SPRAWOZDANIE

z badań podstawowych prowadzonych w 2024 roku na rzecz rolnictwa ekologicznego

ZADANIE	**3. Uprawy polowe metodami ekologicznymi:** **7) badania w zakresie identyfikacji metod ochrony, dopuszczonych w rolnictwie ekologicznym, przed chorobami grzybowymi i szkodnikami w uprawie roślin rolniczych oraz opracowanie przewodnika wraz z wytycznymi w tym zakresie.**
TYTUŁ PODZADANIA	**Innowacyjne badania w zakresie identyfikacji metod ochrony pszenicy przed chorobami grzybowymi, dopuszczonych w rolnictwie ekologicznym z wykorzystaniem substancji podstawowych, wspomaganych ozonowaniem materiału siewnego**
ZESPÓŁ BADAWCZY	**Kierownik projektu** Prof. dr hab. Bożena Łozowicka **Zespół badawczy** Dr hab. Piotr Kaczyński, prof. IOR-PIB Dr Piotr Iwaniuk Dr Izabela Hrynko Mgr inż. Rafał Konecki

Źródło finansowania badań: Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi na podstawie decyzji MRiRW z dnia 04.04.2024 r., DEJ.re.765.20.2024

Pieczęć i podpis wnioskodawcy

1. Wstęp i przesłanki podjęcia badań

Istnieje ciągła konieczność wzrostu efektywności ochrony upraw ekologicznych, w tym pszenicy, ze względu na niedoskonałość obecnie stosowanych rozwiązań. Wzrost świadomości społecznej dotyczący zdrowego stylu życia oraz konsumpcji produktów ekologicznych, wolnych od pozostałości środków ochrony roślin, nawozów sztucznych i mykotoksyn, będących konsekwencją występowania chorób grzybowych, sprzyja wzrostowi areału upraw w systemie ekologicznym.

Polska ma ogromny potencjał do rozwoju sektora rolnictwa ekologicznego, a uprawa pszenicy w systemie ekologicznym jest odpowiedzią na przyjętą przez Komisję Europejską strategię „Europejski Zielony Ład", która determinuje kraje członkowskie m.in. do zwiększenia udziału upraw prowadzonych w systemie ekologicznym (25% do 2030 r.). **Problemem jest jednak brak odpowiednich metodyk ochrony roślin w systemie ekologicznym ograniczających rozwój chorób grzybowych i mykotoksyn oraz uwzględniających jakość plonu, na którą coraz częściej zwracają uwagę świadomi konsumenci.**

Na wielkość plonu oraz parametry jakościowe i żywieniowe ziarna pszenicy wpływ ma występowanie chorób grzybowych. *Septoria tritici* powoduje septoriozę liści, *Tapesia yallundae* jest odpowiedzialna za plamistość oczkową, a *Rhizoctonia cerealis* powoduje ostrą plamistość oczkową (Fones i Gurr, 2015). Grzyby należące do rodzaju *Fusarium* są powszechnymi mikroorganizmami infekującymi zboża. W Polsce najczęściej występują *F. culmorum, F. graminearum, F. avenaceum, F. poae* i *F. oxysporum* (Iwaniuk i wsp. 2018). Do chorób wywoływanych przez te gatunki w uprawie pszenicy zalicza się zgorzel siewek, zgniliznę korzeni oraz fuzariozę kłosów, która ma duże znaczenie w rolnictwie i może powodować **straty plonu sięgające 30%**.

Obecność grzybów patogenicznych w uprawie pszenicy skutkuje występowaniem w ziarnie związków antyżywieniowych, do których należą min. **mykotoksyny**. **Mykotoksyny** stanowią ogromny problem w uprawach zbóż, wpływając na obniżenie wielkości plonu i jego parametrów jakościowych (Łozowicka i wsp. 2022). Są one produktami ubocznymi metabolizmu białek i lipidów takich grzybów pleśniowych jak *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* i *Rhizoctonia* (Zain, 2011) i oprócz występowania bezpośrednio w ziarnie przeznaczonym do zbioru, mogą być

wydzielane także podczas przechowywania zebranego zboża w nieodpowiednich warunkach. Mykotoksyny są bardzo szkodliwe dla zdrowia ludzi i zwierząt, powodują m.in. zatrucia pokarmowe, zaburzenia hormonalne oraz wykazują działanie rakotwórcze (Antonissen i wsp. 2014). W ziarnie pszenicy najczęściej odnotowuje się obecność deoksyniwalenolu (DON) i jego pochodnych (3-AcDON, 15-AcDON), niwalenolu (NIV) i zearalenonu (ZEN) (Nugmanov i wsp. 2018; Łozowicka i wsp. 2014).

Wykorzystanie ekologicznych metod ochrony roślin jest niezwykle istotne w przypadku pszenicy, stanowiącej jedną z podstawowych roślin uprawnych wykorzystywanych do celów konsumpcyjnych, paszowych i przemysłowych. Pszenica jest bogata w związki żywieniowe: aminokwasy, białko, węglowodany (w tym skrobię), błonnik, a także fosfor, cynk, krzem, fluor, wapń, potas i witaminy z grupy B), **które są wyznacznikiem jakości plonu** (Rodehutscord i wsp. 2016; Iwaniuk i wsp. 2021). Według OECD/FAO (OECD, 2019) szacowany wzrost spożycia pszenicy będzie postępował ze względu na rosnącą populację ludzką.

Jakość żywieniowa pszenicy, jak wspomniano, zależy od **zawartości białka i równowagi składu aminokwasowego** w ziarnie. Szczególnie istotna dla ludzi i zwierząt jest zawartość aminokwasów egzogennych, które organizm musi pozyskać wraz z pożywieniem (Łozowicka i wsp. 2021a; Siddiqi i wsp. 2020). Jednak zawartość aminokwasów w ziarnie jest zmienna i może zależeć od odmiany pszenicy, warunków środowiskowych oraz sposobu prowadzonej ochrony upraw (Iwaniuk i wsp. 2022; Hu i wsp. 2022). Nasze własne **badania naukowe (przeprowadzone w Instytucie Ochrony Roślin – PIB TSD w Białymstoku)** wykazały, że środki ochrony roślin mogą powodować obniżenie zawartości aminokwasów w ziarnie pszenicy, natomiast redukcja o połowę dawek fungicydów z grupy spiroketalamin i triazoli skutkuje porównywalnym stężeniem aminokwasów egzogennych i endogennych w odniesieniu do zastosowania dawki rekomendowanej w etykiecie środka ochrony roślin (Iwaniuk i wsp. 2022)**.**

Ponadto, obserwowany jest wzrost zainteresowania badaniami komercyjnymi ekologicznego ziarna zbóż w kierunku obecności mykotoksyn, zlecanymi przez producentów żywności ekologicznej, przeznaczonej na eksport. Na przykład w badanej próbce pszenicy ekologicznej stwierdzono obecność 4 mykotoksyn: 3-AcDON (25,37 μg/g), 15-AcDON (48,83 μg/g), DON (89,20 μg/g) i

NIV (367,71 µg/g). Sumaryczne stężenie mykotoksyn wyniosło 531,11 µg/g, co stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia.

W przypadku rolnictwa konwencjonalnego dostępne fungicydy redukują występowanie chorób grzybowych w uprawie pszenicy, a tym samym stężenie mykotoksyn. Jednak brak jest zaawansowanych badań określających wpływ metod ochrony roślin dopuszczonych do stosowania w rolnictwie ekologicznym zarówno na ograniczenie występowania chorób grzybowych, wielkość i jakość plonu oraz redukcję stężenia mykotoksyn w ekologicznej uprawie pszenicy. Niesie to z sobą ryzyko zmniejszenia wielkości i pogorszenia jakości plonów w przypadku braku alternatywnych metod ochrony wykorzystywanych na szerszą skalę.

W Polsce dopuszczonych **jest 170 środków ochrony roślin** do stosowania w uprawach ekologicznych, w tym 65 preparatów o działaniu fungicydowym, głównie pochodzenia mineralnego (siarka, miedź oraz fosfor), rzadziej biologicznych, wykorzystujących poszczególne szczepy grzybów pasożytniczych lub bakterii (np. 21 środków na bazie mikroorganizmów) oraz dwa środki na bazie związków naturalnych – olejku pomarańczowego bądź mieszaniny eufenolu, geraniolu i tymolu (dane MRiRW, 2023). **Tak niewielkie zróżnicowanie substancji czynnych może wpływać negatywnie na zanieczyszczenie gleb miedzią, siarką i fosforem oraz prowadzić do uodpornienia się patogenów.**

Substancje podstawowe to kolejna grupa związków stosowanych w rolnictwie ekologicznym. Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji Europejskiej 2017/1432 są to związki, które 1) nie są substancjami potencjalnie niebezpiecznymi, 2) nie mają nieodłącznej zdolności do oddziaływania na układ endokrynny, działania neurotoksycznego lub immunotoksycznego, 3) nie są stosowane głównie do celów ochrony roślin, ale mimo to są przydatne w ochronie roślin, bezpośrednio lub w środku składającym się z substancji podstawowej i prostego rozpuszczalnika, 4) nie są wprowadzane do obrotu jako środek ochrony roślin.

W Polsce dopuszczonych do stosowania w uprawach ekologicznych jest 24 substancji podstawowych, do których należy m.in. **ocet winny, chlorowodorek chitozanu i nasiona gorczycy w proszku**.

Ocet winny. Przegląd literatury naukowej wskazuje, że zastosowanie octu winnego ogranicza rozwój grzybów patogenicznych z rodzaju *Pythium, Rhizoctonia,*

Penicillium, Sclerotium, Fusarium i *Phytophthora* (Chalermsan i Peerapan, 2009). Zhu i wsp. (2021) stwierdzili, że ocet winny zastosowany w uprawie polowej przyczynia się do wzrostu masy zielonej **rzepaku**, jego plonu oraz parametrów jakościowych, takich jak kwasy tłuszczowe i białko. Natomiast zastosowanie octu w uprawie **ryżu** zwiększa jego plon (Simma i wsp. 2017). Mungkunkamchao i wsp. (2013) wykazali, że zastosowanie octu w uprawie **pomidora** zwiększa masę zieloną roślin oraz masę i liczbę owoców.

Chlorowodorek chitozanu. Ponadto, stwierdzono, że chitozan powodował wzrost plonu **pszenicy** z hektara o 13,6% i miał pozytywny wpływ na krzewienie, ilość kłosów i masę 1000 ziaren (Zeng i Luo, 2012). Guan i wsp. (2009) wykazali, że zastosowanie chitozanu w uprawie **kukurydzy** w warunkach niskiej temperatury zwiększa wskaźnik kiełkowania oraz skraca średni czas kiełkowania. Podobne pozytywne wyniki uzyskano w badaniu w **jęczmieniu** (*Hordeum vulgare*) w warunkach półpustynnych. Zaobserwowano istotną poprawę plonu ziarna, liczby kłosów i ilości ziaren w kłosie, a także masy 1000 ziaren (Al-Tawaha i Al-Ghzawi, 2013).

Nasiona gorczycy w proszku. Ma i wsp. (2015) stwierdzili także, że nasiona gorczycy w proszku ograniczają rozwój grzybów z rodzaju *Fusarium* w uprawie **papryczek chili**, a także grzybów patogenicznych *Sclerotinia sclerotiorum* i *Rhizoctonia solani* w uprawie **grochu włoskiego** (Sarhan i wsp. 2020). Ponadto, rośliny **łubinu**, na które aplikowane były nasiona gorczycy w proszku charakteryzowały się mniejszymi objawami więdnięcia liści charakterystycznymi dla grzybów rodzaju *Fusarium* (Shaban i wsp. 2011). Abdallah i wsp. (2020) wykazali, że nasiona gorczycy w proszku zastosowane w uprawie **fasoli zwyczajnej** ograniczają wzrost grzyba patogenicznego *R. solani*.

Jednak pomimo korzystnego oddziaływania powyższych substancji podstawowych na niektóre uprawy, brak jest kompleksowych badań dotyczących ich wpływu na ograniczenie występowania chorób grzybowych, wielkość i jakość plonu oraz redukcję stężenia mykotoksyn w ekologicznej uprawie pszenicy.

Przywołane substancje podstawowe w Polsce były badane przede wszystkim jako zaprawy nasienne. Badania te wykazały, że nasiona gorczycy w proszku i ocet stosowane jako zaprawa nasion, zwiększają masę roślin pszenicy, siłę

kiełkowania, zmniejszają rozwój zgorzeli podstawy źdźbła oraz redukują objawy septoriozy plew i mączniaka rzekomego (Kowalska i wsp. 2019, nr PJ. re. 027.7.2019). Natomiast zastosowanie do zaprawiania nasion pszenicy i rzepaku mikroorganizmów (grzybów *Pythium oligandrum*, *Beauveria bassiana* i *Trichoderma* spp. oraz bakterii z rodzaju *Bacillus*) skutkowało zwiększeniem plonu, energii i zdolności kiełkowania oraz zmniejszeniem występowania łamliwości podstawy źdźbła i septoriozy paskowanej liści (Kowalska i wsp. 2022, nr DEJ.re 027.4.2022; Kowalska i wsp. 2023, nr DEJ.re 027.4.2023). **Badania te nie obejmowały jednak aplikacji nalistnej substancji podstawowych w ograniczeniu chorób grzybowych oraz ich wpływu na wielkość i jakość plonu pszenicy oraz występowanie toksycznych mykotoksyn.**

Innowacyjnym rozwiązaniem, które może wpłynąć korzystnie na parametry jakościowe i żywieniowe plonu oraz ograniczenie stężenia mykotoksyn i redukcję porażenia roślin przez choroby grzybowe, jest zastosowanie technologii **ozonowania materiału siewnego**. Ozonowanie polega na zastosowaniu trzyatomowej cząsteczki tlenu, która charakteryzuje się właściwościami bójczymi względem mikroorganizmów. Ozon powstaje naturalnie w atmosferze ziemskiej, ale może być także produkowany przez generatory ozonu. Badania przeprowadzone w roślinach słonecznika wskazują, że ozonowanie nasion redukuje porażenie roślin przez grzyby rodzaju *Alternaria, Fusarium, Aspergillus* i *Penicillium* (Rodrigues i wsp. 2015). Ponadto, wykazano, że ozonowanie może zwiększać siłę i energię kiełkowania nasion pszenicy ozimej (Picchi i wsp. 2017). Badania przeprowadzone przez Vazquez-Ybarra i wsp. (2015) udowodniły, że ozonowanie nasion sałaty siewnej i pomidora zwyczajnego powoduje wzrost biomasy pędów i korzeni. Stwierdzono także, że ozonowanie nasion sałaty skutkuje lepszym wzrostem roślin i większą liczbą liści (Peng i wsp. 2018).

2. Cel podjęcia badań naukowych

Zgodnie z zasadą ograniczenia użycia syntetycznych środków ochrony roślin i rosnącej świadomości konsumentów, rozwój metod ochrony upraw opartych na naturalnych związkach pozwala wyjść naprzeciw oczekiwaniom rolnictwa ekologicznego.

W związku z tym, **celem niniejszego projektu była identyfikacja i opracowanie metod ochrony pszenicy, dopuszczonych do stosowania w rolnictwie ekologicznym (bazujących na occie winnym, chlorowodorku chitozanu i nasionach gorczycy w proszku), stosowanych oddzielnie, łącznie oraz w kombinacji z ozonowaniem materiału siewnego,** w zwalczaniu chorób grzybowych, poprawie parametrów jakościowych i żywieniowych plonu oraz redukcji poziomu mykotoksyn w ziarnie.

Ponadto, **celem praktycznym projektu było upowszechnienie wyników badań w formie przewodnika wraz z wytycznymi, dedykowanego ekologicznym producentom rolnym**

2.1. Hipotezy badawcze:

1.1.1. Metody ochrony fungicydowej na bazie octu winnego, chlorowodorku chitozanu i nasion gorczycy w proszku, stosowane oddzielnie i łącznie wykazują skuteczność w ograniczaniu rozwoju chorób grzybowych w uprawie ekologicznej pszenicy.

1.1.2. Metody ochrony fungicydowej nie będą wykazywać objawów fitotoksyczności względem roślin pszenicy.

1.1.3. Metody ochrony fungicydowej poprawią parametry jakościowe i żywieniowe plonu pszenicy.

1.1.4. Metody ochrony fungicydowej zredukują skażenie ziarna pszenicy tokycznymi mykotoksynami.

1.1.5. Zastosowanie łączne kombinacji metod ochrony fungicydowej wykazuje większą skuteczność w ograniczaniu rozwoju chorób grzybowych, poprawie parametrów jakościowych i żywieniowych plonu oraz redukcji zawartości mykotoksyn w ziarnie pszenicy w porównaniu do ich oddzielnego zastosowania.

1.1.6. Ozonowany materiał siewny zwiększy skuteczność metod ochrony fungicydowej w ograniczaniu rozwoju chorób grzybowych, poprawie parametrów jakościowych i żywieniowych plonu oraz redukcji stężenia mykotoksyn w ziarnie pszenicy.

3. Metodyka badań:

3.1. Materiał badawczy

I. Substancje podstawowe zarejestrowane w ekologicznej uprawie pszenicy: ocet winny, chlorowodorek chitozanu i nasiona gorczycy w proszku
II. Szczep grzyba patogenicznego, wywołującego fuzariozę kłosów (*Fusarium culmorum*)
III. Ozonowany oraz nieozonowany, kwalifikowany materiał siewny pszenicy jarej odmiany Harenda, zalecany na rok 2024 do upraw ekologicznych w woj. podlaskim przez Stację Doświadczalną Oceny Odmian w Krzyżewie (woj. podlaskie)

3.2. Badania fizykochemiczne gleby

Badania fizykochemiczne gleby, uwzględniające skład granulometryczny, odczyn, zawartość mikro i makroelementów zostały zlecone do wykonania przez Stację Chemiczno-Rolniczą.

3.2. Ozonowanie materiału siewnego

Warstwa materiału siewnego pszenicy o grubości 1 cm została umieszczona w płaskich naczyniach, w szczelnie zamkniętym pomieszczeniu. Następnie, ozon został wyemitowany w dawce 20 g ozonu na godzinę, przy użyciu kwarcowego generatora ozonu (TE-03/2-20g/V4.3/MN1).

3.3. Przygotowanie cieczy roboczych

Roztwór octu winnego przygotowano przez wymieszanie stężonego octu winnego (6%) z wodą w celu uzyskania 2% roztworu.

Do odważonych nasion gorczycy w proszku dodano wodę w temp. 35 °C w stosunku 1:2. Uzyskany macerat odstawiono na 2 godz., a następnie przesączono przez sączek. Do uzyskanego przesączu dodano wodę w stosunku 1:2. Przygotowany roztwór stanowił ciecz roboczą bezpośrednio do oprysku.

Roztwór chlorowodorku chitozanu uzyskano poprzez wymieszanie odważonego chlorowodorku chitozanu z wodą w celu uzyskania 1,3% roztworu.

3.3. Doświadczenie wazonowe w fitotronowych warunkach kontrolowanych

I. **Materiał kwalifikowany** ozonowany oraz nieozonowany został wysiany zgodnie z normą wysiewu, w naczyniach wazonowych (15 x 15 cm), w czterech powtórzeniach, w obiektach fitotronowych, wyposażonych w technologie oświetlenia typu LED i system kontrolowania temperatury i wilgotności (Rys. 1).

II. Inokulacja zawiesiną zarodników grzyba *Fusarium culmorum* (OD_{600}= 0,8) została przeprowadzona za pomocą opryskiwacza plecakowego na sprężone powietrze z 2 rozpylaczami (XR Tee Jet 110 03 XR) w fazie BBCH 65 pszenicy (fuzarioza kłosów).

III. Zabiegi substancjami podstawowymi i ich kombinacjami zostały przeprowadzone za pomocą opryskiwacza plecakowego na sprężone powietrze z 2 rozpylaczami (XR Tee Jet 110 03 XR) w dwóch etapach: w fazie BBCH 30 pszenicy (ochrona przed naturalnie występującymi chorobami podstawy źdźbła i liści), BBCH 39, BBCH 59 oraz w fazie BBCH 69 pszenicy (ochrona przed fuzariozą kłosów).

Szczep grzyba patogenicznego *F. culmorum* przeznaczony do inokulacji został pozyskany z upraw pszenicy.

Rys. 1. Doświadczenie wazonowe w fitotronowych warunkach kontrolowanych.

3.4. Doświadczenie poletkowe i polowe produkcji wielkoskalowej

I. Materiał kwalifikowany ozonowany oraz nieozonowany został wysiany zgodnie z normą wysiewu na poletkach doświadczalnych o powierzchni 30 m^2, w czterech powtórzeniach, metodą bloków losowanych, na powierzchni rolniczej prowadzonej zgodnie z zasadami rolnictwa ekologicznego (**doświadczenie poletkowe**) (Rys. 2).

II. Ponadto, materiał siewny wysiano na pola produkcji ekologicznej wielkoskalowej (1900 m^2) (**doświadczenie polowe produkcji wielkoskalowej**) (Rys. 3).

III. Zabiegi substancjami podstawowymi i ich kombinacjami zostały przeprowadzone za pomocą opryskiwacza: w fazie BBCH 30 pszenicy (ochrona przed naturalnie występującymi chorobami podstawy źdźbła i liści), BBCH 39, BBCH 59 oraz w fazie BBCH 69 pszenicy (ochrona przed naturalnie występującą fuzariozą kłosów).

Rys. 2. Doświadczenie poletkowe.

Rys. 3. Doświadczenie polowe produkcji wielkoskalowej.

3.5. Ocena fitotoksyczności metod ochrony roślin i ich kombinacji zgodnie ze standardami EPPO (*ang*. European and Mediterranean Plant Protection Organization) (EPPO, 2014)

Ocena fitotoksyczności została przeprowadzona tydzień i dwa tygodnie po zabiegu substancjami podstawowymi i ich kombinacjami w fazie BBCH 30 i BBCH 69

doświadczenia wazonowego, poletkowego i polowego. Ocena obejmowała następujące parametry:

- Opóźnienie lub przyspieszenie w osiągnięciu faz rozwoju
- Zahamowanie lub stymulacja wzrostu
- Zmiany koloru, nekrozy, deformacje

Fitotoksyczność została oceniona wg skali:

- 0-10% niska fitotoksyczność
- 11-30% średnia fitotoksyczność
- 31-100% wysoka fitotoksyczność

3.6. Skuteczność metod ochrony roślin i ich kombinacji w ograniczaniu chorób grzybowych w doświadczeniu wazonowym, poletkowym i polowym

I. Skuteczność ochrony liści i podstawy źdźbła pszenicy została określona w fazie BBCH 39 oraz BBCH 75. W fazie BBCH 75 ocenie poddano dodatkowo kłosy.

II. Ocena stopnia porażenia chorobami grzybowymi została wykonana wizualnie poprzez zbiór reprezentatywnej ilości całych roślin z pojemników w doświadczeniu wazonowym (n= 10) oraz 20 roślin w doświadczeniu poletkowym i 100 w doświadczeniu polowym. Badano występowanie następujących chorób grzybowych: **łamliwość podstawy źdźbła, ostra plamistość oczkowa, septorioza liści i kłosów, brunatna plamistość liści, fuzarioza kłosów, mączniak prawdziwy, rdza żółta i brunatna**.

III. Wyniki zostały przedstawione w skali procentowej:

- 0-10% niska skuteczność
- 11-30% średnia skuteczność
- 31-100% wysoka skuteczność

IV. Dodatkowo, na zebranym materiale została przeprowadzona ocena dwóch cech morfologicznych (długość źdźbła i kłosa) pszenicy.

V. Ponadto, skuteczność ochrony kłosów pszenicy z doświadczenia wazonowego, poletkowego i polowego została zbadana metodami molekularnymi. DNA ze zhomogenizowanego ziarna pszenicy zostało wyizolowane komercyjnym zestawem (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy) w fazie BBCH 89. Reakcja real-time PCR względem sekwencji genu *EF1-alfa* grzybów patogenicznych z rodzaju *Fusarium* została przeprowadzona w termocyklerze Illumina Eco (Illumina, San Diego, USA) (Iwaniuk i wsp. 2018).

3.7. Określenie parametrów jakościowych i żywieniowych plonu pszenicy, uprawianej w doświadczeniu wazonowym, poletkowym i polowym

I. Wielkość plonu została określona poprzez zbiór ręczny wszystkich kłosów pszenicy z pojemników w doświadczeniu wazonowym i zbiór kombajnem z całego poletka i pola w doświadczeniu poletkowym i polowym, w fazie BBCH 89.

II. Masa tysiąca ziaren (MTZ) pszenicy z doświadczeń wazonowych i polowych została obliczona przy użyciu licznika ziaren (Drello, Nuremberg, Niemcy) i wagi analitycznej.

III. Parametry jakościowe i żywieniowe plonu z doświadczenia wazonowego, poletkowego i polowego, takie jak gęstość w stanie zsypnym, wilgotność, zawartość białka, skrobi, glutenu, indeks sedymentacyjny Zeleny'ego zostały zbadane przy użyciu analizatora ziarna Infratec 1241 (Foss, Hilleroed, Dania), wykorzystującego spektroskopię w bliskiej podczerwieni.

IV. **Aminokwasy** jako jedne z parametrów żywieniowych zostały wyizolowane ze zhomogenizowanego ziarna pszenicy. Roztwory **wzorców 20 aminokwasów** (alanina, arginina, asparagina, kwas asparaginowy, cystyna, kwas glutaminowy, glutamina, glicyna, histydyna, izoleucyna, leucyna, lizyna, metionina, fenyloalanina, prolina, seryna, treonina, tryptofan, tyrozyna i walina) zostały przygotowane w 1% kwasie mrówkowym w wodzie o stężeniu 1 mg/ml. Próbki zmielonego ziarna pszenicy zostały wymieszane z 10 ml roztworu

wodno-metanolowego z 0,1% kwasem mrówkowym. Profil 20 aminokwasów został oznaczony za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC–MS/MS) przy użyciu aparatury Eksigent Ultra LC-100 (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA) z kolumną KINETEX HILIC 1,7 µm, 2,1 × 50 mm (Phenomenex). Do analizy metodą spektrometrii mas zastosowano system MS/MS 6500 QTRAP (AB Sciex Instruments, Foster City, CA), wyposażony w źródło jonizacji przez elektrorozpylanie (ESI). Stężenie wszystkich aminokwasów zostało określone w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM). Dla każdego aminokwasu określono jon prekursorowy i 2 jony produktowe. Walidacja metody została przeprowadzona zgodnie z dokumentem SANTE 11312/2021.

3.8. Określenie stężenia mykotoksyn w ziarnie pszenicy, uprawianej w doświadczeniu wazonowym, poletkowym i polowym

Mykotoksyny zostały wyekstrahowane ze zhomogenizowanego ziarna pszenicy, zebranego w fazie BBCH 89, przy użyciu roztworu acetonitrylu z 1% kwasem mrówkowym. Profil 13 mykotoksyn (DON, 3-AcDON, 15-AcDON, ZEN, NEO, NIV, FusX, DAS, toksyna T-2, toksyna HT-2, fumonizyna B1, B2, B3) oznaczono za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) przy użyciu aparatury Eksigent Ultra LC-100 (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA). Do analizy wykorzystano kolumnę KINETEX XB C18 1,7 µm, 2,1 x 50 mm (Phenomenex). Analiza spektrometrii mas została przeprowadzona przy użyciu systemu MS/MS 6500 QTRAP (AB Sciex Instruments, Foster City, CA). W celu określenia stężenia wszystkich mykotoksyn wykorzystano tryb monitorowania wielu reakcji (MRM). Dla każdej mykotoksyny określono jon prekursorowy i 2 jony produktowe (Łozowicka i wsp. 2022; Nugmanov i wsp. 2018). Walidację metody przeprowadzono zgodnie z dokumentem SANTE/12089/2016 (SANTE, 2016; Rutkowska i wsp. 2020).

3.9. Analizy statystyczne

Uzyskane wyniki zostały opracowane statystycznie metodą analizy wariancji ANOVA dla doświadczeń jednoczynnikowych i dwuczynnikowych w programie Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Do weryfikacji danych na poziomie istotności p=0,05 wykorzystano test Fischera.

4. Wyniki badań

4.1. Właściwości fizykochemiczne gleby

Gleba na poletkach doświadczalnych została określona w kategorii lekkiej. Spośród frakcji granulometrycznych, charakteryzowała się największą zawartością piasku (75,75%) (Tabela 1). Gleba analizowana przed rozpoczęciem doświadczenia miała wyższy odczyn pH (6,5), a także wyższą zawartość fosforu (19 mg/100 g), potasu (8,9 mg/100 g) i magnezu (5,5 mg/100 g) oraz mikroelementów w porównaniu do gleby analizowanej po przeprowadzonym doświadczeniu (Tabela 1). Spośród badanych mikroelementów najwyższym stężeniem charakteryzował się bor (47,5 mg/kg), cynk (31,5 mg/kg) i chrom (13,3 mg/kg). W glebie nie stwierdzono przekroczenia stężeń pierwiastków toksycznych (metali ciężkich), takich jak nikiel, arsen, kadm, rtęć i ołów.

Tabela 1. Skład granulometryczny i właściwości fizykochemiczne gleby.

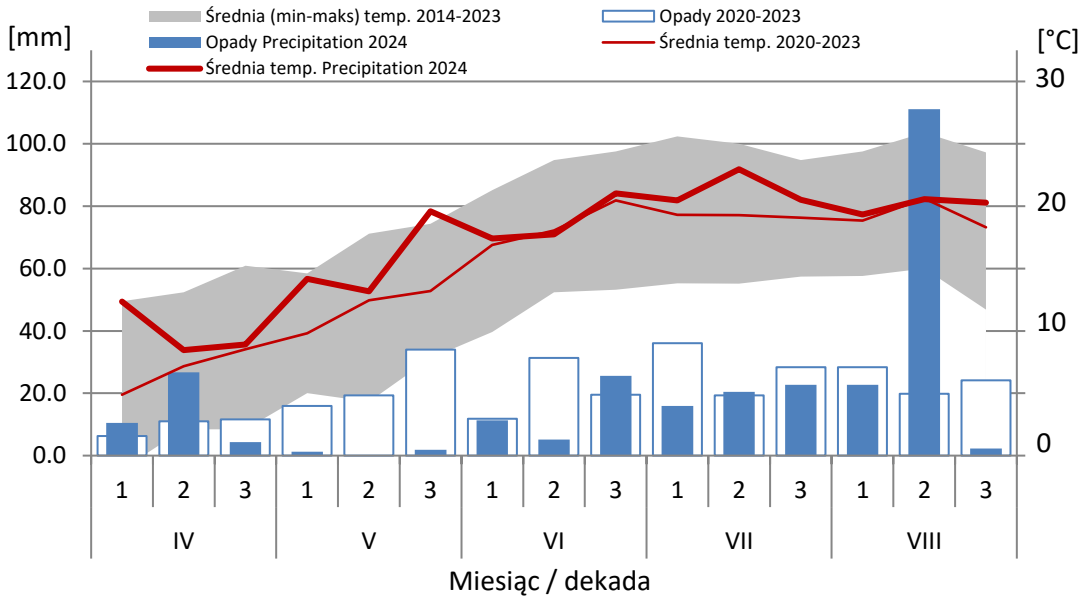
Termin pobrania gleby	pH	P	K	Mg	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	B	Hg	Pb
		mg/100g			mg/kg								
12.04.2024	6,5	19,0	8,9	5,5	13,3	4,74	4,27	31,5	2,49	<1	47,5	0,021	8,6
12.08.2024	6,1	15,7	7,5	4,9	11,8	4,25	3,89	30,3	2,01	<1	44,5	0,025	8,1
Skład granulometryczny (%)													
Ił (mm)	Pył (mm)			Piasek (mm)	Kategoria gleby								
<0,002	0,002-0,02		0,02-0,05		0,05-2,0								
2,25	14,08		7,95		75,75	lekka							

P – fosfor, K – potas, Mg – magnez, Cr – chrom, Ni – nikiel, Cu – miedź, Zn – cynk, As – arsen, Cd – kadm, B – bor, Hg – rtęć, Pb – ołów.

4.2. Warunki pogodowe

Sezon wegetacyjny 2024 r. charakteryzował się fluktuacjami okresów suszy i okresów deszczowych (Rys. 4). Począwszy od I dekady kwietnia aż do II dekady czerwca oraz w I

dekadzie lipca stwierdzono o 7% niższe opady w I dekadzie kwietnia aż po całkowity ich brak w II dekadzie maja, natomiast wyższe opady w odniesieniu do danych z lat 2004-2023 stwierdzono w przypadku II dekady kwietnia (o 166%), III czerwca (o 23%) oraz II lipca (o 10%). Ostatecznie w wiosenno-letnim okresie wegetacyjnym odnotowano 39% redukcję opadów. W przypadku temperatury, niższą średnią obserwowano wyłącznie w III dekadzie kwietnia (o 1,0°C), w pozostałych dekadach stwierdzono wyższą temperaturę od 0,3°C (II dekada maja) do 6,5°C (I dekada kwietnia) wyższą niż w latach ubiegłych. Wysoka temperatura w połączeniu ze znacząco ograniczonymi opadami w okresie wegetacyjnym mogły przyczynić się do obniżenia presji ze strony sprawców chorób grzybowych, a jednocześnie negatywnie przyczynić się do rozwoju pszenicy jarej szczególnie w okresie jej krzewienia i strzelania w źdźbło.



Rys. 4. Warunki pogodowe w 2024 roku w odniesieniu do wielolecia (2004-2023).

4.3. Fitotoksyczność metod ochrony roślin i ich kombinacji

Badanie fitotoksyczności wykazało, że badane związki miały niewielkie działanie fitotoksyczne na rośliny pszenicy, które ujawniło się w fazie 30 i 39 BBCH. Po pierwszym tygodniu od zabiegów **w doświadczeniu wazonowym** zanotowano najwyższą fitotoksyczność, która osiągnęła wartość 10% w przypadku kombinacji octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu (obiekt 6), w fazie 30 BBCH i 3,8% w fazie 39 BBCH (Tabela 2). Jednak zgodnie ze skalą oceny została ona zakwalifkowana jako niska (<10%). Nasiona gorczycy w proszku charakteryzowały się

niższą fitotoksycznością (obiekt 5; 7,5%, 30 BBCH i 1,3%, 39 BBCH), zaś najniższą fitotoksyczność odnotowano w przypadku zastosowania chlorowodorku chitozanu (obiekt 4; 3,8%, 30 BBCH i 1%, 39 BBCH) oraz chlorowodorku chitozanu w połączeniu z ozonowaniem materiału siewnego (obiekt 8; 3,5%, 30 BBCH). Ponadto, ocena długości źdźbła i kłosa wykazała, że ocet winny w największym stopniu indukował przyrost długości źdźbła i kłosa w przypadku ozonowania materiału siewnego (odpowiednio 51,6 cm i 6,2 cm) i bez zastosowania technologii ozonowania (odpowiednio 53,3 cm i 6,6 cm) (Tabela 2).

Tabela 2. Ocena fitotoksyczności roślin pszenicy w doświadczeniu wazonowym.

Obiekt	1 zabieg 30 BBCH		2 zabieg 39 BBCH		3 zabieg 59 BBCH		4 zabieg 69 BBCH		Długość źdźbła [cm]	Długość kłosa [cm]
	I	II	I	II	I	II	I	II		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	50,9	5,9
2	0	0	0	0	0	0	0	0	49,6	6,1
3	5,0	1,0	1,0	0	0	0	0	0	53,3	6,6
4	3,8	0,0	1,0	0	0	0	0	0	51,6	6,2
5	7,5	2,5	1,3	0	0	0	0	0	51,4	6,3
6	10,0	6,3	3,8	0	0	0	0	0	48,6	5,9
7	4,0	1,3	1,3	0	0	0	0	0	51,6	6,2
8	3,5	1,0	1,0	0	0	0	0	0	50,8	5,9
9	7,1	2,5	1,3	0	0	0	0	0	48,8	5,9
10	9,2	5,0	3,8	0	0	0	0	0	49,1	5,8

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
I - 1 tydzień po zabiegu
II - 2 tydzień po zabiegu
0-10% niska fitotoksyczność
11-30% średnia fitotoksyczność
31-100% wysoka fitotoksyczność

W przypadku **doświadczenia poletkowego**, stwierdzono niską fitotoksyczność jedynie w przypadku aplikacji kombinacji octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu w połączeniu z ozonowaniem materiału siewnego (obiekt 10) w fazie 30 BBCH (5,6%) i w fazie 39 BBCH (3,1%), zaś analogiczna kombinacja bez ozonowania materiału siewnego (obiekt 6) skutkowała wystąpieniem fitotoksyczności na poziomie 5,4% i 3,4%, odpowiednio w fazie 30 i 39 BBCH. Ponadto zastosowanie octu winnego skutkowało osiągnięciem najwyższej długości źdźbła i kłosa w przypadku

ozonowania (obiekt 7; 71,5 cm, 7,0 cm) i braku ozonowania (obiekt 3; 72,4 cm, 7,1 cm) (Tabela 3).

Tabela 3. Ocena fitotoksyczności roślin pszenicy w doświadczeniu poletkowym.

Obiekt	1 zabieg 30 BBCH		2 zabieg 39 BBCH		3 zabieg 59 BBCH		4 zabieg 69 BBCH		Długość źdźbła [cm]	Długość kłosa [cm]
	I	II	I	II	I	II	I	II		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	70,5	6,9
2	0	0	0	0	0	0	0	0	69,4	6,8
3	0	0	0	0	0	0	0	0	72,4	7,1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	70,8	6,9
5	0	0	0	0	0	0	0	0	70,2	6,9
6	5,4	3,4	3,4	0	0	0	0	0	68,6	6,7
7	0	0	0	0	0	0	0	0	71,5	7,0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	70,5	6,9
9	0	0	0	0	0	0	0	0	69,0	6,7
10	5,6	3,4	3,1	0	0	0	0	0	68,2	6,6

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
I - 1 tydzień po zabiegu
II - 2 tydzień po zabiegu
0-10% niska fitotoksyczność
11-30% średnia fitotoksyczność
31-100% wysoka fitotoksyczność

W **doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej** stwierdzono najniższą fitotoksyczność, która była obecna jedynie w przypadku kompleksowej ochrony (obiekt 3) w fazie 30 BBCH (4,2%) i w fazie 39 BBCH (2,5%), zaś kombinacja z ozonowaniem materiału siewnego (obiekt 4) skutkowała wystąpieniem fitotoksyczności na poziomie 4,4% i 2,7%, odpowiednio w fazie 30 i 39 BBCH. Ponadto zastosowanie kompleksowej ochrony skutkowało osiągnięciem najwyższej długości źdźbła i kłosa w przypadku ozonowania (71,7 cm, 7,7 cm) i braku ozonowania (71,4 cm, 7,3 cm) (Tabela 4).

Tabela 4. Ocena fitotoksyczności roślin pszenicy w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej.

Obiekt	1 zabieg 30 BBCH		2 zabieg 39 BBCH		3 zabieg 59 BBCH		4 zabieg 69 BBCH		Długość źdźbła [cm]	Długość kłosa [cm]
	I	II	I	II	I	II	I	II		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	69,3	7,1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	68,2	6,9
3	4,2	2,4	2,5	0	0	0	0	0	71,4	7,3
4	4,4	2,7	2,7	0	0	0	0	0	71,7	7,7

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
4 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
I - 1 tydzień po zabiegu
II - 2 tydzień po zabiegu
0-10% niska fitotoksyczność
11-30% średnia fitotoksyczność
31-100% wysoka fitotoksyczność

Zastosowanie technologii ozonowania nie miało wpływu na objawy fitotoksyczności roślin pszenicy.

4.4. Skuteczność metod ochrony roślin i ich kombinacji w ograniczaniu chorób grzybowych w doświadczeniu wazonowym, poletkowym i polowym

W przypadku **doświadczenia wazonowego** stwierdzono występowanie rdzy brunatnej liści i fuzariozę kłosów (Tabela 5). Największe porażenie odnotowano w przypadku kontroli (obiekt 1; odpowiednio 12,4% i 17,6%) i po zastosowaniu ozonowania (obiekt 2; odpowiednio 12,6% i 18,3%). Największą skuteczność badanych metod ochrony względem rdzy brunatnej i fuzariozy kłosów zanotowano w przypadku kombinacji octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 10; odpowiednio 44% i 30,1%) lub bez ozonowania (obiekt 6; 42% i 33%). Wśród zastosowanych metod ochrony roślin, średnią skutecznością ochrony względem rdzy brunatnej charakteryzowało się zastosowanie chlorowodorku chitozanu w kombinacji z ozonowaniem (obiekt 8; 22%) i bez ozonowania (obiekt 4; 18%). W przypadku fuzariozy kłosów średnią i niską skuteczność

odnotowano po zastosowaniu nasion gorczycy w proszku w kombinacji z ozonowaniem (obiekt 9; 15,8%) i bez ozonowania (obiekt 5; 10,2%) (Tabela 5).

Tabela 5. Skuteczność metod ochrony roślin i ich kombinacji w ograniczaniu chorób grzybowych w pszenicy w doświadczeniu wazonowym.

Obiekt	Rdza brunatna		Fuzarioza kłosów zbóż		*Fusarium* spp.
	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	pg/ul
1	12,4	-	17,6	-	1,90
2	12,6	-	18,3	-	1,84
3	8,1	35,0	14,1	19,9	1,63
4	10,2	18,0	14,4	18,2	1,71
5	8,9	28,0	15,8	10,2	1,56
6	7,2	42,0	11,8	33,0	1,10
7	8,4	33,0	14,6	20,2	1,68
8	9,4	22,0	15,0	18,0	1,61
9	9,8	25,0	15,4	15,8	1,74
10	7,1	44,0	12,8	30,1	1,47

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
0-10% niska skuteczność
11-30% średnia skuteczność
31-100% wysoka skuteczność

Ponadto analizy molekularne wykazały, że **w doświadczeniu wazonowym** najwyższym stężeniem DNA grzybów rodzaju *Fusarium* charakteryzowało się zboże pochodzące z kontroli (1,90 pg/µl) i kontroli o ozonowanym materiale siewnym (1,84 pg/µl). Największa redukcja stężenia DNA grzybowego została odnotowana w przypadku kompleksowej ochrony (obiekt 6 i 10; 1,10 pg/µl i 1,47 pg/µl). Ochrona roślin pszenicy przy zastosowaniu nasion gorczycy w proszku w połączeniu z ozonowanym materiałem siewnym okazała się najmniej skuteczna (obiekt 9; 1,74 pg/µl), podobnie jak aplikacja chlorowodorku chitozanu (obiekt 4; 1,71 pg/µl).

W przypadku **doświadczenia poletkowego** stwierdzono występowanie brunatnej plamistości liści, rdzy brunatnej liści, łamliwości podstawy źdźbła, ostrej plamistości oczkowej i fuzariozę kłosów (Tabela 6). Największe porażenie odnotowano w przypadku fuzariozy kłosów na kontroli ozonowanej (obiekt 2; 15,8%) i nieozonowanej (obiekt 1; 15,2%), a także w przypadku brunatnej plamistości liści (12% na kontroli i 10% na kontroli ozonowanej), co wskazuje na średnią skuteczność metod ochrony. Największa skuteczność ochrony została odnotowana względem rdzy brunatnej i fuzariozy kłosów w przypadku kombinacji octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu (obiekt 6; odpowiednio 44,6% i 34,9%) oraz w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 10; 42,2% i 34,8%). Kompleksowa ochrona skutkowała także największą skutecznością ochrony względem brunatnej plamistości liści i ostrej plamistości oczkowej w połączeniu z ozonowaniem (odpowiednio 30% i 20,4%) oraz średnią skutecznością bez ozonowania materiału siewnego (25% i 13,2%). W przypadku łamliwości podstawy źdźbła, średnią skuteczność ochrony stwierdzono po aplikacji octu winnego (obiekt 3; 23,7%) (Tabela 6).

Ponadto analizy molekularne wykazały, że **w doświadczeniu poletkowym** najwyższym stężeniem DNA grzybów rodzaju *Fusarium* charakteryzowało się zboże pochodzące z kontroli (0,92 pg/µl i 0,87 pg/µl). Największa redukcja stężenia DNA grzybowego została odnotowana w przypadku kompleksowej ochrony w połączeniu z ozonowaniem materiału siewnego (obiekt 10; 0,22 pg/µl) oraz aplikacji octu winnego (obiekt 3; 0,24 pg/µl). Ochrona roślin pszenicy przy zastosowaniu nasion gorczycy w proszku w połączeniu z ozonowanym materiałem siewnym okazała się najmniej skuteczna (obiekt 9; 0,76 pg/µl), podobnie jak aplikacja chlorowodorku chitozanu (obiekt 4; 0,82 pg/µl).

W doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej stwierdzono występowanie brunatnej plamistości liści, rdzy brunatnej liści, łamliwości podstawy źdźbła, ostrej plamistości oczkowej i fuzariozę kłosów (Tabela 7). Największe porażenie odnotowano w przypadku fuzariozy kłosów na kontroli nieozonowanej (13,2%) i ozonowanej (11,7%), a także w przypadku brunatnej plamistości liści (11% na kontroli i 10% na kontroli ozonowanej). Największą skuteczność w ograniczaniu występowania brunatnej plamistości liści i fuzariozy kłosów stwierdzono w przypadku kompleksowej ochrony (obiekt 3; odpowiednio 36,0% i 37,8%) oraz w połączeniu z ozonowaniem

(obiekt 4; 40,0% i 49,5%). Ozonowanie materiału siewnego zwiększało skuteczność kompleksowej ochrony pszenicy względem rdzy brunatnej, łamliwości podstawy źdźbła i ostrej plamistości oczkowej (odpowiednio 25,0%, 12,1% i 17,3%), w porównaniu do kompleksowej ochrony pozbawionej ozonowanego materiału siewnego. Jednak w odniesieniu do doświadczenia wazonowego i poletkowego, doświadczenie polowe produkcji wielkoskalowej charakteryzowało się większą skutecznością badanych kompleksowych metod ochrony, zwłaszcza w przypadku brunatnej plamistości liści i fuzariozy kłosów.

Ponadto analizy molekularne wykazały, że **w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej** najwyższym stężeniem DNA grzybów rodzaju *Fusarium* charakteryzowało się zboże pochodzące z kontroli (0,85 pg/µl i 0,80 pg/µl). Największa redukcja stężenia DNA grzybowego została odnotowana w przypadku kompleksowej ochrony w połączeniu z ozonowaniem materiału siewnego (0,42 pg/µl) (Tabela 7). W porównaniu do doświadczenia wazonowego i poletkowego, doświadczenie polowe produkcji wielkoskalowej charakteryzowało się mniejszym porażeniem kłosów pszenicy przez grzyby rodzaju *Fusarium*.

Tabela 6. Skuteczność metod ochrony roślin i ich kombinacji w ograniczaniu chorób grzybowych w pszenicy w doświadczeniu poletkowym.

Obiekt	Brunatna plamistość liści		Rdza brunatna		Łamliwość podstawy źdźbła		Ostra plamistość oczkowa		Fuzarioza kłosów zbóż		*Fusarium* spp.
	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	pg/µl
1	12,0	-	8,6	-	7,6	-	6,8	-	15,2	-	0,92
2	10,0	-	8,3	-	7,2	-	5,4	-	15,8	-	0,87
3	10,0	16,7	5,7	33,7	5,8	23,7	6,1	10,3	12,4	18,4	0,24
4	9,0	25,0	6,0	30,2	6,1	19,7	6,2	8,8	12,2	19,7	0,82
5	11,0	8,3	6,1	29,1	6,3	17,1	6,4	5,9	14,0	7,9	0,62
6	9,0	25,0	4,6	44,6	5,9	22,4	5,9	13,2	9,9	34,9	0,58
7	9,0	10,0	5,6	32,5	6,6	8,3	4,6	14,8	12,1	23,4	0,53
8	9,0	10,0	5,9	28,9	6,8	5,6	4,8	11,1	12,6	20,3	0,71
9	8,0	20,0	6,4	22,9	7,0	2,8	4,9	9,3	13,5	14,6	0,76
10	7,0	30,0	4,8	42,2	6,1	15,3	4,3	20,4	10,3	34,8	0,22

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
0-10% niska skuteczność
11-30% średnia skuteczność
31-100% wysoka skuteczność

Tabela 7. Skuteczność metod ochrony roślin i ich kombinacji w ograniczaniu chorób grzybowych w pszenicy w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej.

Obiekt	Brunatna plamistość liści		Rdza brunatna		Łamliwość podstawy źdźbła		Ostra plamistość oczkowa		Fuzarioza kłosów zbóż		*Fusarium* spp.
	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	% porażenia	% skuteczności	pg/µl
1	11,0	-	7,2	-	6,9	-	5,4	-	13,2	-	0,85
2	10,0	-	6,8	-	6,6	-	5,2	-	11,7	-	0,80
3	7,0	36,0	5,5	23,6	6,2	10,1	4,8	11,1	8,2	37,8	0,61
4	6,0	40,0	5,1	25,0	5,8	12,1	4,3	17,3	5,9	49,5	0,42

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
4 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
0-10% niska skuteczność
11-30% średnia skuteczność
31-100% wysoka skuteczność

4.5. Parametry jakościowe i żywieniowe plonu

W doświadczeniu wazonowym z inokulacją grzybem patogenicznym *F. culmorum* stwierdzono najwyższy plon po aplikacji nasion gorczycy w proszku, bez i z ozonowaniem materiału siewnego (2,5 t/ha). Zabiegi z wykorzystaniem octu winnego oraz z wykorzystaniem chlorowodorku chitozanu i łącznym zastosowaniem octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu w połączeniu z ozonowanym materiałem siewnym, także skutkowały uzyskaniem wysokiego plonu (2,2 t/ha), w porównaniu do pozostałych kombinacji (Tabela 8). Aplikacja chlorowodorku chitozanu skutkowała osiągnięciem najwyższej gęstości ziarna oraz skrobi w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 8; odpowiednio 75,4% i 67,5%) i bez ozonowania materiału siewnego (obiekt 4; odpowiednio 79,2% i 67,7%). Natomiast kompleksowa ochrona uwzględniająca ocet winny, gorczycę w proszku i chlorowodorek chitozanu w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 10) skutkowała najwyższym stężeniem białka, glutenu oraz parametru wypiekowego - liczby sedymentacyjnej Zeleny'ego w ziarnie (odpowiednio 9,6%, 18,7% i 23,3%). Podobne wartości uzyskano dla analogicznej kombinacji bez ozonowania (obiekt 6; odpowiednio 9,6%, 17,8% i 22,5%) (Tabela 8).

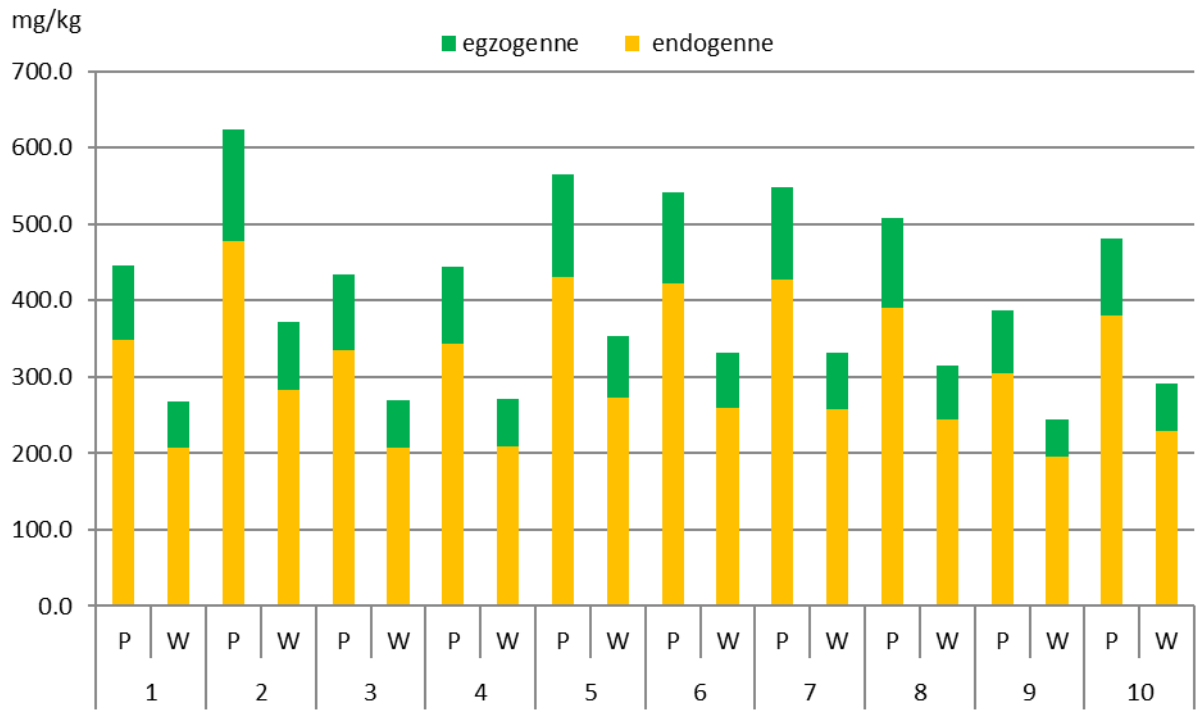
Tabela 8. Parametry jakościowe i ilościowe ziaren pszenicy w doświadczeniu wazonowym.

Obiekt	Plon [t/ha]	Gęstość [kg/hl]	Białko [%]	Wilgotność [%]	Skrobia [%]	Gluten [%]	L.s. Zelenyego	Ergosterol SM [mg/kg]
1	1,9	75,6	9,3	*12,6*	66,7	16,7	21,8	13,9
2	1,8	74,3	*8,7*	12,8	66,8	17,6	22,3	**14,3**
3	2,2	77,1	9,5	12,8	67,5	17,4	18,4	13,3
4	1,8	**79,2**	9,4	**13,1**	**67,7**	17,2	19,8	13,6
5	**2,5**	77,7	9,4	12,8	67,3	*16,6*	19,6	13,5
6	2,0	75,8	**9,6**	12,7	67,4	17,8	22,5	12,9
7	*1,4*	74,7	9,4	12,7	*66,4*	18,5	22,7	13,5
8	2,2	75,4	9,2	12,9	67,5	17,6	*17,8*	13,2
9	**2,5**	74,3	9,3	13,0	67,1	17,4	20,7	13,6
10	2,2	*74,2*	**9,6**	13,0	67,2	**18,7**	**23,3**	*12,7*

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu

9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
Wartość pogrubiona- maksymalna wartość; *Wartość pochylona* – minimalna wartość

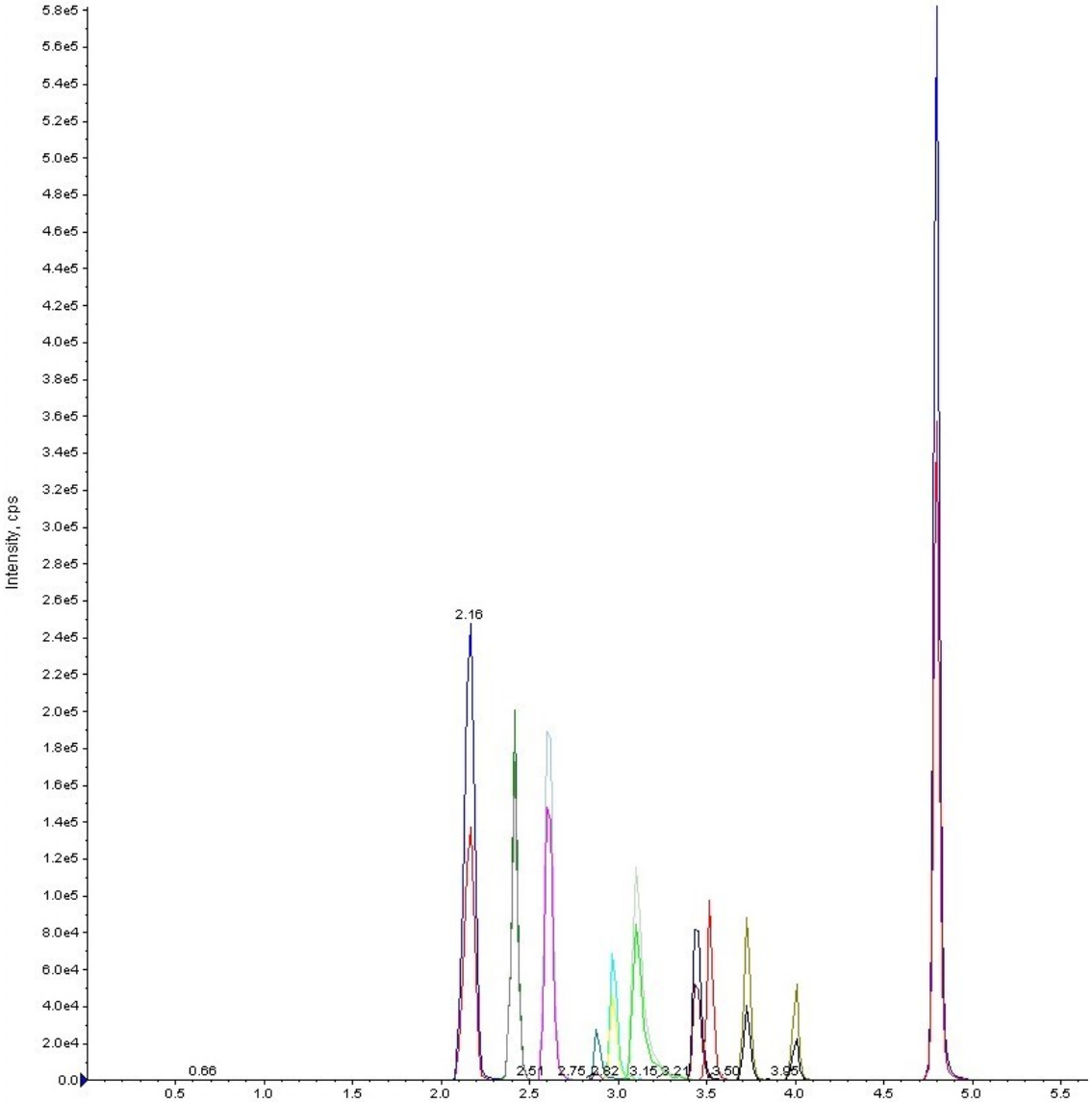
Najwyższą zawartość aminokwasów stwierdzono w kontroli ozonowanej (obiekt 2; 372 mg/kg), zaś zabiegi prowadzone w roślinach uzyskanych z ozonowanego materiału siewnego spowodowały redukcję stężenia aminokwasów, odnotowaną w największym stopniu w przypadku nasion gorczycy w proszku (obiekt 9; 244,7 mg/kg) (Rys. 5). W przypadku zboża uzyskanego z nieozonowanego materiału siewnego stwierdzono indukcję stężenia aminokwasów w porównaniu do kontroli, w wyniku zastosowania kompleksowej ochrony (obiekt 6; 332 mg/kg) oraz aplikacji nasion gorczycy w proszku (obiekt 5; 354,1 mg/kg). Najmniejszą zawartością aminokwasów charakteryzowało się zboże uzyskane w wyniku aplikacji octu winnego (obiekt 3; 434,5 mg/kg) (Tabela 9). W grupie aminokwasów endogennych w największym stężeniu oznaczono kwas asparaginowy (104,6 mg/kg) i asparaginę (56 mg/kg). W grupie aminokwasów egzogennych najwyższym stężeniem charakteryzowała się arginina (24,8 mg/kg) i lizyna (13,6 mg/kg) (Tabela 9). Przykładowy chromatogram przedstawiający występowanie aminokwasów w ziarnie pszenicy został umieszczony na Rys. 6.



1 - Kontrola

2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
W – doświadczenie wazonowe; P – doświadczenie poletkowe

Rys. 5. Suma stężeń aminokwasów egzogennych i endogennych w ziarnie pszenicy w doświadczeniu wazonowym i poletkowym.



Rys. 6. Przykładowy chromatogram LC-MS/MS przedstawiający występowanie aminokwasów w ziarnie pszenicy.

Tabela 9. Stężenie aminokwasów w ziarnie pszenicy w doświadczeniu wazonowym (mg/kg).

Obiekty	Endogenne										Egzogenne									
	Alanina	Asparagina	Kwas asparaginowy	Cystyna	Kwas glutaminowy	Glutamina	Glicyna	Prolina	Seryna	Tyrozyna	Arginina	Histydyna	Izoleucyna	Leucyna	Lizyna	Metionina	Fenyloalanina	Treonina	Tryptofan	Walina
1	27,6	42,9	75,1	1,1	23,7	8,0	11,1	1,9	11,7	*4,3*	15,5	6,6	3,2	3,8	9,6	0,8	6,5	4,7	*2,9*	6,3
2	**36,0**	55,3	**104,6**	*0,9*	**29,8**	7,8	**18,1**	2,3	**18,0**	**9,3**	**24,8**	6,0	**4,2**	5,3	**13,6**	**1,0**	**13,4**	7,6	**7,1**	**6,7**
3	26,9	47,7	*68,9*	1,0	22,3	**12,0**	*10,8*	1,8	11,8	4,7	17,8	6,8	2,9	3,3	10,5	*0,6*	7,1	4,4	3,3	4,7
4	28,5	41,5	74,8	1,3	23,7	9,9	11,9	1,7	*11,6*	4,8	18,5	7,5	2,7	3,3	9,3	0,6	7,8	4,0	3,7	4,8
5	32,1	**56,0**	104,2	1,2	28,1	10,5	15,0	2,1	15,7	7,1	20,4	**9,4**	4,0	**5,6**	11,6	0,9	11,7	**7,7**	4,9	5,8
6	32,0	53,5	99,1	1,2	26,1	11,7	12,8	2,2	14,0	6,5	19,1	7,8	3,2	4,7	10,6	0,9	10,2	6,1	4,4	6,0
7	34,9	53,9	91,0	**1,6**	29,0	7,7	14,4	**2,5**	15,0	7,7	17,6	7,4	3,3	4,0	11,8	0,7	11,5	5,9	5,8	6,0
8	31,1	52,1	85,3	1,1	25,1	*6,8*	16,6	2,0	15,5	7,9	14,5	7,1	3,5	4,6	11,9	0,8	10,3	6,9	5,8	5,6
9	*23,7*	*36,5*	74,1	1,2	*18,1*	10,2	12,7	*1,5*	12,0	4,9	*11,9*	5,4	*2,2*	*2,8*	*8,4*	0,8	*5,7*	*3,8*	4,8	*3,8*
10	28,8	48,3	81,1	1,4	23,8	10,3	13,3	1,9	14,8	6,0	15,3	*5,4*	2,9	3,6	10,6	0,6	8,1	5,2	5,9	4,9

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku

Wartość pogrubiona- maksymalne stężenie aminokwasu

Wartość pochylona – minimalne stężenie aminokwasu

Plon pozyskany z **doświadczenia poletkowego** charakteryzował się lepszymi parametrami jakościowymi zboża z powodu braku inokulacji i podobną tendencją w wielkości poszczególnych parametrów do doświadczenia wazonowego. Stwierdzono najwyższy plon po aplikacji chlorowodorku chitozanu i gorczycy w proszku w połączeniu z ozonowaniem materiału siewnego (obiekty 8 i 9; odpowiednio 4,5 t i 4,4 t) (Tabela 10). Zabiegi octem winnym i gorczycą w proszku bez ozonowania także skutkowały uzyskaniem wysokiego plonu (obiekt 3 i 5; odpowiednio 4,3 t i 4,3 t), jednak charakteryzowały się największą zawartością ergosterolu (do 11 mg/kg). Aplikacja chlorowodorku chitozanu skutkowała osiągnięciem najwyższej gęstości ziarna oraz skrobi w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 8; odpowiednio 77,8% i 69,7%) i bez ozonowania materiału siewnego (obiekt 4; odpowiednio 81% i 69,6%). Natomiast kompleksowa ochrona uwzględniająca ocet winny, gorczycę w proszku i chlorowodorek chitozanu w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 10) skutkowała najwyższym stężeniem białka, glutenu oraz liczby sedymentacyjnej Zeleny'ego w ziarnie (odpowiednio 10,9%, 20,5% i 25,5%). Podobne wartości uzyskano dla analogicznej kombinacji bez ozonowania (obiekt 6; odpowiednio 10,6%, 19,8% i 24,7%).

Tabela 10. Parametry jakościowe i ilościowe ziaren pszenicy w doświadczeniu poletkowym.

Obiekt	Plon [t/ha]	Gęstość [kg/hl]	Białko [%]	Wilgotność [%]	Skrobia [%]	Gluten [%]	L.s. Zelenyego	Ergosterol SM [mg/kg]
1	3,7	77,6	10,1	12,8	68,8	19,6	23,9	10,5
2	3,8	76,5	10,4	12,8	*68,6*	19,4	22,3	10,1
3	4,3	79,0	10,2	12,8	69,3	18,5	20,2	10,7
4	4,0	**81,0**	10,5	**13,0**	69,6	19,0	21,5	10,3
5	4,3	79,9	10,3	12,9	69,5	18,9	21,1	**11,0**
6	3,7	77,5	10,6	12,9	69,2	19,8	24,7	*9,5*
7	*3,6*	*76,1*	10,8	12,9	*68,6*	20,0	24,9	10,6
8	**4,5**	77,8	*10,0*	12,9	**69,7**	*17,8*	*19,8*	10,8
9	4,4	76,9	10,6	*12,7*	69,1	19,5	22,5	10,4
10	4,0	77,0	**10,9**	12,8	69,1	**20,5**	**25,5**	10,1

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu

9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
Wartość pogrubiona- maksymalna wartość; *Wartość pochylona* – minimalna wartość

Zabiegi ochronne stosowane w doświadczeniu poletkowym skutkowały uzyskaniem podobnych tendencji w zawartości aminokwasów co zabiegi ochronne w doświadczeniu wazonowym. Najwyższą zawartość aminokwasów stwierdzono w kontroli ozonowanej (obiekt 2; 624,2 mg/kg), zaś zabiegi prowadzone w roślinach uzyskanych z ozonowanego materiału siewnego spowodowały redukcję stężenia aminokwasów, odnotowaną w największym stopniu w przypadku nasion gorczycy w proszku (obiekt 9; 387,6 mg/kg) (Rys. 5). W przypadku zboża uzyskanego z nieozonowanego materiału siewnego stwierdzono indukcję stężenia aminokwasów w porównaniu do kontroli, w wyniku zastosowania kompleksowej ochrony (obiekt 6; 540,9 mg/kg) oraz aplikacji nasion gorczycy w proszku (obiekt 5; 564,3 mg/kg). W grupie aminokwasów endogennych w największym stężeniu oznaczono kwas asparaginowy (181,5 mg/kg) i asparaginę (94,6 mg/kg) (Tabela 11). W grupie aminokwasów egzogennych najwyższym stężeniem charakteryzowała się arginina (37,7 mg/kg) i lizyna (23,5 mg/kg).

Tabela 11. Stężenie aminokwasów w ziarnie pszenicy w doświadczeniu poletkowym (mg/kg).

Obiekty	Endogenne										Egzogenne									
	Alanina	Asparagina	Kwas asparaginowy	Cystyna	Kwas glutaminowy	Glutamina	Glicyna	Prolina	Seryna	Tyrozyna	Arginina	Histydyna	Izoleucyna	Leucyna	Lizyna	Metionina	Fenyloalanina	Treonina	Tryptofan	Walina
1	46,1	75,0	123,5	1,8	37,5	13,3	19,8	3,0	20,4	7,7	25,2	9,9	5,3	6,5	16,3	1,4	11,1	7,8	*4,7*	9,5
2	**60,2**	**94,6**	**181,5**	1,6	**47,3**	13,7	**30,3**	4,0	**29,4**	**15,7**	**37,7**	10,5	**6,9**	**9,3**	**23,5**	1,5	**20,6**	**12,4**	**11,8**	**11,6**
3	44,6	74,5	*110,0*	*1,5*	37,3	18,8	*18,2*	3,0	20,3	*7,3*	28,9	11,3	4,4	5,4	16,2	1,0	11,1	8,0	5,2	7,7
4	44,6	74,0	120,4	2,0	37,0	16,4	19,4	2,8	19,0	8,0	28,2	12,9	4,3	5,5	15,2	*1,0*	12,1	6,8	6,1	7,5
5	57,4	88,5	158,1	1,8	44,2	17,6	23,4	3,5	24,1	12,2	33,9	**15,1**	6,3	8,4	19,3	**1,5**	18,4	12,3	8,0	10,1
6	54,0	88,5	155,7	1,9	44,2	**19,2**	21,4	3,3	23,4	10,8	31,2	11,8	5,4	7,2	18,7	1,4	16,9	9,5	6,8	9,6
7	55,2	89,8	156,9	**2,7**	44,9	13,6	22,2	**4,2**	25,1	12,5	28,5	12,2	5,3	7,2	20,1	1,2	17,5	10,1	9,0	9,5
8	50,1	78,4	144,6	1,9	39,2	*11,9*	25,0	3,1	24,6	12,4	24,6	12,8	5,4	7,3	19,7	1,4	16,3	10,7	9,2	9,2
9	*38,7*	*58,2*	111,4	1,9	*29,1*	16,4	20,9	*2,7*	*18,2*	7,4	*19,7*	*8,8*	*3,5*	*4,5*	*14,6*	1,4	*10,0*	*6,6*	7,4	*6,2*
10	45,0	82,1	134,0	2,1	41,1	16,5	22,8	3,1	22,5	10,4	23,3	8,9	4,5	5,9	18,0	1,0	14,0	8,9	9,9	7,7

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku

Wartość pogrubiona – maksymalne stężenie aminokwasu

Wartość pochylona – minimalne stężenie aminokwasu

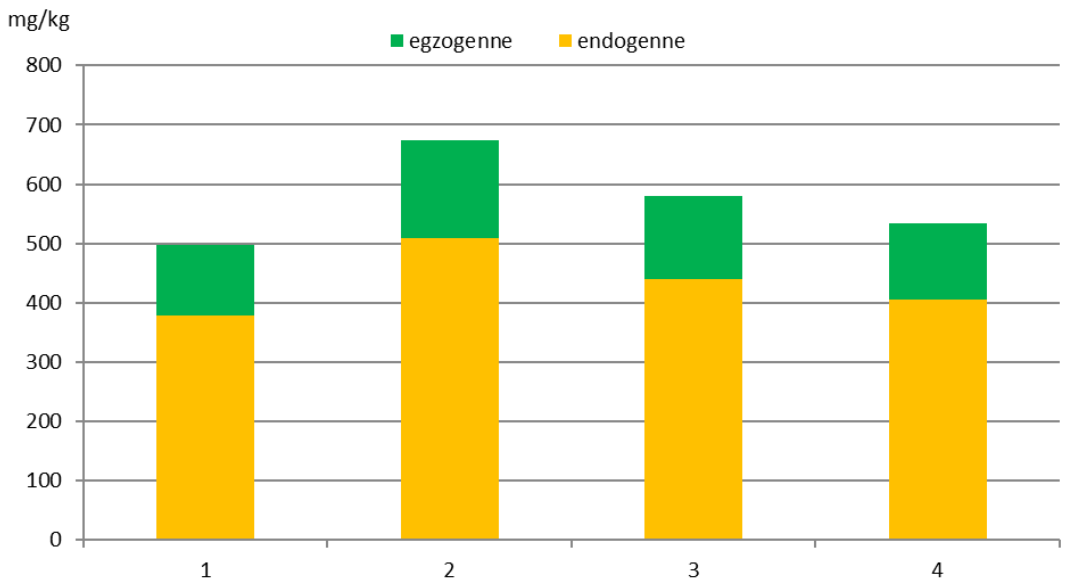
Plon pozyskany z **doświadczenia polowego produkcji wielkoskalowej** charakteryzował się lepszymi parametrami jakościowymi zboża i podobną tendencją w wielkości poszczególnych parametrów do doświadczenia wazonowego i poletkowego. Stwierdzono najwyższy plon (5,1 t) po aplikacji kompleksowej ochrony w połączeniu z ozonowaniem materiału siewnego (obiekt 4), a także najwyższe wartości parametrów jakościowych ziarna pszenicy w porównaniu do nieozonowanego materiału siewnego i doświadczenia poletkowego (Tabela 12). Wśród nich należy zwrócić uwagę na gęstość ziarna (79,6 kg/hl), zawartość białka (11,9%), skrobi (70,2%), glutenu (20,8%) i parametr wypiekowy – liczbę sedymentacyjną Zeleny'ego (26,8), świadczącą o przydatności ziarna w przemyśle piekarniczym.

Tabela 12. Parametry jakościowe i ilościowe ziaren pszenicy w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej.

Obiekt	Plon [t/ha]	Gęstość [kg/hl]	Białko [%]	Wilgotność [%]	Skrobia [%]	Gluten [%]	L.s. Zelenyego	Ergosterol [mg/kg]
1	*4,1*	*78,1*	*10,4*	*12,5*	*69,1*	*19,4*	*23,4*	9,7
2	4,3	78,5	10,9	**12,7**	*68,7*	19,6	23,7	9,2
3	4,8	79,2	11,2	12,6	69,6	20,1	25,9	*8,8*
4	**5,1**	**79,6**	**11,9**	**12,7**	**70,2**	**20,8**	**26,8**	9,0

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
4 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
Wartość pogrubiona- maksymalna wartość; *Wartość pochylona* – minimalna wartość

Najwyższą zawartość aminokwasów w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej stwierdzono w kontroli ozonowanej (obiekt 2; 674,2 mg/kg), zaś zabiegi prowadzone w roślinach uzyskanych z ozonowanego materiału siewnego spowodowały największą redukcję stężenia aminokwasów (533,9 mg/kg) (Rys. 7). W przypadku kontroli nieozonowanej stwierdzono najniższe stężenie aminokwasów (obiekt 1; 498,1 mg/kg). W grupie aminokwasów endogennych w największym stężeniu oznaczono kwas asparaginowy (194,6 mg/kg) i asparaginę (97,2 mg/kg) (Tabela 13). W grupie aminokwasów egzogennych najwyższym stężeniem charakteryzowała się arginina (39,6 mg/kg) i lizyna (26,8 mg/kg).



1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
4 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku

Rys. 7. Suma stężeń aminokwasów egzogennych i endogennych w ziarnie pszenicy w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej.

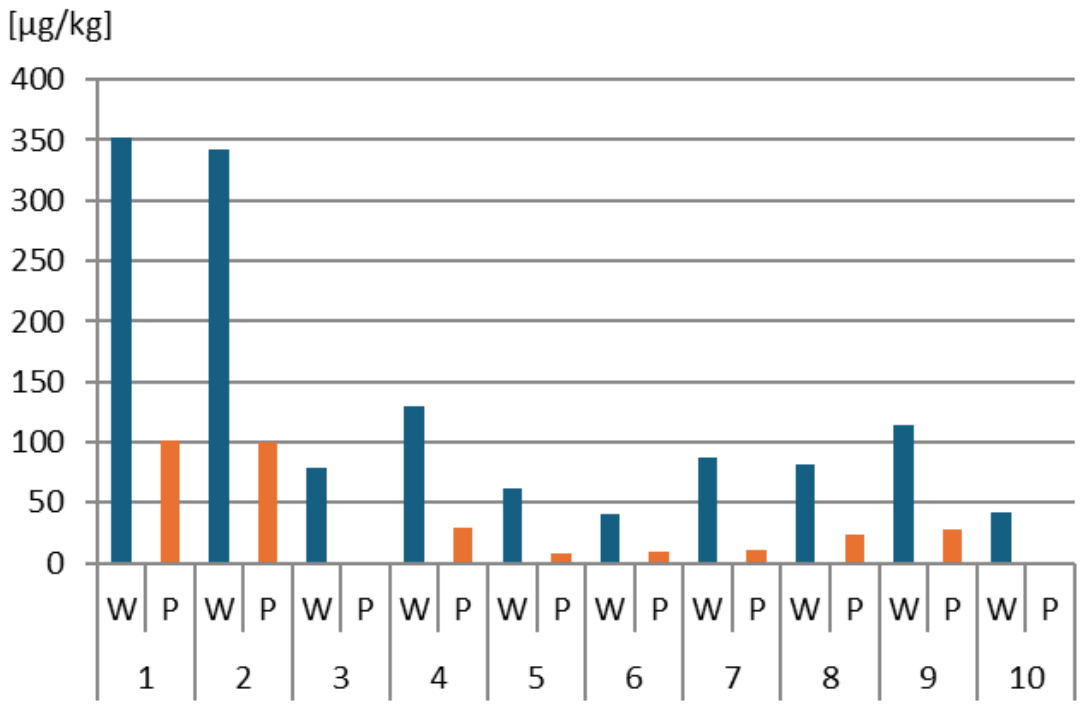
Tabela 13. Stężenie aminokwasów w ziarnie pszenicy w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej (mg/kg).

Obiekty	Endogenne										Egzogenne									
	Alanina	Asparagina	Kwas asparaginowy	Cystyna	Kwas glutaminowy	Glutamina	Glicyna	Prolina	Seryna	Tyrozyna	Arginina	Histydyna	Izoleucyna	Leucyna	Lizyna	Metionina	Fenyloalanina	Treonina	Tryptofan	Walina
1	*48,6*	*78,4*	*129,3*	**3,4**	*39,1*	17,2	24,7	**5,1**	*23,2*	*9,4*	28,3	*11,4*	7,3	8,4	*19,2*	**3,6**	*14,6*	*9,1*	*7,1*	10,7
2	**61,7**	**97,2**	**194,6**	2,9	**48,3**	*15,9*	**34,5**	4,8	**32,6**	**16,2**	**39,6**	11,8	**8,1**	**11,1**	**26,8**	2,8	**24,8**	**15,0**	**13,5**	**12,0**
3	56,3	89,1	159,1	2,6	46,6	**16,8**	26,2	*4,7*	25,8	12,3	34,5	**13,6**	6,7	9,5	21,4	3,0	19,2	12,6	8,4	11,2
4	49,8	85,6	138,7	*2,4*	44,2	16,9	*24,5*	4,8	27,5	11,8	*27,9*	12,5	*7,2*	*7,8*	20,3	*2,3*	17,6	11,0	11,6	*9,5*

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
4 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
Wartość pogrubiona – maksymalne stężenie aminokwasu; *Wartość pochylona* – minimalne stężenie aminokwasu

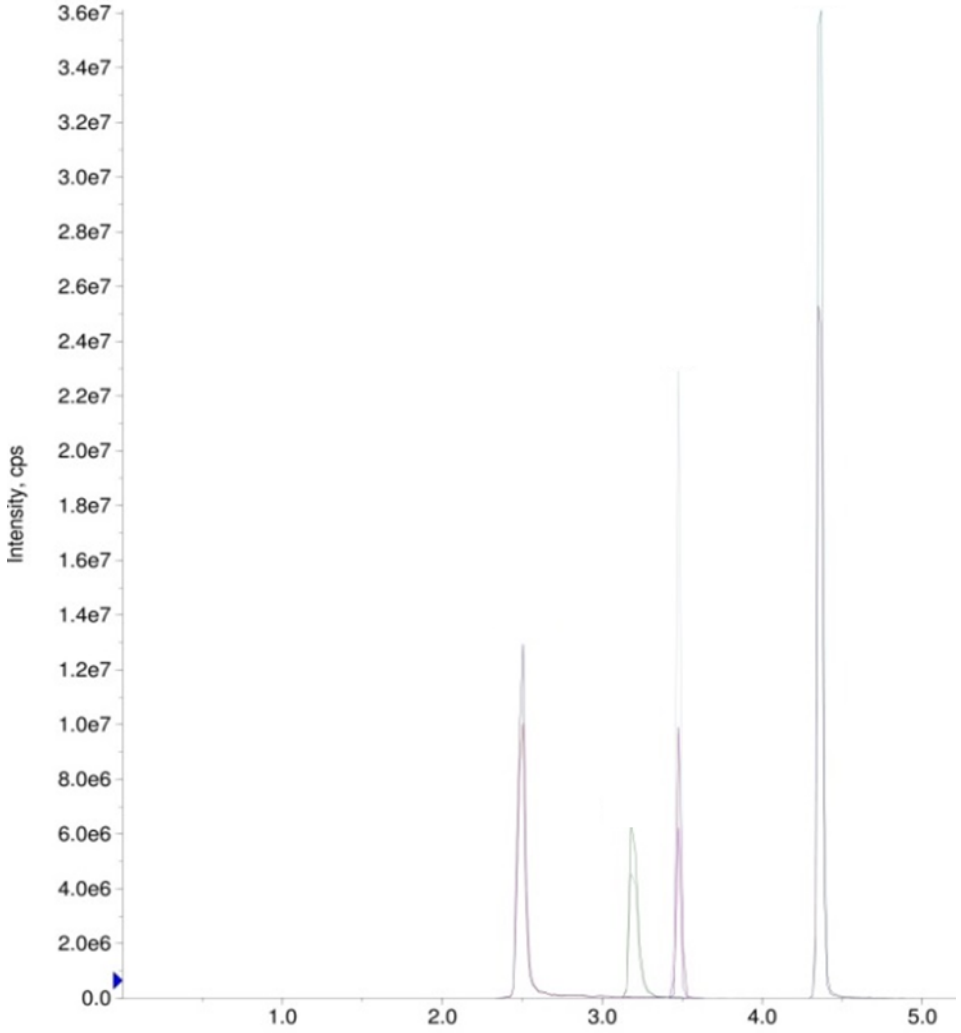
4.6. Stężenie mykotoksyn w ziarnie pszenicy

Spośród 13 badanych mykotoksyn, w ziarnie pszenicy wykryto występowanie 4 związków: 3-Acetylodeoksyniwalenol (3-AcDON), deoksyniwalenol (DON), toksyna HT-2 i toksyna T-2. Zabiegi z wykorzystaniem octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu skutkowały redukcją zawartości mykotoksyn w porównaniu do kontroli (Rys. 8). Przykładowy chromatogram przedstawiający występowanie mykotoksyn w ziarnie pszenicy został umieszczony na Rys. 9.



1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
W – doświadczenie wazonowe; P – doświadczenie poletkowe

Rys. 8. Suma stężeń mykotoksyn w ziarnie pszenicy w doświadczeniu wazonowym i poletkowym.



Rys. 9. Przykładowy chromatogram LC-MS/MS przedstawiający występowanie mykotoksyn w ziarnie pszenicy.

Stężenie mykotoksyn **w doświadczeniu wazonowym**, w którym przeprowadzono inokulację grzybem patogenicznym *F. culmorum* było wyższe, w porównaniu do doświadczenia polowego. Najwyższą zawartość mykotoksyn odnotowano w kontroli (obiekt 1; 352,6 µg/kg) i kontroli ozonowanej (obiekt 2; 342,5 µg/kg). Najwyższą skuteczność w redukcji stężenia mykotoksyn wykazała kompleksowa ochrona z uwzględnieniem octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 10; 41,8 µg/kg) i bez ozonowania (obiekt 6; 40,3 µg/kg) (Rys. 8). DON i toksyna HT-2 występowały w najwyższych stężeniach i osiągnęły wartości 171,6 µg/kg i 156,3 µg/kg w przypadku kontroli oraz 151,5 µg/kg i 167,2 µg/kg w kontroli ozonowanej (Tabela 14). Suma stężeń mykotoksyn HT-2 i T-2 powyżej 50 µg/kg jest wartością nieakceptowaną, która świadczy o tym, że ziarno nie nadaje się

do spożycia. W większości obiektów doświadczalnych stężenie tych mykotoksyn przekroczyło 50 µg/kg, za wyjątkiem obiektów 3, 5, 6, 9,10.

Tabela 14. Stężenia mykotoksyn w ziarnie pszenicy w doświadczeniu wazonowym (µg/kg).

Obiekt	3-ACDON	DON	HT-2	T-2	Suma HT-2 i T-2
1	6,4	**171,6**	156,3	**18,2**	174,6
2	**6,7**	151,5	**167,2**	17,1	**184,4**
3	4,3	27,3	32,4	14,1	46,5
4	3,8	31,5	94,5	*0,4*	94,9
5	4,7	22,4	25,6	9,1	34,7
6	3,1	*12,3*	19,4	5,6	25,0
7	3,2	32,4	39,6	12,4	52,0
8	4,1	27,8	44,1	6,1	50,3
9	3,4	89,7	13,2	7,6	20,8
10	*2,7*	24,6	*10,7*	3,8	*14,5*

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
Wartość pogrubiona- maksymalne stężenie; *Wartość pochylona* – minimalne stężenie

W przypadku **doświadczenia poletkowego**, stężenie mykotoksyn było najwyższe również w kontroli (obiekt 1; 101,8 µg/kg) i kontroli ozonowanej (obiekt 2; 100,3 µg/kg). Najwyższą skuteczność w redukcji stężenia mykotoksyn wykazała kompleksowa ochrona z uwzględnieniem octu winnego, nasion gorczycy w proszku i chlorowodorku chitozanu bez ozonowania (obiekt 6; 8,9 µg/kg) i w połączeniu z ozonowaniem (obiekt 10), w której nie wykryto występowania mykotoksyn (Rys. 8). Dużą skutecznością charakteryzowała się także aplikacja octu winnego (obiekt 3), która skutkowała brakiem występowania mykotoksyn w ziarnie pszenicy. DON i toksyna HT-2 występowały w najwyższych stężeniach i osiągnęły wartości 47,7 µg/kg i 47,4 µg/kg w przypadku kontroli oraz 44,6 µg/kg i 49,2 µg/kg w kontroli ozonowanej (Tabela 15). Przekroczenie

sumy stężeń mykotoksyn HT-2 i T-2 (50 µg/kg) osiągnięto jedynie na obiektach niepoddawanych zabiegom (obiekt 1 i 2), podczas gdy ziarno pozyskane z obiektów poddanych zabiegom jest bezpieczne ze względu na niską zawartość mykotoksyn.

Tabela 15. Stężenia mykotoksyn w ziarnie pszenicy w doświadczeniu poletkowym (µg/kg).

Obiekt	3-ACDON	DON	HT-2	T-2	Suma HT-2 i T-2
1	**2,0**	**47,7**	47,4	**4,8**	52,2
2	1,8	44,6	**49,2**	4,8	**53,9**
3	*0,0*	*0,0*	*0,0*	*0,0*	*0,0*
4	*0,0*	*0,0*	29,5	0,1	29,6
5	*0,0*	*0,0*	7,5	*0,0*	7,5
6	*0,0*	3,7	5,2	*0,0*	5,2
7	*0,0*	*0,0*	10,7	*0,0*	10,7
8	*0,0*	8,2	13,4	1,9	15,3
9	*0,0*	23,6	3,9	*0,0*	3,9
10	*0,0*	*0,0*	*0,0*	*0,0*	*0,0*

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny
4 - Chlorowodorek chitozanu
5 - Nasiona gorczycy w proszku
6 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
7 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny
8 - Ozonowany materiał siewny + chlorowodorek chitozanu
9 - Ozonowany materiał siewny + nasiona gorczycy w proszku
10 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku

Wartość pogrubiona- maksymalne stężenie; *Wartość pochylona* – minimalne stężenie

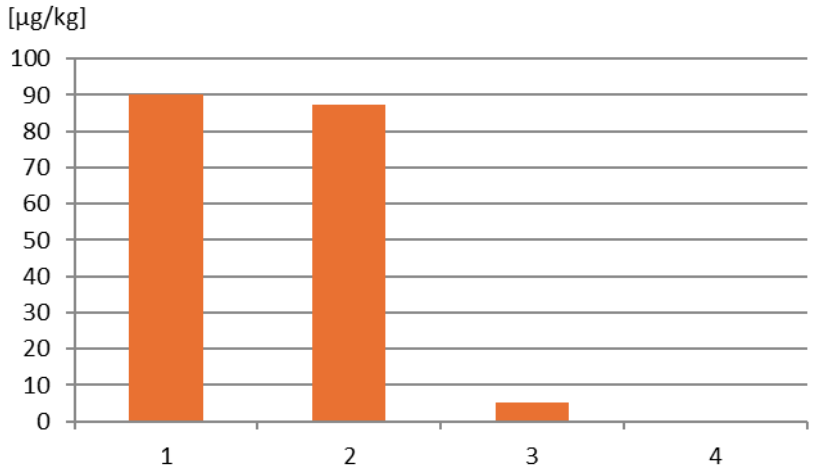
W **doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej**, stężenie mykotoksyn było najniższe we wszystkich obiektach, w porównaniu do doświadczenia wazonowego i poletkowego. Najwyższe stężenia sumy mykotoksyn odnotowano w kontroli i kontroli z ozonowanym materiałem siewnym (obiekty 1 i 2; odpowiednio 90,1 µg/kg i 87,5 µg/kg) (Rys. 10). Podobnie jak w doświadczeniu poletkowym, w przypadku kompleksowej ochrony z ozonowanym materiałem siewnym na polu produkcji wielkoskalowej nie stwierdzono występowania mykotoksyn. Niewielkie stężenie tych związków wykryto w wyniku przeprowadzonej kompleksowej ochrony bez ozonowania materiału siewnego (obiekt 3; 5,2 µg/kg). DON i toksyna HT-2 występowały w najwyższych stężeniach i osiągnęły wartości 42,1 µg/kg i 43,0 µg/kg w przypadku kontroli oraz 38,5 µg/kg i 45,7

µg/kg w kontroli ozonowanej (Tabela 16). W doświadczeniu polowym wielkoskalowym, suma stężeń mykotoksyn HT-2 i T-2 nie przekracza 50 µg/kg, co świadczy o tym, że nawet zboże z kontroli i kontroli ozonowanej (obiekt 1 i 2) nadaje się do konsumpcji.

Tabela 16. Stężenia mykotoksyn w ziarnie pszenicy w doświadczeniu poletkowym (µg/kg).

Obiekt	3-ACDON	DON	HT-2	T-2	Suma HT-2 i T-2
1	**1,5**	**42,1**	43,0	**3,5**	**46,5**
2	1,2	38,5	**45,7**	2,1	47,8
3	*0,0*	1,4	3,8	*0,0*	*0,0*
4	*0,0*	*0,0*	*0,0*	*0,0*	*0,0*

1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
4 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
Wartość pogrubiona- maksymalne stężenie; *Wartość pochylona* – minimalne stężenie



1 - Kontrola
2 - Ozonowany materiał siewny
3 - Ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku
4 - Ozonowany materiał siewny + ocet winny + chlorowodorek chitozanu + nasiona gorczycy w proszku

Rys. 10. Suma stężeń mykotoksyn w ziarnie pszenicy w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej.

5. Podsumowanie

- W niniejszych badaniach określono skuteczność działania fungicydowego octu winnego, chlorowodorku chitozanu i nasion gorczycy w proszku, ich kombinacji oraz połączenia z ozonowaniem materiału siewnego.
- Oznaczono parametry jakościowe i żywieniowe plonu, a także występowanie mykotoksyn w plonie pod wpływem zastosowania powyższych metod ochrony roślin.
- Kompleksowa ochrona uwzględniająca ocet winny, chlorowodorek chitozanu i nasiona gorczycy w proszku charakteryzowała się największą skutecznością w zwalczaniu chorób grzybowych pszenicy, w szczególności rdzy brunatnej, ostrej plamistości oczkowej i fuzariozy kłosów pszenicy.
- Kompleksowa ochrona charakteryzowała się uzyskaniem korzystnych parametrów jakościowych i żywieniowych plonu, w szczególności białka, glutenu i liczby sedymentacyjnej Zeleny'ego, świadczącej o jakości wypiekowej mąki i jej przydatności w przemyśle piekarniczym. Minimalne kryterium przydatności ziarna pszenicy do przemiału na mąkę wynosi 25, co wskazuje na to, że ziarno pozyskane w wyniku kompleksowej ochrony połączonej z ozonowaniem materiału siewnego w doświadczeniu poletkowym i polowym produkcji wielkoskalowej spełnia te wymagania.
- Spośród 20 badanych aminokwasów, największym stężeniem w ziarnie pszenicy charakteryzowały się kwas asparaginowy, asparagina i alanina. Aminokwasy te stymulują budowę masy mięśniowej i produkcję testosteronu oraz wpływają na detoksykację organizmu.
- Kompleksowa ochrona skutkowała uzyskaniem najniższego stężenia szkodliwych dla zdrowia mykotoksyn w ziarnie, szczególnie toksyny HT-2, której chroniczne spożycie w pożywieniu prowadzi do osłabienia układu odpornościowego, zaburzeń hormonalnych i potencjalnych skutków kancerogennych.
- Brak przekroczenia najwyższego dopuszczalnego poziomu sumy stężeń mykotoksyn HT-2 i T-2 (50 µg/kg) został odnotowany w obiektach poddanych zabiegom doświadczenia poletkowego oraz we wszystkich obiektach doświadczenia polowego produkcji wielkoskalowej, co świadczy o tym, że zboże w tych kombinacjach nadaje się do konsumpcji.

- Kompleksowa ochrona w doświadczeniu polowym produkcji wielkoskalowej charakteryzowała się niższą fitotoksycznością, większą skutecznością zastosowanych metod ochrony przed chorobami grzybowymi (zwłaszcza przed brunatną plamistością liści i fuzariozą kłosów), większym plonem i lepszymi parametrami jakościowymi ziarna, większym stężeniem aminokwasów i mniejszą zawartością szkodliwych dla zdrowia mykotoksyn, w porównaniu do analogicznej ochrony w doświadczeniu wazonowym z inokulacją grzybem patogenicznym *F. culmorum* i do doświadczenia poletkowego.
- Stwierdzono, że ozonowanie materiału siewnego przyczynia się w niewielkim stopniu do zwiększenia skuteczności ograniczania chorób grzybowych i uzyskania plonu o lepszych parametrach jakościowych.
- Ze względu na powierzchowną dezynfekcję materiału siewnego przez ozon, technika ozonowania może być wykorzystana do zwiększenia trwałości przechowywanego zboża.
- Niniejsze badania posłużyły opracowaniu przewodnika wraz z wytycznymi w zakresie rodzaju i sposobu stosowania octu winnego, chlorowodorku chitozanu, nasion gorczycy w proszku i ich kombinacji w ekologicznej uprawie pszenicy.
- Przeprowadzone badania są fundamentem przygotowania nowych, skutecznych programów ochrony pszenicy uprawianej w systemie ekologicznym.
- Badania realizowane w ramach niniejszego projektu wychodzą naprzeciw potrzebom rolnictwa i poza wysoką wartością naukową mają szansę znaleźć właściwe miejsce na szczeblu producentów żywności ekologicznej oraz organów kształtujących i realizujących politykę rolnictwa ekologicznego, a także politykę bezpieczeństwa żywności.

6. Bibliografia:

1. Abdallah, I., Yehia, R., Kandil, M.Ah., 2020. Biofumigation potential of Indian mustard (Brassica juncea) to manage Rhizoctonia solani. Egypt J. Biol. Pest Control. 30, 99.
2. Al-Tawaha, A.M., Al-Ghzawi, A., 2013. Response of barley cultivars to chitosan application under semi-arid conditions. Res. Crop. 14, 427-430.
3. Antonissen G., Martel A., Pasmans F., Ducatelle R., Verbrugghe E., Vandenbroucke V., Li S., Haesebrouck F., Van Immerseel F., Croubels S. 2014. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. Toxins, 6: 430–452.
4. Chalermsan, Y., Peerapan, S., 2009. Wood vinegar: by-product from rural charcoal kiln and its role in plant protection. Asian J. Food Agro-Ind. 2, 189-195.
5. EPPO. 2014. PP1/135(4) Phytoxicity assessment. Bulletin OEPP/EPPO, 44: 265-273.
6. Fones, H., Gurr, S. 2015. The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. Fungal Gen. Biol. 79: 3-7.
7. Guan, Y.J., Hu, J., Wang, X.J., Shao, C.X., 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 10, 427-433.
8. Hu, X., Ma, J., Qian, W., Cao, Y., Zhang, Y., Liu, B., Tang, L., Cao, W., Zhu, Y., Liu, L., 2022. Effects of low temperature on the amino acid composition of wheat grains. Agronomy, 12, 1171.
9. Iwaniuk P., Konecki R., Snarska, K., Łozowicka B. 2018. Quantitative evaluation of Fusarium species and crop quality traits in wheat varieties of northeastern Poland. J. Plant Prot. Res. 58, 413-419.
10. Iwaniuk P., Łozowicka B., Kaczyński P., Konecki R. 2021. Multifactorial wheat response under Fusarium culmorum, herbicidal, fungicidal and biostimulator treatments on the biochemical and mycotoxins status of wheat. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 20, 443-453.
11. Iwaniuk, P., Konecki, R., Kaczynski, P., Rysbekova, A., Lozowicka, B., 2022. Influence of seven levels of chemical/biostimulator protection on amino acid profile and yield traits in wheat. Crop J. 10, 1198-1206.
12. Kowalska J., Krzymińska J., Jakubowska M., Tyburski J., Gwiazdowski R., Łopatka L., Nowaczyk R. 2019. Uprawy polowe metodami ekologicznymi: optymalizacja sposobów zaprawiania materiału siewnego i nasadzeniowego stosowanego w rolnictwie ekologicznym (nr PJ.re. 027.7.2019).
13. Kowalska J., Krzymińska J., Jakubowska M., Antkowiak M., Kardasz P., Łukaszyk J., Łopatka L., Nowaczyk R. 2022. Uprawy polowe metodami ekologicznymi: badania w zakresie możliwości zastosowania dopuszczonych w rolnictwie ekologicznym środków do celów zaprawiania nasion roślin rolniczych oraz jako nawozów o działaniu dolistnym. Badania nad wykorzystaniem mikroorganizmów pożytecznych oraz substancji podstawowych do zaprawiania ziarna pszenicy jarej w kierunku optymalizacji jej uprawy (DEJ.re 027.4.2022).
14. Kowalska, J., Tyburski, J., Krzymińska, J., Jakubowska, M., 2021. Effects of seed treatment with mustard meal in control of Fusarium culmorum Sacc. and the growth of common wheat (Triticum aestivum ssp. vulgare). Eur. J. Plant Pathol. 159, 327-338.
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
16. Łozowicka, B., Miciński, J., Zwierzchowski, G., Kowalski, I.M., Szarek, J., 2012. Monitoring study of pesticide residues in cereals and foodstuff from Poland. Pol. J. Environ. Stud. 21, 1703-1712.
17. Łozowicka, B., Kaczyński, P., Paritova, A.E., Kuzembekova, G.B., Abzhalieva, A.B., Sarsembayeva, N.B., Alihan, K., 2014. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. Food Chem. Toxicol. 64.
18. Łozowicka B., Kaczyński P., Iwaniuk P. 2021a. Analysis of 22 free amino acids in honey from Eastern Europe and Central Asia using LC-MS/MS technique without derivatization step. Journal of Food Composition and Analysis, 103837.
19. Łozowicka, B., Iwaniuk, P., Konecki, R., Kaczyński, P., Kuldybayev, N., Dutbayev, Y., 2022. Impact of diversified chemical and biostimulator protection on yield, health status, mycotoxin level, and economic profitability in spring wheat (Triticum aestivum L.) cultivation. Agronomy, 12, 258.

20. Ma, Y., Gentry, T., Hu, P., Pierson, E., Gu, M., Yin, S., 2015. Impact of brassicaceous seed meals on the composition of the soil fungal community and the incidence of Fusarium wilt on chili pepper. Appl. Soil Ecol. 90, 41-48.
21. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Środki ochrony roślin spełniające wymogi produkcji ekologicznej (dostęp: 02.12.2022r.) Dostępny w internecie: https://www.gov.pl/web/rolnictwo/rodki-ochrony-roslin-spelniajace-wymogi-produkcji-ekologicznej
22. Mungkunkamchao, T., Kesmala, T., Pimratch, S., Toomsan, B., Jothityangkoon, D., 2013. Wood vinegar and fermented bioextracts: Natural products to enhance growth and yield of tomato (Solanum lycopersicum L.). Sci. Hortic. 154, 66-72.
23. Nugmanov, A., Beishova, I., Kokanov, S., Lozowicka, B., Kaczynski, P., Konecki, R., Snarska, K., Wolejko, E., Sarsembayeva, N., Abdigaliyeva, T. 2018. Systems to reduce mycotoxin contamination of cereals in the agricultural region of Poland and Kazakhstan. Crop Prot. 106, 64-71.
24. OECD/FAO Agricultural Outlook 2019-2028, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2019.
25. Peng, Y., Yan-zhi, G., Ling, Q., 2018. Effects of ozone-treated domestic sludge on hydroponic lettuce growth and nutrition. J. Integr, Agric. 17, 593-602.
26. Picchi, V., Monga, R., Marzuoli, R., Gerosa, G., Faoro, F., 2017. The ozone-like syndrome in durum wheat (Triticum durum Desf.): Mechanisms underlying the different symptomatic responses of two sensitive cultivars. Plant Physiol. Biochem. 112, 261-269.
29. Rutkowska E., Łozowicka B., Kaczyński P. 2020. Compensation of matrix effects in seed matrices followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues. Journal of Chromatography A, 1614, 460738.
30. Rodehutscord M., Ruckert C., Maurer H.P., Schenkel H., Schipprack W., Knudsen K.E.B., Schollenberger M., Laux M., Eklund M., Sieger W., Mosenthin R. 2016. Variation in chemical composition and physical characteristics of cereal grains from different genotypes. Arch. Anim. Nutr. 70: 87-107.
31. Rodrigues, V.O., Costa, F.R., Nery, M.C., Cruz, S.M., de Melo, S.G.F., de Carvalho, M.L.M., 2015. Treating sunflower seeds subjected to ozonization. J. Seed Sci. 37, 1288-1210.
32. SANTE., 2016., Document No. SANTE/12089/2016. Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed, https://ec.europa.eu/food/system/files/2017-05/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf (dostęp 14.12.2022).
33. SANTE., 2021. , Document No. SANTE 11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-02/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf (dostęp 14.12.2022).
34. Sarhan, E.A., El-Sayed, S.A., Abdelmaksoud, H.M., Elmarsafawy, T.S., 2020. Influence of biofumigation with mustard or canola seed meal in controlling soil-borne pathogenic fungi of chickpea. Egypt. J. Agric. Res., 98, 40-51.
35. Shaban, W.I., El-Barougy, E., Zian, A.H., 2011. Control of lupine Fusarium wilt by biofumigation with mustard and canola seed meal. Tun. J. Plant Prot. 6, 87-98.
36. Siddiqi, R.A., Singh, T.P., Rani, M., Sogi, D.S., Bhat, M.A., 2020. Diversity in grain, flour, amino acid composition, protein profiling, and proportion of total flour proteins of different wheat cultivars of North India. Front. Plant Nutr. 7, 141.
37. Simma, B., Polthanee, A., Goggi, A.S., Siri, B., Promkhambut, A., Caragea, P.C., 2017. Wood vinegar seed priming improves yield and suppresses weeds in dryland direct-seeding rice under rainfed production. Agron. Sustain. Develop. 37, 56.
38. Vazquez-Ybarra, J.A.,. Pena-Valdivia, C.B., Trejo, C., Villegas-Bastida, A., Benedicto-Valdez, S., Sánchez-García, P., 2015. Promoción del crecimiento de plantas de lechuga (Lactuca sativa L.) con dosissubletales de ozonoaplicadas al medio de cultivo. Rev. Fitotec. Mexic. 38, 405-413.
39. Zain, M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. J. Saudi Chem. Soc. 15: 129–144.
40. Zeng, D., Luo, X., 2012. Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. Open. J. Soil Sci. 2, 282-288.
41. Zhu, K., Gu, S., Liu, J., Luo, T., Khan, Z., Zhang, K., Hu, L., 2021. Wood vinegar as a complex growth regulator promotes the growth, yield, and quality of rapeseed. Agronomy, 11, 510.