Sposób bioochrony bulw ziemniaka sadzeniaka przed rozwojem fitopatogenów grzybowych.

Przedmiotem wynalazku jest sposób bioochrony bulw ziemniaka sadzeniaka przed rozwojem fitopatogenów grzybowych. Sposób według wynalazku jest przeznaczony dla ekologicznego rolnictwa, jako biologiczna metoda zaprawiania bulw ziemniaka sadzeniaka przed okresem przechowywania w okresie jesienno-zimowym w celu ochrony przed fitopatogenami.

Infekcje fitopatogenami grzybowymi mogą spowodować obniżenie plonu bulw ziemniaków, szczególnie odmian wrażliwych (np. *Impresja*) nawet o 70%. Ochrona ziemniaka przed chorobami powodowanymi przez patogenne grzyby wymaga zabiegów ochrony roślin m. in. zaprawiania preparatami.

Obecnie na rynku krajowym dostępne są preparaty zawierające fungicydy, które w swoim składzie zawierają czynne substancje chemiczne o działaniu przeciwgrzybowym. Ich formulacje oparte są na antygrzybowych substancjach czynnych (np. fluazynam, cymoksanil, propineb, difenokonazol, mandipropamid, mankozeb, wodorotlenek miedzi, siarczan miedzi, chlorotalonil, cyjazofamid, ametoktradyna, fluopikolid, chlorowodorek propamokarbu, piraklostrobina, folpet i in.). Udowodniono jednak, że długoterminowe stosowanie fungicydów powoduje degradację środowiska naturalnego, zachwianie naturalnych biocenoz oraz wzrost oporności fitopatogenów na stosowane związki chemiczne. Środki chemiczne stosowane do ochrony roślin charakteryzują się niską biodegradowalnością w środowisku naturalnym, kumulacją w komórkach organizmów żywych, np. w ziemniakach i mogą przechodzić od końcowego ogniwa w łańcuchu żywienia do organizmów zwierząt i człowieka. Fungicydy stosowane w ochronie sadzeniaków wpływają również na zaburzenie równowagi biologicznej w naturalnych biocenozach.

Alternatywą dla fungicydów są substancje naturalnego pochodzenia które wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec fitopatogenów. Ponadto środki chemiczne oparte na fungicydach przeznaczone są przede wszystkim

dostosowania na polu w czasie uprawy ziemniaka, nie ma zaś metod stosowanych podczas magazynowania ziemniaków sadzeniaków. Natomiast podstawą produkcji zdrowych ziemniaków sadzeniaków jest profilaktyka w postaci eliminowania źródeł zakażenia, uprawa odmian o podwyższonej odporności, ale przede wszystkim prawidłowe przechowywanie zdrowych ziemniaków.

Trudności utrzymania zdrowego ziemniaka w czasie jego przechowywania wynikają z faktu zmieniającego się klimatu, w szczególności podwyższonych temperatur w sezonie jesienno – zimowym, co szczególnie dotyka małych i średnich producentów, którzy przechowują sadzeniaki tradycyjnymi metodami. W warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności zarażone bulwy ziemniaków ulegają zniszczeniu w ciągu kilkunastu dni, a choroba dotyka do 20% magazynowanych ziemniaków. Gospodarstwa zajmujące się uprawą ekologiczną, w tym przypadku nie posiadają żadnych rozwiązań ochrony ziemniaka przed fitopatogenami.

Znane są drożdże z kladu *Metschnikowia pulcherrima*.

Niniejszy wynalazek rozwiązuje problem ekologicznego sposobu ochrony bulw ziemniaka sadzeniaka przed rozwojem fitopatogenów, bez konieczności stosowania środków chemicznych, mogących powodować degradację środowiska naturalnego, zachwianie naturalnych biocenoz oraz wzrost oporności fitopatogenów na zastosowane związki chemiczne.

Sposób bioochrony bulw ziemniaka sadzeniaka przed rozwojem fitopatogenów grzybowych charakteryzuje się tym, że ziemniaki traktuje się zawiesiną komórek drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* o gęstości 10^6-10^7 jtk/ml w postaci kąpieli przez zanurzenie ziemniaków w czasie 5-10 minut, a proces namnażania komórek drożdży prowadzi się w temp. 20-30˚C w czasie 12-48 godz. po zaszczepieniu serwatki czystą kulturą drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* w ilości inokulum 5-10 % v/v, które inkubowano w temperaturze 20-30˚C w czasie 12-48 godz., przy czym stosuje się kwaśną serwatkę pochodzącą z produkcji przemysłowej suplementowaną 1,25-5 g/l ekstraktem drożdżowym, 2,5-10 g/l peptonem i 5-10 g/l glukozą.

Korzystnie drożdże przechowuje się na agarze YPG (1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy) w temp. 4°C po ich namnożeniu w temp. 20-30°C przez czas 24-72 godziny.

Sposób według wynalazku jest rozwiązaniem ekologicznym, przyczynia się do przywrócenia równowagi biologicznej i ochrony środowiska naturalnego. Sposób stosowany do zaprawiania sadzeniaków wpływa pozytywnie na rozwój systemu korzeniowego, a w konsekwencji rozwój roślin i zwiększone plony podczas uprawy ziemniaka.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady z powołaniem się na rysunek, na którym Fig. 1 przedstawia wykres ilustrujący aktywność przeciwdrobnoustrojową przykładowych drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* wyizolowanych z polskich upraw ekologicznych bez stosowania fungicydów w teście in vitro; Fig 2 wykres ilustrujący plon biomasy hodowli drożdży *M. pulcherrima*, w podłożach serwatkowych o różnym poziomie suplementacji. Fig. 3 wykres ilustrujący dynamikę wzrostu drożdży *M. pulcherrima* w bioreaktorze w pożywce serwatkowej; Fig. 3 A1 i B1 przedstawiają próby kontrolne inhibicji infekcji ziemniaka przez *Alternaria solani* (A) i *Fusarium sambucinum* (B), a Fig.3 A2 i B2 - próby z naniesioną hodowlą drożdży z kladu *M. pulcherrima* na podłożu serwatkowym.

Przykład 1.

Drożdże *M. pulcherrima* wyizolowano z owoców z polskich upraw ekologicznych. Drożdże przechowywano na podłożu agarowym YPG (1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy) w temperaturze 4˚C po uprzedniej inkubacji drożdży w temp. 20˚C przez 24 godz.

Ocenę działania przeciwdrobnoustrojowego drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* w warunkach in vitro na fitopatogeny ziemniaka przeprowadzono metodą dyfuzyjno-agarową. Szczepy z kladu *M. pulcherrima* hodowano na pożywce YPG przez 12 godzin w temperaturze 20˚C na wytrząsarce (Unimax, Heidolph, Niemcy) przy 160 rpm. Uprzednio przygotowane zawiesiny fitopatogenów (106 jtk/mL) w ilości 100 µl przenoszono na agar PDA. Następnie,

za pomocą sterylnego korkobora, w płytkach agarowych wycięto studzienki o średnicy 10 mm, do których wprowadzono 250 µl hodowli drożdży – izolatów z kladu *M. pulcherrima*. Płytki inkubowano w temp. 25°C przez 2-5 dni, w zależności od rodzaju fitopatogenu. Średnice stref zahamowania wzrostu patogenów mierzono w mm. Na Fig. 1 przedstawiono strefy zahamowania wzrostu patogenów przez szczepy drożdży *M. pulcherrima*.

Hodowlę szczepu drożdży *M. pulcherrima* prowadzono w reaktorze szklanym LPP Equipment o objętości całkowitej 5L. W reaktorze, sterylizowano 3L pożywki, którą zaszczepiono 150 ml inokulum (5%). Inokulum stanowiła hodowla drożdży w serwatce kwaśnej suplementowanej 1,25 g/l ekstraktu drożdżowego, 2,5 g/l peptonu i 5 g/l glukozy, inkubowana w temp. 20°C przez czas 12 godz. Hodowlę w reaktorze prowadzono w kwaśnej serwatce suplementowanej 1,25 g/l ekstraktu drożdżowego, 2,5 g/l peptonu i 5 g/l glukozy w reaktorze w temperaturze 20˚C w czasie 12 godzin przy prędkościach mieszadła: 200 rpm.

Na Fig.2 przedstawiono dynamikę wzrostu izolatu drożdży z kladu *M. pulcherrima* na suplementowanym serwatce w reaktorze w całym 96-godzinnym cyklu hodowli.

Testy przeciwdrobnoustrojowe *in situ* na sadzeniakach przeprowadzono po ich kąpieli w zawiesinie komórek po 12-godz. hodowli drożdży z kladu *M. pulcherrima* o gęstości 10^6 jtk/ml w kwaśne serwatce suplementowanej 1,25 g/l ekstraktu drożdżowego, 2,5 g/l peptonu i 5 g/l glukozy, w której zanurzono ziemniaki na 5 minut i następnie pozostawiono do wyschnięcia. Następnie ziemniaki traktowano fitopatogenami poprzez nacięcia skalpelem, do których wprowadzono 20 µl każdej zawiesiny fitopatogenów grzybowych. Próbę kontrolną stanowiły ziemniaki traktowane tylko patogenami. Ziemniaki inkubowano w temp. 25±5°C przez 14 dni. Dla porównania sprawdzono aktywność hamowania wzrostu fitopatogenów przez hodowlę drożdży z kladu *M. pulcherrima* w pożywce referencyjnej YPG. Procent porażenia fitopatogenem mierzono w porównaniu do kontroli zgodnie |z równaniem:

$$\text{Inhibicja (\%)} = (C - T) / C \times 100$$

gdzie:

C - % inwazji fitopatogenu na ziemniakach kontrolnych,

T - % inwazji fitopatogenu na ziemniakach traktowanych drożdżami M. pulcherrima wyizolowanych z kwiatów truskawki na podłożu serwatkowym/ na podłożu YPG.

Procent porażonej powierzchni mierzono po przecięciu sadzeniaków na pół. Test przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Inhibicja porażenia sadzeniaków fitopatogenami [%] przez hodowlę izolatu drożdży z kladu *M. pulcherrima* w pożywce serwatkowej w porównaniu do podłoża YPG .

Fitopatogen	**Pożywka hodowlana**	
	serwatkowa	**YPG**
Fusarium oxysporum	30±10	30±5
Fusarium sambucinum	100±0	80±10
Alternaria alternata	100±0	80±5
Alternaria solani	100±0	90±5
Alternaria tenuissima	100±0	95±5
Colletotrichum coccodes	100±0	100±0
Rhizoctonia solani	50±5	60±5
Phoma exigua	100±0	80±5

Komórki drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* namnożone na podłożu serwatkowym hamowały wzrost fitopatogenów grzybowych na ziemniaku podczas jego przechowywania: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Colletotrichum coccodes*, *Rhizoctonia solani*, *Phoma exigua*.

Przykład 2.

Drożdże *M. pulcherrima* wyizolowano z owoców z polskich upraw ekologicznych. Drożdże przechowywano na podłożu agarowym YPG (1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy) w temperaturze 4˚C po uprzedniej inkubacji drożdży w temp. 25˚C przez 48 godz.

Ocenę działania przeciwdrobnoustrojowego drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* w warunkach in vitro na fitopatogeny ziemniaka przeprowadzono metodą dyfuzyjno-agarową. Szczepy z kladu *M. pulcherrima* hodowano na pożywce YPG przez 24 godziny w temperaturze 25˚C na wytrząsarce (Unimax, Heidolph, Niemcy) przy 160 rpm. Uprzednio przygotowane zawiesiny fitopatogenów (106 jtk/mL) w ilości 100 µl przenoszono na agar PDA. Następnie, za pomocą sterylnego korkobora, w płytkach agarowych wycięto studzienki o średnicy 10 mm, do których wprowadzono 250 µl hodowli drożdży – izolatów z kladu *M. pulcherrima*. Płytki inkubowano w temp. 25°C przez 2-5 dni, w zależności od rodzaju fitopatogenu. Średnice stref zahamowania wzrostu patogenów mierzono w mm. Na Fig. 1 przedstawiono strefy zahamowania wzrostu patogenów przez szczepy drożdży *M. pulcherrima*.

Hodowlę szczepu drożdży *M. pulcherrima* prowadzono w reaktorze szklanym LPP Equipment o objętości całkowitej 5L. W reaktorze, sterylizowano 3L pożywki, którą zaszczepiono 225 ml inokulum (7,5%). Inokulum stanowiła hodowla drożdży w serwatce kwaśnej suplementowanej 2,5 g/l ekstraktu drożdżowego, 5 g/l peptonu i 7,5 g/l glukozy, inkubowana w temp. 25°C przez czas 24 godz. Hodowlę w reaktorze prowadzono w kwaśnej serwatce suplementowanej 2,5 g/l ekstraktu drożdżowego, 5 g/l peptonu i 7,5 g/l glukozy w reaktorze w temperaturze 25˚C w czasie 24 godzin przy prędkościach mieszadła: 200 rpm. Na Fig. 2 przedstawiono dynamikę wzrostu izolatu drożdży z kladu *M. pulcherrima* na suplementowanej serwatce w reaktorze w całym 96-godzinnym cyklu hodowli.

Testy przeciwdrobnoustrojowe *in situ* na sadzeniakach przeprowadzono po ich kąpieli w zawiesinie komórek po 24-godz. hodowli drożdży z kladu *M. pulcherrima* o gęstości 10^6 jtk/ml w kwaśne serwatce suplementowanej 2,5 g/l ekstraktu drożdżowego, 5 g/l peptonu i 7,5 g/l glukozy, w której zanurzono ziemniaki na 7 minut i następnie pozostawiono do wyschnięcia. Następnie ziemniaki traktowano fitopatogenami poprzez nacięcia skalpelem, do których wprowadzono 20 µl każdej zawiesiny fitopatogenów grzybowych. Próbę kontrolną stanowiły ziemniaki traktowane tylko patogenami. Ziemniaki inkubowano w temp. 25±5°C przez 14 dni. Dla porównania sprawdzono aktywność hamowania wzrostu

fitopatogenów przez hodowlę drożdży z kladu *M. pulcherrima* w pożywce referencyjnej YPG. Procent porażenia fitopatogenem mierzono w porównaniu do kontroli zgodnie |z równaniem:

$$\text{Inhibicja (\%)} = (C - T) / C \times 100$$

gdzie:

C - % inwazji fitopatogenu na ziemniakach kontrolnych,

T - % inwazji fitopatogenu na ziemniakach traktowanych drożdżami M. pulcherrima wyizolowanych z kwiatów truskawki na podłożu serwatkowym/ na podłożu YPG.

Procent porażonej powierzchni mierzono po przecięciu sadzeniaków na pół. Test przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Inhibicja porażenia sadzeniaków fitopatogenami [%] przez hodowlę izolatu drożdży z kladu *M. pulcherrima* w pożywce serwatkowej w porównaniu do podłoża YPG.

Fitopatogen	**Pożywka hodowlana**	
	serwatkowa	**YPG**
Fusarium oxysporum	30±10	30±5
Fusarium sambucinum	100±0	80±10
Alternaria alternata	100±0	80±5
Alternaria solani	100±0	90±5
Alternaria tenuissima	100±0	95±5
Colletotrichum coccodes	100±0	100±0
Rhizoctonia solani	50±5	60±5
Phoma exigua	100±0	80±5

Komórki drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* namnożone na podłożu serwatkowym hamowały wzrost fitopatogenów grzybowych na ziemniaku podczas jego przechowywania: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Colletotrichum coccodes*, *Rhizoctonia solani*, *Phoma exigua.*

Przykład 3.

Drożdże *M. pulcherrima* wyizolowano z owoców z polskich upraw ekologicznych. Drożdże przechowywano na podłożu agarowym YPG (1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy) w temperaturze 4˚C po uprzedniej inkubacji drożdży w temp. 30˚C przez 72 godz.

Ocenę działania przeciwdrobnoustrojowego drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* w warunkach in vitro na fitopatogeny ziemniaka przeprowadzono metodą dyfuzyjno-agarową. Szczepy z kladu *M. pulcherrima* hodowano na pożywce YPG przez 48 godzin w temperaturze 30˚C na wytrząsarce (Unimax, Heidolph, Niemcy) przy 160 rpm. Uprzednio przygotowane zawiesiny fitopatogenów (10^6 jtk/mL) w ilości 100 µl przenoszono na agar PDA. Następnie, za pomocą sterylnego korkobora, w płytkach agarowych wycięto studzienki o średnicy 10 mm, do których wprowadzono 250 µl hodowli drożdży – izolatów z kladu *M. pulcherrima*. Płytki inkubowano w temp. 25°C przez 2-5 dni, w zależności od rodzaju fitopatogenu. Średnice stref zahamowania wzrostu patogenów mierzono w mm. Na Fig. 1 przedstawiono strefy zahamowania wzrostu fitopatogenów przez szczepy drożdży *M. pulcherrima*.

Hodowlę szczepu drożdży *M. pulcherrima* prowadzono w reaktorze szklanym LPP Equipment o objętości całkowitej 5L. W reaktorze, sterylizowano 3L pożywki, którą zaszczepiono 300 ml inokulum (10%). Inokulum stanowiła hodowla drożdży w serwatce kwaśnej suplementowanej 5 g/l ekstraktu drożdżowego, 10 g/l peptonu i 10 g/l glukozy, inkubowana w temp. 30°C przez czas 48 godz. Hodowlę w reaktorze prowadzono w kwaśnej serwatce suplementowanej 5 g/l ekstraktu drożdżowego, 10 g/l peptonu i 10 g/l glukozy w reaktorze w temperaturze 30˚C w czasie 48 godzin przy prędkościach mieszadła: 200 rpm. Na Fig.2 przedstawiono dynamikę wzrostu izolatu drożdży z kladu *M. pulcherrima* na suplementowanej serwatce w reaktorze w całym 96-godzinnym cyklu hodowli.

Testy przeciwdrobnoustrojowe *in situ* na sadzeniakach przeprowadzono po ich kąpieli w zawiesinie komórek po 48-godz. hodowli drożdży z kladu

M. pulcherrima o gęstości 10^7 jtk/ml w kwaśne serwatce suplementowanej 5 g/l ekstraktu drożdżowego, 10 g/l peptonu i 10 g/l glukozy, w której zanurzono ziemniaki na 10 minut i następnie pozostawiono do wyschnięcia. Następnie ziemniaki traktowano fitopatogenami poprzez nacięcia skalpelem, do których wprowadzono 20 µl każdej zawiesiny fitopatogenów grzybowych. Próbę kontrolną stanowiły ziemniaki traktowane tylko patogenami. Ziemniaki inkubowano w temp. 25±5°C przez 14 dni. Dla porównania sprawdzono aktywność hamowania wzrostu fitopatogenów przez hodowlę drożdży z kladu *M. pulcherrima* w pożywce referencyjnej YPG. Procent porażenia fitopatogenem mierzono w porównaniu do kontroli zgodnie |z równaniem:

$$\text{Inhibicja (\%)} = (C - T) / C \times 100$$

gdzie:

C - % inwazji fitopatogenu na ziemniakach kontrolnych,

T - % inwazji fitopatogenu na ziemniakach traktowanych drożdżami M. pulcherrima wyizolowanych z kwiatów truskawki na podłożu serwatkowym/ na podłożu YPG.

Procent porażonej powierzchni mierzono po przecięciu sadzeniaków na pół. Test przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Inhibicja porażenia sadzeniaków fitopatogenami [%] przez hodowlę izolatu drożdży z kladu *M. pulcherrima* w pożywce serwatkowej w porównaniu do podłoża YPG.

Fitopatogen	**Pożywka hodowlana**	
	serwatkowa	**YPG**
Fusarium oxysporum	30±10	30±5
Fusarium sambucinum	100±0	80±10
Alternaria alternata	100±0	80±5
Alternaria solani	100±0	90±5
Alternaria tenuissima	100±0	95±5
Colletotrichum coccodes	100±0	100±0
Rhizoctonia solani	50±5	60±5
Phoma exigua	100±0	80±5

Komórki drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* namnożone na podłożu serwatkowym hamowały wzrost fitopatogenów grzybowych na ziemniaku podczas jego przechowywania: *Fusarium oxysporum, Fusarium sambucinum, Alternaria alternata, Alternaria solani, Alternaria tenuissima, Colletotrichum coccodes, Rhizoctonia solani, Phoma exigua.*

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób bioochrony bulw ziemniaka sadzeniaka przed rozwojem fitopatogenów grzybowych **znamienny tym, że** ziemniaki traktuje się zawiesiną komórek drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* o gęstości 10^6-10^7 jtk/ml w postaci kąpieli przez zanurzenie ziemniaków w czasie 5-10 minut, a proces namnażania komórek drożdży prowadzi się w temp. 20-30˚C w czasie 12-48 godz. po zaszczepieniu serwatki czystą kulturą drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* w ilości inokulum 5-10 % v/v, które inkubowano w temperaturze 20-30˚C w czasie 12-48 godz., przy czym stosuje się kwaśną serwatkę pochodzącą z produkcji przemysłowej suplementowaną 1,25-5 g/l ekstraktem drożdżowym, 2,5-10 g/l peptonem i 5-10 g/l glukozą.
2. Sposób według zastrz. 1 znamienny tym, że drożdże przechowuje się na agarze YPG (1% ekstraktu drożdżowego, 2% peptonu, 2% glukozy) w temp. 4°C po ich namnożeniu w temp. 20-30°C przez czas 24-72 godziny.

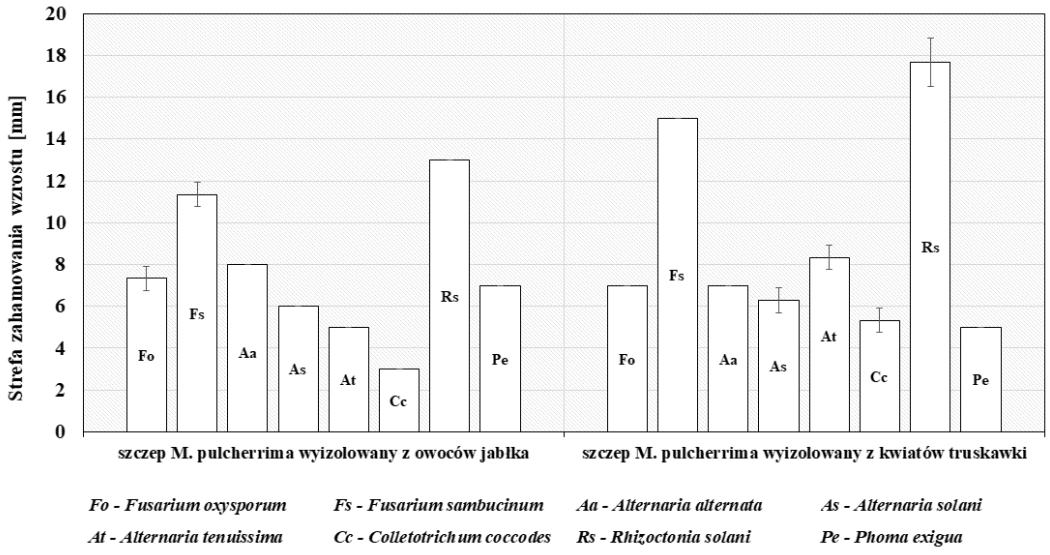

Strefa zahamowania wzrostu [mm]
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Fo
Fs
Aa
As
At
Cc
Rs
Pe
szczep M. pulcherrima wyizolowany z owoców jabłka
szczep M. pulcherrima wyizolowany z kwiatów truskawki
Fo - Fusarium oxysporum
Fs - Fusarium sambucinum
Aa - Alternaria alternata
As - Alternaria solani
At - Alternaria tenuissima
Cc - Colletotrichum coccodes
Rs - Rhizoctonia solani
Pe - Phoma exigua

Fig. 1

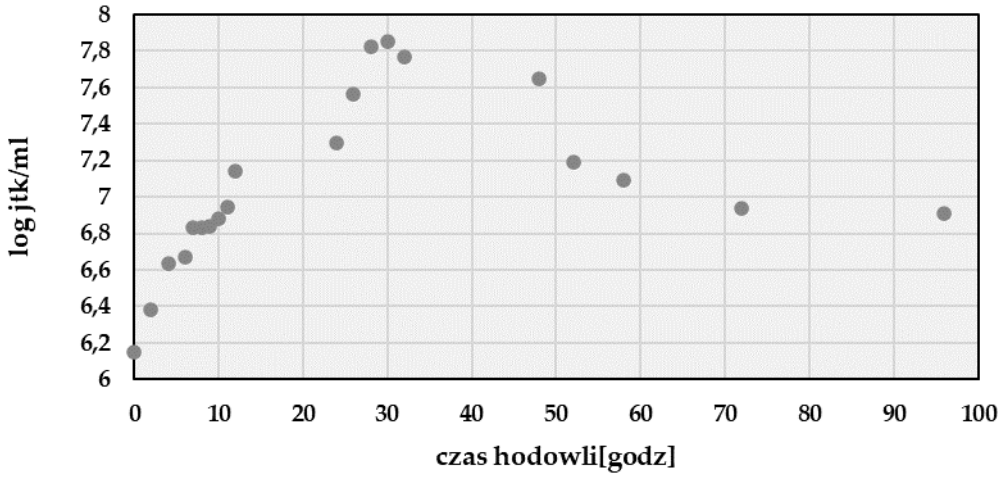
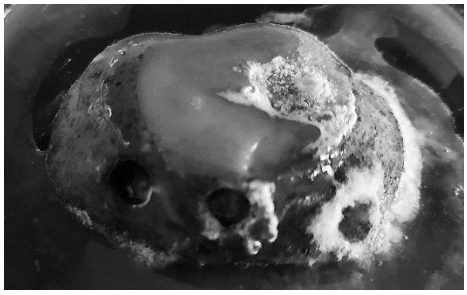
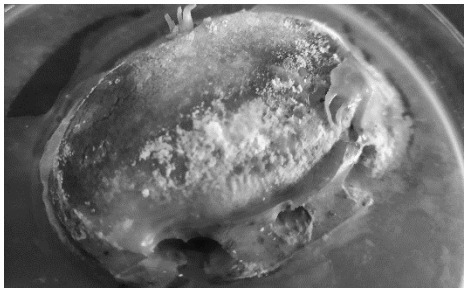

log jtk/ml
8
7,8
7,6
7,4
7,2
7
6,8
6,6
6,4
6,2
6
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
czas hodowli[godz]

Fig. 2



A1

A2



B1

B2

Fig. 3

Skrót

Sposób bioochrony bulw ziemniaka sadzeniaka przed rozwojem fitopatogenów grzybowych charakteryzuje się tym, że ziemniaki traktuje się zawiesiną komórek drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* o gęstości 10^6-10^7 jtk/ml w postaci kąpieli przez zanurzenie ziemniaków w czasie 5-10 minut, a proces namnażania komórek drożdży prowadzi się w temp. 20-30˚C w czasie 12-48 godz. po zaszczepieniu serwatki czystą kulturą drożdży z kladu *Metschnikowia pulcherrima* w ilości inokulum 5-10 % v/v, które inkubowano w temperaturze 20-30˚C w czasie 12-48 godz., przy czym stosuje się kwaśną serwatkę pochodzącą z produkcji przemysłowej suplementowaną 1,25-5 g/l ekstraktem drożdżowym, 2,5-10 g/l peptonem i 5-10 g/l glukozą.

(2 zastrzeżenia)