



SPRAWOZDANIE

*z przeprowadzonych w 2017 r. badań w zakresie upraw polowych metodami ekologicznymi:
badania w zakresie wykorzystania substancji podstawowych w ochronie upraw polowych
w uprawach ekologicznych, pt.:*

Wykorzystanie w ekologicznej uprawie naturalnych substancji wspierających zdrowotność roślin okopowych

realizowanych przez:

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Bydgoszczy

**we współpracy z Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim, Katedrą Agroekosystemów
w Olsztynie¹**

w związku z decyzją Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.re.027.3.2017 z dnia 26.05.2017 r., wydaną na podstawie § 8 ust. 1, ust. 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 i z 2016 r. poz. 1614).

Kierownik tematu: *dr hab. Mirosław Nowakowski, prof. IHAR-PIB*

Główni wykonawcy:

- *dr hab. Mirosław Nowakowski, prof. IHAR-PIB*
- *dr hab. Józef Tyburski, prof. UWM¹*
- *dr Anna Litwiniec*
- *dr Paweł Skonieczek*
- *dr Grzegorz Gryń*
- *mgr Katarzyna Franke*
- *mgr Łukasz Matyka*
- *mgr Marcin Żurek*

BYDGOSZCZ 2017

SPIS TREŚCI

str.

1. WPROWADZENIE I CEL BADAŃ.....	3
2. METODY, WARUNKI I ZAKRES BADAŃ	5
2.1. Metody badań	5
2.2. Warunki i zakres badań	5
3. PRZEPROWADZONE BADANIA.....	9
3.1. <i>Polymyxa betae</i>	9
3.1.1. Zakres badań	12
3.1.2. Wyniki badań	13
3.1.3. Podsumowanie	16
3.2. <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Aphanomyces cochlioides</i> i <i>Cercospora beticola</i>	16
3.2.1. Działanie soków, ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych na <i>A. cochlioides</i> , <i>C. beticola</i> i <i>R. solani</i>	16
3.2.2. Wyniki badań	18
3.2.3. Podsumowanie	24
3.3. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> i <i>Pectobacterium</i> sp.	24
3.3.1. Działanie soków, ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych na <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> i <i>Pectobacterium</i> sp.	24
3.3.2. Wyniki badań	24
3.4. <i>Globodera rostochiensis</i>	31
3.4.1. Działanie ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych na larwy i cysty <i>G. rostochiensis</i>	32
3.4.2. Wyniki badań.....	32
3.4.3. Podsumowanie.....	33
4. STWIERDZENIA I WNIOSKI	38
CYTOWANE PIŚMIENNICTWO	39

WPROWADZENIE I CEL BADAŃ

Duże nasilenie koncentracji uprawy roślin wokół zakładów przetwórczych oraz skracanie rotacji roślin w płodozmianie, jak również coraz większy udział w nim roślin okopowych i kapustowatych, wpływa na wzrost zagrożenia ze strony w/w chorób i szkodników dla upraw ziemniaka i buraka cukrowego. Groźnym, kwarantannowym szkodnikiem upraw ziemniaka jest mątwik ziemniaczany *Globodera rostochiensis*, powodujący straty plonu dochodzące do 80%. Wśród chorób bakteryjnych duże problemy stwarzają *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) sprawca bakteriozy pierścieniowej ziemniaka oraz *Pectobacterium* sp. czynnik etiologiczny czarnej nóżki. Z kolei duże zagrożenie dla buraka cukrowego stanowią *Aphanomyces cochlioides* i *Rhizoctonia solani*, które są ekspansywnymi patogenami porażającymi siewki (zgorzel siewek buraka) oraz dorosłe rośliny (zgnilizny korzeni). Rizomania – to ważna pod względem gospodarczym choroba buraka cukrowego powodowana przez wirusa BNYYV, którego wektorem jest grzybopodobny pierwotniak *Polymyxa betae*. Wymienione czynniki powodują poważne straty sięgające nawet do 50-80% plonu. Do wzrastającej presji czynników chorobotwórczych przyczynia się także wykorzystywanie nawozowe liści roślin okopowych.

Wdrażając do praktyki ekologiczną ochronę roślin okopowych przed chorobami wykorzystuje się metodę agrotechniczną, hodowlaną i bazującą na naturalnie występujących substancjach bioaktywnych (Klimach i in. 1996, Góra 1996, Bartyńska, Budzikur-Ramza 2001, Nowakowski 2002, Tyburski i in. 2004, Nowakowski 2013, Pastuszevska i in. 2013).

W ochronie przed rizomanią duże znaczenie ma hodowla odpornościowa, jednak odporne odmiany buraka nie gwarantują pełnego bezpieczeństwa plonu ze względu na patotypy coraz częściej przełamujące istniejącą odporność. Wskazane jest zatem poszukiwanie czynników, które mogłyby efektywnie ograniczać rozwój nosiciela choroby. Największe straty w plonie buraka cukrowego może wywołać choroba grzybowa liści – chwościk, powodowana przez *Cercospora beticola*. Poszukiwanie efektywnych w ochronie ziemniaka i buraka cukrowego substancji bioaktywnych jest konieczne w warunkach nasilonego występowania chorób i szkodników oraz niewystarczającej skuteczności i niewielkiej ilości stosowanych dotąd środków ochrony roślin. Brak dostatecznej wiedzy oraz problemy organizacyjne i finansowe przy kształtowaniu korzystnej pod względem fitosanitarnym agrotechniki, zbyt duża wrażliwość na patogeny odmian deklarowanych jako odporne oraz ograniczenia w przepisach w zakresie stosowania dostępnych środków ochrony roślin również zmuszają do poszukiwania metod biologicznych ograniczania rozwoju i występowania agrofagów. Dane literaturowe wskazują na rosnące zainteresowanie biologicznymi metodami zwalczania wymienionych patogenów (Heijbroek i in. 1998, Chitwood 2002, Naraghi i in. 2014). Udowodniono już, że rośliny stosowane w uprawie jako międzyplon, np. niektóre odmiany gorczycy białej i rzodkwi oleistej, zmniejszają liczebność nicieni oraz patogenów grzybowych w glebie (Heijbroek i in. 1998, Tyburski i in. 2004, Błażević i in. 2010, Daub i Westphal 2011, Valdes i in. 2011, Nowakowski 2013). Związki aktywne tych roślin, takie jak glukozynolany i produkty ich hydrolitycznego rozkładu, są opisywane jako silne czynniki o działaniu antynicieniowym, przeciwrzybowym, przeciwbakteryjnym, a także allelopatycznym (Vig i in. 2009). Interesujące wyniki uzyskano ponadto stosując suche ekstrakty kilku innych roślin z rodziny kapustowatych w celu

zahamowania rozwoju populacji mątwika ziemniaczanego (Aires i in. 2009). Najskuteczniejsza okazała się rukiew wodna. Z kolei bylica roczna (*Artemisia annua* L.) znana jest jako roślina o udokumentowanym działaniu przeciwpierwotniakowym i przeciwwirusowym, ale również przeciwgrzybowym, przeciwbakteryjnym i przeciwnowotworowym (Liu i in. 2001, Tu 2011, Lubbe i in. 2012). Substancją aktywną w dużej mierze odpowiedzialną za obserwowane efekty jest artemizyna, ale synergistycznie mogą oddziaływać pozostałe składniki biomasy (Elfawal i in. 2012), m.in. flawonoidy czy też endofity. Wymienione rośliny lecznicze zostały włączone do badań.

W ramach realizacji niniejszego projektu zaplanowano także przeprowadzenie oceny przydatności sanitarnej gatunku *Solanum sisymbriifolium* (psianka stulizolistna), który jak wykazały wcześniejsze badania, wyróżnia się dużą efektywnością w zakresie ograniczania rozwoju nicieni w glebie i posiada znaczny potencjał jako czynnik grzybostatyczny (Scholte 2000, Tyburski i in. 2005, Szymczak-Nowak i in. 2007, Nowakowski 2010).

Przeprowadzone wcześniej przez autorów projektu badania wskazują na to, że ekstrakty z biomasy wybranych, testowanych roślin będą mogły zostać wykorzystane w praktyce rolniczej do ograniczenia nasilenia występowania trudnych do zwalczania grzybów polifagicznych, organizmów grzybopodobnych, bakterii chorobotwórczych i nicieni groźnych dla buraka cukrowego i ziemniaka. Konieczne jest jednak potwierdzenie uzyskanych wcześniej wyników badań w kolejnym roku, umożliwiającym powtórzenie serii doświadczeń.

Testy laboratoryjne i polowe, umożliwiające selekcję ekstraktów z substancjami bioaktywnymi zaplanowano w bydgoskim Oddziale Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy we współpracy z Katedrą Agroekosystemów na Uniwersytecie Warmińsko–Mazurskim (UWM) w Olsztynie. Wymieniona Katedra posiada duże doświadczenie w zakresie ekologicznej uprawy i ochrony roślin okopowych (m. in. z zastosowaniem *Solanum sisymbriifolium*), które są przedmiotem badań we wnioskowanym projekcie. Badana zostanie reakcja kolekcjonowanych izolatów i form agrofagów na różne ekstrakty i ich stężenia. Do badania działania antynicieniowego wykorzystany będzie test z użyciem płytek wielodołkowych, barwienia fluorescencyjnego z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego zaopatrzonego w zestaw specjalistycznych filtrów oraz metoda wazonowa. Obserwacje zachowania nicieni będą prowadzone za pomocą mikroskopu odwróconego, w określonych odstępach czasu po zadziałaniu ekstraktu. Doświadczenie określające działanie przeciwgrzybowe i antybakteryjne substancji bioaktywnych przeprowadzone będzie z użyciem podłoży wzrostowych metodą dyfuzyjną i zatrutych podłoży. Efekt działania ekstraktów na *Polymyxa betae* zostanie sprawdzony z zastosowaniem metod molekularnych - w toku reakcji RT-PCR. Dodatkowo prowadzone będą bezpośrednie obserwacje mikroskopowe przy użyciu mikroskopu odwróconego oraz fluorescencyjnego - doświadczenia na wyizolowanych zoosporach.

W ramach realizacji projektu pt. „Wykorzystanie w ekologicznej uprawie naturalnych substancji wspierających zdrowotność roślin okopowych” wymienione wcześniej zespoły pracowników IHAR-PIB i UWM przeprowadziły badania polowe i laboratoryjne dotyczące oceny działania ekstraktów wybranych roślin sanitarnych w zakresie ograniczania rozwoju grzybów, glonowców grzybopodobnych, bakterii i nicieni.

Końcowym etapem badań autorów będą prace mające na celu przygotowanie wdrożenia przyjaznej dla środowiska metody ochrony ziemniaka i buraka cukrowego, z zastosowaniem wybranych, skutecznych i tanich substancji bioaktywnych. Potwierdzenie pozytywnych efektów stosowania ekstraktu z wybranego gatunku/ów roślin pozwoli na przygotowanie dokumentów do złożenia przez zainteresowaną instytucję wniosku o uznanie ekstraktu za substancję podstawową.

Celem projektu jest zatem opracowanie efektywnej, alternatywnej do chemicznej, metody ochrony roślin buraka cukrowego przed *R. solani*, *A. cochlioides*, *C. beticola* i *P. betae*, a także ochrony ziemniaka przed *Cms*, *Pectobacterium* sp. i *G. rostochiensis*, z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych zawierających substancje hamujące rozwój agrofagów.

2. METODY, WARUNKI I ZAKRES BADAŃ

2.1. Metody badań

Wyniki prezentowane w niniejszym sprawozdaniu pochodzą z badań realizowanych w bydgoskim oddziale Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB we współpracy z Katedrą Agroekosystemów na Uniwersytecie Warmińsko–Mazurskim w Olsztynie. Oceniana była reakcja wybranych izolatów i form agrofagów ziemniaka i buraka cukrowego na różne ekstrakty roślinne i ich zróżnicowane stężenia. Do badania działania antynicieniowego ekstraktów wykorzystano test laboratoryjny z użyciem płytek wielodołkowych oraz doświadczenie wazonowe. Obserwacje zachowania nicieni były prowadzone za pomocą mikroskopu odwróconego, w określonych odstępach czasu po użyciu ekstraktu. Doświadczenie określające działanie antybakteryjne i przeciwgrzybowe substancji bioaktywnych przeprowadzono z użyciem podłoży wzrostowych metodą zawieszinową, zatrutych podłoży i krążkowo-dyfuzyjną. Efekt działania ekstraktów na *Polymyxa betae* został sprawdzony z zastosowaniem metod molekularnych - w toku reakcji RT-PCR. Dodatkowo prowadzono bezpośrednie obserwacje mikroskopowe przy użyciu mikroskopu odwróconego, podczas doświadczeń na wyizolowanych zoosporach.

Badania miały umożliwić ocenę wpływu substancji bioaktywnych pochodzących z gorczycy białej, rzodkwi oleistej, katrań abisyńskiego, pieprzycy siewnej, psianki stuliszolistnej, rukwi wodnej, czosnku pospolitego, bylicy rocznej i barszczu Sosnowskiego na ograniczenie rozwoju agrofagów: *Cms*, *Pectobacterium* sp., *A. cochlioides*, *C. beticola*, *G. rostochiensis*, *P. betae* i *R. solani*. W eksperymentach sprawdzono również oddziaływanie 17 olejków eterycznych na zachowanie wyżej wymienionych mikroorganizmów i szkodników.

2.2. Warunki i zakres badań

W połowie maja na polu doświadczalnym IHAR-PIB w Bydgoszczy wysiano rzodkiew oleistą odmiany Romesa, gorzycę białą odmiany Bardena, katrań abisyński odmiany Borowski oraz psiankę stuliszolistną. W okresie początku kwitnienia danej odmiany pobrano materiał badawczy w celu przygotowania ekstraktów z części nadziemnej (rys. 1, 2, 3 i 4). Część roślin pozostawiono na poletkach w celu zebrania nasion. W fitotronie wysiano

pieprzycę siewną, rukiew wodną oraz bylicę jednoroczną (temperatura 21°C, fotoperiod 14/10 dzień/noc) (rys. 5).



Rys. 1. Uprawa rzodkwi oleistej odmiany Romesa



Rys. 2. Uprawa gorczycy białej odmiany Bardena



Rys. 3. Uprawa kataranu abisyńskiego odmiany Borowski



Rys. 4. Uprawa psianki stulizolistnej



Rys. 5. Uprawa pieprzycy siewnej (lewa strona) i rukwi wodnej (prawa strona) w komorze wegetacyjnej



Rys. 6. Pozyskiwanie soku wyciskarką firmy Meku typ R32

Materiał roślinny pobrany z poletek doświadczalnych cięto na fragmenty o długości 2-3 cm i poddano suszeniu w temp. 30°C. Z pozostałej części świeżej masy roślinnej wyciśnięto sok wyciskarką firmy Meku typ R32 (rys. 6) oraz przeznaczono do traktowania wysoką temperaturą (łaźnia wodna, 90°C, 20 min.) w celu aktywacji enzymu mirozynyzy.

W każdym przypadku otrzymany sok z roślin przesączono przez sito o otworach 0,25 mm i wirowano (8000 obr. min.⁻¹, 10 min.) (rys. 7). Otrzymany supernatant zamrażano w temperaturze -20°C. Przed zastosowaniem ekstraktu poddano go sterylizacji mechanicznej, przepuszczając przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,2 μm.



Rys. 7. Odwirowane soki z roślin rzodkwi oleistej, gorczycy białej i katranu abisyńskiego

Rozdrobniony materiał części nadziemnej gorczycy białej, rzodkwi oleistej, katranu abisyńskiego, rukwi wodnej, pieprzycy siewnej i psianki stulizolistnej po wysuszeniu i zmieleniu podawano ekstrakcji wodnej i w 50% alkoholu etylowym. Otrzymane ekstrakty odwirowywano, zamrażano i sterylizowano poprzez filtrowanie (filtr o średnicy porów 0,2 μm). Przeprowadzono także ocenę sanitarnego działania substancji zawartych w biomacie barszczu Sosnowskiego oraz czosnku pospolitego. Fragmenty roślin barszczu Sosnowskiego przywieziono z okolicy miejscowości Minikowo i Chrzastowo, koło Nakła (rys. 8). Do badań wykorzystano ogonki liściowe barszczu, z których wyciskano sok. W przypadku ekstraktów z czosnku i barszczu postępowano analogicznie jak opisano to wcześniej dla pozostałych gatunków roślin.

Szczegółowe warunki badań laboratoryjnych zostaną przedstawione podczas omówienia wyników dotyczących wpływu testowanych ekstraktów na poszczególne agrofagi buraka cukrowego i ziemniaka.



Rys. 8. Młode rośliny barszczu Sosnowskiego, wykorzystane w badaniach, miały wysokość około 1 m (zdjęcie po lewej); starsze okazy osiągają wysokość ponad 3 m (zdjęcie po prawej)

3. PRZEPROWADZONE BADANIA

3.1. *Polymyxa betae*

Doświadczenie celem oceny wpływu badanych ekstraktów na *Polymyxa betae* założono w systemie imersyjno-piaskowym opracowanym i zastosowanym wcześniej na potrzeby realizacji Programu Wieloletniego IHAR-PIB na lata 2015-2020, zadanie 2.4. System ten został opisany po raz pierwszy przez Paul i in. (1993) do oceny odporności na rizomanię siewek buraka cukrowego. Inokulum stanowiły korzenie roślin zasiedlonych przez wektor przenoszący wirusa nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka BNYVV, roztarte homogenizatorem ręcznym w roztworze odżywczym Steinera. Następnie, roztarty materiał przenoszono do 50 ml butelek oraz wprowadzano do nich po 5 nieporażonych ok. 3 tygodniowych siewek buraka cukrowego odmiany Japola. Aby ocenić wpływ badanych ekstraktów na patogeny wyżej opisane, inokulum przed wprowadzeniem do butelek doświadczalnych poddawano traktowaniu danym ekstraktem w objętości od 200 μ l do 1 ml, zależnie od zastosowanego ekstraktu/mieszanki przez 24 h w 37°C. Dodatkowo, celem weryfikacji wpływu koncentracji inokulum na efekt działania badanych ekstraktów w wybranych przypadkach stosowano zwiększoną dwukrotnie dawkę inokulum oraz ekstraktu. Wyciągi metanolowe lub w chloroformie były aplikowane przez nasączenie agrożelu. Doświadczenia utrzymywano w klimatyzowanym pomieszczeniu laboratoryjnym w temperaturze 22/17°C (dzień/noc) przy fotoperiodzie naturalnym. Tabela 1 zawiera wykaz kombinacji doświadczeń zastosowanych celem oceny rozwoju liczebności *Polymyxa betae*. Poza zastosowanymi w pierwszym roku badań gorczycą białą odmiany Bardena i rzodkwią oleistą odmiany Romesa w bieżącym roku badano również wpływ innych ekstraktów, pozyskanych z psianki stulizolistnej, barszczu Sosnowskiego oraz bylicy rocznej (rys. 9). Dokonano również wstępnej oceny wybranych wyciągów pozyskanych z innych gatunków roślin i porostów (m.in. leczniczych uzyskanych w Katedrze Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu). Rośliny buraka stanowiące materiał

do pobrania inokulum (odmiany Japola lub Jarysa) wysiewano w kuwetach do ziemi stanowiącej mieszaninę 1:1:1 ziemi rizomaniowej (z wektorem zasiedlonym głównie przez patotyp A wirusa), uniwersalnego podłoża ogrodniczego oraz autoklawowanego piasku. Korzenie pobierano po 1,5 miesiąca wzrostu w porażonej ziemi. Rośliny odmiany Japola przeznaczone do traktowania ekstraktami w butelkach doświadczalnych wysiewano do ogrodniczego podłoża uniwersalnego w kuwetach. Celem zapewnienia materiału do analiz molekularnych, po 4, 5 i 6 tygodniach od momentu założenia doświadczenia w warunkach porażenia pobierano naważki korzenia ok. 100 mg, po czym materiał wymrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80 °C.



Rys. 9. Rośliny bylicy rocznej *Artemisia annua* utrzymywane w doświadczeniach laboratoryjnych do stadium kwitnienia, celem pobrania ziela do sporządzenia ekstraktów

Tab. 1. Zestawienie doświadczeń z płynnymi ekstraktami pozyskanymi z roślin oraz doświadczeń enzymatycznych (enzym mirozynaza + glukozynolan sinigryna)

Nazwa rośliny	Typ ekstraktu / mieszaniny	Dawka*	
Gorczyca biała, odmiana Bardena	Sok z części nadziemnej rośliny	250 µl	500 µl
Gorczyca biała odmiana Bardena	Sok z części nadziemnej rośliny z dodatkiem mirozynazy	250 µl	500 µl
Rzodkiew oleista, odmiana Romesa	Sok z części nadziemnej rośliny	500 µl	
Rzodkiew oleista, odmiana Romesa	Sok z części nadziemnej rośliny z dodatkiem mirozynazy	200 µl	500 µl
Psianka stulizolistna	Sok z części nadziemnej rośliny	200 µl	500 µl
Barszcz Sosnowskiego	Sok z części nadziemnej rośliny	500 µl	
Bylica roczna	Macerat RT	500 µl	1000 µl
Bylica roczna	Macerat 65 °C	500 µl	1000 µl

Bylica roczna	Macerat/chloroform	500 μ l		
Bylica roczna	Świeże części nadziemne/roztwór wodny	500 μ l		
Bylica roczna	Świeże części nadziemne/FeSO ₄ x 7H ₂ O	500 μ l		
Bylica roczna	Świeże części nadziemne/chloroform - rozdzielone na 2 fazy przez wirowanie	500 μ l		
Bylica roczna	Świeże części nadziemne ekstrakt białek	500 μ l		
X	Mirozynaza + sinigryna 17,5 mM (inkubacja w 37 °C przez 1h)	200 μ l	375 μ l	500 μ l

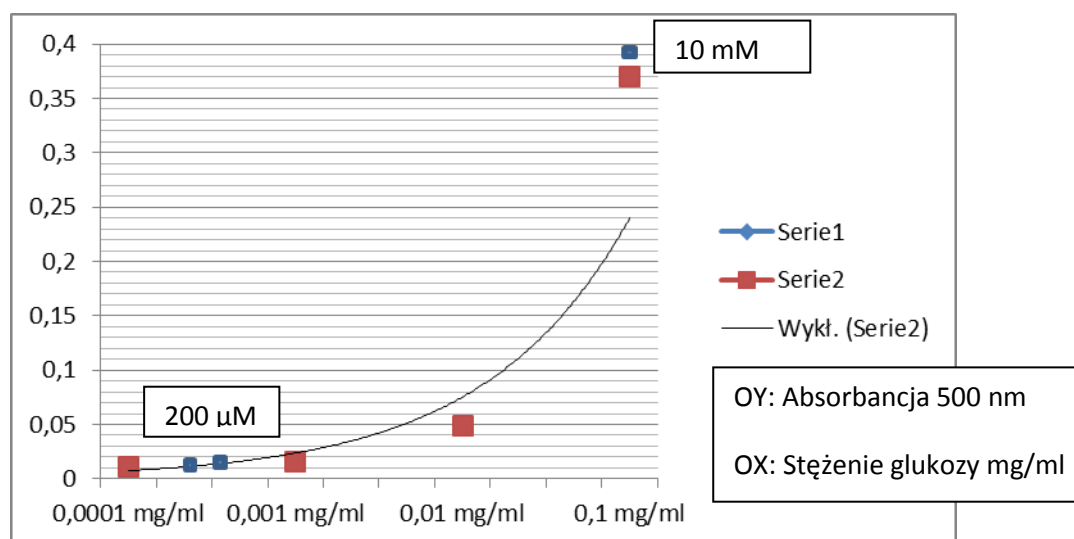
* stosowana na podstawową porcję inokulum korzeni

W przypadku obserwacji mikroskopowych stosowano objętości 1:1 ekstrakt/zawiesina zoospor.

Założono równocześnie następujące doświadczenia kontrolne dla oceny porównawczej:

- 1) kontrola pozytywna - rośliny w roztworze odżywczym Steinera w obecności inokulum korzeni,
- 2) kontrola negatywna - rośliny w roztworze odżywczym Steinera,
- 3) kontrola eksperymentalna ekstraktów - mieszanina substancji aktywnych występujących w badanych ekstraktach opracowana na potrzeby eksperymentu, tj. enzymu - mirozynazy (tioglukozydaza z *Sinapis alba*) oraz substratu - sinigryny (SIGMA-ALDRICH).

Stężenia substratu oraz enzymu w mieszaninie kontrolnej zostały ustalone poprzez ocenę stopnia hydrolizy substratu na podstawie spektrofotometrycznego odczytu ilości uwolnionej glukozy (reakcja GOD-PAP, Aqua-med), co zostało szczegółowo opisane w ubiegłorocznym sprawozdaniu. Na rysunku 10 przedstawiono zastosowane stężenia efektywnie przyczyniające się do wzrostu stężenia glukozy w doświadczeniu kontrolnym. Jednostki enzymu dostosowano w oparciu o wskazania, iż 1 jednostka enzymu powoduje hydrolizę 1 μ mola sinigryny w 1 minutę (Shikita i in. 1999).



Rys. 10. Krzywa wzorcową GOD-PAP dla reakcji kontrolnych. Serie 1 reakcje badane - wartości absorbancji 0,0135 oraz 0,0151 dla 200 μ M sinigryny oraz 0,388 dla 10 mM sinigryny. Serie 2 wzorzec glukozy.

3.1.1. Zakres badań

Analizy molekularne

Wpływ badanych ekstraktów na zasiedlenie korzeni przez *Polymyxa betae* i zdolność do przenoszenia BNYVV przez *P. betae* oceniono w toku molekularnej detekcji w/w patogenów z korzeni roślin rosnących w obecności ekstraktów w reakcji RT-PCR. Izolację RNA wykonano z ok. 100 mg naważek korzeni przez oczyszczanie na kolumnkach z zastosowaniem zestawu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), zgodnie z protokołem producenta. Czystość i stężenie RNA oceniono spektrofotometrycznie z zastosowaniem NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), natomiast jakość na 1,2% żelu agarozowym (DNA Gdańsk) na bazie TAE z dodatkiem 5% podchlorynu sodu (Aranda i in. 2012). Syntezę cDNA prowadzono z zastosowaniem 300 ng RNA w 20 µl objętości reakcji, w obecności pozostałych komponentów reakcji: starter oligo(dT)₁₈ (Genomed), mieszanina dNTP 10 mM każdego (Thermo Scientific), 5x RT bufor (Thermo Scientific), inhibitor RNaz RiboLock™ (Thermo Scientific) oraz odwrotna transkryptaza RevertAid™ (Thermo Scientific) w stężeniach oraz warunkach termicznych opisanych przez producenta.

RT-PCR realizowano na bazie uzyskanej w pierwszym etapie matrycy cDNA z użyciem następujących substratów: MgCl₂ (Thermo Scientific; finalne stężenie: 3,125 mM), dNTP (Thermo Scientific; finalne stężenie: 0,25 mM), startery (Genomed; 1,25 µM), polimeraza DreamTaq (Thermo Scientific; 0,05 u/µl), 10x Taq bufor z (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific; 1x) oraz woda bez RNaz (GenoPlast Biochemicals) do 10 µl. W niniejszym doświadczeniu prowadzono amplifikację sekwencji specyficznych wektora oraz wirusa zgodnie z metodyką opisaną przez Meunier i in. (2003).

Produkty reakcji rozdzielano przy napięciu 5V/cm na 1,5% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny (Promega; 0,5 µg/ml). Wielkość produktów została oszacowana w systemie dokumentacji Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad Laboratories Srl), program Quantity One, wersja 4.0.3, poprzez odniesienie do markera wielkości DNA GeneRuler™ 100 bp Plus (Thermo Scientific). Dokonano oceny obecności specyficznych produktów reakcji oraz względnej intensywności produktów w stosunku do kontroli.

Obserwacje mikroskopowe

Wpływ ekstraktów na zachowanie *P. betae* badano również w zawiesinie zoospor w roztworze odżywczym Steinera, uzyskanej zgodnie z metodyką opisaną przez Paul i in. (1993). Obserwacje prowadzono w mikroskopie odwróconym (OLYMPUS CK2) na płytkach hodowlanych 6-dołkowych (NEST) oraz w komorach na szkiełkach nakrywkowych Lab-Tek™ (Nunc™). Zawiesinę zoospor poddawano działaniu uzyskanych ekstraktów w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowano przez 24 h w 37°C, po czym prowadzono obserwacje morfologii oraz ruchu zoospor w badanych mieszaninach. Dla weryfikacji obecności komórek z uszkodzoną błoną, prawdopodobnie podlegających śmierci, wykonano barwienie przyżyciowe błękitem trypanu.

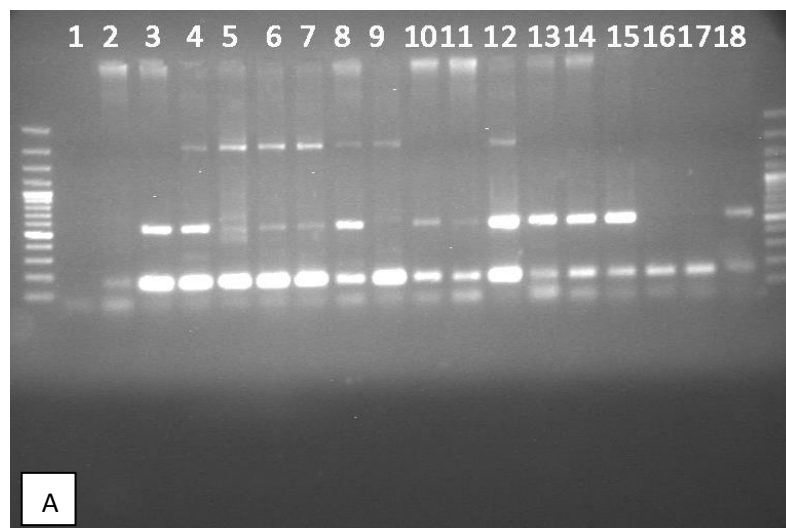
W początkowym etapie obserwacji przeprowadzono również znakowanie form przetrwalnych na płytkach hodowlanych 6-dołkowych z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych przeciwko BNYVV oraz koniugatu przeciwciała drugorzędowego z alkaliczną fosfatazą. Detekcja następowała przez dodanie substratu dla AP, fosforan paranitrofenyłu pNPP (SIGMA-ALDRICH). Obecność form żywych, aktywnie poruszających się, czyli zoospor

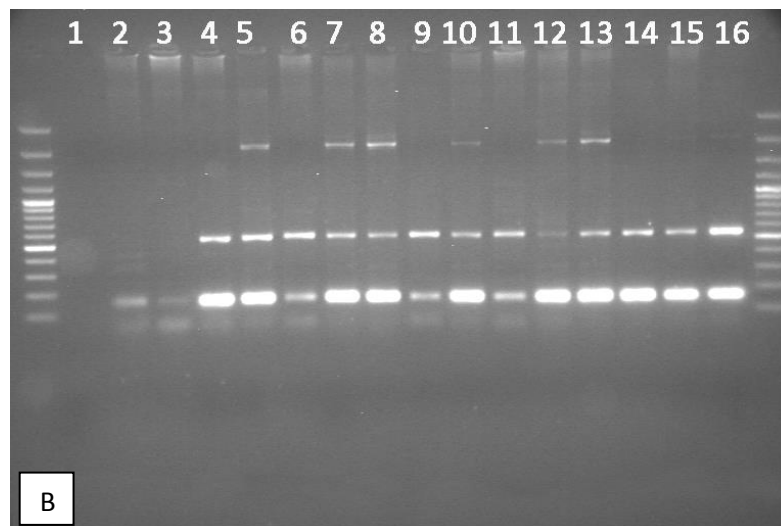
stwierdzano na podstawie wybranych cech morfologicznych, tj. występowania wici oraz średniej wielkości zgodnej z opisywaną w przedziale 4-7 μm .

3.1.2. Wyniki badań

Analizy molekularne

Przeprowadzone doświadczenia wskazują, iż po zastosowaniu badanych ekstraktów w porównaniu do doświadczenia kontrolnego dochodziło do ograniczenia wykrywalnej ilości *P. betae*, jednakże było to w znaczącym stopniu zależne od zastosowanej wyjściowej koncentracji inokulum. Zwiększenie proporcji inokulum w roztworze odżywczym, mimo zastosowanej równoważnej dawki ekstraktu, często wiązało się z detekcją wyższego poziomu patogena, co stwierdzono przykładowo w przypadku gorzycy białej odmiany Bardena. Najskuteczniejsze z dotychczas przetestowanych ekstraktów w ograniczaniu populacji *P. betae* były mieszanina kontrolna mirozynaza z sinigriną 17,5 mM w dawce 2 x 375 μl (była ona skuteczna nawet pomimo zwiększenia ilości inokulum), soki z rzodkwi oleistej i gorzycy białej wzbogacone mirozynazą oraz soki z barszczu Sosnowskiego i psianki stulizolistnej (rys. 11A). Ograniczenie wykrywalnej ilości *P. betae* nie zawsze było równoznaczne z zapobiegnięciem infekcji wirusem BNYVV. Jednakże, w przypadku zastosowania soku z psianki analiza RT-PCR nie wykazała obecności wirusa, a na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż do zmniejszenia porażenia BNYVV mogło dochodzić także na skutek działania mieszaniny mirozynazy z sinigriną, soku z rzodkwi Romesa oraz barszczu Sosnowskiego. Wyraźny dawko-zależny efekt ograniczenia populacji *P. betae* widoczny był również w przypadku zastosowania maceratów z bylicy rocznej 1 ml w stosunku do 0,5 ml (rys. 11B).





Rys. 11. Wpływ badanych ekstraktów na detekcję *P. betae* oraz BNYVV z korzeni roślin utrzymywanych w roztworze odżywczym. Produkty typowe dla *P. betae* ok. 170 pz oraz BNYVV ok. 545 pz. **A** 1 - kontrola reakcji PCR, 2 - kontrola negatywna, 3, 4 - kontrola pozytywna, 5 - mieszanina mirozynaza z sinigriną 200 μ l, 6, 7 - mieszanina mirozynaza z sinigriną 500 μ l, 8 - mieszanina mirozynaza z sinigriną 2 x 375 μ l, 9 - sok Romesa 500 μ l, 10 - sok Romesa 200 μ l + mirozynaza, 11 - sok Romesa 500 μ l + mirozynaza, 12 - sok Bardena 2 x 250 μ l, 13 - sok Bardena 2 x 500 μ l, 14 - sok Bardena 2 x 250 μ l + mirozynaza, 15 - sok Bardena 2 x 500 μ l + mirozynaza, 16 - sok psianka stulizolistna 200 μ l, 17 - sok psianka stulizolistna 500 μ l, 18 - sok barszcz Sosnowskiego 500 μ l;

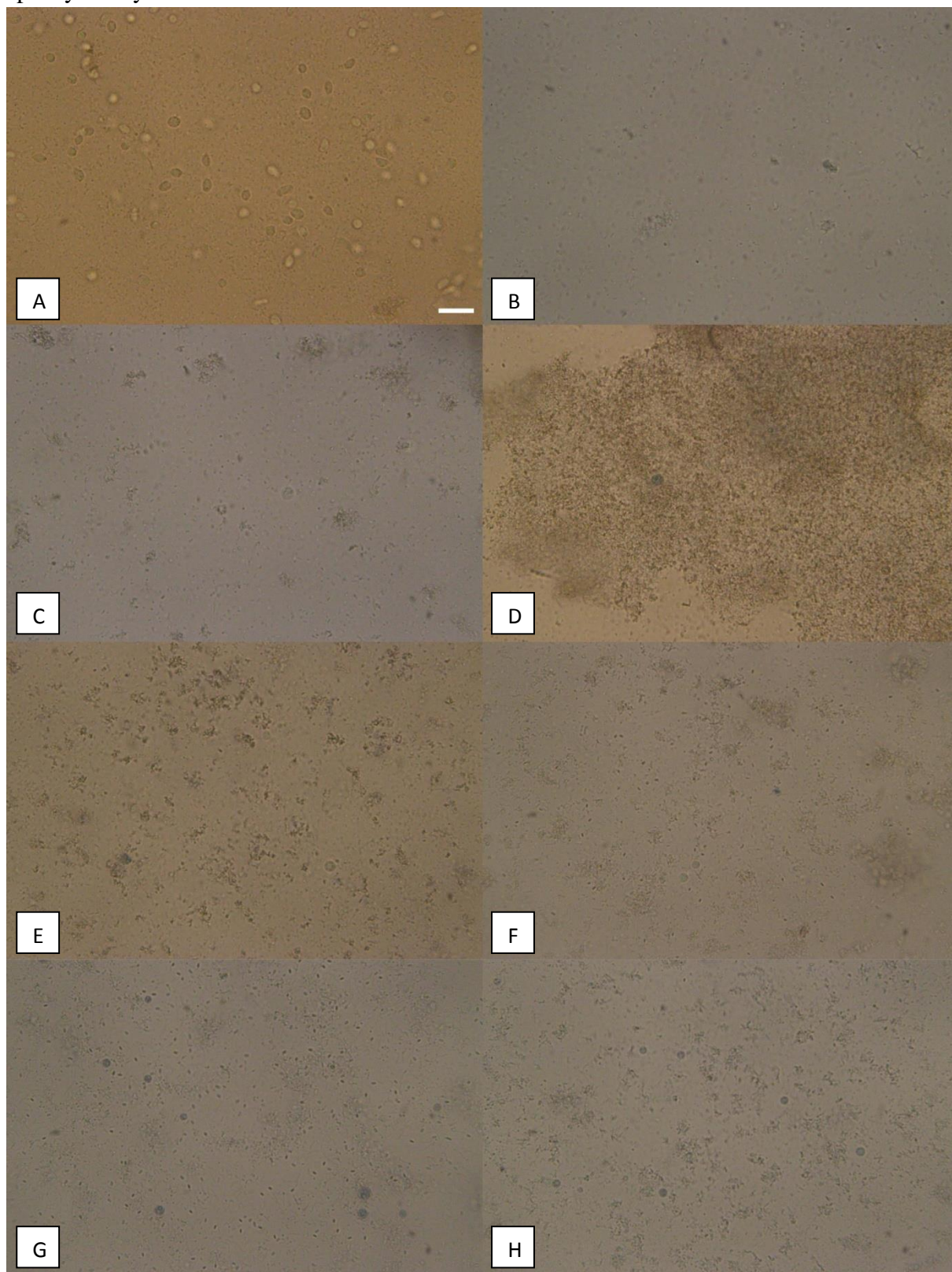
B 1 - kontrola reakcji PCR, 2, 3 - kontrola negatywna, 4, 5 - kontrola pozytywna, 6 - mieszanina mirozynaza z sinigriną 500 μ l, 7 - macerat bylica/chloroform, 8 - macerat bylica 65 $^{\circ}$ C 2 x 500 μ l, 9 - macerat bylica 65 $^{\circ}$ C 2 x 1000 μ l, 10 - macerat bylica RT 2 x 500 μ l, 11 - macerat bylica RT 2 x 1000 μ l, 12 - ekstrakt wodny bylica 500 μ l, 13 - ekstrakt bylicy świeże części nadziemne/FeSO₄ x 7H₂O 500 μ l, 14 - ekstrakt bylica/chloroform/faza górna 500 μ l, 15 - ekstrakt bylica/chloroform/faza dolna 500 μ l, 16 - ekstrakt białek bylica 500 μ l.

Obserwacje mikroskopowe

Mikroskopowe obserwacje wydają się potwierdzać uzyskane wyniki molekularne, o czym świadczą następujące spostrzeżenia:

- 1) w doświadczeniu kontrolnym w zawiesinie widoczna była duża ilość żywych, szybko poruszających się za pomocą wici zoospor *P. betae*, o typowej morfologii (rys. 12A);
- 2) efektem zastosowania mieszaniny kontrolnej mirozynaza/17,5 mM sinigrina był najprawdopodobniej rozpadu komórek *P. betae*, wskutek śmierci komórki - na płytkach hodowlanych obserwowano głównie nieregularne fragmenty komórkowe, nie stwierdzono zoospor żywych o typowej morfologii (Rys. 12B); już bezpośrednio po dodaniu mieszaniny do komórek obserwowano utratę zdolności do ruchu, bezwładne unoszenie się wici;
- 3) pod wpływem soków z łodyg badanych odmian gorczycy białej i rzodkwi oleistej, a także soków z psianki stulizolistnej oraz barszczu Sosnowskiego nastąpiło znaczące ograniczenie zdolności do aktywnego przemieszczania się zoospor, pojawiały się natomiast często komórki o nieregularnym kształcie, obkurczone i formy spoczynkowe, oraz komórki o przerwanej ciągłości błony (dochodziło do barwienia komórek błękitem trypanu) (rys. 12C-F); maceraty i ekstrakty z bylicy rocznej powodowały najprawdopodobniej śmierć komórek (obserwowano liczne komórki obkurczone, intensywnie barwiące się błękitem trypanu) (rys. 12G-H);
- 4) zastosowanie badanych ekstraktów i mieszanin bezpośrednio na populację zoospor patogena w postaci zawiesiny mogło przyczyniać się do efektywnego ograniczenia zdolności

do aktywnego przemieszczania się wektora i śmierci komórki, ale również do tworzenia form spoczynkowych.



Rys. 12. Wpływ badanych ekstraktów na morfologię i zachowanie zoospor *P. betae*. A - zawiesina zoospor kontrolna, widoczne wici i znacząca aktywność motoryczna, B - reakcja kontrolna mirozyna/sinigryna 17,5 mM, C - sok z łądyg Bardeny, D - sok z łądyg Romeszy, E - sok z ogonków

psianki stuliszolistnej, F - sok z barszczu Sosnowskiego, G - macerat suszu bylicy rocznej, H - świeże ziele bylicy/roztwór wodny.

3.1.3. Podsumowanie

1. Zoospory *P. betae* wykazały się znaczącą wrażliwością na działanie badanych ekstraktów, szczególnie w przypadku dawek zastosowanych bezpośrednio na zawiesinę zoospor, co potwierdzono w toku obserwacji mikroskopowych. Detekcja molekularna wskazuje, iż ograniczenie *P. betae* w zawieszynie pod działaniem ekstraktów jest możliwe, ale jest istotnie zależne od wyjściowej ilości inokulum (równoważna dawka ekstraktu na inokulum w przypadku jego wyższej koncentracji nie zawsze zabezpiecza przez rozwojem patogena w równym stopniu) oraz mimo ograniczenia ilości wektora nie zawsze możliwe jest równoczesne uniknięcie infekcji wirusem. Przyczyną tego jest najprawdopodobniej trudność penetracji badanych ekstraktów do głębszych partii korzeni stanowiących inokulum - zastosowane źródło wektora - oraz możliwość tworzenia form przetrwalnych przez część populacji. Dlatego też, celem weryfikacji tej hipotezy, wskazane byłoby przeprowadzenie inokulacji czystą zawiesiną zoospor po traktowaniu ekstraktami.

2. Zastosowanie soków z gorzycy białej i rzodkwi oleistej wyraźnie wpływa na zmniejszenie zasiedlenia korzeni buraka cukrowego przez *P. betae*, w szczególności po wzbogaceniu ich w enzym odpowiedzialny za hydrolizę glukozyolanów - mirozynazę. Zarówno obserwacje mikroskopowe, jak i analizy molekularne wskazują na możliwość ograniczenia populacji patogena również pod wpływem soku z barszczu Sosnowskiego oraz psianki stuliszolistnej, a także ekstraktów bylicy rocznej. Obserwacje mikroskopowe po barwieniu błękitem tryptanu potwierdzają, że po bezpośrednim zastosowaniu ekstraktów w zawieszynie w większości przypadków dochodzi do śmierci zoospor.

3. Zastosowanie wybranego ekstraktu jako preparatu doglebowego bądź składnika otoczki nasion buraka cukrowego wymaga opracowania najbardziej skutecznej postaci. Z przetestowanych mieszanin/ekstraktów znaczącą efektywność stwierdzono w przypadku mieszaniny 17,5 mM sinigriny z mirozynazą (w dawce 2x 375 µl), jednakże porównywalną efektywność można było uzyskać dla badanych ekstraktów, co było jednak bardziej zależne od wyjściowej koncentracji inokulum.

3.2. *Rhizoctonia solani*, *Aphanomyces cochlioides* i *Cercospora beticola*

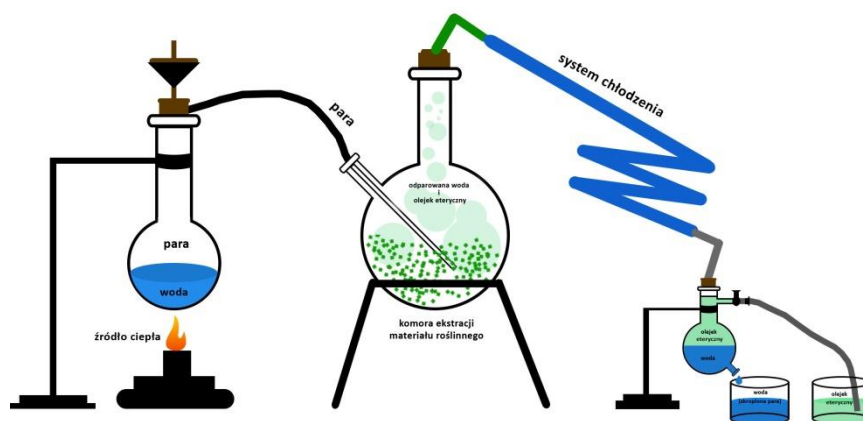
3.2.1. Działanie soków, ekstraktów i olejków eterycznych na *R. solani*, *A. cochlioides* i *C. beticola*

W trakcie doświadczeń badano oddziaływanie soków i ekstraktów pozyskanych ze świeżej masy części nadziemnych wybranych gatunków roślin (metodą wyłaczania i destylacji z parą wodną) oraz zakupionych zagęszczonych olejów eterycznych, na ograniczenie wzrostu mikroorganizmów chorobotwórczych *R. solani*, *A. cochlioides* i *C. beticola*, które powodują duże straty w obsadzie i plonie buraka cukrowego.

Sok z barszczu Sosnowskiego, gorzycy białej odmiany Bardena, rzodkwi oleistej odmiany Romesa, katanu abisyńskiego odmiany Borowski i czosnku pospolitego uzyskiwano ze świeżej masy roślinnej przy użyciu wyciskarki firmy Meku typ R32.

Otrzymany produkt odwirowywano (8000 obr. min⁻¹, 10 min.) i przepuszczano przez filtr o średnicy porów 0,2 μm.

Do wytworzenia ekstraktu z psianki stulizolistnej, gorczycy białej Bardena i rzodkwi oleistej Romesa wykorzystano metodę destylacji. Po ogrzaniu wody i przejściu pary wodnej przez rozdrobniony materiał roślinny, zostaje ona wraz z rozpuszczonymi składnikami schłodzona. Niektóre gatunki roślin zawierają dodatkowo w biomacie olejki eteryczne, które są hydrofobowe, dzięki czemu można je oddzielić od ekstraktu wodnego (rys. 13).



Źródło: <http://www.oils-wellness.pl/o-olejkach-pl/wprowadzenie-pl/olejki-eteryczne-pl/>

Rys. 13. Schemat zestawu laboratoryjnego do destylacji

Skuteczność soków, ekstraktów i olejków eterycznych w ograniczaniu wzrostu liniowego badanych patogenów oceniano metodą zatrutych podłoży (Kowalik R., Krechniak E. 1961). Do płynnej pożywki z agaru glukozowo-ziemniaczanego (PDA) dodawano pozyskane z roślin roztwory w takich objętościach, by uzyskać koncentracje 10% dla soków roślinnych, 0,6% dla ekstraktów/hydrolatów i 0,3% dla olejków eterycznych. Tak przygotowane podłoża rozlewano do płytek Petriego i po ich zestaleniu szczepiono krążkiem agaru o średnicy 9 mm, przerośniętego grzybnią, osobno, każdego z trzech w/w patogenów. W kombinacji kontrolnej negatywnej *A. cochlioides*, *C. beticola* i *R. solani* hodowano na pożywce niezawierającej badanych substancji, natomiast w kontroli pozytywnej zastosowano preparat Funguran A-Plus NEW 50 WP (substancja aktywna – miedź; dopuszczona w produkcji ekologicznej) w ilości 4 g/l. Płytki przetrzymywano przy stałej temperaturze 24°C. Aktywność badanych roztworów w ograniczaniu wzrostu liniowego strzępek patogena oceniano na podstawie pomiarów ich przyrostu. Pomiarów wykonywano co 24, 48, 72 i 168 godzin od wyłożeniu krążków agaru. Obserwowano wpływ badanego ekstraktu na przerastanie powierzchni pożywki przez patogeny. Eksperyment wykonano w 3 powtórzeniach. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono indeks tempa wzrostu liniowego testowanych mikroorganizmów (ITW):

$$ITW = \frac{A}{D} + \frac{b_1}{d_1} + \dots + \frac{b_x}{d_x}$$

gdzie: A – średnia z pomiarów średnicy kolonii grzyba (mm), D – czas trwania doświadczenia (dni), b₁...b_x – przyrost średnicy kolonii (mm), d₁...d_x – liczba dni od ostatniego pomiaru.

Dodatkowo wykonano test metodą dyfuzyjno-krażkową. Jako nośnik zagęszczonego olejku eterycznego zastosowano sterylne krążki bibuły o średnicy 9 mm, na które naniesiono po 30 µl olejku.

3.2.2. Wyniki badań

Skuteczność pozyskanych do badań soków i olejków eterycznych testowano na dwóch izolatach *R. solani* należących do AG 2 i AG 4, dwóch izolatach *A. cochlioides* oraz dwóch izolatach *C. beticola*. Wymienione czynniki chorobotwórcze wyizolowano w Pracowni Hodowli Odpornościowej i Technologii Produkcji Roślin Korzeniowych IHAR-PIB w Bydgoszczy, w wyniku analiz mikologicznych korzeni i liści buraka cukrowego, z typowymi objawami porażenia dla danego patogena. Po oczyszczeniu izolaty były przechowywane w banku patogenów oddziału IHAR-PIB w Bydgoszczy.

Przeprowadzone badania laboratoryjne pozwoliły określić bezpośredni wpływ badanych ekstraktów na dynamikę wzrostu testowanych grzybów i glonowców grzybopodobnych (*A. cochlioides*).

Zastosowane soki, ekstrakty i olejki eteryczne modyfikowały rozrost powierzchniowy strzępek, którego zróżnicowanie bardzo dobrze jest widoczne w wynikach przedstawionych jako ITW (tab. 2, 3 i 4). Przy czym poszczególne gatunki badanych patogenów w różny sposób reagowały na udział w podłożu poszczególnych ekstraktów roślinnych. Zróżnicowane działanie fungistatyczne uzależnione było również od koncentracji badanych substancji w pożywce. Duże różnice w pomiarach przyrostu strzępek, pomiędzy badanymi gatunkami mikroorganizmów, spowodowane były ich cechami genetycznymi, charakterystycznymi dla danego gatunku. Z badań wynika, że najwolniejszym tempem wzrostu charakteryzowały się izolaty *C. beticola*, natomiast najszybszym *A. cochlioides*. Jednocześnie *A. cochlioides* okazał się najbardziej wrażliwy na badane olejki eteryczne.

W testach z udziałem soków roślinnych (po wyłoczeniu) z barszczu Sosnowskiego, gorczycy białej odmiany Bardena, rzodkwi oleistej odmiany Romesa, katanu abisyńskiego odmiany Borowski i czosnku pospolitego o stężeniach 10% (w pożywce), jedynie czosnek pospolity całkowicie zatrzymał wzrost *A. cochlioides* oraz *C. beticola*, natomiast w przypadku *R. solani* ograniczał wzrost grzybni. W celu określenia minimalnego, skutecznego stężenia na ograniczenie wzrostu badanych grzybni przeprowadzono test soku z czosnku o takim samym stężeniu, jak w przypadku olejków, 0,3%. Przyrost grzybni był na poziomie kontroli negatywnej (tab. 2 i tab. 5). Czyli sok z czosnku o stężeniu 0,3% nie ograniczył wzrostu badanych patogenów.

Burgiel i in. (2008) wykazali, że metanolowy ekstrakt oraz olejek z owoców barszczu Sosnowskiego odznacza się znaczną aktywnością fungistatyczną, hamując rozwój grzybów z rodzajów *Fusarium* i *Alternaria*. Warto zatem przeprowadzić w przyszłości dodatkowe badania w celu sprawdzenia wpływu ekstraktów z nasion barszczu Sosnowskiego na ważne gospodarczo agrofagi buraka cukrowego.

Tab. 2. Fungistatyczne oddziaływanie soków roślinnych (stężenie 10%), otrzymanych z wybranych gatunków i odmian roślin, na patogeny buraka cukrowego: *R. solani*, *A. cochlioides* i *C. beticola*, wyrażone średnicą (w mm) grzybni patogena mierzoną po 24, 48, 72 i 168 godzinach oraz wartością ITW

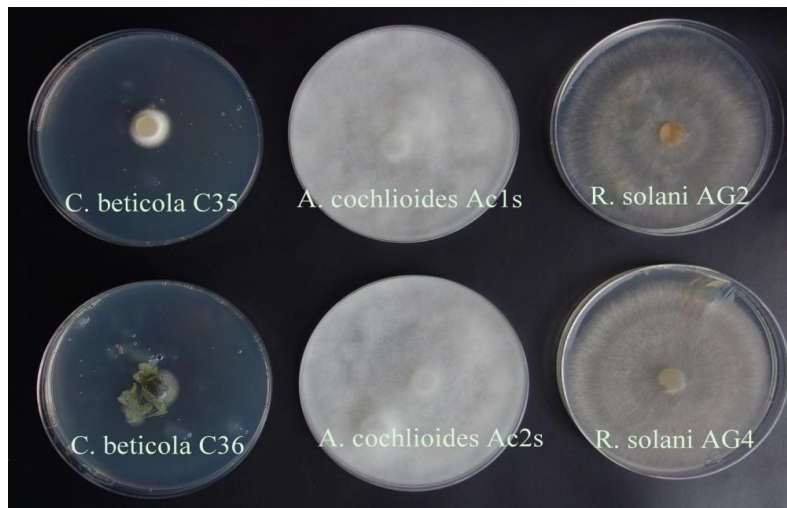
	Barszcz Sosnowskiego					Gorzycza biała Bardena					Rzodkiew oleista Romesa				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	22	42	75	85	80,5	0	46	75	85	80,5	0	39	62	85	70,8
<i>R. solani</i> AG4	19	61	85	85	88,0	0	51	80	85	84,3	0	35	71	85	77,5
<i>A. cochlioides</i> Ac1s	52	85	85	85	88,0	48	85	85	85	88,0	0	62	85	85	88,0
<i>A. cochlioides</i> Ac2s	57	85	85	85	88,0	50	85	85	85	88,0	20	72	85	85	88,0
<i>C. beticola</i> C35	0	12	17	42	24,8	0	12	16	35	22,0	0	12	16	30	20,6
<i>C. beticola</i> C36	0	12	17	44	25,3	0	12	16	33	21,4	0	12	14	30	19,1
	Katrzan abisyński Borowski					Czosnek pospolity					Czosnek pospolity 0,3%				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	0	42	72	85	78,3	0	0	0	17	4,9	4	28	53	85	64,0
<i>R. solani</i> AG4	0	54	79	85	83,5	0	14	17	71	33,0	15	43	70	85	76,8
<i>A. cochlioides</i> Ac1s	50	85	85	85	88,0	0	0	0	0	0,0	36	85	85	85	88,0
<i>A. cochlioides</i> Ac2s	50	85	85	85	88,0	0	0	0	0	0,0	38	85	85	85	88,0
<i>C. beticola</i> C35	0	12	17	34	22,5	0	0	0	0	0,0	0	12	16	33	21,4
<i>C. beticola</i> C36	0	12	16	36	22,3	0	0	0	0	0,0	0	12	16	36	22,3

ITW - indeks tempa wzrostu grzyba – opis w metodyce

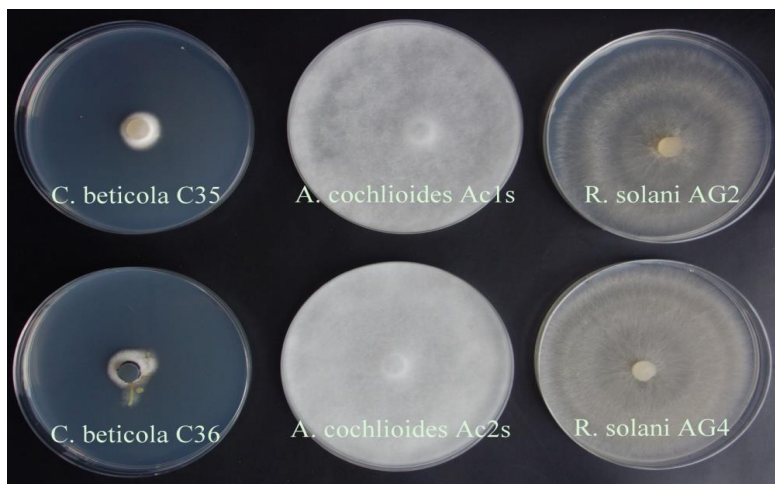
W kombinacjach z ekstraktami wodnymi pozyskanymi z psianki stulizolistnej, gorzycy białej i rzodkwi oleistej (tab. 3, rys. 14, 15 i 16) zahamowanie wzrostu grzybów było niezauważalne i porównywalne z kontrolą negatywną (tab. 5).

Tab. 3. Fungistatyczne oddziaływanie hydrolatów roślinnych (stężenie 0,6%), otrzymanych z wybranych gatunków i odmian roślin, na patogeny buraka cukrowego: *R. solani*, *A. cochlioides* i *C. beticola*, wyrażone średnicą (w mm) grzybni patogena mierzoną po 24, 48, 72 i 168 godzinach oraz wartością ITW

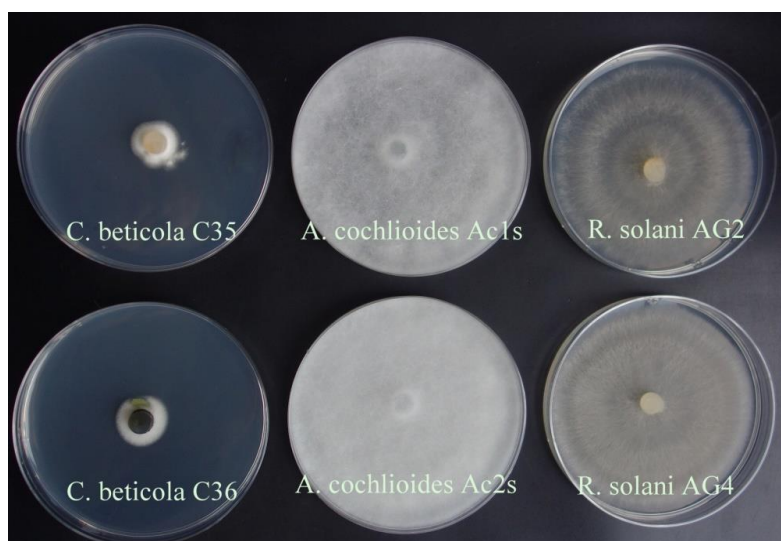
	Psianka stulizolistna					Gorzycza biała Bardena					Rzodkiew oleista Romesa				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	35	60	83	85	86,5	38	64	83	85	86,5	32	55	77	85	82,0
<i>R. solani</i> AG4	19	49	79	85	83,5	21	52	84	85	87,3	21	49	78	85	82,8
<i>A. cochlioides</i> Ac1s	54	85	85	85	88,0	0	85	85	85	88,0	19	85	85	85	88,0
<i>A. cochlioides</i> Ac2s	55	85	85	85	88,0	62	85	85	85	88,0	64	85	85	85	88,0
<i>C. beticola</i> C35	0	12	15	37	21,8	0	12	16	39	23,1	0	13	16	37	22,6
<i>C. beticola</i> C36	0	10	14	44	23,1	0	11	18	43	25,8	0	12	17	44	25,3



Rys. 14. Efekt zastosowania 0,6% hydrolatu pozyskanego ze świeżej masy części nadziemnej psianki stuliszolistnej po 72h (powolny, niezależny od hydrolatu przyrost strzępek *C. beticola*)



Rys. 15. Efekt zastosowania 0,6% hydrolatu pozyskanego ze świeżej masy części nadziemnej gorczycy Bardena po 72h (powolny, niezależny od hydrolatu przyrost strzępek *C. beticola*)



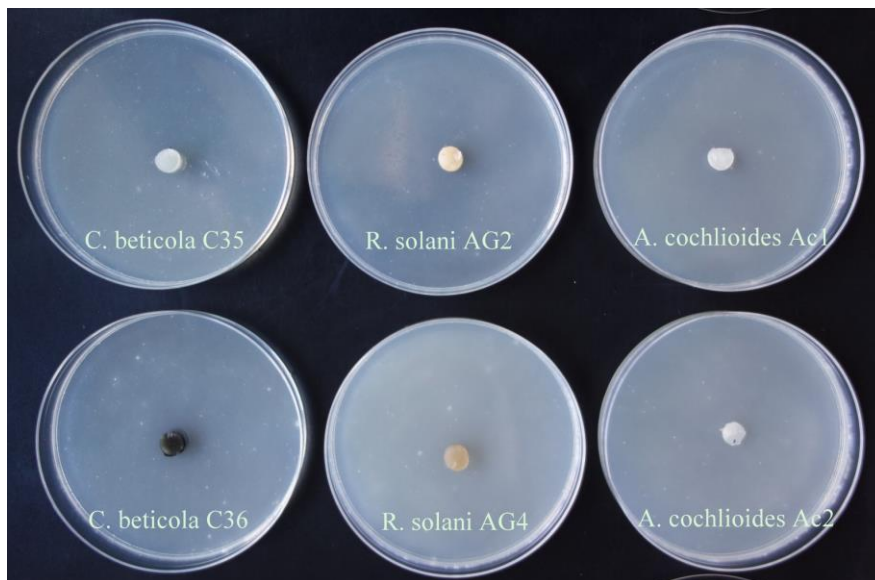
Rys. 16. Efekt zastosowania 0,6% hydrolatu pozyskanego ze świeżej masy części nadziemnej rzodkwi Romesa po 72h (powolny, niezależny od hydrolatu przyrost strzępek *C. beticola*)

Bardzo wysoką aktywnością w zakresie hamowania rozwoju badanych agrofagów buraka cukrowego charakteryzowały się zagęszczone olejki eteryczne: lemongrasowy, cynamonowy (rys. 17), geraniowy, z goździkowca korzennego, majerankowy oraz lebiodkowy, które przez okres trwania testów całkowicie ograniczały wzrost wszystkich badanych patogenów. Skutecznym w ograniczaniu wzrostu mikroorganizmów był również olejek anyżowy i miętowy, które całkowicie wstrzymały rozrost *A. cochlioides* i *C. beticola* oraz znacznie ograniczały przyrost *R. solani* AG 2. Olejek drzewa herbacianego, pod koniec testu pozwolił rozpocząć wzrost jedynie *C. beticola* oznaczonej jako C36. Natomiast zakupiony ekstrakt miętowy o takim samym stężeniu co olejek miętowy, w ogóle nie wykazał właściwości ograniczania przyrostu patogenów. Olejki szalwiowy (rys. 18), imbirowy i lawendowy całkowicie ograniczały wzrost izolatów grzybopodobnego glonowca *A. cochlioides* i w zróżnicowanym stopniu pozostałe grzyby (tab. 4).

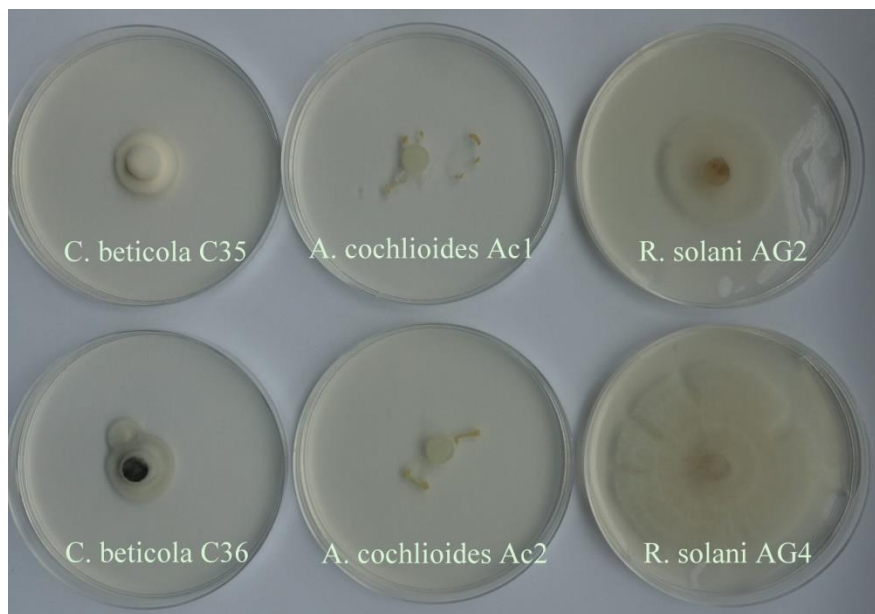
Tab. 4. Fungistatyczne oddziaływanie wybranych olejków eterycznych (stężenie 0,3%) na patogeny buraka cukrowego: *R. solani*, *A. cochlioides* i *C. beticola*, wyrażone średnicą (w mm) grzybni patogena mierzoną po 24, 48, 72 i 168 godzinach oraz wartością ITW

	Lemongrasowy					Bergamotowy					Szałwiowy				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R.solani</i> AG2	0	0	0	0	0,0	0	0	3	73	23,1	0	0	0	48	13,7
<i>R.solani</i> AG4	0	0	0	0	0,0	0	0	0	70	20,0	0	7	9	72	27,3
<i>A.cochlioides</i> Ac1s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>A.cochlioides</i> Ac2s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C35	0	0	0	0	0,0	0	9	9	19	12,2	0	8	8	20	11,7
<i>C. beticola</i> C36	0	0	0	0	0,0	0	8	8	27	13,7	0	2	2	21	7,5
	Imbirowy					Cynamonowy					Rozmarynowy				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	0	12	21	66	34,6	0	0	0	0	0,0	0	0	11	85	32,5
<i>R. solani</i> AG4	0	15	25	58	35,3	0	0	0	0	0,0	0	0	8	63	24,0
<i>A. cochlioides</i> Ac1s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>A. cochlioides</i> Ac2s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C35	0	11	14	22	16,8	0	0	0	0	0,0	0	0	0	12	3,4
<i>C. beticola</i> C36	0	12	15	30	19,8	0	0	0	0	0,0	0	0	0	18	5,1
	Anyżowy					Cyprysowy					Cedrowy				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	0	0	0	8	2,3	0	18	32	85	48,3	0	12	16	34	21,7
<i>R. solani</i> AG4	0	0	0	0	0,0	4	23	34	85	49,8	0	14	18	35	23,5
<i>A. cochlioides</i> Ac1s	0	0	0	0	0,0	0	0	30	85	46,8	0	0	14	26	17,9
<i>A. cochlioides</i> Ac2s	0	0	0	0	0,0	0	0	21	85	40,0	0	0	12	27	16,7
<i>C. beticola</i> C35	0	0	0	0	0,0	0	10	14	27	18,2	0	11	12	21	15,0
<i>C. beticola</i> C36	0	0	0	0	0,0	0	11	15	32	20,4	0	11	13	24	16,6

	Lawendowy					Geraniowy					Z drzewa herbacianego				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	0	0	0	6	1,7	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>R. solani</i> AG4	0	0	0	7	2,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>A. cochloides</i> Ac1s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>A. cochloides</i> Ac2s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C35	0	0	0	10	2,9	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C36	0	0	0	18	5,1	0	0	0	0	0,0	0	0	0	4	1,1
	Z goździkowca korzennego					Miętowy					Majerankowy				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	0	0	0	0	0,0	0	0	0	22	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>R. solani</i> AG4	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>A. cochloides</i> Ac1s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>A. cochloides</i> Ac2s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C35	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C36	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
	Jałowcowy z jagód					Lebiodkowy (oregano)					Ekstrakt miętowy				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	0	13	18	51	28,1	0	0	0	0	0,0	13	30	56	85	66,3
<i>R. solani</i> AG4	0	15	20	70	35,0	0	0	0	0	0,0	14	39	60	85	69,3
<i>A. cochloides</i> Ac1s	0	0	0	21	6,0	0	0	0	0	0,0	43	85	85	85	88,0
<i>A. cochloides</i> Ac2s	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0	42	85	85	85	88,0
<i>C. beticola</i> C35	0	11	12	20	14,7	0	0	0	0	0,0	0	13	16	34	21,7
<i>C. beticola</i> C36	0	11	14	29	18,8	0	0	0	0	0,0	0	13	18	37	24,1



Rys. 17. Efekt zastosowania 0,3% olejku eterycznego cynamonowego po 168 godzinach od założenia doświadczenia (dla żadnego z patogenów nie zaobserwowano wzrostu strzępek)



Rys. 18. Efekt zastosowania 0,3% olejku eterycznego szalwiowego po 168 godzinach od założenia doświadczenia (znaczne różnice przyrostu strzępek, pomiędzy badanymi gatunkami mikroorganizmów).

Tab. 5. Wpływ warunków kontroli negatywnej, bez ekstraktów i kontroli pozytywnej, z zastosowaniem Funguranu w ilości 4 g/l, na rozwój patogenów buraka cukrowego: *R. solani*, *A. cochlioides* i *C. beticola*, wyrażony średnicą (w mm) grzybni patogena mierzoną po 24, 48, 72 i 168 godzinach oraz wartością ITW

	Kontrola negatywna (bez ekstraktów)					Kontrola pozytywna (Funguran)				
	24	48	72	168	ITW	24	48	72	168	ITW
<i>R. solani</i> AG2	0	34	57	85	67,0	0	12	28	78	43,3
<i>R. solani</i> AG4	0	53	79	85	83,5	0	0	9	32	15,9
<i>A. cochlioides</i> Ac1s	40	85	85	85	88,0	0	0	0	0	0,0
<i>A. cochlioides</i> Ac2s	42	85	85	85	88,0	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C35	0	12	17	35	22,8	0	0	0	0	0,0
<i>C. beticola</i> C36	0	13	20	42	27,0	0	0	0	0	0,0

Przeprowadzony dodatkowo z udziałem olejków eterycznych test krążkowo-dyfuzyjny okazał się mniej przydatny w prowadzonych badaniach. Nie wykazał on rzeczywistego zróżnicowania w działaniu fungistatycznym pomiędzy zakupionymi olejkami. Opary unoszące się ze swobodnie położonych na pożywce krążków, w znacznej większości hamowały wzrost badanych patogenów, przez co utrudniona była możliwość porównania uzyskanych efektów na badanych obiektach.

3.2.3. Podsumowanie :

1. Silne zahamowanie wzrostu *R. solani*, *A. cochlioides* oraz *C. beticola* wykazano na podłożach zawierających 0,3% olejku eterycznego - lemongrasowego, bądź też cynamonowego, geraniowego, z goździkowca korzennego, majerankowego lub lebiodkowego.
2. Stwierdzono, że fungistatyczna aktywność ekstraktu zależy nie tylko od gatunku i odmiany rośliny z jakiej pochodzi, ale również od metodyki przygotowania ekstraktu oraz jego koncentracji.

3.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i *Pectobacterium* sp.

3.3.1. Działanie soków, ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych na *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i *Pectobacterium* sp.

W doświadczeniu oceniającym wpływ bioaktywnych składników roślinnych na bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i *Pectobacterium* sp. wykorzystano sok roślinny pozyskany ze świeżej masy, ekstrakt wodny i alkoholowy otrzymany z suchej masy oraz sok roślinny wyciśnięty z roślin traktowanych wysoką temperaturą (20 min., 90°C). Podczas badań przetestowano również oddziaływanie 17 olejków eterycznych na wzrost badanych bakterii. Metodami użytymi w określaniu działania biobójczego były metody: zawiesinowa i krążkowo-dyfuzyjna. W metodzie zawiesinowej wykorzystano płytki titracyjne oraz technikę posiewu kropłowego. W metodzie dyfuzyjno-krążkowej jako nośnik ekstraktu/olejku zastosowano sterylne krążki z bibuły o średnicy 9 mm, na które наносono po 30 µl badanej substancji pochodzenia roślinnego. W eksperymencie użyto bakterie: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) szczep NCPPB 4053 oraz izolaty *Pectobacterium wasabiae* (*Pw*) i *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) (bank patogenów w IHAR-PIB Młochów) o koncentracji $2,5 \times 10^6$ jtk/ml.

3.3.2. Wyniki badań

W studzienki płytki titracyjnej umieszczono po 160µl ekstraktów w dwóch stężeniach i dodano po 20 µl zawiesiny bakterii. Do tak przygotowanych mieszanin dodano 20 µl wody lub roztworu mirozynazy (2,5 U/ml). Po czasie 5 i 30 min działania ekstraktu wykonano posiew bakterii na podłoże YPGA.

W przypadku działania ekstraktów ze świeżej masy roślin działanie ograniczające wzrost kolonii bakterii *Cms* stwierdzono dla ekstraktu otrzymanego z gorczycy białej w czasie 5 i 30 minut. Pozostałe ekstrakty nie wykazywały działania biobójczego (tab. 6). Podobnie brak działania antybakteryjnego stwierdzono dla ekstraktów otrzymanych z suszonych roślin, zarówno w próbach z dodatkiem i bez mirozynazy (tab. 7).

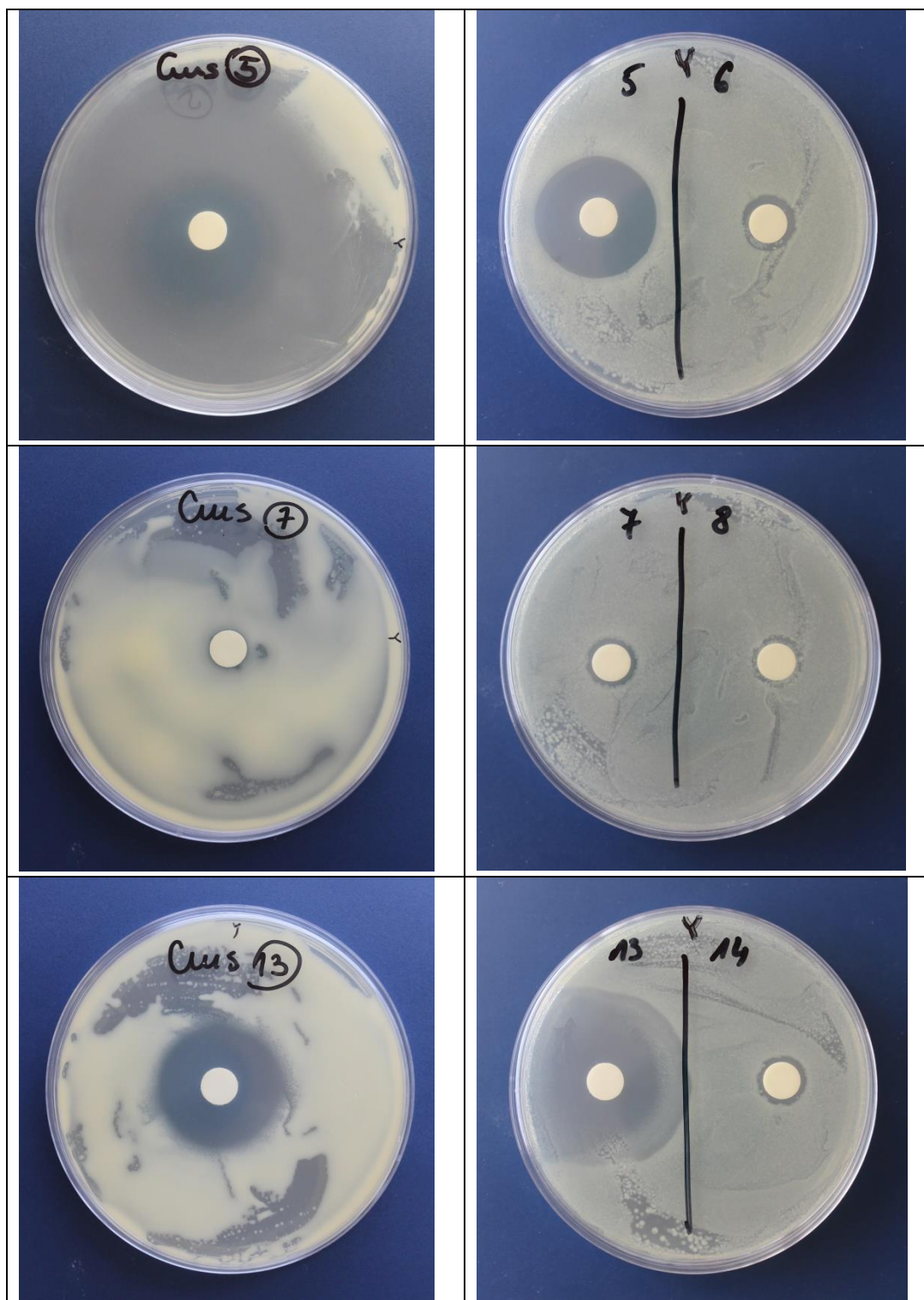
Efekt biobójczy ekstraktów roślinnych na wybrane patogeny bakteryjne ziemniaka zaobserwowano w wyniku użycia ekstraktów otrzymanych z roślin traktowanych wysoką temperaturą i dodatku egzogennej mirozynazy (tab. 8). Po 30 minutach działania ekstraktu stwierdzono wyraźną redukcję liczby bakterii *Cms* we wszystkich użytych ekstraktach

rozcieńczonych 2-krotnie z dodatkiem mirozyny. W przypadku bakterii z rodzaju *Pectobacterium* sp. działanie redukujące zanotowano dla ekstraktów z dodatkiem mirozyny otrzymanych z gorczycy białej oraz ekstraktu z pieprzycy siewnej. Wydłużenie czasu działania ekstraktów z pieprzycy siewnej rozcieńczonych 2-krotnie z dodatkiem mirozyny spowodowało inaktywację bakterii *Cms*. W przypadku bakterii będących sprawcą czarnej nóżki wydłużenie działanie ekstraktu nie prowadziło do pełnej eliminacji bakterii. Metoda krążkowo-dyfuzyjna z użyciem ekstraktów wodnych i alkoholowych z suszonych roślin oraz ze świeżej masy nie potwierdziła działania biobójczego badanych wyciągów (wyniki nie zamieszczone).

Wyniki działania olejków eterycznych przedstawiono w tabeli 9. Na powierzchni płytek wyłożono przygotowane krążki, nasączone ekstraktem. Obserwacje i pomiar stref zahamowania wzrostu bakterii dokonywano po 1 dniu (dla *Pw*) i w 7 dniu od posiania dla bakterii *Cms*. Z uwagi na lotny charakter wielu substancji czynnych w badanych olejkach autorzy zdecydowali się zastosować dodatkowo metodę – zawiesinową, dwa rozcieńczenia i dwa czasy działania.

Cztery olejki (szałwiowy, anyżowy, cyprysowy, lawendowy) nie powodowały stref oddziaływania na bakterie *Cms* i *Pw*. Dla bakterii *Pw* brak stref zahamowania wzrostu kolonii stwierdzono również dla olejku bergamotowego, imbirowego, rozmarynowego, cedrowego, miętowego, jałowcowego z jagód. Najsilniejsze oddziaływanie na bakterie *Cms* powodowały olejki lemongrasowy, imbirowy powodując całkowite zahamowanie wzrostu na pożywce. Olejki cynamonowy, cedrowy, z goździkowca korzennego, geraniowy, rozmarynowy i lebidkowy powodowały zahamowanie wzrostu sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka wynoszące odpowiednio 25, 14, 12,76 i 5 mm. Bakterie *Pw* wykazywały większą odporność na działanie olejków eterycznych przejawiające się mniejszymi strefami zahamowania wzrostu w pobliżu krążków nasączonych olejkami. Dla olejków cynamonowego, lebidkowego, z drzewa herbacianego, lemongrasowego, geraniowego i majerankowego strefy oddziaływania kształtowały się w przedziale 1-9 mm (rys. 19).

W metodzie zawiesinowej u obu bakterii stwierdzono zależność działania hamującego olejku od jego stężenia i czasu działania na testowany mikroorganizm. Dla bakterii *Cms* jedynie olejek anyżowy w obu stężeniach nie spowodował inaktywacji bakterii po czasie 60 min. W tym samym czasie działania olejki lemongrasowy, cynamonowy, geraniowy, z goździkowca korzennego i lebidkowy w obu badanych stężeniach wykazały działanie biobójcze na bakterie *Cms* i *Pw*.



Rys. 19. Przykładowe strefy oddziaływania olejków eterycznych na bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonius* (lewa strona) i *Pectobacterium wasabiae* (prawa strona) oznaczenia na szalkach: 5- olejek cynanonowy, 6- olejek rozmarynowy, 7- olejek anyżowy, 8- olejek cyprysowy, 13- olejek z goździkowca korzennego, 14- olejek miętowy

Tab. 6. Działanie ekstraktów, otrzymanych ze świeżej masy roślin, rozcieńczonych w wodzie, na bakterie *Cms*, *Pw* i *Pa* (czas działania 5 i 30 min.)

Ekstrakt / stężenie		5 minut						30 minut					
		Bakterie/ stężenie mirozynyzy						Bakterie/ stężenie mirozynyzy					
		Cms		Pw		PaO		Cms		Pw		PaO	
		M1	K+	M1	K+	M1	K+	M1	K+	M1	K+	M1	K+
pieprzycy siewna siewki	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gorczyca biała	10x	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
	100x	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rzodkiew oleista	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
katran abisyński	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
psianka stulizolistna	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
czosnek	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
barszcz Sosnowskiego	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ wzrost kolonii bakterii, +/- ograniczony wzrost kolonii bakterii, - brak wzrostu kolonii bakterii (skuteczne bakteriobójcze działanie ekstraktu),
K+ kontrola bez dodatku mirozynyzy, M1 stężenie 0,25 U/ml mirozynyzy,

Tab. 7. Działanie ekstraktów, otrzymanych z suchej masy roślin, rozcieńczonych w wodzie, na bakterie *Cms*, *Pw* i *Pa* (czas działania 5 i 30 min)

Ekstrakt / stężenie		5 minut						30 minut					
		Bakterie/ stężenie mirozynyzy						Bakterie/ stężenie mirozynyzy					
		<i>Cms</i>		<i>Pw</i>		<i>Pa</i>		<i>Cms</i>		<i>Pw</i>		<i>Pa</i>	
		M1	K+	M1	K+	M1	K+	M1	K+	M1	K+	M1	K+
pieprzycasiewna nasiona	20x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pieprzycasiewna siewki	20x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gorczyca biała	20x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rzodkiew oleista	20x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
psiankastuliszolistna	20x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ wzrost kolonii bakterii, +/- zahamowany wzrost kolonii bakterii, - brak wzrostu kolonii bakterii (skuteczne bakteriobójcze działanie ekstraktu), K+ kontrola bez dodatku mirozynyzy, M1 stężenie 0,25 U/ml mirozynyzy,

Tab. 8. Działanie ekstraktów, otrzymanych z roślin traktowanych wysoką temperaturą, rozcieńczonych w wodzie, na bakterie *Cms*, *Pw* i *Pa* (czas działania 5, 30 i 60 min.)

Ekstrakt / stężenie		5 minut									30 minut									60 minut								
		<i>Cms</i>			<i>Pw</i>			<i>Pa</i>			<i>Cms</i>			<i>Pw</i>			<i>Pa</i>			<i>Cms</i>			<i>Pw</i>			<i>Pa</i>		
		M1	M2	K+	M1	M2	K+	M1	M2	K+	M1	M2	K+	M1	M2	K+	M1	M2	K+	M1	M2	K+	M1	M2	K+	M1	M2	K+
rukiew wodna	2x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+	+/-	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+
	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+
rzodkiew oleista	2x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+	+/-	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+
	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+	+/-	b.d	+	+	b.d	+	+	b.d	+
gorczyca biała	2x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+	+
	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pieprzycia siewna	2x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+	+
	10x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+

+ wzrost kolonii bakterii, +/- zahamowany wzrost kolonii bakterii, - brak wzrostu kolonii bakterii (skuteczne bakteriobójcze działanie ekstraktu),
K+ kontrola bez dodatku mirozynyzy, M1 stężenie 0,25 U/ml mirozynyzy, stężenie 0,05 U/ml mirozynyzy

Tab. 9. Działanie olejków eterycznych i ekstraktów roślinnych na bakterie *Cms* i *Pw* badane metodą krążkowo-dyfuzyjną (rozcieńczenie olejków 10x) i zawiesinową (rozcieńczenie olejków 100x i 200x)

.	Olejek eteryczny/ekstrakt	<i>Cms</i>				<i>Pw</i>					
		metoda krążkowo-dyfuzyjna promień oddziaływania [mm] rozcieńczenie olejków 10x	Metoda zawiesinowa		metoda krążkowo-dyfuzyjna promień oddziaływania [mm] rozcieńczenie olejków 10x	Metoda zawiesinowa					
			5 min			60 min					
			100x	200x		100x	200x				
1	Lemongrasowy	całkowity brak wzrostu na płytce	-	-	-	-	2	+	+	-	-
2	Bergamotowy	1	+	+	-	-	0	+	+	+/-	+
3	Szałwiowy	0	+	+	-	-	0	+	+	+/-	+
4	Imbirowy	całkowity brak wzrostu na płytce	-	-	-	-	0	+	+	+	+
5	Cynamonowy	25	-	-	-	-	9	-	-	-	-
6	Rozmarynowy	6	+	+	-	-	0	+	+	+/-	+
7	Anyżowy	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+
8	Cyprykowy	0	-	-	-	-	0	+	+	+	+
9	Cedrowy	14/23*	+	+	-	-	0	+	+	+	+
10	Lawendowy	0	+	+	-	-	0	+	+	+	+
11	Geraniowy	7/14	-	-	-	-	1	-	-	-	-
12	Z drzewa herbacianego	2	+	+	-	-	3/6	+	+	-	+
13	Z goździkowca korzennego	12	-	-	-	-	0/22	-	-	-	-
14	Miętowy	2	+/-	+	-	-	0	+/-	+	-	+
15	Majerankowy	2	+	+	-	-	1	+/-	+	-	+
16	Jałowcowy z jagód	1	+	+	-	-	0	+	+	+	+
17	Lebiodkowy (oregano)	5/11	-	-	-	-	3/21	-	-	-	-
18	Hydrolat miętowy	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+
19	Czosnek**	5	+	+	+	+	7	+	+	+	+
20	Bylica**	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+

*wartość po ukośniku oznacza strefę spowolnionego wzrostu bakterii ** dla czosnku i bylicy rozcieńczenie 5x i 10x, + wzrost kolonii bakterii, +/- ograniczony wzrost kolonii bakterii, - brak wzrostu kolonii bakterii (skuteczne bakteriobójcze działanie ekstraktu)

3.4. *Globodera rostochiensis*

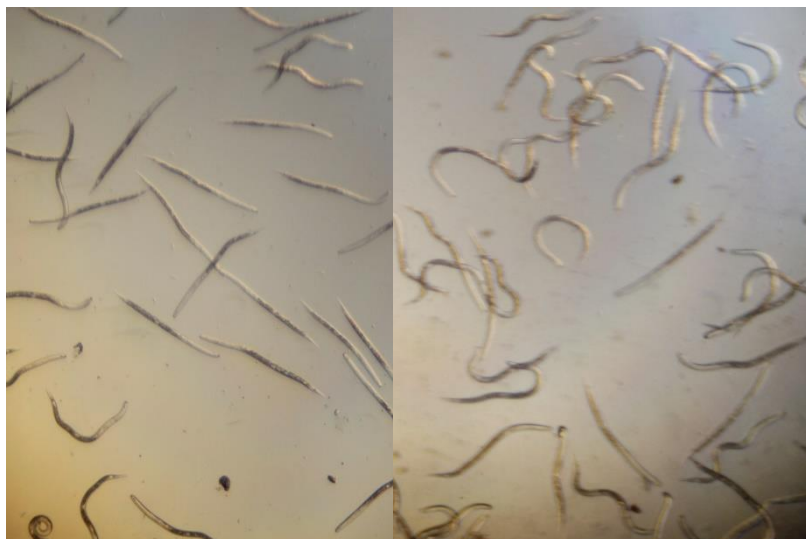
3.4.1. Działanie ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych na larwy i cysty mątwika ziemniaczanego

W badaniu ekstraktów roślinnych na larwy mątwika ziemniaczanego uwzględniono ekstrakty pozyskane ze świeżych roślin, roślin po wysuszeniu i rozpuszczeniu w wodzie oraz wyciągi pozyskane z roślin uprzednio traktowanych wysoką temperaturą. Wariantem doświadczenia był dodatek do mieszaniny ekstraktu i larw mątwika egzogennej mirozynazy. Badania przeprowadzono w płytkach titracyjnych obserwując zachowanie larw pod mikroskopem (rys. 20).

W doświadczeniu określającym wpływ ekstraktów roślinnych na jaja i larwy w cystach mątwika wykorzystano ekstrakty z wysuszonego materiału roślinnego. Eksperyment polegał na ocenie działania ekstraktów roślinnych na stymulację wylęgu larw z cyst mątwika ziemniaczanego. Przygotowane wcześniej ekstrakty rozmrożono i przepuszczono przez filtr strzykawkowy o średnica porów 0,22 μm . W badaniach użyto komory hodowlane i woreczki nylonowe, wykonane z materiału o wielkości otworów 0,22 mm, w których zamykano po 20 sztuk cyst. Woreczki umieszczano w komorach hodowlanych i zalewano 25-krotnie rozcieńczonymi sterylnymi ekstraktami. W odstępach 3-4 dniowych dokonywano przeniesienia woreczków z cystami do nowego roztworu ekstraktu. Badania wykonano w dwóch powtórzeniach. Obserwacje przeprowadzono przy pomocy mikroskopu odwróconego zliczając larwy inwazyjne, które wydostały się z cyst pod wpływem działania roztworu ekstraktu lub dyfuzatu korzeniowego. Po 18 dniach eksperymentu sprawdzano żywą zawartość cyst zamkniętych w woreczkach stosując stymulację wylęgu dyfuzatem korzeniowym z pomidora. W ocenie liczby larw, które wylęgły się z jaj i wydostały się poza cystę zastosowano 6-cio stopniową skalę.

Przeprowadzono również eksperyment określający działanie suchych ekstraktów roślinnych na porażenie roślin ziemniaka uprawianych w wazonach (Rys. 21). Doświadczenie wykonano w fitotronie. Do wazonów z posadzoną bulwą ziemniaka włożono woreczek nylonowy z cystami mątwika ziemniaczanego. Liczka jaj i larw w woreczku wynosiła 2500 szt. stanowiąc inokulum. Po 3 tygodniach od wysadzenia ziemniaków na powierzchnie podłoża uprawnego w wazonie wprowadzono wysuszony ekstrakt roślinny (5 g/wazon). Po okresie wegetacji ziemniaków pobrano po 100 ml podłoża z wazonów w celu określenia ilości jaj i larw w powstałych cystach. Jako kontrolę pozytywną zastosowano środek Vydate. Kontrolę negatywną stanowiły wazon bez dodatku wysuszonego materiału roślinnego. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki podano w liczbie jaj i larw z cyst wyekstrahowanych z 100 ml prób.

Wśród substancji pochodzenia roślinnego do badań użyto również olejki eteryczne. W studzienkach płytek titracyjnych umieszczono larwy mątwika ziemniaczanego patotyp Ro1 i Ro5 i zalano rozcieńczonymi 100x olejkami eterycznymi. Obserwacje prowadzono pod mikroskopem w określonych odstępach czasu.



Rys. 20. Larwy mątwika ziemniaczanego (strona lewa - kontrola, bez dodatku ekstraktu, strona prawa - pobudzone działaniem ekstraktu)



Rys. 21. Doświadczenie wazonowe określające działanie suchej masy roślin z rodziny kapustowatych na mątwika ziemniaczanego

3.4.2. Wyniki badań

Wyniki eksperymentów oceniających wpływ ekstraktów na cysty i larwy mątwika ziemniaczanego stanowią uzupełnienie wyników uzyskanych w 2016 roku w ramach badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego.

Żaden z badanych ekstraktów roślin z rodziny kapustowatych nie powodował stymulacji wylęgu larw z cyst (tab. 10). Ekstrakty z suchej masy z pomidora części nadziemnej i korzeni powodowały wylęg larw w stopniu zbliżonym do dyfuzatu korzeniowego ziemniaka. Zaobserwowano działanie ekstraktu z pieprzycy siewnej na larwy i jaja w cystach mątwika ziemniaczanego patotypu Ro1 i Ro5 przejawiające się brakiem

wylęgu larw po przeniesieniu woreczków z cystami do zawiesiny dyfuzatu korzeniowego pomidora.

Wykazano brak działania ekstraktów ze świeżej masy roślin na larwy mątwika ziemniaczanego patotyp Ro1 po 1,5-godzinym okresie przebywania larw w ekstrakcie 10 i 40-krotnie rozcieńczonym. Po 24 godzinach żywe larwy stwierdzano w ekstraktach z katanu abisyńskiego, gorczycy białej, rzodkwi oleistej i rukwi wodnej. W tym samym czasie działania ekstraktów martwe larwy mątwika ziemniaczanego obserwowano po zastosowaniu wyciągu z pieprzycy siewnej i czosnku pospolitego (tab. 11).

Podobne działanie na larwy mątwika ziemniaczanego stwierdzono po zastosowaniu ekstraktów z suchej masy (tab. 12). Po 1,5 godzinie działania ekstraktów 100% larw było żywych. Wydłużenie czasu przebywania larw w ekstraktach do 24 godzin spowodowało śmierć larw w ekstraktach z pieprzycy siewnej i z nasion pieprzycy siewnej z dodatkiem enzymu mirozynyazy. W pozostałych przypadkach larwy zachowały żywotność.

Większą skuteczność działania biobójczego wykazano dla ekstraktów otrzymanych z roślin traktowanych wysoką temperaturą (tab. 13). Działanie antymątwikowe zaobserwowano już po 10 minutach przebywania larw w ekstrakcie z pieprzycy siewnej z dodatkiem mirozynyazy. Po czasie 1,5 godziny przebywania larw w ekstraktach z gorczycy białej i pieprzycy siewnej liczba żywych larw oscylowała w zakresie 5%. Po 24 godzinach we wszystkich użytych wyciągach nie stwierdzono obecności żywych larw.

Analizując wyniki prób gleby pobranych z wazonów doświadczalnych, do których aplikowano zmieloną biomasę roślin z rodziny kapustowatych zaobserwowano różnicę w ilości pozyskanych cyst i żywej zawartości cyst (jaj i larw) z zależności od użytego gatunku rośliny (tab. 14). W przypadku dodatku do gleby sproszkowanego materiału roślinnego otrzymanego z rukwi wodnej, rzodkwi oleistej odmiany Colonel i gorczycy białej odmiany Bardena stwierdzono wysoką liczbę jaj i larw w cystach (w 100 ml gleby) powstałych na korzeniach ziemniaka. Dodatek do podłoża sproszkowanej biomasy z gorczycy białej odmiany Concerta, rzodkwi oleistej odmiany Romesa i pieprzycy siewnej zaobserwowano wyraźny spadek liczby jaj i larw w pobranych próbach.

Działanie olejków eterycznych na larwy mątwika ziemniaczanego patotyp Ro1 i Ro5 było zróżnicowane (tab. 15). Pięć olejków (lemongrasowy, cynamonowy, anyżowy, z goździkowca korzennego i lebiodkowy) działało mątwikobójczo już po 1 godzinie przebywania larw w roztworach olejków rozcieńczonych 100-krotnie. Po 48 godzinach działania wszystkie olejki eteryczne wykazały działanie toksycznie na larwy mątwika z wyjątkiem olejku z drzewa herbacianego na Ro1 i olejku lawendowego na Ro5.

3.4.3. Podsumowanie

1. Wykazano duże zróżnicowanie podatności bakterii *Cms* i z rodzaju *Pectobacterium* sp. na pozyskane substancje pochodzenia roślinnego. Większą wrażliwością na soki roślinne, ekstrakty i olejki eteryczne użyte w badaniach cechował się sprawca bakteriozy pierścieniowej ziemniaka - *Cms*.
2. Z uwagi na trudności stosowania w praktyce rolniczej substancji pochodzenia roślinnego i niedostateczną wiedzę na temat ich działania antymątwikowego należy w kolejnych badaniach prowadzić również stałą obserwację zachowania się nicieni mątwika ziemniaczanego w środowisku glebowym po aplikacji uzyskanych ekstraktów roślinnych.

Tab. 10. Działanie ekstraktów wodnych otrzymanych z suchej masy części nadziemnej, nasion pieprzycy siewnej i korzeni pomidora na cysty mątwika ziemniaczanego Ro1 i Ro5 [liczba larw w stopniach]

Dzień	Ekstrakty z suchej masy części nadziemnej wytrąsane w wodzie								Nasiona		Korzenie		Kontrola pozytywna		Kontrola negatywna		
	Rukiew wodna		Pieprzycy siewna		Psianka stulizolistna		Pomidor		Pieprzycy siewna		Pomidor		dyfuzat ziemniak		woda		
	Ro1	Ro5	Ro1	Ro5	Ro1	Ro5	Ro1	Ro5	Ro1	Ro5	Ro1	Ro5	Ro1	Ro5	Ro1	Ro5	
3	0/0*	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2	0/0	0/0	1/1	0/1	0/0	0/0	1/1	2/1	1/1	2/0	
6	0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/2	1/1	0/2	3/2	2/3	2/2	3/3	2/1	2/3	
9	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/3	1/0	1/0	2/1	2/4	3/3	4/4	1/2	2/2	
12	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	2/3	1/0	0/0	4/2	5/5	3/3	3/3	2/2	3/3	
15	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	2/1	2/3	0/0	0/0	3/3	3/2	3/3	4/4	2/2	2/2	
18	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	5/5	0/3	0/0	0/0	3/4	3/4	4/3	5/4	2/1	2/1	
Żywa zawartość cyst w stopniach, po ponownym zalaniu dyfuzatem korzeniowym z pomidora	5°	20/14	13/10	0/0	0/0	12/18	5/14	0/17	10/8	21/21	7/8	25/21	7/6	5/15	5/2	22/20	10/11
	4°	5/12	9/11	0/0	0/0	14/6	8/6	20/13	8/4	7/9	6/8	5/7	9/12	5/6	6/13	8/10	4/10
	3°	5/4	8/9	0/0	0/0	4/6	7/3	10/0	6/10	2/0	5/7	0/2	5/8	10/7	8/7	0/0	7/9
	2°	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/7	0/0	0/0	0/0	5/2	0/0	0/0	7/2	6/0	0/0	0/0
	1°	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	7/0	0/0	0/0	3/0	0/0	0/0	0/0
	0°	0/0	0/0	30/30	30/30	0/0	10/0	0/0	6/8	0/0	0/5	0/0	8/4	0/0	5/8	0/0	9/0

*- wyniki po ukośniku stanowią powtórzenia

Stopnie: 0°- 0, 1° - (1-5), 2°-(6-20), 3°-(21-50), 4° -(51-100), 5°- >100

Tab. 11. Działanie ekstraktu ze świeżej masy roślinnej bez traktowania wysoką temperaturą i bez dodatku mirozyny na larwy mątwika ziemniaczanego Ro1 [% żywych]

Czas obserwacji	Katrzan abisyński		Gorzycza biała		Rzodkiew oleista		Pieprzycy siewna		Rukiew wodna		Czosnek		Pomidor	Woda	Kontrola pozytywna (sinigryna + mirozyna)
	10x	40x	10x	40x	10x	40x	10x	40x	10x	40x	10x	200x			
10 min	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
1,5 h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
24 h	>70	100	3	80	5	30	0	0	80	80	0	0	100	100	0

Tab. 12. Działanie wodnych ekstraktów z suchej masy części nadziemnej badanych roślin i nasion pieprzycy siewnej na larwy mątwika ziemniaczanego Ro1 [% żywych]

Czas obserwacji	Gorzycza biała		Rzodkiew oleista		Pieprzycza siewna- siewki		Pieprzycza siewna- nasiona		Rukiew wodna		Psianka stulizolistna	Pomidor	Woda	Kontrola pozytywna (sinigryna + mirozyna)
	10x	10x+M*	10x	10x+M	10x	10x + M	10x	10x + M	10x	10x + M	10x			
10 min	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
1,5 h	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
24 h	40	40	40	40	0	0	40	0	90	90	90	100	100	0

M* - stężenie 0,25 U/ml mirozyny,

Tab. 13. Działanie ekstraktów otrzymanych z roślin traktowanych wysoką temperaturą rozcieńczonych w wodzie na larwy mątwika ziemniaczanego Ro1 [% żywych]

Czas obserwacji	Gorzycza biała		Pieprzycza siewna- siewki		Rzodkiew oleista		Rukiew wodna		Woda	Kontrola pozytywna (sinigryna + mirozyna)
	10x	10x+M*	10x	10x+M	10x	10x + M	10x	10x + M		
10 min	100	100	100	50	100	b.d.	100	b.d.	100	0
1,5 h	100	5	100	5	100	b.d.	100	b.d.	100	0
24 h	0	0	0	0	0	b.d.	0	b.d.	100	0

M* - stężenie 0,25 U/ml mirozyny,

Tab. 14. Wyniki oceny żywej zawartości w cystach mątwika ziemniaczanego Ro1 w próbach 100 ml gleby z doświadczenia wazonowego

Obiekt	Początkowa liczba jaj i larw	Powtórzenia						Mediana	
		1		2		3		Liczba jaj i larw	Liczba cyst
		Liczba jaj i larw	Liczba cyst	Liczba jaj i larw	Liczba cyst	Liczba jaj i larw	Liczba cyst		
Rukiew wodna	2500	250	4	3090	35	2280	25	2280	25
Rzodkiew - Colonel	2500	2410	25	810	9	3340	37	2410	25
Rzodkiew -Romesa	2500	470	7	340	4	1420	16	470	7
Gorzycza - Concerta	2500	220	3	330	6	420	5	330	5
Gorzycza - Bardena	2500	1420	14	3260	48	1993	28	1993	28
Pieprzycza siewna	2500	940	20	890	15	810	15	890	15
Vydate pozytywna	2500	130	3	30	1	130	3	130	3
Kontrola negatywna	2500	660	13	2800	41	1460	20	1460	20

Tab. 15. Działanie olejków eterycznych rozcieńczonych 100x na larwy mątwika ziemniaczanego Ro1 i Ro5 [% żywych]

Lp.	Nazwa olejku	Ro1		Ro5	
		1h	48h	1h	48h
1	Lemongrasowy	0	0	0	0
2	Bergamotowy	5	0	5	0
3	Szałwiowy	0	0	5	0
4	Imbirowy	30	0	50	0
5	Cynamonowy	0	0	0	0
6	Rozmarynowy	80	0	80	0
7	Anyżowy	0	0	0	0
8	Cyprynowy	100	0	100	0
9	Cedrowy	100	0	100	0
10	Lawendowy	100	0	100	10
11	Geraniowy	70	0	80	0
12	Z drzewa herbacianego	0	5	0	0
13	Z goździkowca korzennego	0	0	0	0
14	Miętowy	100	0	100	0
15	Majerankowy	5	0	5	0
16	Jałowcowy z jagód	100	0	100	0
17	Lebiodkowy (oregano)	0	0	0	0
18	Hydrolat miętowy-bułgarski	100	0	100	0
19	Woda+ etanol	100	10	100	100
20	Dyfuzat z pomidora	100	100	100	100

4. STWIERDZENIA I WNIOSKI

1. W toku przeprowadzonych badań potwierdzono działanie cytotoksyczne mieszaniny kontrolnej enzym-substrat (mirozynaza z sinigriną), jak również badanych ekstraktów na *P. betae* w stadium zoospor. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że zastosowanie ekstraktów gorczycy białej, rzodkwi oleistej, psianki stulizolistnej, barszczu Sosnowskiego oraz bylicy rocznej może wpłynąć na zmniejszenie zasiedlenia korzeni buraka cukrowego przez *Polymyxa betae*, jednak działanie ochronne jest istotnie zależne od wyjściowej koncentracji inokulum patogena. W przypadku wybranych wyciągów, np. bylicy rocznej wykazano wyraźny efekt dawko-zależny, w przypadku innych, tj. psianki stulizolistnej, stwierdzono również możliwość ograniczenia BNYVV. Na obecnym etapie wskazane byłoby przeprowadzenie dalszych analiz po bezpośredniej inokulacji zawiesiną zoospor wektora BNYVV w doświadczeniach laboratoryjnych oraz ocenę wpływu wybranych mieszanin/ekstraktów jako komponentów otoczki nasion na stopień zasiedlenia korzeni w/w patogenami, jak również doświadczenia w warunkach polowych.
2. Najskuteczniejsze działanie fitosanitarne, całkowicie ograniczające rozwój testowanych izolatów *R. solani*, *A. cochlioides* oraz *C. beticola* stwierdzono po zastosowaniu 0,3% roztworu olejku lemongrasowego, bądź też cynamonowego, geraniowego, z goździkowca korzennego, majerankowego lub lebiodkowego. Istotny wpływ na ograniczenie rozwoju *R. solani*, *A. cochlioides* oraz *C. beticola* ma nie tylko gatunek czy odmiana rośliny z jakiej pochodzi ekstrakt, ale również metoda jego przygotowania i koncentracja.
3. Przeprowadzone badania wykazały, że skuteczność biobójczego działania ekstraktów na agrofagi ziemniaka uzależniona jest od metodyki ich przygotowania. Ekstrakty otrzymane z roślin traktowanych wysoką temperaturą odznaczały się szybszym działaniem zarówno bakteriobójczym jak i nicieniobójczym.
4. Analizując działanie ekstraktów pozyskanych z roślin należących do rodziny kapustowatych, stwierdzono, że najlepszym działaniem biobójczym, w każdym badanym wariantcie dotyczącym ochrony biologicznej ziemniaka, charakteryzowały się wyciągi z pieprzycy siewnej.
5. Uzyskane pozytywne efekty działania fitosanitarnego ekstraktów w warunkach laboratoryjnych i w doświadczeniu wazonowym wymagałyby potwierdzenia w kolejnym roku badań oraz ustalenia minimalnych skutecznych w ochronie roślin stężeń. Kolejnym, koniecznym etapem badań byłoby przeprowadzenie doświadczeń polowych z uwzględnieniem wpływu czynników środowiskowych na działanie fitosanitarne ekstraktów. Po zakończeniu badań wdrożeniowych ekstrakty z biomasy niektórych testowanych roślin będą mogły zostać wykorzystane w praktyce rolniczej do ograniczenia nasilenia występowania trudnych do zwalczania grzybów polifagicznych, bakterii chorobotwórczych i nicieni groźnych dla buraka cukrowego i ziemniaka.

CYTOWANE PIŚMIENNICTWO

- Aires A., Carvalho R., 2009. M. Da Conceição Barbosa, Rosa E. Suppressing Potato Cyst Nematode, *Globodera rostochiensis*, with Extracts of Brassicacea Plants. *Am. J. Pot. Res.* 86: 327–333.
- Aranda P.S., LaJoie D., Jorcyk C.L. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33: 366–369.
- Bartyńska M., Budzikur-Ramza E. 2001. The action of some essential oils on fungi. *Bull. Pol. Ac. Sc., Biological Sc.* 49: 327–331.
- Blažević I., Radonić A., Mastelić J., Zekić M., Skočibušić M., Maravić A. 2010. Hedge mustard (*Sisymbrium officinale*): chemical diversity of volatiles and their antimicrobial activity. *Chemistry & Biodiversity*; 7: 2023–2034.
- Burgiel Z.J., Tomaszewska-Potępa A., Vogt O., Burgiel M.M. 2008. Fungistatyczne właściwości ekstraktów z nasion wybranych roślin należących do rodziny Apiaceae. – Postępy w ochronie roślin 48(2): 701–705.
- Chitwood D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu. Rev. Phytopathol.*; 40: 221–249.
- Daub M., Westphal A. 2011. Integriertes Nematodenmanagement in Fruchfolgesystemen mit Zuckerrüben. *Sugar Industry*; 9: 41–50.
- Elfawal M.A., Towler M.J., Reich N.G., Golenbock D., Weathers P.J., Rich S.M. 2012. Dried whole plant *Artemisia annua* as an antimalarial therapy. *PLoS One*; 7(12): e52746.
- Góra J. 1996. Properties of essential oils and prospects of their application for plant protection, In: Effectiveness of some microorganisms and plant extracts in the control of plant diseases. Orlikowski L.B., Skrzypczak Cz. (red.). VII Conference of the Section for Biological Control of Plant Diseases of the Polish Phytopathological Society, Research Institute of Pomology and Floriculture. Skierniewice, 18-19 IV 1996: 57–61.
- Heijbroek W., Munning R.G., Swinkels L.P.J.C. 1998. The effects of trap crops, flower mixtures and bare fallow, grown as a rotational set aside on nematodes and fungal pathogens in soil. In: 61st IIRB Congress, 11-12 February 1998, Brussels, Belgium. Abstract book: 71–85.
- Klimach A., Wiczorek W., Góra J. 1996. Wpływ olejków eterycznych na ograniczenie występowania chorób grzybowych i bakteryjnych roślin. *Pestycydy* 1: 45–54.
- Kowalik R., Krechniak E. 1961: Szczegółowa metodyka biologicznych laboratoryjnych badań środków grzybobójczych (63–66). W: „Materiały do Metodyki Biologicznej Oceny Środków Ochrony Roślin”. Red. Węgorek, Inst. Ochr. Roślin, Poznań.
- Liu C.H., Zou W.X., Lu H., Tan R.X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*; 88: 277–282.
- Lubbe A., Seibert I., Klimkait T., van der Kooy F. 2012. Ethnopharmacology in overdrive: The remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua*. *Journal of Ethnopharmacology*; 141(3): 854–859.
- Meunier A., Schmit J.-F., Stas A., Kutluk N., Bragard C. 2003. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *Beet Necrotic Yellow Vein Virus*, *Beet Soilborne Virus*, and *Beet Virus Q* and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2356–2360.

- Naraghi L., Heydari A., Askari H., Pourrahim R., Marzban R. 2014. Biological control of *Polymyxa betae*, fungal vector of rhizomania disease of sugar beets in greenhouse conditions. *J Plant Prot Res*; 54: 109–114.
- Nowakowski M. 2002. Proekologiczna technologia uprawy buraka cukrowego. W: Wdrażanie nowych proekologicznych technologii w zakresie produkcji roślin uprawnych. *Mat. 84/02 IUNG Puławy*: 41–84.
- Nowakowski M. 2010. Ocena efektywności antymątwikowej (*Heterodera schachtii*) gatunku *Solanum sisymbriifolium*. Sprawozdanie z realizacji tematu IHAR-PIB, DS 1-4-01-8-06: 1–8.
- Nowakowski M. 2013. Przydatność gorczycy białej i rzodkwi oleistej jako mulczu, nawozu i czynnika ochrony fitosanitarnej w uprawie buraka cukrowego. *Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR-PIB Nr 43, ISBN 83-891172-67-4*: 150 ss.
- Pastuszczyńska T., Franke K., Nowakowski M. 2013. Badanie wpływu uprawy gorczycy białej na zagęszczenie populacji mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*) w glebie. *Biul. IHAR*; 269: 141–148.
- Paul H., Henken B., Scholten O.E., Lange W. 1993. Use of zoospores of *Polymyxa betae* in screening beet seedlings for resistance to beet necrotic yellow vein virus. *Neth. J. Plant Path.*, 99 Supplement 3: 151–160.
- Scholte K. 2000. Growth and development of plants with potential use as trap crops for potato cyst nematodes and their effects on the numbers of juveniles in cysts. *Annals of Applied Biology* 137: 031–042.
- Shikita M., Fahey J.W., Golden T.R., Holtzclaw W.D., Talalay P. 1999. An unusual case of 'uncompetitive activation' by ascorbic acid: purification and kinetic properties of myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochem. J.* 341: 725–732.
- Szymczak-Nowak J., Malinowska E., Tyburski J., Rychcik B. 2007. Wpływ *Solanum sisymbriifolium* na ograniczanie populacji mątwika ziemniaczanego. *Prog. Plant. Protec. / Post. Ochr. Roślin*, 47(4): 224–226.
- Tu Y. 2011. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*; 17: 1217–1220.
- Tyburski J., Rychcik B., Malinowska E., Szymczak-Nowak J., Zawislak K. 2005. *Solanum sisymbriifolium* jako roślina sanitarna płodozmianów ziemniaczanych. Sprawozdanie z grantu KBN nr 3 P06R 025 23: 33 ss.
- Tyburski J., Szymczak-Nowak J., Łada M., Nowakowski M. 2004. Ekologiczna uprawa buraka cukrowego. Red. J. Tyburski. Wyd. Krajowe Centrum Rolnictwa Ekologicznego Radom. ISBN 83-89060-69-8: 63 ss.
- Valdes Y., Viaene N., Perry R.N., Moens M. 2011. Effect of the green manures *Sinapis alba*, *Brassica napus* and *Raphanus sativus* on hatching of *Globodera rostochiensis*. *Nematology*; 13(8): 965–975.
- Vig A.P., Rampal G., Thind T.S., Arora S. 2009. Bio-protective effects of glucosinolates—A review. *LWT-Food Sci Technol*; 42: 1561–1572.