



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

SPRAWOZDANIE

z przeprowadzonych w 2023 r. badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego w zakresie upraw polowych metodami ekologicznymi, pt.:

Uprawy polowe metodami ekologicznymi: badania w zakresie możliwości zastosowania dopuszczonych w rolnictwie ekologicznym środków do celów zaprawiania nasion roślin rolniczych oraz jako nawozów o działaniu dolistnym

Kierownik tematu: dr Beata Wasilewska-Nascimento

Wykonawcy:

dr Piotr Barbaś

dr Dominika Boguszewska-Mańkowska

dr Milena Pietraszko

dr Cezary Trawczyński

dr hab. inż. Krystyna Zarzyńska

pracownicy techniczni

Zrealizowano na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 kwietnia 2023 r. (pismo DEJ.re.027.10.2023).

Wstęp i cel badań

Rozpatrywanie zdrowotności roślin w rolnictwie ekologicznym powinno opierać się na całościowym podejściu do uprawy, która jest dynamicznym układem ekologicznym składającym się z zespołu organizmów połączonych relacjami troficznymi oraz środowiska, w którym one występują. Poznanie interakcji między roślinami, szkodnikami, patogenami roślin i organizmami pożytecznymi odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu skutecznych zabiegów w uprawie ekologicznej.

Szeroko badanymi mikroorganizmami pomagającymi rozwiązywać problemy ochrony wielu upraw przed szkodnikami i patogenami są grzyby entomopatogeniczne (EPF) należące do workowców (*Ascomycota*). Najczęściej wykorzystywane w ochronie roślin należą do rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium*.

Występujące w glebie EPF odgrywają znaczącą rolę w ekosystemach. Przede wszystkim są one pasożytami owadów. Dzięki enzymom, które chemicznie trawią oskórek zaatakowanego owada grzyby przenikają do jamy ciała żywiciela. Tam produkują mykotoksyny, które zaburzają reakcje obronne owada. Uszkodzenia mechaniczne narządów spowodowane przez rozrastającą się grzybnię, wyczerpanie składników odżywczych oraz nagromadzenie toksyn powodują śmierć żywiciela (Zimowska & Król 2019). Dalszy rozwój grzybów na martwym osobniku prowadzi do tworzenia znacznej ilości zarodników konidialnych zdolnych do infekowania kolejnych owadów. W przypadku braku żywiciela EPF rozwijają się w fazie saprotroficznej w bogatych w materię organiczną powierzchniowych warstwach gleby (Ortiz-Urquiza 2022).

Siedliskiem zarodników jest gleba. W warunkach naturalnych EPF z łatwością porażają te stadia rozwojowe stawonogów, które rozwijają się w środowisku glebowym. Często obserwuje się infekcje grzybowe pędraków, drutowców i rolnic oraz zimujących w glebie osobników stonki ziemniaczanej (Wasilewska-Nascimento 2021). Dzięki dotacji MRiRW w 2022 roku udowodniono patogeniczność rodzimego szczepu *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. wyizolowanego w Jadwisinie w odniesieniu do wszystkich stadiów rozwojowych stonki ziemniaczanej.

Innym szkodnikiem, który jest szczególnie niepożądany na plantacjach nasiennych oraz w uprawie sadzeniaków są mszyce (Aphidoidea). Znaczenie gospodarcze mszyc, podobnie jak innych szkodników wysysających soki z roślin, takich jak mączliki (Aleyrodidae), wciornastki (Thysanoptera) i przędziorkowate (Tetranychidae), będzie wzrastać w kolejnych latach z powodu zachodzących zmian klimatycznych.

Do najczęściej występujących na ziemniaku mszyc należą: mszyca brzoskwiniowo-ziemniaczana (*Myzus persicae*), mszyca szakłakowo-ziemniaczana (*Aphis nasturtii*), mszyca kruszynowo-ziemniaczana (*Aphis frangulae*). W wyniku żerowania mszyc liście skręcają się, żółkną i zasychają; obserwuje się zahamowanie wzrostu roślin. Podczas nakłuwania liści mszyce często wprowadzają do roślin wirusy wywołujące groźne choroby ziemniaka, przyczyniając się tym samym, w sposób pośredni, do obniżenia plonowania bulw. Najgroźniejsze wirusy to: wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV), smugowatości ziemniaka (PVY) oraz mozaiki kędzierzawej (PVM). Porażone wirusem sadzeniaki stają się źródłem

rozprzestrzeniania chorób na całej plantacji. Obecnie notuje się brak środków do zwalczania mszyc w uprawie ekologicznej.

Badania Lopez Castillo i in. (2014) oraz Rasool i in. (2020) wykazały, że wzrost populacji mszyc można ograniczyć wykorzystując endofityczne właściwości EPF.

Grzyby owadobójcze są zdolne do kolonizacji roślin endofitycznie przez co stymulują ich wzrost i indukują w nich odporność (Zimowska & Król 2019). Endofity żyją przynajmniej przez część swego życia w przestrzeniach międzykomórkowych roślin lub wiązkach przewodzących, nie uszkadzając tkanek roślin żywicielskich (Francis i in. 2022).

Prowadzone są prace w kierunku poznania endofitycznego wpływu EPF na emisję lotnych związków organicznych roślin żywicielskich. Potwierdzono, że zmiany w zapachu roślin mogą prowadzić nie tylko do zmniejszenia liczebności szkodników, ale także do zwiększonej liczebności naturalnych wrogów na roślinach skolonizowanych przez endofity, wpływając tym samym pośrednio na obronę roślin (Francis i in. 2022; Vianna i in. 2018).

Najbardziej pożądane owady drapieżne w uprawie ziemniaków to: biedronkowate (Coccinellidae), bzygowate (Syrphidae) i złotooki (Chrysopidae). Zarówno dorosłe jak i larwy tych owadów żywią się mszycami. Jedna larwa może zjeść w ciągu całego swojego rozwoju od 100 do 2000 mszyc w zależności od gatunku. Biedronki oraz larwy złotooków mogą zjadać również jaja stonki ziemniaczanej.

EPF rozpowszechnione w ryzosferze zdolne są do bezpośredniej interakcji z patogenami glebowymi o przestrzeń życiową i składniki pokarmowe (Zimowska & Król 2019). Wyniki badań prowadzonych w 2022 roku w ramach dotacji do rolnictwa ekologicznego sugerują, że mogą one być konkurencyjne w stosunku do zasiedlającego glebę patogena jakim jest *Rhizoctonia solani*.

Rośliny ze swojej strony muszą szybko reagować na różne warunki stresowe spowodowane takimi czynnikami jak patogeny i szkodniki. Kwas abscysynowy (ABA) jest jednym z klasycznych hormonów roślinnych, koordynuje odpowiedzi roślin na czynniki stresogenne zarówno biotyczne jak i abiotyczne. Najczęściej obserwowaną odpowiedzią roślin na działanie czynnika stresowego jest obniżenie poziomu hormonów tzw. stymulatorów wzrostu roślin tj. gibereliny czy cytokininy przy równoczesnym zwiększeniu poziomu hormonów zwykle hamujących wzrost elongacyjny komórek lub przyspieszających dojrzewanie i/lub starzenie się tkanek, a więc kwasu abscysynowego (ABA), etylenu czy kwasu jasmonowego. ABA jest hormonem, który poprawia gospodarkę wodną rośliny: z jednej strony zamyka aparaty szparkowe, co zmniejsza transpirację, z drugiej - może przyczynić się do wydajniejszego przewodzenia wody (Du i in. 2013).

Produkcja wtórnych metabolitów grzybów w roślinach może działać na szkodniki żerujące na części nadziemnej. Ostatnio jednak coraz częściej pojawiają się informacje, że EPF mogą być odpowiedzialne za modulację maszynerii chemicznej rośliny, na przykład zmiany w produkcji związków związanych z obroną roślin (Gange i in. 2019; Hu & Bidochka 2019). Takie związki jak alkaloidy były ekstrahowane z grzybów endofitycznych oraz roślin zakażonych endofitami (Yue i in. 2000).

W badaniach laboratoryjnych udowodniono, że zastosowanie chitozanu zwiększa sporulację *B. bassiana*. Grzyb rosnący na pożywce z chitozaniem wykazał ponad 40-krotnie wyższą produkcję zarodników niż w kontroli bez chitozanu. Wyprodukowane w obecności chitozanu zarodniki konidialne zachowują swoją żywotność i stopień patogeniczności (Palma-Guerrero i in. 2008).

W doświadczeniach zastosowano chlorowoderek chitozanu, który jest substancją podstawową, dopuszczoną w rolnictwie ekologicznym do zaprawiania bulw ziemniaka przed sadzeniem. Działając jako elicytor roślinny stymuluje on odporność roślin na grzyby i bakterie chorobotwórcze (<https://rolnictwo-ekologiczne.ior.poznan.pl/wyniki-wyszukiwania>). Chlorowoderek chitozanu może być stosowany łącznie z innymi zabiegami ochronnymi (Kowalska 2021).

Inną substancją podstawową jest talk stosowany w formie wodnej zawiesiny jako bariera fizyczna dla owadów, roztoczy oraz grzybowych ektopasożytów roślin należących do rzędu mączniakowców (*Erysiphales*). Jest stosowany na drzewach owocowych, w gajach oliwnych i winoroślach (Kowalska 2021).

Obecnie w Polsce są zarejestrowane trzy szczepy gatunku *B. bassiana* w formie mykoinsektycydów. Biopreparaty te, stosowane dolistnie w formie oprysków, znajdują praktyczne zastosowanie w zwalczaniu mączlików, wciornastków, przędziorków i mszyc w uprawach warzywnych, w sadownictwie i w uprawie roślin ozdobnych. W przypadku drutowców rekomendowane jest nawadnianie podłoża preparatem zawierającym zarodniki grzyba (<https://www.gov.pl/web/rolnictwo/wyszukiwarka-srodkow-ochrony-roslin---zastosowanie>). Dalsze prace badawcze powinny iść w kierunku rozwiązań technologicznych umożliwiających zastosowanie preparatów grzybowych w uprawie polowej. Jednym z takich rozwiązań może być użycie zarodników grzybowych do zaprawiania bulw.

Wyróżniono następujące cele badań:

1. Potwierdzenie występowania grzybów owadobójczych w ekologicznej uprawie ziemniaka,
2. Ocena skuteczności zaprawiania bulw zarodnikami gatunku *B. bassiana* w celu zwiększenia zdrowotności roślin ziemniaka,
3. Ocena skuteczności jednoczesnego zastosowania EPF i substancji podstawowej (chlorowoderek chitozanu, talk),
4. Opracowanie sposobów zastosowania biopestycydów nowej generacji w uprawie ziemniaków z uwzględnieniem dostępnej wiedzy.

Zadanie 1. Analiza jakościowa i ilościowa grzybów entomopatogenicznych w ekologicznej uprawie ziemniaka

Metodyka prowadzonych prac

Próby gleby były pobierane przy użyciu laski Egnera do głębokości 15 cm w trzech fazach rozwojowych roślin ziemniaka odmiany Gardena: pełnia wschodów, kwitnienie, bulwy

dojrzałe do zbioru. Na obrzeżach plantacji graniczących z roślinami płodozmianu, w środku pola oraz w bliskości zadrzewienia śródpolnego pobrano po pięć prób.

Próby gleby pozyskano na polu ekologicznym i w uprawie konwencjonalnej (środek pola). W warunkach laboratoryjnych glebę umieszczano w sterylnych szalkach Petriego o średnicy 11 cm (po cztery szalki na każdy punkt poboru prób). Grzyby owadobójcze były izolowane metodą owada pułapkowego z wykorzystaniem larw barciaka większego (*Galleria mellonella*). W każdej szalce z glebą umieszczano 6 larw. Ich śmiertelność była oceniana w odstępach 2-dniowych, aż do uzyskania 100% larw martwych. Martwe larwy dezynfekowano w 70% roztworze alkoholu etylowego oraz 1% roztworze podchlorynu sodu i umieszczano pojedynczo w sterylnych szalkach Petriego z wilgotną bibułą. Grzyby porastające ciało martwych osobników były hodowane na pożywce PDA w celu identyfikacji. Morfologiczna identyfikacja poszczególnych gatunków była przeprowadzona przy użyciu mikroskopu optycznego.

Dodatkowo określono zawartość wody w glebie metodą suszarkowo-wagową oraz z wykorzystaniem sondy TDR.

Dane przeanalizowano metodą jednoczynnikowej analizy ANOVA przy użyciu programu Statistica 13. Różnice między średnimi porównano za pomocą testu HSD Tukeya na poziomie istotności $P < 0,05$.

Wyniki

W próbach gleby wykazano obecność dwóch gatunków grzybów entomopatogenicznych: *Metarhizium robertsii* (Metchnikoff) Sorokin (1883) i *B. bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). W uprawie ekologicznej we wszystkich punktach poboru prób dominował rodzaj *Metarhizium* (tab. 1.1). Śmiertelność larw *G. mellonella* porażonych grzybem wzrastała w okresie wegetacji. Na obrzeżach plantacji graniczących ze zbożem osiągnęła ona 100% w fazie bulw dojrzałych do zbioru. Największe porażenie spowodowane przez *B. bassiana* dotyczyło larw barciaka większego umieszczonych w glebie pobranej w pobliżu zadrzewienia śródpolnego i wyniosło 8,3%. Nie odnotowano obecności tego gatunku w glebie pochodzącej z obrzeży plantacji graniczących ze zbożem. Gatunek ten nie był obecny w fazie bulw dojrzałych do zbioru w trzech miejscach poboru prób w uprawie ekologicznej.

W uprawie konwencjonalnej w fazie wschodów roślin ziemniaka odnotowano 46,7% śmiertelność larw barciaka większego spowodowaną przez *B. bassiana* (tab. 1.1). W kolejnych fazach rozwoju roślin ziemniaka uległa ona zmniejszeniu.

We wszystkich próbach glebowych z wyjątkiem prób pobranych na obrzeżach plantacji graniczących ze zbożem w fazie bulw dojrzałych do zbioru odnotowano obecność nicieni entomopatogenicznych. Największą (93,3%) śmiertelność larw barciaka większego porażonych nicieniami zanotowano podczas wschodów w uprawie ekologicznej, w części pola graniczącej ze zbożem. We wszystkich punktach poboru prób obecność nicieni była największa na początku okresu wegetacji ziemniaka (tab. 1.1).

Tabela 1.1 Średnia śmiertelność larw *G. mellonella* (%) wywołana grzybami (EPF) i nicieniami entomopatogenicznymi

Czynnik chorobowy	System produkcji ziemniaków											
	Ekologiczny									Konwencjonalny		
	bliskość zadrzewienia śródpolnego			środek pola			obrzeża plantacji graniczące ze zbożem			środek pola		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
<i>Beauveria bassiana</i>	8,3	0,0	0,0	6,3	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	46,7	20,0	37,5
<i>Metarhizium robertsii</i>	25,0	87,5	71,4	31,2	60,0	75,0	6,7	64,3	100	0,0	50,0	12,5
EPF – Ogółem	33,3	87,5	71,4	37,5	66,7	75,0	6,7	64,3	100	46,7	70,0	50,0
Nicienie	66,7	12,5	28,6	62,5	33,3	25,0	93,3	35,7	0,0	53,3	30,0	50,0

a - pełnia wschodów; b - kwitnienie; c - bulwy dojrzałe do zbioru

Zawartość gleby w glebie ulegała zmianie w miarę osiągnięcia kolejnych stadiów rozwojowych przez rośliny ziemniaka (tab. 1.2). W uprawie ekologicznej oraz konwencjonalnej, najwyższe jej wartości notowano w fazie wschodów. Najniższą zawartość wody dla wszystkich punktów poboru prób zarejestrowano w fazie kwitnienia.

Zawartość wody w glebie dla trzech badanych faz rozwojowych ziemniaka była wyższa w systemie konwencjonalnym niż w uprawie ekologicznej.

Tabela 1.2 Zawartość wody w glebie (%) w wybranych punktach pola ekologicznego i w uprawie konwencjonalnej określona metodą suszarkowo-wagową

Pomiar	System produkcji ziemniaków											
	Ekologiczny									Konwencjonalny		
	bliskość zadrzewienia śródpolnego			środek pola			obrzeża plantacji graniczące ze zbożem			środek pola		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Zawartość wody (%)	5,65	2,77	4,49	7,12	3,2	5,64	5,21	3,46	6,23	9,57	4,32	6,55

a - pełnia wschodów; b - kwitnienie; c - bulwy dojrzałe do zbioru

Zadanie 2. Badanie reakcji roślin ziemniaka na inokulację zarodnikami *B. bassiana* z dodatkiem substancji podstawowej

Metodyka prowadzonych prac

W badaniach wykorzystano rodzimy szczep *B. bassiana* wyizolowany w Jadwisinie w roku 2021 z martwego osobnika stonki ziemniaczanej. Grzyb hodowano na pożywce PDA. Zawiesina zarodników w stężeniu 10^8 jtk/ml, także zmieszana z talkiem lub z chlorowodorkiem chitozanu została użyta do zaprawiania bulw ziemniaków dwóch odmian: wczesnej - Gwiazda i średnio wczesnej – Gardena. Zaprawianie bulw wykonano ręcznie przed sadzeniem. W doświadczeniach badano następujące kombinacje: 1 - kontrola (bulwy zaprawione wodą), 2 - bulwy zaprawiane wodną zawiesiną talku, 3 – bulwy zaprawione chlorowodorkiem chitozanu, 4 – bulwy traktowane wodną zawiesiną zarodników *B. bassiana*, 5 - bulwy traktowane wodną zawiesiną zarodników *B. bassiana* i talku, 6 - bulwy traktowane wodną zawiesiną zarodników *B. bassiana* i chlorowodoru chitozanu. Doświadczenie było prowadzone na polu ekologicznym w Jadwisinie na 10 roślinach w każdej kombinacji i w trzech powtórzeniach.

Oceniano reakcje roślin na poziomie morfologicznym podczas całego okresu wegetacji. Mierzono następujące parametry: wysokość roślin, masa łodyg, masa liści i wielkość ich powierzchni oraz wskaźnik pokrycia gleby przez listowie (LAI). Po zbiorze przeprowadzono ocenę plonu pod względem ilościowym i jakościowym.

Prowadzono ocenę presji agrofagów (stonki ziemniaczanej, mszyc, *Rhizoctonia solani*, *P. infestans* i *Alternaria* spp.) w okresie wegetacji. Obserwacje prowadzono co 10 dni na 10 roślinach w poszczególnych kombinacjach w trzech powtórzeniach. Liczono złoża jaj oraz osobniki stonki ziemniaczanej żerujące na liściach. Próby złożone z 12 liści ziemniaka przenoszono do laboratorium, gdzie określano liczbę mszyc oraz ich potencjalnych wrogów naturalnych (biedronkowate, bzygowate, mszycarzowate). Ocena porażenia patogenami została przeprowadzona przy użyciu zmodyfikowanej 9 - stopniowej skali wg. Roztropowicz (1999), gdzie 9 - brak objawów porażenia, 8 - plamy na 2 liściach, 7 - na porażonej roślinie ok. 9 liści z objawami, 6 – objawy występują na ok. 20% liści, 5 - objawy występują na ok. 50% liści, 4 - objawy występują na ok. 80% liści, 3 – bez objawów tylko pojedyncze liście na roślinie, 2 – roślina bardzo silnie porażona, pojedyncze zielone liście, 1 – wszystkie liście zniszczone, pędy zasychające lub zaschnięte.

W celu oznaczenia zawartości glikoalkaloidów w poszczególnych organach roślin pobrano próby bulw (pięć bulw z każdej kombinacji) oraz liści (120 g z kombinacji). Analiza zawartości TGA została wykonana w Katedrze Technologii Rolnej i Przechowalnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Zawartość ABA w tkankach roślin oznaczono ilościowo (testy immunologiczne, Sigma Aldrich, USA) z zastosowaniem procedury ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi (Zdunek & Lips 2001). Materiał do badań stanowiły rośliny z jednego doświadczenia. Zamrożone tkanki roślin ziemniaka zostały utarte w ciekłym azocie i zawieszono w roztworze składającym się z 80% metanolu, 2% lodowatego kwasu octowego i BHT (20 mg/l). Ekstrakty wytrząsano w ciemności przez 24 godziny, a następnie wirowano przy 15 000 g i 4°C przez 20 min.

Supernatant z ekstraktów tkankowych został przeniesiony do TBS (150 mM NaCl, 25 mM TRIS-HCl, pH 7,5).

Dane przeanalizowano metodą jednoczynnikowej analizy ANOVA przy użyciu programu Statistica 13. Różnice między średnimi porównano za pomocą testu HSD Tukeya na poziomie istotności $P < 0,05$.

Wyniki

W przypadku odmiany Gardena, zastosowanie zapraw skutkowało zwiększeniem wysokości roślin, masy łodyg i liści, ich powierzchni asymilacyjnej oraz wskaźnika LAI (tab. 2.1).

Tabela 2.1 Średnie wartości parametrów morfologicznych w przeliczeniu na roślinę po zastosowaniu zapraw (odmiana Gardena)

Kombinacja	Wysokość roślin (cm)	Masa łodyg (g)	Masa liści (g)	Powierzchnia liści (cm ²)	LAI
Kontrola	27,3	51,7	155,0	3557,8	1,4
Talk	37,0	86,7	240,0	5387,3	2,2
Chitozan	29,0	56,7	191,7	4541,0	1,8
<i>B. bassiana</i>	35,7	66,7	171,7	4407,9	1,8
<i>B. bassiana</i> +chitozan	36,0	71,7	190,0	4501,2	1,8
<i>B. bassiana</i> +talk	33,0	83,3	206,7	4831,2	1,9

Największy plon bulw z rośliny uzyskano po zastosowaniu zapraw zawierających zarodniki *B. bassiana*, chlorowodorek chitozanu lub talk (tab.2.2). Zastosowanie zarodników *B. bassiana* wpłynęło na zwiększenie udziału bulw o średnicy przekraczającej 50mm w strukturze plonu odmiany Gardena.

Tabela 2.2 Plon bulw i jego struktura po zastosowaniu zapraw (odmiana Gardena)

Kombinacja	Plon (g)	Struktura plonu bulw (%)			
		<35mm	35-50mm	51-60mm	>60mm
Kontrola	646,1	10,0	71,2	16,6	2,2
Talk	655,9	10,5	73,4	13,6	2,5
Chitozan	687,8	9,4	64,0	25,2	1,4
<i>B. bassiana</i>	697,4	10,6	65,1	19,6	4,7
<i>B. bassiana</i> +chitozan	643,5	12,1	67,8	19,2	0,9
<i>B. bassiana</i> +talk	629,0	11,4	60,9	23,3	4,4

Rośliny odmiany Gwiazda zareagowały pozytywnie na zastosowanie zaprawy zawierającej zarodniki *B. bassiana* zwiększeniem masy łodyg i liści oraz powierzchni asymilacyjnej i wskaźnika LAI w porównaniu do kombinacji kontrolnej (tab. 2.3). Najslabiej ze wszystkich kombinacji wypadła *B. bassiana* z dodatkiem talku.

Tabela 2.3 Średnie wartości parametrów morfologicznych w przeliczeniu na roślinę po zastosowaniu zapraw (odmiana Gwiazda)

Kombinacja	Wysokość roślin (cm)	Masa łodyg (g)	Masa liści (g)	Powierzchnia liści (cm ²)	LAI
Kontrola	62,0	138,3	233,3	5900,7	2,4
Talk	56,0	143,3	291,7	7303,3	2,9
Chitozan	59,0	160,0	318,3	7139,5	2,9
<i>B. bassiana</i>	60,0	195,0	238,3	7828,2	3,1
<i>B. bassiana</i> +chitozan	57,0	155,0	248,3	6780,3	2,7
<i>B. bassiana</i> +talk	54,0	110,0	196,7	4627,7	1,9

Największy plon bulw odmiany Gwiazda uzyskano po zastosowaniu zaprawy zawierającej zarodniki *B. bassiana* (tab. 2.4). W strukturze plonu największej bulw o średnicy 35-50mm wyprodukowały rośliny z kombinacji kontrolnej. Zastosowanie zaprawy zawierającej zarodniki *B. bassiana* spowodowało zmniejszenie ilości bulw małych i zwiększenie frakcji bulw o średnicy 51-60mm w porównaniu do kontroli.

Tabela 2.4 Plon bulw i jego struktura po zastosowaniu zapraw (odmiana Gwiazda)

Kombinacja	Plon (g)	Struktura plonu bulw (%)			
		<35mm	35-50mm	51-60mm	>60mm
Kontrola	679,4	10,6	64,9	21,6	2,9
Talk	625,7	10,3	46,7	27,6	15,4
Chitozan	685,8	8,1	60,0	22,7	9,2
<i>B. bassiana</i>	757,8	6,6	56,8	31,8	4,8
<i>B. bassiana</i> +chitozan	645,8	10,5	53,8	26,9	8,8
<i>B. bassiana</i> +talk	637,8	10,5	58,0	25,1	6,4

Objawy ospowatości na bulwach odmiany Gardena były najmniejsze po zastosowaniu chlorowodoru chitozanu (tab. 2.5). W przypadku odmiany Gwiazda, najsilniejsze objawy ospowatości odnotowano dla roślin z kontroli. Zastosowanie zapraw skutkowało zmniejszeniem porażenia bulw.

Najmniejsze porażenie bulw odmiany Gardena parchem zwykłym odnotowano w kontroli. Największe szkody spowodowane przez szkodniki glebowe zanotowano w kontroli (odmiana Gardena). Po zastosowaniu wodnego roztworu talku jako zaprawy oraz zarodników *B. bassiana* obserwowano mniejsze uszkodzenia roślin odmiany Gwiazda.

Tabela 2.5 Ocena pozbiorowa bulw ziemniaka odmian Gardena i Gwiazda po zastosowaniu zapraw (% średniej masy z rośliny)

Kombinacja	Gardena			Gwiazda		
	Ospowatość	Parch zwykły	Uszkodzenia przez pędraki	Ospowatość	Parch zwykły	Uszkodzenia przez pędraki
Kontrola	41,4	61,5	3,3	76,6	65,1	0,5
Talk	56,6	65,7	0,3	64,6	74,1	0,2
Chitozan	39,5	70,8	0,0	72,5	63,2	1,3
<i>B. bassiana</i>	48,9	70,6	0,0	69,3	64,8	0,1
<i>B. bassiana</i> +chitozan	57,2	80,2	1,1	65,4	63,9	1,4
<i>B. bassiana</i> +talk	66,4	71,3	1,6	70,3	70,4	0,8

Najmniejszą liczbę dorosłych osobników stonki ziemniaczanej obserwowano na roślinach obu odmian, których bulwy zaprawiono wodną zawiesiną talku oraz talku z zarodnikami *B. bassiana* (tab. 2.6). Zaprawienie bulw odmiany Gardena chlorowodorkiem chitozanu oraz chlorowodorkiem chitozanu z dodatkiem zarodników *B. bassiana* również skutkowało mniejszą liczbą dorosłych owadów na liściach. Średnia liczba złoż jaj na roślinach z kontroli była największa dla odmiany Gardena w porównaniu z roślinami zaprawionymi. Dodanie talku do zarodników *B. bassiana* podczas zaprawiania bulw spowodowało zwiększenie liczby złoż jaj na roślinach odmiany Gwiazda. Liczba larw żerujących na roślinach z kontroli oraz zaprawionych zarodnikami *B. bassiana* była podobna dla odmiany Gardena. Natomiast zastosowanie zarodników *B. bassiana* do zaprawiania bulw odmiany Gwiazda spowodowało zmniejszenie liczebności larw o 8,6% w porównaniu do kontroli.

Tabela 2.6 Wpływ zastosowania różnych zapraw na zasiedlenie roślin ziemniaka przez stonkę ziemniaczaną w okresie jej największego nasilenia (22.06.2023)

Kombinacja	Gardena			Gwiazda		
	a	b	c	a	b	c
Kontrola	0,4	1,1	21,4	0,4	0,3	21,7
Talk	0,1	0,6	34,9	0,2	0,1	23,6
Chitozan	0,1	0,7	26,1	0,6	0,4	24,4
<i>B. bassiana</i>	0,5	0,8	21,8	0,5	0,5	13,1
<i>B. bassiana</i> +chitozan	0,2	0,9	26,2	0,3	0,0	23,0
<i>B. bassiana</i> +talk	0,2	0,6	31,2	0,2	0,8	20,1

a - liczba dorosłych osobników stonki ziemniaczanej żerujących na liściach; b - liczba złoż jaj obserwowanych na liściach; c - liczba larw stonki ziemniaczanej żerujących na liściach

Zastosowanie zapraw nie miało wpływu na porażenie roślin *Alternaria* spp. oraz *Phytophthora infestans* w okresie wegetacji (tab 2.7).

Tabela 2.7 Ocena porażenia roślin alternariozą i zarazą ziemniaka wg. 9-stopniowej skali po zastosowaniu zapraw dla odmian Gardena i Gwiazda (średnia z 3 pomiarów z lipca 2023)

Kombinacja	Gardena		Gwiazda	
	Alternarioza	Zaraza ziemniaka	Alternarioza	Zaraza ziemniaka
Kontrola	6,1	8,3	6,4	8,6
Talk	6,0	7,9	6,4	8,6
Chitozan	6,0	8,4	6,7	8,9
<i>B. bassiana</i>	5,9	8,1	6,5	8,9
<i>B. bassiana</i> +chitozan	5,9	8,4	6,5	8,7
<i>B. bassiana</i> +talk	5,9	8,1	6,5	8,7

Najwięcej bezskrzydłych osobników mszyc obserwowano na roślinach odmiany Gardena zaprawionych zarodnikami *B. bassiana* i talkiem (118,4 osobników) a najmniej na roślinach odmiany Gwiazda zaprawionych wodnym roztworem chlorowodorku chitozanu (9,2 mszyc) oraz chlorowodorku chitozanu i zarodników *B. bassiana* (9,5 mszyc) (tab. 2.8).

Obserwowano pasożytnicze błonkówki oraz „mumie” mszyc na liściach ziemniaka (tab. 2.8). Ich obecność na roślinach w kontroli była wyższa dla odmiany Gwiazda. Dla obu odmian zaprawionych zarodnikami *B. bassiana* liczba „mumii” obserwowanych na liściach była zbliżona i wynosiła 1,5-1,7. Średnia liczba jaj złotooków na liściach wahała się od 0,7 do 1,5. Zastosowanie zapraw nie miało wpływu na ich liczebność.

Tabela 2.8 Wpływ zastosowania zapraw na zasiedlenie roślin ziemniaka przez mszycę i ich wrogów naturalnych (średnia z 6 obserwacji)

Kombinacja	Gardena			Gwiazda		
	a	b	c	a	b	c
Kontrola	35,8	0,5	0,8	18,5	3,0	1,5
Talk	12,8	0,0	0,7	45,7	0,3	1,3
Chitozan	32,2	0,2	1,3	9,2	0,5	1,2
<i>B. bassiana</i>	38,7	1,7	0,7	19,2	1,5	0,7
<i>B. bassiana</i> +chitozan	17,0	0,3	1,8	9,5	0,3	0,7
<i>B. bassiana</i> +talk	118,4	1,2	0,8	34,5	0,5	1,5

a – średnia liczba bezskrzydłych osobników mszyc żerujących na liściach; b – średnia liczba „mumii” mszyc obserwowanych na liściach; c – średnia liczba jaj złotooków obserwowanych na liściach

Zawartość glikoalkaloidów w liściach i bulwach była różna dla obu testowanych odmian ziemniaka. Ich zawartość w liściach roślin odmiany Gardena była wyższa niż w liściach odmiany Gwiazda (fig. 2.1). Zastosowanie zaprawy zawierającej zarodniki *B. bassiana* oraz złożonej z zarodników grzyba i chlorowodorku chitozanu spowodowało zwiększenie zawartości solaniny w liściach odmiany Gardena.

Zawartość glikoalkaloidów w bulwach pochodzących z kombinacji kontrolnej odmiany Gwiazda była niższa niż odmiany Gardena. W przypadku odmiany Gwiazda, zawartość zarówno solaniny jak i chakoniny była większa we wszystkich kombinacjach z zastosowaniem zapraw w porównaniu do kontroli (fig. 2.1c).

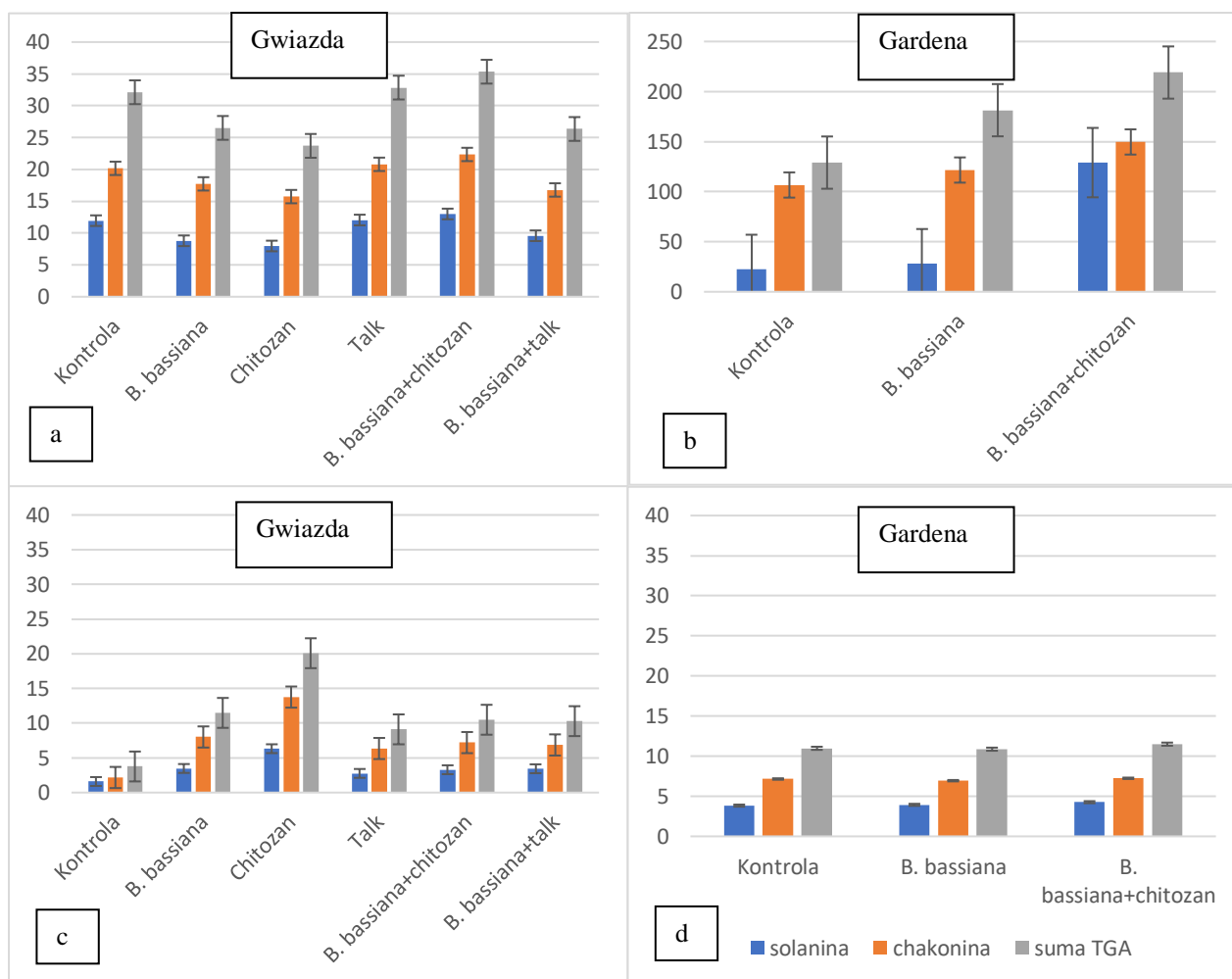


Fig. 2.1 Zawartość glikoalkaloidów w liściach (a, b) i bulwach (c, d) ziemniaka po zastosowaniu zapraw

Stężenie ABA w tkankach roślin w kombinacji kontrolnej było najniższe u obydwu badanych odmian (Gwiazda 85ng/ g śm; Gardena 111,1 ng/g śm) z wyjątkiem stosowania chlorowodoru chitozanu u odmiany Gardena oraz zarodników *B. bassiana* i talku u odmiany Gwiazda (fig. 2.2). Największe stężenie ABA w liściach odmiany Gwiazda było w przypadku stosowania talku, grzyba z rodzaju *Beauveria* oraz zarodników *B. bassiana* razem z chlorowodorkiem chitozanu. U odmiany Gardena najwyższym stężeniem ABA charakteryzowały się kombinacje, w których zastosowano *B. bassiana* oraz chlorowodorek chitozanu łącznie z grzybem. Zaobserwowano również różnice odmianowe. Wyższe stężenie ABA w warunkach kontrolnych wykazano dla odmiany Gwiazda. Otrzymane wyniki potwierdzają znaczenie ABA w odpowiedzi na zastosowane „stresy”.

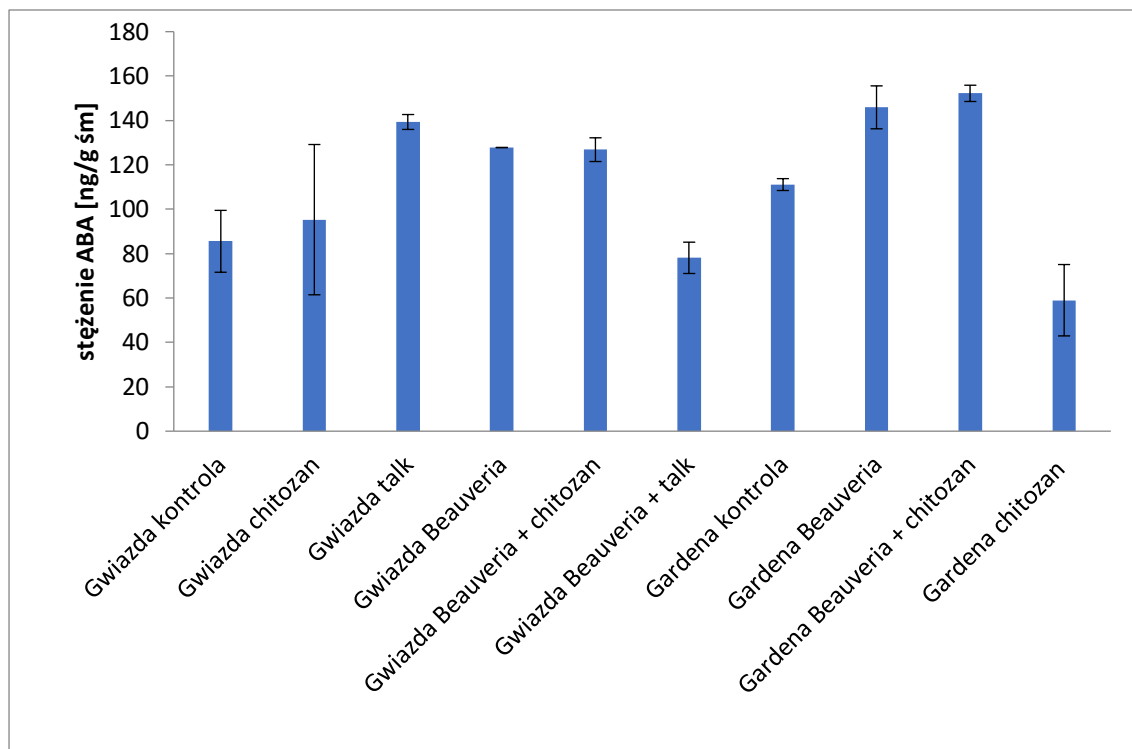


Fig. 2.2 Stężenie ABA w liściach roślin ziemniaka odmiany Gwiazda i Gardena po zastosowaniu zapraw

Zadanie 3. Izolacja gatunku *B. bassiana* z tkanek roślinnych

Metodyka prowadzonych prac

Bulwy dwóch odmian ziemniaka (Gardena i Gwiazda) były zaprawione w kombinacjach przedstawionych w zadaniu 2.

Aby uzyskać potwierdzenie obecności gatunku *B. bassiana* w roślinach zebrano próby korzeni, łodyg i liści roślin zaprawionych zawieszoną zarodników i roślin kontrolnych w okresie pełni wschodów i kwitnienia. W warunkach laboratoryjnych, za pomocą sterylnego skalpela były wykrawane fragmenty korzeni i łodyg o długości 1 cm oraz fragmenty liści o powierzchni 1 cm². Próby poddawano powierzchniowej sterylizacji (0,5% roztwór podchlorynu sodu i 70% roztwór alkoholu etylowego) i umieszczano w sterylnych szalkach Petriego z pożywką PDA (Lopez Castillo i in. 2014). Szalki były obserwowane w warunkach laboratoryjnych w celu sprawdzenia obecności endofitu w tkankach roślinnych.

Wyniki

W większości prób pobranych z organów roślinnych nie wykryto obecności *B. bassiana* opisaną wyżej metodą. W jednej próbie korzeni wykazano obecność grzybni i zarodników tego gatunku.

Z pobranych prób wyizolowano natomiast grzyby wywołujące choroby roślin należące do rodzajów *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*. Z prób korzeni wyizolowano również grzyby *Trichoderma* spp., co potwierdza ich endofityczne właściwości.

Wnioski

1. Potwierdzono obecność dwóch gatunków grzybów entomopatogenicznych w glebie w ekologicznej uprawie ziemniaka. Patogeniczność wyizolowanych gatunków *B. bassiana* i *M. robertsii* w stosunku do agrofagów, takich jak pędraki, drutowce i nicienie roślinożerne powinna zostać sprawdzona w dalszych badaniach.
2. Wykazano, że zastosowanie wodnego roztworu zarodników *B. bassiana* do zaprawiania bulw może stymulować rozwój roślin i zwiększać plon niektórych odmian.
3. Dodanie substancji podstawowych (chlorowodorek chitozanu, talk) do zaprawy zawierającej zarodniki *B. bassiana* nie zwiększyło jej skuteczności w stosunku do agrofagów ziemniaka.
4. Opracowanie sposobów zastosowania biopestycydów nowej generacji w uprawie ziemniaków z uwzględnieniem dostępnej wiedzy zostało przedstawione w postaci publikacji pt. „Biopestycydy nowej generacji w uprawie ziemniaka”, która ukaże się w numerze 4 czasopisma „Ziemniak Polski”.

Literatura

- Du H., Liu H., Xiong L., 2013. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Frontiers in Plant Science* 4, 397 doi:10.3389/fpls.2013.00397
- Francis F., Fingu-Mabola J.C., Fekih I.B., 2022. Direct and endophytic effects of fungal entomopathogens for sustainable aphid control: a review. *Agriculture* 12, 2081 doi:10.3390/agriculture12122081
- Gange A.C., Koricheva J., Currie A.F., Jaber L.R., Vidal S., 2019. Meta-analysis of the role of entomopathogenic and unspecialized fungal endophytes as plant bodyguards. *New Phytologist* doi: 10.1111/nph.15859
- Hu S., Bidochka M.J., 2019. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* doi:10.1111/jam.14503
- Kowalska J., 2021. Substancje podstawowe – efektywne uzupełnienie metod ochrony upraw. *Progress in Plant Protection* 61 (2): 139-146 doi:10.14199/ppp-2021-015
- Lopez Castillo D., Zhu-Salzman K., Ek-Ramos M.J., Sword G.A., 2014. The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. *PLoS ONE*: 9 (8): e103891 doi:10.1371/journal.pone.0103891
- Ortiz-Urquiza A., 2022. The split personality of *Beauveria bassiana*: understanding the molecular basis of fungal parasitism and mutualism. *mSystems*: e00766-21 doi:10.1128/mSystems.00766-21
- Palma-Guerrero J., Jansson H.-B., Salinas J., Lopez-Llorca L.V., 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology* 104: 541-553 doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x

Rasool S., Vidkjær N.H., Hooshmand K., Jensen B., Fomsgaard I.S., Meyling N.V., 2020. Seed inoculations with entomopathogenic fungi affect aphid populations coinciding with modulation of plant secondary metabolite profiles across plant families. *New Phytologist* 229: 1715-1727 doi:10.1111/nph.16979

Roztropowicz S. (red.), 1999. *Metodyka obserwacji, pomiarów i pobierania prób w agrotechnicznych doświadczeniach z ziemniakiem*. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Jadwisinie, 50ss.

Vianna F., Pelizza S., Russo L., Allegrucci N., Scorsetti A., 2018. Endophytic *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) alters *Helicoverpa gelotopoeon*'s (D.) (Lepidoptera: Noctuidae) life cycle and reproductive parameters. *Journal of Plant Protection Research* 58 (4): 321-327 doi:10.24425/jppr.2018.124643

Wasilewska-Nascimento B., 2021. Niedoceniony potencjał grzybów owadobójczych w uprawie ziemniaka. *Ziemniak Polski* 4: 40-47

Yue Q., Miller C.J., White J.F., Richardson M.D., 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4687-4692

Zimowska B., Król E.D., 2019. Entomopatogeniczne grzyby i ich znaczenie biocenotyczne. *Advancements of Microbiology* 58 (4): 471-482

Zdunek E., Lips S.H., 2001. Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *Journal of Experimental Botany* 52, 1269-1276 doi:10.1093/jexbot/52.359.1269

Jadwisin, 13.11.2023 r.

Kierownik tematu

Beata Wasilewska-Nascimento