



IV SESJA MŁODYCH MIKROBIOLOGÓW ŚRODOWISKA ŁÓDZKIEGO

Opracowanie biopreparatu na bazie ekstraktów roślinnych do ochrony ziemniaka sadzeniaka przed fitopatogenami

Aleksandra Steglińska^{1,2}, Anastasiia Bekhter³, Konrad Jastrząbek³, Alina Kunicka-
Styczyńska⁴, Krzysztof Śmigielski³, Beata Gutarowska¹, Dorota Kręgiel¹

1) Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

2) Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska Politechniki Łódzkiej, ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

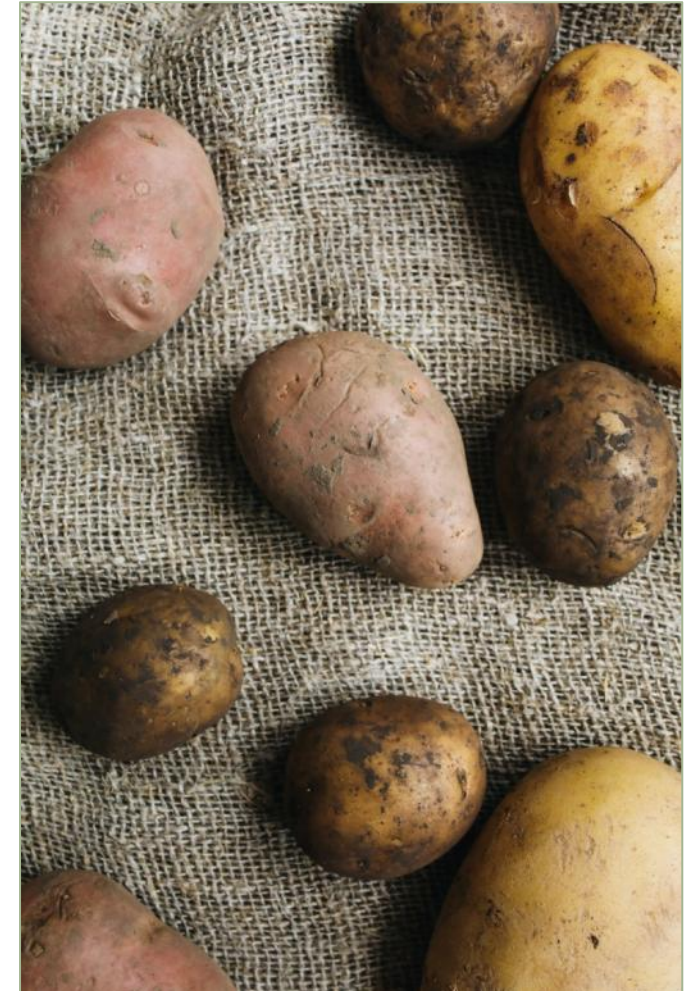
3) Instytut Surowców Naturalnych i Kosmetyków, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

4) Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

23.06.2021

Ziemniak sadzeniak

- Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) jest trzecią najczęściej konsumowaną rośliną spożywczą na świecie, po pszenicy i ryżu.
- Polska to 2 w Europie i 7 na świecie największy producent ziemniaków.
- Zbiory w 2020 roku w Polsce osiągnęły wartość 9 mln ton (powierzchnia uprawy 300 tys. ha).
- Duży potencjał eksportowy - problemem jest zwiększona detekcja fitopatogenów ziemniaka
- Głównym źródłem zakażenia ziemniaka chorobami są porażone sadzeniaki.
- Bezpośrednie straty plonów spowodowane przez patogeny roślin zmniejszają globalną produktywność rolnictwa o 20–50%.



Biopreparat vs. chemiczny preparat

Problemy związane ze stosowaniem chemicznych preparatów:

- Słaba biodegradowalność
- Toksyczność w stosunku do organizmów ludzkich
- Akumulacja w roślinach, glebie, wodzie
- Uodparnianie się patogenów
- Niska selektywność



**Wzrost zainteresowania naturalnymi,
przyjaznymi środowisku metodami
ochrony roślin**

- Substancje pochodzenia roślinnego zawarte w olejkach i ekstraktach
- Mikroorganizmy i ich metabolity



Cel pracy

- ocena przeciwdrobnoustrojowych właściwości ekstraktów roślinnych wobec fitopatogenów ziemniaka sadzeniaka,
- wyznaczenie wartości MIC i MBC/MFC wybranych ekstraktów,
- analiza składu chemicznego wybranych ekstraktów,
- testy aplikacyjne na sadzeniakach.

Materiał roślinny



Przygotowanie ekstraktów

1. 20 g drobno zmielonego surowca roślinnego zalano 200 ml wody o temp. 100°C i pozostawiono pod przykryciem bez mieszania na 1 godzinę.
2. Otrzymane ekstrakty poddano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz w temperaturze 23-27°C przez 30 min.
3. Napary przefiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Surowce roślinne pozyskano z:
"Dary Natury" Sp. z o. o.
Zakład Zielarski „KAWON - HURT”

Fitopatogeny ziemniaka sadzeniaka



Colletotrichum coccodes DSM 62126
Antraknoza



Phoma exigua DSM 62040
Fomoza



Streptomyces scabiei DSM 40778
Parch zwykły



Fusarium oxysporum Z154*,
Fusarium sambucinum DSM 62397
Sucha zgnilizna bulw



Rhizoctonia solani DSM 22843
Rizoktonioza



Pectobacterium carotovorum PCM 2056
Mokra zgnilizna bulw



Alternaria solani Z184*, *Alternaria alternata* ŁOCK 408,
Alternaria tenuissima DSM 63360
Alternarioza

Metodyka badań

1. Screening – ocena przeciwdrobnoustrojowych właściwości wodnych ekstraktów roślinnych wobec fitopatogenów ziemniaka sadzeniaka
 - Metoda agarowo-dyfuzyjna: posiew zawiesiny fitopatogenów o gęstości 10^6 jtk/ml w 0,85% NaCl na podłoże PDA (pleśnie) lub TSA (bakterie), $\varnothing$ studzienki = 15 mm, objętość nanoszonego ekstraktu = 250 μ l, inkubacja 2-7 dni w zależności od fitopatogenu w $T = 25^\circ\text{C}$
2. Wyznaczenie MIC i MBC/MFC
 - Metoda zawiesinowa: geometryczny szereg rozcieńczeń ekstraktu, podłoże MEB (pleśnie) lub TSB (bakterie), inokulacja zawiesiną fitopatogenów o gęstości 10^6 jtk/ml w 0,85% NaCl, inkubacja 1-4 dni w zależności od fitopatogenu w $T = 25^\circ\text{C}$
3. Analiza składu chemicznego wybranych ekstraktów
 - Chromatografia gazowa GC/MS
4. Testy aplikacyjne wybranych ekstraktów na ziemniakach
 - Nacięte sadzeniaki zanurzono w ekstrakcie i po wyschnięciu zainokulowano 60 μ l zawiesiny fitopatogenów o gęstości 10^6 jtk/ml w 0,85% NaCl, następnie inkubowano przez 14 dni w $T = 25^\circ\text{C}$

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wodnych ekstraktów roślinnych

NAZWA ZWYCZAJOWA	NAZWA SYSTEMATYCZNA	ŚREDNIE STREFY ZAHAMOWANIA WZROSTU FITOPATOGENÓW [MM] ± OS										SPEKTRUM DZIAŁANIA [LICZBA HAMOWANYCH FITOPATOGENÓW]
		<i>Fusarium oxysporum</i> Z154	<i>Fusarium sambucium</i> DSM 62397	<i>Alternaria alternata</i> ŁOCK 408	<i>Alternaria solani</i> Z184	<i>Alternaria tenuissima</i> DSM 63360	<i>Colletotrichum coccodes</i> DSM 62126	<i>Rhizoctonia solani</i> DSM 22843	<i>Phoma exigua</i> DSM 62040	<i>Pectobacterium carotovorum</i> PCM 2056	<i>Streptomyces scabiei</i> DSM 40778	
Krwawnik	<i>Achillea millefolium</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Mięta	<i>Mentha piperita</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Szałwia	<i>Salvia officinalis</i>	11,0+1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1
Skrzyp	<i>Equisetum arvense</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Pokrzywa	<i>Urtica dioica</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Mniszek	<i>Taraxacum officinale</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Perz	<i>Elymus repens</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Dziurawiec	<i>Hypericum ternum</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Rozmaryn	<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Chmiel	<i>Humulus lupulus</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Cząber	<i>Satureja hortensis</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Kminek	<i>Carum carvi</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Czarnuszka	<i>Nigella sativa</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	4,0+1,0	0,0±0,0	1,0+0,0	5,3+0,6	1,7+0,6	0,0±0,0	4,7+0,6	0,0±0,0	5
Tymianek	<i>Thymus vulgaris</i>	1,7+0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	1,3+0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	2
Lawenda	<i>Lavandula angustifolia</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Chrzan	<i>Armoracia rusticana</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0
Czosnek	<i>Allium sativum</i>	39,7+0,6	19,7+0,7	24,3+0,6	49,6+0,6	31,0+1,0	41,3+0,6	56,0+1,0	43,3+2,1	25,0+1,0	27,7+0,6	10
Goździki	<i>Flos Caryophylli</i>	25,7+0,6	11,0+0,0	28,7+1,2	49,0+1,0	25,6+0,6	25,3+0,6	57,6+0,6	39,7+0,6	20,7+0,6	41,7+0,6	10
Cebula	<i>Allium cepa</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	20,1+0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	1
Kurkuma	<i>Curcuma longa</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	29,7+0,6	1
Rdest wężownik	<i>Polygonum bistorta</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	24,6+0,6	1
Rdest ptasi	<i>Polygonum aviculare</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0

< 5 mm niska

5-9,9 mm średnia

10-15 mm wysoka

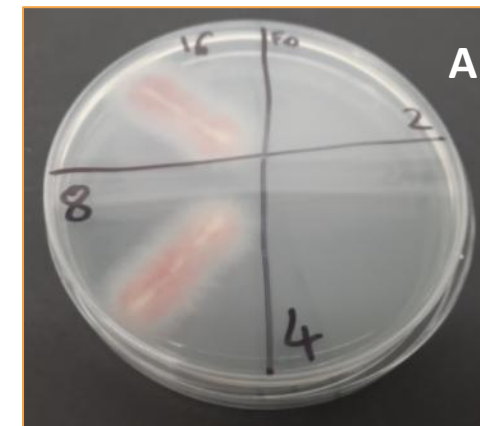
>15 mm bardzo wysoka

Minimalne stężenie hamujące/bójcze wodnych ekstraktów roślinnych

FITOPATOGENY	EKSTRAKT WODNY Z CZOSNKU (<i>Allium sativum</i>)		EKSTRAKT WODNY Z GOŹDZIKÓW (<i>Flos Caryophylli</i>)	
	MIC [mg/ml]	MBC/ MFC [mg/ml]	MIC [mg/ml]	MBC/ MFC [mg/ml]
<i>Fusarium oxysporum</i> Z154	12,5	25	6,3	12,5
<i>Fusarium sambucinum</i> DSM 62397	12,5	25	3,1	12,5
<i>Alternaria alternata</i> ŁOCK 408	25	25	6,3	brak
<i>Alternaria solani</i> Z184	6,3	25	3,1	6,3
<i>Alternaria tenuissima</i> DSM 63360	25	brak	6,3	12,5
<i>Colletotrichum coccodes</i> DSM 62126	12,5	25	6,3	12,5
<i>Rhizoctonia solani</i> DSM 22843	12,5	12,5	3,1	6,3
<i>Phoma exigua</i> DSM 62040	6,3	12,5	3,1	6,3
<i>Pectobacterium carotovorum</i> PCM 2056	25	25	6,3	25
<i>Streptomyces scabiei</i> DSM 40778	12,5	25	3,1	12,5

MIC – minimalne stężenie hamujące [ang. *Minimal Inhibitory Concentration*]

MBC/MFC – minimalne stężenie bójcze [ang. *Minimal Bactericidal/Fungicidal Concentration*]



Wyznaczenie wartości MFC ekstraktu z czosnku wobec *F. oxysporum* (A) i *P. exigua* (B)

Kompozycja chemiczna wodnych ekstraktów roślinnych

Kompozycja chemiczna wodnego ekstraktu z czosnku
[związki chemiczne >0.3%]

Związki chemiczne	Index Kovatsa	Udział procentowy [%]
Acetaldehyde		4,88
propionaldehyde	512	1,52
Allyl mercaptan	599	3,32
Butanal, 3-methyl-	650	4,04
Acetic acid	655	1,82
2-Propanone, 1-hydroxy-	676	5,16
Mercaptoacetone	765	1,59
2-furan-carboxaldehyde	804	6,70
Allyl n-propyl sulphide	888	0,36
Disulfide, methyl 2-propenyl	894	0,42
3-methyl-2(5H)-furanone	897	1,13
2-Furancarboxaldehyde	929	0,76
Dimethyl trisulfide	947	0,90
Benzeneacetaldehyde	1006	0,40
2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone	1040	2,13
2,3-Dihydro-5-hydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	1049	0,48
Diallyl disulphide	1056	1,49
Allyl methyl trisulfide	1111	0,39
Pyranone	1118	3,53
3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	1157	0,42
5-Hydroxymethylfurfural	1196	31,41

Kompozycja chemiczna wodnego ekstraktu z goździków
[związki chemiczne >0.2%]

Związek chemiczny	Index Kovatsa	Udział procentowy [%]
Acetaldehyde		0,36
Diethyl ether	542	5,58
Ethyl acetate	618	0,24
Acetic acid	650	0,21
Propylene glycol	727	0,23
3-Hexen-1-ol,	841	0,61
p-Cresol	1055	0,68
Linalool	1085	0,55
Camphor	1120	0,21
L-Pinocarveol	1123	0,60
Pinocarpone	1138	0,26
borneol	1150	0,26
Terpinen-4-ol	1162	0,32
α-Terpineol	1173	0,40
Carvone	1216	0,57
Eugenol	1334	77,79
Caryophyllene	1419	2,35
Eugenol acetate	1486	4,30
Hexadecanoic acid	1941	0,38

Testy aplikacyjne na sadzeniakach

Fusarium oxysporum



Próbka kontrolna
ID = 45% ± 5,0

Allium sativum
ekstrakt wodny
ID = 0% ± 0

Colletotrichum coccodes



Próba kontrolna
ID = 90% ± 5,0

Allium sativum
ekstrakt wodny
ID = 0% ± 0

Fitopatogen	Stopień porażenia sadzeniaków odmiany 'Impresja' [%]		
	Próbka kontrolna	<i>Allium sativum</i> ekstrakt wodny	<i>Flos Caryophylli</i> ekstrakt wodny
<i>Fusarium oxysporum</i> Z154	45±5,0	0±0,0	5±2,5
<i>Fusarium sambucinum</i> DSM 62397	10±2,5	0±0,0	10±5,0
<i>Alternaria alternata</i> ŁOCK 408	5±0,0	5±2,5	5±2,5
<i>Alternaria solani</i> Z184	5±0,0	0±0,0	20±5,0
<i>Alternaria tenuissima</i> DSM 63360	5±2,5	5±0,0	0±0,0
<i>Colletotrichum coccodes</i> DSM 62126	90±5,0	0±0,0	100±0,0
<i>Rhizoctonia solani</i> DSM 22843	5±0,0	0±0,0	80±7,5
<i>Phoma exigua</i> DSM 62040	5±0,0	0±0,0	100±0,0
<i>Pectobacterium carotovorum</i> PCM 2056	100±0,0	100±0,0	100±0,0
<i>Streptomyces scabiei</i> DSM 40778	5±2,5	0±0,0	20±5,0

ID – stopień porażenia sadzeniaków przez fitopatogeny

Podsumowanie

- Ekstrakty wodne z czosnku i goździków wykazały wysoką/bardzo wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec fitopatogenów ziemniaka sadzeniaka w testach *in vitro*.
- Ekstrakt wodny z czosnku zahamował wzrost 7 z 10 badanych fitopatogenów w testach *in vivo*.
- Ekstrakt wodny z czosnku może zostać wykorzystany jako baza do opracowania biopreparatu roślinnego do ochrony ziemniaka sadzeniaka przed fitopatogenami.



Dziękuję za uwagę

mgr inż. Aleksandra Steglińska
aleksandra.steglinska@dokt.p.lodz.pl

Badania wykonane w ramach projektu „Opracowanie strategii zapobiegania rozwojowi fitopatogenów ziemniaka sadzeniaka w oparciu o ekologiczne rozwiązania biotechnologiczne i nową metodę przechowywania” w ramach konkursu Działania 16. Współpraca objętego PROW 2014-2020 / Agencja Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa