



S P R A W O Z D A N I E

*z przeprowadzonych w 2016 r. badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego
w zakresie upraw polowych metodami ekologicznymi, pt.:*

***Wykorzystanie naturalnych substancji wspierających zdrowotność w ekologicznej
uprawie i ochronie roślin okopowych przed ważnymi pod względem gospodarczym
chorobami i szkodnikami***

zawierające się w obszarach badawczych Załącznika Nr 1 do ogłoszenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 listopada 2015 r. (poz. 79):

Pkt 3. Uprawy polowe metodami ekologicznymi:

3. 2 Badania w zakresie innowacyjnych rozwiązań przy ekologicznej uprawie roślin polowych;

3.3 Metody zaprawiania nasion metodami ekologicznymi

realizowanych przez:

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Bydgoszczy

na podstawie § 8 ust. 1 pkt 1, ust. 2 pkt 1 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. z 2015 r. poz.1170)

na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi
z dnia 20.05.2016 nr HORre-msz-078-3/16(219)

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

Główni wykonawcy:

- *dr hab. Mirosław Nowakowski, prof. IHAR-PIB*

- *dr Anna Litwiniec*

- *dr Paweł Skonieczek*

- *dr Grzegorz Gryń*

- *mgr Łukasz Matyka*

- *mgr Marcin Żurek*

BYDGOSZCZ 2016

SPIS TREŚCI

str.

| | |
|--|-----------|
| 1. WPROWADZENIE | 3 |
| 2. METODY, WARUNKI I ZAKRES BADAŃ | 4 |
| 2.1. Metody badań | 4 |
| 2.2. Warunki i zakres badań | 4 |
| 3. PRZEPROWADZONE BADANIA | 7 |
| 3.1. <i>Polymyxa betae</i> | 7 |
| 3.1.1. Zakres badań..... | 10 |
| 3.1.2. Wyniki badań | 11 |
| 3.1.3. Podsumowanie | 16 |
| 3.2. <i>Aphanomyces cochlioides</i> , <i>Cercospora beticola</i> i <i>Rhizoctonia solani</i> | 16 |
| 3.2.1. Działanie ekstraktów na <i>A. cochlioides</i> , <i>C. beticola</i> i <i>R. solani</i> | 16 |
| 3.2.2. Wyniki badań | 17 |
| 3.2.3. Podsumowanie | 20 |
| 3.3. <i>Globodera rostochiensis</i> (mątwik ziemniaczany)..... | 20 |
| 3.3.1. Działanie ekstraktów na cysty <i>G. rostochiensis</i> | 20 |
| 3.3.2. Działanie ekstraktów na larwy inwazyjne <i>G. rostochiensis</i> | 21 |
| 3.3.3. Wyniki badań..... | 22 |
| 3.3.4. Podsumowanie..... | 23 |
| 3.4. Działanie ekstraktów roślinnych na bakterie <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (Cms) i <i>Pectobacterium wasabiae</i> (Pwa) | 24 |
| 4. STWIERDZENIA I WNIOSKI | 29 |
| CYTOWANE PIŚMIENNICTWO | 30 |

WPROWADZENIE

Skracanie rotacji roślin w płodozmianie oraz coraz większy udział w nim roślin okopowych i kapustowatych, wpływa na wzrost zagrożenia ze strony chorób i szkodników dla upraw ziemniaka i buraka cukrowego. Groźnym, kwarantannowym szkodnikiem upraw ziemniaka, pojawiającym się w uproszczonych płodozmianach, jest mątwik ziemniaczany *Globodera rostochiensis*, powodujący straty plonu dochodzące do 80%. Duże zagrożenie dla buraka cukrowego stanowią natomiast *Aphanomyces cochlioides* i *Rhizoctonia solani*, które są ekspansywnymi patogenami porażającymi siewki (zgorzel siewek buraka) oraz dorosłe rośliny (zgnilizny korzeni). Rizomania z kolei – to ważna pod względem gospodarczym choroba buraka cukrowego powodowana przez wirusa BNYVV, którego wektorem jest grzybopodobny pierwotniak *Polymyxa betae*. Wymienione czynniki chorobotwórcze powodują poważne straty sięgające nawet do 50-80% plonu. Do wzrastającej presji czynników chorobotwórczych przyczynia się także koncentracja uprawy ziemniaka i buraka wokół zakładów przetwórczych oraz wykorzystanie nawozowe liści roślin okopowych.

W ekologicznej ochronie roślin okopowych przed chorobami wykorzystuje się metodę agrotechniczną, hodowlaną i bazującą na naturalnie występujących substancjach bioaktywnych (Nowakowski 2002, Nowakowski 2004, Nowakowski 2013, Pastuszewska 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 występowania agrofagów. Dane literaturowe wskazują na rosnące zainteresowanie biologicznymi metodami zwalczania wymienionych patogenów (Heijbroek i in. 1998, Chitwood 2002, Naraghi i in. 2014). Z drugiej strony wiadomo, że rośliny stosowane w uprawie jako międzyplon, np. gorczyca biała i rzodkiew oleista, wykazują działanie ochronne przeciwko nicieniom oraz patogenom grzybowym w glebie (Heijbroek i in. 1998, Nowakowski 2004, Blažević 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 antynicienowym, przeciwrzybowym, przeciwbakteryjnym, przeciwoksydacyjnym, a także allelopatycznym (Vig i in. 2009). Jednocześnie gorczyca biała i rzodkiew są roślinami wykorzystywanymi jako rośliny lecznicze, nawozowe i dostarczające olej.

W ramach realizacji zadania pt. „Wykorzystanie naturalnych substancji wspierających zdrowotność w ekologicznej uprawie i ochronie roślin okopowych przed ważnymi pod

względem gospodarczym chorobami i szkodnikami” zespół złożony z pracowników Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB), Oddział w Bydgoszczy, przeprowadził badania polowe i laboratoryjne dotyczące oceny działania ekstraktów wybranych roślin sanitarnych w zakresie ograniczania rozwoju grzybów, bakterii i nicieni.

Celem projektu jest opracowanie efektywnej i alternatywnej do chemicznej metody ochrony roślin buraka cukrowego przed *R. solani*, *A. cochlioides*, *C. beticola* i *P. betae* oraz ziemniaka przed *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 Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Bydgoszczy. Oceniana była reakcja wybranych izolatów i form agrofagów na różne ekstrakty roślinne i ich stężenia. Do badania działania antynicieniowego wykorzystano test z użyciem płytek wielodołkowych. Obserwacje zachowania nicieni były prowadzone za pomocą mikroskopu odwróconego, w określonych odstępach czasu po użyciu ekstraktu. Doświadczenie określające działanie przeciugrzybowe substancji bioaktywnych przeprowadzono z użyciem podłoży wzrostowych metodą 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 odmian gorczycy białej, rzodkwi oleistej i barszczu Sosnowskiego na ograniczenie rozwoju agrofagów: *A. cochlioides*, *C. beticola*, *G. rostochiensis*, *P. betae* i *R. solani*.

2.2. Warunki i zakres badań

W połowie maja na polu doświadczalnym IHAR-PIB w Bydgoszczy wysiano po dwie odmiany rzodkwi oleistej: Romesa i Colonel oraz gorczycy białej: Bardena i Concetra (norma wysiewu: 20 kg/ha gorczyce, 30 kg/ha rzodkwie) (rys.1). W okresie początku kwitnienia danej odmiany pobrano materiał badawczy w celu przygotowania ekstraktów z części nadziemnej i korzeni (rys. 3 i 4). Część roślin pozostawiono na poletkach w celu zebrania nasion.



Rys. 1. Poletka doświadczalne podczas wschodów gorczycy białej i rzodkwi oleistej oraz w okresie przed kwitnieniem roślin

Połowę każdej próby materiału z części nadziemnej i korzeni roślin 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. 2).



Rys. 2. Wyciskarka firmy Meku typ R32

Sok z roślin przesączono przez sito o porach wielkości 0,25 mm i zamrożono w temp. -20°C. Świeżą masę korzeni zmielono w młynku laboratoryjnym, a następnie naważki 20 g zalano 80 ml wody destylowanej lub 70% metanolem i wytrząsano 1 godzinę.



Rys. 3. Gorczyca biała odmiana Bardena (po lewej) i odmiana Concerta (po prawej)



Rys. 4. Rzodkiew oleista odmiana Romesa (po lewej) i Colonel (po prawej)

Rozdrobniony materiał roślinny części nadziemnej badanych odmian gorczycy białej i rzodkwi oleistej po wysuszeniu i zmieleniu podawano także ekstrakcji w aparacie Soxhleta. Odważono po 4 g suchego materiału roślinnego do celulozowych gilz. W trakcie ekstrakcji użyto 120 ml 99% chlorku metylenu. Czas ekstrakcji wynosił 4 godziny. Z otrzymanych ekstraktów odparowywano chlorek metylenu, a osad zawieszano w 3 ml 99% metanolu. Otrzymane ekstrakty metanolowe zamrożono w temperaturze -20°C. Autorzy zdecydowali się także na ocenę sanitarnego działania substancji zawartych w biomacie barszczu Sosnowskiego. Materiał badawczy przywieziono z okolicy miejscowości Minikowo i Chrzastowo, koło Nakła (rys. 5). Z uwagi na wielkość i zdrewnienie rośliny, do badań wykorzystano ogonki liściowe, z których wyciskano sok. Część roślin wysuszono, a następnie zmielono i poddano ekstrakcji w aparacie Soxhleta, analogicznie jak to czyniono wcześniej w przypadku gorczycy białej i rzodkwi oleistej.

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



Rys. 5. Rośliny barszczu Sosnowskiego, osiągają wysokość do 3,5 m (zdjęcie po lewej); młode rośliny, wykorzystane w badaniach, miały wysokość około 1 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, zad. 2.4. System ten został opisany po raz pierwszy przez Paul i in. (1993) do oceny odporności na rizomanię siewek buraka cukrowego. W niniejszym doświadczeniu inokulum stanowiły korzenie roślin zasiedlonych przez wektor przenoszący wirusa nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka BNYVV, roztarte homogenizatorem ręcznym w roztworze odżywczym Steinerja w proporcji 0,3 ml korzeni na 200 µl roztworu. Roztarty materiał przenoszono następnie do 50 ml butelek, do których wprowadzano nieporażone ok. 3 tygodniowe siewki buraka cukrowego odmiany Japola (5 roślin na butelkę). W przypadku oceny wpływu badanych ekstraktów na patogeny

wyżej opisane inokulum przed wprowadzeniem do butelki poddawano uprzedniemu traktowaniu danym ekstraktem w objętości od 50 µl do 1 ml, zależnie od zastosowanego ekstraktu/mieszanki (50, 100, 200, 500, 1000 µl) przez 24h w 37 °C, a następnie takie inokulum przenoszono do butelek doświadczalnych. Stosowano również materiał z części nadziemnych/korzeni roślin utarty w ciekłym azocie w ilości 0,3 g na inokulum. Doświadczenia utrzymywano w klimatyzowanym pomieszczeniu laboratoryjnym przy kontrolowanej temperaturze 22/17 °C (dzień/noc) przy fotoperiodzie naturalnym. Tabela 1 zawiera szczegółowy wykaz kombinacji doświadczeń zastosowanych celem oceny wpływu badanych ekstraktów na *Polymyxa betae*. Rośliny stanowiące materiał do pobrania inokulum wysiewano w kuwetach do ziemi stanowiącej mieszankę 1:1:1 ziemi rizomaniowej (z wektorem zasiedlonym głównie przez patotyp A wirusa), uniwersalnego podłoża ogrodniczego oraz wyautoklawowanego piasku. Korzenie pobierano po 1,5 miesiąca wzrostu w porażonej ziemi. Rośliny odmiany Japola przeznaczone do traktowania ekstraktami w butelkach doświadczalnych wysiewano do podłoża uniwersalnego w kuwetach. Doświadczenia kuwetowe utrzymywano w fotoperiodzie 12 h dzień/12 h noc przy kontrolowanej temperaturze 22/17 °C (dzień/noc). Po 3, 4 i 5 tygodniach od momentu założenia doświadczenia w warunkach porażenia pobierano naważki korzenia ok. 100 mg do dalszych analiz. Materiał pobrany wymrażano w ciekłym azocie i przechowywano w - 80 °C.

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

| Nazwa rośliny | Typ ekstraktu / mieszanki | Dawka* | | | |
|-------------------------------------|--|---------|--------|--------|---------|
| | | 50 µl | 100 µl | 500 µl | 1000 µl |
| Gorczyca biała, odmiana 'Bardena' | Sok z części nadziemnej rośliny/ Ekstrakt metanolowy (75°C) z korzeni, Ekstrakt metanolowy z części nadziemnej (aparatus Soxhleeta) | 50 µl | 100 µl | 500 µl | 1000 µl |
| Gorczyca biała, odmiana 'Concerta' | Sok z części nadziemnej rośliny/ Ekstrakt metanolowy (75°C) z korzeni | 50 µl | 100 µl | 500 µl | 1000 µl |
| Rzodkiew oleista, odmiana 'Colonel' | Sok z części nadziemnej rośliny/ Ekstrakt metanolowy (75°C) z korzeni, Ekstrakt metanolowy z części nadziemnej (aparatus Soxhleeta) | 50 µl | 100 µl | 500 µl | 1000 µl |
| Rzodkiew oleista, odmiana 'Romesa' | Sok z części nadziemnej rośliny/ Ekstrakt metanolowy (75°C) z korzeni, Ekstrakt metanolowy z części nadziemnej (aparatus Soxhleeta) | 50 µl | 100 µl | 500 µl | 1000 µl |
| Gorczyca biała, odmiana 'Bardena' | Część nadziemna/korzeń utarty w ciekłym azocie | 0,3 g | | | |
| Gorczyca biała, odmiana 'Concerta' | Część nadziemna/korzeń utarty w ciekłym azocie | 0,3 g | | | |
| Rzodkiew oleista, odmiana 'Colonel' | Część nadziemna/korzeń utarty w ciekłym azocie | 0,3 g | | | |
| Rzodkiew oleista, odmiana 'Romesa' | Część nadziemna/korzeń utarty w ciekłym azocie | 0,3 g | | | |
| X | Mirozynaza + sinigrina 200 µM (inkubacja w 25 °C przez 1h) | 1000 µl | | | |

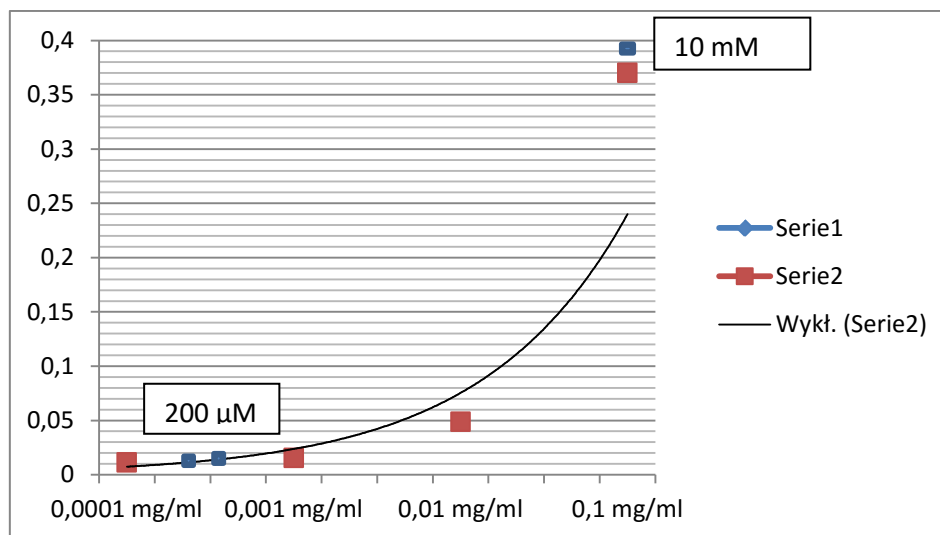
| | | | | | | |
|--|---|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | Mirozyna + sinigryna 10 mM (inkubacja w 37 °C przez 1h) | 50 μ l | 100 μ l | 200 μ l | 500 μ l | 1000 μ l |
| | Mirozyna + sinigryna 17,5 mM (inkubacja w 37 °C przez 1h) | 50 μ l | 100 μ l | 200 μ l | 500 μ l | 1000 μ l |

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

Do oceny porównawczej warunków doświadczenia założono równocześnie następujące doświadczenia kontrolne:

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

Stężenia substratu oraz enzymu w mieszaninie kontrolnej zostały ustalone eksperymentalnie poprzez ocenę stopnia hydrolizy substratu na podstawie ilości uwolnionej glukozy (reakcja GOD-PAP, Aqua-med). Na rysunku 6 przedstawiono zastosowane stężenia efektywnie przyczyniające się do wzrostu stężenia glukozy w doświadczeniu kontrolnym. Ostatecznie zastosowano większe stężenie komponentów reakcji (17,5 mM sinigryna), ponieważ przyczyniło się ono do dalszego wzrostu absorbancji o około 28% wartości początkowej, podczas gdy stężenie czterokrotnie większe przyczyniały się do wzrostu jedynie o około 37% w/w wartości. 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. 6. Krzywa wzorcową GOD-PAP dla reakcji kontrolnych (absorbancja dla długości fali 500 nm względem stężenia glukozy). 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

Celem oceny wpływu badanych ekstraktów na zasiedlenie korzeni przez *Polymyxa betae* i zdolność do przenoszenia BNYVV przez *P. betae* przeprowadzono molekularną detekcję w/w patogenów z korzeni roślin rosnących w obecności ekstraktów w toku reakcji RT-PCR. Z ok. 100 mg naważek korzeni wykonano izolację RNA metodą oczyszczania na kolumnkach z zastosowaniem zestawu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), zgodnie z protokołem producenta. Czystość i stężenie RNA było oceniane spektrofotometrycznie z zastosowaniem NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Jakość oceniano 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. Pozostałe komponenty reakcji stanowiły: 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 prowadzono z użyciem 2 µl uzyskanej w pierwszym etapie matrycy cDNA oraz 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 na 1,5% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydydy (Promega; 0,5 µg/ml) przy napięciu 5V/cm żelu. Wielkość produktów szacowano w systemie dokumentacji Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad Laboratories Srl) z zastosowaniem programu Quantity One, wersja 4.0.3, przez odniesienie do markera wielkości DNA 3000 bp DNA Ladder (GenoPlast Biochemicals). Ocenie podlegała obecność specyficznych produktów reakcji oraz względna intensywność uzyskanych produktów w stosunku do kontroli (kategorie: wyższa, niższa, porównywalna).

Obserwacje mikroskopowe

Dla zbadania wpływu badanych ekstraktów na zachowanie *P. betae* uzyskano zawiesinę zoospor w roztworze odżywczym Steiner, zgodnie z metodyką opisaną przez Paul i in. (1993). Obserwacje prowadzono w mikroskopie odwróconym (OLYMPUS CK2) na płytkach hodowlanych 6-dołkowych (NEST). Tak uzyskaną zawiesinę zoospor poddawano działaniu uzyskanych ekstraktów w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowano przez 24h w 37 °C, a następnie prowadzono obserwacje morfologii oraz ruchu zoospor w badanych mieszaninach w komorach na szkiełkach nakrywkowych Lab-Tek™ (Nunc™). Celem weryfikacji obecności komórek z uszkodzoną błoną, prawdopodobnie podlegających śmierci prowadzono barwienie przyżyciowe błękitem trypanu.

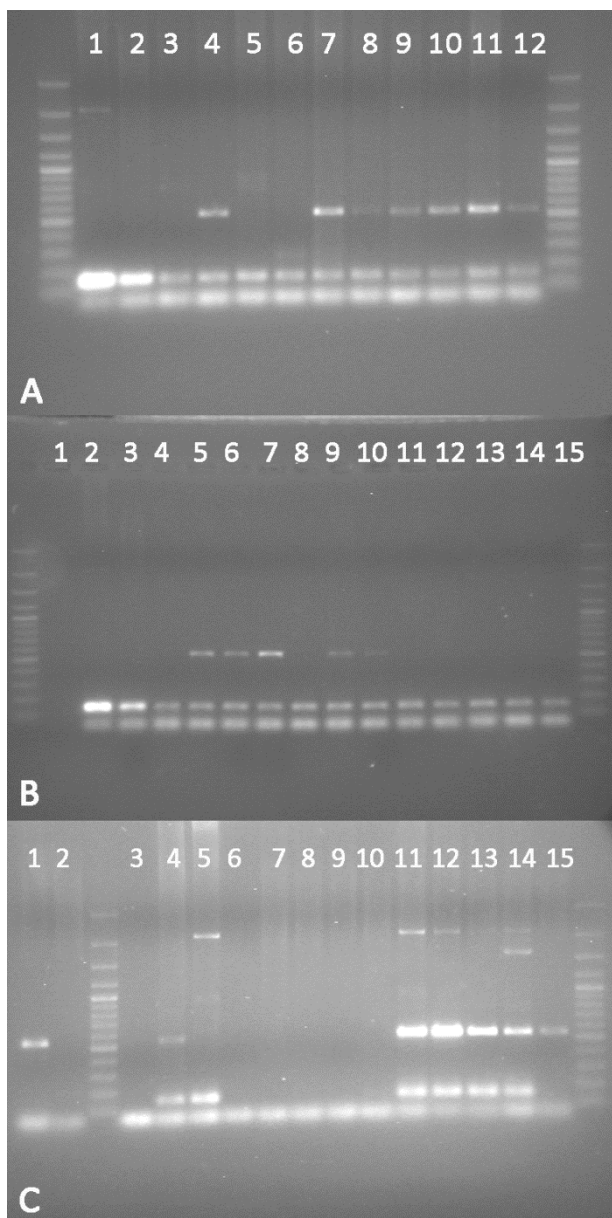
Na wstępnym etapie prowadzonych obserwacji prowadzono również znakowanie form przetrwalnych na płytkach hodowlanych 6-dołkowych przeciwciałem poliklonalnym przeciwko BNYVV oraz koniugatem przeciwciała drugorzędowego z alkaliczną fosfatazą. Detekcja następowała przez dodanie substratu dla AP, fosforan paranitrofenylu pNPP

(SIGMA-ALDRICH). Potwierdzenie obecności form żywych, aktywnie poruszających się, czyli zoospor możliwe było na podstawie wybranych cech morfologicznych, w szczególności natomiast występowania wici oraz średniej wielkości zgodnej z opisywaną w przedziale 4-7 μm .

3.1.2. Wyniki badań

Analizy molekularne

Przeprowadzone doświadczenia wskazują, iż w porównaniu do doświadczenia kontrolnego po zastosowaniu badanych ekstraktów dochodziło do ograniczenia wykrywalnej ilości *P. betae* w większości przypadków poza sproszkowanymi ekstraktami uzyskanymi z badanych materiałów roślinnych poprzez roztarcie w ciekłym azocie. Najskuteczniejsze z dotychczas przetestowanych ekstraktów były mieszanina kontrolna mirozynaza z sinigriną 17,5 mM w dawce 500 μl oraz ekstrakty metanolowe z korzeni, jak również świeże soki (rys. 7). Ograniczenie wykrywalnej ilości *P. betae* nie zawsze było jednak równoznaczne z zapobiegnięciem infekcji wirusem BNYVV.



Rys. 7. 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 negatywna, 2 - kontrola pozytywna, 3 - sok Colonel 0,5 ml, 4 - sok Colonel 1 ml, 5 - sok Romesa 50 μ l, 6 - sok Romesa 100 μ l, 7 - sok Romesa 0,5 ml, 8 - sok Romesa 1 ml, 9 - ekstrakt metanolowy Concerta (korzeń) 50 μ l, 10 - ekstrakt metanolowy Concerta (korzeń) 100 μ l, 11- ekstrakt metanolowy Concerta (korzeń) 0,5 ml, 12- ekstrakt metanolowy Concerta (korzeń) 1 ml);

B (1 - kontrola reakcji PCR, 2 - kontrola negatywna próba A1, 3 - kontrola pozytywna próba A2, 4 - ekstrakt metanolowy Bardena (korzeń) 50 μ l, 5 - ekstrakt metanolowy Bardena (korzeń) 100 μ l, 6 - ekstrakt metanolowy Bardena (korzeń) 0,5 ml, 7 - ekstrakt metanolowy Bardena (korzeń) 1 ml, 8 - ekstrakt metanolowy Romesa (korzeń) 50 μ l, 9 - ekstrakt metanolowy Romesa (korzeń) 100 μ l, 10 - ekstrakt metanolowy Romesa (korzeń) 0,5 ml, 11 - ekstrakt metanolowy Romesa (korzeń) 1 ml, 12 - ekstrakt metanolowy Colonel (korzeń) 50 μ l, 13 - ekstrakt metanolowy Colonel (korzeń) 100 μ l, 14 - ekstrakt metanolowy Colonel (korzeń) 0,5 ml, 15 - ekstrakt metanolowy Colonel (korzeń) 1 ml);

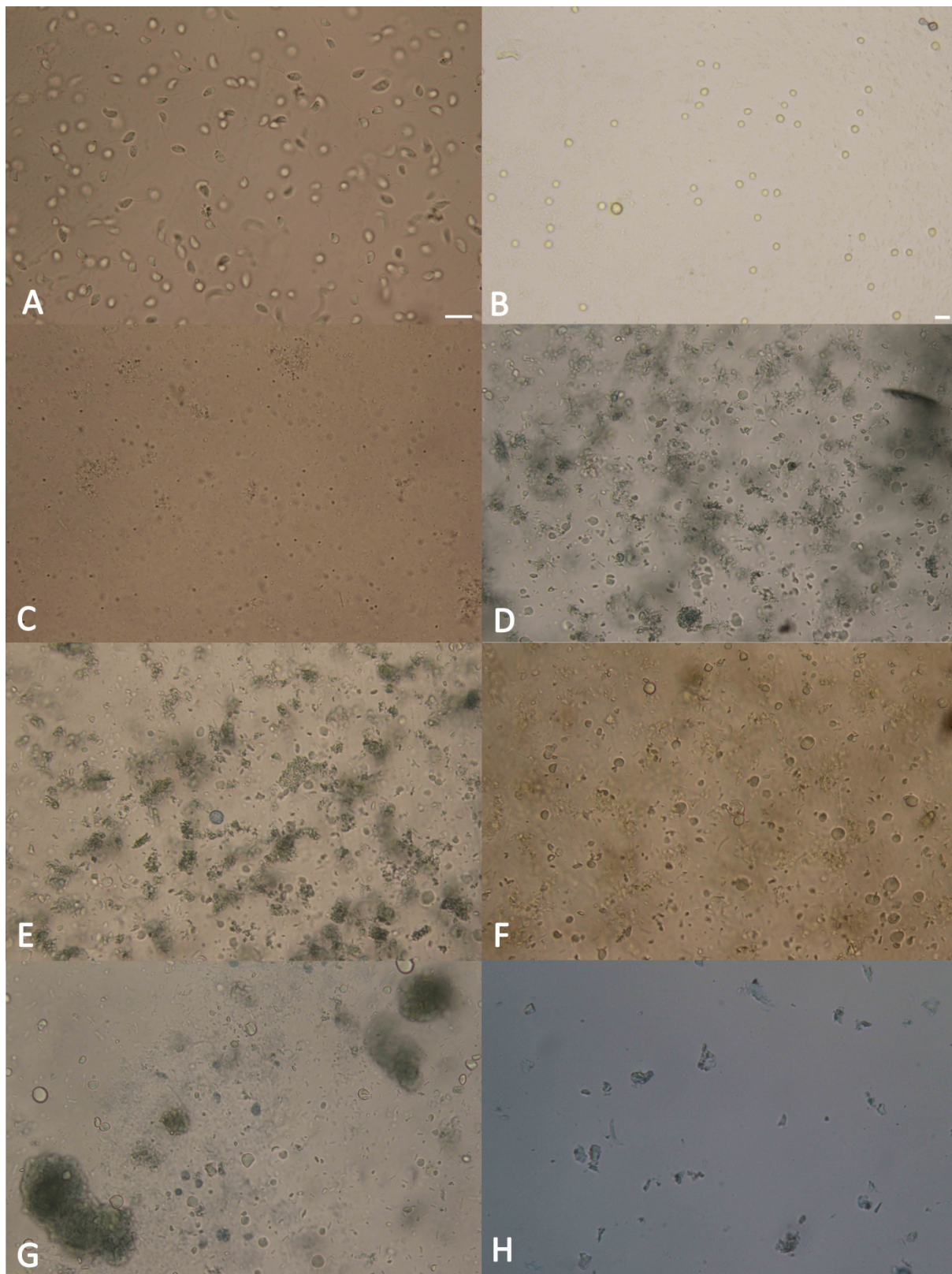
C (1 - kontrola pozytywna, 2 - kontrola negatywna, 3 - kontrola reakcji PCR, 4 - kontrola pozytywna próba A2, 5 - kontrola negatywna próba A1, 6 - sok Bardena 50 μ l, 7 - sok Bardena 100 μ l, 8 - sok

Colonel 50 μ l, 9 - sok Colonel 100 μ l, 10 - sok Bardena 1 ml, 11 - część nadziemna utarta w ciekłym azocie Colonel 0,3 g, 12 - korzeń utarty w ciekłym azocie Colonel 0,3 g, 13 - mieszanina mirozynaza z 17,5 mM sinigriną 100 μ l, 14 - mieszanina mirozynaza z 17,5 mM sinigriną 200 μ l, 15 - mieszanina mirozynaza z 17,5 mM sinigriną 0,5 ml). Ze względu na brak produktów w jednej z kontroli pozytywnych i występowanie produktu w jednej z kontroli negatywnych konieczne powtórzenie eksperymentu dla ostatecznej interpretacji uzyskanych wyników.

Obserwacje mikroskopowe

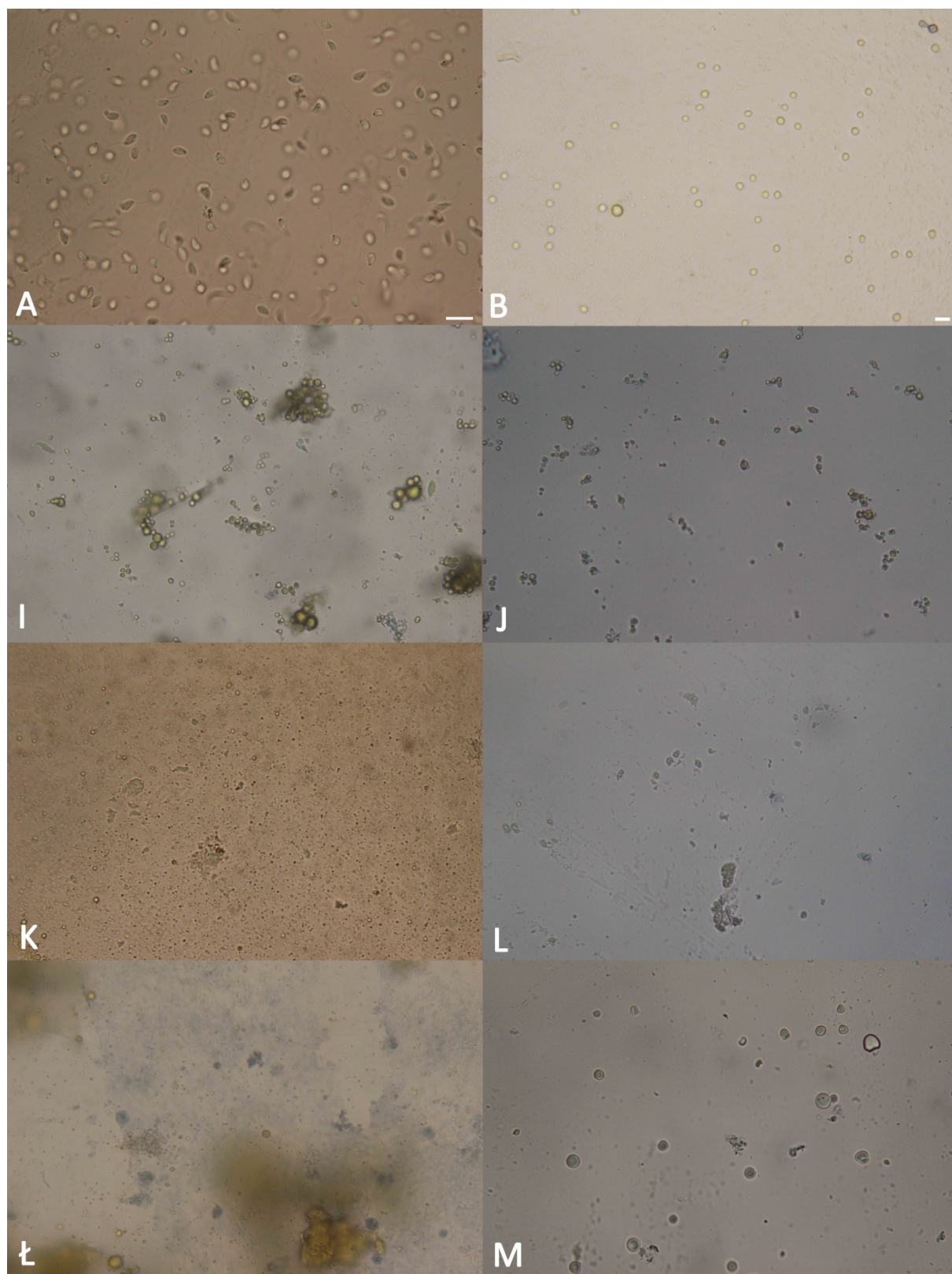
Mikroskopowe obserwacje wydają się potwierdzać uzyskane wyniki molekularne, wskazując, że:

- 1) w doświadczeniu kontrolnym w zawieszynie obserwowano obecność dużej ilości żywych, szybko poruszających się zoospor *P. betae* o typowej morfologii, posiadających wici (rys. 8A);
- 2) w doświadczeniu kontrolnym na płytkach hodowlanych 6-dołkowych obserwowano tworzenie form spoczynkowych/przetrwalnych wykazujących pozytywną reakcję na BNYVV po barwieniu substratem alkalicznej fosfatazy (rys. 8B);
- 3) w wyniku zastosowania mieszaniny kontrolnej mirozynaza/17,5 mM sinigrina najprawdopodobniej doszło do rozpadu komórek *P. betae*, być może wskutek śmierci komórki - na płytkach hodowlanych obserwowano głównie nieregularne fragmenty komórkowe, brak zoospor żywych o typowej morfologii (rys. 8C);
- 4) pod wpływem soków z łądyg oraz ekstraktów metanolowych z korzeni i łądyg badanych odmian gorzycy białej i rzodkwi oleistej dochodziło do znaczącego ograniczenia zdolności do aktywnego przemieszczania się zoospor, często obserwowano komórki o nieregularnym kształcie, obkurczone oraz formy spoczynkowe, niejednokrotnie dochodziło do barwienia komórek błękitem trypanu (rys. 8D-3M);
- 5) zastosowanie soków i ekstraktów metanolowych mogło przyczynić się do wzmożonego tworzenia form spoczynkowych, ograniczenia zdolności do aktywnego przemieszczania się wektora i śmierci komórki.



Rys. 8. Wpływ badanych ekstraktów na morfologię i zachowanie zoospor *P. betae*. A - zawiesina zoospor kontrolna, widoczne wici i znacząca aktywność motoryczna, B - formy spoczynkowe na płytkach hodowlanych, reakcja kontrolna - detekcja BNYVV, C - reakcja kontrolna

mirozynaza/sningryna 17,5 mM, D, E, F, G - soki z łądy Bardena, Concerta, Colonel, Romesa, H - wyciąg metanolowy z korzenia Concerta.



Rys. 8. c.d. Wpływ badanych ekstraktów na morfologię i zachowanie zoospor *P. betae*. A - zawiesina zoospor kontrolna, widoczne wici i znacząca aktywność motoryczna, B - formy spoczynkowe na płytkach hodowlanych, reakcja kontrolna - detekcja BNYVV, I - wyciąg metanolowy z łądygi

Bardena, J - wyciąg metanolowy z korzenia Bardena, K - wyciąg metanolowy z łodygi Colonel, L - wyciąg metanolowy z korzenia Colonel, Ł - wyciąg metanolowy z łodygi Romesa, M - wyciąg metanolowy z korzenia Romesa.

3.1.3. Podsumowanie

1. Zoospory *P. betae* wykazały się wrażliwością na działanie wybranych spośród badanych ekstraktów, szczególnie w przypadku dawek zastosowanych bezpośrednio na kulturę zoospor (obserwacje mikroskopowe). Detekcja molekularna wskazuje, iż ograniczenie *P. betae* w zawieszynie pod działaniem ekstraktów jest możliwe, ale ze względu na niejednoznaczne wyniki uzyskane dla niektórych prób wskazane jest powtórzenie eksperymentu.
2. Zastosowanie ekstraktów gorczycy białej i rzodkwi oleistej może wpłynąć na zmniejszenie zasiedlenia korzeni buraka cukrowego przez *P. betae*, jednak ponieważ uzyskane wyniki bazują na pojedynczym eksperymencie badawczym konieczna jest dalsza ich weryfikacja, jak również ocena zasiedlenia korzeni w późniejszym etapie od momentu traktowania. Obserwacje mikroskopowe prowadzone w dłuższym czasie pozwolą na bardziej precyzyjną weryfikację zakresu tworzenia form przetrwalnych/śmierci komórek.
3. Przed zastosowaniem wybranego ekstraktu jako preparatu doglebowego bądź składnika otoczki nasion buraka cukrowego konieczne jest opracowanie najbardziej skutecznej postaci. Z przetestowanych mieszanin/ekstraktów najbardziej skuteczna wydaje się mieszanina 17,5 mM sinigriny z mirozynazą.

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

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

Eksperyment polegał na sprawdzeniu działania otrzymanych ekstraktów roślinnych pozyskanych ze świeżej masy części nadziemnych i korzeni, suchej masy części nadziemnych (metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta) oraz nasion na ograniczenie wzrostu wybranych patogenów w uprawie buraka cukrowego. Przygotowane wcześniej ekstrakty rozmrożono i wysterylizowano przez filtrację. Jako nośnik wyciągu użyto sterylne krążki z bibuły o średnicy 6 mm, na które naniesiono po 20 µl ekstraktu. W eksperymencie użyto *A. cochlioides*, *R. solani* AG2 i AG4 oraz *C. beticola* pozyskane z buraka cukrowego. Doświadczenie przeprowadzono w szalkach Petriego. Patogeny pasażowano na pożywkę Potato Dextrose Agar (PDA) na które wyłożono przygotowane krążki, nasączone ekstraktem. Szalki przetrzymywano w temp. 24°C. Co 24, 48 i 72 godziny obserwowano wpływ badanego ekstraktu na przerastające powierzchnię pożywki patogeny.

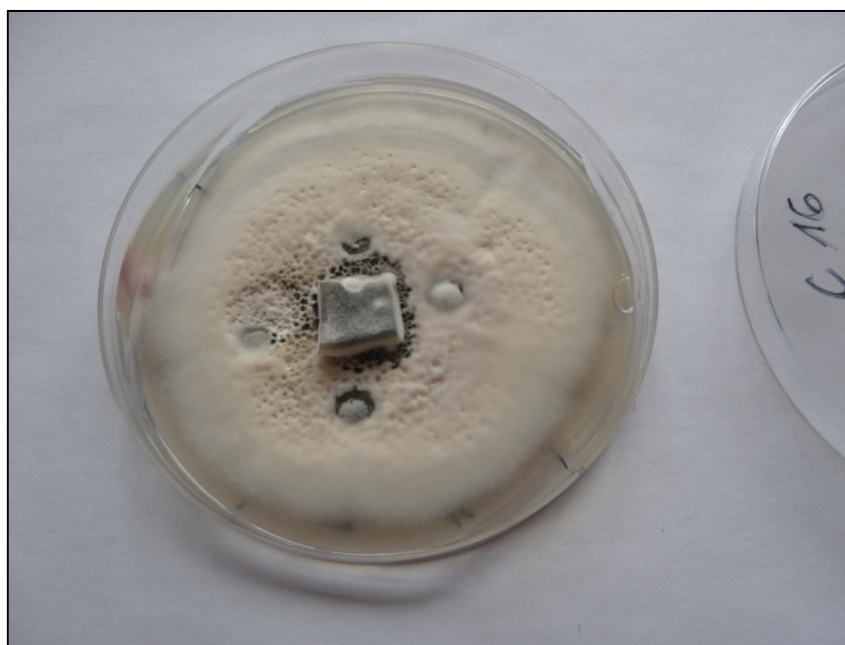
Działanie ekstraktów pozyskanych z suchego materiału roślinnego części nadziemnej przeprowadzono analogicznie jak dla sprawdzenia działania ekstraktu z korzeni badanych roślin kapustowatych. Jako dodatkowy wariant doświadczalny zastosowano dodatek do ekstraktów syntetycznej mirozynazy. Kontrolę stanowił wariant z zastosowaniem pożywki PDA bez dodatku ekstraktu roślinnego.

3.2.2. Wyniki badań

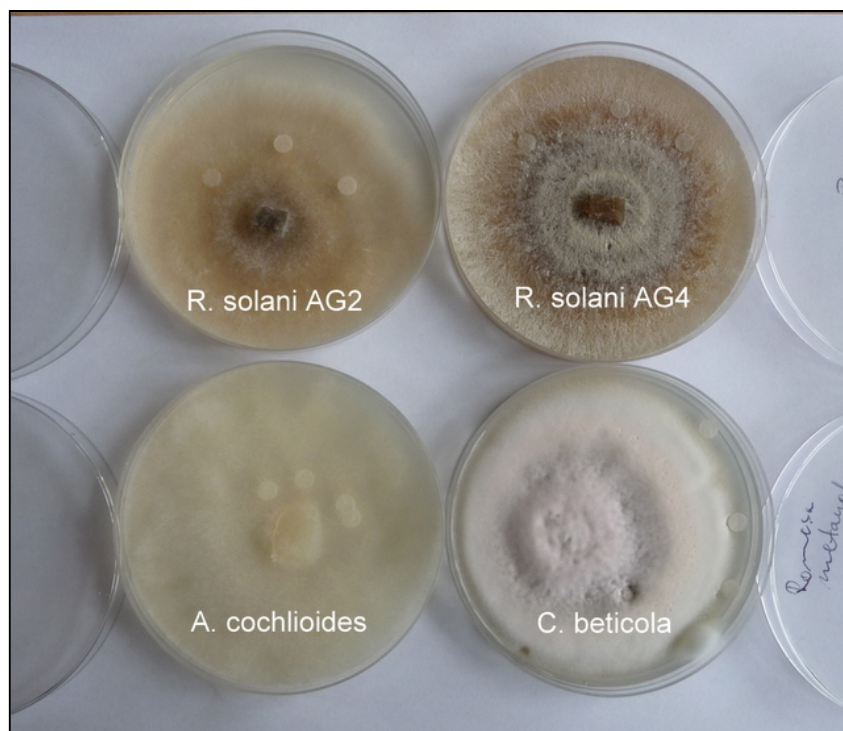
Spośród testowanych ekstraktów właściwości fungistatyczne wykazał ekstrakt z rzodkwi oleistej odmiany Romesa (tab. 2). Przeprowadzone doświadczenie sprawdzające działanie otrzymanych preparatów biologicznych wykazało grzybostatyczne działanie wyciągu ze świeżej (rys. 9) i suchej części nadziemnej (rys. 10) tej odmiany, w odniesieniu do grzyba *C. beticola*. W przypadku pozostałych ekstraktów nie stwierdzono jednoznacznego wpływu na rozwój *A. cochlioides*, *R. solani* i *C. beticola*. Również stosowanie mirozynyzy nie poprawiło w widoczny sposób właściwości grzybobójczych badanych ekstraktów.

Wyniki badań ekstraktów z barszczu Sosnowskiego, z uwagi na bardzo dużą zmienność rejestrowanych efektów, nie zamieszczono w sprawozdaniu. Autorzy planują powtórzenie testów, celem jednoznacznego określenia działania substancji zawartych w biomacie tego gatunku rośliny na poszczególne patogeny buraka cukrowego.

Obserwacje poczynione podczas prowadzenia eksperymentów z określaniem działania ekstraktów na badane patogeny są zachęcające do kontynuowania prac i wykorzystania zdobytej już wiedzy. Różnorodność każdego z patogenów skłania do przeprowadzenia kolejnych badań z zastosowaniem zmodyfikowanej metodyki i bardziej zróżnicowanej koncentracji testowanych ekstraktów.



Rys. 9. Ekstrakt z świeżej masy części nadziemnej rzodkwi oleistej Romesa umieszczony na grzybni *C. beticola*



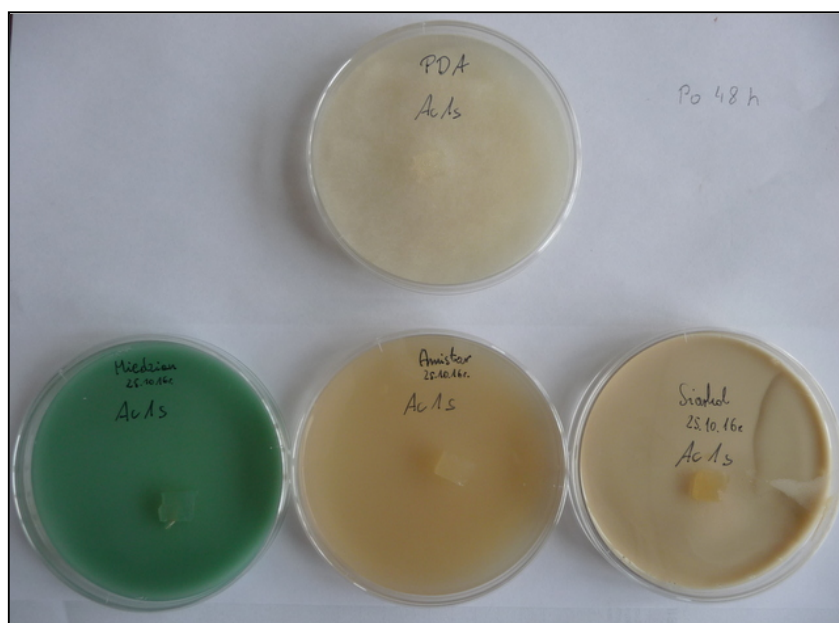
Rys. 10. Ekstrakt z suchej masy części nadziemnej rzodkwi oleistej Romesa wprowadzony na płytki z badanymi patogenami buraka cukrowego

Tab. 2. Działanie ekstraktów otrzymanych z badanych odmian gorczycy białej i rzodkwi oleistej na patogeny buraka cukrowego: *A. cochlioides*, *C. beticola* i *R. solani*

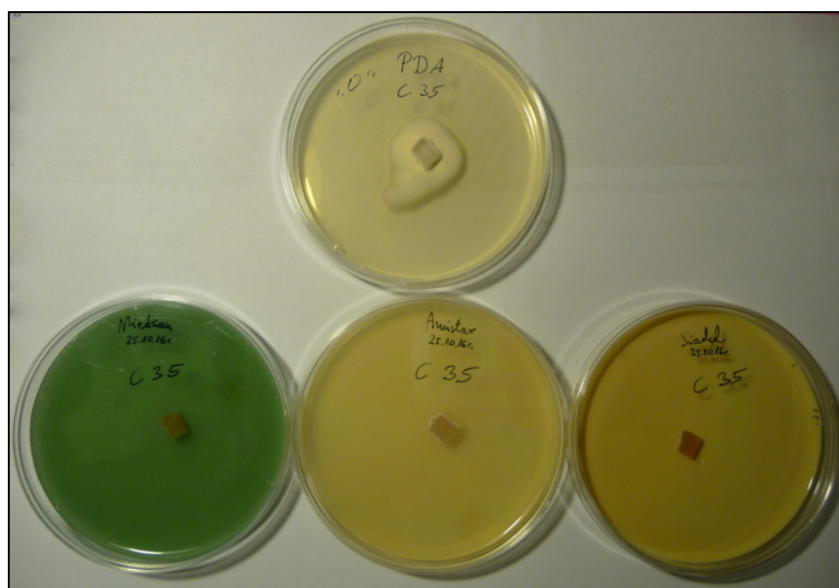
| Ekstrakt | Gatunek | Odmiana | Patogeny buraka cukrowego | | |
|---|------------------|----------|---------------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | <i>R. solani</i> | <i>A. cochlioides</i> | <i>C. beticola</i> |
| Ekstrakty ze świeżej masy części nadziemnej | Gorczyca biała | Bardena | - | - | - |
| | | Concerta | - | - | - |
| | Rzodkiew oleista | Romesa | - | - | + |
| | | Colonel | - | - | - |
| Ekstrakty ze świeżej masy korzeni | Gorczyca biała | Bardena | - | - | - |
| | | Concerta | - | - | - |
| | Rzodkiew oleista | Romesa | - | - | - |
| | | Colonel | - | - | - |
| Ekstrakt metanolowy z suchej masy części nadziemnej | Gorczyca biała | Bardena | - | - | - |
| | | Concerta | - | - | - |
| | Rzodkiew oleista | Romesa | - | - | + |
| | | Colonel | - | - | - |
| Ekstrakt metanolowy z suchej masy korzeni | Gorczyca biała | Bardena | - | - | - |
| | | Concerta | - | - | - |
| | Rzodkiew oleista | Romesa | - | - | - |
| | | Colonel | - | - | - |
| Mieszanka mirozynazy z sinigryną | Gorczyca biała | Bardena | - | - | - |
| | | Concerta | - | - | - |
| | Rzodkiew oleista | Romesa | - | - | - |
| | | Colonel | - | - | - |

- brak działania; + działanie hamujące rozwój patogena

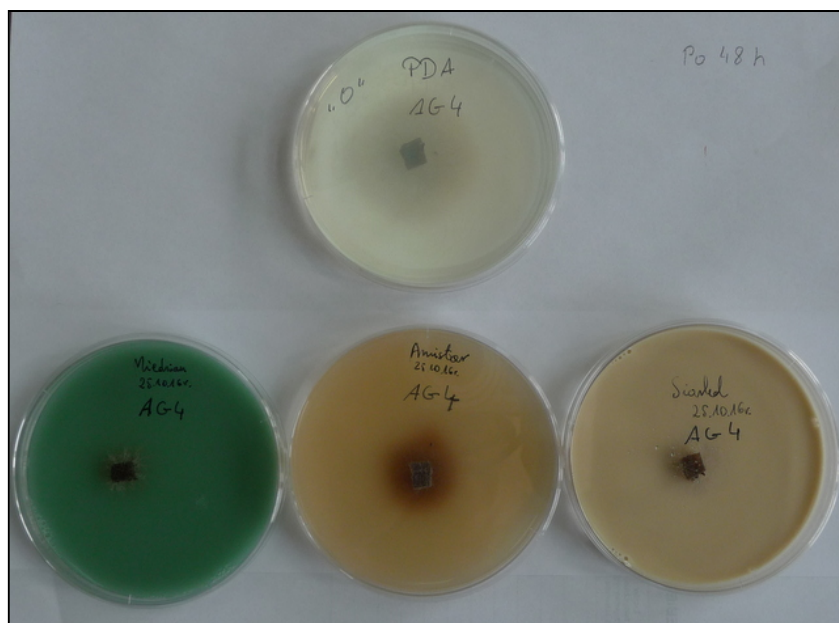
Przeprowadzono ponadto test zatrutego podłoża z substancjami kontrolnymi wpływającymi na rozwój grzybów. W teście zastosowano następujące produkty: Miedzian 50WP i Siarkol Extra 80WP (środki ochrony roślin dopuszczone do stosowania w ekologicznej uprawie roślin) oraz Amistar (środek ochrony roślin dopuszczony do stosowania w tradycyjnej uprawie ziemniaka). Po 48 godzinach wszystkie trzy zastosowane środki wykazały hamujące działanie na wzrost badanych patogenów. W przypadku *A. cochlioides* i *C. beticola* nie zaobserwowano w ogóle wzrostu (rys. 11 i 12), natomiast w przypadku grzyba *R. solani* przyrost grzybni był wyraźnie ograniczony przez zastosowane substancje (rys. 13).



Rys. 11. Test rozwoju *A. cochlioides* po zastosowaniu środka Miedzian 50WP, Siarkol Extra 80WP i Amistar 250SC



Rys. 12. Test rozwoju *C. beticola* po zastosowaniu środka Miedzian 50WP, Siarkol Extra 80WP i Amistar 250SC



Rys. 13. Test rozwoju *R. solani* po zastosowaniu środka Miedzian 50WP, Siarkol Extra 80WP i Amistar 250SC

3.2.3. Podsumowanie

Ekstrakty z części nadziemnej rzodkwi oleistej odmiany Romesa charakteryzowały się wyraźnym efektem ograniczania wzrostu grzyba *C. beticola*. W przypadku pozostałych ekstraktów nie udowodniono jednoznacznej reakcji testowanych grzybów fitopatogennych na roztwory uzyskane z biomasy badanych roślin i zastosowane ich stężenia.

Zastosowane jako obiekty kontrolne, chemiczne środki ochrony roślin dopuszczone do stosowania w ekologicznej uprawie roślin (Miedzian 50WP i Siarkol Extra 80WP), hamowały rozwój *A. cochlidioides*, *C. beticola* i *R. solani*.

3.3. *Globodera rostochiensis* (mątwik ziemniaczany)

3.3.1. Działanie ekstraktów na cysty *G. rostochiensis*

Eksperyment polegał na ocenie działania ekstraktów roślinnych na stymulację wylęgu larw z cyst mątwika ziemniaczanego. Przygotowane wcześniej ekstrakty rozmrożono i wysterylizowano przez filtrację (filtr strzykawkowy, średnica porów 0,22 μm). W pierwszym etapie badań użyto 96-dołkowe płytki titracyjne (rys. 14), w których umieszczono cysty mątwika i zalano 5-krotnie i 10-krotnie rozcieńczonymi ekstraktami otrzymanymi ze świeżej masy badanych roślin. Jako kontrolę pozytywną użyto dyfuzat korzeniowy z pomidora, kontrolę negatywną stanowiła próba z wodą demineralizowaną. Modyfikacją metody było zastosowanie komór hodowlanych i woreczków nylonowych, wykonanych z materiału nylonowego o wielkości porów 0,22 mm (rys. 15), w których zamykano po 20 sztuk cyst. Woreczki umieszczano w komorach hodowlanych i zalewano 5-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.

Badanie metanolowego ekstraktu ze zmielonych korzeni gorczycy białej i rzodkwi oleistej przeprowadzono z użyciem nośników bibułowych. W celu wykluczenia toksycznego działania metanolu na cysty użyto nośnik ekstraktu w postaci bibuły o wymiarach 15 mm na 15 mm. Nośnik nasączono 100 μ l dwukrotnie rozcieńczonego ekstraktu i powietrznie wysuszono. Działanie ekstraktów z korzeni testowano w komorach hodowlanych do obserwacji przyżyciowej. 20 sztuk cyst zamknięto w woreczkach nylonowych. Woreczki umieszczano w komorach hodowlanych i zalano 1 ml wody demineralizowanej. Następnie dodawano nośniki z ekstraktem. Kontrolę pozytywną stanowił nośnik bibułowy nasączony dyfuzatem korzeniowym pomidora. Kontrolę negatywną stanowiła próba z nośnikiem bibułowym bez dodatku ekstraktu/dyfuzatu. Woreczki z cystami przekładano do nowych komór hodowlanych z dodatkiem nośnika nasączonego ekstraktem/dyfuzatem w odstępach 1 tygodnia.

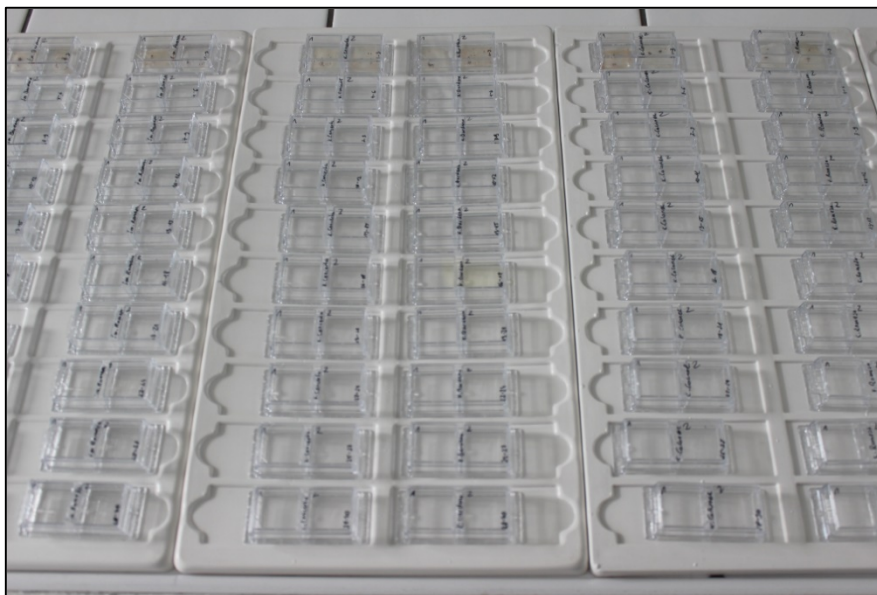
Działanie ekstraktów pozyskanych z suchego materiału roślinnego części nadziemnej (z aparatu Soxhleta) testowano analogicznie jak przy sprawdzaniu działania ekstraktu z korzeni badanych roślin kapustowatych. Jako kolejny wariant doświadczalny zastosowano dodatek do ekstraktów syntetycznej mirozyny. W odstępach 3 dniowych woreczki z cystami przekładano do nowych komór hodowlanych i dodawano świeżo przygotowany nośnik z ekstraktem. Obserwacje komór hodowlanych prowadzono przy użyciu mikroskopu odwróconego. Jako kontrolę pozytywną zastosowano nośnik bibułowy nasączony dyfuzatem korzeniowym pomidora. Kontrolę negatywną stanowił wariant z zastosowaniem nośnika bibułowego bez dodatku ekstraktu roślinnego.

3.3.2. Działanie ekstraktów na larwy inwazyjne *G. rostochiensis*

Działanie ekstraktów ze świeżej masy roślin na formy inwazyjne mątwika przeprowadzono w 96-dołkowych płytkach titracyjnych. Materiał doświadczalny stanowiły larwy mątwika ziemniaczanego otrzymane po działaniu dyfuzatu korzeniowego pomidora, które przeniesiono do dołków płytek titracyjnych. Następnie do zawiesin larw dodano ekstrakty ze świeżej masy badanych odmian gorczycy białej i rzodkwi oleistej oraz barszczu Sosnowskiego (część nadziemna). Jako końcowe stężenie użyto 5-krotnie i 10-krotnie rozcieńczone ekstrakty ze świeżej masy. Kontrolę pozytywną stanowiły próby z dodatkiem sinigryny i mirozyny. Jako kontrolę negatywną zastosowano wodę destylowaną. Płytki przeglądano pod mikroskopem odwróconym po 1, 2, 3 i 7 dniach. Działanie metanolowych ekstraktów roślinnych na larwy inwazyjne mątwika ziemniaczanego przeprowadzono analogicznie jak dla testowania działania ekstraktów na cysty. Komory hodowlane przeglądano po 1, 24 i 48 godzinach. Wyniki przedstawiono w procentach larw żywych.



Rys. 14. Płytki titracyjne użyte do testowania działania ekstraktów roślinnych na cysty i larwy mątwika ziemniaczanego



Rys. 15. Komory hodowlane do obserwacji przyżyciowej wykorzystane do testowania działania ekstraktów roślinnych na cysty i larwy mątwika ziemniaczanego

3.3.3. Wyniki badań

Wyniki badań działania ekstraktów otrzymanych ze świeżych roślin, z uwagi na szybkie narastanie zanieczyszczeń biologicznych w dołkach płytek titracyjnych zalanych ekstraktem nie dały jednoznacznych wyników (nie załączono). Skuteczniejszą metodą badania oddziaływania ekstraktów na cysty mątwika okazała się metoda z zastosowaniem woreczków nylonowych umieszczanych w komorach hodowlanych do obserwacji przyżyciowej. Metoda ta pozwoliła na ograniczenie silnego namnażania mikroorganizmów w przeglądanych próbach, co ułatwiło dokonywanie obserwacji. Otrzymane wyniki wskazują na

brak oddziaływania badanych ekstraktów otrzymanych ze świeżej masy na stymulację wylęgu larw z cyst mątwika ziemniaczanego (tab. 3). Jednocześnie zastosowana metodyka pozwoliła stwierdzić brak działania toksycznego badanych ekstraktów na żywą zawartość cyst. Porównując zachowanie się cyst w roztworach wodnych ekstraktów roślinnych odnotowano działanie hamujące wyląg larw względem kontroli negatywnej (woreczki z cystami w wodzie).

Działanie ekstraktu metanolowego korzeni nie spowodowało wylęgu larw z cyst mątwika. Podobnie jak w przypadku roztworów wodnych ekstraktów, wyląg larw w kontroli negatywnej był wyższy (tab. 4). Również działanie ekstraktów otrzymanych z suchej masy (aparatus Soxhleta) nie spowodowały wylęgu larw z cyst mątwika. Obserwacja zawartości woreczka po zakończeniu eksperymentu nie potwierdziła działania toksycznego ekstraktów na żywą zawartość cyst (tab. 5).

Działanie ekstraktów otrzymanych ze świeżej masy na larwy inwazyjne mątwika ziemniaczanego przedstawiono w tabeli 6. Po 1 dniu od dodania ekstraktu z części nadziemnej roślin kapustowatych do zawiesiny zawierającej larwy mątwika zarejestrowano różnice w działaniu badanych wyciągów. Najwięcej larw żywych obserwowano po działaniu ekstraktu z gorzycy białej odmiana Bardena, najmniej po dodaniu ekstraktu z rzodkwi oleistej odmiana Romesa. W 2, 3 dniu po dodaniu ekstraktów do zawiesiny larw mątwika we wszystkich próbach nie stwierdzono obecności larw żywych. Wyjątek stanowiła próba z dodatkiem ekstraktu z rzodkwi oleistej odmiany Romesa 10-krotnie rozcieńczonego. Po 7 dniach nie było już larw żywych w badanych próbach. Wodne ekstrakty z korzeni gorzycy białej i rzodkwi oleistej spowodowały nieznaczny spadek ilości żywych larw. Podobnie obserwacje zanotowano po dodaniu wodnego ekstraktu z barszczu Sosnowskiego do studzienek z larwami mątwika. Procent żywych larw w tych próbach wynosił około 90%.

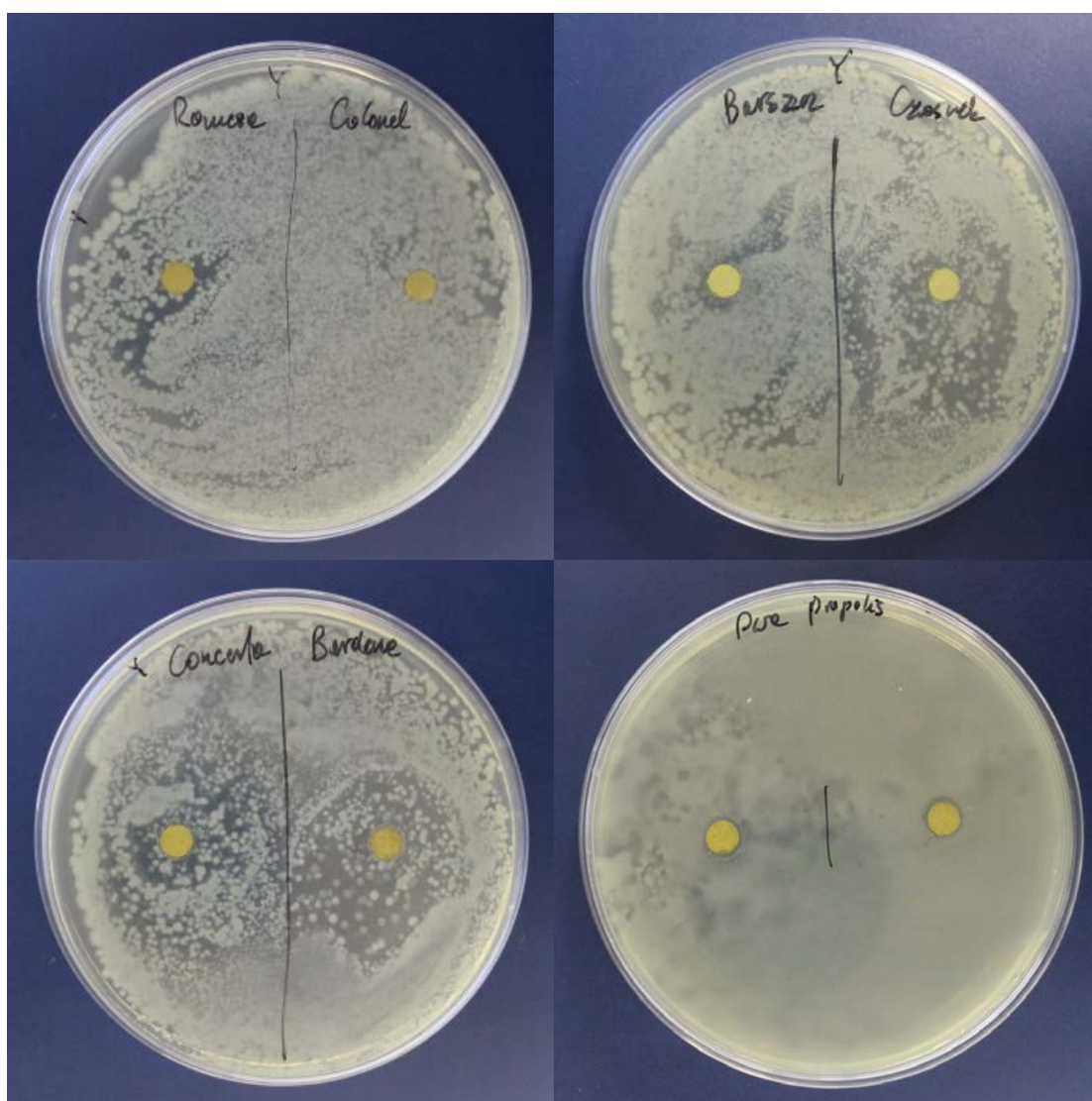
Użycie ekstraktów metanolowych otrzymanych z suchej masy części nadziemnej nie wykazało działania biobójczego na larwy mątwika. Po 48 godzinach kontaktu nicieni z ekstraktami wszystkie obserwowane larwy były żywe (tab. 7).

3.3.4. Podsumowanie

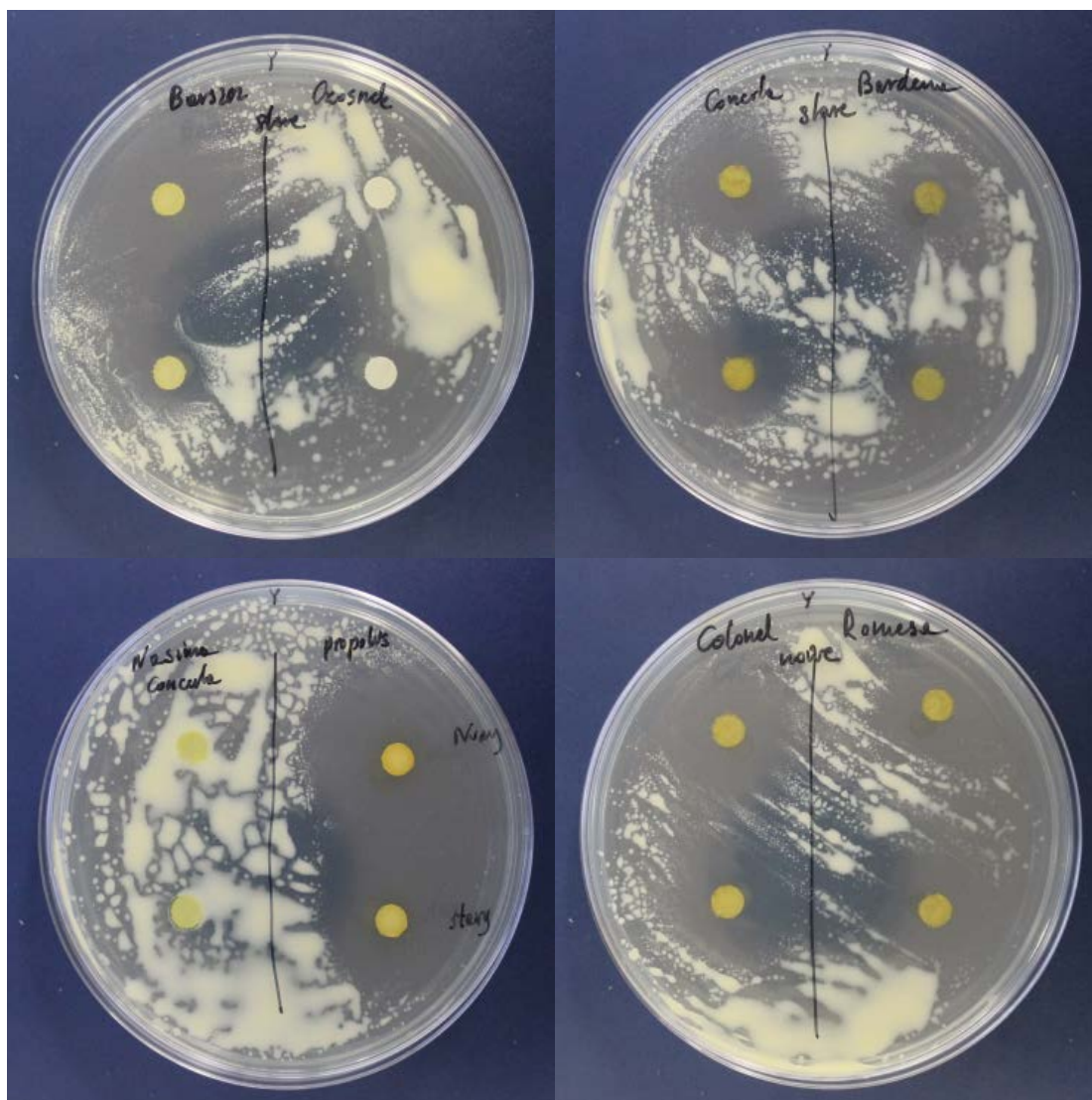
Przeprowadzone eksperymenty wykazały niejednoznaczne działanie użytych do badań ekstraktów. Dotychczasowa wiedza dotycząca wykorzystania ekstraktów roślinnych w biologicznej ochronie roślin przed nicieniami jest niewielka. Doświadczenie i umiejętności praktyczne nabyte w trakcie testowania działania ekstraktów na cysty i larwy nicieni mątwika ziemniaczanego stanowią dobrą bazę do prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Trudności metodologiczne wynikające z biologii nicienia oraz ograniczenia czasowe projektu motywują do przeprowadzenia kolejnych badań z zastosowaniem innych koncentracji przygotowanych ekstraktów. Zasadne byłoby również uwzględnienie użycia ekstraktów z innych roślin oraz poszerzenie spektrum działania ekstraktów na inne nicienie występujące w uprawie ziemniaków.

3.4. Działanie ekstraktów roślinnych na bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) i *Pectobacterium wasabiae* (*Pwa*)

Przeprowadzono dodatkowe, nieplanowane, doświadczenie sprawdzające działanie otrzymanych ekstraktów (z suchej masy metodą ekstrakcji w aparacie Soxhleta) na wybrane bakterie chorobotwórcze ziemniaka. Jako nośnik ekstraktu zastosowano sterylne krążki z bibuły o średnicy 6 mm, na które naniesiono po 20 μ l ekstraktu. W eksperymencie użyto bakterie *Cms* szczep NCPPB 4053 oraz środowiskowy szczep *Pwa* wyosobniony z bulwy ziemniaka (bank patogenów w IHAR-PIB Młochów). Zawiesiny bakteryjne *Cms* i *Pwa* o koncentracji $2,5 \times 10^3$ jtk/ml wysiano na podłoże YPGA w postaci posiewu murawowego. Na powierzchnie płytek wyłożono przygotowane krążki, nasączone ekstraktem. Obserwacje i pomiar stref zahamowania wzrostu bakterii dokonywano po 1 dniu (dla *Pwa*) i w 7 dniu od posiania (*Cms*).



Rys. 16. Działanie ekstraktów roślinnych na bakterie *Pectobacterium wasabiae*



Rys. 17. Działanie ekstraktów roślinnych na bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Zaobserwowano różnice działania ekstraktów na bakterie. Bakterie *Pectobacterium wasabiae* wykazywały dużą odporność na działanie ekstraktów (rys. 16). Obecność krążka nasączonego ekstraktem nie wpływała na wzrost tych bakterii. W przypadku *Cms* odnotowano wyraźne strefy zahamowania wzrostu w obrębie krążków wyłożonych na pożywki (rys. 17). Każdy z użytych ekstraktów oddziaływał na *Cms*, przy czym największe promienie wokół krążków obserwowano dla ekstraktów z rzodkwi oleistej oraz barszczu Sosnowskiego. Mała ilość przeprowadzonych powtórzeń oraz brak określenia minimalnego stężenia ekstraktu działającego hamująco na bakterie nie pozwala na zestawienie wyników w postaci tabelarycznej. Wstępne wyniki potwierdzają działanie bakteriobójcze otrzymanych ekstraktów i zachęcają do przeprowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

Tab. 3. Działanie ekstraktów otrzymanych ze świeżej masy części nadziemnej i korzeni (roztwór wodny) gorczycy białej (odmiana Bardena i Concerta) i rzodkwi oleistej (odmiana Romesa i Colonel) na cysty mątwika ziemniaczanego, 2 powtórzenia [liczba larw w szt.]

| dzień | Ekstrakty ze świeżej masy części nadziemnej | | | | | | | | Ekstrakty ze świeżej masy korzeni wytrząsane w wodzie | | | | | | | | Kontrola pozytywna | | Kontrola negatywna | |
|--|---|-----|----------|-----|---------|-----|--------|-----|---|-----|----------|------|---------|-----|--------|------|--------------------|------|--------------------|-----|
| | Bardena | | Concerta | | Colonel | | Romesa | | Bardena | | Concerta | | Colonel | | Romesa | | dyfuzat pomidora | | woda | |
| 3 | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 180 | 140 | 15 | 5 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 14 | 6 | 0 | 0 | 120 | 150 | 14 | 35 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 4 | 1 | 0 | 50 | 40 | 16 | 20 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 210 | 220 | 5 | 40 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 17 | 0 | 0 | 43 | 25 | 3 | 3 |
| suma | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 1 | 0 | 23 | 30 | 1 | 0 | 604 | 575 | 53 | 103 |
| Żywa zawartość cyst pozostała w woreczku | 580 | 600 | 650 | 630 | 670 | 660 | 880 | 410 | 1210 | 870 | 1320 | 1350 | 770 | 830 | 890 | 1020 | 430 | 460 | 220 | 250 |
| Suma żywej zawartości cyst | 580 | 601 | 650 | 630 | 671 | 660 | 880 | 410 | 1214 | 874 | 1321 | 1350 | 793 | 860 | 891 | 1020 | 1034 | 1035 | 273 | 353 |

*- wyniki w kolumnach stanowią powtórzenia

Tab. 4. Działanie ekstraktów otrzymanych ze świeżej masy korzeni gorczycy białej (odmiana Bardena i Concerta) i rzodkwi oleistej (odmiana Romesa i Colonel) na cysty mątwika ziemniaczanego (ekstrakty wytrząsane w metanolu w temp. 24°C)[liczba larw w szt.]

| tydzień | Ekstrakty ze świeżej masy korzeni | | | | Kontrola pozytywna | Kontrola negatywna |
|--|-----------------------------------|----------|---------|--------|--------------------|--------------------|
| | Bardena | Concerta | Colonel | Romesa | dyfuzat pomidora | woda |
| 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 40 | 3 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 90 | 20 |
| 3 | 0 | 1 | 0 | 2 | 220 | 20 |
| suma | 0 | 2 | 0 | 4 | 350 | 43 |
| Żywa zawartość cyst pozostała w woreczku | 590 | 980 | 780 | 600 | 250 | 820 |
| Suma żywej zawartości cyst | 590 | 982 | 780 | 604 | 600 | 863 |

Tab. 5. Działanie ekstraktów otrzymanych z suchej masy części nadziemnej badanych roślin kapustowatych i barszczu Sosnowskiego na cysty mątwika ziemniaczanego, dwa powtórzenia [liczba larw w szt.]

| dzień | Ekstrakty z suchej masy części nadziemnej | | | | | | | | Ekstrakt ze świeżej masy ogonków liściowych | Ekstrakty z suchej masy części nadziemnej z dodatkiem mirozynyzy | | | | | | | | Kontrola pozytywna | Kontrola negatywna |
|--|---|-----|----------|------|---------|-----|--------|-----|---|--|-----|----------|-----|---------|-----|--------|-----|--------------------|--------------------|
| | Bardena | | Concerta | | Colonel | | Romesa | | Barszcz Sosnowskiego | Bardena | | Concerta | | Colonel | | Romesa | | Dyfuzat Pomidora | woda |
| 3 | 0* | 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 0 |
| suma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 0 |
| Żywa zawartość cyst pozostała w woreczku | 900 | 570 | 730 | 1120 | 880 | 780 | 920 | 750 | 650 | 810 | 790 | 690 | 690 | 930 | 630 | 1090 | 660 | 840 | 700 |
| Suma żywej zawartości cyst | 900 | 570 | 730 | 1120 | 880 | 780 | 920 | 750 | 650 | 810 | 790 | 690 | 690 | 930 | 630 | 1090 | 660 | 926 | 700 |

*- wyniki w kolumnach stanowią powtórzenia

Tab. 6. Działanie ekstraktów otrzymanych ze świeżej masy części nadziemnej i korzeni badanych roślin kapustowatych i barszczu Sosnowskiego na larwy inwazyjne mątwika ziemniaczanego, rozcieńczenie 5- i 10-krotne ekstraktu [% żywych larw]

| dzień | Ekstrakty ze świeżej masy części nadziemnej | | | | | | | | Ekstrakty ze świeżej masy korzeni wytrąsane w wodzie | | | | | | | | Ekstrakt ze świeżej masy ogonków liściowych | Kontrola pozytywna | Kontrola negatywna | |
|-------|---|-----|----------|-----|---------|-----|--------|-----|--|-----|----------|-----|---------|-----|--------|-----|---|-----------------------|--------------------|-----|
| | Bardena | | Concerta | | Colonel | | Romesa | | Bardena | | Concerta | | Colonel | | Romesa | | Barszcz Sosnowskiego | Sinigryna +mirozynyza | woda | |
| | 5x | 10x | 5x | 10x | 5x | 10x | 5x | 10x | 5x | 10x | 5x | 10x | 5x | 10x | 5x | 10x | 5x | 10x | - | - |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1 | 1 | 20 | 1 | 1 | 5 | 5 | 0 | 3 | 95 | 100 | 97 | 100 | 100 | 100 | 97 | 100 | 90 | 90 | 0 | 100 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 93 | 100 | 98 | 100 | 98 | 100 | 97 | 97 | 93 | 90 | 0 | 100 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 99 | 100 | 98 | 98 | 95 | 99 | 97 | 98 | 90 | 90 | 0 | 100 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 98 | 95 | 95 | 96 | 97 | 95 | 95 | 97 | 84 | 90 | 0 | 100 |

Tab. 7. Działanie ekstraktów otrzymanych z suchej masy części nadziemnej roślin kapustowatych i barszczu Sosnowskiego na larwy inwazyjne mątwika ziemniaczanego, 2 powtórzenia (ekstrakty otrzymane z użyciem aparatu Soxhleta) [% żywych larw]

| godziny | Ekstrakty z suchej masy części nadziemnej | | | | | | | | Ekstrakt z suchej masy ogonków liściowych | | Kontrola pozytywna | Kontrola negatywna |
|---------|---|------|----------|-----|---------|-----|--------|-----|---|-----|-----------------------|--------------------|
| | Bardena | | Concerta | | Colonel | | Romesa | | Barszcz | | Sinigryna +mirozynaza | woda |
| 0 | 100* | 100* | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 |
| 24 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 |
| 48 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 |

*- wyniki w kolumnach stanowią powtórzenia

4. STWIERDZENIA I WNIOSKI

1. Wykazano potencjał cytotoksyczny mieszaniny kontrolnej enzym-substrat (mirozynaza z sinigryną), jak również badanych ekstraktów na *P. betae* w stadium zoospor. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że zastosowanie ekstraktów gorczyicy białej i rzodkwi oleistej może wpłynąć na zmniejszenie zasiedlenia korzeni buraka cukrowego przez *Polymyxa betae*, jednak wskazana jest dalsza weryfikacja w toku kolejnych powtórzeń. Ocena zasiedlenia korzeni roślin przez wektora BNYVV w późniejszym etapie od momentu traktowania, jak również bardziej precyzyjna ilościowa weryfikacja zakresu tworzenia form przetrwalnych/śmierci indukowanej ekstraktami może pozwolić na wybranie najbardziej skutecznej postaci oraz dawki ekstraktu do dalszych zastosowań.
2. Ekstrakt ze świeżej i z suchej masy części nadziemnej rzodkwi oleistej odmiany Romesa odznaczał się właściwościami grzybostatycznymi w stosunku do *C. beticola*. Stwierdzono działanie hamujące rozwój *A. cochliformis*, *C. beticola* i *R. solani* po zastosowaniu roztworów zawierających Miedzian 50WP lub Siarkol Extra 80WP.
3. Zarejestrowane działanie antymatulkowe ekstraktów ze świeżej masy części nadziemnych roślin z rodziny kapustowatych motywuje do skupienia większej uwagi na efekcie biobójczym wyciągów roślinnych na larwy inwazyjne nicieni w glebie, niż na mechanizmie stymulującym wylęg larw z cyst. Stanowi ono poza tym dobrą merytoryczną podstawę do dalszych prac badawczych poszerzających zakres wiedzy w danej tematyce prowadzącej do przyjaznych dla środowiska zastosowań z zakresu ochrony roślin w produkcji ziemniaka.
4. Uzyskane w 2016 roku wyniki badań autorów projektu 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, bakterii chorobotwórczych i nicieni groźnych dla buraka cukrowego i ziemniaka. Konieczne jest jednak potwierdzenie uzyskanych, pozytywnych i negatywnych wyników badań w kolejnym roku, umożliwiającym powtórzenie serii doświadczeń i opracowanie zalecanych dla rolników skutecznych stężeń roztworów, a także przygotowanie do wdrożenia nowych metod ochrony roślin do praktyki rolniczej.
5. W trakcie kontynuacji i dalszych badań celowym byłoby przetestowanie działania różnych stężeń uzyskanych ekstraktów z roślin kapustowatych i selerowatych (baldaszkowatych) na badane już agrofagi, a także na *Cms* i inne nicienie występujące w uprawie roślin okopowych.

CYTOWANE PIŚMIENNICTWO

- Aranda P.S., LaJoie D., Jorcyk C.L. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33: 366-369.
- 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.
- Chitwood D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu. Rev. Phytopathol.*; 40: 221–249.
- Daub M., Westphal A. 2011. Integriertes Nematodenmanagement in Fruchtfolgesystemen mit Zuckerrüben. *Sugar Industry*; 9:41–50.
- 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.
- 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. 2004. Międzyplony ścierniskowe o działaniu antymatwikowym (20–24). Nawożenie (30–39). W: *Ekologiczna uprawa buraka cukrowego*. Red. J.Tyburski. Wyd. Krajowe Centrum Rolnictwa Ekologicznego Radom. ISBN 83-89060-69-8: 63 ss.
- 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.
- Pastuszevska 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.
- 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.
- 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.