

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245234 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441834**

(22) Data zgłoszenia: **2022.07.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.01.29 BUP 05/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.06.03 WUP 23/2024**

(51) MKP:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

A01N 63/20 (2020.01)

A01P 3/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT OGRODNICTWA – PAŃSTWOWY
INSTYTUT BADAWCZY, Skierniewice, PL
INTERMAG SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Oikusz, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ARTUR MIKICIŃSKI, Skierniewice, PL
JOANNA PUŁAWSKA, Skierniewice, PL
HUBERT GŁOS, Skierniewice, PL
ANNA JARECKA-BONCELA, Skierniewice, PL
MAGDALENA PTASZEK, Łódź, PL
AGNIESZKA WŁODAREK, Głuchów, PL
ANNA PONIATOWSKA, Skierniewice, PL
MONIKA MICHAŁECKA, Skierniewice, PL
MONIKA KAŁUŻNA, Skierniewice, PL
HUBERT KARDASZ, Oikusz, PL
KATARZYNA GÓRALSKA, Kraków, PL
MARCIN OLESZCZAK, Kielce, PL
KRZYSZTOF AMBROZIAK, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Patrycja Rosół, Kraków, PL

(54) Tytuł:

Szczepy rodzaju *Pantoea* spp. i zastosowanie szczepów rodzaju *Pantoea* spp. w ochronie roślin

PL 245234 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są szczepy rodzaju *Pantoea* spp. oraz zastosowanie szczepów rodzaju *Pantoea* spp. w ochronie roślin warzywnych, sadowniczych, rolniczych i ozdobnych, przed chorobami grzybowymi takimi jak np. zgnilizna twardzikowa, szara pleśń, alternarioza, antraknoza, brunatna zgnilizna, gorzka zgnilizna, mączniak właściwy i mokra zgnilizna owoców oraz bakteryjnymi takimi jak np. zaraza ogniowa, czy też mokra zgnilizna, porażającymi rośliny uprawne, w okresie wegetacji oraz w trakcie przechowywania plonów.

Jednym z głównych celów rolnictwa krajów wysoko rozwiniętych jest zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony roślin przez wprowadzenie proekologicznych systemów produkcji. Upowszechnienie i wdrożenie tych systemów pozwala na przywrócenie równowagi w środowisku i wykorzystanie jego naturalnej oporności przeciwko agrofagom oraz innym szkodliwym czynnikom ograniczającym efektywność produkcji roślinnej. W społeczeństwie jest coraz powszechniejsze oczekiwanie na rozwój metod alternatywnych wobec metody chemicznej. Jednym z rozwiązań pozwalającym na ograniczenie chemizacji rolnictwa jest stosowanie bioproduktów – środków ochrony roślin bazujących na mikroorganizmach, pozwalających na ochronę roślin przed chorobami i jednocześnie na produkcję bezpiecznych dla konsumenta owoców i warzyw o zmniejszonej pozostałości chemicznych środków ochrony roślin.

Jedną z ważniejszych i powszechnie występujących chorób grzybowych roślin uprawnych jest zgnilizna twardzikowa powodowana przez grzyba *Sclerotinia sclerotiorum*, będącego polifagiem, porażającym większość gatunków roślin warzywnych, a także występującym w uprawie rzepaku, słonecznika i soi. Największe straty patogen powoduje na roślinach, które wytwarzają organy spichrzowe takie jak korzenie, cebule czy kłącza. Natomiast u warzyw kapustnych *S. sclerotiorum* może powodować pozbiornicze gnicie główek w okresie przechowywania. Zgnilizna twardzikowa stanowi także bardzo duże zagrożenie dla plantacji nasiennych, nie tylko warzyw korzeniowych, ale także warzyw kapustnych i roślin rolniczych. Poważnym problemem dla plantatorów jest skuteczne wyeliminowanie patogenu z uprawy, gdyż sprawca choroby wytwarza liczne sklerocja, które mają kilkuletnią żywotność i przez to trwale zakażają podłoże, czy pomieszczenia, w których są składowane warzywa po zbiorze.

Szara pleśń powodowana przez grzyba *Botrytis cinerea* atakuje wiele gatunków roślin, przy czym może występować przez cały okres wegetacji, porażając wszystkie nadziemne ich części. Sprawca choroby poraża rośliny rolnicze, sadownicze i ozdobne. Szczególnie podatne na infekcje są rośliny jagodowe. Patogen może wyrządzać szkody już w fazie kiełkowania roślin, powodując zgorzel i obumieranie młodych siewek. Szara pleśń poraża także warzywa w okresie przechowywania. Grzyb do infekcji i rozwoju wymaga wysokiej wilgotności względnej powietrza oraz silnie zwilżonych liści. Rozwojowi choroby sprzyja mała ilość światła, osłabienie roślin innymi chorobami, a także niedobór wapnia i potasu w glebie.

Alternarioza to zespół chorób liści, pędów i w mniejszym stopniu owoców powodowanych przez grzyby z rodzaju *Alternaria* spp. Mikroorganizmy te są szeroko rozpowszechnione w głównych rejonach uprawy cebuli, warzyw kapustnych, pora, marchwi, ziemniaków i pomidorów. Infekcje powodowane przez zarodniki *Alternaria* spp. mogą powodować znaczne straty w jakości i ilości uzyskiwanych plonów oraz przyczyniać się do ich gorszego przechowywania. Cechą charakterystyczną chorób powodowanych przez grzyby z rodzaju *Alternaria* spp. są koncentryczne, lekko zapadające się, małe plamy o barwie od zielonej do ciemnobrązowej, które ułożone są współśrodkowo na porażanych organach. Plamy z czasem przybierają postać ciemnobrązowych kanciastych form z żółtą otoczką.

Antraknoza, to choroba owoców powodowana przez grzyba *Glomerella acutata* znanego głównie w stadium konidialnym *Colletotrichum acutatum* na różnych etapach ich wzrostu. Objawy mogą być obserwowane zarówno w sadzie, jak i w okresie przechowywania. Grzyb zimuje w postaci grzybni w korze ran zgorzelowych oraz rzadziej na zмумifikowanych owocach. W czasie wzrostu jabłek i gruszek w warunkach wysokiej wilgotności powietrza dochodzi do wysiewu zarodników, które przenoszone przez wiatr i krople deszczu dokonują infekcji. Patogen porażać może jabłoni i gruszę a także truskawkę, wiśnię, czy borówkę wysoką. W przypadku jabłek i gruszek występowanie objawów antraknozy, w okresie przechowywania, zbiega się często z osiągnięciem dojrzałości konsumpcyjnej. Dodatkowo zbyt wysoka temperatura panująca w chłodni i podczas obrotu handlowego stymuluje szybszy rozwój plam gnilnych. W ostatnich latach nasilenie choroby w centralnej Polsce nie było wysokie, jednak w 2018 roku porażenie jabłek wzrosło.

Brunatna zgnilizna jabłek – monilioza, to choroba, powodowana przez grzyby z rodzaju *Monilinia* spp.. Choroba występuje zarówno na drzewach ziarnkowych – jabłoniach, jak i na owocach drzew pestkowych. Poraża zwłaszcza śliwy oraz morele. Choroba ma dwie formy: letnią – występującą w sadzie oraz ujawniającą się w czasie przechowywania. Szkodliwość choroby polega na gniciu owoców.

Gorzka zgnilizna jabłek i gruszek to choroba powodowana przez grzyby z rodzaju *Neofabrea* spp. Patogeny te powodują dwa typy objawów: zgorzele kory jabłoni oraz „oczkwowanie” jabłek i gruszek w okresie przechowywania. Zgorzele kory objawiają się powstawaniem eliptycznych ran zgorzelowych na pędach drzew. Na zamarłej korze widoczne są wzniesienia będące skupieniami zarodników konidialnych. Zarodnikowanie grzybów na martwych sęczkach, krótkopędach i ranach zgorzelowych jest źródłem zakażenia dla owoców.

Mączniak właściwy to zbiorowa nazwa grupy chorób wywołanych przez grzyby porażające nadziemne części roślin. Grzyby te są wysoko wyspecjalizowane i często porażają jeden wybrany gatunek rośliny. Dlatego w każdej uprawie może występować inny gatunek grzyba, który wywołuje tę chorobę. I tak np. na różach na ogół chorobę wywołuje grzyb *Podosphaera pannosa*, na trawach i zbożach *Erysiphe graminis* lub *Blumeria graminis*, na winoroślach *Uncinula necator*, na marchwi *Erysiphe heraclei* a na jabłoniach *Podosphaera leucotricha*. Grzyby te mogą wywoływać objawy na wszystkich częściach nadziemnych: liściach, łodygach, owocach i kwiatach. Oprócz upraw warzyw i roślin ozdobnych, mączniak występuje również w uprawach owoców jagodowych. Pomimo tego, że prawie każdą uprawę atakują inne gatunki grzybów chorobotwórczych, cechą wspólną mączniaków właściwych są białe, mączyste plamy, pojawiające się najczęściej na górnej stronie liści. Zwykle zaczynają się one pojawiać w dolnej części rośliny. Kiedy grzyb się rozprzestrzenia, może pokryć całą powierzchnię liścia, powodując żółknięcie i ostatecznie zasychanie. W przypadku bardzo silnego porażenia, objawy mogą pojawić się również na spodniej stronie liścia i w zależności od gatunku innych organach nadziemnych rośliny.

Do najbardziej szkodliwych chorób jabłoni i gruszy należy zaraza ogniowa. W Polsce występuje od ponad 50 lat i corocznie wyrządza szkody o znaczeniu gospodarczym, zwłaszcza w sadach. Dotychczas została wykryta w prawie wszystkich rejonach uprawy roślin sadowniczych. Wieloletnie obserwacje wskazują jednak na znacząco nieregularność występowania choroby, i to zarówno w aspekcie jej nasilenia w rejonach, w których jest notowana od lat, jak i niespodziewanego pojawu w rejonach, w których nigdy nie była wykrywana. Zmienność występowania zarazy ogniowej wiąże się głównie z przebiegiem warunków atmosferycznych decydujących o przeżywalności jej sprawcy, bakterii *Erwinia amylovora*, w porażonych organach roślin-gospodarzy, których zakres jest szeroki i obejmuje ponad 130 gatunków, głównie z rodziny różowatych. W Polsce, obok jabłoni i gruszy, porażane są: głóg, pigwa, pigwowiec, ognik, irga, jarzęb i świdośliwa.

Natomiast mokra zgnilizna jest wywołwana przez bakterie z gatunku *Pectobacterium carotovorum*, które mogą powodować masowe, mokre gnicie korzeni lub bulw już pod koniec okresu wegetacji lub w czasie przechowania. Gniciu korzeni towarzyszy typowy dla tej choroby nieprzyjemny zapach psującej się ryby. W trakcie wegetacji na porażonych korzeniach i bulwach widoczne są małe, wodniste plamki, które brunatnieją i powiększają swoją powierzchnię. Tkanka w tych miejscach mięknie, gnije i zmienia się w półpłynną, śluzowatą, cuchnącą masę. Nasilenie objawów występuje w trakcie przechowywania, zwłaszcza na uszkodzonych mechanicznie korzeniach i bulwach. Rozwojowi bakterii sprzyja wysoka temperatura i duża wilgotność powietrza w przechowalniach. Do zakażenia roślin dochodzi w warunkach polowych, w okresach długotrwałego uwilgotnienia gleby. Bakteria rozprzestrzenia się masowo w glebie, w której pozostały zakażone resztki roślinne. W większości przypadków zakażenie następuje w trakcie transportu i przechowania mokrych i mechanicznie uszkodzonych korzeni i bulw. Na owocach natomiast może występować mokra zgnilizna powodowana przez grzyby z rodzaju *Penicillium* spp., np. *Penicillium expansum*.

Znane są z literatury patentowej i publikacji naukowych środki ochrony roślin oparte na mikroorganizmach przeznaczone do stosowania w uprawie roślin.

Przykładowo, ze zgłoszenia PL418852 A1 znany jest biopreparat przeznaczony do ochrony liści roślin przed szarą pleśnią, składający się z wody (95%), kwasów humusowych (4%) oraz zarodników konidialnych szczepów grzybów *Trichoderma atroviride* Tr-43 i Tr-53, *Trichoderma harzianum* WT17AJ i *Trichoderma asperellum* WT9 w ilości minimum 10^6 jednostek tworzących kolonie w 1 ml preparatu, oraz kompozycja środka do ochrony liści roślin przed szarą pleśnią na bazie tego biopreparatu.

Z opisu patentowego PL238148 B1, znany jest biopreparat do ochrony roślin przed zakażeniem bakteryjnym, np. powodowanymi przez bakteryjne patogeny pektynolityczne z rodzaju *Pectobacterium* i *Dickeya* (mokra zgnilizna), stanowiący formułację sypką zawierającą jako nośnik ziemię okrzemkową

lub kaolin oraz dodatki w postaci metylocelulozy, β -cyclodekstryny, lignosulfonianu sodowego, KH_2PO_4 , zaś jako środek biologicznie aktywny zawiera liofilizat wybranego, zdeponowanego szczepu bakterii antagonistycznej *Serratia plymuthica* czyli szczep A294 zdeponowany pod numerem B/00143, lub *Serratia rubidaea* czyli szczep H469 zdeponowany od numerem B/00142, lub szczep bakterii antagonistycznej *Serratia rubidaea* czyli szczep H440 zdeponowany pod numerem B/00141, lub szczep bakterii antagonistycznej *Enterobacter amnigenus* czyli szczep A167 zdeponowany pod numerem B/00145, lub szczep bakterii antagonistycznej *Rahnella aquatilis* czyli szczep H145 zdeponowany pod numerem B/00144 lub mieszaninę pięciu szczepów bakterii antagonistycznych.

Znana jest z opisu patentowego PL236445 B1 nowa mieszanina bakterii antagonistycznych do ochrony roślin, która zawiera co najmniej dwa szczepy wybrane z pośród szczepów: – *Serratia plymuthica* szczep A294, *Enterobacter amnigenus* szczep A167, *Rahnella aquatilis* szczep H145, *Serratia rubidaea* szczep H440, *Serratia rubidaea* szczep H469. Szczepy te zdeponowano w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, w dniu 1 grudnia 2017 roku. Przedmiotem patentu jest również zastosowanie mieszaniny bakterii antagonistycznych określonych powyżej, do ochrony roślin przed zakażeniami bakteriami pektynolitycznymi oraz sposób nanoszenia tych bakterii antagonistycznych, gdzie nanosi się mieszaninę poprzez oprysk, zamglawianie, obsypywanie roślin, zamaczanie roślin w warunkach przechowywania, w warunkach szklarniowych, polowych, hydroponicznych, gdzie bakterie antagonistyczne hamują symptomy chorobowe spowodowane przez bakterie pektynolityczne w zakresie temperatur od 7°C do 40°C.

Jak opisano w publikacji A. Mikiciński, P. Sobiczewski, pt.: „Perspectives on the use of bacteria in the protection of apple and pear against fire blight (*Erwinia amylovora*)”, *Progress in Plant Protection* (2018), 58 (1): 68–75, ochrona roślin przed zarzą ogniwą obejmuje integrację różnych metod ukie-
runkowanych na zapobieganie ich porażeniu oraz wyniszczanie choroby. Spośród chemicznych środków ochrony roślin do walki z zarzą zarejestrowane są w Polsce prawie wyłącznie preparaty miedziowe. Jednak różne ograniczenia związane z ich stosowaniem spowodowały wzrost zainteresowania metodami alternatywnymi, w tym metodą biologiczną z wykorzystaniem bakterii. Stwierdzono, że w warunkach naturalnych występują bakterie działające antagonistycznie wobec sprawcy zarazy ogniowej oraz mające zdolności ochrony roślin przed chorobą. Badania prowadzone w różnych krajach wykazały, że najbardziej skuteczne są bakterie gatunków *Pantoea agglomerans* i *Pseudomonas fluorescens*, a także *Bacillus subtilis* i *Lactobacillus plantarum*. Rozległe badania nad zastosowaniem różnych szczepów *P. agglomerans* (według starszej klasyfikacji *Erwinia herbicola*) do walki z zarzą ogniwą przeprowadzono w latach 80. ubiegłego wieku pod kierunkiem prof. S. V. Beera na Uniwersytecie Cornelia, w stanie Nowy Jork, które opisano w publikacji: S. V. Beer, J. R. Rundle, pt.: „Suppression of *Erwinia amylovora* by *Erwinia herbicola* in immature pear fruits”, *In Phytopathology* (1983), Vol. 73, No. 9, pp. 1346–1346. Wprowadzenie zawiesiny bakterii na kwiaty jabłoni na dzień przed lub trzy dni po inokulacji *E. amylovora* wykazało, że odpowiednio 52% i 25% kwiatów było zewnętrznie zdrowych. Podobną skuteczność (52% kwiatów bez objawów) odnotowano po zabiegu streptomycyną, opisanym w publikacji S. V. Beer i in., pt.: „Control of fire blight by non-pathogenic bacteria. *In Phytopathology*” (1980), Vol. 70, No. 5, pp. 459–459.

Na szczególną uwagę zasługuje szczep C9-1 wyizolowany ze zgorzeli na pniu jabłoni w stanie Michigan, początkowo zidentyfikowany jako *P. agglomerans* (C. A. Ishimaru i in., pt.: „Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*”, *Phytopathology*, (1988), 78(6), 746–750), a następnie jako *P. vagans* (C. L. Brady i in., pt.: „*Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov.”, *Int J Syst Evol Microbiol* (2009), 59:2339–2345. Traktowanie jabłoni i grusz zawiesiną C9-1 w okresie kwitnienia ograniczało występowanie zarazy ogniowej o 50% – 80% i było podobnie skuteczne jak zabieg siarczanem streptomycyny. Z tego względu Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska zainicjowała działania nad jego komercjalizacją, jak opisano w publikacji K. B. Johnson, V. O. Stockwell pt.: „Biological control of fire blight. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*”, CABI Publishing (2000), Oxon, United Kingdom, 319–337. Na bazie szczepu, wyprodukowano pierwszy biopreparat przeciwko zarazie ogniowej o nazwie BlightBan C9-1.

Jak wynika z przeprowadzonej analizy stanu techniki, znane metody biologicznej ochrony roślin przed chorobami bakteryjnymi i grzybowymi oraz preparaty bazujące na potencjale mikroorganizmów, najczęściej oferują dość wąski zakres działania, który ogranicza się do niewielkiego spektrum zwalczanych patogenów, np. zwykle jest to tylko jeden patogen. Jednak w praktyce często bywa tak, że na

roślinie występuje kilka patogenów jednocześnie. W takim przypadku zastosowanie dostępnych rozwiązań niesie za sobą konieczność używania w ochronie roślin dodatkowych preparatów zwalczających także pozostałe patogeny bakteryjne lub grzybowe występujące w danym momencie na roślinach, w tym syntetycznych środków ochrony roślin. Prowadzi to do wzrostu kosztów ochrony roślin, a także do nadmiernej chemizacji środowiska naturalnego. Nieoczekiwanie problem ten został rozwiązany w niniejszym wynalazku.

Celem wynalazku jest wyizolowanie nowych szczepów bakterii rodzaju *Pantoea* spp., o znacznie szerszym spektrum działania, niż znane i stosowane obecnie szczepy, których wykorzystanie do kompleksowej ochrony wielu gatunków roślin, zarówno warzywnych, sadowniczych, jak i ozdobnych, przed atakującymi je jednocześnie różnymi chorobami grzybowymi i/lub bakteryjnymi może być rozwiązaniem wskazanych powyżej niedogodności znanych rozwiązań.

Istotą wynalazku jest szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00272, w dniu 26 listopada 2019 r.

Istotą wynalazku jest szczep *Pantoea allii* T14/15, zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00276, w dniu 26 listopada 2019 r.

Istotą wynalazku jest również zastosowanie szczepów rodzaju *Pantoea* spp. Zdeponowanych w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, w dniu 26 listopada 2019 r., wybranych ze szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 nr depozytu B/00272 albo *Pantoea allii* T14/15 nr depozytu B/00276, jako środka do ochrony roślin przed chorobami wywołanymi przez patogeny bakteryjne i/lub grzybowe.

Korzystnie szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 albo *Pantoea allii* T14/15 nanosi się w postaci zawiesiny wodnej na powierzchnię rośliny, poprzez opryskiwanie, zamaczanie roślin lub ich części w warunkach przechowywania, pod osłonami i w warunkach polowych, a liczba komórek szczepu w zawieszynie wynosi co najmniej 10^7 jtk/ml.

Szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15, będące przedmiotem wynalazku, wyróżnia szerokie spektrum działania. Każdy ze szczepów charakteryzuje się działaniem antagonistycznym jednocześnie względem wielu patogenów roślin, zarówno grzybowych jak i bakteryjnych, powodujących choroby takie jak np. zgnilizna twardzikowa, szara pleśń, mączniak właściwy, alternarioza, antraknoza, monilioza, gorka zgnilizny, zaraza ogniową czy mokra zgnilizna. Co więcej, szczepy te mogą być stosowane do ochrony wielu gatunków roślin, takich jak m.in. jabłoń, grusza, malina, truskawka, borówka wysoka, winorośl, marchew, kapusta, sałata, seler. Zakres porażanych gatunków przez sprawcę szarej pleśni, to według Boreckiego („Szkodniki i choroby roślin sadowniczych”, wydanie III, PWRiL, 1983) ponad 100 gatunków roślin, a sprawca zgnilizny twardzikowej poraża według Leskiego wiele gatunków roślin zielnych w tym wszystkie warzywa, dodatkowo sprawca mokrej zgnilizny (bakteria) według Leskiego („Szkodniki i choroby roślin warzywnych”, PWRiL, 1985) atakuje większość roślin uprawnych w tym wszystkie warzywa.

Zastosowanie szczepów rodzaju *Pantoea* spp., według wynalazku, ogranicza koszty ochrony roślin poprzez zmniejszenie ilości preparatów zwalczających różne patogeny bakteryjne lub grzybowe występujące jednocześnie w tym samym okresie na roślinach, a przez to również pozwala unikać nadmiernej chemizacji roślin. Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, jak i *Pantoea allii* T14/15 wykazują wyjątkowo silne działanie antagonistyczne względem co najmniej 10 roślinnych patogenów grzybowych i/lub bakteryjnych, które były testowane w warunkach laboratoryjnych i testach polowych.

W poniższych przykładach została przedstawiona charakterystyka szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 oraz wyniki badań *in vitro* lub *in vivo*, potwierdzające ich skuteczność w przykładowych badaniach prowadzonych w uprawach jabłoni, marchwi, kapusty, sałaty, selera i winogron. Na rysunku przedstawiono drzewa największego prawdopodobieństwa, obrazujące filogenetyczne powiązania między wszystkimi gatunkami *Pantoea* spp., a szczepem *Pantoea agglomerans* T16/8 – fig. 1 oraz szczepem *Pantoea allii* T14/15 – fig. 2, w oparciu o połączony zestaw danych sekwencji genów *atpD*, *gyrB*, *infB* i *rpoB*.

Przykładów tych nie należy traktować, jako ograniczających istotę rozwiązania, czy zawężających zakres ochrony wynalazku, gdyż stanowią one jedynie jego ilustrację.

Przykład 1

Identyfikacja szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8

Szczep *Pantoea agglomerans* T16/8 został zdeponowany zgodnie z Traktatem Budapeszteńskim w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu. Depozyt złożono w dniu 26 listopada 2019 r. Depozytowi nadano numer B/00272.

Izolacja i morfologia kolonii szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8

Bakterie izolowano z powierzchni liści truskawki na początku sezonu wegetacyjnego. Odcięte liście (kilka sztuk), umieszczano w kolbach Erlenmayera o objętości 500 ml, zawierających około 200 ml sterylnej wody destylowanej z dodatkiem jednej kropli Tween 80, a następnie wytrząsano przez 30 minut. Popłuczyny przenoszono do sterylnych plastikowych falkonów. Supernatant zlewano, a z osadu izolowano bakterie, posiewając je na pożywkę NAS (2,3% nutrient agar z dodatkiem sacharozy do końcowego stężenia 5%) w szalkach Petriego o średnicy 90 mm. Kolonie szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8, po 24 godzinach inkubacji w temp. 25°C, formowały silnie rozlewające jasnożółte, gęste optycznie, koliste kolonie o średnicy 2 mm. Po upływie kolejnej doby ich średnica osiągała 3–4 mm. Dalsza inkubacja szczepu (25°C) powodowała silne rozlewanie się na powierzchni pożywki NAS, co mogło powodować łączenie sąsiadujących ze sobą kolonii a nawet wypełnianie całej jej powierzchni. Wraz z upływem czasu zabarwienie ich pozostawało niezmiennie jasnożółte.

Przechowywanie szczepu T16/8

Szczep *Pantoea agglomerans* T16/8 przechowywany jest w temperaturze – 80°C w glicerolu w buforze PBS (0,27% Na₂HPO₄, 0,04% NaH₂PO₄, 0,8% NaCl). W celu zdeponowania szczepu posiewano go na pożywkę NAS (w szalkach Petriego o średnicy 90 mm), a następnie po 24 godz. inkubacji w temp. 25°C zmywano sterylnym buforem (1 ml). Pobierano 0,8 ml i przenoszono do próbówki typu eppendorf, wcześniej wysterylizowanej wraz z 0,2 ml gliceryny. Zawiesinę szczepu bakterii T16/8 wstrząsano (worteksowano) w celu dokładnego wymieszania a następnie umieszczano w kriopudełku i przenoszono do komory zamrażarki niskotemperaturowej - 80°C.

Oznaczenie przynależności gatunkowej szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8

Przynależność gatunkową szczepu określono na podstawie analizy filogenetycznej przeprowadzonej na bazie sekwencji:

- A. genu kodującego 16S rRNA,
- B. fragmentów genów metabolizmu podstawowego atpD, gyrB, infB i rpoB,
- C. na podstawie analizy sekwencji genomu szczepu.

W celu analiz filogenetycznych (A, B) z 48 godzinnej hodowli bakterii potencjalnie przydatnych do biologicznej ochrony na pożywce NSA (2,3% Difco Nutrient Agar; 5% sacharoza) izolowano DNA zestawem Genomie Mini do izolacji DNA z bakterii (A&A Biotechnology, Polska) wg instrukcji przysłanej przez producenta. Materiał do izolacji przygotowano przez zawieszenie czystej kolonii izolatu w 100 µl buforu Tris (10 mM Tris.HCl, pH 8.5). Do powstałej zawiesiny dodano 200 µl uniwersalnego buforu lizującego LT (0.25% SDS, 0.2 M NaOH) i 20 µl roztworu Proteinazy K. Całość dokładnie wymieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut. Próbkę przeniesiono do 75°C i inkubowano kolejne 5 minut. Następnie mieszaninę wytrząsano na mieszadło typu Vortex przez 20 sekund, po czym wirowano 3 minuty przy 15000 rpm. Uzyskany supernatant наносzono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA. Całość wirowano 1 minutę przy 15000 rpm. W kolejnym etapie do kolumny dodano 500 µl roztworu płuczającego A1 i ponownie wirowano 1 minutę przy 15000 rpm. Minikolumnę przeniesiono do nowej próbówki o objętości 2 ml, po czym do kolumny dodano 400 µl roztworu A1. Próbkę wirowano 2 minuty przy 15000 rpm. Osuszoną mini kolumnę umieszczono następnie w nowej próbówce o objętości 1.5 ml. W celu elucji, na złożę minikolumny naniesiono 100 µl buforu Tris uprzednio ogrzanego do temperatury 75°C. Próbkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej i wirowano przez 1 minutę przy 15000 rpm. Do reakcji PCR pobrano 3 µl uzyskanego DNA.

A. Analiza sekwencji genu 16S rRNA.

Do reakcji PCR zastosowano startery fd1 – 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' i rP2 – 5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3', opisane w publikacji Weisburg i in., pt.: „16 S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study”, *Journal of Bacteriology* (1991), 173, 697–703. Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze T3000 firmy Biometra®. Zastosowano następujące warunki reakcji amplifikacji: wstępna denaturacja 4 minuty w temp. 95°C, 35 cykli, w temperaturach 95°C przez 45 sek., 55°C–45 sek. Oraz 72°C – 1 min. 30 sek. Końcowy etap wydłużania prowadzono w 72°C przez 10 mi-

nut. Uzyskany w ten sposób produkt reakcji amplifikacji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym w buforze 0,5 x TBE. W celu oceny wielkości uzyskanego produktu użyto 1 µl wzorca O'Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (#SM1153) firmy Fermentas. Produkt reakcji sekwencjonowano w firmie Genomed S.A (Warszawa). Otrzymane dla każdego izolatu sekwencje złożono przy użyciu programu SeqMan pakietu Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin) i porównywano z sekwencjami zdeponowanymi w banku genów NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) i bazie danych EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>) w celu znalezienia największego podobieństwa.

Identyfikacja przeprowadzona na podstawie sekwencji genu 16S rRNA pozwoliła na klasyfikację badanych izolatów do rodzaju *Pantoea*.

B. Analiza sekwencji fragmentów genów metabolizmu podstawowego.

Do analizy filogenetycznej użyto fragmentów 4 genów metabolizmu podstawowego: *atpD*, *gyrB*, *infB* i *rpoB*. W pierwszej kolejności amplifikowano fragmenty genów ze starterami specyficznymi do genów *infB*. Zastosowano warunki reakcji amplifikacji takie jak opisano w publikacjach: C. Brady i in., pt.: „Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA)”, *Systematic and Applied Microbiology* (2008), 31 (6–8), pp. 447–460 oraz L. Diancourt i in., pt.: „Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates” (2005), *J Clin Microbiol* 43: 4178–4182). Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze T3000 firmy Biometra®. Dodatkowo wyekstrahowano z uzyskanego genomu szczepu T16/8 sekwencje genów *atpD*, *gyrB*. Sekwencje wszystkich czterech genów połączono w jeden ciąg i porównano z sekwencjami tych samych genów szczepów typowych innych gatunków z rodzaju *Pantoea* zdeponowanych w bazie danych NCBI. Do analizy filogenetycznej uwzględniono wszystkie sekwencje genów (numery dostępu podane są na drzewach filogenetycznych). Drzewa największego prawdopodobieństwa (ML) oparte na połączonych sekwencjach 4 badanych genów zostały wygenerowane w programie MEGAX przy użyciu modelu parametrycznego i ewolucyjnego uznanego za najlepszy model substytucji dla wszystkich sekwencji każdego genu oddzielnie obliczonych automatycznie przez program i 500 powtórzeń ładowania początkowego.

Analiza filogenetyczna i wynikające z niej drzewo Maximum Likelihood (ML), skonstruowane na połączonych sekwencjach genów porządkowych *atpD*, *gyrB*, *infB* i *rpoB* wykazały, że szczep T16/8 jest najściślej spokrewniony z gatunkiem *Pantoea agglomerans*. Przedstawione na rysunku drzewo największego prawdopodobieństwa oparte na modelu Tamura-Nei, pokazuje filogenetyczne powiązania między szczepem T16/8, a wszystkimi gatunkami *Pantoea* spp. w oparciu o połączony zestaw danych sekwencji genów *atpD*, *gyrB*, *infB* i *rpoB*. Dyskretny rozkład Gamma został wykorzystany do modelowania ewolucyjnych różnic szybkości między ośrodkami (5 kategorii (+G, parametr = 0,4052)). Model zmienności szybkości pozwalał, aby niektóre ośrodki były ewolucyjnie niezmiennie ([+], 24,38% ośrodków). Wartości bootstrap (wyrażone jako wartości procentowe 500 powtórzeń) są podane w węzłach. Litera „T” następująca po nazwach szczepów wskazuje, że dany szczep jest szczepem typowym gatunku.

C. Sekwencjonowanie genomu i analiza

W celu sekwencjonowania genomu szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8, izolowano jego DNA metodą Alianabi i Martinez, opisaną w publikacji S.M. Aljanabi, I. Martinez, pt.: „Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques” (1997), *Nucleic Acids Res.* 25(22), 4692-3. Przygotowano biblioteki z krótką wstawką (około 350 zasad) do sekwencjonowania na urządzeniu MiSeq (Illumina) oraz biblioteki do sekwencjonowania na urządzeniu MinION (Oxford Nanopore Technologies). Otrzymano 3 495 070 odczytów z biblioteki sparowanych końców z krótkimi wstawkami (rozmiar wstawek 300–500 bp) zsekwencjonowanych na urządzeniu MiSeq (Illumina) i 76 550 długich odczytów MinION. Wszystkie odczyty zostały użyte do złożenia genomu denovo (Genomed SA, Warszawa, Polska). Składanie denovo zostało wykonane za pomocą oprogramowania Unicycler ver. 0.4.7. Otrzymane sekwencje wszystkich elementów genetycznych zostały opatrzone adnotacjami w programie RAST.

Uzyskany wysokiej jakości genom szczepu T16/8 ujawnił, że jego materiał genomowy składa się z chromosomu (wielkość T16/8_chrom: 4 099 784 pz) oraz 3 plazmidów (wielkość pT16/8_1: 547 479 pz, wielkość pT16/8_2: 181 799 pz, pT16/8_3: 75 138 pz).

Średnie podobieństwo nukleotydów (Average Nucleotide Identity – ANI)

Średnie podobieństwo nukleotydów (ANI) obliczono dla genomu szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8 i szczepów typowych gatunków: *Pantoea agglomerans* DSM3493^T, *Pantoea allii* LMG24248^T,

Pantoea ananatis LMG2665^T, *Pantoea vagans* LMG241991 za pomocą algorytmu JSpecies (JSpeciesWS; <http://jspeciesWS>; <http://jspeciesWS>; .ribohost.com/jspeciesws/). Wartości ANI-MUMmer(ANIm) i ANI-Blast (ANlb) między tymi dwoma szczepami powinny być wyższe niż 95%, aby sklasyfikować szczepy do tego samego gatunku zgodnie z kryteriami przynależności do jednego gatunku opisanymi w publikacjach K.T. Konstantinidis i in., pt.: „Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers”, *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 7286–7293 oraz M. Richter, R. Rosello-Mora, Rpt.: „Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2009), 106, 19126–19131. Analiza (ANI) potwierdza klasyfikację szczepu T16/8 do gatunku *Pantoea agglomerans*, ponieważ wartość ANI między genomem szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8 a genomem szczepu typowego gatunku *Pantoea agglomerans* jest wyższa niż 95% (Tabela 1, Tabela 2).

Tabela 1

ANlb i podobieństwo procentowe	
	T16/8
T16/8	*
<i>Pantoea agglomerans</i> DSM3493 ^T	98.49
<i>Pantoea allii</i> LMG24248 ^T	78.47
<i>Pantoea ananatis</i> LMG2665 ^T	78.37
<i>Pantoea vagans</i> LMG24199 ^T	91.26

Tabela 2

ANlb i podobieństwo procentowe	
	T16/8
T16/8	*
<i>Pantoea agglomerans</i> DSM3493 ^T	98.49
<i>Pantoea allii</i> LMG24248 ^T	78.47
<i>Pantoea ananatis</i> LMG2665 ^T	78.37
<i>Pantoea vagans</i> LMG24199 ^T	91.26

W wyniku przeprowadzonych analizy wykazano, że szczep należy do następującego gatunku: *Pantoea agglomerans*

Właściwości patogeniczne

Właściwości patogeniczne szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8 były testowane na:

- tytoniu – wykazanie reakcji nadwrażliwości
- bulwach ziemniaka – test właściwości pektynolitycznych
- gatunkach roślin wymienianych w literaturze jako porażanych przez bakterie z gatunku *P. agglomerans*: alokacji, cebuli, fasoli adzuki, kukurydzy, pszenicy, groszku, życicy trwałej.

W żadnym z testów szczep *Pantoea agglomerans* T16/8 nie wykazał właściwości patogenicznych.

Przykład 2

Identyfikacja szczepu *Pantoea allii* T14/15

Szczep *Pantoea allii* T14/15 został zdeponowany zgodnie z Traktatem Budapeszteńskim w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu. Depozyt złożono w dniu 26 listopada 2019 r. Depozytowi nadano numer B/00276.

Izolacja i morfologia kolonii szczepu *Pantoea allii* T14/15

Bakterie izolowano z powierzchni liści truskawki na początku sezonu wegetacyjnego. Odcięte liście (kilka sztuk), umieszczano w kolbach Erlenmayera o objętości 500 ml, zawierających około 200 ml sterylnej wody destylowanej z dodatkiem jednej kropli Tween 80, a następnie wytrząsano przez 30 minut. Popłuczyny przenoszono do sterylnych plastikowych falkonów. Supernatant zlewano, a z osadu izolowano bakterie, posiewając je na pożywkę NAS (2,3% nutrient agar z dodatkiem sacharozy do końcowego stężenia 5%) w szalkach Petriego o średnicy 90 mm. Kolonie szczepu *Pantoea allii* T14/15, po

24 godzinach inkubacji w temp. 25°C, formowały żółte, gęste optycznie, koliste kolonie o średnicy 1–2 mm. Po upływie kolejnej doby ich średnica osiągała 2–3 mm. Wraz z upływem kolonie miały bardziej intensywny żółty kolor.

Przechowywanie szczepu T14/15

Szczep *Pantoea allii* T14/15 przechowywany jest w temperaturze – 80°C w glicerolu w buforze PBS (0,27% Na₂HPO₄, 0,04% NaH₂PO₄, 0,8% NaCl). W celu zdeponowania szczepu posiewano go na pożywkę NAS (w szalkach Petriego o średnicy 90 mm), a następnie po 24 godz. inkubacji w temp. 25°C zmywano sterylnym buforem (1 ml). Pobierano 0,8 ml i przenoszono do probówki typu eppendorf, wcześniej wysterylizowanej wraz z 0,2 ml gliceryny. Zawiesinę szczepu bakterii T14/15 wstrząsano (worteckowano) w celu dokładnego wymieszania a następnie umieszczano w kriopudełku i przenoszono do komory zamrażarki niskotemperaturowej – 80°C.

Oznaczenie przynależności gatunkowej szczepu *Pantoea allii* T14/15

Przynależność gatunkową szczepu określono na podstawie analizy filogenetycznej przeprowadzonej na bazie sekwencji:

- A. genu kodującego 16S rRNA,
- B. fragmentów genów metabolizmu podstawowego atpD, gyrB, infB i rpoB,
- C. na podstawie analizy sekwencji genomu szczepu.

W celu analiz filogenetycznych (A, B) z 48 godzinnej hodowli bakterii potencjalnie przydatnych do biologicznej ochrony na pożywce NSA (2,3% Difco Nutrient Agar; 5% sacharoza) izolowano DNA zestawem Genomie Mini do izolacji DNA z bakterii (A&A Biotechnology, Polska) wg instrukcji przysłanej przez producenta. Materiał do izolacji przygotowano przez zawieszenie czystej kolonii izolatu w 100 µl buforu Tris (10 mM Tris.HCl, pH 8.5). Do powstałej zawiesiny dodano 200 µl uniwersalnego buforu lizującego LT (0.25% SDS, 0.2 M NaOH) i 20 µl roztworu Proteinazy K. Całość dokładnie wymieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut. Próbkę przeniesiono do 75°C i inkubowano kolejne 5 minut. Następnie mieszaninę wytrząsano na mieszadle typu Vortex przez 20 sekund, po czym wirowano 3 minuty przy 15000 rpm. Uzyskany supernatant nanoszono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA. Całość wirowano 1 minutę przy 15000 rpm. W kolejnym etapie do kolumny dodano 500 µl roztworu płuczącego A1 i ponownie wirowano 1 minutę przy 15000 rpm. Minikolumnę przeniesiono do nowej probówki o objętości 2 ml, po czym do kolumny dodano 400 µl roztworu A1. Próbkę wirowano 2 minuty przy 15000 rpm. Osuszoną mini kolumnę umieszczono następnie w nowej probówce o objętości 1,5 ml. W celu elucji, na złożę minikolumny naniesiono 100 µl buforu Tris uprzednio ogrzanego do temperatury 75°C. Próbkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej i wirowano przez 1 minutę przy 15000 rpm. Do reakcji PCR pobrano 3 µl uzyskanego DNA.

A. Analiza sekwencji genu 16S rRNA.

Do reakcji PCR zastosowano startery fD1 – 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' i rP2 – 5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3', opisane w publikacji Weisburg i in., pt.: „16 S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study”, Journal of Bacteriology (1991), 173, 697–703. Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze T3000 firmy Biometra®. Zastosowano następujące warunki reakcji amplifikacji: wstępna denaturacja 4 minuty w temp. 95°C, 35 cykli, w temperaturach 95°C przez 45 sek., 55°C – 45 sek. Oraz 72°C – 1 min. 30 sek. Końcowy etap wydłużania prowadzono w 72°C przez 10 minut. Uzyskany w ten sposób produkt reakcji amplifikacji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym w buforze 0,5 x TBE. W celu oceny wielkości uzyskanego produktu użyto 1 µl wzorca O'Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (#SM1153) firmy Fermentas. Produkt reakcji sekwencjonowano w firmie Genomed S.A (Warszawa). Otrzymane dla każdego izolatu sekwencje złożono przy użyciu programu SeqMan pakietu Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin) i porównywano z sekwencjami zdeponowanymi w banku genów NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) i bazie danych EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>) w celu znalezienia największego podobieństwa.

Identyfikacja przeprowadzona na podstawie sekwencji genu 16S rRNA pozwoliła na klasyfikację badanych izolatów do rodzaju *Pantoea*.

B. Analiza sekwencji fragmentów genów metabolizmu podstawowego

Do analizy filogenetycznej użyto fragmentów 4 genów metabolizmu podstawowego: atpD, gyrB, infB i rpoB. W pierwszej kolejności amplifikowano fragmenty genów ze starterami specyficznymi do genów infB. Zastosowano warunki reakcji amplifikacji takie jak opisano w publikacjach: C. Brady i in., pt.: „Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural

Tabela 3

ANiB i podobieństwo procentowe	
	T14/15
T14/15	*
<i>Pantoea agglomerans</i>	78.67
<i>Pantoea allii</i> LMG24248 ^T	98.89
<i>Pantoea ananatis</i> LMG2665 ^T	88.14
<i>Pantoea vagans</i> LMG24199 ^T	78.94

Tabela 4

ANiB i podobieństwo procentowe	
	T14/15
T14/15	*
<i>Pantoea agglomerans</i>	84.00
<i>Pantoea allii</i> LMG24248 ^T	99.04
<i>Pantoea ananatis</i> LMG2665 ^T	89.20
<i>Pantoea vagans</i> LMG24199 ^T	84.11

W wyniku przeprowadzonych analizy wykazano, że szczep należy do następującego gatunku: *Pantoea allii*.

Właściwości patogeniczne

Właściwości patogeniczne szczepu *Pantoea allii* T14/15 były testowane na:

- tytoniu – wykazanie reakcji nadwrażliwości
- bulwach ziemniaka – test właściwości pektynolitycznych
- gatunkach roślin wymienianych w literaturze jako porażanych przez bakterie z gatunku *P.allii*: alokacji, cebuli, fasoli adzuki, kukurydzy, pszenicy, groszku, życicy trwałej.

W żadnym z testów szczep *Pantoea allii* T14/15 nie wykazał właściwości patogenicznych.

Przykład 3

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 do ochrony roślin przed **zgnilizną twardzikową** powodowaną przez grzyba ***Sclerotinia sclerotiorum***.

Dokonano oceny in vitro antagonistycznych właściwości izolatów bakterii *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w stosunku do *Sclerotinia sclerotiorum*. Najpierw przeprowadzono badania ograniczenia wzrostu grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* przez szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15. Badania prowadzono na pożywce PDA (agar glukozowo-ziemniaczany), jako współhodowle szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 lub *Pantoea allii* T14/15 oraz grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* i obserwowano zahamowanie wzrostu grzyba. Badania prowadzono równolegle, oddzielnie dla każdego szczepu. Strefę ograniczenia wzrostu patogenicznego grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* przez szczepy T16/8 i T14/15, po 5 i 7 dniach przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5

Szczep	Strefa ograniczenia po 5 dniach [mm]	Strefa ograniczenia po 7 dniach [mm]
Kontrola	0	0
T16/8	2	0
T14/15	8	5

Wielkości liczbowe przedstawione w tabeli 5 określają promień od obrzeża kolonii do obrzeża strefy zahamowania wzrostu w mm, zahamowanie wzrostu patogena przez badane szczepy wskazuje na zdolność szczepów T16/8 i T14/15 do produkcji substancji o właściwościach fungicydowych lub fungistatycznych.

Kolejne doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na liściach kapusty głowiastej i marchwi. Po uszkodzeniu igłą preparacyjną liście kapusty i fragmenty marchwi moczone przez 5 minut w wodnych zawiesinach, jednej zawierającej szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a drugiej szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml. Następnie po 2 godzinach na miejscu uszkodzenia nanoszono krążki grzybni przerośnięte 7-dniowymi kulturami *Sclerotinia sclerotiorum*. Kontrolę stanowiły liście kapusty i marchwi moczone w wodzie destylowanej i inokulowane grzybem *Sclerotinia sclerotiorum*.

Zainokulowane liście kapusty i marchew układano w kuwetach na wilgotnych matach wyłożonych siatkami. Kuwety z liśćmi kapusty i marchwi wkładano do worków foliowych w celu zwiększenia wilgotności. Po 3 i 5 dniach inkubacji w temperaturze 25°C mierzono długość plam infekcyjnych. Test przeprowadzono w 6 powtórzeniach – każdy szczep bakterii testowano na 6 fragmentach roślin (liście kapusty i fragmenty marchwi). Spośród 426 badanych izolatów środowiskowych, szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 wykazały jedną z najwyższych skuteczności w hamowaniu rozwoju *S. sclerotiorum*: T16/8 – 62,5% – 81%, a T14/15-54%.

Następnie przeprowadzono ocenę *in vivo* antagonistycznych właściwości szczepów bakterii *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w stosunku do *Sclerotinia sclerotiorum* w doświadczeniach szklarniowych i polowych.

Przeprowadzono ocenę wpływu szczepów bakterii T16/8 i T14/15 na ograniczanie rozwoju zgnilizny twardzikowej w uprawie sałaty szklarniowej. W tym celu wyprodukowaną rozsadę sałaty 'Królowa Majowych', wysadzono do substratu torfowego w doniczkach P9 o pojemności 0,5 l, sztucznie zakażonego przez *Sclerotinia sclerotiorum*. Inokulum patogena przygotowywano na pożywce z płatków owsianych. Rośliny ustawiono na parapetach w szklarni i przez okres 1,5 miesiąca prowadzono ich uprawę. W tym okresie sałata była trzykrotnie podlewana zawiesinami wodnymi ze szczepami T16/8 i T14/15, po 50 ml na doniczkę. Badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu T16/8 lub T14/15, a ilość komórek bakterii każdego rodzaju w zawieszynie wynosiła 10^7 jtk/ml. Pierwszą aplikację wykonano przed wysadzeniem sałaty do zakażonego podłoża. Kolejne aplikacje przeprowadzono w odstępach 10 dniowych. Kontrolę niezakażoną (nieinokulowaną) stanowiły rośliny rosnące w czystym substracie torfowym, bez patogena, z kolei kontrolę zakażoną (inokulowaną) – sałata uprawiana w podłożu zainokulowanym przez *S. sclerotiorum*, podlewane wodą destylowaną. Jako środek standardowy (porównawczy) zastosowano produkt komercyjny Contans WG. Doświadczenie przeprowadzono w 4 powtórzeniach po 5 roślin w każdym (ogółem 20 roślin na kombinację). W centralnej części szalek Petriego o średnicy 90 mm umieszczano 5 mm średnicy krążek pożywki PDA przerośnięty strzępkami. Przygotowano inokulum patogena – *S. sclerotiorum*. Szalki inkubowano przez 10 dni w 25°C. Następnie, pożywkę homogenizowano (homogenizator H500, Pol-Eko Aparatura, Polska) z dodatkiem wody destylowanej (150 ml wody na 1 szalkę) przez 5 minut. Otrzymaną zawiesinę bardzo dokładnie mieszano z substratem torfowym (TS1 Klasmann, Polska) w proporcji: zawartość 1 szalki na 1 litr podłoża. Zakażony torf inkubowano przez 7 dni w szklarni, w workach z niewielkimi otworami. Po tygodniu inkubacji przystąpiono do założenia doświadczenia.

W dniu każdego zabiegu oraz tydzień i dwa tygodnie po ostatnim podlewaniu sałaty, określano stopień porażenia roślin stosując 8-stopniową skalę: (0–0%; 1–1%; 2–5%; 3–15%; 4–25%; 5–50%; 6–75%; 7–100%). Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. W celu określenia różnic pomiędzy średnimi użyto testu Duncana, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Do oceny skuteczności preparatów zastosowano skrócony wzór Abbotta. Wpływ badanych bakterii na ograniczanie zgnilizny twardzikowej na sałacie przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6

Badany izolat	% porażenia	% porażenia sałaty	Skuteczno ść, [%]	% porażenia sałaty	skuteczność [%]
	1 ocena	2 ocena		3 ocena - na koniec doświadczenia	
Kontrola nieinokulowana	0,0	0,0	-	0,0	-
Kontrola inokulowana	3,4	9,6	-	45,9	-
T 16/8	0,0	3,5	63,5	24,3	47,0
T 14/15	0,0	1,2	87,5	14,8	67,8
Contans WG	0,0	0,9	90,6	10,8	76,4

Przeprowadzono również ocenę skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 w ograniczeniu zgnilizny twardzikowej (*Sclerotinia sclerotiorum*) na selerze korzeniowym w doświadczeniu wazonowym. W tym celu rośliny selera korzeniowego odmiany 'Talar' zostały wysadzone do doniczek średnicy 12 cm wypełnionych substratem torfowym zakażonym uprzednio *S. sclerotiorum* i ustawione w szklarni (faza BBCH roślin: 13 BBC H). Liczba roślin na poletko wynosiła 5 szt. W okresie wegetacji selera korzeniowego wykonano 4 zabiegi ochrony roślin w formie podlewania roślin. Użyto po 20 ml cieczy roboczej na roślinę, jednej zawierającej szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a drugiej szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml, w odstępie co 7 dni, a badania prowadzono równolegle oddzielnie dla każdego szczepu.

Kontrolę niezakażoną (nieinokulowaną) stanowiły rośliny rosnące w czystym substracie torfowym, bez patogena, z kolei kontrolę zakażoną (inokulowaną) – sałata uprawiana w podłożu zainokulowanym przez *S. sclerotiorum*, podlewane wodą destylowaną. Jako środek standardowy (porównawczy) zastosowano produkt komercyjny Contans WG. Pierwszy zabieg został wykonany 7 dni przed wysadzeniem roślin do doniczek tj. rozsada selera rosnąca w multiplatach. Infekcja roślin selera była przeprowadzona sztucznie. Podłoże zakażano *S. sclerotiorum* w stosunku 1:1 tj. 1 l podłoża : 1 szalka przerośnięta grzybnia *S. sclerotiorum*. Obserwacje procentowego porażenia liści selera przez sprawcę zgnilizny twardzikowej prowadzono na 7 losowo wybranych liściach, w momencie pojawienia się pierwszych objawów chorobowych. Ocenę prowadzono według 8-stopniowej skali, gdzie 0 = brak objawów chorobowych, 1° – do 1% powierzchni, 2° – od 2 do 6% powierzchni, 3° – od 7 do 15% powierzchni, 4° – od 16 do 25% powierzchni, 5° – od 26 do 50% powierzchni, 6° – od 51 do 75% powierzchni, 7° – od 76 do 100% powierzchni liści z objawami zgnilizny twardzikowej. Wykonano pomiary wysokości roślin w centymetrach (do nasady najwyższego liścia oraz całych liści). Oznaczano również wybarwienie (kolor) liści roślin selera według 11-stopniowej skali, gdzie 5 stanowiło kontrolę, 0–4 liście jasnozielone, blade, żółkące, 6–10 liście od ciemnozielonych do bardzo ciemnozielonych. Określano także objawy fitotoksyczności według skali EPPO PP 1/135(4) (2014), od 0 do 100%, gdzie 0 – oznacza brak objawów uszkodzeń, a 100 – rośliny całkowicie zniszczone. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Duncuna przy poziomie istotności 5%. Skuteczność badanych środków obliczono według wzoru Abbott'a.

Ocenę skuteczności badanych szczepów mikroorganizmów w ochronie selera korzeniowego przed zgnilizną twardzikową przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7

Kombinacje		Zgnilizna twardzikowa – <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>							
		Średni % porażenia liści				Skuteczność [%]			
		Data obserwacji				Data obserwacji			
		I ocena	II ocena	III ocena	IV ocena	I ocena	II ocena	III ocena	IV ocena
1	Kontrola nieinokulowana	0	0	0	0	-	-	-	-
2	Kontrola inokulowana	2,64	8,57	18,43	33,06	-	-	-	-
3	T16/8	0,14	0,86	2,97	13,53	94,7	89,9	83,9	59,1
4	T14/15	0	0,32	1,79	16,42	100	96,3	90,3	50,3
5	Contans WG	0,14	0,97	3,58	13,95	94,7	88,7	80,6	57,8

Wyniki obu przedstawionych powyżej doświadczeń dla sałaty i selera (tab. 6, tab. 7), prowadzonych w warunkach prowokacyjnych – przy sztucznej inokulacji podłoża, wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność badanych szczepów T16/8 i T14/15, do zastosowania w zwalczaniu zgnilizny twardzikowej. Osiągnięte wyniki skuteczności badanych izolatów były, co najmniej tak skuteczne, jak uznanego standardu, jakim jest preparat Contans WG. Dodatkowo, zauważono pozytywny wpływ izolatów na wzrost i rozwój roślin selera, co przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8

Kombinacje		Wysokość roślin selera (cm)		
		Data obserwacji		
		I ocena	II ocena	III ocena
		Pomiar od podstawy do nasady najwyższego liścia		
1	Kontrola nieinokulowana	7,53	8,78	10,55
2	Kontrola inokulowana	7,43	8,9	10,35
3	T16/8	7,83	8,8	10,43
4	T14/15	8,1	8,73	10,28
5	Contans WG	7,25	7,38	8,6

Przykład 4

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 do ochrony roślin przed **szarą pleśnią** powodowaną przez grzyba **Botrytis cinerea**.

Dokonano oceny in vitro antagonistycznych właściwości izolatów bakterii *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w stosunku do *Botrytis cinerea*. Najpierw przeprowadzono badania ograniczenia wzrostu grzyba *Botrytis cinerea* przez szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15. Badania prowadzono na pożywce PDA (agar glukozowo-ziemniaczany), jako współhodowle szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 lub *Pantoea allii* T14/15 oraz grzyba *Botrytis cinerea* i obserwowano zahamowanie wzrostu grzyba. Badania prowadzono równolegle, oddzielnie dla każdego szczepu. Strefę ograniczenia wzrostu patogennego grzyba *Botrytis cinerea* przez szczepy T16/8 i T14/15, po 5 i 7 dniach przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9

Szczep	Strefa ograniczenia po 5 dniach [mm]	Strefa ograniczenia po 7 dniach [mm]
Kontrola	0	0
T16/8	5	0 (b. w.)
T14/15	6	0 (b. w.)

Wielkości liczbowe przedstawione w tabeli 9 określają promień od obrzeża kolonii do obrzeża strefy zahamowania wzrostu w mm, zahamowanie wzrostu patogena przez badane szczepy wskazuje na zdolność szczepów T16/8 i T14/15 do produkcji substancji o właściwościach fungicydowych lub fungistatycznych. Skrót „b.w.” oznacza brak wzrostu na powierzchni – rozrost grzyba osiągnął granicę bakterii, ale nie wyrósł na jej powierzchni. Wskazuje to na inny mechanizm niż antybioza, m.in. pasożytnictwo lub toksyny, które nie dyfundują do pożywki mikrobiologicznej, ale pozostają uwięzione we wzroście mikroorganizmu.

Dokonano oceny in vitro antagonistycznych właściwości izolatów bakterii *Pantoea agglomerans* T16/8 lub *Pantoea allii* T14/15 w stosunku do *Botrytis cinerea* na kwiatach jabłoni. Jednoroczne drzewka jabłoni odmiany 'Najdared' przechowywano w chłodni zwykłej w temp. 2–3°C i wilgotności względnej 98%. Następnie sadzono je w doniczki o średnicy 24 cm w mieszaninę torfu z glebą w stosunku 1:1. Posadzone drzewka inkubowano w szklarni w temp. 20°C przez okres około 2 tygodni. Po tym czasie następował rozwój kwiatostanów. Na każdym drzewku pozostawiono 20 w pełni rozwiniętych kwiatów, a pozostałe usuwano w celu minimalizacji ryzyka błędów w dalszej części doświadczenia. Każda przygotowana w ten sposób roślina stanowiła jedną kombinację. Następnie przy użyciu atomizera na kwiaty

nanoszono wodne zawiesiny bakteryjne, a na kombinację kontrolną wodę destylowaną. Użyto zawiesiny zawierające: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml. Badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Po upływie 24 godzin na pędy nanoszono inokulum w postaci zawiesiny zarodników konidialnych *B. cinerea* (Iz1). Koncentrację zarodników konidialnych ustalono na 10^6 /ml. Godzinę po zakażeniu na pędy z kwiatami zakładano torebki foliowe w celu utrzymania maksymalnego poziomu wilgotności sprzyjającej rozwojowi naniesionego grzyba. Kolejną dobę później torebki zdejmowano, aby nie zaburzyć naturalnych procesów fizjologicznych roślin. Po upływie 5–7 dni od inokulacji pojedyncze kwiaty ostrożnie (tak by się wzajemnie nie dotykały) ścinano do próbek typu Falcon i transportowano do laboratorium. Zerwane kwiaty przecinano sterylnym skalpelem wzdłuż dna kwiatowego dzieląc je na dwie symetryczne połowy. Uzyskany materiał roślinny wykładano na szalkach Petriego o średnicy 90 mm w których znajdowała się pożywka PDA. Odczyt przeprowadzonego doświadczenia wykonywano po upływie 1 doby od momentu umieszczenia kwiatów na pożywce. Wybrane szczepy bakterii testowano na kwiatach kilkakrotnie. W tabeli 10 przedstawiono wyniki badania.

Tabela 10

Szczep	Patogen	
	<i>Botrytis cinerea</i> Iz1	Skuteczność ochrony
Kontrola	100	-
T16/8	90,0	10
T14/15	0	100

Kolejne doświadczenie przeprowadzono na jabłkach. W czasie wykonywania inokulacji jabłek wykorzystano dwa izolaty *B. cinerea* (Iz1 i Iz2), wyizolowane z chorych jabłek z różnych sadów. Zawiesiny zarodników konidialnych grzyba uzyskano poprzez zmycie 14-dniowych kultur sterylną wodą destylowaną. Następnie 250 ml kolby Erlenmeyera wypełnione 100 ml zawiesiny grzyba umieszczono na wytrząsarce w celu rozbicia skupisk zarodników. Po ok. 2 godzinach wytrząsania przystąpiono do standaryzowania zawiesin grzybowych przy użyciu komory Bürkera. Koncentrację zarodników konidialnych ustalono na 10^6 w mililitrze. W przeprowadzonym badaniu wykorzystano jabłka odmiany „Gala” pochodzące z Sadu Doświadczalnego, które bezpośrednio po zbiorze były przechowywane w chłodni zwykłej w temp. 2°C. Jabłka poddano wstępnemu oczyszczeniu poprzez płukanie w wodzie. Po osuszeniu używając waty nasączonej 95% etanolem odkażano powierzchnię skórki. Na obwodzie w środkowej części każdego owocu wykonano korkoborem 4 symetrycznie oddalone od siebie zranienia o średnicy 5 mm i głębokości 3 mm. Następnie do każdego zranienia wprowadzano 30 μ l zawiesiny bakteryjnej. Użyto zawiesiny wodne zawierające: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml, a badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Po 1 godzinie dodano 30 μ l zawiesiny zarodników konidialnych izolatu grzyba Iz1 lub Iz2. Koncentrację zarodników konidialnych ustalono na 10^6 /ml. W kombinacji kontrolnej w zranienia wprowadzono 30 μ l sterylnej wody destylowanej, a po upływie 1 godziny 30 μ l inokulum odpowiedniego izolatu *B. cinerea*. Jabłka przechowywano przez 4 dni w temp. pokojowej (ok. 19°C) i wilgotności względnej powietrza powyżej 90%. W tabeli 11 przedstawiono wyniki badania.

Tabela 11

Szczep	Nazwa i numer izolatu patogena grzybowego			
	<i>Botrytis cinerea</i> Iz1 koncentracja 10^6 /ml	Skuteczność [%]	<i>Botrytis cinerea</i> Iz2 koncentracja 10^6 /ml	Skuteczność [%]
Kontrola	31,1	-	35,0	-
T14/15	7,1	77	8,5	76
T16/8	9,0	71	11,3	68

Przeprowadzono także badania na winogronach. Dojrzałe owoce winorośli odmiany „Solaris” pobierano z plantacji, a następnie sterylizowano przez zanurzenie w 50% etanolu i przemywano kilkakrotnie sterylną wodą destylowaną. Po przeschnięciu owoce nakłuwano sterylną igłą do głębokości ok. 1 mm i wykładano raną do góry na szalkach Petriego o średnicy 20 cm, po uprzednim zanurzeniu w zawiesinach wodnych badanych bakterii. Użyto zawiesiny zawierające: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^9 jtk/ml, a badania prowadzono równo-

legle i oddzielnie dla każdego szczepu. Po 24 godz. przeprowadzano inokulację, niosząc na wykonane rany kroplami, zawiesiny zarodników *B. cinerea* pipetą pasterowską, w ilości około 50 µl. Kombinację kontrolną stanowiły jagody winorośli zakażane wyłącznie zawiesiną zarodników patogennego grzyba *B. cinerea*. Każdą kombinację stanowiło 60 jagód (20 jagód w 3 powtórzeniach). Wyniki oceniano zgodnie ze skalą bonitacyjną: 0 – brak objawów szarej pleśni na powierzchni skórki jagody, 1 – 25%, 2 – 50%, 3 – 100% powierzchni objęte chorobą. Wyniki badania przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12

Kombinacja	Porażenie owoców w skali bonitacyjnej	Skuteczność [%]
Kontrolna	1,86	-
T 14/15	0,79	57,5
T 16/8	0,57	69,4

Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność szczepów T16/8 i T14/15 w ochronie winorośli przed szarą pleśnią.

Kolejne doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na liściach kapusty głowiastej i marchwi. Po uszkodzeniu igłą preparacyjną liście kapusty i fragmenty marchwi moczone przez 5 minut w wodnych zawiesinach, jednej zawierającej szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a drugiej szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml. Następnie po 2 godzinach na miejscu uszkodzenia наносzono krążki grzybni przerośnięte 7-dniowymi kulturami *Botrytis cinerea*. Kontrolę stanowiły liście kapusty i marchwi moczone w wodzie destylowanej i inokulowane grzybem *Botrytis cinerea*. Zainokulowane liście kapusty i marchew układano w kuwetach na wilgotnych matkach wyłożonych siatkami. Kuwety z liśćmi kapusty i marchwi wkładano do worków foliowych w celu zwiększenia wilgotności. Po 3 i 5 dniach inkubacji w temperaturze 25°C mierzono długość plam infekcyjnych. Test przeprowadzono w 6 powtórzeniach – każdy szczep bakterii testowano na 6 fragmentach roślin (liście kapusty i fragmenty marchwi). Spośród badanych 426 izolatów środowiskowych, szczepy T16/8 i T14/15 wykazały jedną z najwyższych skuteczności w hamowaniu rozwoju *B. cinerea* T16/8 – 45,8% – 67%, a T14/15 – 37,7% – 51%.

Następnie przeprowadzono ocenę *in vivo* antagonistycznych właściwości szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w stosunku do *Botrytis cinerea* w doświadczeniach szklarniowych i polowych. Przeprowadzono ocenę skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 w zwalczaniu szarej pleśni na jabłkach, w czasie przechowywania owoców. Biologiczną skuteczność testowanych bakterii w zwalczaniu szarej pleśni jabłek oceniono po przechowaniu owoców, na podstawie porównania liczby jabłek z objawami choroby w kombinacjach badawczych (opryskiwanych zawiesinami wodnymi szczepów T16/8 i T14/15) i kombinacji kontrolnej (nieopryskiwanej). W badaniach użyto zawiesiny zawierającej: jedną – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a drugą – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml, a badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Pierwsze zabiegi wykonano w okresie kwitnienia, a kolejne w okresie przedzbiornym 4, 3, 2, 1 tydzień przed zbiorem oraz „drenching”, polegający na zalewaniu owoców umieszczonych w skrzynkach, różnymi zawiesinami wodnymi szczepów T16/8 i T14/15 (każdą zawiesiną osobno), bezpośrednio po zbiorze.

Pierwszą ocenę wykonano po ponad 5 miesiącach przechowywania jabłek w chłodni zwykłej w temperaturze 2°C (1,8–2,2°C) i wilgotności względnej powietrza 90–92%, a drugą po 7 dniach przechowywania jabłek w temperaturze 15–20°C. W każdej kombinacji oceniono 1000 sztuk owoców (4 powtórzenia x 250 szt. w powtórzeniu), licząc jabłka zdrowe i z objawami choroby. Wyniki wyrażono w procentach owoców porażonych w stosunku do wszystkich jabłek ocenianych w danej kombinacji. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Newmana – Keuls przy poziomie istotności 5%. Wyniki oceny skuteczności uzyskane w prowadzonych obserwacjach pokazano w tabeli 13. Symbole A, B, C, D, E, F, G – oznaczają terminy aplikacji (A – pełnia kwitnienia, B – opadanie płatków, C, D, E, F – odpowiednio 4, 3, 2, 1 tydzień przed zbiorem, G – „drenching” owoców). Porównawczo przeprowadzono badania dla preparatów komercyjnych Captan 80 WDG i Luna Experience 400 S.C.

Tabela 13

Kombinacja	Terminy zabiegów/stężenie - dawka	I ocena po przechowywaniu owoców w chłodni		II ocena po przechowywaniu owoców temp. pokojowej	
		<i>Botrytis cinerea</i>	Skuteczność [%]	<i>Botrytis cinerea</i>	Skuteczność [%]
Kontrola	-	0,7	-	1,0	-
Captan 80 WDG, Luna Experience 400 SC	ABC 1,9 kg E 0,75	0,4	42,9	0,7	30
T16/8	CDEFG 10 ⁷	0	100	0	100
T14/15	CDEFG 10 ⁷	0,3	57,1	0,8	20

Przeprowadzono również ocenę skuteczności szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w zwalczaniu szarej pleśni (*Botrytis cinerea*) na owocach winorośli odmiany „Solaris” zebranych w fazie zaawansowanej dojrzałości zbiorczej (BBCH 89). Ochronę winorośli testowanymi preparatami rozpoczęto wraz z początkiem kwitnienia, gdy 10% okwiatu opadło. Przeprowadzono ocenę skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 w zwalczaniu szarej pleśni na winorośli, w czasie przechowywania owoców. Użyto zawiesiny wodnej zawierającej: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10⁷ jtk/ml. Badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Pierwszą ocenę występowania szarej pleśni wykonano bezpośrednio po zbiorze owoców, tuż przed umieszczeniem w chłodni. Drugą po 40 dniach przechowywania w chłodni, a trzecią po 7 dniach w przechowywania w 21°C. Wyniki każdej oceny przedstawiono, jako % porażonych jagód. Skuteczność badanych preparatów określono na podstawie porównania % porażenia jagód w kombinacjach chronionych w stosunku do kombinacji kontrolnej (nietraktowanej). Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Newmana – Keulsa przy poziomie istotności 5%. Wyniki oceny skuteczności uzyskane w prowadzonych obserwacjach pokazano w tabeli 14. Symbole A, B, C, D, E, F, G – oznaczają terminy aplikacji (A – początek kwitnienia, B – pełnia fazy kwitnienia, C – 70% kołpaczków opadło, D – koniec fazy kwitnienia, E – jagody zaczynają się stykać ze sobą, F – początek dojrzewania, jagody zaczynają się wybarwiać, G – mięknięcie jagód, H – jagody dojrzałe do zbioru). Porównawczo przeprowadzono badania dla preparatów komercyjnych Serenade ASO, Luna Experience 400 S.C., Switch 62,5 WG).

Tabela 14

Szara pleśń – winorośl 'Solaris'							
Kombinacja	Terminy zabiegów	I ocena bezpośrednia po zbiorze		II ocena po 40 dniach przechowywania w chłodni		III ocena po 7 dniach przechowywania w 21°C	
		średni % porażenia	Skuteczność w %	średni % porażenia	Skuteczność w %	średni % porażenia	Skuteczność w %
Kontrola	-	29,6	-	77,0	-	84,4	-
T16/8	ABCDEF GH	3,5	91,9	12,5	83,8	20,9	75,2
T14/15	ABCDEF GH	2,4	91,9	22,0	71,4	32,5	61,5
T16/8	BCEF	5,2	82,4	12,8	83,4	26,0	69,2
T14/15	BCEF	1,2	95,9	14,0	81,8	23,0	72,7
Serenade ASO	BCEF	0,9	97,0	5,3	93,1	15,6	81,5
Luna Experience 400 SC Switch 62,5 WG	BECE	1,6	94,6	3,1	96,0	14,1	83,3

Wyniki obu przedstawionych powyżej doświadczeń, prowadzonych w warunkach prowokacyjnych na jabłkach i winogronach (tab. 13, tab. 14) – przy wysokim poziomie agrotechniki i intensywności produkcji, wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność zarówno szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8, jak i szczepu *Pantoea allii* T14/15 do zastosowania w zwalczaniu szarej pleśni. Osiągnięte wyniki skuteczności szczepów były, co najmniej tak dobre, jak uznanego standardu, jakim jest preparat Serenade ASO oraz programu ochrony chemicznej.

Przykład 5

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 do ochrony roślin przed **alternariozą** powodowaną przez grzyby z rodzaju ***Alternaria* spp.**

Ocenę skuteczności szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w ograniczaniu alternariozy przeprowadzono w doświadczeniach polowych na kapuście głowiastej i marchwi.

Pierwsze doświadczenie przeprowadzono na kapuście głowiastej rosnącej na polu doświadczalnym. Doświadczenie założono w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach po 2 rzędy roślin (20 roślin na poletku), obejmowało 6 kombinacji. Do oprysków użyto zawiesiny zawierającej: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml, a badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Porównawczo w doświadczeniu używano standardowego produktu biologicznego Serenade ASO i standardowego produktu chemicznego – Scorpion 325 SC. Zawiesiny zastosowano profilaktycznie – przed wystąpieniem objawów chorobowych. Wykonano 5 zabiegów opryskiwania roślin. W dniu każdego zabiegu opryskiwania kapusty, określano stopień porażenia roślin stosując 8-stopniową skalę: (0–0%; 1–1%; 2–5%; 3–15%; 4–25%; 5–50%; 6–75%; 7–100%). Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. W celu określenia różnic pomiędzy średnimi użyto testu Dun-cana, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Do oceny skuteczności preparatów zastosowano skrócony wzór Abbotta. Tabela 15 zawiera ocenę skuteczności użytych zawiesin w ograniczaniu rozwoju alternariozy kapusty.

Tabela 15

Kombinacja	% porażenia liści/% skuteczności							
	I ocena		II ocena		III ocena		IV ocena	
Kontrola	10,5	-	21,1	-	27,9	-	35,7	-
T16/8	2,9	72,4	11,2	46,9	15,5	44,4	21,2	40,6
T14/15	3,1	70,5	12,4	41,2	17,2	38,4	23,2	35,0
Serenade ASO	3,0	70,3	12,1	41,2	17,1	38,4	23,4	35,0
Scorpion 325 SC	0,0	100	0,5	97,6	1,0	96,4	1,5	95,8

Następnie przeprowadzono ocenę skuteczności szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 lub *Pantoea allii* T14/15 w ograniczaniu alternariozy marchwi.

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach polowych, na marchwi rosnącej na polu doświadczalnym. Doświadczenie obejmowało 6 kombinacji. Doświadczenie założono w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach po 2 rzędy roślin. Do oprysków użyto zawiesiny wodnej zawierającej: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml, a badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Porównawczo w doświadczeniu używano standardowych produktów biologicznych Serenade ASO i Scorpion 325 SC. Badane formułacje zastosowano profilaktycznie – przed wystąpieniem objawów chorobowych. Wykonano 5 zabiegów opryskiwania roślin. W dniu każdego zabiegu opryskiwania marchwi, określano stopień porażenia roślin stosując 8-stopniową skalę: (0–0%; 1–1%; 2–5%; 3–15%; 4–25%; 5–50%; 6–75%; 7–100%). Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. W celu określenia różnic pomiędzy średnimi użyto testu Dun-cana, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Do oceny skuteczności preparatów zastosowano skrócony wzór Abbotta. Tabela 16 zawiera ocenę skuteczności badanych preparatów w ograniczaniu rozwoju alternariozy marchwi.

Tabela 16

Kombinacja	% porażenia liści/% skuteczności							
	I ocena		II ocena		III ocena		IV ocena	
Kontrola	10,1	-	25,2	-	43,6	-	62,1	-
T16/8	4,0	60,4	11,5	55,5	30,0	31,2	49,4	20,5
T14/15	4,2	58,4	10,9	56,7	32,1	26,4	51,6	16,9
Serenade ASO	7,7	23,8	19,2	23,0	39,1	10,3	58,6	5,6
Scorpion 325 SC	0,0	100%	0,5	98,0	1,1	97,5	3,9	93,7

Wyniki obu przedstawionych powyżej doświadczeń, prowadzonych w warunkach prowokacyjnych na kapuście i marchwi (tab. 15, tab. 16) – przy wysokim poziomie agrotechniki i intensywności produkcji, wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność zarówno szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8, jak i szczepu *Pantoea allii* T14/15 do zastosowania w zwalczaniu alternariozy. Osiągnięte wyniki skuteczności szczepów, według wynalazku, były co najmniej tak dobre lub lepsze, jak uznanego standardu, jakim jest preparat Serenade ASO – standard biologiczny.

Przykład 6

Zastosowanie szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8 do ochrony roślin przed **antraknozą** powodowaną przez grzyba ***Glomerella acutata*** znanego głównie w stadium konidialnym *Colletotrichum acutatum*.

Przeprowadzono ocenę skuteczności szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8 w zwalczaniu antraknozy jabłek w czasie przechowywania owoców. Pierwsze zabiegi wykonano w okresie kwitnienia, a kolejne w okresie przedzbiorczym 4, 3, 2, 1 tydzień przed zbiorem oraz „drenching” lub zanurzanie jabłek w roztworach biopreparatów bezpośrednio po zbiorze. Ocenę przeprowadzono po przechowaniu owoców, na podstawie porównania liczby jabłek z objawami choroby w kombinacjach badawczych, opryskiwanych zawiesiną zawierającą szczep *Pantoea agglomerans* T16/8 w ilości 10^7 jtk/ml i kombinacji kontrolnej (nieopryskiwanej). Pierwszą ocenę wykonano po ponad 5 miesiącach przechowywania jabłek w chłodni zwykłej w temperaturze 2°C (1,8–2,2°C) i wilgotności względnej powietrza 90–92%, a drugą po 7 dniach przechowywania jabłek w temperaturze 15–20°C. W każdej kombinacji oceniono 1000 sztuk owoców (4 powtórzenia x 250 szt. w powtórzeniu), licząc jabłka zdrowe i z objawami choroby. Wyniki wyrażono w procentach owoców porażonych w stosunku do wszystkich jabłek ocenianych w danej kombinacji. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Newmana – Keulsa przy poziomie istotności 5%. Symbole A, B, C, D, E, F, G – oznaczają terminy aplikacji (A – pełnia kwitnienia, B – opadanie płatków, C, D, E, F – odpowiednio 4, 3, 2, 1 tydzień przed zbiorem, G – „drenczing” owoców). Porównawczo przeprowadzono badania dla preparatów komercyjnych Captan 80 WDG i Luna Experience 400 S.C. Wyniki przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17

Kombinacja	Terminy zabiegów/stężenie	I ocena po przechowywaniu owoców w chłodni.	
		<i>Colletotrichum</i> spp.	Skuteczność [%]
Kontrola	-	0,5	-
Captan 80 WDG Luna Experience 400 SC	ABC 1,9 kg E 0,75	0,3	40
T16/8	CDEFG 10^7	0	100

Wyniki doświadczenia, prowadzonego w warunkach prowokacyjnych – przy wysokim poziomie agrotechniki i intensywności produkcji, wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność szczepu T16/8 do zastosowania w zwalczaniu antraknozy powodowanej przez *Colletotrichum* spp. Osiągnięte wyniki skuteczności były co najmniej tak dobre lub lepsze, jak uznanych standardów chemicznych (Captan 80 WDG, Luna Experience 400 SC).

Przykład 7

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 do ochrony roślin przed **brunatną zgnilizną (moniliozą)** powodowaną przez grzyby z rodzaju ***Monilinia* spp.**

Dokonano oceny *in vitro* antagonistycznych właściwości szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8 w stosunku do grzyba *Monilinia fructicola*. Najpierw przeprowadzono badania ograniczenia wzrostu grzyba *Monilinia fructicola* przez szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8. Badania prowadzono na pożywce PDA (agar glukozowo-ziemniaczany), jako współhodowle szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 oraz grzyba *Monilinia fructicola* i obserwowano zahamowanie wzrostu grzyba. Strefę ograniczenia wzrostu patogenicznego grzyba *Monilinia fructicola* przez szczepy T16/8, po 5 i 7 dniach przedstawiono w tabeli 18. Wielkości liczbowe przedstawione w tabeli określają promień od obrzeża kolonii do obrzeża strefy zahamowania wzrostu w mm.

Tabela 18

Szczep	Strefa ograniczenia po 5 dniach [mm]	Strefa ograniczenia po 7 dniach [mm]
Kontrola	0	0
T16/8	15	5

Następnie przeprowadzono badanie na jabłkach odmiany 'Rajka' zebranych w fazie dojrzałości zbiorczej (BBCH 87). Przeprowadzono „drenching”, polegający na zalewaniu owoców umieszczonych w skrzynkach zawieszinami badanych szczepów T16/8 oraz T14/15, każdym z osobna. Jabłka użyte w doświadczeniu w okresie przedzbiorczym nie były traktowane chemicznie. Drenching wykonano kilka godzin po zbiorze. Biologiczną skuteczność testowanych bakterii w zwalczaniu brunatnej zgnilizny drzew ziarnkowych oceniono po przechowaniu owoców, na podstawie porównania liczby jabłek z objawami choroby w kombinacjach badawczych, opryskiwanych zawieszinami ze szczepami T16/8 lub T14/15 i kombinacji kontrolnej (nieopryskiwanej). Użyto zawiesiny wodne zawierające szczepy T16/8 lub T14/15, w ilości 10^7 jtk/ml każdy. Badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Pierwszą ocenę wykonano po 3,5 miesiącach przechowywania jabłek w chłodni zwykłej w temperaturze 2°C (1,8–2,2°C) i wilgotności względnej powietrza 90–92%, drugą i trzecią po 7 i 14 dniach przechowywania jabłek w temperaturze 15–20°C. W każdej kombinacji oceniono 440 sztuk owoców (4 powtórzenia x 110 szt. w powtórzeniu), licząc jabłka zdrowe i z objawami choroby. Wyniki wyrażono w procentach owoców porażonych w stosunku do wszystkich jabłek ocenianych w danej kombinacji. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Newmana – Keulsa przy poziomie istotności 5%. I ocena została przeprowadzona po przechowywaniu w chłodni. II ocena była przeprowadzona po przechowywaniu w temp. 15–20°C, po 7 dniach. III ocenę przeprowadzono po kolejnych 7 dniach przechowywania w temp. 15–20°C. W tabeli 19 przedstawiono skuteczność szczepów T16/8 i T14/15 zastosowanych w badaniach podczas przechowywania jabłek.

Tabela 19

Kombinacja	I ocena po przechowywaniu owoców w chłodni		II ocena po przechowywaniu owoców temp. pokojowej		III ocena po przechowywaniu owoców temp. pokojowej	
	Monilinia spp.	Skuteczność [%]	Monilinia spp.	Skuteczność [%]	Monilinia spp.	Skuteczność [%]
Kontrola	0,3	-	0,3	-	0,3	-
T14/15	0,1	66,7	0,2	33,3	0,2	33,3
T16/8	0	100	0	100	0	100

Wyniki przedstawionego doświadczenia, prowadzonego w warunkach prowokacyjnych – przy wysokim poziomie agrotechniki i intensywności produkcji wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność szczepów T16/8 i T14/15 do zastosowania w zwalczaniu brunatnej zgnilizny jabłek powodowanych przez grzyby rodzaju *Monilinia* spp.

Przykład 8

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 do ochrony roślin przed **gorzką zgnilizną** powodowaną przez grzyby z rodzaju ***Neofabrea* spp.**

Dokonano oceny *in vitro* antagonistycznych właściwości izolatów bakterii *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w stosunku do grzybów z rodzaju *Neofabrea* spp. Najpierw przeprowadzono badania ograniczenia wzrostu *Neofabrea* spp. przez szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15. Badania prowadzono na pożywce PDA (agar glukozowo-ziemniaczany), jako współhodowle szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 lub *Pantoea allii* T14/15 oraz *Neofabrea* spp. i obserwowano

zahamowanie wzrostu grzyba. Badania prowadzono równolegle, oddzielnie dla każdego szczepu. Strefę ograniczenia wzrostu patogennego grzybów *Neofabrea* spp. przez szczepy T16/8 i T14/15, po 14 dniach przedstawiono w tabeli 20. Wskazane w niej wielkości liczbowe określają promień od obrzeża kolonii do obrzeża strefy zahamowania wzrostu w mm.

Tabela 20

Szczep	Strefa ograniczenia
Kontrola	0
T16/8	2
T14/15	4

Zahamowanie wzrostu patogena przez badane szczepy wskazuje na zdolność szczepów T16/8 i T14/15 do produkcji substancji o właściwościach fungicydowych lub fungistatycznych.

Następnie przeprowadzono cenę skuteczności szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w zwalczaniu gorzkiej zgnilizny jabłek w czasie przechowywania owoców. Pierwsze zabiegi wykonano w okresie kwitnienia, a kolejne w okresie przedzbiorczym 4, 3, 2, 1 tydzień przed zbiorem oraz „drenching” lub zanurzanie jabłek w zawiesinach badanych szczepów: T16/8 oraz T14/15, każdego z osobna, bezpośrednio po zbiorze.

Biologiczną skuteczność testowanych szczepów bakterii w zwalczaniu gorzkiej zgnilizny jabłek oceniono po przechowaniu owoców, na podstawie porównania liczby jabłek z objawami choroby w kombinacjach badawczych, opryskiwanych zawiesinami wodnymi ze szczepami T16/8 lub T14/15 i kombinacji kontrolnej (nieopryskiwanej). Użyto zawiesiny zawierające szczepy T16/8 lub T14/15, w ilości 10^7 jtk/ml każdy. Badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Pierwszą ocenę wykonano po ponad 5 miesiącach przechowywania jabłek w chłodni zwykłej w temperaturze 2°C (1,8–2,2°C) i wilgotności względnej powietrza 90–92%, a drugą po 7 dniach przechowywania jabłek w temperaturze 15–20°C. W każdej kombinacji oceniono 1000 sztuk owoców (4 powtórzenia x 250 szt. w powtórzeniu), licząc jabłka zdrowe i z objawami choroby. Wyniki wyrażono w procentach owoców porażonych w stosunku do wszystkich jabłek ocenianych w danej kombinacji. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Newmana – Keulsa przy poziomie istotności 5%. W tabeli 21 przedstawiono skuteczność szczepów T16/8 i T14/15 w zwalczaniu gorzkiej zgnilizny jabłek w czasie przechowywania owoców. Symbole A, B, C, D, E, F, G - oznaczają terminy aplikacji (A – pełnia kwitnienia, B – opadanie płatków, C, D, E, F – odpowiednio 4, 3, 2, 1 tydzień przed zbiorem, G – „drenching” owoców). Porównawczo przeprowadzono badania dla preparatów komercyjnych Captan 80 WDG i Luna Experience 400 S.C.

Tabela 21

Kombinacje	Termin aplikacji/dawka/koncentracja	Zgnilizny powodowane przez <i>Neofabraea</i> spp.	Skuteczność [%]
kontrola	-	1,4	-
Captan 80 WDG Luna Experience 400 SC	ABC 1,9 kg E 0,75	0,3	78,6
T16/8	CDEFG 10^7	0,4	71,4
T14/15	CDEFG 10^7	0,2	85,7

Wyniki przedstawionego doświadczenia, prowadzonego w warunkach prowokacyjnych – przy wysokim poziomie agrotechniki i intensywności produkcji, wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność badanych szczepów T16/8 i T14/15 do zastosowania w zwalczaniu gorzkiej zgnilizny jabłek powodowanych przez grzyby rodzaju *Neofabrea* spp. Osiągnięte wyniki skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 były, co najmniej tak dobre lub lepsze, jak uznanych standardów chemicznych (Captan 80 WDG, Luna Experience 400 SC).

Przykład 9

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w ograniczaniu **mączniaka właściwego** na marchwi, wywołanego przez grzyba ***Erysiphe heraclei***.

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach polowych, na marchwi rosnącej na polu doświadczalnym. Doświadczenie obejmowało 6 kombinacji. Doświadczenie założono w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach po 2 rzędy roślin. Zastosowano zawiesiny wodne zawierające: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml. Badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Zawiesiny zastosowano profilaktycznie – przed wystąpieniem objawów chorobowych. Porównawczo w doświadczeniu używano standardowego produktu biologicznego Serenade ASO. Wykonano 5 zabiegów opryskiwania roślin. W dniu każdego zabiegu opryskiwania marchwi, określano stopień porażenia roślin stosując 8-stopniową skalę: (0–0%; 1–1%; 2–5%; 3–15%; 4–25%; 5–50%; 6–75%; 7–100%). Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. W celu określenia różnic pomiędzy średnimi użyto testu Duncana, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Do oceny skuteczności preparatów zastosowano skrócony wzór Abbotta. Tabela 22 zawiera ocenę skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 w ograniczaniu rozwoju mączniaka prawdziwego marchwi (*Erysiphe heraclei*).

Tabela 22

Kombinacja	% porażenia liści/% skuteczności					
	I ocena		II ocena		III ocena	
Kontrola	4,8	-	7,5	-	10,1	-
T16/8	0,0	100	1,8	76,0	3,1	69,3
T14/15	0,0	100	2,1	72,0	4,2	57,4
Serenade ASO	0,0	100	2,0	73,3	3,6	64,6

Wyniki przedstawionego doświadczenia, prowadzonego w warunkach prowokacyjnych – przy wysokim poziomie agrotechniki i intensywności produkcji, wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność szczepów T16/8 i T14/15 w zwalczaniu mączniaka właściwego na marchwi, powodowanego przez grzyba *Erysiphe heraclei*. Osiągnięte wyniki skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 były, co najmniej tak dobre lub lepsze, niż uznanego produktu Serenade ASO.

Przykład 10

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 do ochrony roślin przed **zarazą ogniową** powodowaną przez bakterię **Erwinia amylovora**.

Przeprowadzono badania ograniczenia wzrostu bakterii *Erwinia amylovora* w warunkach in vitro na następujących podłożach: NAS (2,3% nutrient agar z dodatkiem sacharozy do końcowego stężenia 5%), King's B (wg. King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. pt.: „Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin”, J. Lab. Clin. Med. 1954, 44(2), 301–7), LB (trypton 1%, NaCl 1%, ekstrakt drożdżowy 0,5%, agar 2%) oraz NAG (agar odżywczy 2,3%, glicerol 16 ml). Zastosowano metodę opisaną przez Mikicińskiego (Mikiciński A, Sobiczewski P., Puławska J., Maciorowski R. pt.: „Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus spp.*)”, Eur J Plant Pathol, 2016, 145:265–276). Szczep *Pantoea agglomerans* T16/8 wysiano punktowo na odpowiednią pożywkę na środku płytek Petriego. Po 3 dniach inkubacji w 26°C bakterie uśmiercono w oparach chloroformu, a następnie powierzchnię pożywki zalano 4 ml schłodzonego miękkiego agaru z dodatkiem 100 µl zawiesiny Ea659 (10^7 CFU ml⁻¹). Strefy zahamowania wzrostu patogenicznej bakterii *Erwinia amylovora* mierzono po 24 i 48 godzinach inkubacji w 26°C. Testy prowadzono w 6 powtórzeniach. Strefę inhibicji bakterii *Erwinia amylovora* przez szczepy T16/8 na różnych podłożach, po 24 i 48 h, przedstawiono w tabeli 23. Wielkości liczbowe przedstawione w tabeli określają promień od obrzeża kolonii do obrzeża strefy zahamowania wzrostu w mm.

Tabela 23

Strain	Medium							
	NAS		LB		King's B		NAG	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
T16/8	7,5	7,5	0	0	0	0	4,3	0

Szczep T16/8 wykazał strefę zahamowania wzrostu bakterii *Erwinia amylovora* na dwóch z 4 badanych pożywek.

Kolejne doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na zawiązkach owoców gruszy. Zawiązki gruszy odmiany „Konferencja” pocięto poprzecznie na plastry i zanurzano w wodnej

zawiesinie szczepów, jednej zawierającej szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a drugiej – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml lub w sterylnej wodzie destylowanej w przypadku kontroli. Badania prowadzono równolegle oddzielnie dla każdego szczepu. Plastry układano na wilgotnej bibule na dnie szalek Petriego, o średnicy 20 cm. Po upływie 6 godz. wykonywano zakażenie poprzez naniesienie za pomocą opryskiwacza ręcznego na powierzchnie plastrów inokulum bakterii patogenicznych *Erwinia amylovora* (izolat Ea 659) o stężeniu 10^7 jtk/ml. Każdą kombinację stanowiło 40 zawiązków (4 powtórzenia). Ocenę skuteczności (S) szczepów T16/8 i T14/15 przeciwko zarazie ogniowej na zawiązkach gruszy przedstawiono w tabeli 24. Porównawczo przeprowadzono badania dla preparatów komercyjnych Switch 62,5 WG, Miedzian 50WP BlightBan A506, BlightBan C9-1.

Tabela 24

Kombinacja	Odczyt po 2 d	S [%]	Odczyt po 5 d	S [%]	Odczyt po 7 d	S [%]
Kontrola pozytywna	0,93	-	3,0	-	4,0	-
Switch 62,5 WG 0,1%	0,48	48,4	2,8	6,7	3,5	12,5
BlightBan® A506 10^8 jtk/ml	0,0	100,0	0,15	95,0	0,63	84,2
BlightBan® C9-1 10^8 jtk/ml	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
T14/15 10^8 jtk/ml	0,0	100,0	0,08	97,3	0,48	88,0
T16/8 10^8 jtk/ml	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Miedzian 50WP 0,15%	0,0	100,0	0,23	92,3	0,43	89,2
Miedzian 50WP 0,3%	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0

Wyniki przedstawionego doświadczenia laboratoryjnego wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność szczepów T16/8 i T14/15 w zwalczaniu zarazy ogniowej powodowanej przez bakterię *Erwinia amylovora*. Osiągnięte wyniki skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 były, co najmniej tak dobre lub lepsze, jak uznanych standardów biologicznych (BlightBan® A506, BlightBan® C9-1) i chemicznego (Miedzian 50WP).

Przykład 11

Zastosowanie szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 do ochrony jabłek przed **mokrą zgnilizną** powodowaną przez grzyby z rodzaju *Penicillium* spp. (***Penicillium expansum***) oraz **mokrą zgnilizną korzeni marchwi** powodowaną przez bakterie ***Pectobacterium carotovorum***

Dokonano oceny in vitro antagonistycznych właściwości izolatów bakterii *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w stosunku do grzybów z rodzaju *Penicillium* spp. Najpierw przeprowadzono badania ograniczenia wzrostu *Penicillium* spp. przez szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15. Badania prowadzono na pożywce PDA (agar glukozowo-ziemniaczany), jako współhodowle szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 lub *Pantoea allii* T14/15 oraz *Penicillium* spp. i obserwowano zahamowanie wzrostu patogenu. Badania prowadzono równolegle, oddzielnie dla każdego szczepu, a ich koncentracja w zawiesinie wynosiła 10^7 jtk/ml. Strefę ograniczenia wzrostu patogenu *Penicillium* spp. przez szczepy T16/8 i T14/15, po 5 i 7 dniach przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24

Szczep	Strefa ograniczenia wzrostu <i>Penicillium expansum</i> po 5 dniach [mm]	Strefa ograniczenia wzrostu <i>Penicillium expansum</i> po 7 dniach [mm]
Kontrola	0	0
T16/8	20	0
T14/15	10	0

Wielkości liczbowe przedstawione w tabeli określają promień od obrzeża kolonii do obrzeża strefy zahamowania wzrostu w mm. Zahamowanie wzrostu patogena przez badane szczepy wskazuje na zdolność szczepów T16/8 i T14/15 do produkcji substancji o właściwościach fungicydowych lub fungistatycznych.

Przeprowadzono badania skuteczności szczepów bakterii *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w zwalczaniu mokrej zgnilizny jabłek. W czasie wykonywania inokulacji jabłek wykorzystano dwa izolaty patogena *Penicillium expansum* (Izolaty P8 i P11), pochodzące od chorych jabłek z różnych sadów. Zawiesiny zarodników konidialnych grzyba uzyskano poprzez zmycie 7-dniowych kultur sterylną wodą destylowaną. Następnie 250 ml kolby Erlenmeyera wypełnione 100 ml zawiesiny zarodników grzyba *Penicillium expansum* umieszczono na wytrząsarce w celu rozbicia skupisk zarodników. Koncentrację zarodników konidialnych ustalono dla izolatu P8 na 10^6 , a dla P11 na 10^5 jtk/ml. Po ok. 2 godzinach wytrząsania dokonano standaryzacji zawiesin bakteryjnych przy użyciu komory Bürkera. W badaniu wykorzystano jabłka odmiany „Gala”, które bezpośrednio po zbiorze były przechowywane w chłodni zwykłej w temp. 2°C. Jabłka poddano wstępnemu oczyszczeniu poprzez płukanie w wodzie. Po osuszeniu używając waty nasączonej 95% etanolem odkażano powierzchnię skórki. Na obwodzie środkowej części każdego owocu wykonano korkoborem 4 symetrycznie oddalone od siebie zranienia o średnicy 5 mm i głębokości 3 mm. Następnie do każdego zranienia wprowadzano 30 µl zawiesiny bakteryjnej. Użyto zawiesiny wodne zawierającej: jedna – szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, a druga – szczep *Pantoea allii* T14/15, każdy w ilości 10^7 jtk/ml, a badania prowadzono równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Po 1 godzinie dodano 30 µl zawiesiny zarodników konidialnych odpowiedniego izolatu grzyba (P8 lub P11). Koncentrację zarodników konidialnych ustalono na 10^6 /ml. W kombinacji kontrolnej w zranienia wprowadzono 30 µl sterylnej wody destylowanej, a po upływie 1 godziny 30 µl inokulum odpowiedniego izolatu *P. expansum*. Jabłka przechowywano przez 5 dni w temp. pokojowej (ok. 19°C) i wilgotności względnej powietrza powyżej 90%. Ocenę skuteczności szczepów T16/8 i T14/15 przeciwko mokrej zgniliznie w badaniach jabłek przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25

Szczep	Nazwa i numer izolatu patogena			
	<i>Penicillium expansum</i> P8	Skuteczność [%]	<i>Penicillium expansum</i> P11	Skuteczność [%]
Kontrola	28,8	-	18,2	-
T14/15	15,0	48	8,7	52
T16/8	17,8	38	12,5	31

Wyniki przedstawionego doświadczenia laboratoryjnego wskazują wyraźnie na skuteczność i co zatem idzie także przydatność szczepów T16/8 i T14/15 w zwalczaniu mokrej zgnilizny powodowanej przez grzyb *Penicillium expansum*.

W kolejnym badaniu przeprowadzono ocenę skuteczności szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 i *Pantoea allii* T14/15 w ograniczaniu mokrej zgnilizny korzeni marchwi w czasie jej przechowywania, powodowanej przez bakterię *Pectobacterium carotovorum*. Marchew rosnącą na polu doświadczalnym opryskano w trakcie wegetacji 4-krotnie co 7 dni (wszystkie poletka) przemiennie preparatami chemicznymi Amistar 250 SC, Zato 50 WG, Score 250 EC i Scorpion 325 SC. Następnie miesiąc przed zbiorem wykonano trzy zabiegi co 10 dni stosując zawiesiny ze szczepami T16/8 lub T14/15. Użyto zawiesiny wodne zawierające szczepy T16/8 lub T14/15, w ilości 10^7 jtk/ml każdy. Zabiegi wykonywano równolegle i oddzielnie dla każdego szczepu. Następnie marchew (100 sztuk z każdej kombinacji) wstawiono do chłodni w temp. 4°C. Ocenę stopnia porażenia korzeni marchwi wykonano 3-krotnie: w dniu wystawienia z przechowalni oraz po 10 dniach i 20 dniach przetrzymywania korzeni w temperaturze pokojowej. Określano stopień porażenia korzeni marchwi stosując 8-stopniową skalę: (0–0%; 1–1%; 2–5%; 3–15%; 4–25%; 5–50%; 6–75%; 7–100%). Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Duncuna przy poziomie istotności 5%. Skuteczność badanych środków obliczono według wzoru Abbott'a. Porównawczo przeprowadzono badania dla preparatów komercyjnych Serenade ASO, Scorpion 325 SC). Wyniki przedstawiono w tabeli 26.

Tabela 26

Kombinacje		Mokre gnicie bakteryjne (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)					
		Średni % porażenia główek			Skuteczność [%]		
		Data obserwacji			Data obserwacji		
		po wyjęciu z chłodzi	po 10 dniach przechowywania w temp. pokojowej	po kolejnych 10 dniach	po wyjęciu z chłodzi	po 10 dniach przechowywania w temp. pokojowej	po kolejnych 10 dniach
1	Kontrola	0,6	2,5	6,0	-	-	-
2	T16/8	2,22	5,21	8,9	-	-	-
3	T14/15	1,1	2,4	2,5	-	4	58,3
4	Serenade ASO	0,36	6,5	12,6	40	-	-
5	Scorpion 325 SC	0,43	1,0	3,0	28,3	60	50

W kolejnym doświadczeniu przeprowadzono ocenę skuteczności szczepu *Pantoea agglomerans* T16/8 na zdrowotność korzeni marchwi w trakcie ich przechowywania, przy czym były one stosowane pozbiorniczo. Nać marchwi była chroniona preparatami chemicznymi – cztery zabiegi co 7 dni. Korzenie marchwi po wykopaniu były moczone w zawieszynie zawierającej szczep T16/8 w ilości 10⁷ jtk/ml. Następnie marchew (100 sztuk z każdej kombinacji) wstawiono do chłodzi w temp. 4°C. Ocenę stopnia porażenia korzeni marchwi wykonano 3-krotnie: w dniu wystawienia z przechowalni oraz po 10 dniach i 20 dniach przetrzymywania korzeni w temperaturze pokojowej. Określano stopień porażenia korzeni marchwi stosując 8-stopniową skalę: (0–0%; 1–1%; 2–5%; 3–15%; 4–25%; 5–50%; 6–75%; 7–100%). Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi oceniano przy użyciu testu Duncuna przy poziomie istotności 5%. Skuteczność badanych środków obliczono według wzoru Abbott'a. Wyniki przedstawiono w tabeli 27

Tabela 27

Kombinacje		Mokre gnicie bakteryjne – <i>Pectobacterium carotovorum</i>					
		Średni % porażenia korzeni			Skuteczność [%]		
		Data obserwacji			Data obserwacji		
		W dniu wystawienia	Po 10 dniach	Po 20 dniach	W dniu wystawienia	Po 10 dniach	Po 20 dniach
1	Kontrola	7,75	12,16	18,08	-	-	-
2	T16/8	0,49	3,49	8,91	93,7	71,3	50,7
3	Serenade ASO	11,0	25,33	32,24	-	-	-

Wyniki przedstawionych powyżej doświadczeń, prowadzonych w warunkach prowokacyjnych – przy wysokim poziomie agrotechniki i intensywności produkcji, wskazują wyraźnie na wysoką skuteczność i co zatem idzie także wysoką przydatność szczepu T16/8 do zastosowania w zwalczaniu zgnilizn korzeni powodowanych przez *Pectobacterium carotovorum*. Osiągnięte wyniki skuteczności szczepu T16/8 były lepsze, niż uznanego standardu Serenade ASO.

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep *Pantoea agglomerans* T16/8, zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00272, w dniu 26 listopada 2019 r.
2. Szczep *Pantoea allii* T14/15 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, pod numerem B/00276, w dniu 26 listopada 2019 r.
3. Zastosowanie szczepów rodzaju *Pantoea* spp. zdeponowanych w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PCM w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im.

Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, w dniu 26 listopada 2019 r., wybranych ze szczepów *Pantoea agglomerans* T16/8 nr depozytu B/00272 albo *Pantoea allii* T14/15 nr depozytu B/00276, jako środka do ochrony roślin przed chorobami wywołanymi przez patogeny bakteryjne i/lub grzybowe.

4. Zastosowanie, według zastrz. 3, **znamiennie tym**, że szczepy *Pantoea agglomerans* T16/8 albo *Pantoea allii* T14/15 nanosi się w postaci zawiesiny wodnej na powierzchnię rośliny, poprzez opryskiwanie, zamaczanie roślin lub ich części w warunkach przechowywania, pod osłonami i w warunkach polowych, a liczba komórek szczepu w zawieszynie wynosi co najmniej 10^7 jtk/ml.

Rysunki

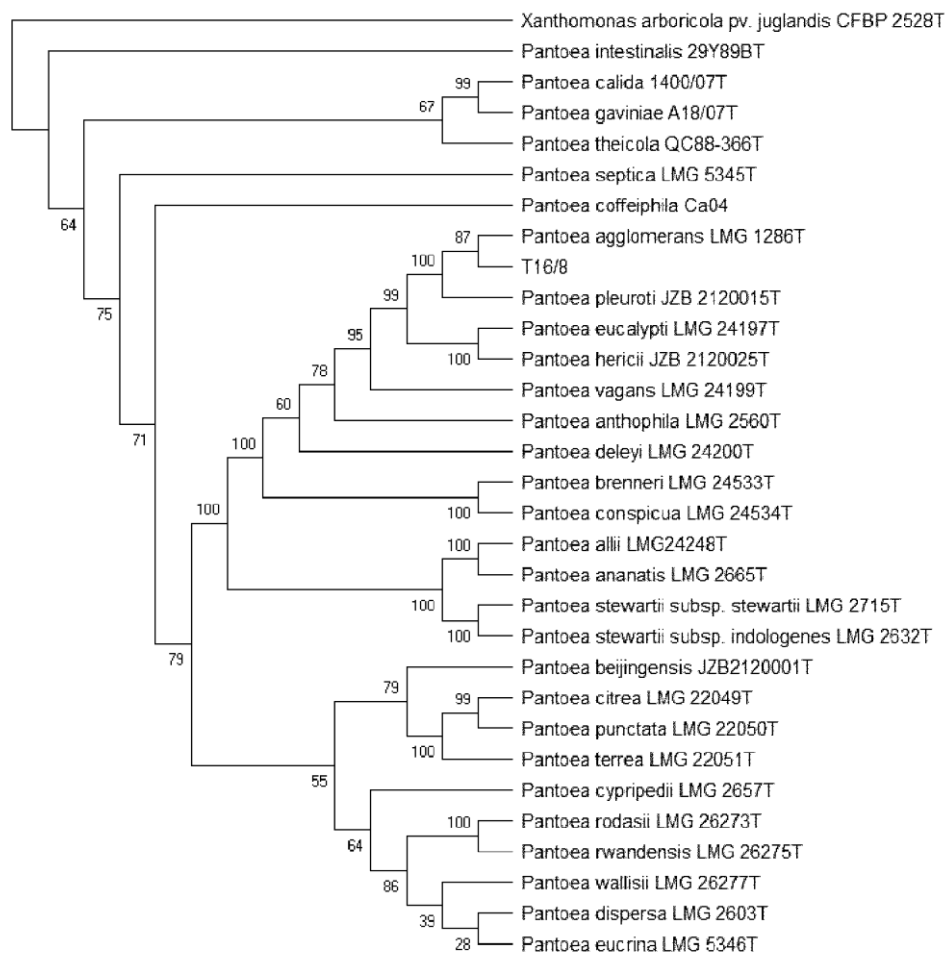


Fig. 1

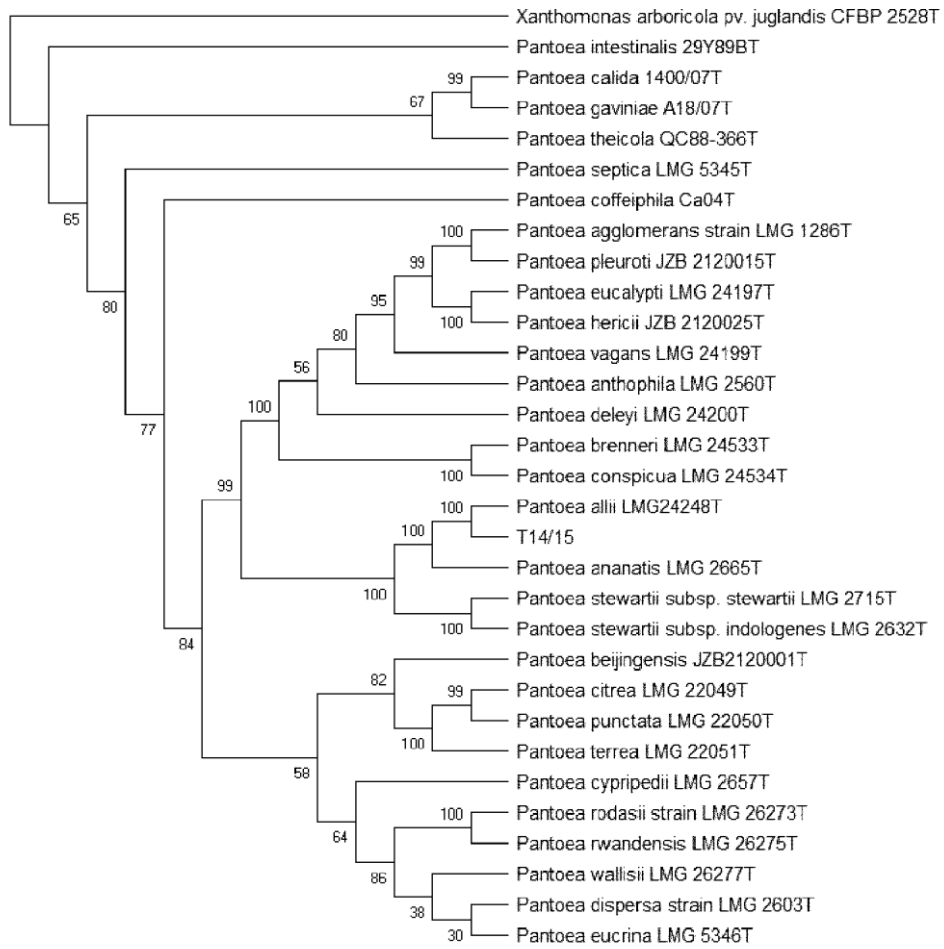


Fig. 2