	0,0	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1
T. CBS	85,0 a	50,0 b / 41,1	38,0 c / 55,3	30,0 c / 64,7	18,0 d / 78,8	10,0 d / 88,2
T. CNC	85,0 a	45,0 b / 47,1	32,0 c / 62,3	25,0 d / 70,6	16,0 e / 81,2	10,0 e / 88,2
T. 11.02.	85,0 a	36,0 b / 57,6	20,0 c / 76,5	12,0 d / 85,9	10,0 d / 88,2	0,0 d / 100
T. 22.07	85,0 a	36,0 b / 57,6	30,0 b / 64,7	20,0 c / 76,5	12,0 d / 86,0	5,0 d / 94,1
T. 3.9	85,0 a	28,0 b / 67,0	22,0 b / 74,0	20,0 b / 76,5	10,0 c / 88,2	5,0 c / 94,1
T.5.11	85,0 a	25,0 b / 70,5	20,0 b / 76,4	18,0 bc / 78,8	15,0 cd / 82,3	10,0 d / 88,2
T.26.05	80,0 a	60,0 b / 25,0	50,0 c / 37,5	33,0 d / 58,7	17,0 e / 78,7	12,0 e / 85,0
T. P23	85,0 a	50,0 b / 41,2	40,0 bc / 52,9	30,0 c / 64,7	12,0 d / 85,9	10,0 d / 88,2
średnia	84,4 a	41,3 b / 51,0	31,5 bc / 62,5	23,5 c / 72,0	13,8 d / 83,7	7,8 d / 90,8

średnie w rzędach w obrębie izolatów, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

W tabeli 8 przedstawiono wyniki wzrostu izolatów *T. aggressivum* na pożywkach zawierających różne stężenia preparatu Serifel. Stężenie 0,005% ograniczyło rozwój *T. aggressivum* o 67,5%, a stężenie 0,05% - blisko o 90%.

Tabela 8. Wpływ różnych stężeń preparatu Serifel na wzrost *in vitro* izolatów *Trichoderma aggressivum* (średnica kolonii w mm / zahamowanie rozwoju w %) po 5 dniach inkubacji.

Izolat	Stężenie preparatu Serifel (%)					
	0,0	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1
T. CBS	85,0 a	60,0 b / 29,4	30,0 c / 64,7	25,0 c / 70,5	14,0 d / 83,5	12,0 d / 85,8
T. CNC	85,0 a	60,0 b / 29,4	36,0 c / 57,6	25,0 c / 70,5	14,0 bc / 83,5	14,0 c / 83,5
T. 11.02.	85,0 a	26,0 b / 69,4	20,0 b / 76,4	12,0 bc / 85,8	5,0 c / 94,1	5,0 c / 94,1
T. 22.07	85,0 a	20,0 b / 76,4	20,0 b / 76,4	15,0 bc / 82,3	8,0 c / 90,5	0,0 d / 100
T. 3.9	85,0 a	35,0 b / 58,8	22,0 c / 74,1	18,0 c / 78,8	10,0 cd / 88,2	5,0 d / 94,1
T.5.11	85,0 a	30,0 b / 64,7	28,0 b / 67,0	23,0 b / 73,0	16,0 c / 81,1	14,0 c / 83,5
T.26.05	80,0 a	60,0 b / 25,0	33,0 c / 58,7	28,0 c / 65,0	12,0 d / 85,0	12,0 d / 85,0
T. P23	85,0 a	40,0 b / 52,9	30,0 c / 64,7	26,0 c / 69,5	10,0 cd / 88,2	8,0 d / 90,6
średnia	84,4 a	41,4 b / 50,8	27,4 b / 67,5	21,5 bc / 74,4	11,1 c / 86,8	8,8 c / 89,6

średnie w rzędach w obrębie izolatów, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

Badania uprawowe

Do oceny skuteczności w ochronie pieczarki przed zieloną pleśnią wytypowano tylko biopreparaty, gdyż nadtlenek wodoru nie hamował skutecznie rozwoju izolatów *T. aggressivum*.

Średni stopień przerośnięcia podłoża pieczarkowego po zainfekowaniu zarodnikami *T. aggressivum* w liczbie 12,5 / 1 g w kombinacjach kontrolnych był od 0,5 do 4,4 (tabela 9). W przypadku trzech izolatów (T.11.02, T.P23 i T.20) w kombinacjach z preparatami stwierdzono lepszy przerost grzybni pieczarki (4,6-5,0) niż w uprawach bez preparatów. Izolat T.3.9 całkowicie zahamował rozwój pieczarki we wszystkich kombinacjach.

W kombinacjach zainfekowanych zarodnikami w liczbie 1,25 na 1 g podłoża stwierdzono przerost grzybni pieczarki w zakresie od 3,0 do 5,0. W kombinacjach z preparatami nie obserwowano lepszego przerostu grzybni pieczarki, a średni przerost grzybni w tych kombinacjach wynosił 4,5 (tabela 9).

Tabela 9. Ocena przerośnięcia podłoża przez grzybnię pieczarki po zainfekowaniu zarodnikami izolatów *Trichoderma aggressivum* podłoża fazy II i dodaniu preparatów biologicznych.

Kombinacja / 12,5 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	5,0	5,0	5,0	5,0
CBS	4,3	4,4	4,6	4,9
CNC	4,4	5,0	4,2	4,5
T.11.02	4,3	5,0	4,8	5,0
T.P23	3,7	3,5	4,2	5,0
T.20	3,4	3,8	4,3	4,0
T.26.05	2,8	3,0	2,9	3,3
T.31	4,4	4,3	4,4	4,5
T.3.9.	0,5	0,5	0,0	0,0
średnia	3,6 a	3,8 a	3,8 a	4,0 a
Kombinacja / 1,25 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	5,0	5,0	5,0	5,0
CBS	5,0	5,0	5,0	5,0
CNC	5,0	5,0	5,0	5,0
T.11.02	5,0	5,0	5,0	5,0
T.P23	3,9	4,8	4,5	4,2
T.20	5,0	5,0	5,0	5,0
T.26.05	4,0	4,5	4,0	4,5
T.31	4,0	3,5	3,5	4,0
T.3.9	3,0	3,0	3,5	3,0
średnia	4,4 a	4,5 a	4,5 a	4,5 a

średnie w rzędach, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

Ocenę przerośnięcia ziemi okrywowej przez grzybnię pieczarki po zainfekowaniu zarodnikami *T. aggressivum* zestawiono w tabeli 10. Średni stopień przerośnięcia ziemi okrywowej przez grzybnię pieczarki w uprawach bez preparatów, do których dodawano 12,5 zarodników na 1 g podłoża był w zakresie 0,0-3,7, natomiast średnia wyniosła 2,3. W kombinacjach z preparatami przerostu grzybni pieczarki nie był istotnie większy. W kombinacji z Limocide i izolatami CBS, CNC i T.P23 przerost grzybni był nieznacznie lepszy niż w pozostałych kombinacjach.

Średni przerost okrywy w kombinacjach, gdzie dodano zarodniki w liczbie 1,25 / 1g podłoża, wynosił 3,9-4,1. Nieznacznie lepszy przerost okrywy przez grzybnię stwierdzono w kombinacji z Limocide z izolatami CBS, CNC, T.11.02 i T.26.05 w porównaniu z kombinacjami niechronionymi.

Tabela 10. Ocena przerośnięcia ziemi okrywowej przez grzybnię pieczarki po zainfekowaniu zarodnikami izolatów *Trichoderma aggressivum* podłoża fazy II i dodaniu preparatów biologicznych.

Kombinacja / 12,5 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	5,0	5,0	5,0	5,0
CBS	2,0	1,7	2,8	3,0
CNC	2,2	2,2	2,4	3,1
T.11.02	2,7	1,9	3,2	2,5
T.P23	1,2	1,5	1,7	2,9
T.20	1,0	0,7	1,0	1,0

T.26.05	2,2	2,2	1,9	2,2
T.31	3,7	3,7	3,8	4,2
T.3.9.	0,0	0,5	0,5	0,0
średnia	2,2 a	2,2 a	2,5 a	2,7 a
Kombinacja / 1,25 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	5,0	5,0	5,0	5,0
CBS	4,5	3,2	4,8	5,0
CNC	4,8	4,5	5,0	5,0
T.11.02	4,2	4,5	4,5	5,0
T.P23	2,0	4,5	0,8	1,3
T.20	3,8	2,8	4,5	3,8
T.26.05	3,8	4,0	4,0	4,5
T.31	4,0	3,5	3,5	4,0
T.3.9	3,0	3,0	3,5	3,0
średnia	3,9 a	3,9 a	4,0 a	4,1 a

średnie w rzędach, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

W pierwszym rzucie średni plon owocników w kombinacjach zainfekowanych zarodnikami w liczbie 12,5 / 1 g był w zakresie od 1,50 do 2,75 kg/m², a różnice nie były istotne statystycznie (tabela 11). Plon w kombinacjach z preparatami Limocide i Serifel zainfekowanych izolatami CBS, CNC i T.P23 był istotnie wyższy niż w kombinacjach zainfekowanych i bez preparatów (Fot. 5). W kombinacji z izolatami T.3.9 nie uzyskano plonu.

Analiza plonu w kombinacjach zainfekowanych zarodnikami w liczbie 1,25 / 1 g nie wykazała istotnych różnic między nimi. W kombinacji z preparatem Limocide z izolatami CBS i CNC plon był istotnie wyższy niż w kombinacjach niechronionych.

Tabela 11. Plon owocników (kg/m²) uzyskany w I rzucie owocników po zainfekowaniu podłoża pieczarkowego w fazie II przez grzyby *Trichoderma aggressivum*.

Kombinacja / 12,5 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	11,59 Aa	12,28 Aa	12,44 Aa	11,61 Aa
CBS	0,84 Ccd	1,12 BCc	3,27 Abc	2,43 Ac
CNC	0,73 Ccd	1,23 BCc	2,01 ABc	2,48 ABc
T.11.02	2,48 Abc	1,84 Ac	3,79 Abc	2,10 Ac
T.P23	0,91 Ccd	1,31 BCc	2,54 ABc	4,85 Abc
T.20	0,63 Acd	1,11 Ac	0,95 Ad	2,23 Ac
T.26.05	0,71 Acd	0,82 Ac	0,85 Ad	1,62 Acd
T.31	6,04 Aa	5,68 Ab	5,95 Ab	6,32 Ab
T.3.9.	0,0 Ad	0,0 Ac	0,0 Ad	0,0 Ad
średnia	1,54 A	1,64 A	2,42 A	2,75 A
Kombinacja / 1,25 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	11,70 Aa	12,29 Aa	12,48 Aa	11,81 Aa
CBS	7,44 Ab	6,76 Ab	7,97 Ab	9,52 Aab
CNC	6,69 Bb	6,93 Bb	8,13 ABb	10,85 Aab
T.11.02	6,74 Ab	6,51 Ab	8,50 Ab	8,04 Ab
T.P23	2,13 Bc	6,08 Ab	3,12 Bde	0,83 Bc

T.20	6,33 ABb	3,87 Bc	6,06 ABcd	8,04 Ab
T.26.05	6,85 Ab	6,68 Ab	7,78 Abc	9,3 Aab
T.31	11,26 Aa	10,53 Aa	11,76 Aa	11,53 Aa
T.3.9	1,75 Ac	2,42 Ac	1,61 Ae	3,26 Ac
średnia	6,76 A	6,90 A	7,49 A	8,13 A

A, B, C – średnie w rzędach oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

a, b, c - średnie w kolumnach, w obrębie kombinacji, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

Trichoderma. aggressivum CNC



Trichoderma. aggressivum P23



Uprawa kontrolna
zainfekowana

Serenade ASO

Serifel

Limocide

Fot. 5. Pierwszy rzut owocników w kombinacjach zainfekowanych wybranymi izolatami *Trichoderma aggressivum*.

W drugim rzucie w kombinacjach zainfekowanych zarodnikami w liczbie 12,5 / 1 g średni plon był w zakresie 0,66-1,54 kg/m² (tabela 12). W większości kombinacji zainfekowanych *T. aggressivum* nie uzyskano plonu. W kombinacjach z preparatem Limocide z izolatami T.P23 i T.20 plon był istotnie wyższy niż w kombinacjach bez preparatu.

W uprawie zainfekowanej mniejszą liczbą zarodników (1,25/1g) średni plon z kombinacji wynosił 4,08-4,88 kg/m². Nie stwierdzono istotnego wpływu preparatów na wzrost plonu w większości kombinacji, z wyjątkiem kombinacji z preparatem Serenade ASO i izolatem T.P23.

Tabela 12. Plon owocników (kg/m²) uzyskany w II rzucie owocników po zainfekowaniu podłoża pieczarkowego w fazie II przez grzyby *Trichoderma aggressivum*.

Kombinacja / 12,5 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	9,23 Aa	8,81 Aa	8,86 Aa	8,97 Aa
CBS	0,0 Ac	0,5 Ac	0,35 Ac	0,58 Ac
CNC	0,0 Ac	0,71 Ac	0,0 Ac	0,91 Ac
T.11.02	1,11 Ac	1,85 Ac	1,25 Ac	1,62 Abc
T.P23	0,0 Cc	0,74 BC	1,15 Ac	2,61 Abc
T.20	0,0 Bc	0,40 Bc	0,25 Bc	1,92 Abc
T.26.05	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac	0,35 Ac
T.31	4,21 Ab	4,12 Ab	4,25 Ab	4,36 Ab
T.3.9.	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac
średnia	0,66 A	1,04 A	0,91 A	1,54 A

Kombinacja / 1,25 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	9,23 Aa	8,81 Aa	8,86 Aa	8,97 Aa
CBS	5,73 Ab	3,91 Ab	5,30 Ab	5,67 Ab
CNC	5,25 Ab	4,05 Ab	4,64 Ab	5,84 Ab
T.11.02	5,57 Ab	3,60 Ab	3,83 Ab	6,54 Aab
T.P23	0,80 B	4,35 Ab	0,35 Bc	0,23 Bc
T.20	5,25 A	3,55 Ab	4,42 Ab	3,87 Ab
T.26.05	1,20 A	0,51 Ac	1,12 Ac	1,25 Ac
T.31	7,22 Aab	7,78 Aa	7,63 Aab	7,46 Aab
T.3.9	1,23 A	0,78 Ac	0,68 Ac	1,21 Ac
średnia	4,88 A	4,15 A	4,08 A	4,53 A

A, B, C – średnie w rzędach oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

a, b, c - średnie w kolumnach, w obrębie kombinacji, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

W kolejnym etapie badań prowadzono ocenę skuteczności biopreparatów w ochronie przed zieloną pleśnią na podłożu pieczarkowym fazy III, tj. z przerośniętą grzybnią pieczarki. Zainfekowanie podłoża zarodnikami *T. aggressivum* w ilości 1,25 i 12,5 na 1 g, nie wywołało objawów choroby w uprawie, zarówno w rzucie pierwszym, jak i w drugim (Fot. 6-7).



Fot. 6-7. Uprawa zainfekowana zarodnikami *Trichoderma aggressivum* – podłoże III fazy.

Średni plon owocników w I rzucie w kombinacjach zainfekowanych zarodnikami w liczbie 12,5 na 1 g podłoża wynosił 9,77-10,79 kg/m², a różnice między kombinacjami nie były istotne. W uprawie z mniejszą liczbą zarodników uzyskano podobne wartości plonu.

Tabela 13. Plon owocników (kg/m²) uzyskany w I rzucie po zainfekowaniu podłoża pieczarkowego w fazie III przez izolaty *T. aggressivum*.

Kombinacja / 12,5 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	11,86	11,54	11,12	11,69
CBS	9,92	9,16	11,26	9,28
T.11.02	11,34	9,64	11,36	11,22
T.P23	9,93	8,89	9,94	11,05
T.20	9,75	9,63	10,25	10,32
średnia	10,56 A	9,77 A	10,79 A	10,71 A
Kombinacja / 1,25 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	11,23	11,44	11,22	11,80
CBS	10,05	10,22	9,75	10,59

T.11.02	11,12	9,11	9,88	10,91
T.P23	9,89	9,68	10,20	10,32
T.20	10,12	10,03	9,41	10,41
średnia	10,48 A	10,10 A	10,09 A	10,81 A

średnie w rzędach oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

W II rzucie w kombinacjach zainfekowanych zarodnikami w liczbie 12,5 na 1 g podłoża średni plon owocników wynosił 11,06-11,51 kg/m² i nie różnił się między nimi (tabela 14). W kombinacjach, do których wprowadzono mniejszą liczbę zarodników uzyskano porównywalny plon.

Tabela 14. Plon owocników (kg/m²) uzyskany w uprawie pieczarki w II rzucie po zainfekowaniu podłoża pieczarkowego w fazie III przez izolaty *T. aggressivum*.

Kombinacja / 12,5 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	11,85	12,57	11,42	11,60
CBS	10,77	11,31	12,55	11,51
T.11.02	12,88	11,72	11,30	9,87
T.P23	12,82	9,22	9,32	10,44
T.20	9,55	10,95	10,69	12,62
średnia	11,57 A	11,15 A	11,06 A	11,21 A
Kombinacja / 1,25 zarodników na 1 g	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
Kontrola bez infekcji	10,47	10,85	11,70	11,28
CBS	11,45	10,45	11,29	11,19
T.11.02	10,88	10,81	11,70	12,39
T.P23	11,14	9,58	10,86	9,77
T.20	12,31	10,86	11,31	12,19
średnia	11,25 A	10,51 A	11,37 A	11,36 A

średnie w rzędach oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

Temperatura 21°C w hali czasie przerostu grzybni pieczarki przez okrywę, po zainfekowaniu podłoża fazy III zarodnikami *Trichoderma* nie miała wpływu na nasilenie rozwoju zielonej pleśni. W tym wariancie doświadczenia choroba również się nie rozwinęła. Stwierdzono brak różnic w plonie pomiędzy kombinacją kontrolną a kombinacjami zainfekowanymi (tabela 15).

Tabela 15. Plon owocników (kg/m²) uzyskany w I i II rzucie po zainfekowaniu podłoża pieczarkowego w fazie III przez izolaty *T. aggressivum*.

Kombinacja / 12,5 zarodników na 1 g	I rzut	II rzut	Razem
Kontrola bez infekcji	11,56	11,04	22,60
CBS	10,92	10,25	21,17
T.11.02	10,56	9,85	20,41
T.P23	9,74	11,02	20,76
T.20	10,75	11,40	22,15
średnia	10,51 A	10,91 A	21,42
Kombinacja / 1,3 zarodników na 1 g	I rzut	II rzut	Razem
Kontrola bez infekcji	11,33	12,25	23,58
CBS	10,05	10,22	20,27
T.11.02	11,12	9,11	20,23
T.P23	11,89	9,25	21,14
T.20	10,12	10,79	20,91
średnia	10,50 A	10,72 A	21,22

średnie w rzędach oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ według testu t-Studenta

Wnioski

1. W warunkach *in vitro* stwierdzono słabą skuteczność nadtlenu wodoru w hamowaniu *Trichoderma aggressivum*, który w stężeniu 300 ppm zahamował wzrost o izolatów o około 30%.
2. Skuteczność biopreparatów w ograniczaniu rozwoju *T. aggressivum* była wysoka. Limocide w stężeniu 0,5% oraz Serenade ASO i Serifel w stężeniu 0,05% zahamowały wzrost większości izolatów w ponad 80%.
3. Przerost podłoża pieczarkowego przez grzybnię pieczarki był najlepszy w kombinacjach z preparatami Limocide i Serifel dla kilku izolatów *T. aggressivum*, a po nałożeniu okrywy nieznacznie lepszy przerost okrywy przez grzybnię pieczarki stwierdzono w kombinacjach z preparatem Limocide.
4. Plon owocników pieczarki w uprawie zainfekowanej *T. aggressivum* w kombinacjach z preparatami Limocide i Serifel był istotnie wyższy niż w kombinacjach bez preparatów.
5. Zainfekowanie podłoża pieczarkowego fazy III *T. aggressivum* nie wywołało objawów zielonej pleśni w uprawie, zarówno w rzucie pierwszym, jak i w drugim.
6. Zainfekowanie uprawy boczniaka bakteriami *Pseudomonas 'gingeri'* nie wywołało istotnych objawów plamistości bakteryjnej na owocnikach, a zastosowanie nadtlenu wodoru w stężeniu 120 ppm obniżyło plon grzybów.