



Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu

Tytuł zadania

**Metody ochrony przed szkodnikami i chorobami
w uprawach sadowniczych**

Kierownik zadania:

Dr hab. Jolanta Kowalska

Wykonawcy:

Dr hab. Jolanta Kowalska
Dr Dorota Remlein -Starosta
Renata Wojciechowska,
Lidia Łopatka

Współpraca:

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Zakład Fizjologii Roślin.

1. Wstęp i cel badań

Preparaty oparte na bazie mikroorganizmów mogą stanowić alternatywę i/lub uzupełnienie obecnie znanych metod ochrony sadowniczych upraw ekologicznych. Mając na uwadze niewielki, a w niektórych przypadkach zmniejszający się asortyment środków ochrony roślin, możliwość wykorzystania mikroorganizmów w ochronie jest obiecująca. Mechanizm działania mikroorganizmów pożytecznych wykorzystywanych w ochronie roślin i plonów przed patogenami polega na mykopasożytnictwie, antybiozie, konkurencji o substancje odżywcze i/lub o miejsce, zwiększeniu tolerancji roślin na stres poprzez wspomaganie wzrostu korzeni i rozwoju roślin, indukowaniu odporności oraz unieszkodliwianiu enzymów wytwarzanych przez patogeny. Preparaty biologiczne wykorzystujące najczęściej zjawisko antagonizmu pomiędzy patogenem a mikroorganizmem pożytecznym często są zaliczane do grupy stymulatorów wzrostu, dzięki czemu zgodnie z art. 5 ustawy o nawozach i nawożeniu z dnia 5 lipca 2007 roku mogą być wprowadzone do obrotu i stosowania w Polsce (Dz. U. Nr 147, poz. 1033) pod warunkiem ich rejestracji w przynajmniej jednym kraju należącym do EU.

W ochronie upraw sadowniczych, zarówno drzew jak i roślin jagodowych, mogą dobrze się sprawdzać preparaty biologiczne. Jeden z nich o nazwie handlowej Boni Protect forte zawiera w swoim składzie zarodniki grzybów drożdżoidalnych *Aureobasidium pullulans*. Grzyby te naniesione na powierzchnię roślin szybko ją zasiedlają i tym samym zabezpieczają przed infekcjami powodowanymi przez grzyby patogeniczne. Czynnikiem decydującym o skuteczności tych preparatów są warunki meteorologiczne oraz faza rozwojowa roślin. Jest to produkt o działaniu kontaktowym – stąd wymagane jest dokładne pokrycie całych roślin – w tym owoców. Po zabiegu należy zwrócić uwagę na opady deszczu – ulewny deszcz w ciągu 2 godzin od oprysku powoduje częściowe zmycie preparatu i konieczność powtórzenia zabiegu w dniu następnym.

Jako potencjalny zakres działania *A. pullulans* wymienia się moniliozę na wiśniach, parcha jabłoni, zarzę ogniwą kwiatów jabłoni, potencjalnie także szarą pleśń przechowywanych owocach malin i truskawki. Główny cel zastosowania Boni Protect to zabezpieczenie owoców przed patogenami – sprawcami chorób przechowalnianych.

Produkt, który jest naturalnym preparatem mikrobiologicznym nie ma okresu karencji i polecany jest przede wszystkim do ochrony owoców w ostatnim etapie ich wzrostu, nawet tuż przed zbiorami. *A. pullulans* znajduje się na liście Załącznika Rozporządzenia (KE) Nr 1107/2009, z zastrzeżeniem że jest to substancja aktywna o działaniu fungicydalnym i bakteriobójczym, będącą w trakcie rozważania przez Komisję Europejską.

Kolejnym produktem mikrobiologicznym będącym dostępnym w handlu i przeznaczonym do wszechstronnego stosowania są efektywne mikroorganizmy. Ma to być kompozycja mikroorganizmów stosowana do produkcji nawozów naturalnych, nawozów organicznych, środków poprawiających kondycję gleby, kompostów, są zalecane do zaszczepiania gleby w celu stworzenia korzystniejszego środowiska mikrobiologicznego do uprawy roślin. Poprzez zastosowanie EM można starać się odtworzyć strukturę gruzełkową gleby, udostępnić niedostępne dla roślin makro- i mikroelementy, przyspieszyć humifikacji masy organicznej znajdującej się w glebie, wzmocnić naturalną odporność roślin, wypierać patogeny i szkodniki, neutralizować skutki suszy i optymalizować stosunek węgla do azotu. Bardzo ważnym aspektem jest wiedza, że stosowanie EM nie powinno być „złotym środkiem”, należy szczególną uwagę skierować na właściwe praktyki gospodarowania glebą i zabiegi pielęgnacyjne, bowiem przede wszystkim Dobra Praktyka Rolna jest podstawą zapewniającą wysokie plony. Coraz częściej powtarzane są jednak opinie producentów rolnych (szczególnie amatorów) o pozytywnym wpływie efektywnych mikroorganizmów na uprawy. Po ich stosowaniu w warunkach sprzyjających oczekuje się zwiększenia kondycji zdrowotnej roślin, a przez to również zwiększenia plonów. Jednak efekty stosowania nie są jednoznaczne, a co ważniejsze powtarzalne.

W ramach realizacji celu głównego, jakim jest opracowanie metod ochrony przed szkodnikami i chorobami w uprawach sadowniczych, w niniejszym projekcie wykonana została ocena wykorzystania grzyba drożdżoidalnego *Aureobasidium pullulans* w ochronie truskawek stosowanego w trakcie sezonu wegetacyjnego i zabezpieczenie owoców przed objawami szarej pleśni *Botrytis cinerea*. Badania ukierunkowano na stosowanie produktu w czasie całej wegetacji i zabezpieczenie zawiązków owoców truskawki, gdyż stosowanie przed zbiorem owoców może być już nieefektywne (*A. pullulans* nie niszczy istniejącej infekcji).

W związku z podjęciem badań z zastosowaniem EM na plantacji truskawki i różnymi formami ich wprowadzania na uprawę w roku 2011, w roku bieżącym do niniejszych badań włączono także ten blok eksperymentów koncentrując się wokół preparatów mikrobiologicznych w uprawach sadowniczych.

2. Materiał i metody

1) OCENA WYKORZYSTANIA *A. PULLULANS* W UPRAWIE TRUSKAWEK

Plantację truskawki składającą się z odmiany „Honeoye” i „Senga-Sengana” założono w październiku 2010 roku na glebie brunatnej, będącej w IIIa klasie bonitacyjnej. Przedplonem były rośliny motylkowate, w latach ubiegłych gleba nawożona była jedynie kompostem. W dwóch sezonach poprzedzających doświadczenie na powierzchni nie wykonywano żadnych zabiegów chemicznymi środkami ochrony roślin. Rośliny sadzono w czarną włókninę. Mikroorganizm w postaci preparatu stosowano w trakcie 3 lub 6 zabiegów w sezonie produktem przygotowanym w dawce 0,6 g/1 litr wody. Wykorzystano produkt o nazwie handlowej Boni Protect forte, biotechnologiczny preparat wspomagający wzrost i rozwój roślin zawierający 5×10^9 kiełkujących komórek grzyba *A. pullulans* (szcep DSM14940 i DSM 14941). Rośliny kontrolne nie były traktowane żadnym produktem.

Doświadczenie prowadzono pod kątem obserwacji rozwoju roślin - w tym celu ścięto części zielone roślin w celu zważenia masy części świeżej i liczono rozłogi oraz oceniano zdrowotność roślin - występowanie szarej pleśni na owocach i plamistości na liściach (czerwonej i białej). Zbiór części zielonych przeprowadzono na losowo wybranych roślinach w obrębie każdego poletka, zbioru dokonano 16.08.12r. Zdolność do przechowywania owoców była kontrolowana przez okres 7 dni o zbiorze w warunkach chłodni (4°C). W każdym rzędzie rosło 30 krzaczków roślin, jedna kombinacja roślin obejmowała 60 krzaczków truskawki.

Schemat zabiegów:

1. Kombinacja 1 (poletko - rząd 1 i 2) wykonano wszystkie zabiegi (6),
2. Kombinacja 2 (poletko - rząd 3 i 4) wykonano 3 zabiegi,
3. Kombinacja 3 (poletko - rząd 5 i 6) - bez zabiegów, kontrola.

W tabeli zawarto wykonane zabiegi z *A. pullulans* stosowano 250 l wody/ha, 0,6 g produktu/ 1 l wody.

Kombinacja	data zabiegu nalistnego						
	10.05	13.05	14.05 powtórzony	17.05	20.05	24.05	30.05
1	x	x	x	x	x	x	x
2	x	x	x	x			
3 kontrola							

Z powodu wieczornych opadów w dn. 13.05, zabieg został powtórzony dnia następnego.

Temperatura powietrza podczas zabiegów z *A. pullulans*

daty zabiegów	temp. °C
10.05.	25
13.05	18
14.05	14
17.05	22
20.05	26
24.05	26
30.05	27

Z powodu wieczornych opadów w dn. 13.05, zabieg został powtórzony dnia następnego

2) OCENA WYKORZYSTANIA EFEKTYWNYCH MIKROORGANIZMÓW W UPRAWIE TRUSKAWEK

W roku 2011 założono powierzchnię doświadczalną w gospodarstwie ekologicznym w Słońsku, odmiana truskawki Honeoye, nasadzono 240 krzaczków. Badania wykonywano w systemie poletek. Zabiegi nalistne z EM wykonano zgodnie z poniższym schematem. Rośliny kontrolne nie były traktowane produktem. Obserwacje prowadzono pod kątem rozwoju roślin (w tym celu ścięto części zielone roślin i ustalono masę części świeżej oraz liczono rozłogi) oraz zdrowotności roślin - występowanie szarej pleśni na owocach i plamistości na liściach (czerwonej i białej). Notowano plonowanie roślin. Zbiór części zielonych przeprowadzono na wybranych 5. roślinach w obrębie każdego poletka.

Schemat zabiegów:

1. Kombinacja 1 (poletko - rząd 1 i 2) - EM Bio-World o koncentracji 5% (50 ml EM Bio-World/·1 l wody, zabiegi co 7 dni, wykonano 8 zabiegów

2. Kombinacja 2 (poletko - rząd 3 i 4) - EM Bio-World o koncentracji 5% (50 ml EM Bio-World/·1 l wody, zabiegi co 14 dni, wykonano 6 zabiegów
3. Kombinacja 3 (poletko - rząd 5 i 6) - EM Bio-World o koncentracji 10% (50 ml EM Bio-World/·0,5 l wody, zabiegi co 14 dni, wykonano 6 zabiegów
4. Kombinacja 4 (poletko - rząd 7 i 2) kontrola, 8 zabiegów wodą

Badania nad reakcjami obronnymi roślin

Dodatkowym, włączonym elementem badań, są prace prowadzone przez Panią dr hab. Iwonę Morkunas wraz Zespołem z Zakładu Fizjologii Roślin UP w Poznaniu. Próbki liści truskawki pobrano 12.05.12r. (przed rozpoczęciem zabiegów z EM) i 22.08.12 (po zakończeniu zabiegów opryskiwania). Masę zieloną oraz liczbę rozłogów ścięto i liczono 22.08.12. Badania nad reakcjami obronnymi roślin po kontakcie z EM rozpoczęto w roku 2011. Po kontakcie roślinnych błon komórkowych z patogenem następuje wzrost ilości aktywnych form tlenu np. O_2^{2-} , H_2O_2 i w konsekwencji wybuch tlenowy, który działa cytotoksycznie na zakażone komórki roślinne. Prowadzi to do przeorganizowania cytoszkieletu i zwiększenia grubości ścian komórkowych. W rezultacie mamy do czynienia z tzw. systemiczną odpornością nabytą. Polega ona na aktywacji systemu obronnego w niezainfekowanych częściach rośliny. Wyzwalana jest dzięki produkcji białek związanych z patogenezą. Sygnałem do tej odpowiedzi jest kwas salicylowy. Wyróżnia się obecnie czternaście klas roślinnych białek biorących udział w tym procesie. Są to m.in. glukanazy, chitynazy, osmotyny, inhibitory proteaz, proteinazy, lizozymy, peroksydazy (m.in. β -glukozydaza), białka działające bakteriobójczo, uczestniczące w apoptozie. Ekspresja kodujących je genów zależy od obecności pochodzącego od patogena bodźca - elicytora, odbieranego przez specyficzne receptory, które za pośrednictwem kinaz przekazują sygnał do ich indukcji w rezultacie prowadzi to do: akumulacji fenoli, - wzrostu ilości flawonoidów, syntezy licznych białek oraz szeregu metabolitów wtórnych (fitoalaksyn), które mogą oddziaływać toksycznie na patogeny. Aby potwierdzić zakładaną hipotezę o wpływie EM na indukowanie odporności roślin truskawki przeprowadzane są analizy porównawcze dla β -glukozydazy i substancji fenolowych w roślinach traktowanych i nie traktowanych preparatem EM Bio-World. Aktualnie próbki roślin pobrane w roku 2012 są w trakcie analiz.

Badania zawartości chlorofilu roślin kontrolnych i traktowanych mikrobiologicznie

Barwniki fotosyntetyczne (asymilacyjne) to barwne związki chemiczne odgrywające kluczową rolę w procesie fotosyntezy i nadające barwę liściom. Wyróżnia się trzy grupy barwników: chlorofile, karotenoidy i fikobiliny. U roślin wyższych stosunek ilościowy chlorofilu *a* do *b* wynosi około 3:1. Skład oraz zawartość barwników zmienia się wraz z rozwojem rośliny oraz zależy od natężenia i widma światła oraz dostępności składników mineralnych. Zawartość i odpowiednie proporcje obu chlorofili stanowią wskaźnik kondycji roślin i właściwej dostępności składników mineralnych, dlatego analiza ilościowa i jakościowa chlorofili w roślinach traktowanych preparatami EM może być indykatorem oddziaływania mikroorganizmów EM na pobieranie i dostępność składników pokarmowych dla roślin. Chlorofil oznaczano metodą Amona (1946). W roku 2012 w celu wykonania oceny zawartości chlorofilu pobrano dwukrotnie próbki liści truskawek (04.07.12r. oraz 22.08.12r.) .

3. Uzyskane wyniki

a. OCENA WYKORZYSTANIA *A. PULLULANS* W UPRAWIE TRUSKAWEK

Plonowanie roślin traktowanych *A. pullulans*

Kombinacja	Plon truskawek [g]				Suma [g]
	zbiór 1	zbiór 2	zbór 3	zbór 4	
1 – 6 zabiegów	750	1200	4000	3800	9750
2 – 3 zabiegi	500	800	3800	2700	7800
3 - kontrola	150	300	500	500	1450
suma	1 400	2300	8300	7000	19000

Najwyższy plon (9,75 kg) zebrano z kombinacji, gdzie wprowadzono 6 razy *A. pullulans* . Niższy plon (7,8 kg) uzyskano w kombinacji o zredukowanej liczbie zabiegów, natomiast najniższy plon (redukcja plonu w porównaniu do kombinacji nr 1 o 85%) zebrano z roślin kontrolnych. Reasumując plonowanie roślin było generalnie wysokie.

Liczba truskawek wykazujących objawy szarej pleśni po przechowywaniu w pojemniku przez 7 dni w warunkach chłodni.

Kombinacja	Liczba truskawek wykazujących objawy szarej pleśni			
	zbiór 1	zbiór 2	zbiór 3	zbiór 4
1	5	16	32	38
2	5	21	38	42
3	4	30	36	39

Nie stwierdzono istotnych różnic w zdolności do ograniczania objawów szarej pleśni na przechowywanych owocach zebranych w różnych terminach z różnych kombinacji.

b. OCENA WYKORZYSTANIA EFEKTYWNYCH MIKROORGANIZMÓW W UPRAWIE TRUSKAWEK

Wpływ zabiegów z EM Bio-World na rozwój roślin w **2011r.**

Wariant	Średnia liczba rozlogów [szt.]	Średnia masa zielona [g]
I -zanurzanie korzeni+ 15 nalistnych	6,0*	44,0*
II -zanurzanie korzeni + 8 nalistnych	6,1*	54,47*
III - 8 zabiegów nalistnych	5,6*	53,33*
kontrola	4,5	26,47

Obserwacja 20.08.11, * statystycznie istotnie różne od pozostałych danych w obrębie kolumny, test t-Studenta, $p < 0,05$

Wpływ zabiegów z EM Bio-World na rozwój roślin w **2012r.**

Kombinacja	Średnia liczba rozlogów [szt.]	Średnia masa zielona [g]
1 – 5% EM co 7 dni	2,78	36,78
2 – 5% EM co 14 dni	2,79	70,96*
3 – 10% EM co 14 dni	2,25	29,42
4 - kontrola	2,12	47,76

* statystycznie istotnie różne od pozostałych danych w obrębie kolumny, test t-Studenta, $p < 0,05$

Zdecydowanie najwyższą świeżą masę zieloną zebrano z kombinacji nr 2, gdzie wykonano 6 zabiegów nalistnych w odstępie 14. dniowym z koncentracją 5 % EM. Zwiększenie koncentracji preparatu EM Bio-World do 10% nie spowodowało polepszenia parametrów wzrostu roślin. Podobną tendencję zanotowano w przypadku

liczby rozlogów. Stosowanie zabiegu 5%, ale z większą częstotliwością zabiegów nie wpłynęło na polepszenie rozwoju roślin. Taki efekt zanotowano też w sezonie 2011r., gdzie zwiększenie dawki lub liczby zabiegów (do 15) nie przyniosło spodziewanych efektów.

Plony owoców truskawki traktowanej EM Bio-World w **2012r.**

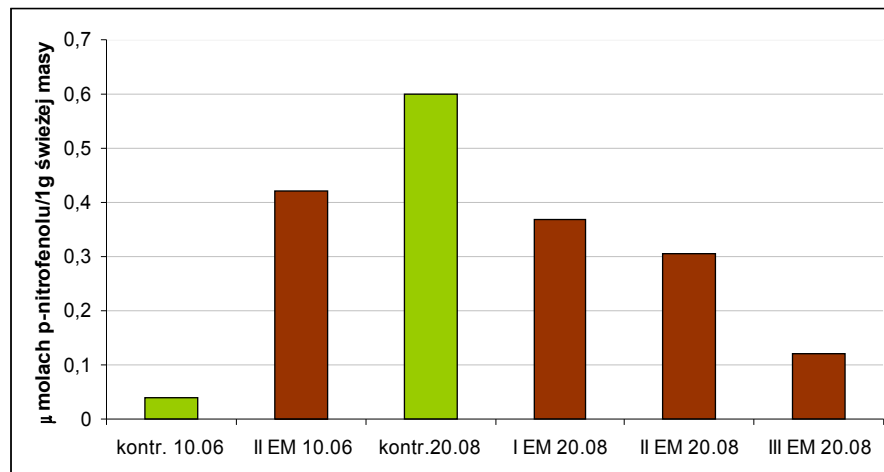
Kombinacja	Zbiór 1 31.05	Zbiór 2 2.06	Zbiór 3 5.06	Zbiór 4 10.06	Zbiór 5 14.06	suma
1 – 5% co 7 dni	1100	1000	1300	1900	1300	6600
2 – 5% co 14 dni	1500	1000	1400	1900	1800	7600
3 – 10% co 14 dni	1000	700	900	1800	1500	5900
4 - kontrola	1400	900	800	1700	1400	6200

* statystycznie istotnie różne od pozostałych danych w obrębie kolumny, test t-Studenta, $p < 0,05$

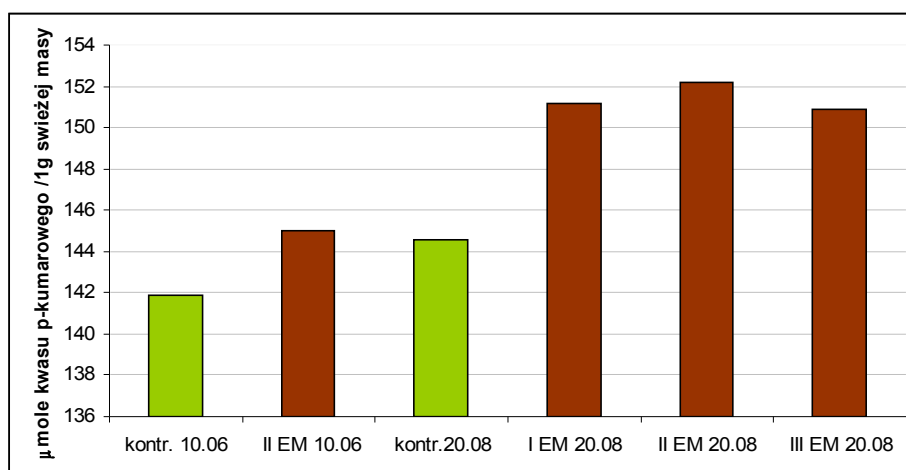
Zdecydowanie najwyższy plon zebrano z kombinacji 2, zwiększenie koncentracji preparatu EM do 10% nie spowodowało wpływu na plonowanie roślin.

Reakcje obronne roślin po EM Bio-World

Sezon 2011r.



Rys. 1. β- glikozydaza w liściach truskawki traktowanych EM Bio-World w zależności od terminu poboru próbek i wariantu doświadczenia - badania w 2011



Rys. 2. Fenole w liściach truskawki traktowanych EM Bio-World w zależności od terminu poboru próbek i wariantu doświadczenia - badania w 2011

β- glikozydaza jest enzymem odpowiedzialnym za rozpad cukrów do wolnych aglikonów. Substancje te są prekursorami izoflawonoidów. Izoflawonoidy są to aromatyczne (pierścieniowe) związki polifenolowe, które mają działanie bakteriobójcze i grzybobójcze. W komórkach roślinnych zarówno aktywność peroksydaz (w tym β – glikozydazy), jak i wzrastający poziom flawonoidów (związków fenolowych) jest jednym z fizjologicznych odpowiedzi obronnych przed atakiem przez patogeny. Po dwukrotnym zastosowaniu 06. 2011r. produktu EM Bio-World, widać wyraźny wzrost aktywności β – glikozydazy. Jednocześnie wzrasta ilość substancji fenolowych. Może to wskazywać na aktywację procesów obronnych rośliny po zastosowaniu EM. Po wielokrotnych zabiegach EM, pod koniec sezonu wegetacyjnego, aktywność β –glikozydazy maleje, jednocześnie odnotowano podwyższenie zawartości fenoli w komórkach liści truskawki, bez względu na częstotliwość zabiegów (15 lub 8 zabiegów). Nagromadzenie tych substancji o działaniu bakterio i grzybobójczym może oddziaływać pozytywnie na zdrowotność plantacji traktowanych EM.

Sezon 2012r.

Zebrane próbki znajdują się w laboratorium Zakładu Fizjologii Roślin UP w Poznaniu i są w trakcie analizy. Pełna informacja zostanie przekazana podczas spotkania wykonawców projektu w Radomiu 2013r.

Zawartość chlorofilu w liściach truskawki

Sezon 2011

Zawartość chlorofilu w zależności od terminu pobrania próbek oraz częstotliwości stosowania EM Bio-World w sezonie 2011

Kombinacja /roślina	chlorofil a [g/g świeżej masy]	chlorofil b [g/g świeżej masy]	chlorofil a + b [g/g świeżej masy]
Truskawki z 30.04.2011 (start)	1114,485	347,078	1464,067
Truskawki - kontrola 20.08.11 (zakończenie)	1312,470	414,482	1729,926
Wariant I EM	1106,825	355,372	1464,731
Wariant II EM	1224,190	431,609	1658,774
Wariant III EM	1630,980	541,625	2176,420

Nie stwierdzono znacznego wpływu zabiegów z EM na zawartość chlorofilu a+b.

Sezon 2012

Zawartość chlorofilu w zależności od terminu pobrania próbek oraz częstotliwości stosowania EM Bio-World w sezonie 2012

Kombinacja /roślina	chlorofil a [g/g świeżej masy]	chlorofil b [g/g świeżej masy]	chlorofil a + b [g/g świeżej masy]
Truskawki 4.07.2012 (start)			
1 – 5% co 7 dni	1323	420,5	1749,5
2 – 5% co 14 dni	1186	377,5	1563,5
3 – 10% co 14 dni	1279	394	1673
4 - kontrola	1099	339	1438
Truskawki - 4.07.2012 (zakończenie)			
1 – 5% co 7 dni	975,5	306	1281,5
2 – 5% co 14 dni	890,5	308,5	1199
3 – 10% co 14 dni	1061,5	344	1405,5
4 - kontrola	1102	383,5	1485,5

4. Wnioski

1. Najwyższy plon truskawki zebrano z kombinacji 1, gdzie wprowadzono 6 razy *A. pullulans* w dawce 0,6 g produktu handlowego/1 l wody. Niższy plon o 20 % (7,8 kg) w porównaniu do kombinacji 1. uzyskano w kombinacji 2, gdzie wykonano jedynie 3 zabiegi nalistne w tej samej dawce. Najniższy plon (redukcja plonu w porównaniu do kombinacji nr 1 o 85%) zebrano z roślin kontrolnych.
2. Nie stwierdzono istotnych różnic w zdolności do ograniczania objawów szarej pleśni na przechowywanych owocach zebranych w różnych terminach z różnych

kombinacji z *A. pullulans*. Plamistości liści truskawki nie obserwowano we wszystkich kombinacjach.

3. Zdecydowanie najwyższą świeżą masę zieloną zebrano z roślin traktowanych 5% EM podczas 6 zabiegów nalistnych w odstępie 14. dniowym. Zwiększenie koncentracji preparatu EM do 10% nie spowodowało polepszenia parametrów wzrostu roślin. Podobną tendencję zanotowano w przypadku liczby rozłogów. Stosowanie zabiegu 5%, ale z większą częstotliwością zabiegów nie wpłynęło na polepszenie rozwoju roślin. Ten sam efekt obserwowano w sezonie 2011, gdzie zwiększenie dawki lub liczby zabiegów nie przyniosło spodziewanych efektów.
4. Zdecydowanie najwyższy plon zebrano z roślin traktowanych 5% EM podczas 6 zabiegów nalistnych w odstępie 14. dniowym. Zwiększenie koncentracji preparatu EM do 10% nie spowodowało wpływu na plonowanie roślin.
5. Po wielokrotnych zabiegach EM, pod koniec sezonu wegetacyjnego, aktywność β -glikozydazy maleje, jednocześnie zwiększa się zawartość fenoli w komórkach liści truskawki, bez względu na częstotliwość zabiegów.
6. Nie stwierdzono wpływu zabiegów z EM na zawartość chlorofilu a+b.

Sprawozdanie z etapu badań zrealizowanego w roku 2012 znajduje się na stronie internetowej www.ior.poznan.pl

Autorzy dziękują Pani dr hab. Iwonie Morkunas oraz Zespołowi Zespołu Zakładu Fizjologii Roślin UP w Poznaniu, który zaangażowany jest w niniejsze badania.

W przypadku pytań: J.Kowalska@iorpib.poznan.pl, tel. 61-864-90-77

Sporządziła: dr hab. Jolanta Kowalska, Zakład Metod Biologicznych, IOR-PIB w Poznaniu