

SPRAWOZDANIE

z badań podstawowych prowadzonych w 2021 roku
na rzecz rolnictwa ekologicznego

Kierownik Projektu: dr Regina Janas

Warzywnictwo ekologiczne, w tym uprawa ziół: badania w celu usprawnienia ekologicznej produkcji materiału rozmnożeniowego polegające na określeniu dobrych praktyk, standardów postępowania oraz opracowanie przewodnika wraz z wytycznymi w zakresie prowadzenia produkcji materiału rozmnożeniowego upraw warzywniczych w systemie rolnictwa ekologicznego;

Opracowanie ekologicznych metod zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego cebuli z uwzględnieniem zasad dobrej praktyki oraz czynników optymalizujących produkcję nasienną w systemie rolnictwa ekologicznego wraz z wytycznymi (kompleksowy przewodnik – 2 letniej produkcji cebuli na nasiona).

na podstawie § 8 ust.1 pkt 2, ust.2 pkt 2 i ust.10 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. *w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa* (Dz. U. poz. 1170, z późn. zm)

decyzja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi
z dnia 31.03.2021 r., nr JPR.re.027.3.2021

DYREKTOR
Instytutu Ogrodnictwa –
Państwowego Instytutu Badawczego

.....
dr hab. Dorota Konopacka, prof. IO

Wykonawcy: dr Regina Janas, prof. dr hab. Lidia Sas-Paszt, dr Anna Lisek, dr Paweł Trzciński, mgr inż. Aleksandra Wojska, prof. dr hab. Mieczysław Grzesik



WSTĘP

Rolnictwo ekologiczne zyskuje coraz większe zainteresowanie nie tylko w krajach Unii Europejskiej ale przeradza się w trend ogólnoswiatowy. Zmiany w systemie produkcji roślin uprawnych wymusza zarówno niepokojące tempo degradacji i zanieczyszczenia środowiska, związane z tym postępujące ocieplenie klimatu, jak również rosnąca świadomość konsumentów, zainteresowanych w coraz większym stopniu wysoką jakością i prozdrowotnymi walorami żywności. Za nieodwracalnymi zmianami w tym zakresie podążają inicjatywy i prawodawstwo organizacji międzynarodowych i struktur światowych. Produkcja roślin w systemach ekologicznych staje się coraz większym przedmiotem zainteresowania Unii Europejskiej, która w ramach planowanej polityki rolnej w zakresie „zielonego ładu” planuje rozwój tej gałęzi produkcji rolnej. **Europejski „zielony ład”** wymaga **podejścia całościowego** (holistycznego), czyli udziału wszystkich działań i polityk UE. Konieczne są inicjatywy w szeregu ściśle powiązanych ze sobą dziedzin, np. w polityce rolnej, klimatycznej, środowiskowej, energetycznej, transportowej, przemysłowej, oraz w dziedzinie zrównoważonego finansowania. Przyjęte w 2020 r., projekty **Unijnej Strategii Bioróżnorodnościowej 2030** oraz **konkluzji** do tej Strategii, określają priorytetowe działania w zakresie m.in. wzmocnienia obszarów chronionych w Europie oraz **odbudowy zdegradowanych ekosystemów poprzez zwiększenie areалу rolnictwa ekologicznego, ograniczenie stosowania pestycydów, zmniejszenie ryzyka im towarzyszącego oraz sadzenie drzew. Bezpieczeństwo żywnościowe jest też priorytetem przyjętej przez UE strategii „Od pola do stołu” (od produkcji do konsumpcji), która ma pomóc UE osiągnąć neutralność klimatyczną do 2050 r. poprzez przestawienie obecnego systemu żywnościowego UE na model zrównoważony, m.in. przez znaczne ograniczenie stosowania pestycydów, środków przeciwdrobnoustrojowych i nawozów oraz zwiększenie produkcji ekologicznej.**

Zgodnie z powyższymi wymogami, krajowy system produkcji roślin ogrodnich musi być poddany szybkim procesom konwersji, zmierzającym do znaczącego zwiększenia powierzchni upraw w systemach ekologicznych, jak również sugestywnej zmiany świadomości młodych rolników, ukierunkowanej na podejmowanie decyzji o przestawianiu dotychczasowych systemów produkcji na ekologiczne.

Jedną z najważniejszych decyzji jaką musi podjąć producent gospodarujący metodami ekologicznymi jest **decyzja dotycząca stosowanego w gospodarstwie ekologicznego materiału siewnego a także ekologicznego wegetatywnego materiału rozmnożeniowego**. Decyzja w tym zakresie jest jedną z najważniejszych, gdyż nie tylko warunkuje uzyskanie certyfikatu produkcji ekologicznej, ale także wysokość i jakość plonów. Obowiązujące w tym zakresie prawo i przepisy stanowią, że materiał siewny użyty do wysiewu w produkcji ekologicznej powinien pochodzić z upraw ekologicznych oraz spełniać wymagania w zakresie wytwarzania, jakości oraz obrotu określonego w Ustawie o Nasiennictwie z dnia 9.11.2012 oraz rozporządzeń wykonawczych tej ustawy. Analogiczne przepisy dotyczą również stosowania w produkcji ekologicznej materiału rozmnożeniowego. Ustawodawstwo w tym zakresie dopuszcza odstępstwa - zastosowanie nie ekologicznych nasion i wegetatywnego materiału rozmnożeniowego, tylko w przypadku, gdy nie są one dostępne z produkcji ekologicznej. Producent ekologiczny musi również zmierzyć się z trudnym problemem ochrony roślin i nawożenia, w której zabrania się stosowania środków chemicznych (pestycydów) i nawozów sztucznych. Ograniczony asortyment biologicznych środków ochrony jest nadal elementem zaporowym przy podejmowaniu decyzji o konwersji.

Zachowanie **standardów wysokiej skuteczności środków** ochrony stosowanych w ekologicznej ochronie roślin uprawnych jest bardzo złożone i trudne, zwłaszcza w przypadku środków mikrobiologicznych opartych na żywych mikroorganizmach.

Do najważniejszych kryteriów, warunkujących wysoką skuteczność mikroorganizmów, zwalczających patogeny należy zaliczyć:

- wprowadzenie antagonisty (grzyba, bakterii pożytecznej) na powierzchni rośliny przed wystąpieniem infekcji,
- antagonistę powinien charakteryzować się wysoką zdolnością do kolonizacji zmienionej powierzchni roślin, szybkim wzrostem, zdolnością do wykorzystania składników odżywczych, oraz większą

zdolnością do przeżycia i rozwoju niż patogen w szerokim zakresie temperatur, pH i ciśnienia osmotycznego,

- wykazywać się skutecznością nawet w niskich stężeniach oraz mieć szerokie spektrum działania,
- powinien być stabilny genetycznie, nie powinien produkować metabolitów szkodliwych dla zdrowia ludzi i zwierząt oraz nie być fitotoksyczny i nie wywierać szkodliwego działania na surowiec,
- powinien również charakteryzować się odpornością na pestycydy,
- poszerzać spektrum aktywności po łącznym stosowaniu z innymi środkami stosowanymi w uprawach ekologicznych (synergia).

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem m.in. mikroorganizmów pożytecznych wyizolowanych i zdeponowanych w Symbio Banku Instytutu Ogrodnictwa - PIB w Skierniewicach do zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego cebuli, przeznaczonego do reprodukcji nasion, wskazują na utrzymywanie wymaganych standardów w zakresie stabilności działania i ochrony plantacji nasiennej cebuli oraz stymulacji produktywności materiału rozmnożeniowego.

Celem badań było opracowanie ekologicznych metod zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego cebuli uprawianej na nasiona zgodnych z zasadami dobrej praktyki oraz opracowanie drugiej części przewodnika wraz z wytycznymi w zakresie prowadzenia produkcji nasiennej cebuli (II rok uprawy).

Podzadanie 1. Selekcja nośników dla szczepów pożytecznych mikroorganizmów oraz opracowanie składu biopreparatów przydatnych w zwiększeniu potencjału plonotwórczego materiału rozmnożeniowego cebuli w systemach ekologicznych.

W ramach prac związanych z podzadaniem 1 wykonano następujące analizy:

1. Selekcja nośników dla mikroorganizmów przeznaczonych do aplikacji w uprawie nasiennej cebuli

Materiał i metody

W ramach podzadania badano wpływ wybranych nośników na przeżywalność bakterii. Testowano następujące **nośniki: maltodekstryna** (forma stała – liofilizat), **sorbitol** (forma stała – liofilizat), **mannitol** (forma stała – liofilizat), **trehaloza** (forma stała – liofilizat), **kwasy humusowe** (forma płynna) oraz **biowęgiel** (forma stała). W celu przygotowania formułacji bakterii, mikroorganizmy hodowano przez 72 godziny na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej w pożywce płynnej o składzie: pepton sojowy (5 g), ekstrakt drożdżowy (3 g), glukoza (1 g), woda destylowana (1000 g). Temperatura inkubacji 20-22°C. Następnie, w przypadku przygotowywania liofilizatów, zawiesinę bakteryjną połączono w stosunku 9:1 z maltodekstryną, sorbitolem, mannitolem lub trehalozą. Tak przygotowane zawiesiny zamrożono w temperaturze -80°C, a następnie poddano liofilizacji (liofilizator model: alpha 1-4 LD plus, producent: Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) przy ciśnieniu 0.05 mBar, temperaturze -50°C przez 24 godziny. W przypadku płynnej formułacji, kwasy humusowe (TotalHumus, producent THE Sp. z o.o.) połączono z zawiesiną bakteryjną w stosunku 2:1. Stałą formułację uzyskano poprzez połączenie zawiesiny bakteryjnej z biowęglem, w stosunku 2:8 i wysuszenie w temperaturze 40°C powstałej w ten sposób mieszaniny.

W przygotowanych w ten sposób formułacjach oszacowano populację bakterii po 3 i 14 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej. Liczebność bakterii określono przy użyciu posiewów kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń na powierzchni pożywki Plate Count Agar.

2. Określenie właściwości biologicznych gleby po zastosowaniu biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie

Materiał i metody

W ramach podzadania oszacowano wpływ aplikowanych bakterii oraz nośników z bakteriami na populację wybranych grup mikroorganizmów: ogólną liczebność grzybów mikroskopowych, ogólną liczebność bakterii, bakterii *Pseudomonas* spp., promieniowców oraz bakterii wytwarzających

formy przetrwalnikowe. Materiał badawczy stanowiła gleba pobrana z korzeni roślin. Rośliny przed wysadzeniem traktowano konsorcjami bakterii i następnie uprawiano przez 2 miesiące w doniczkach zawierających glebę z 5 % dodatkiem torfu odkwaszonego o pH 5,5–6,5. Po 2 miesiącach pobrano korzenie roślin wraz z przylegającą do nich glebą ryzosferową do analiz mikrobiologicznych. Glebę ryzosferową oddzielono od korzeni i następnie zawieszono w jałowej wodzie destylowanej. Zawiesiny, następnie, mieszano na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej przez 30 minut. Określenie liczebności wybranych grup mikroorganizmów przeprowadzono z zastosowaniem metody posiewu kolejnych rozcieńczeń zawiesin glebowych na pożywki agarowe.

3. Identyfikacja wyselekcjonowanych mikroorganizmów w glebie po zastosowaniu biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie.

Wykrywanie mikroorganizmów w glebie po aplikacji konsorcjów mikrobiologicznych do gleby techniką DGGE

Celem badań było określenie obecności w glebie szczepów bakterii aplikowanych do gleby w postaci **dwóch konsorcjów mikrobiologicznych oraz konsorcjów mikrobiologicznych połączonych z biowęgłem.**

Materiał i metody

W ramach badań przeprowadzono wykrywanie szczepów bakterii aplikowanych do gleby w oparciu o analizę genu rybosomalnego 16S rRNA z użyciem techniki DGGE (elektroforeza w denaturującym żelu gradientowym - denaturing gradient gel electrophoresis). **Technika DGGE umożliwia identyfikację mikroorganizmów w oparciu o DNA wyekstrahowany z gleby, bez konieczności kultuwowania mikroorganizmów na pożywkach.** Technika DGGE polega na rozdzieleniu pojedynczych amplikonów o tej samej długości, ale różniących się sekwencją, w żelu poliakrylamidowym, w gradiencie chemicznym (Hill i in., 2000). Technika ta była stosowana na przykład do oceny zróżnicowania bakteryjnego lub grzybowego kilku typów gleb uprawnych, gleb o zróżnicowanym poziomie nawożenia azotowego oraz gleb zanieczyszczonych chemicznie (Smalla i in. 2007; Hoshino i Morimoto 2008; Sun i in. 2014; Liu i in. 2015).

Próbki gleby pobrano z doświadczenia, w którym aplikowano do gleby konsorcja mikrobiologiczne lub konsorcja mikrobiologiczne w połączeniu z biowęgłem.

- **Konsorcjum 1** - zawierało szczep bakterii stymulujący wzrost roślin AF2020HAAA (*Bacillus* sp.) oraz szczep bakterii AF2020GYAB (*Bacillus* sp.), charakteryzujący się właściwościami syntezy auksyn i metabolitów toksycznych przeciwko *Verticillium dahliae*.
- **Konsorcjum 2** zawierało szczep bakterii stymulujący wzrost roślin Sp2020GYAD (*Enterobacter* sp./*Pantoea* sp.) oraz szczep CH2020GYBA (*Flavobacterium* sp.) charakteryzujący się zdolnością do degradacji chityny i syntezą metabolitów toksycznych przeciwko *V. dahliae*.

Zastosowano następujące kombinacje:

- I. Kontrola,
- II. Konsorcjum 1,
- III. Konsorcjum 2,
- IV. Konsorcjum 1 + biowęgiel,
- V. Konsorcjum 2 + biowęgiel.

Po 2 miesiącach od aplikacji biopreparatów pobrano próby gleby z głębokości 15-20cm.

Ekstrakcję DNA z 0,5 g gleby przeprowadzono w dwóch powtórzeniach dla każdej z kombinacji przy użyciu zestawu NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel). Ponadto, wyizolowano DNA z kultur bakterii rosnących na pożywkach mikrobiologicznych, ze szczepów wchodzących w skład konsorcjów. DNA izolowano ze szczepów bakterii AF2020HAAA (*Bacillus* sp.), AF2020GYAB (*Bacillus* sp.), Sp2020GYAD (*Enterobacter* sp./*Pantoea* sp.) oraz CH2020GYBA (*Flavobacterium* sp.), przy użyciu zestawu komercyjnego do izolacji DNA z bakterii i drożdży (GeneMatrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit for isolating DNA from bacteria and yeast, EURx). Koncentrację DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Do analiz przygotowano próby DNA w rozcieńczeniu 10 ng/μl.

Reakcje przeprowadzono z użyciem starterów 907-R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') oraz GC357-F zawierającego klamrę GC długości 40 pz (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') (Sass i in. 2001). Reakcje przeprowadzono w 10 cyklach (94°C 30s, 61°C 60s, 72°C 60s), a następnie w 20 cyklach (94°C 30s, 56°C 60s, 72°C 60s) w mieszaninie o objętości 20 μl, zawierającej bufor reakcyjny 1x, 0,2 mM dNTPs, 0,4 μM każdego startera, 0,5 U polimerazy DNA (AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase with Buffer I; ThermoScientific, Waltham, USA) oraz 20 ng matrycy DNA. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze S1000™ (BioRad, Hercules, USA). Obecność produktu PCR sprawdzono w 1,4% żelu agarozowym.

Analiza DGGE (elektroforeza w denaturującym żelu gradientowym - denaturing gradient gel electrophoresis) bakteryjnego genu 16S rRNA - analizę DGGE przeprowadzono z użyciem systemu do wyrywania mutacji DCode™ (Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Żele poliakrylamidowe (37,5:1 akrylamid:bisakrylamid) w koncentracji 7% przygotowano w gradiencie chemicznym 30%-55%. Na żel poliakrylamidowy nakładano 10 μl każdej próby. Elektroforezę w buforze 1xTAE prowadzono przez 4,5 godz. w temperaturze 60°C przy napięciu 200V. Żele poliakrylamidowe barwiono z użyciem barwnika SYBR GREEN I (Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:10 000 przez 30 minut. Elektroforegramy dokumentowano przy użyciu systemu do dokumentacji żeli (GelDoc-It® Imaging System, UVP, Upland USA).

4. Identyfikacja izolatów bakterii w oparciu o analizę sekwencji genu kodującego 16S rRNA oraz genów warunkujących podstawowe funkcje komórki.

Celem badań była identyfikacja molekularna izolatów bakterii ryzosferowych wykazujących właściwości pożyteczne dla wzrostu i plonowania roślin ogrodniczych.

Materiał i metody

Identyfikację szczepów bakterii technikami molekularnymi przeprowadzono dla 15 izolatów bakterii pozyskanych ze strefy ryzosferowej roślin ogrodniczych, wykazujących właściwości pożyteczne dla wzrostu i plonowania roślin: AF150ABA, AF150ABB, AF150AC, AF150AD, AF150AE, AF150AF, AF150AG, AF150Ai, AF150AJ.

Materiałem biologicznym były kolonie bakterii kulturowane na pożywkach mikrobiologicznych. Ekstrakcję DNA przeprowadzono z użyciem zestawu komercyjnego GeneMatrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx) do izolacji DNA z bakterii i drożdży. Koncentrację DNA określono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Do analiz sporządzono rozcieńczenia 10ng/μl DNA.

Do identyfikacji izolatów bakterii zastosowano następujące techniki molekularne:

- analiza sekwencji w obrębie genu rybosomalnego 16S rRNA oraz 6 genów warunkujących podstawowe funkcje komórki: *rpoB*, *gyrA*, *recA*, *tuf* oraz *purH*.
- analiza z użyciem techniki rep-PCR, która umożliwia identyfikację bakterii na poziomie podgatunku lub szczepu.

Amplifikację genu 16S rRNA przeprowadzono w 35 cyklach (94 °C x 1 min, 55 °C x 1 min, 72°C x 2 min) z użyciem starterów 27f/1492r (Lane 1991). Reakcje z użyciem starterów specyficznych oraz reakcje amplifikacji genów *rpoB*, *gyrA*, *recA*, *tuf*, *purH* i *groEL* przeprowadzono według opisanych

warunków (Rodríguez i in. 2007; Xiao i in. 2009; Rooney i in. 2009; Caamaño-Antelo i in. 2015) (Tabela 4). Reakcje rep-PCR przeprowadzono z użyciem starterów BOX (Louws i in. 1994), w następujących warunkach termicznych: 37 cykli (94°C × 1 min., 40°C × 2 min., 72°C × 2 min.). Łącznie przeprowadzono reakcje PCR z użyciem 8 par starterów (Tabela 4).

Tabela 4. Startery zastosowane do identyfikacji izolatów bakterii

Lp.	Gen/region	Startery	Źródło
1.	16S rRNA	27f /1492r	Lane 1991
2.	<i>rpoB</i>	rpoBF/rpoBR	Xiao i in. 2009
3.	<i>gyrA</i>	gyrA47F/gyrA1066R	Xiao i in. 2009
4.	<i>recA</i>	recAF/recAR	Rodríguez i in. 2007
5.	<i>tuf</i>	tufGPF/tufGPR	Caamaño-Antelo i in. 2015
6.	<i>purH</i>	purH-70f/ purH-1013r	Rooney i in. 2009
7.	<i>groEL</i>	groEL-550f/ groEL-1497r	Rooney i in. 2009
8.	Sekwencje powtarzalne	BOXA1R	Louws i in. 1994

Produkty amplifikacji 16S rRNA, reakcji ze starterami specyficznymi oraz produkty reakcji rep-PCR rozdzielano w 1,6% żelu agarozowym. Żele agarozowe barwiono w bromku etydyny i wizualizowano w świetle UV. Identyfikację szczepów bakterii na podstawie uzyskanych sekwencji przeprowadzono przez porównanie z danymi zgromadzonymi w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5. Ocena stopnia zasiedlenia korzeni roślin cebuli przez arbuskularne grzyby mykoryzowe po aplikacji biopreparatów.

Material i metody

W miesiącu wrześniu 2021, pobrano fragmenty systemu korzeniowego (po 10 g z każdego powtórzenia) do oceny stopnia kolonizacji korzeni cebuli przez arbuskularne grzyby mykoryzowe (AGM). Pobrane fragmenty korzeni cebuli wybarwiono według metody opracowanej w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Ogrodnictwa (Derkowska i in. 2015). Z tak przygotowanych korzeni wykonano preparaty mikroskopowe wybierając po 30 fragmentów o długości około 1 cm, które układano równolegle na szkiełku podstawowym zawierającym glicerynę i rozgniatano szkiełkiem nakrywkowym. Przygotowane preparaty histologiczne analizowano przy użyciu mikroskopu Nikon 50i (obiektywy o powiększeniu: 20x, 40x, 60x, 100x) i wykonano dokumentację fotograficzną zaobserwowanych struktur mykoryzowych. Ocenę stopnia kolonizacji korzeni roślin cebuli przez arbuskularne grzyby mykoryzowe wykonano metodą Trouvelot (1986). Na podstawie uzyskanych wyników obliczano frekwencję mykoryzową (F%) oraz intensywność kolonizacji korzeni (M%, m%) przy wykorzystaniu programu komputerowego MYCOCALC, dostępnego na stronie internetowej: <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec-/Mycocalcprg/download.html> (Tabela 1, 2 i 3).

Wyniki

1. Selekcja nośników dla mikroorganizmów przeznaczonych do aplikacji w uprawie nasiennej cebuli

Najlepszymi nośnikami przy liofilizacji bakterii były trehaloza i mannitol (Tabela 1). Po 3 dniach inkubacji przeżywalność bakterii w odniesieniu do populacji wyjściowych wahała się od 18 do 63 % w przypadku mannitolu i 37 do 70% w przypadku trehalozy. Po użyciu maltodekstryny i sorbitolu jako krioprotektantów w procesie liofilizacji odnotowano duży spadek liczebności bakterii. W przypadku płynnej formulacji z kwasami humusowymi liczebność mikroorganizmów po 3 dniach inkubacji w odniesieniu do populacji wyjściowej wynosiła od 7,4 do 9,8%. Sucha formulacja z zastosowaniem biowęgla zapewniała przeżywalność na poziomie 19,5–29,6 % tylko w przypadku bakterii z rodzaju *Bacillus*.

Przechowywanie w temperaturze pokojowej wpłynęło na zmniejszenie liczebności bakterii w formulacji płynnej (Tabela 2). Nie zaobserwowano zmian w liczebności bakterii w suchych formulacjach pomiędzy populacją wyjściową (po 3 dniach inkubacji) i przechowywaną przez 17 dni.

Biorąc pod uwagę przeżywalność bakterii oraz aspekt ekonomiczny (cenę nośników) do dalszych testów z roślinami wybrano formulację na bazie mannitolu.

Tabela 1. Liczebność bakterii w płynie hodowlanym i w przygotowanych formulacjach.

Oznaczenie próbki	Liczebność bakterii w płynie hodowlanym [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Liofilizacja				Płynna formulacja	Sucha formulacja
		Maltodekstryna [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Sorbitol [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Mannitol [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Trehaloza [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Kwasy humusowe [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Biowęgiel [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]
AF2020HAAA (Bacillus sp.)	4,6 ± 1,1	< 1000	< 1000	2,3 ± 0,4	3,1 ± 0,3	0,5 ± 0	0,9 ± 0
Sp2020GYAD (Enterobacter sp./ Pantoea sp.).	15,1 ± 3,6	< 1000	< 1000	9,6 ± 2,2	9 ± 0,9	1,6 ± 0,5	0 ± 0
AF2020GYAB (Bacillus sp.)	2,7 ± 0,4	< 1000	< 1000	0,7 ± 0	1,5 ± 0,1	0,2 ± 0	0,8 ± 0,1
CH2020GYBA (Flavobacterium sp.)	5,4 ± 0,4	< 1000	< 1000	1 ± 0,1	2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0 ± 0

Tabela 2. Liczebność bakterii w przygotowanych formulacjach po 3 (*) i 17 (**) dniach inkubacji w temperaturze pokojowej.

Oznaczenie próbki	Mannitol * [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Mannitol ** [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Trehaloza * [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Trehaloza ** [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Kwasy humusowe * [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Kwasy humusowe ** [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Biowęgiel* [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Biowęgiel** [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]
AF2020HAAA (Bacillus sp.)	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,5	3,1 ± 0,3	2,6 ± 0,2	0,5 ± 0	< 1000	0,9 ± 0	0,9 ± 0
Sp2020GYAD (Enterobacter sp./ Pantoea sp.).	9,6 ± 2,2	10,3 ± 2,9	9 ± 0,9	9,1 ± 0,4	1,6 ± 0,5	< 1000	Nie badano	Nie badano
AF2020GYAB (Bacillus sp.)	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2	0,2 ± 0	< 1000	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0
CH2020GYBA (Flavobacterium sp.)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2 ± 0,2	2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	< 1000	Nie badano	Nie badano

2. Określenie właściwości biologicznych gleby po zastosowaniu biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie

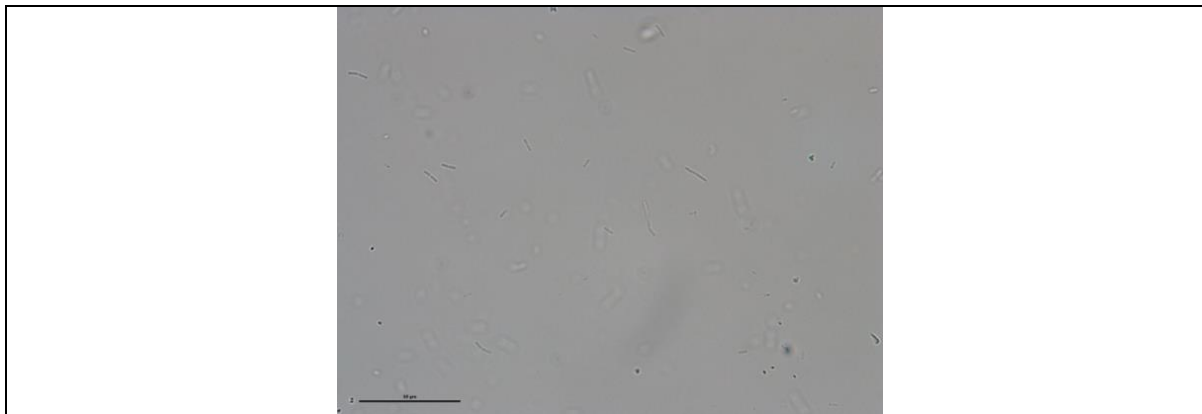
Odnotowano zróżnicowany wpływ aplikowanych konsorcjów i bioproduktów (nośników z bakteriami) na liczebność badanych grup mikroorganizmów (Tabela 3). W glebie spod roślin traktowanych Konsorcjum 1 odnotowano istotnie mniejszą liczebność grzybów mikroskopowych, bakterii *Pseudomonas* oraz promieniowców, w porównaniu do kontroli. Po aplikacji Konsorcjum 2 w glebie zaobserwowano istotnie większą liczebność grzybów mikroskopowych oraz istotnie mniejszą liczebność bakterii *Pseudomonas* spp. w porównaniu do kontroli. W przypadku zastosowania Konsorcjum 1 i nośnika (mannitolu) odnotowano zwiększenie ogólnej populacji bakterii w porównaniu z kontrolą. W porównaniu do kontroli, nie odnotowano istotnych statystycznie zmian populacji badanych grup mikroorganizmów w glebie spod roślin traktowanych Konsorcjum 2 wraz z nośnikiem.

Tabela 3. Porównanie liczebności wybranych grup mikroorganizmów po aplikacji bakterii. Wyniki analiz zweryfikowano testem HSD dla $\alpha=0.05$, przy użyciu programu Statistica 13. Średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się statystycznie.

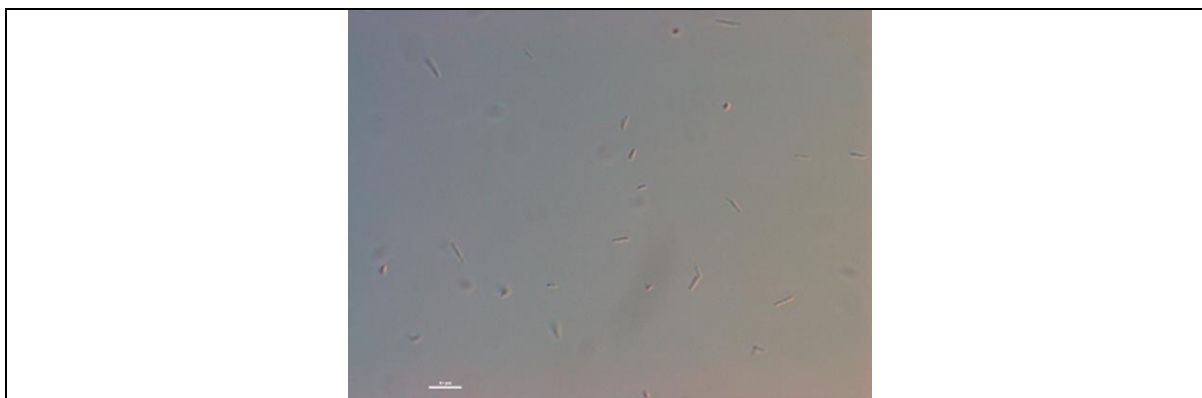
Oznaczenie próbek	Ogólna liczebność grzybów mikroskopowych [x 10 ⁵ jtk x g ⁻¹]	Ogólna liczebność bakterii [x 10 ⁸ jtk x g ⁻¹]	Ogólna liczebność bakterii <i>Pseudomonas</i> spp. [x 10 ⁵ jtk x g ⁻¹]	Ogólna liczebność bakterii <i>Pseudomonas</i> wytwarzających fluorescencyjny pigment [x 10 ⁵ jtk x g ⁻¹]	Ogólna liczebność przetrwalników bakteryjnych [x 10 ⁵ jtk x g ⁻¹]	Ogólna liczebność promieniowców [x 10 ⁵ jtk x g ⁻¹]
Kontrola	21,7 ± 2,4 b	8,1 ± 1,2 ab	4,8 ± 0,1 c	2,7 ± 0,5 b	52,2 ± 5,7 a	35,6 ± 6,3 b
Konsorcjum 1	10 ± 0 a	6,9 ± 0,9 a	1,2 ± 0,1 a	0,8 ± 0 a	53,8 ± 7,9 a	11 ± 1,4 a
Konsorcjum 2	47,1 ± 0 c	7,3 ± 0,7 ab	2,6 ± 0,2 b	1,3 ± 0,3 a	47,7 ± 15 a	37,1 ± 0 b
K1 plus mannitol	19,4 ± 0,9 b	15,1 ± 2 c	4 ± 0,5 c	1,5 ± 0,1 ab	40,5 ± 13 a	36,3 ± 3,5 b
K2 plus mannitol	22,9 ± 2 b	11,7 ± 0 bc	4,1 ± 0,4 c	1,7 ± 0,3 ab	32,7 ± 3,3 a	51,4 ± 6,1 b



Fot. 1. Morfologia komórek szczepu AF2020HAAA. Wymaz z 72 godzinnej kolonii wyrosłej na pożywce Plate Count Agar.



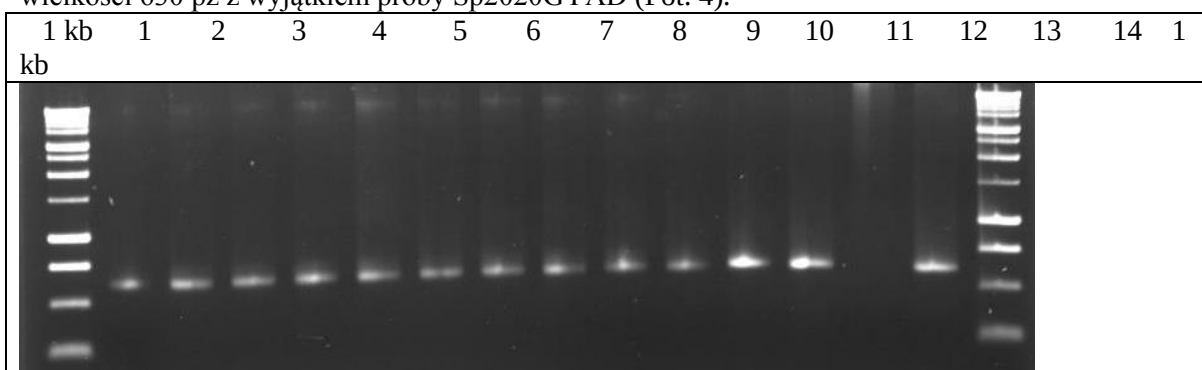
Fot. 2. Morfologia komórek szczepu AF2020GYAB. Preparat przyżyciowy pochodzący z 24 godzinnej hodowli, pożywka bulion 10% tryptonowo sojowy z 72 godzinnej kolonii wyrosłej na pożywce Plate Count Agar.



Fot. 3. Morfologia komórek szczepu AF2020HAAA. Preparat przyżyciowy pochodzący z 24 godzinnej hodowli, pożywka bulion 10% tryptonowo sojowy z 72 godzinnej kolonii wyrosłej na pożywce Plate Count Agar.

3. Identyfikacja wyselekcjonowanych mikroorganizmów w glebie po zastosowaniu biopreparatów wzbogaconych mikrobiologicznie.

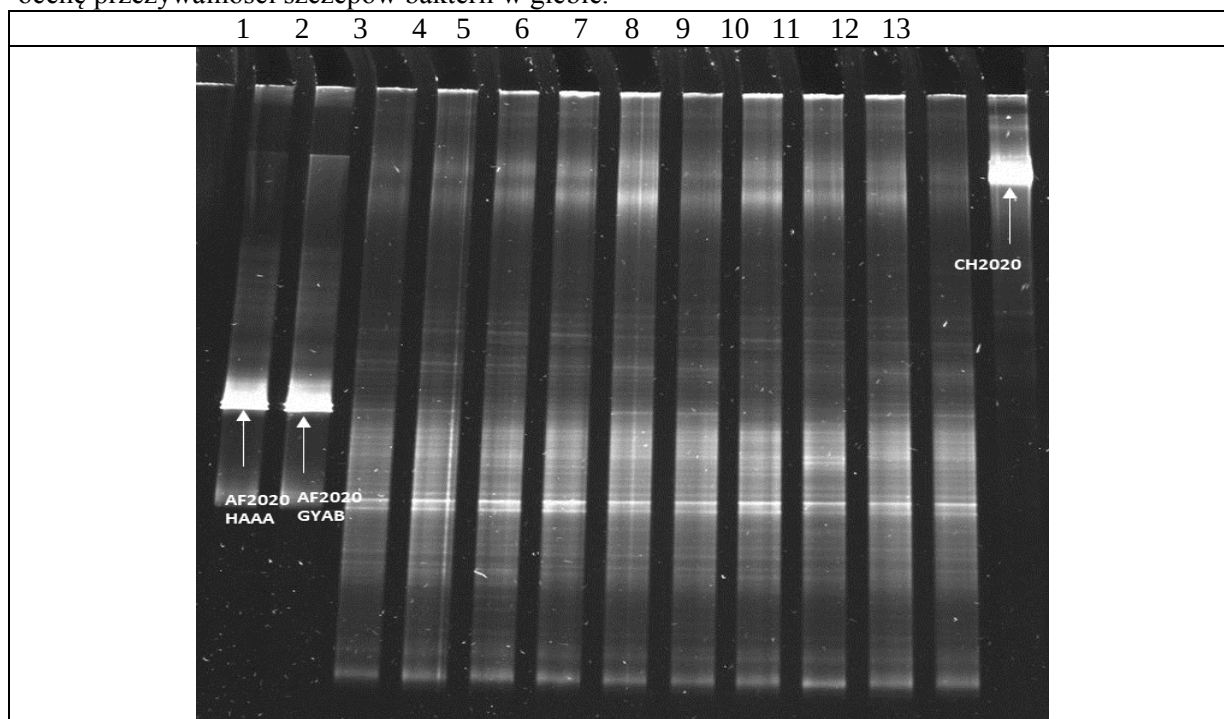
W wyniku przeprowadzonych reakcji ze starterami GC357-F /907-R uzyskano produkty PCR wielkości 630 pz z wyjątkiem próby Sp2020GYAD (Fot. 4).



Fot. 4. Produkty PCR wielkości 630 pz uzyskane w reakcji ze starterami GC357-F /907-R dla DNA pozyskanego z gleby oraz DNA uzyskanego z kolonii bakteryjnych szczepów kontrolnych. 1,2 - gleba kontrolna; 3-4 - Konsorcjum 1; 5, 6 - Konsorcjum 2; 7, 8 - Konsorcjum 1 + biowęgiew; 9, 10 - Konsorcjum 2 + biowęgiew; 11 - AF2020HAAA; 12 - AF2020GYAB; 13 - Sp2020GYAD; 14 - CH2020GYBA. 1 kb – marker wielkości.

W wyniku rozdzielenia produktów PCR w żelu poliakrylamidowym z gradientem chemicznym 30%-55% uzyskano elektroforegram przedstawiający obecność ampikonów genu 16S rRNA szczepów

kontrolnych oraz testowanych prób gleby (Fot. 5). Dla kontrolnych szczepów bakterii AF2020HAAA (*Bacillus* sp.), AF2020GYAB (*Bacillus* sp.) oraz CH2020GYBA (*Flavobacterium* sp.), z których wyizolowano DNA z kultur na pożywkach mikrobiologicznych, uzyskano fragmenty DNA charakteryzujące te szczepy bakterii. Nie stwierdzono obecności fragmentów DNA odpowiadających szczepom kontrolnym w testowanych próbach gleby. Uzyskany wynik może być spowodowany zbyt niską populacją szczepów bakterii w glebie, poniżej progu czułości zastosowanej metody. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność przeprowadzenia analiz w następnych sezonach wegetacyjnych w celu oceny obecności w glebie aplikowanych szczepów bakterii. Przeprowadzenie analiz w zróżnicowanych odstępach czasowych po aplikacji szczepów bakterii umożliwi bardziej precyzyjną ocenę przeżywalności szczepów bakterii w glebie.



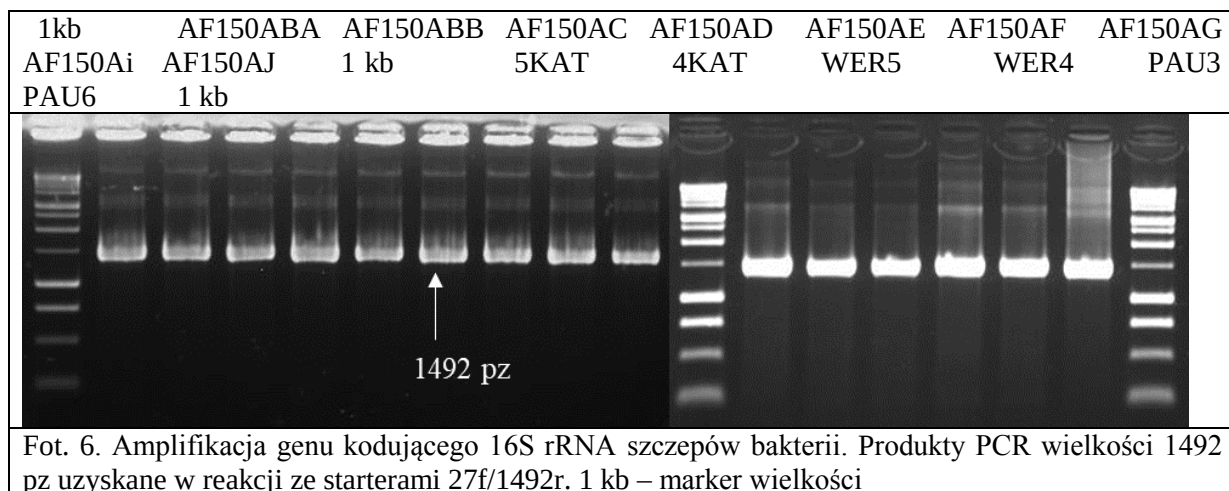
Fot. 5. Profile DGGE uzyskane w wyniku amplifikacji genu 16S rRNA ze starterami GC357-F /907-R. 1-AF2020HAAA; 2-AF2020GYAB; 3,4-gleba kontrolna; 5, 6-Konsorcjum 1; 7, 8-Konsorcjum 2; 9, 10 - Konsorcjum 1 + biowęgiel; 11, 12 - Konsorcjum 2 + biowęgiel; 13 - CH2020GYBA. Strzałkami oznaczono produkty amplifikacji kontrolnych szczepów bakterii.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki znajdują zastosowanie w identyfikacji szczepów bakterii wprowadzanych do gleby po aplikacji bioproduktów w ekologicznych uprawach roślin cebuli. Ponadto, uzyskane wyniki będą wykorzystane do charakterystyki molekularnej pożytecznych dla roślin mikroorganizmów, zdeponowanych w SymbioBanku Zakładu Mikrobiologii i Ryzosfery Instytutu Ogrodnictwa - PIB w Skierniewicach.

4. Identyfikacja izolatów bakterii w oparciu o analizę sekwencji genu kodującego 16S rRNA oraz genów warunkujących podstawowe funkcje komórki.

W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR ze starterami 27f/1492r w celu amplifikacji genu kodującego 16S rRNA uzyskano produkty wielkości 1492 pz (Fot. 6).



Sekwencje genów 16S rRNA 4KAT, 5KAT, 4WER, 5WER, PAU3, PAU6 wykazały podobieństwo do sekwencji w bazie NCBI w granicach 91,11 – 99,82% do sekwencji bakterii z rodzajów *Micrococcus* sp., *Paenibacillus* sp., *Priestia* sp., *Kocuria* sp., *Bacillus* sp. oraz *Rufibacter* sp. (Tabela 5). Identyfikacja izolatów AF150ABA, AF150ABB, AF150AC, AF150AD, AF150AE, AF150AF, AF150AG, AF150Ai, AF150AJ na podstawie sekwencji genów 16S rRNA, *rpoB*, *gyrA*, *recA*, *tuf* oraz *purH* wykazała 98-100% podobieństwo do sekwencji gatunków bakterii *Bacillus velezensis*, *B. amyloliquefaciens* lub *B. subtilis* (Tabela 6).

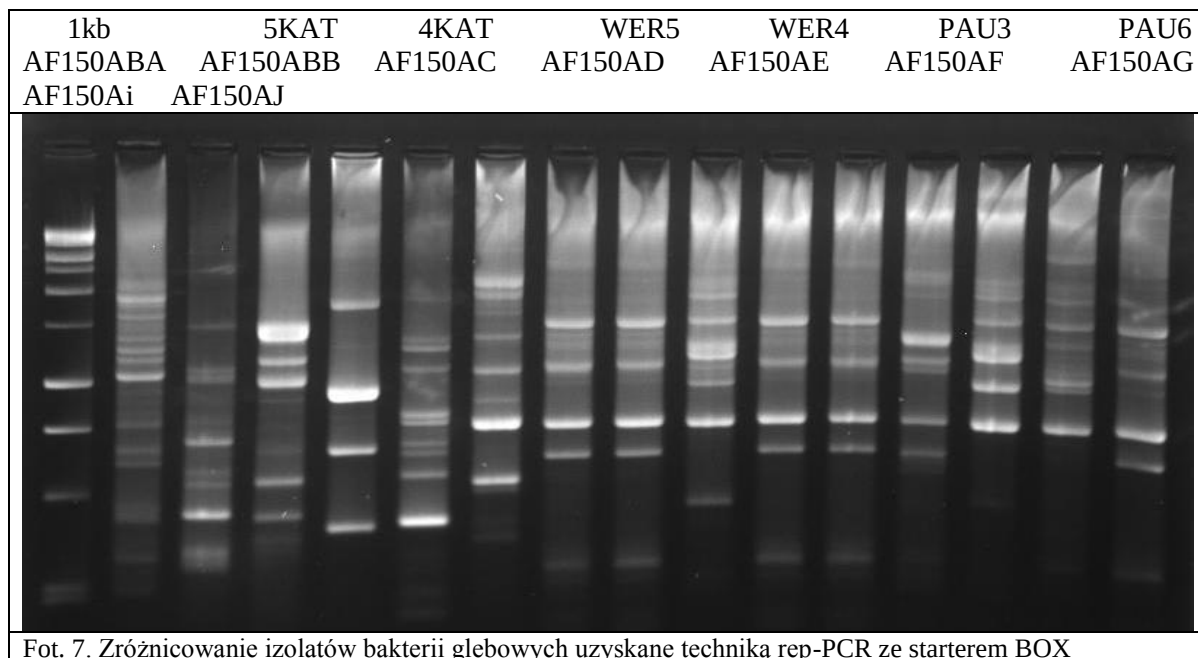
Tabela 5. Identyfikacja izolatów bakterii wyizolowanych z ryzosfery roślin ogrodniczych i wykazujących właściwości korzystne dla wzrostu i plonowania roślin.

Lp.	Nazwa izolatu	Długość sekwencji (pz)	Rodzaj/gatunek o największym podobieństwie	Nr sekwencji NCBI	Stopień podobieństwa (%)	Identyfikacja
1.	4KAT	504	<i>Micrococcus aloeverae</i>	NR_134088.1	99,6	<i>Micrococcus</i> sp.
			<i>Micrococcus yunnanensis</i>	NR_116578.1	99,6	
			<i>Micrococcus endophyticus</i>	NR_044365.1	99,4	
2.	5KAT	581	<i>Paenibacillus rhizoryzae</i>	NR_137245.1	94.15	<i>Paenibacillus</i> sp.
			<i>Paenibacillus albus</i>	NR_169406.1	93.64	
3.	4WER	510	<i>Priestia flexa</i>	NR_118382.1	98,43	<i>Priestia</i> sp.
			<i>Priestia megaterium</i>	NR_112636.1	98,43	
			<i>Priestia aryabhatai</i>	NR_118442.1	98,43	
4.	5WER	550	<i>Kocuria palustris</i>	NR_026451.1	99.82	<i>Kocuria</i> sp.
			<i>Kocuria assamensis</i>	NR_132604.1	99.64	
			<i>Kocuria massiliensis</i>	NR_169461.1	98.72	
5.	PAU3	395	<i>Bacillus cereus</i>	NR_115526.1	98,22	<i>Bacillus</i> sp.
			<i>Bacillus tropicus</i>	NR_157736.1	98,22	
			<i>Bacillus proteolyticus</i>	NR_157735.1	98,22	
6.	PAU6	406	<i>Rufibacter soli</i>	NR_169379.1	91.11	<i>Rufibacter</i> sp.
			<i>Rufibacter glacialis</i>	NR_147754.1	91.11	

Tabela 6. Identyfikacja izolatów bakterii w oparciu o analizę sekwencji genów 16S rRNA, *rpoB*, *gyrA*, *recA*, *tuf*, *purH* (% największego podobieństwa do sekwencji w bazie danych NCBI).

L p	Izolat	16S rRNA – podobieństwo (%)		<i>gyrA</i> – podobieństwo (%)		<i>purH</i> – podobieństwo (%)		<i>recA</i> – podobieństwo (%)		<i>rpoB</i> – podobieństwo (%)		<i>tuf</i> – podobieństwo (%)		Identyfikacja
1 .	AF150 ABA	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>
2 .	AF150 ABB	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>
3 .	AF150 AC	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	98	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>
4 .	AF150 AD	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>
5 .	AF150 AE	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>
6 .	AF150 AF	<i>Bacillus velezensis</i>	100	<i>Bacillus velezensis</i>	100	<i>Bacillus velezensis</i>	100	<i>Bacillus velezensis</i>	100	<i>Bacillus velezensis</i>	99	<i>Bacillus velezensis</i>	100	<i>Bacillus velezensis</i>
7 .	AF150 AG	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	98	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>
8 .	AF150 Ai	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i> /B. <i>subtilis</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i> /B. <i>subtilis</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i> /B. <i>subtilis</i>	98	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i> /B. <i>subtilis</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i> /B. <i>subtilis</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i> /B. <i>subtilis</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i> /B. <i>subtilis</i>
9 .	AF150 AJ	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>efaciens</i>	99	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>	100	<i>Bacillus amyloliqu</i> <i>uefaciens</i>

W wyniku przeprowadzonych reakcji BOX-PCR uzyskano profile DNA dla każdego z testowanych izolatów bakterii (Fot. 7). Takie same profile DNA uzyskano dla grupy 5 izolatów: AF150ABA, AF150ABB, AF150AD, AF150AE, AF150AJ oraz dla pary izolatów AF150AC i AF150AG. Wynik ten wskazuje na duże podobieństwo genetyczne izolatów bakterii o takich samych profilach DNA. Dla pozostałych izolatów uzyskano odmienne profile DNA.



Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że 7 spośród 15 testowanych izolatów bakterii AF150ABA, AF150ABB, AF150AD, AF150AE, AF150AJ, AF150AC, AF150AG należy do gatunku *Bacillus amyloliquefaciens* (Tabela 7). Izolat AF150AF należy do gatunku *Bacillus velezensis*, natomiast izolat AF150Ai należy do rodzaju *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens*/*B. subtilis*). Do rodzaju *Bacillus* należy także izolat PAU 3. Pozostałych 5 izolatów należy do różnych rodzajów: 4KAT - *Micrococcus* sp., 5KAT - *Paenibacillus* sp., 4WER - *Priestia* sp., 5WER - *Kocuria* sp., PAU6 - *Rufibacter* sp. Uzyskane wyniki znajdują zastosowanie do charakterystyki molekularnej pożytecznych dla roślin mikroorganizmów, zdeponowanych w SymbioBanku Instytutu Ogrodnictwa - PIB w Skierniewicach.

Tabela 7. Identyfikacja izolatów bakterii w oparciu o analizę sekwencji genów 16S rRNA, *rpoB*, *gyrA*, *recA*, *tuf*, *purH*, *groEL* oraz analizy techniką rep-PCR.

	Gatunek	Izolaty
1.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AF150ABA, AF150ABB, AF150AD, AF150AE, AF150AJ
2.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AF150AC, AF150AG
3.	<i>Bacillus velezensis</i>	AF150AF
4.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i>	AF150Ai
5.	<i>Micrococcus</i> sp.	4KAT
6.	<i>Paenibacillus</i> sp.	5KAT
7.	<i>Priestia</i> sp.	4WER
8.	<i>Kocuria</i> sp.	5WER
9.	<i>Bacillus</i> sp.	PAU3
10.	<i>Rufibacter</i> sp.	PAU6

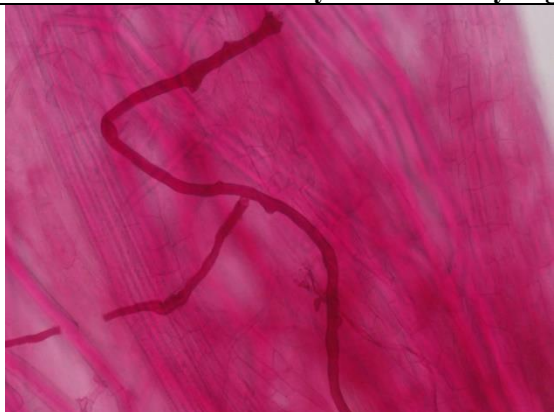
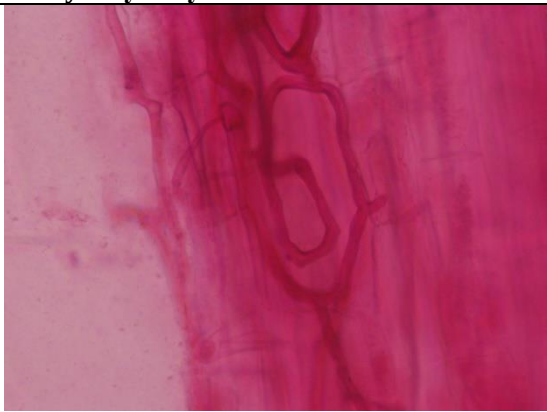
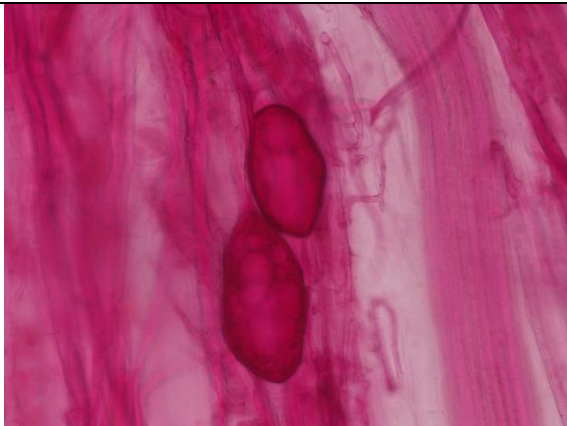
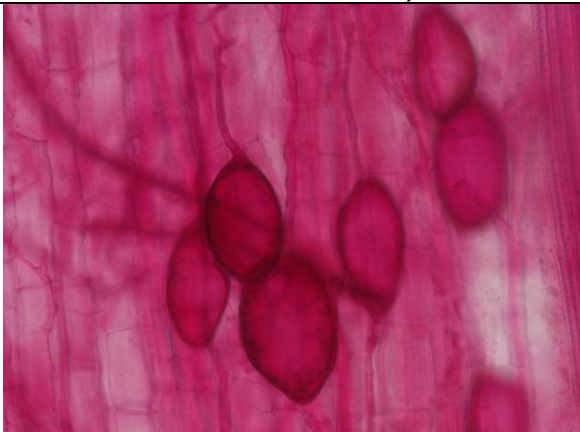
5. Ocena stopnia zasiedlenia korzeni roślin cebuli przez arbuskularne grzyby mykoryzowe po aplikacji biopreparatów.

W wyniku przeprowadzonych analiz laboratoryjnych stwierdzono, iż najwyższym stopniem frekwencji mykoryzowej charakteryzowały się korzenie roślin cebuli traktowane Konsorcjum 2 oraz Konsorcjum 2 w połączeniu z aplikacją biowęglą. Jednakże różnice te nie są istotne statystycznie. Mikroorganizmy będące komponentami Konsorcjum 2 wpłynęły również na zwiększenie stopnia względnej intensywności mykoryzowej (M%) w korzeniach roślin cebuli. Korzenie roślin kontrolnych uformowały najmniej struktur mykoryzowych w wyniku symbiozy z grzybami AGM (Tabela 8).

Tabela 8. Ocena kolonizacji korzeni roślin cebuli przez arbuskularne grzyby mykoryzowe po aplikacji konsorcjów mikroorganizmów (Zakład Mikrobiologii i Ryzosfery, Skierniewice 2021r.).

Traktowanie	F%	M%	m%	a%	A%
Kontrola	15.56 a	1.62 a	10.35 a	0	0
Konsorcjum 1	17.78 a	1.37 a	7.72 a	0	0
Konsorcjum 2	21.11 a	1.81 a	5.08 a	0	0
Konsorcjum 1 + biowęgiel	20.0 a	1.52 a	7.70 a	0	0
Konsorcjum 2 + biowęgiel	21.11 a	2.13 a	10.06 a	0	0

Zaobserwowane struktury arbuskularnych grzybów mykoryzowych w korzeniach roślin cebuli

	
Fot. 8. Grzybnia AGM w korzeniach roślin kontrolnych cebuli (Zakład Mikrobiologii i Ryzosfery, Skierniewice 2021r.).	Fot. 9. Zwoje grzybni AGM w korzeniach roślin cebuli traktowanych Konsorcjum 2 (Zakład Mikrobiologii i Ryzosfery, Skierniewice 2021r.).
	
Fot. 10. Wezykule w korzeniach roślin kontrolnych cebuli (Zakład Mikrobiologii i Ryzosfery, Skierniewice 2021r.).	Fot. 11. Wezykule w korzeniach roślin cebuli traktowanych Konsorcjum 2 (Zakład Mikrobiologii i Ryzosfery, Skierniewice 2021r.).

Podsumowanie

Aplikacja konsorcjów mikroorganizmów wpłynęła na zwiększenie formowania struktur arbuskularnych grzybów mykoryzowych i stopnia zasiedlania korzeni cebuli przez grzyby

mykoryzowe, w porównaniu do korzeni roślin nie inokulowanych mikroorganizmami. Jednakże różnice te nie są istotne statystycznie. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia wskazują na tendencję do korzystnego oddziaływania Konsorcjum 1, Konsorcjum 2 oraz Konsorcjum 2 w połączeniu z aplikacją biowęglu na zwiększenie występowania grzybów AGM w korzeniach roślin cebuli. Stosowanie pożytecznych mikroorganizmów w uprawie roślin warzywnych przyczyni się do przywrócenia równowagi mikrobiologicznej w glebie.

Podzadanie 2. Badania nad opracowaniem ekologicznych metod zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego cebuli zgodnie z zasadami dobrej praktyki rolniczej oraz opracowanie przewodnika II roku produkcji cebuli nasiennej w systemach ekologicznych.

Prowadzone w roku sprawozdawczym badania były kontynuacją doświadczeń rozpoczętych w 2020 roku w zakresie opracowania kompleksowej technologii produkcji cebuli na nasiona w systemach ekologicznych (cykl dwuletni). W II roku badań prowadzono badania w zakresie oceny produktywności materiału rozmnożeniowego (wyprodukowanego metodami ekologicznymi w I roku badań) i jego przydatność do reprodukcji nasion. Wsadki, będące materiałem rozmnożeniowym cebuli w produkcji nasiennej, przechowywano po sezonie wegetacyjnym przez okres zimowy (listopad – 10 kwietnia) w kontrolowanych warunkach, w komorach przechowalni Instytutu Ogrodnictwa. Oceniono wartość przechowalniczą i potencjał plonotwórczy wysadków oraz możliwości zwiększenia produktywności w II roku uprawy cebuli na nasiona.

W doświadczeniach uwzględniono kompleksowo oddziałujące środki biologiczne o zróżnicowanych mechanizmach działania: ochronnych, stymulujących oraz poprawiających biologiczne właściwości gleby. Wykorzystano produkty naturalne, środki biologiczne, mikroorganizmy pożyteczne SymbioBanku oraz bioprodukty wzbogacone mikrobiologicznie, wyselekcjonowane w I roku badań pod kątem najlepszej skuteczności ochronnej i stymulującej odporność roślin nasiennych oraz nowe szczepy mikroorganizmów antagonistycznych izolowane z ryzosfery wybranych gatunków roślin i gleb. Stosowano je w różnych stężeniach do zaprawiania materiału rozmnożeniowego cebuli oraz dolistnie/lub doglebowo w uprawach cebuli wysadkowej na nasiona. Określono wpływ zastosowanych metod biologicznych na produktywność materiału rozmnożeniowego oraz plon i jakość nasion otrzymanych z ekologicznych wysadków.

Metodyka badań

Wsadki po przechowaniu zimowym poddano **selekcji negatywnej**, eliminując materiał nietypowy, zdeformowany, ze zmianami chorobowymi (nekrozy), ze zmienioną barwą łuski. **Do doświadczeń przeznaczono wyłącznie zdrowy materiał rozmnożeniowy.**

W kolejnym etapie poddano go ponownej **kalibracji**, sortując na **dwie frakcje : wysadki o średnicy 4-5 cm (male) i 6-7cm (duże)**, celem uchwycenia różnic we wzroście, rozwoju, architekturze nasiennika i plonowaniu. Przed założeniem ścisłych doświadczeń wysadki z poszczególnych frakcji zostały **zaprawione biologicznie** przy pomocy **mikroorganizmów pożytecznych Symbio Banku IO-PIB** i/lub preparatu **BlackJak** (opartym na skoncentrowanej wodnej zawieszynie leonardyty), z wysoką zawartością kwasów ulmowych. W uprawach cebuli nasiennej działał on stymulująco na rozwój korzeni, ułatwia też pobieranie składników pokarmowych poprzez zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych korzeni, stymuluje wzrost i rozprzestrzenianie się pożytecznych organizmów glebowych, ogranicza wpływ negatywnych skutków uprawy gleby np. zasolenie a dodawany do nawozów dolistnych, poprawia ich przyswajalność.

Doświadczenia prowadzono w warunkach laboratoryjnych, halach wegetacyjnych (kontrolowane warunki temperatury i wilgotności) oraz polowych na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa - PIB w Skierniewicach. Badania prowadzono na materiale rozmnożeniowym (wysadkach) cebuli odmiany Density4, roślinach nasiennych, wytworzonych z wysadków oraz nasionach reprodukowanych z wysadków w II roku uprawy, zgodnie z założeniami zadania opracowanymi w 2020 roku dla uprawy roślin dwuletnich.

Oceniono następujące parametry (najważniejsze w produkcji nasiennej):

- zdrowotność materiału rozmnożeniowego przed wysadzeniem w polu i szklarni,
- aktywność fizjologiczną roślin,
- wzrost i rozwój roślin nasiennych,
- produktywność wysadków mierzoną:
 - liczbą wytworzonych pędów nasiennych,

- o masą nasion uzyskanych z roślin nasiennych, powstałych z ekologicznych wysadków,
- o jakością materiału siewnego reprodukowanego z ekologicznego materiału rozmnożeniowego.

Badane parametry weryfikowano w warunkach szklarniowych i polowych.

1. Badania i doświadczenia w warunkach szklarniowych

Odpowiednio wyselekcjonowany, kalibrowany i zaprawiony materiał rozmnożeniowy wysadzano w warunkach szklarniowych do podłoża glebowych przeznaczonych do upraw ekologicznych. Wysadki dwóch frakcji 4-5 cm i 6-7 cm wysadzano do 10 litrowych pojemników (doświadczenie wazonowe) po jednym wysadku w pojemniku. Doświadczenia założono w 3 powtórzeniach po 10 wysadków w każdym powtórzeniu. Podczas wegetacji rośliny traktowano środkami naturalnymi, mikrobiologicznymi i bioproduktami wzbogaconymi mikrobiologicznie.

Przyjęto następujący schemat traktowania roślin nasiennych cebuli (kombinacje):

1. Kontrola,
2. (M1) Bakterie 1 - Ps118AA *Pseudomonas* sp., X58AD *Pantoea* sp. – AF2020HAAA, AF2020GYAB *Bacillus* sp.,
3. (M2) Bakterie 2 - P.119AC, P.72ED *Enterobacter* sp.- Sp2020GYAD *Enterobacter* sp./*Pantoea* sp., CH2020GYBA *Flavobacterium* sp.,
4. (M1+D) Bakterie 1 - Ps118AA *Pseudomonas* sp., X58AD *Pantoea* sp.+ drożdże;
5. (M1+Kh) Bakterie 1 - Ps118AA *Pseudomonas* sp., X58AD *Pantoea* sp.+ kwasy humusowe,
6. Serwatka,
7. Polyversum,
8. Chlorella (BioAlga),
9. (M1+Ch) Bakterie 1 - Ps118AA *Pseudomonas* sp., X58AD *Pantoea* sp.+ BioAlga.

Oceniono wpływ testowanych środków na wzrost i rozwój roślin cebuli, metabolizm roślin, procesy jarowizacji, kwitnienia i zawiązywania nasion oraz architekturę roślin nasiennych i produktywność materiału rozmnożeniowego w kontrolowanych warunkach podłoża glebowych.

Prowadzono następujące pomiary i obserwacje:

- pomiary biometryczne i dynamikę wzrostu roślin określoną na podstawie wielokrotnych pomiarów ich wysokości;
- monitoring zależności metod traktowania i ich wpływ na rozpoczęcie poszczególnych faz fenologicznych (tworzenie liści właściwych, strzelanie w pęd nasienno, tworzenie pędów, kwitnienie, zawiązywanie nasion, dojrzałość zbiorcza nasion);
- indeks zawartości chlorofilu w siewkach (p.3) mierzony aparatem Minolta SPAD-502, Konica Minolta;
- aktywność wymiany gazowej w roślinach cebuli: fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa i stężenie międzykomórkowego CO₂, mierzone przy pomocy analizatora wymiany gazowej TPS-2, PP Systems, USA;
- monitoring zdrowotności roślin.

Prowadzone testy oceny wzrostu, metabolizmu i zdrowotności roślin są rutynowo stosowane i opracowane przez zespół nasiennictwa. Są powszechnie uznane za użyteczne markery aktywności metabolicznej oraz reakcji roślin na bodźce zewnętrzne, co stwierdzono w opublikowanych wynikach badań i często cytowanej fachowej literaturze krajowej i zagranicznej.

2. Doświadczenia polowe i ocena laboratoryjna

Wyniki badań laboratoryjnych i szklarniowych były weryfikowane w doświadczeniach polowych, prowadzonych na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach. Przedplonem dla cebuli nasiennej była koniczyna, uprawiana na tym stanowisku przez dwa kolejne lata. Doświadczenia zakładano w 4 powtórzeniach, w układzie losowanych bloków z wyłączoną kontrolą. Powierzchnia poletka wynosiła 9 m². Wysadki po selekcji, kalibrażu i zaprawianiu (analogicznie, jak opisane wyżej) wysadzano w polu 15.04.2021, optymalnym

terminie zalecanym przy wysadzaniu materiału rozmnożeniowego, przeznaczonego do reprodukcji nasion. Wsadki sadzono w dwóch rozstawach - kwadratowej 30 x 30 cm oraz prostokątnej 30 x 20 cm, zagęszczającej obsadę roślin, celem modyfikacji pokroju rośliny nasiennej. W doświadczeniach aplikowano środki naturalne, mikrobiologiczne i bioprodukty wzbogacone mikrobiologicznie wg. schematu podanego w opisie doświadczeń szklarniowych.

Zabiegi opryskiwania i/lub podlewania roślin badanymi środkami były wykonywane cyklicznie, co 7-10 dni z uwzględnieniem odpowiednich warunków pogodowych, opryskiwaczem ręcznym, ciśnieniowym, wyposażonym w lancę z końcówką o strumieniu stożkowym, zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Ochrony Roślin. Przyjęto hipotezę, że podstawą skutecznej ochrony ekologicznej cebuli przed chorobami (szczegółowo opisanymi w załączniku do sprawozdania – **II części Przewodnika – Możliwości zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego (wysadków) cebuli w systemach ekologicznych (II rok produkcja na nasiona)**), jest stosowanie różnych metod aplikacji środków ochrony:

- ✓ wprowadzanie środków do gleby przed wysadzaniem materiału rozmnożeniowego;
- ✓ podlewanie roślin w okresie wzrostu wegetatywnego;
- ✓ opryskiwanie roślin biostymulatorami wzrostu w celu odporności na niekorzystne warunki otoczenia i patogeny;
- ✓ opryskiwanie roślin w okresie wegetacji w zaawansowanym stadium rozwoju w okresie zagrożenia mączniakiem rzekomym (zgodnie z sygnalizacją i własnymi lustracjami sąsiednich plantacji cebuli);
- ✓ stosowanie wymienionych środków w okresie przedzbiorczym cebuli w celu zabezpieczenia reprodukowanych nasion przed patogenami z rodzaju *Botrytis*, *Alternaria* i *Fusarium*;
- ✓ stosowanie bioatraktantów celem zwiększenia efektywności zapylania kwiatów przez owady zapylające. W doświadczeniach stosowano 3 krotnie opryski kwitnącej cebuli atraktantem Biopolin.

Począwszy od maja prowadzono systematyczną lustrację plantacji nasiennej i usuwano z niej rośliny z objawami porażenia przez choroby i szkodniki.

Obserwacje i oceny w doświadczeniach polowych

Oceniono:

- ✓ dynamika wzrostu roślin cebuli (pomiar biometryczne roślin);
- ✓ dynamika procesu jarowizacji;
- ✓ dynamika kwitnienia roślin;
- ✓ dynamika zawiązywania nasion;
- ✓ indeks zawartości chlorofilu w liściach, mierzony aparatem Minolta SPAD-502, Konica Minolta – dwukrotny pomiar podczas fazy wegetatywnego rozwoju oraz w fazie generatywnej;
- ✓ wymiana gazowa (fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa i stężenie międzykomórkowego CO₂) mierzona przy pomocy analizatora wymiany gazowej TPS-2, PP Systems, USA – dwukrotny pomiar – w fazie wegetatywnej i generatywnej;
- ✓ plon i jakość reprodukowanych nasion;
- ✓ lustracje upraw cebuli pod kątem infekcji pierwotnej patogenów;
- ✓ analizy mikrobiologiczne porażonych fragmentów roślin, pobranych w okresie wegetacji cebuli w celu diagnozy sprawców chorób;
- ✓ ocena porażenia roślin przez szkodniki oraz diagnostyka szkodliwej entomofauny;
- ✓ analizy zdrowotności reproduowanego w doświadczeniach materiału siewnego;
- ✓ ocena produktywności materiału rozmnożeniowego cebuli na podstawie uzyskanych danych z doświadczeń polowych.

Zbiór roślin nasiennych wykonano ręcznie, jednorazowo, gdy nasiona uzyskały czarną barwę i u 50% baldachów zaczynały pękać torebki nasienne (6.09.2021). Zbiory wykonano techniką ścinania główek baldachów z krótką częścią pędów nasiennych (8-10 cm). ścięte główki baldachów dosuszano przez dwa tygodnie w szklarni a następnie młócono i doczyszczano na zestawie maszyn Petcus. Po oczyszczeniu nasiona ponownie dosuszono i po 2 tygodniach od zbioru przeprowadzono analizy jakości i zdrowotności nasion. Wyniki badań zestawiono na rysunkach.

WYNIKI

W ramach projektu opracowano metody i zasady zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego, przeznaczonego do reprodukcji nasion w II roku uprawy. Wyniki zestawiono na rysunkach 1-106.

Wykazano, że środki biologiczne zastosowane do ekologicznego zaprawiania materiału rozmnożeniowego przed przechowywaniem, istotnie **zwiększyły zdrowotność wysadków** i ograniczyły porażenie fitopatogenami, głównie z rodzaju *Botrytis* i *Fusarium*. Po traktowaniu wysadków cebuli środkami biologicznymi (biopreparatami, naturalnymi substancjami, mikroorganizmami pożytecznych z SymbioBanku oraz bioproduktami wzbogaconymi mikrobiologicznie, zgodnie z metodyką I roku uprawy 2020r.) odnotowano **istotny spadek porażenia grzybami patogenicznymi** w porównaniu z obiektami kontrolnymi nie traktowanymi. **Najlepszą skuteczność ochronną podczas przechowywania materiału rozmnożeniowego** wykazywały bioprodukty wzbogacone mikroorganizmami z kombinacji **D + S + M2**, w skład której wchodziły drożdże, serwatka i bakterie z rodzaju *Enterobacter* oraz z **kombinacji na bazie drożdży (D)**. W wymienionych kombinacjach odnotowano **redukcję porażenia** w porównaniu do kontroli na **poziomie 86-91%**, odpowiednio dla średnicy wysadków 4-5 i 6-7 cm. Wymieniony kompleks naturalnych produktów wzbogaconych bakteriami probiotycznymi z rodzaju *Enterobacter*, wyizolowanymi z rizosfery cebuli w SymbioBanku, istotnie zwiększał zdrowotność materiału rozmnożeniowego.

W roku sprawozdawczym rekomendowano do badań środki z I roku uprawy, najbardziej przydatne w uprawach cebuli nasiennej, ze względu na szerokie spectrum właściwości ochronnych, stymulujących odporność roślin oraz wzbogacających kompleks glebowy w mikroorganizmy pożyteczne. Ponadto wprowadzono nowe mikroorganizmy antagonistyczne wyizolowane w Symbio Banku IO – PIB oraz bioprodukty wzbogacone mikrobiologicznie.

W większości prowadzonych badań w warunkach szklarniowych, polowych i laboratoryjnych (następca ocena wpływu aplikacji mikroorganizmów w uprawach polowych, na jakość reprodukowanych nasion), wyróżniały się bioprodukty wzbogacone bakteriami antagonistycznymi z Symbio Banku M1 +D (na bazie bakterii antagonistycznych z rodzaju *Pseudomonas*, *Pantoea* i *Bacillus* i drożdży) oraz M1 + Ch (bakterie antagonistyczne z rodzaju *Pseudomonas*, *Pantoea* i *Bacillus* i chlorella – preparat Bioalga).

Mikroorganizmy antagonistyczne zastosowane w kompleksie z drożdżami lub algami (chlorella), stosowane **do zaprawiania wysadków oraz aplikowane w uprawach szklarniowych i polowych, zintensyfikowały efekty ochronne oraz stymulowały wzrost i rozwój roślin nasiennych** w rezultacie czego stwierdzono **zwiększoną aktywność fizjologiczną roślin**, mierzoną wymianą gazową, zawartością chlorofilu w liściach oraz cechami biometrycznymi w porównaniu z kontrolą i pozostałymi kombinacjami. Wymienione konsorcja mikrobiologiczne połączone z drożdżami lub algami **indukowały również rozwój roślin nasiennych w fazie generatywnej**. Po ich aplikacji w uprawach cebuli nasiennej, rośliny wcześniej przechodziły z fazy wegetatywnej w generatywną, strzelały w pędy nasienne i zakwitały. **Rośliny nasienne wytwarzały większą ilość i masę pędów nasiennych** i w rezultacie otrzymano **większe plony** w porównaniu do innych kombinacji i kontroli. Było to również uzależnione od średnicy wysadków i rozstawy roślin. Z większych wysadków (6-7 cm) i rozstawy 30x 30 cm uzyskano więcej pędów nasiennych, i bardziej rozbudowany pokrój nasiennika (architektura nasiennika) w porównaniu z wysadkami małymi i analogicznymi doświadczeniami, prowadzonymi w rozstawie 30x20 cm. Zastosowanie zgodnie z przyjętą metodyką środków biologicznych i bioproduktów istotnie **zwiększyło jakość (energię i zdolność kiełkowania), zdrowotność i dorodność (mierzoną masą tysiąca nasion)** reprodukowanych w doświadczeniach nasion. Z nasion otrzymanych w obiektach nie traktowanych (kontrola) izolowano głównie grzyby z rodzaju *Alternaria*, *Botrytis* należące do gatunków *B. allii*, *B. cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Stemphylium botryosum*. Zastosowanie ekologicznej osłony roślin nasiennych niezależnie od rodzaju środka i metody, zwiększyło zdrowotność roślin i nasion, wyeliminowało lub znacznie zredukowało zasiedlenie mikopatogenami. Potwierdzono najlepszą skuteczność ochronną w tym zakresie bioproduktów M1+ D i M1 + Ch oraz komercyjnego preparatu mikrobiologicznego Polyversum. Ich fungistatyczne oddziaływanie utrzymywało się również na etapie wzrostu i rozwoju roślin w warunkach szklarniowych i polowych.

Monitoring upraw pod kątem zdrowotności wskazał w tych obiektach mniejsze porażenie roślin mączniakiem rzekomym i alternariozami. Dodatkowe zastosowanie we właściwych fazach wzrostu i rozwoju roślin nasiennych cebuli biologicznych środków ochrony Contans, Serenade, i Polyversum oraz doglebowej aplikacji mikroorganizmów pożytecznych i bioproduktów wzbogaconych antagonistycznymi bakteriami z Symbio Banku, ograniczyło porażenie roślin cebuli przez choroby grzybowe.

Monitoring szkodników

W przeprowadzonych w 2021 roku obserwacjach, analizowano skład gatunkowy szkodników w porównaniu do dotychczas zarejestrowanej szkodliwej entomofauny, występującej na cebuli nasiennej. Dominantami i subdominantami okazały się te same gatunki, które od dziesiątków lat wyrządzają istotne szkody na większości plantacji we wszystkich rejonach uprawy cebuli nasiennej. Dotyczy to przede wszystkim **wciornastka tytoniowca (*Thrips tabaci*)**, **wgryzki szczypiorki (*Acrolepiosis assectella*)** **śmietki cebulanki (*Delia antiqua*)**, **piętnówek (*Mamestra* spp.)** i **rolnic (*Agrotis* spp.)**. Te ostatnie z wymienionych gatunków oraz wciornastek tytoniowiec są polifagami i w sezonach wegetacyjnych przemieszczają się na różne gatunki upraw, w zmiennych liczbowo populacjach, migrując w kolejnych sezonach wegetacyjnych na obszary korzystne dla swego rozwoju. W uprawach cebuli nie stwierdzono występowania nowych gatunków szkodników.

Przebieg pogody w kwietniu i maju, w porównaniu do ubiegłych lat, odbiegał od średnich temperatur dobowych powietrza, stąd też, notowano opóźniony o 1-2 tygodnie okres wegetacyjny i nalot szkodników na pola. Pod koniec maja sygnalizowano nieliczne uszkodzenia wysadków spowodowane przez **larwy śmietki cebulanki**. Najliczniejszy był **wciornastek tytoniowiec**, który występował przez cały sezon wegetacyjny, aż do wykształcenia nasion w kwiatostanach. W maju i czerwcu notowano uszkodzenia powodowane przez **gąsienice wgryzki szczypiorki**. Jednak w drugiej połowie czerwca z uwagi na upałą pogodę przekraczającą 30°C, nie notowano dalszego zasiedlania cebuli przez tego szkodnika, podobnie, jak obecności zmieników (*Lygus* spp.) w okresie kwitnienia cebuli. Stwierdzono **wzrost aktywności rolnic** w okresie suszy na polach w rejonach uprawy cebuli nasiennej, które **żerowały w wysadkach**. Z zebranych kilku osobników, zidentyfikowano **rolnicę zbożówkę (*Agrotis segetum*)**.

Na kwitnących nasiennikach cebuli stwierdzono występowanie owadów zapylających kwiaty: **pszczoł, motyli i muchówek** oraz obecność **ślodyszka rzepakowego**, odżywiającego się pyłkiem kwiatów.

Częste opady atmosferyczne, sprzyjały występowaniu patogenów, sprawców m.in. **mączniaka rzekomego (*Peronospora destructor*)** i **alternariozy (*Alternaria* spp.)**, które mogły mieć wpływ na spadek liczności szkodników, zasiedlających uprawę.

Zabiegi ochronne

Przeciwko szkodnikom stosuje się dwie podstawowe metody, zapobiegające nadmiernemu wzrostowi populacji szkodników, lub prowadzące do redukcji ich liczebności do poziomu nie mającego wpływu na wysokość plonu.

Metoda profilaktyczna opiera się na wprowadzeniu płodozmianu, przez jednoroczne lub dwuletnie zmianowanie roślin. Oprócz szkodników, skutecznie są też eliminowane patogeny, m.in. *Fusarium* i *Pythium* spp. W doświadczeniach prowadzonych na certyfikowanym ekologicznym polu doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach **wysadki cebuli wysadzono na polu po 2-letniej uprawie koniczyny, nie dopuszczającej do przetrwania m.in. bobówek śmietki cebulanki i innych gatunków muchówek, a przede wszystkim nicieni (niszczyka zjadliwego)**. Na rozwój szkodników glebowych wpływ miały uprawki mechaniczne gleby: zabiegi pielęgnacyjne w międzyrzędziach w okresie wegetacyjnym oraz wiosenna i jesienna podorywka po zbiorze.

Podstawowe znaczenie w ochronie ekologicznych upraw przed szkodnikami ma metoda interwencyjnego stosowania środków ochrony roślin. Zabiegi ochronne przeprowadza się w okresie bezpośredniego zagrożenia uprawy przez szkodniki w oparciu o tzw. progi zagrożenia. Są one ustalane na podstawie stałego monitorowania szkodników na polu w sezonie wegetacyjnym. W roku sprawozdawczym 2021 **interwencyjną metodę zwalczania wykonano przeciwko wciornastkom**, których liczebność przekraczała próg zagrożenia. Zabieg wykonano jednym z zalecanych w programach ochrony roślin **środkiem – Limocide**, dawce 4,0 l/ha, przez 2-krotne opryskanie plantacji.

Wrogowie naturalni

W agrocenozach warzywniczych, w tym na plantacjach nasiennych cebuli, największą rolę w ograniczaniu liczebności populacji szkodników odrywają wrogowie naturalni – pasożytnicze i

drapieżne organizmy. Szkodniki przyciągają wiele organizmów zoofagicznych, które w istotny sposób redukują liczebność szkodników na polu, często do poziomu nie wymagającego zabiegów ochronnych. Przyjmuje się, że wrogowie naturalni zmniejszają liczebność szkodników o 1/3 ogólnej liczby organizmów roślinożernych na polu.

Na ekologicznym certyfikowanym polu doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach stworzono warunki do ich rozwoju umieszczając tzw. ekohotele. Z pasożytniczych gatunków pospolicie występują: błonkówki z rodziny gąsienicznikowatych (*Ichneumonidae*), męczelkowatych (*Braconidae*) i błeskotkowatych (*Chalcididae*). Z drapieżnych gatunków, najliczniejsze są chrząszcze z rodziny biegaczowatych (*Carabidae*), najczęściej niestrudki (*Bembidion*), skorobieżki (*Amara*), szykonie (*Pterostichus*) i zwinniki (*Trechus*) oraz kusakowatych (*Staphylinidae*) – rydzenice (*Aleochara*). Drapieżne chrząszcze zjadają m.in. jaja i larwy śmietki cebulanki (*Delia antiqua*), udnicy cebulówki, mianiarek oraz innych gatunków muchówek, chrząszczy lub pluskwiaków. Z pozostałych entomofagów pola penetrują: chrząszcze z rodziny biedronkowatych (*Coccinellidae*) i omomiłkowatych (*Cantharididae*), z pluskwiaków: tasznikowate (*Capsidae*) i zażartkowate (*Nabidae*), z muchówek: bzygowate (*Syrphidae*), rączykowate (*Tachinidae*), pryszczarkowate (*Cecidomyiidae*) i łowikowate (*Asylidae*) oraz pająki sieciowe i kosarze.

Wymienione szkodniki są również zjadane przez inne zwierzęta, jak: dwuparce, pajączki, drobne gryzonie, krety, jeże i ptaki.

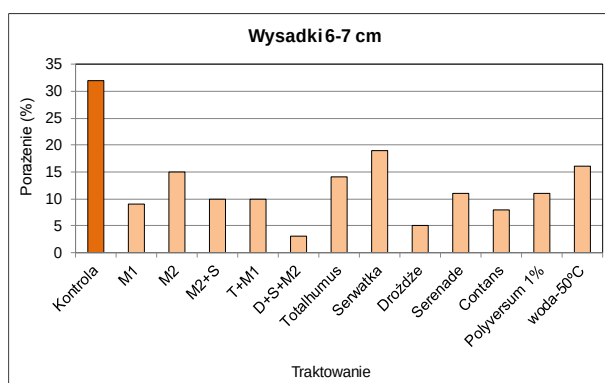
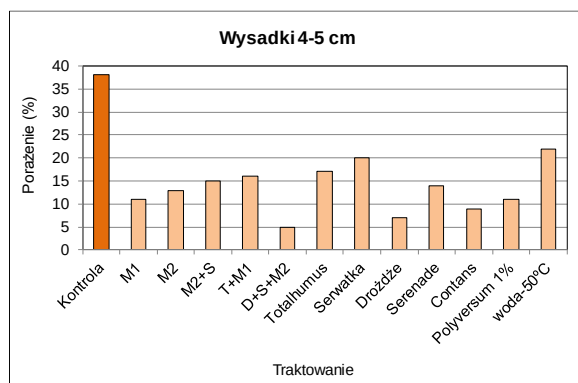
Od sadzenia wysadków do zbioru nasion na plantacjach, notowano obecność epigeicznych gatunków: chrząszczy z rodziny biegaczowatych (skorobieżki, szykonie) i kusakowatych (rydzenice). Na częściach nadziemnych notowano obecność drapieżnych muchówek z rodziny bzygowatych (*Syrphidae*), rączykowatych (*Tachinidae*), a także pająki sieciowe.

Opracowana technologia II roku ekologicznej produkcji cebuli nasiennej w zakresie możliwości zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego oraz druga część przewodnika dla producentów, uwzględniają kompleksowe, innowacyjne, biologiczne metody uprawy i ochrony roślin przed chorobami i szkodnikami, ochronę środowiska, gleby i powietrza oraz zachowanie równowagi biologicznej, zgodne z kodeksem dobrej praktyki. Przeprowadzone badania wychodzą również naprzeciw oczekiwaniom producentom roślin w systemach ekologicznych. Wzbogacenie środków naturalnych w mikroorganizmy antagonistyczne stwarza możliwość kompleksowej osłony materiału rozmnożeniowego i roślin nasiennych przed patogenami oraz stymulacji odporności roślin cebuli na stres biotyczny i abiotyczny w II roku uprawy roślin nasiennych. . Nowo opracowane metody i technologie, w których zastosowano środki naturalne wzbogacone w pożyteczne mikroorganizmy, usprawnia i zoptymalizują proces produkcji nasiennej poprzez zwiększenie potencjału plonotwórczego materiału rozmnożeniowego oraz otwierają innowacyjną linię produkcji nasiennej w systemach ekologicznych.

Ocena porażenia materiału rozmnożeniowego mikopatogenami po zimowym przechowywaniu.

Wpływ środków biologicznych stosowanych w I roku produkcji cebuli nasiennej na wartość przechowalniczą i zdrowotność materiału rozmnożeniowego.

1. Kontrola;
2. M1 - Bakterie1 – X58AD, PS 118AA;
3. M2 - Bakterie2 – Pi 119AC, Pi 72ED;
4. M2+S Bakterie 2 + serwatka;
5. T+M1 - Totalhumus+ bakterie – Ps118AA i X58AD;
6. D + S + M2 - Drożdże +serwatka + bakterie Pi119AC, Pi 72ED);
7. Totalhumus;
8. Serwatka;
9. Drożdże;
10. Serenade;
11. Contans;
12. Polyversum 1%;
13. Woda-50⁰ C.

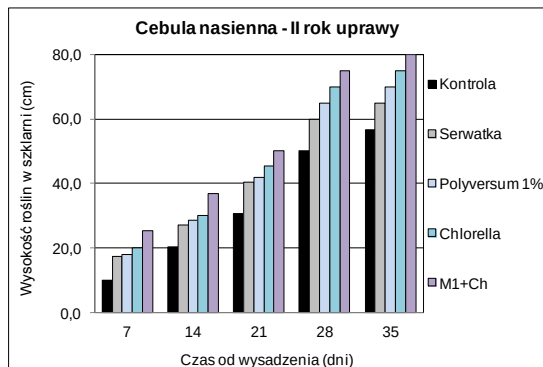
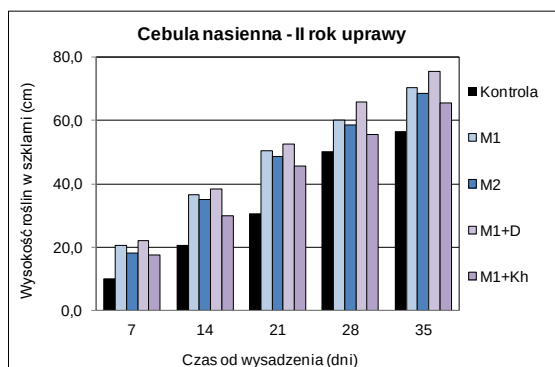


Rys.1-2. Porażenie materiału rozmnożeniowego cebuli po zimowym przechowywaniu w zależności od sposobu traktowania roślin w I roku uprawy

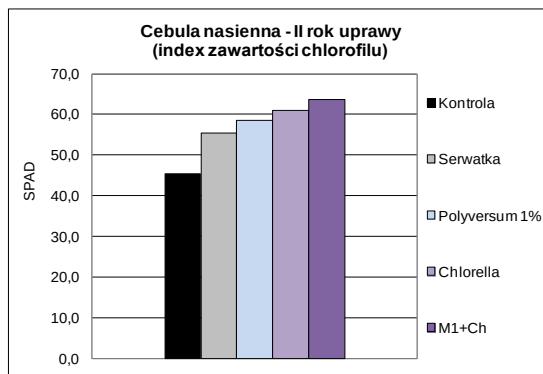
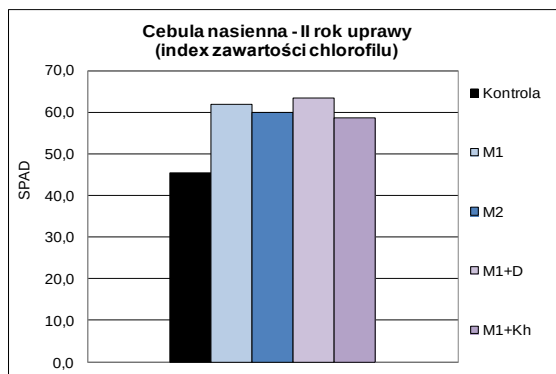
Doświadczenia szklarniowe

Po przeprowadzeniu kalibracji i sortowaniu na dwie frakcje materiału rozmnożeniowego, uprawa cebuli w kulturach wazonowych prowadzona była z podziałem na dwie średnice wysadków.

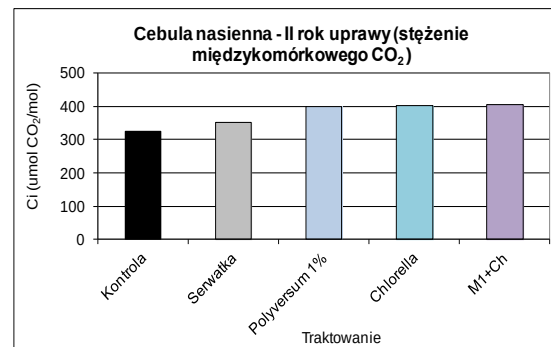
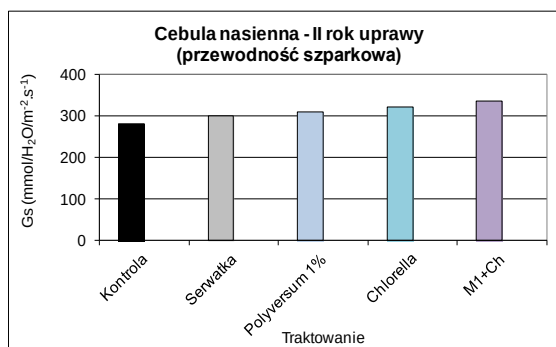
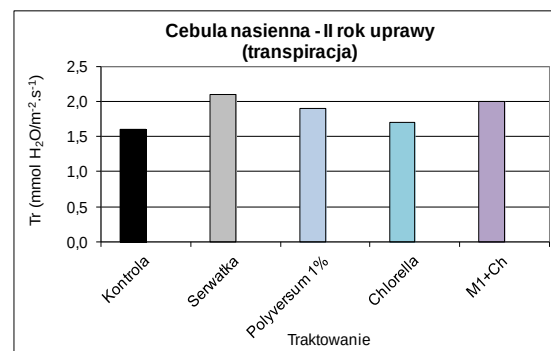
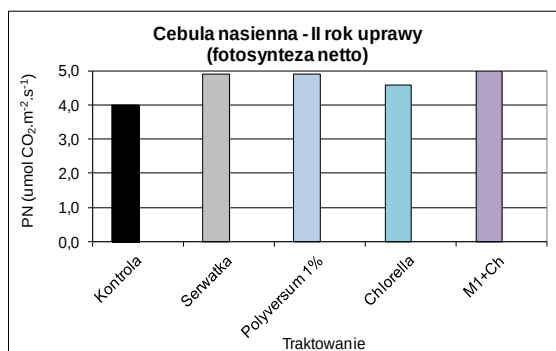
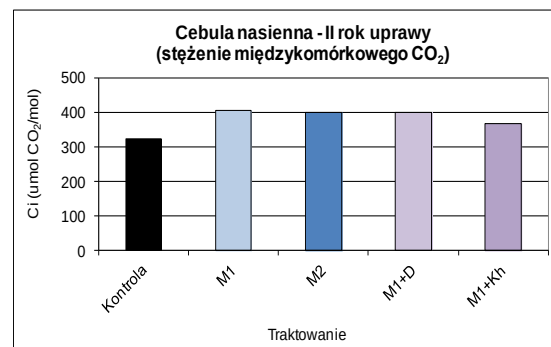
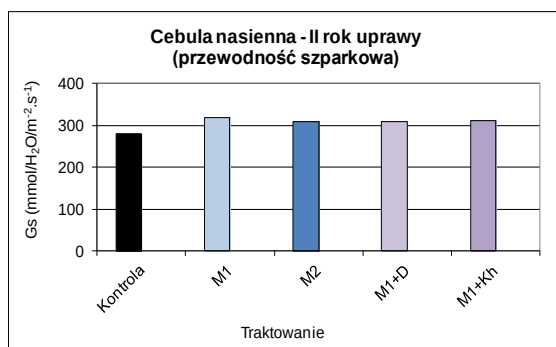
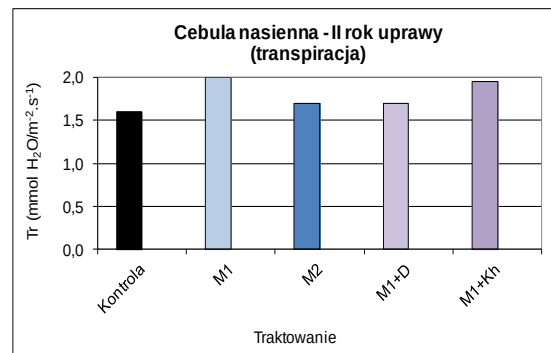
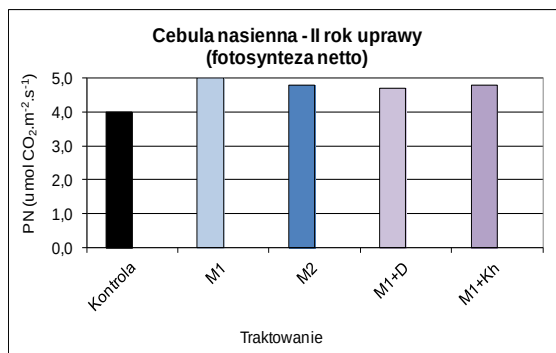
Średnica wysadków 4-5 cm



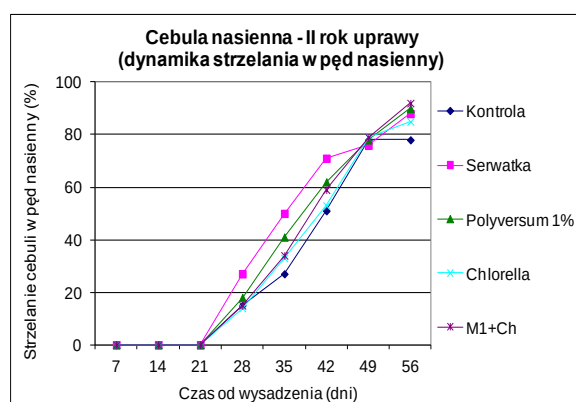
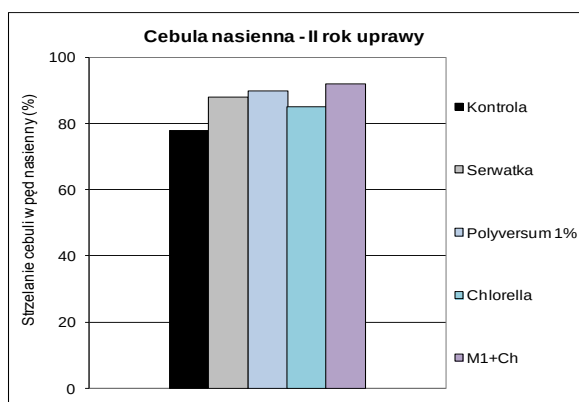
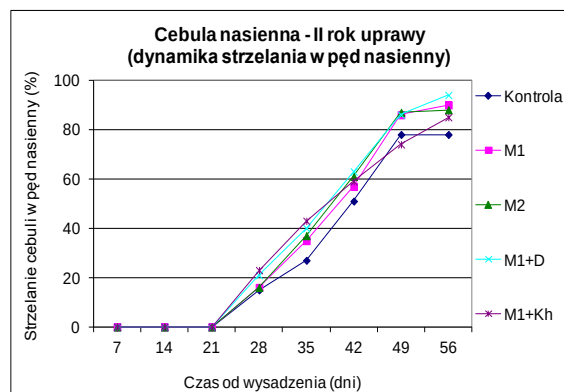
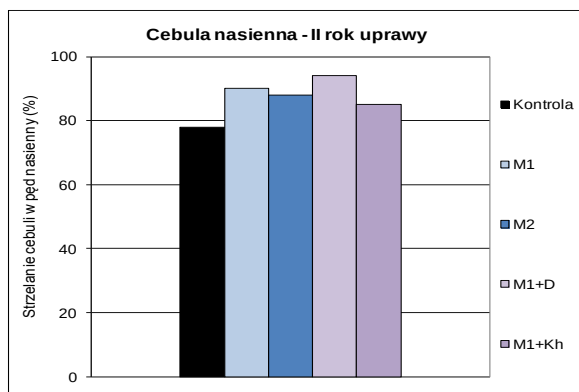
Rys. 3-4. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na wzrost roślin w warunkach szklarniowych (średnica wysadków 4-5 cm)



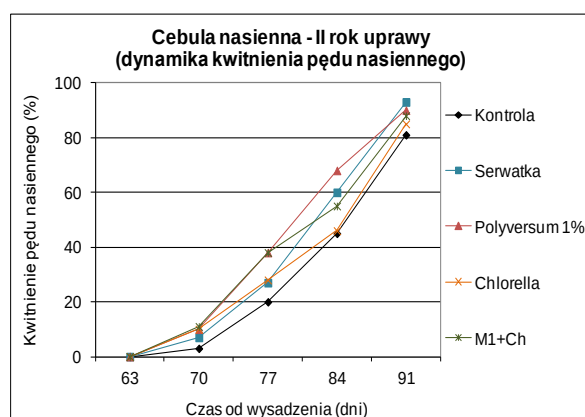
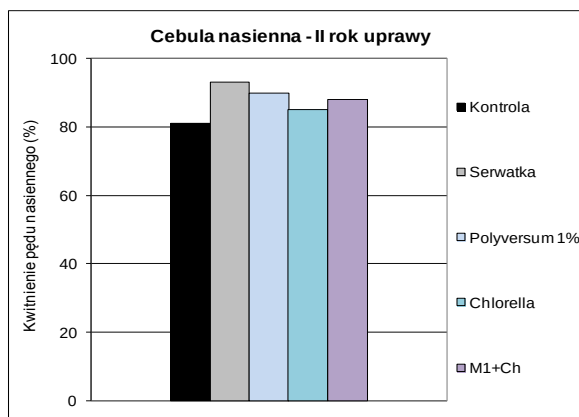
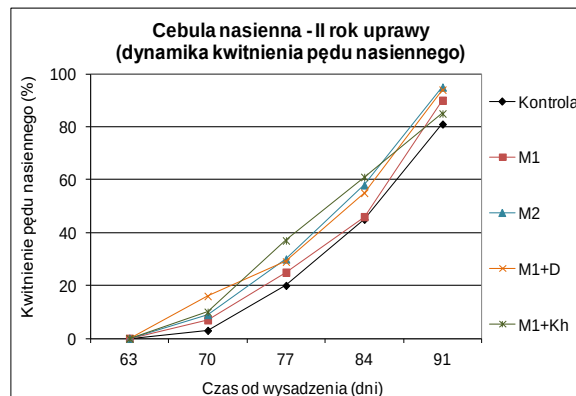
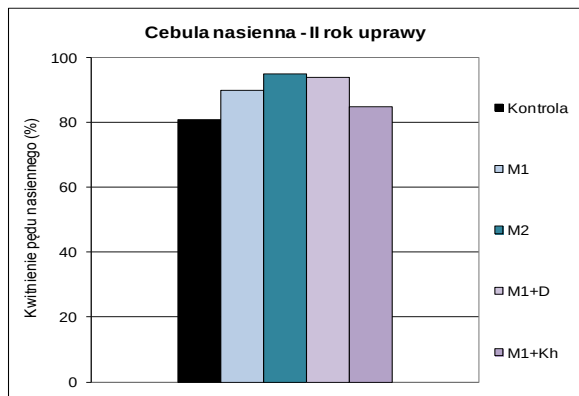
Rys. 5-6. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na index zawartości chlorofilu w liściach w uprawie szklarniowej (średnica wysadków 4-5 cm)



Rys. 7-14. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na wymianę gazową roślin w uprawie szklarniowej (średnica wysadków 4-5 cm)

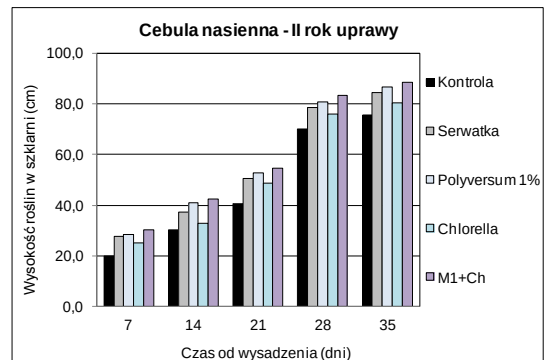
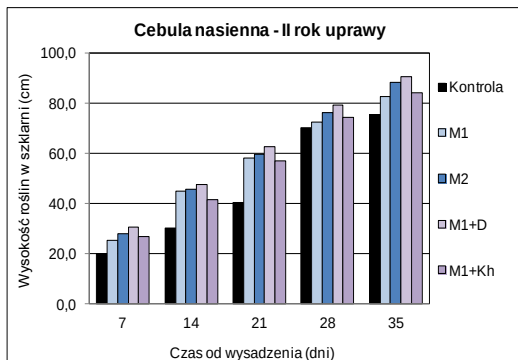


Rys. 15-18. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na strzelanie w pęd nasienny w uprawie szklarniowej (średnica wysadków 4-5 cm)

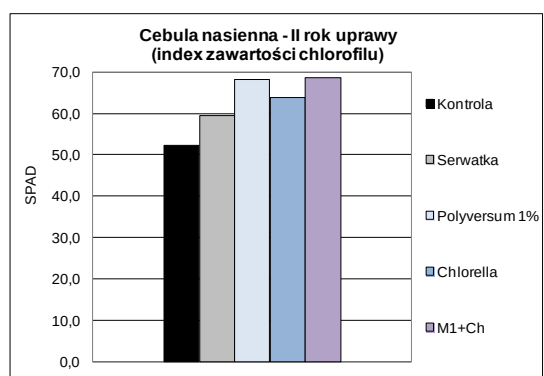
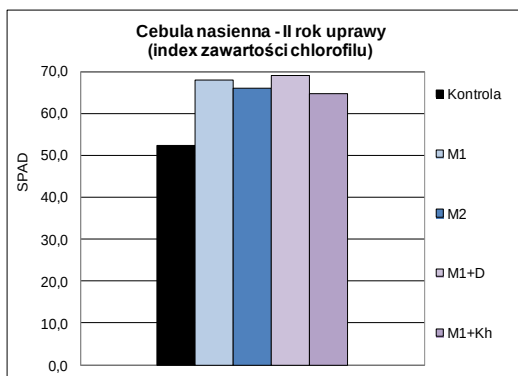


Rys. 19-22. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na kwitnienie roślin nasiennych w uprawie szklarniowej (śr. wysadków 4-5 cm)

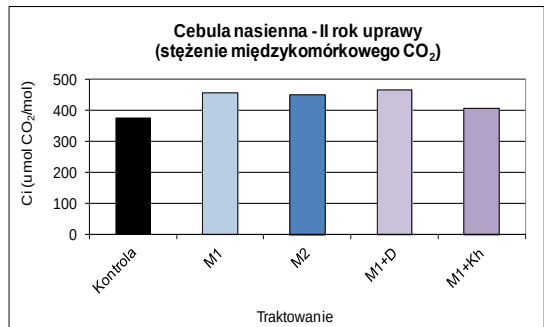
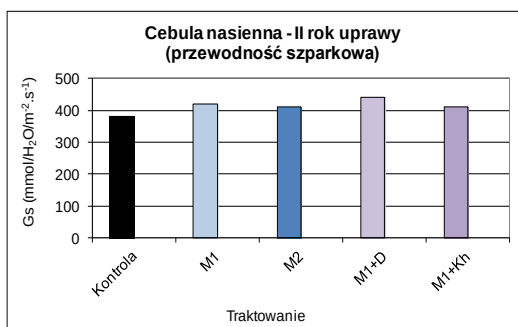
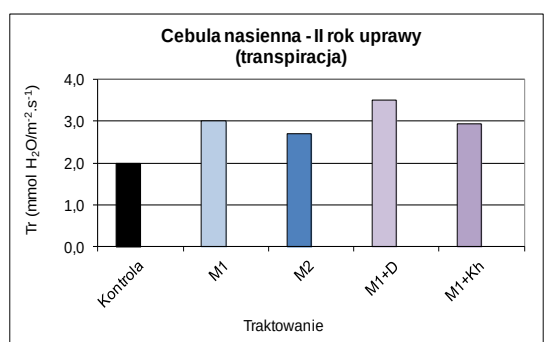
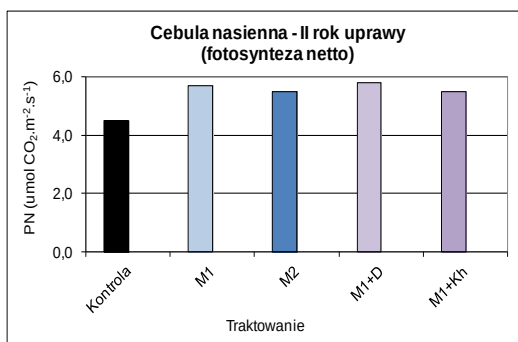
Średnica wysadków 6-7 cm

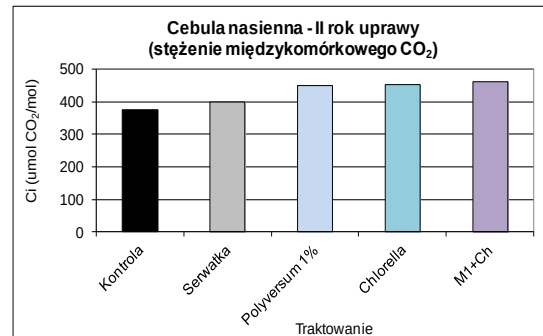
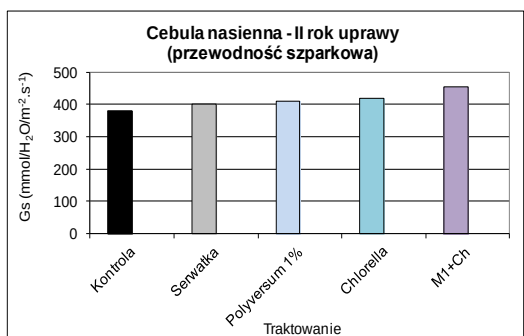
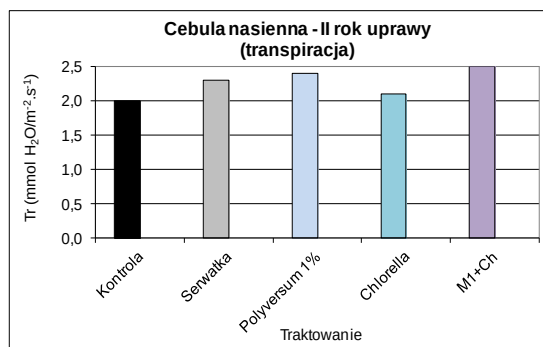
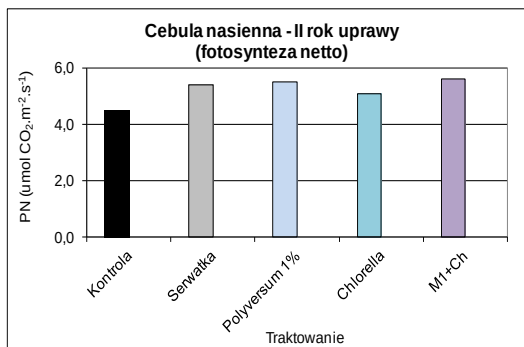


Rys. 23-24. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **wzrost roślin w szklarni** (średnica wysadków 6-7 cm)

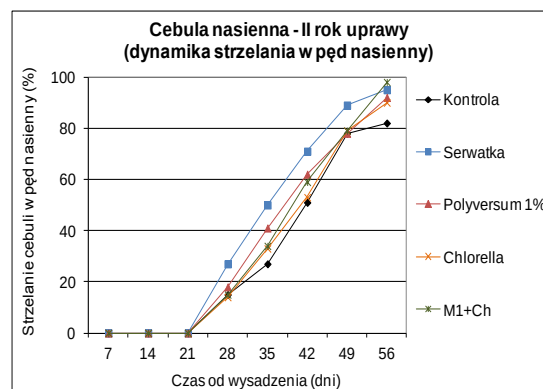
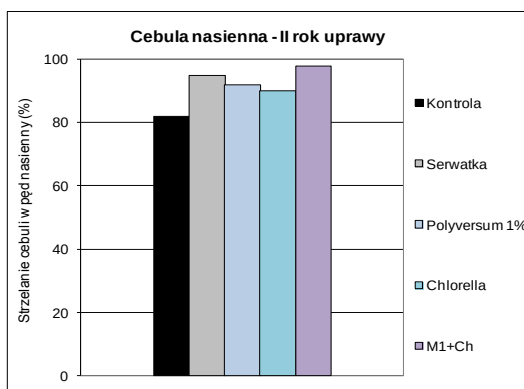
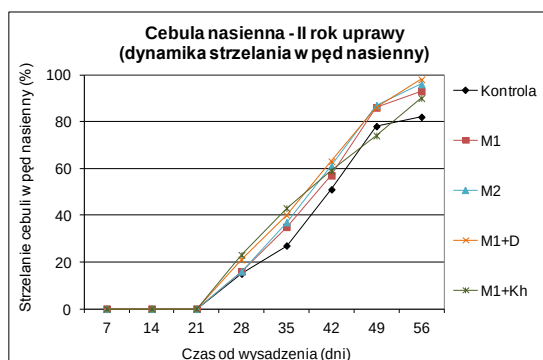
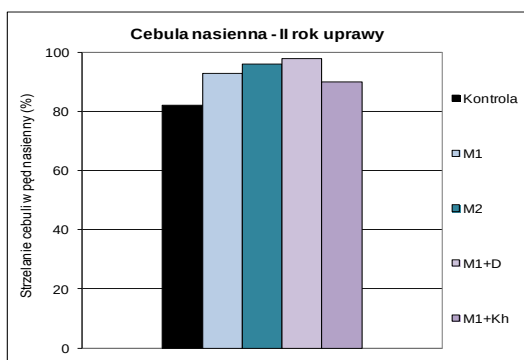


Rys. 25-26. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **index zawartości chlorofilu** w liściach w uprawie szklarniowej (śr. wysadków 6-7 cm)

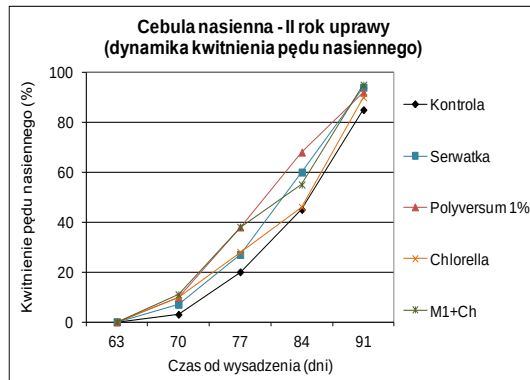
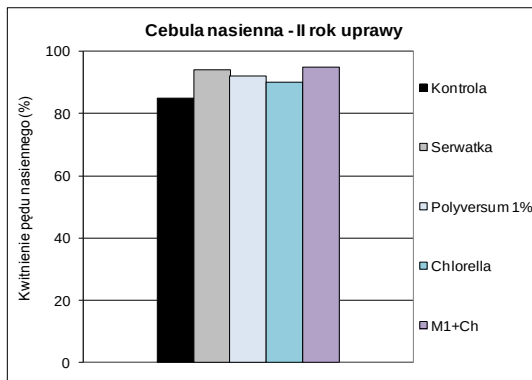
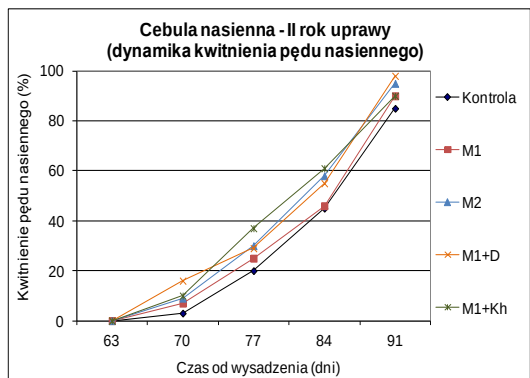
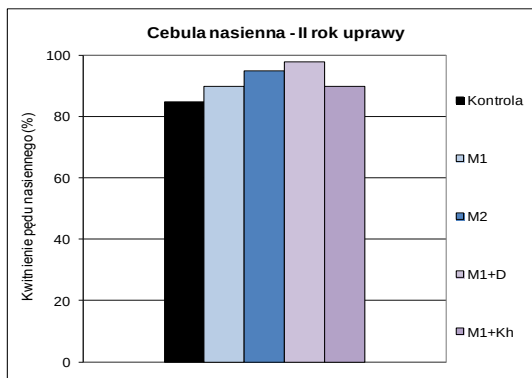




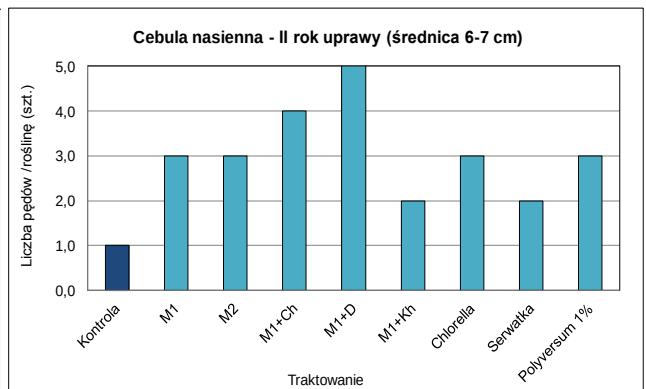
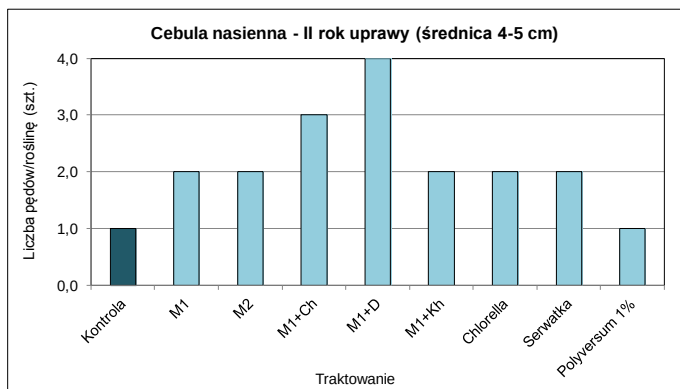
Rys. 27-34. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **wymianę gazową roślin** w uprawie szklarniowej (średnica wysadków 6-7 cm)



Rys. 35-38. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **dynamikę strzelanie w pęd nasienny** w uprawie szklarniowej (śr. wysadków 6-7 cm)



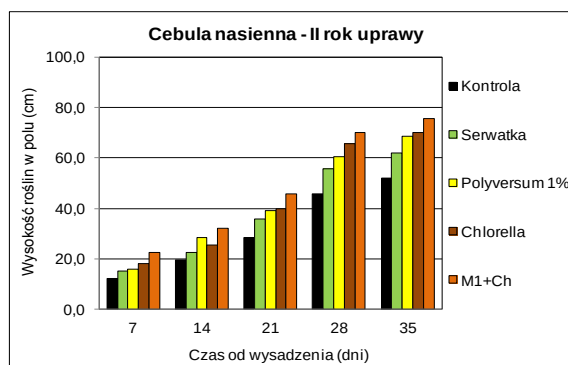
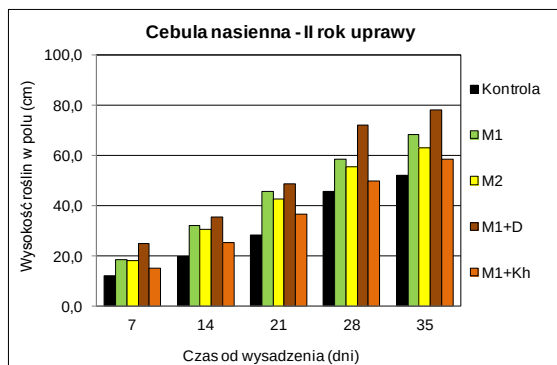
Rys. 39-42. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **kwitnienie roślin nasiennych** w uprawie szklarniowej (śr. wysadków 6-7 cm)



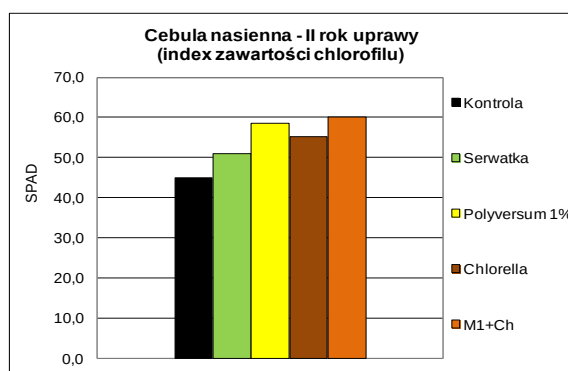
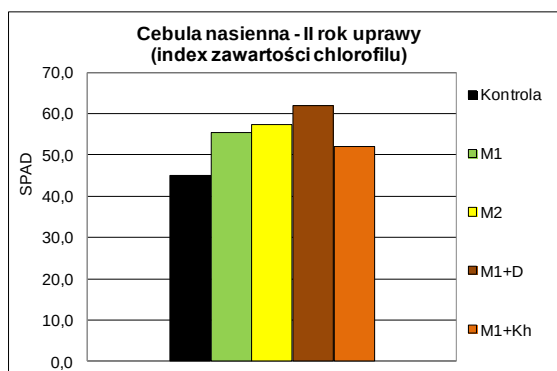
Rys. 43-44. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na liczbę pędów nasiennych wytworzonych przez wysadki o średnicy 4-5 cm i 6-7 cm

Doświadczenia polowe

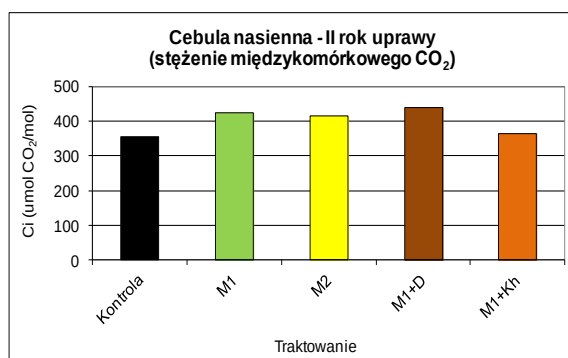
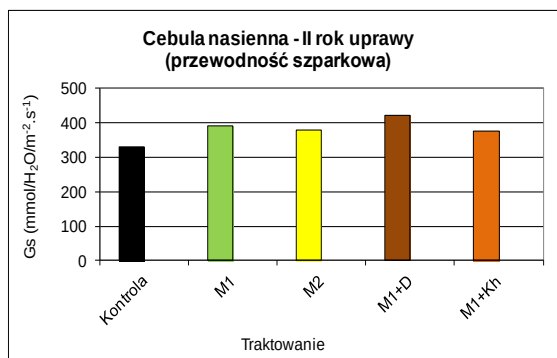
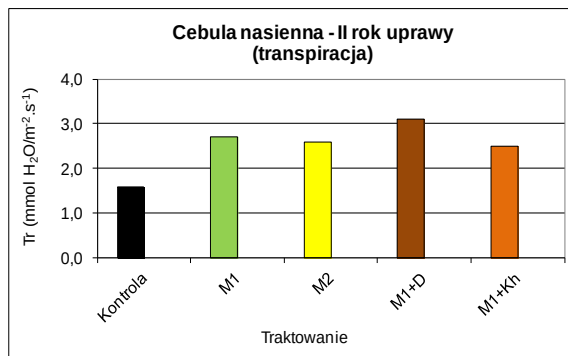
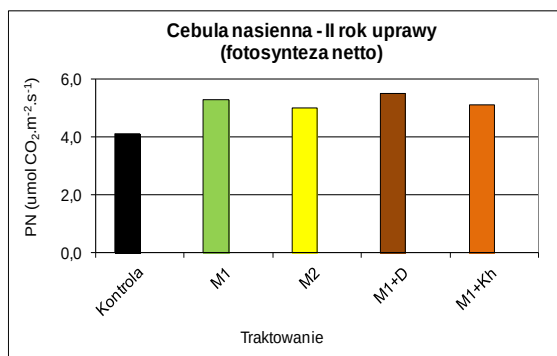
Rozstawa 30x30 cm

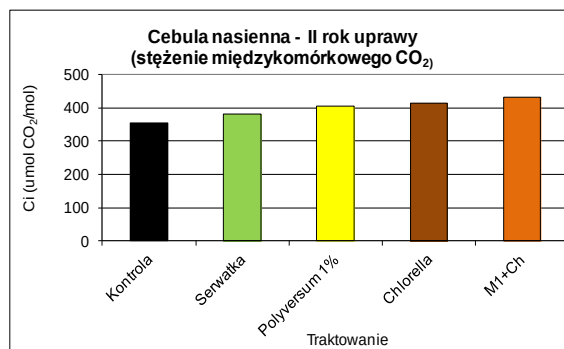
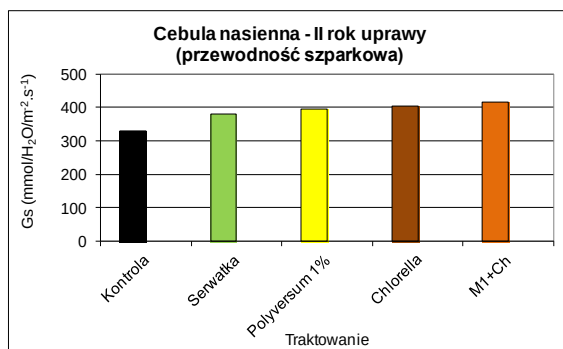
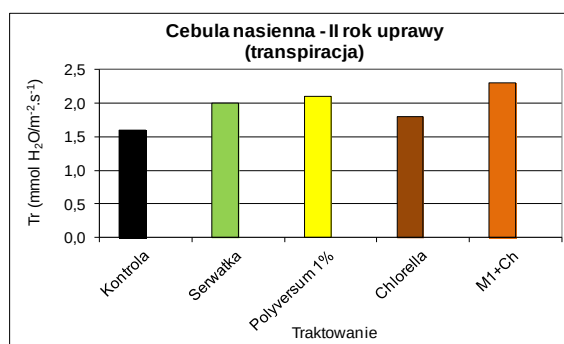
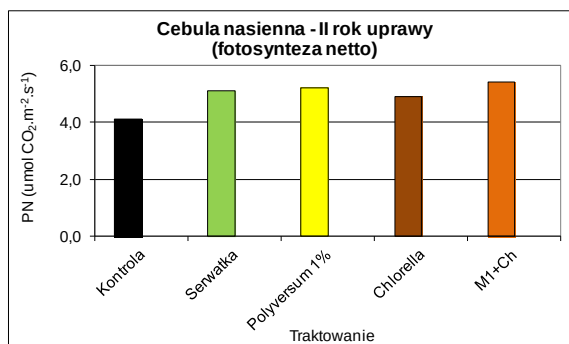


Rys. 45-46. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **wzrost roślin w polu** (rozstawa 30x30 cm)

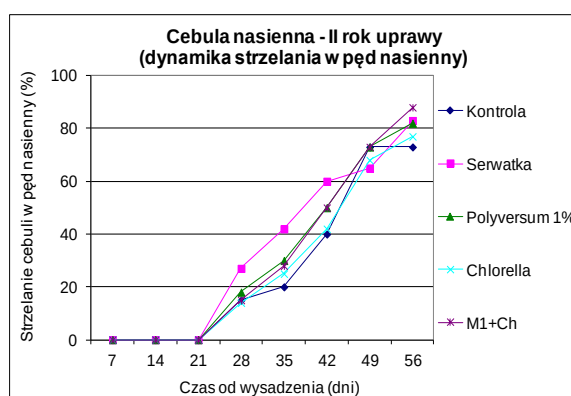
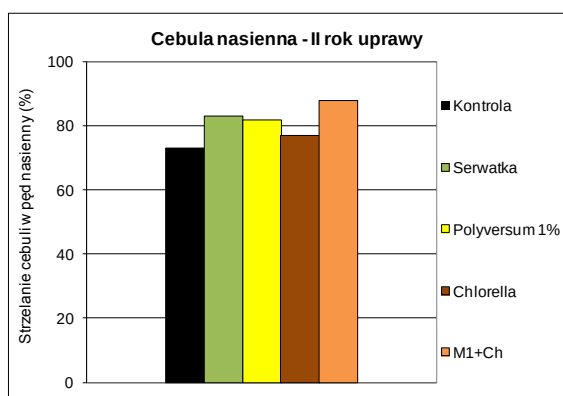
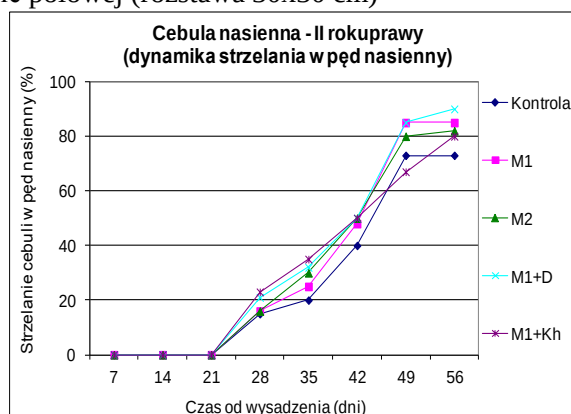
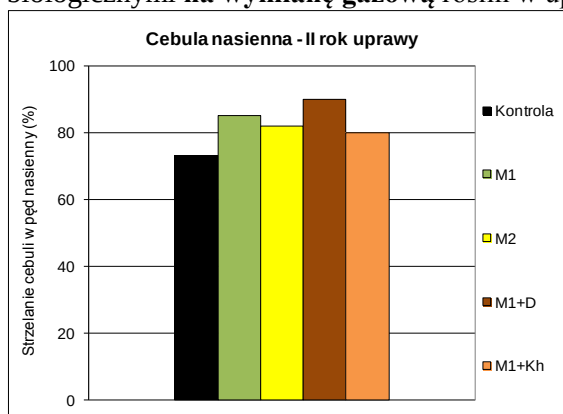


Rys. 47-48. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **index zawartości chlorofilu** w liściach w uprawie polowej (rozstawa 30x30 cm)

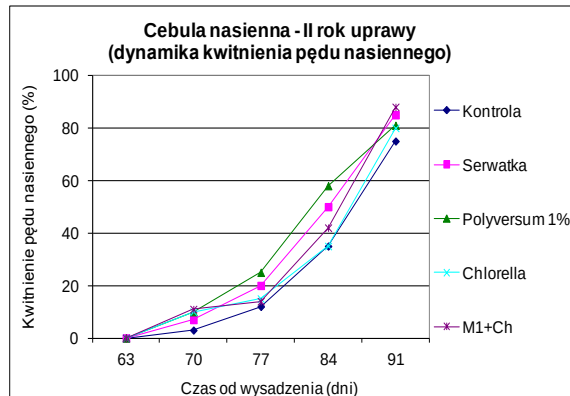
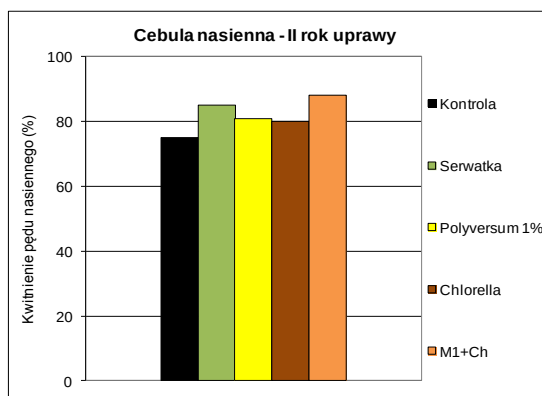
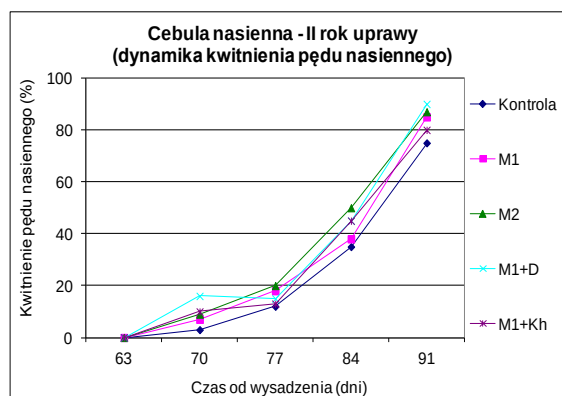
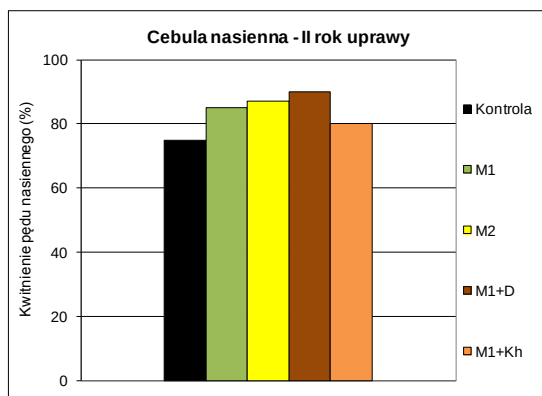




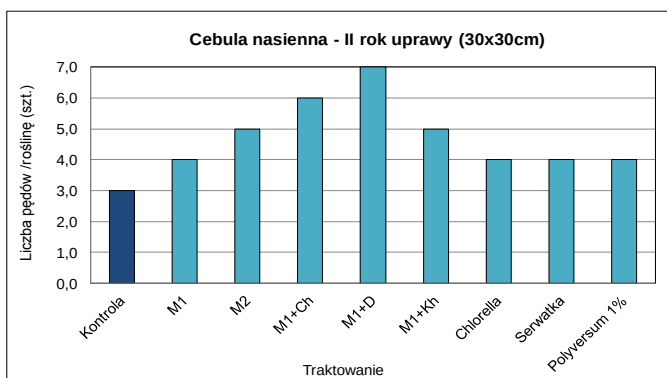
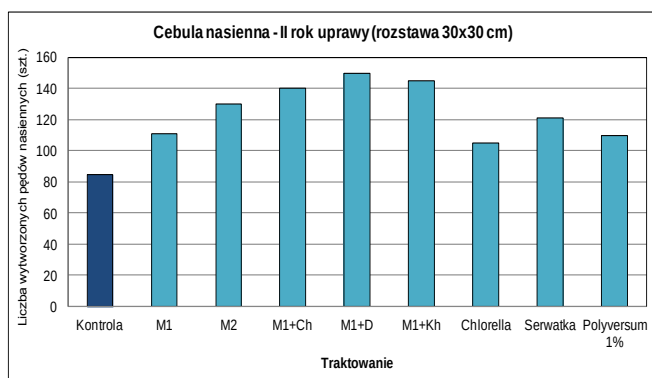
Rys. 49-56. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi **na wymianę gazową** roślin w uprawie polowej (rozstawa 30x30 cm)



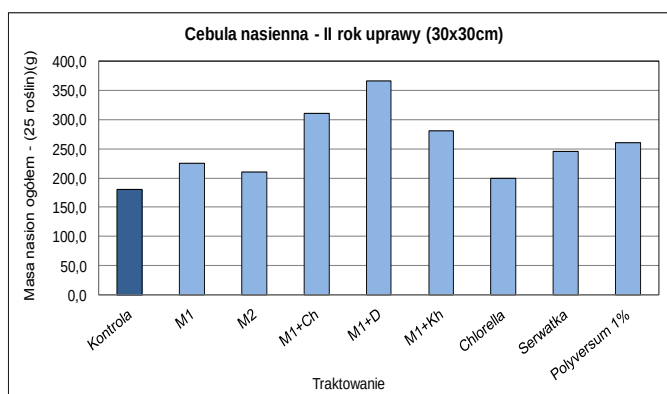
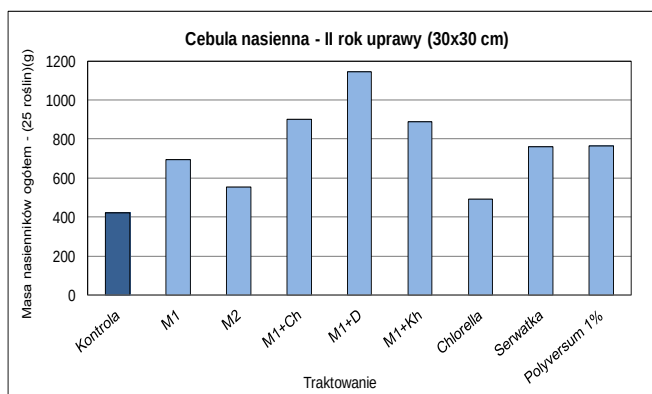
Rys. 57-60. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi **na dynamikę strzelanie w pęd nasienny** w uprawie polowej (rozstawa 30x30 cm)



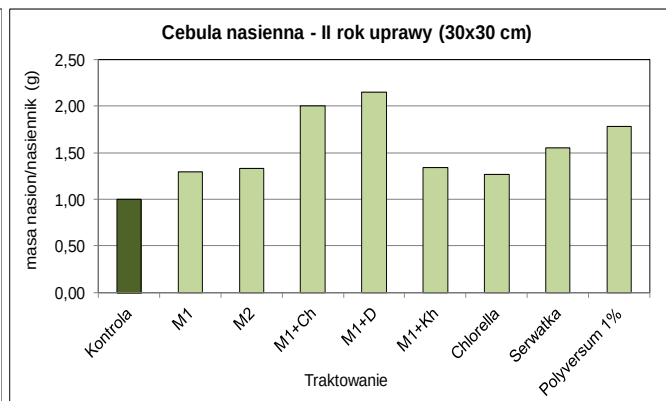
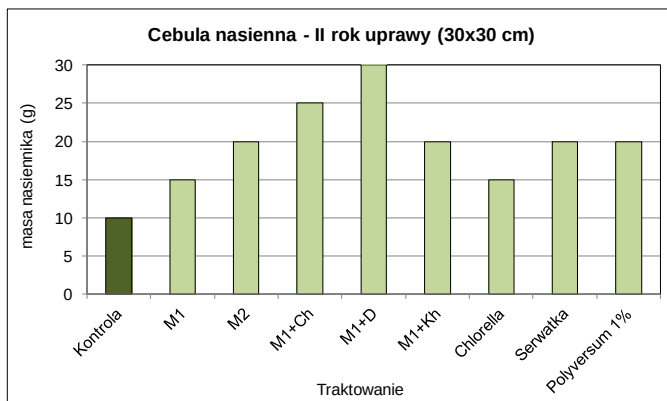
Rys. 61-64. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **kwitnienie** roślin nasiennych w uprawie polowej (rozstawa 30x30 cm)



Rys. 65-66. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **liczbę wytworzonych pędów kwiatostanowych oraz liczbę pędów z 1 rośliny** przy rozstawie 30x30 cm

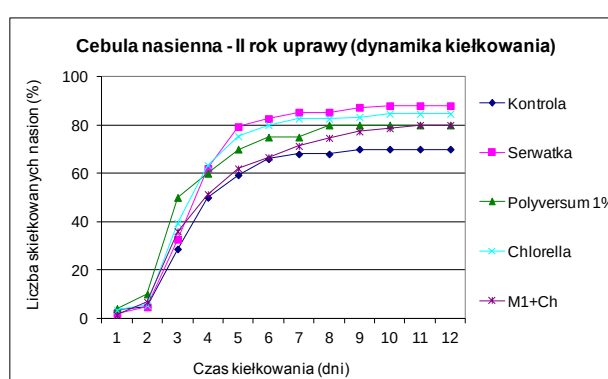
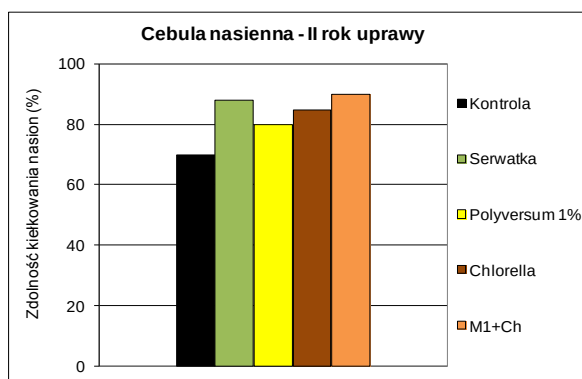
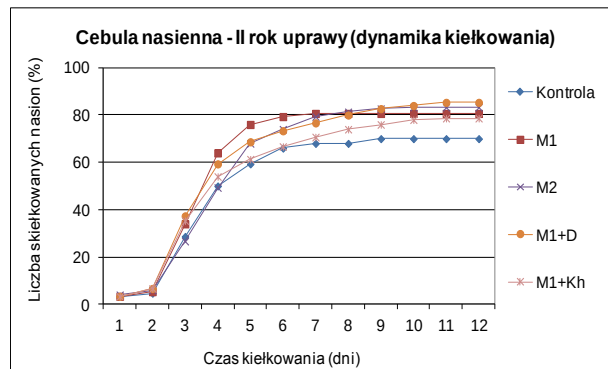
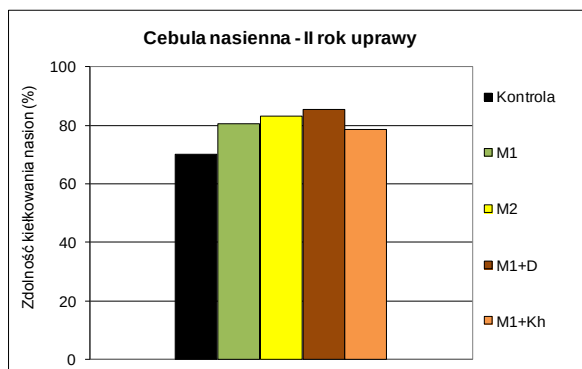


Rys. 67-68. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **masę nasienników i plon nasion** (rozstawa roślin 30x30 cm)

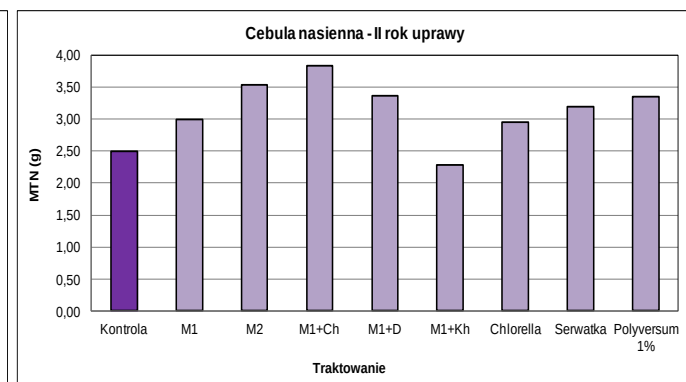
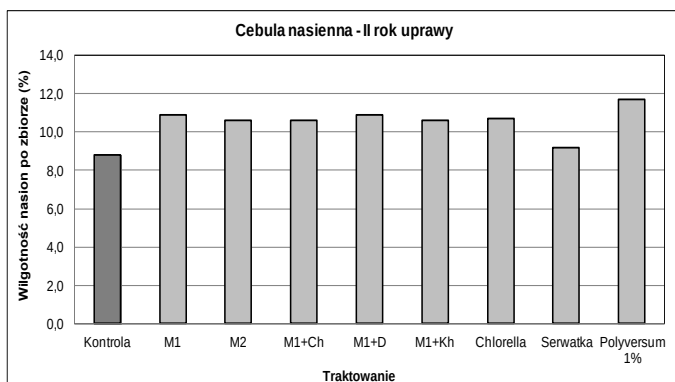


Rys. 69-70. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **masę nasiennika** i **masę nasion z 1 nasiennika** (rozstawa roślin 30x30 cm)

Analizy jakości nasion otrzymanych z wysadków uprawianych w rozstawie 30 x 30 cm

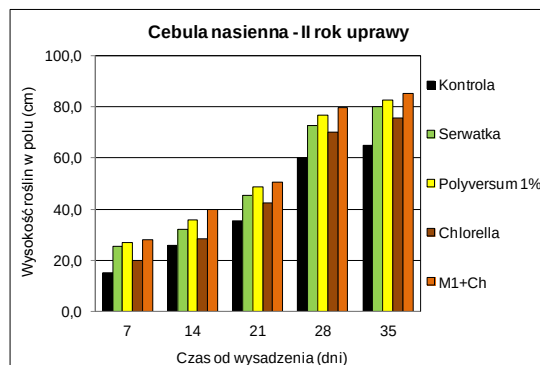
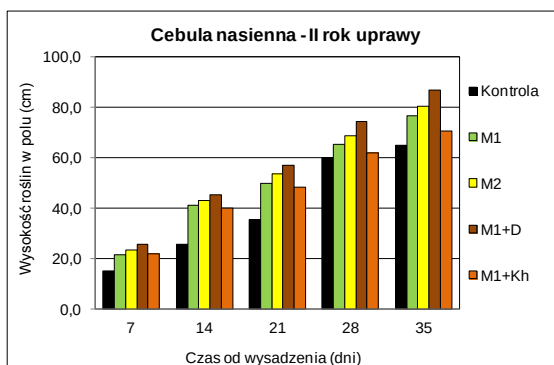


Rys. 71-74. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **zdolność** i **dynamikę kiełkowania nasion** po ich zbiorze (rozstawa roślin 30x30 cm)

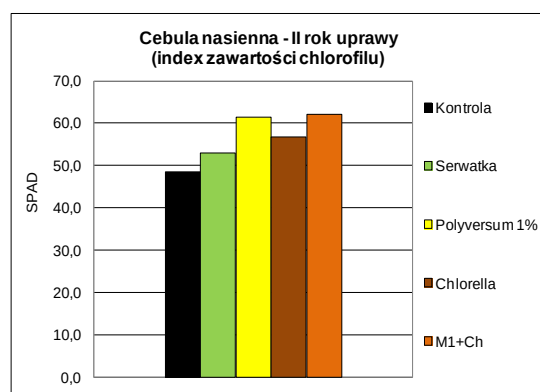
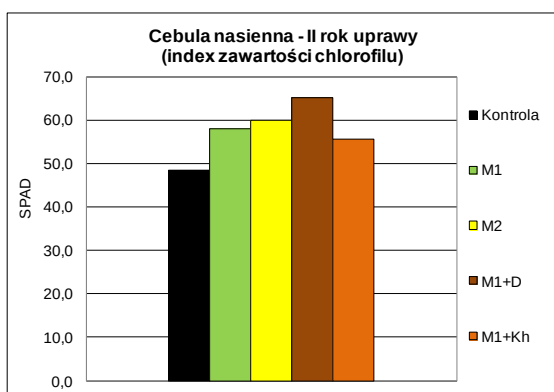


Rys. 75-76. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **wilgotność nasion po zbiorze** i **MNT (g)** (rozstawa roślin 30x30 cm)

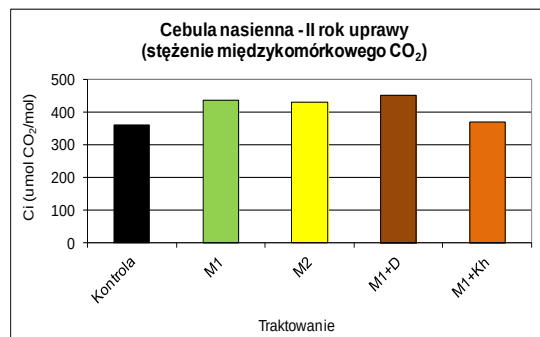
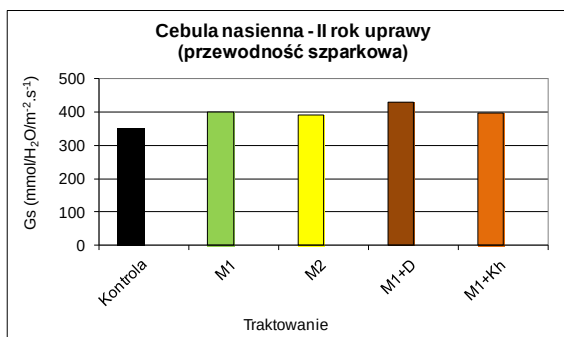
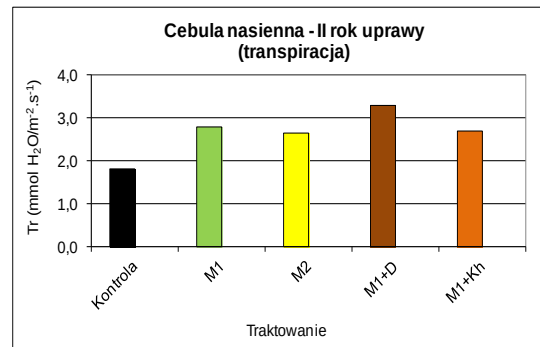
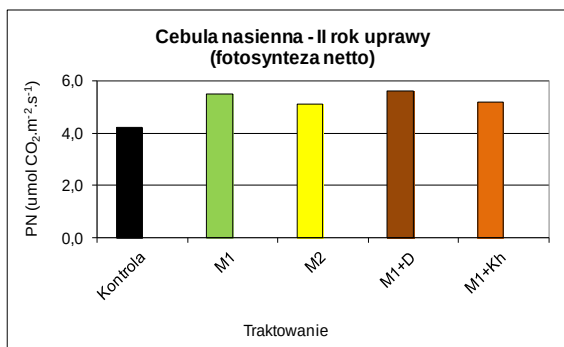
Rozstawa 30x20 cm

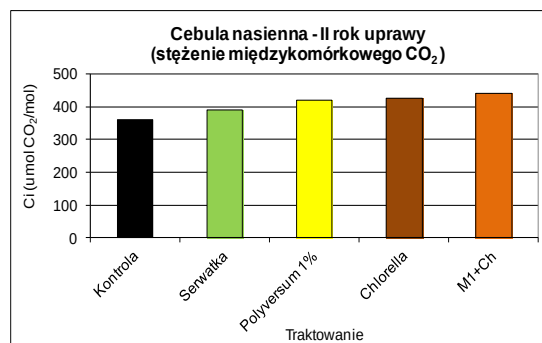
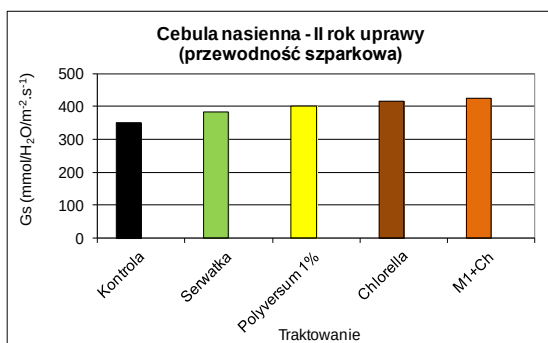
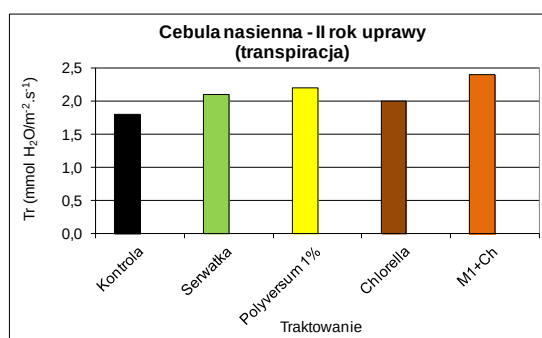
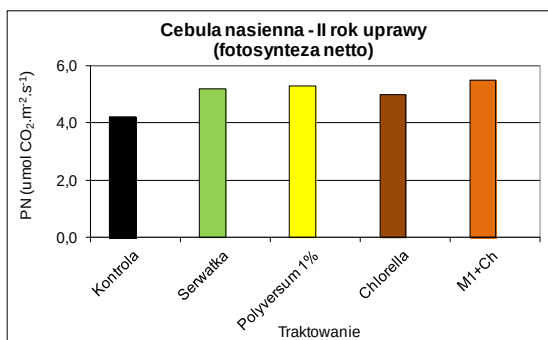


Rys. 77-78. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density 4 środkami biologicznymi na **wzrost roślin w polu** (rozstawa 30x20 cm)

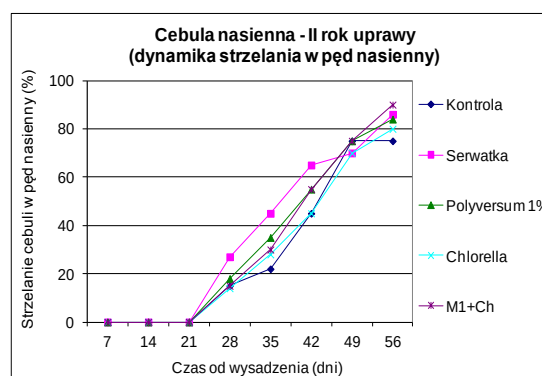
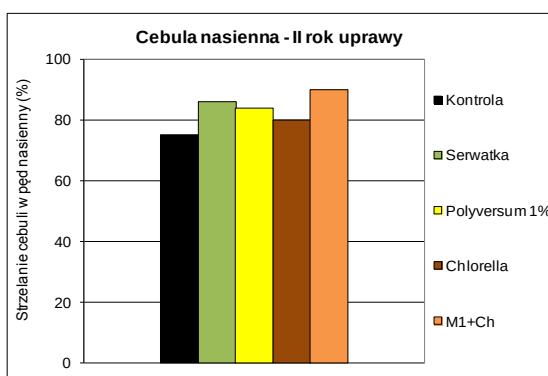
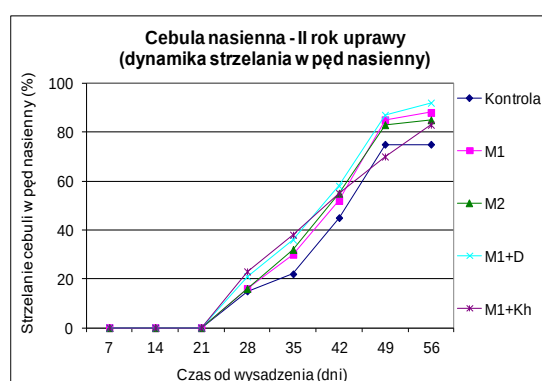
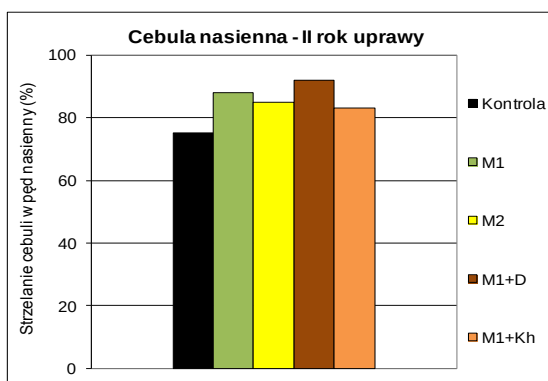


Rys. 79-80. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **index zawartości chlorofilu** w liściach w uprawie polowej (rozstawa 30x20 cm)

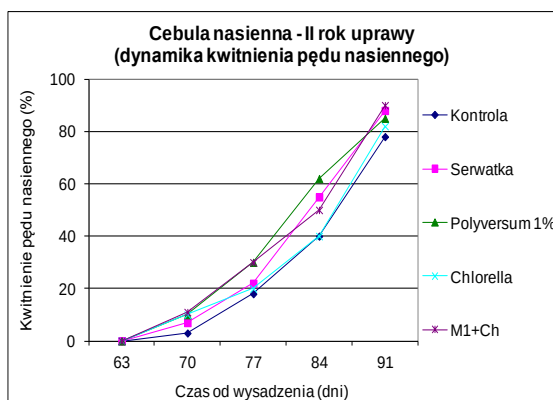
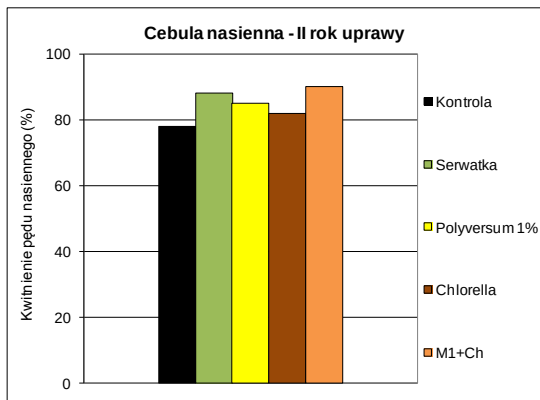
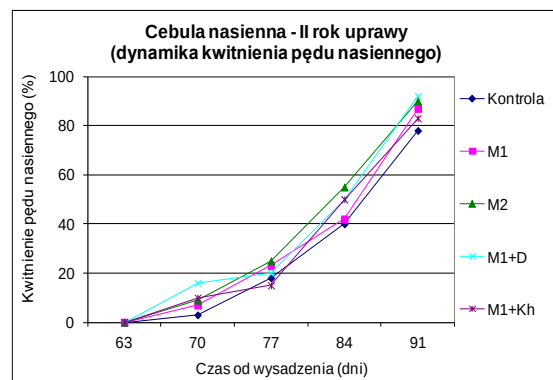
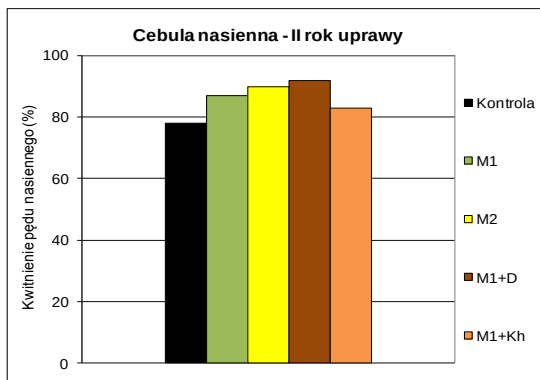




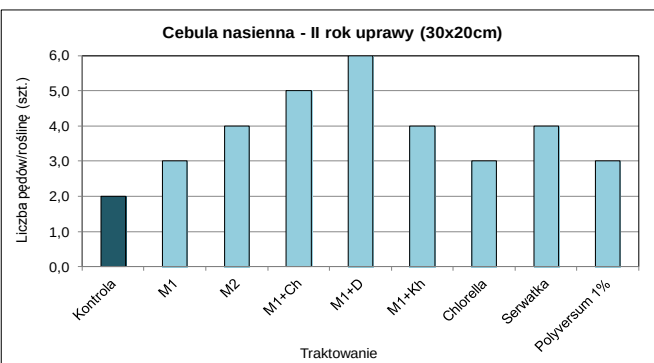
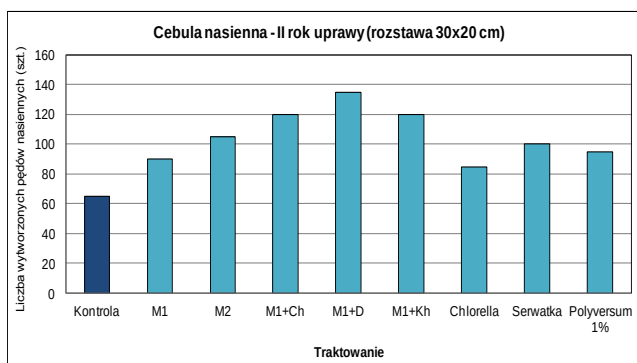
Rys. 81-88. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **wymianę gazową roślin** w uprawie polowej (rozstawa 30x20 cm)



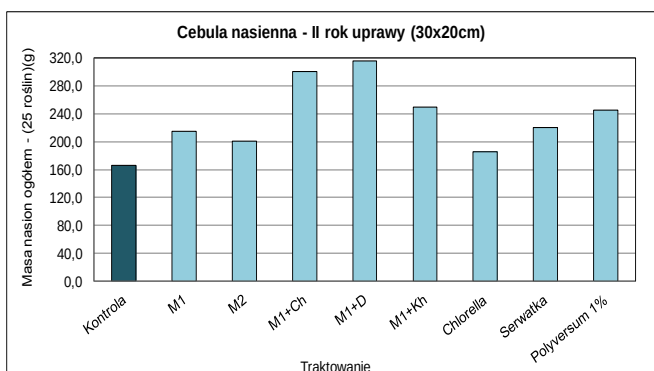
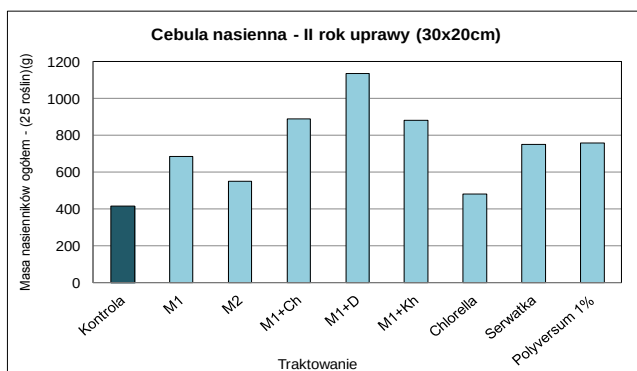
Rys. 89-92. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na **dynamikę strzelania w pęd nasienny** w uprawie polowej (rozstawa 30x20 cm)



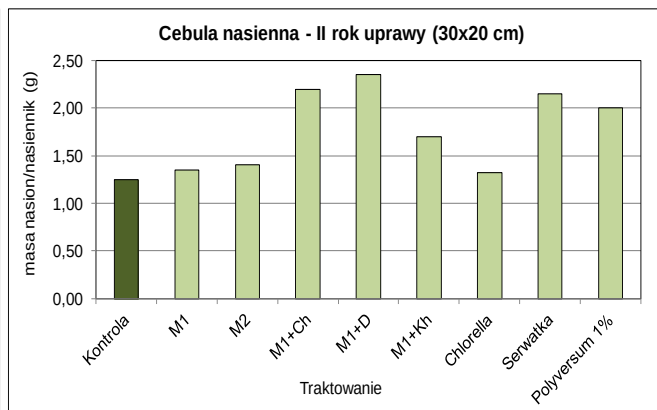
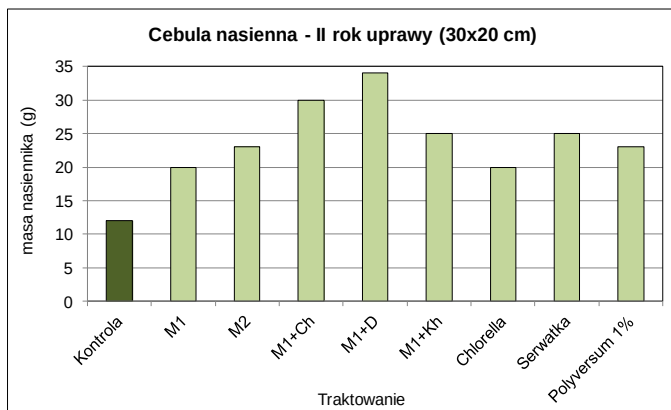
Rys. 93-96. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na kwitnienie roślin nasiennych w uprawie polowej (rozstawa 30x20 cm)



Rys. 97-98. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na liczbę wytworzonych pędów kwiatostanowych w uprawie polowej (30x20 cm)

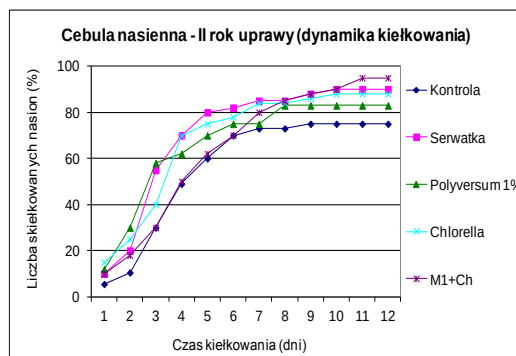
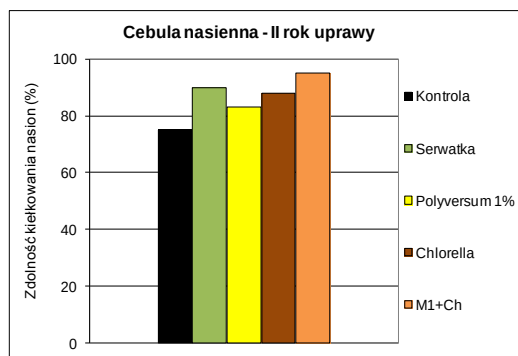
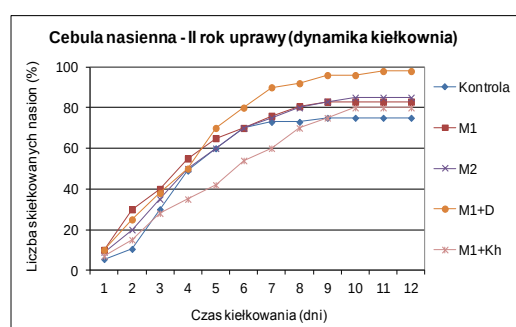
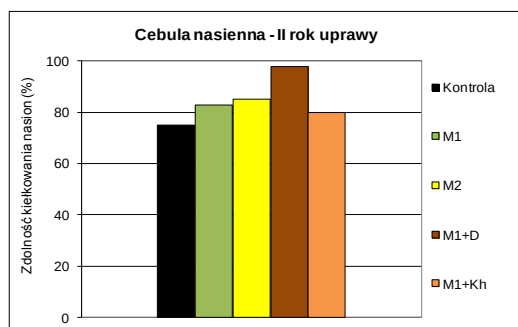


Rys. 99-100. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na masę nasienników i plon nasion (rozstawa roślin 30x20cm)

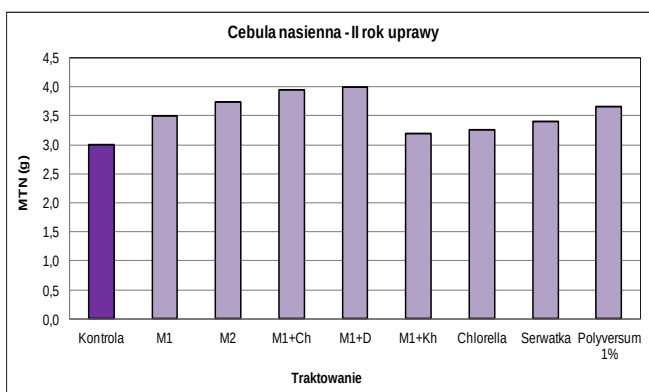
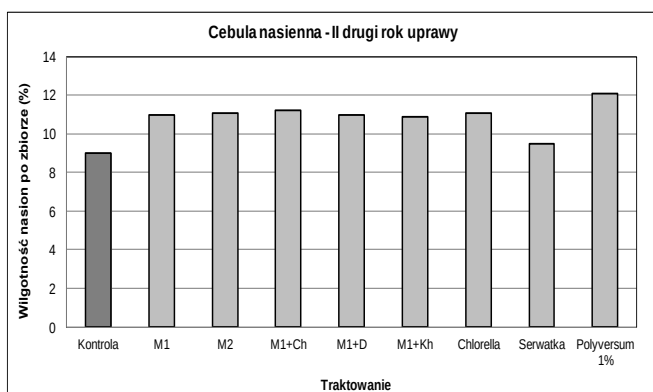


Rys. 101-102. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na masę nasienia i masę nasion z 1 nasienia (roztawa roślin 30 x 20 cm)

Analizy jakości nasion otrzymanych z wysadków uprawianych w roztawie 30 x 20 cm



Rys. 103-104. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na zdolność i dynamikę kiełkowania nasion po ich zbiorze (roztawa 30x20 cm)



Rys. 105-106. Wpływ traktowania wysadków cebuli odmiany Density4 wybranymi środkami biologicznymi na wilgotność nasion po zbiorze i MTN (g) (roztawa roślin 30x20 cm)

PODSUMOWANIE

Z przeprowadzonych dwuletnich badań wynika, że istnieją możliwości stymulacji potencjału plonotwórczego wysadków i zwiększenia jego produktywności. Zaleca się:

- ✓ właściwe przechowywanie, szczegółowo opisane w Przewodniku,
- ✓ biologiczne zaprawianie przed przechowywaniem oraz przed wysadzaniem w II roku produkcji,
- ✓ rygorystyczną selekcję wysadków,
- ✓ wysadzanie wyłącznie zdrowego materiału rozmnożeniowego,
- ✓ przestrzeganie optymalnego terminu sadzenia, aby długość okresu wegetacji był wystarczający do wytworzenia właściwej ilości pędów nasiennych, zawiązywania i dojrzwania nasion,
- ✓ zabiegi agrotechniczne w II roku uprawy cebuli na nasiona, zmierzające do modyfikacji pokroju (architektury) nasiennika ukierunkowanej na tworzenie głównie pędów I rzędu, z których otrzymuje się najlepszej jakości nasiona,
- ✓ nawożenie dostosowane do potrzeb cebuli z naciskiem na zmniejszenie w II roku produkcji cebuli nasiennej dawki potasu, gdyż zbyt duża jego zawartość w nektarze kwiatów, zmniejsza ich atrakcyjność dla owadów zapylających,
- ✓ zapewnienie przynajmniej 5 pni pszczelich na ha plantacji,
- ✓ profilaktyczne opryski atraktantami, gdy w sąsiedztwie znajdują się uprawy roślin miododajnych (np. facelii),
- ✓ stosowanie profilaktycznych metod zapobiegania chorobom i inwazji szkodników,
- ✓ regularne odchwaszczanie plantacji,
- ✓ stosowanie stymulatorów odporności roślin na choroby i niekorzystne warunki klimatyczne,
- ✓ wzbogacanie gleby poprzez stosowanie produktów bogatych w kwasy humusowe, pożyteczne mikroorganizmy, drożdże, w miarę potrzeby dolistna aplikacja tych środków. Wyprodukowanie nasion cebuli w warunkach gospodarstwa ekologicznego.

Zalecenia dotyczące ochrony upraw cebuli nasiennej w II roku przed chorobami i szkodnikami.

1. Przestrzeganie stosowania płodozmianu, który skutecznie eliminuje wiele patogenów pochodzenia bakteryjnego, grzybowego i wirusowego oraz gatunki szkodliwej zoofauny;
2. Wprowadzanie do uprawy odmian bardziej tolerancyjnych na żerowanie szkodników, szybciej regenerujących skutki uszkodzeń, o szybszym i krótszym okresie dojrzwaniu nasion;
3. Przestrzeganie optymalnym terminów sadzenia wysadków, okresowe wykonywanie prac pielęgnacyjno-ochronnych, ograniczających liczebność szkodników;
4. Stałe zwalczanie chwastów w najwcześniejszych fazach wzrostu;
5. Interwencyjne zwalczanie szkodników w okresie przekroczenia progu zagrożenia;
6. Stosowanie tylko biologicznych środków ochrony roślin pochodzenia roślinnego i mikrobiologicznego;
7. Niszczenie roślin dziko rosnących w sąsiedztwie plantacji (przykaszanie). Są one rozsadanikiem chorób i szkodników;
8. Unikanie wypalania roślinności w otulinie pól uprawnych.

Wymiernym efektem badań i prac doświadczalnych było opracowanie drugiej części przewodnika dla producentów z zakresu ekologicznej uprawy cebuli na nasiona w dwuletnim cyklu produkcyjnym (Możliwości zwiększenia produktywności materiału rozmnożeniowego (wysadków) cebuli w systemach ekologicznych (II rok produkcja na nasiona)).

Literatura

1. Babik J. (pod red.) 2004. Ekologiczne metody uprawy cebuli – materiały dla rolników. Krajowe Centrum Rolnictwa Ekologicznego. Radom;
2. Caamaño-Antelo S., Fernández-No I. C., Böhme K., Ezzat-Alnakip M., Quintela-Baluja M., Barros-Velázquez J., Calo-Mata P. 2015. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food Microbiology*, 46: 288-298;
3. Derkowska E., Sas Paszt L., Dyki B., Sumorok B. 2015. Assessment of mycorrhizal frequency in the roots of fruit plants using different dyes. *Adv. in Microbiol.*, 5(1): 54-64. DOI: [10.4236/aim.2015.51006](https://doi.org/10.4236/aim.2015.51006);
4. Doruchowski R. W. 2000. Liliowate – Cebula zwyczajna (*Alium cepa* L. var. *cepa* Helm) w : Nasiennictwo (red. Duczał K. W., Tucholska H.). PWRiL. Poznań: 252-263;
5. Hill G. T., Mitkowski N. A., Aldrich-Wolfe L., Emele L. R., Jurkonie D. D., Ficke A., Maldonaldo-Ramirez S., Lynch S. T., Nelson, E. B. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* 15: 25-36;
6. Hoshino Y. T., Morimoto S. 2008. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 701-710;
7. Janas R., Robak J., Sobolewski J. 2005. Skuteczność wybranych środków pochodzenia roślinnego i biostymulatorów w ochronie cebuli nasiennej przed patogenami grzybowymi. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin.* 45,1:742-744;
8. Janas R., Szwejda J., Wojska A. 2020. Przewodnik Uprawa cebuli (*Allium cepa* L.) na nasiona w systemach ekologicznych. I rok uprawy – produkcja wysadków. Instytut Ogrodnictwa. Skierniewice: ss. 29;
9. Kaniszewski S. 2018. Warzywa w uprawie ekologicznej, Skierniewice 2018;
10. Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115–175. In: Stackebrandt E. and M. Goodfellow (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom;
11. Liu J., Yu Y., Cai Z., Bartlam M., Wang Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR–DGGE. *World J. Microb. Biot.* 31: 1387-1395;
12. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 2286-2295;
13. Rodríguez H., de las Rivas B., Muñoz R. 2007. Efficacy of recA gene sequence analysis in the identification and discrimination of *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from stuck wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1): 70-78;
14. Rooney A. P., Price N. P., Ehrhardt C., Swezey J. L., Bannan J. D. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10): 2429-2436;
15. Sadowski Cz., Lenc L., Łukanowski A. 2009. Phytopathological aspect of onion seed production in organic farm. *J. of Res. and Appl. in Agric. Eng.* 54(4): 80-84;
16. Sadowski Cz., Lenc L., Baturó A., Łukanowski A. 2008. Z badań nad zdrowotnością roślin uprawianych w systemie ekologicznym. *Mon. „Poszukiwanie nowych rozwiązań w ochronie upraw ekologicznych”* pod red. E. Matyjaszczyk IOR PIB Poznań, s. 89-106;
17. Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe, C. C. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results?. *J. Microbiol. Meth.* 69: 470-479;
18. Studziński A., Kagan F., Sosna Z. 1987. Atlas chorób i szkodników roślin warzywnych. PWRiL. Warszawa;
19. Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology* 55: 415–424;
20. Szwejda J. 2006. Ochrona roślin warzywnych przed szkodnikami w gospodarstwach ekologicznych w Polsce (tekst w j. ang.). SGGW Warszawa, *Horticult. And Landsc. Architect.* 27: 5-15;

21. Szwejda J. 2015. Szkodniki czosnkowatych. W: Szkodniki Roślin Warzywnych. PWN. Warszawa: 41-54;
22. Szwejda J. 2020. Ochrona cebuli i czosnku. Warzywa. Kraków: 9: 38-40;
23. Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V., 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un systeme racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds), Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. INRA, Paris, 217-221;
24. Xiao L., Xie C. C., Cai J., Lin Z. J., Chen Y. H. 2009. Identification and characterization of a chitinase-produced *Bacillus* showing significant antifungal activity. Current Microbiology, 58(5): 528-533.