



Sposób otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora* z zastosowaniem szczepów grzyba z rodzaju *Trichoderma*, biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin, sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie oraz kompozycja podłoża namnażającego dla grzybów z rodzaju *Trichoderma*

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania ekologicznego, suchego biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora* z zastosowaniem szczepów grzyba z rodzaju *Trichoderma* oraz biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin. Przedmiot wynalazku stanowią również: sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie oraz kompozycja podłoża namnażającego dla grzybów z rodzaju *Trichoderma*.

Owoce malin posiadają właściwości prozdrowotne, przeciwutleniające i przeciwzapalne, a przy tym są soczyste i aromatyczne, dlatego też są chętnie kupowanym towarem. W związku z tym uprawa malin odgrywa bardzo ważną rolę w produkcji rolniczej i ogrodniczej wielu krajów na całym świecie, w tym również w Polsce. Ponadto plony malin w Polsce wykazują wyraźne tendencje wzrostowe. Jednakże, grzybowe patogeny malin, takie jak: *Botrytis* sp., *Verticillium* sp. *Colletotrichum* sp. czy *Phytophthora* sp., wywołują olbrzymie straty w produkcji tych owoców, powodując choroby, odpowiednio takie jak szara pleśń, wercilioza, antraknoza i fytoftoroza (Malarczyk D., Panek J., Frąc M., 2019. *Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops - A Review. Molecules*, 24, 1200.).

Jednocześnie Rozporządzenie Rady Wspólnoty Europejskiej nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej nakłada na producentów owoców ograniczenia w stosowaniu konwencjonalnych nawozów mineralnych i środków chemicznych, sugerując w zamian za to wykorzystanie środków ekologicznych pochodzenia naturalnego, takich jak preparaty mikrobiologiczne.

W literaturze często podkreślane jest znaczenie interakcji między *Trichoderma* spp., patogenem i rośliną. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* działają jako czynniki biokontroli przejawiając kilka typowych mechanizmów, takich jak: wytwarzanie związków hamujących rozwój patogenów, mykopasożytnictwo, inaktywacja enzymów patogenów, indukowanie odporności systemicznej roślin, czy rywalizacja o składniki odżywcze, czyli o przestrzeń życiową poprzez tworzenie biomasy grzybni. Grzyby należące do rodzaju *Trichoderma* są powszechnie znane z bardzo szybkiego wzrostu i są uważane za agresywnych konkurentów w stosunku do patogenów. Zdolność *Trichoderma* spp. do efektywnego rozkładu martwej materii organicznej w wyniku produkcji szeregu enzymów litycznych przyczynia się do poprawy właściwości fizyko-chemicznych gleby, a więc poprawia jej jakość. Grzyby z rodzaju *Trichoderma*, w wyniku aktywności hydrolitycznej, uwalniają z materii organicznej makro i mikroelementy do roztworu glebowego, z których korzystają rośliny (Sharma B.L., Singh S.P., Sharma M.L., 2011. *Bio-degradation of crop residues by Trichoderma species vis-à-vis nutrient quality of the prepared compost. Sugar Tech, 14* 174-180.). Sprawia to, że szczepy *Trichoderma* spp. są często wykorzystywane jako składnik biopreparatów (Pylak M., Oszust K., Frąc M., 2019. *Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 18*, 597–616.).

W stanie techniki opisano, że szczepy należące do rodzaju *Trichoderma* wykazują właściwości antagonistyczne wobec wielu patogenów grzybowych roślin. Poniżej zostało przytoczonych kilka znaczących światowych przykładów patentów z ostatnich kilkunastu lat.

Izolat *T. asperellum* T34 był w stanie hamować wzrost dwóch patogenów roślinnych, takich jak *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani* (Gay M.I.T., Vilaplana M.L.C., 2009. *Substrates containing a Trichoderma asperellum strain for biological control of Fusarium and Rhizoctonia. Patent EP1400586B1*).

T. asperellum T34 na specjalnym podłożu, takim jak kompozyt (kompost + torf + wermikulit), czy torf + kompost (kompost z kory sosny, kompost z twardego drewna, kompost szlamowy z oczyszczalni ścieków, pozostałości ogrodowe) okazał się wysoce aktywny w

tlumieniu rozwoju *R. solani* i *F. oxysporum* (Gay M.I.T., Vilaplana M.L.C., 2009. *Substrates containing a Trichoderma asperellum strain for biological control of Fusarium and Rhizoctonia. Patent US7553657B2*).

Niektóre szczepy *T. atroviride* były w stanie kontrolować patogeny roślinne w glebie, takie jak *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium* i *Sclerotinia* (Stewart A., 2009. *Methods and compositions comprising Trichoderma atroviride for the biological control of soil borne plant pathogens and promoting plant growth. Zgłoszenie patentowe WO2009102222A1*; Stewart A., 2013. *Methods and compositions comprising Trichoderma atroviride for the biological control of soil borne plant pathogens and promoting plant growth. Patent US8394623B2*).

Opracowano także środek do kontroli biologicznej oparty o szczep *T. atroviride* SC1, który okazał się skuteczny w kontrolowaniu niektórych roślinnych patogenów grzybowych, powodujących choroby korzeni, owoców i kwiatów roślin, takich jak: Liliaceae, Cucurbitaceae, Vitaceae, Cruciferae, Rosaceae, Umbelliferae, Solanaceae, i Compositae (Pertot I., Longa C.M., Prodorutti D., Michelon L., Savazzini F., 2009. *Trichoderma atroviride sc1 for biocontrol of fungal diseases in plants. Zgłoszenie patentowe WO2009116106A1*; Pertot I., Longa C.M., Prodorutti D., Michelon L., Savazzini F., 2011. *Trichoderma atroviride sc1 for biocontrol of fungal diseases in plants. Zgłoszenie patentowe EP2274414A1*; Pertot I., Longa C.M., Prodorutti D., Michelon L., Savazzini F., 2013. *Trichoderma atroviride sc1 for biocontrol of fungal diseases in plants. Patent US8431120B2* Pertot I., Longa C.M., Prodorutti D., Michelon L., Savazzini F., 2014. *Trichoderma atroviride sc1 for biocontrol of fungal diseases in plants. Patent EP2274414B1*).

Wykazano także, że dwa szczepy *Trichoderma* takie jak *T. harzianum* T22 i *T. virens* G41 zwalczają wiele chorób roślin, wywoływanych przez gatunki grzybów, takie jak *Pythium* (*P. aphanidermatum*, *P. irregulare* i *P. ultimum*), *Fusarium* (*F. oxysporum*), *Phytophthora* (*P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. infestans* i *P. nicotianae*), *Rhizoctonia* (*R. solani*), *Sclerotium* (*S. rolfsii*) i *Thielaviopsis* (*T. basicola*), u wielu różnych roślin, w tym roślin rabatowych, roślin ozdobnych, drzew owocowych, a także owoców pestkowych, owoców ziarnkowych i roślin rzepakowych, winogron, cytrusów, ziaren zbóż, traw czy warzyw (Martin W.R., Hayes C.K., 2010. *Control of plant diseases and enhancing plant growth using a combination of a Trichoderma virens species and a rhizosphere competent Trichoderma harzianum species. Zgłoszenie patentowe WO2010009241A2*; Martin W.R., Hayes C.K., 2011. *Control of plant diseases and enhancing plant growth using a combination of a Trichoderma virens species and a rhizosphere competent Trichoderma harzianum species.*

Zgłoszenie patentowe WO2010009241A3; Martin W.R., Hayes C.K., 2014. Control of plant diseases and enhancing plant growth using a combination of a *Trichoderma virens* species and a rhizosphere competent *Trichoderma harzianum* species. Zgłoszenie patentowe CN104247718A; Martin W.R., Hayes C.K., 2016. Control of plant diseases and enhancing plant growth using a combination of a *Trichoderma virens* species and a rhizosphere competent *Trichoderma harzianum* species. Patent EP2320742B1; Martin W.R., Hayes C.K., 2017. Control of plant diseases and enhancing plant growth using a combination of a *Trichoderma virens* species and a rhizosphere competent *Trichoderma harzianum* species. Patent US9681668B2).

Opracowano także specjalną kompozycję do biologicznego zwalczania chorób grzybowych roślin składającą się z dwóch szczepów, *T. virens* i *T. harzianum*, z kaolinem, wermikulitem i karboksymetylocelulozą (Isyanti I., Norhayati T., Alester A.B.C., 2010. Composition for biological control of plant diseases. Zgłoszenie patentowe WO2010064889A1).

Z kolei biofungicyd zawierający nowy szczep *T. viride* wraz z tłuszczami i enzymami sprzyjającymi wzrostowi tych szczepów, okazał się skuteczny w zwalczaniu chorób roślin przenoszonych przez glebę, takich jak czerwona zgnilizna oraz zgnilizna korzeni, łodygi i kłącza (Patel C.S., 2011. Composition and method of preparation of biofungicide based on *Trichoderma viride* for controlling soil borne diseases. Zgłoszenie patentowe WO2011099027A1).

Inny szczep *T. viride* skutecznie zastosowano do zwalczania gnicia korzeni roślin strączkowych (Dianlin Y., Wide C.S., Weiming X., River H.F.S.R., Gang L., 2012. Method for controlling legume root rot by using *Trichoderma viride*. Zgłoszenie patentowe CN102823467A). A nowy szczep *T. asperellum* PD-19 okazał się efektywny w hamowaniu rozwoju fytoftorazy ogórka (Root T.P., Zaide J., Flowers Y.Y., Hui L., Jingjing L., Seung-ho L., 2014. A ratchet and *Trichoderma* spores and biological agents used in the prevention of blight of cucumber. Patent CN103289902B).

Udowodniono także, że *T. asperellum* GY20 w postaci pasty jest skuteczny w zwalczaniu *F. oxysporum* (Li C., Weiwei Z., Meadville T.P.O., Qiqing Z., 2014. Alkaloid compound from *Trichoderma citrinoviride* and application thereof. Zgłoszenie patentowe CN104211630A; Li N., Zhang H., Luo Z., Li H., 2014 *Trichoderma asperellum* strain gy20 and paste preparation for preventing and treating *Fusarium oxysporum* schl. f. sp. *fragariae*. Zgłoszenie patentowe WO2014089951A1).

Wykazano także, że szczep SH2303 *T. harzianum* był w stanie kontrolować więdnienie roślin powodowane przez *Fusarium* i przyczyniał się do poprawy jakości gleby (New Z., Weidong T., Lijuan Z., Wei G., Jie C., 2015. *Formulation and preparation process for Hartz Trichoderma inoculant carrier. Patent CN104222075B*), podczas gdy *T. asperellum* 04-22 wykazał działanie mykopasożytnicze w stosunku do *Phytophthora ramorum* (Widmer T.L., Samuels G.J., 2015. *Trichoderma asperellum to remediate Phytophthora ramorum-infested soil. Zgłoszenie patentowe WO2015026712A1*; Widmer T.L., Samuels G.J., 2016) *Trichoderma asperellum to remediate Phytophthora ramorum-infested soil. Patent US9320283B2*).

Z kolei do ochrony sadów jabłoniowych przed *Fusarium* zaproponowano preparat zawierający izolat *T. asperellum* (Kun L.L., Shaojun D., Complex D.D., Meijuan X., 2016. *Trichoderma reesei CstrxR1, and building method and application thereof. Zgłoszenie patentowe CN105647821A*; Kun Y., Shijie Z., Steel E.B., Side-Star, Meng L., Xiaobing C., 2017. *One kind of Trichoderma and its Application aculeatus. Zgłoszenie patentowe CN106754426A*).

T. atroviride to szczep TF280, który okazał się skuteczny w ochronie pszenicy przed zakażeniem chorobami roślin powodowanymi przez *F. oxysporum* i *R. cerealis* (Jinfeng I., Nan O.W., Wenfeng X., Li Z.O., Ju L., Printing D.T., Zhi-Wide M., 2017. *Antagonistic Trichoderma for promoting the growth of crops and its application. Zgłoszenie patentowe CN107034146A*).

Konidia szczepu *T. virens* G1-3 w kompozycji z pożytecznymi bakteriami *B. amyloliquefaciens* TJ1000 lub 1BE, wykazały natomiast właściwości antagonistyczne wobec *Pythium*, *Phytophthora*, *Penicillium* i *Fusarium* w uprawie kukurydzy, pomidorów, słonecznika, pszenicy, papryki czy soi (Johnson T.D., 2017. *Increasing plant yield with bacterial/fungal combinations. Patent US9538765B2*).

Dostępne są również doniesienia literaturowe o właściwościach antagonistycznych *Trichoderma* spp. w stosunku do tych patogenów (De la Cruz-Quiroz R., Roussos S., Rodríguez-Herrera R., Hernandez-Castillo D., Aguilar C.N., 2018. *Growth inhibition of Colletotrichum gloeosporioides and Phytophthora capsici by native Mexican Trichoderma strains. Karbala International Journal of Modern Science, 4, 237-43.*; Bae S.J., Mohanta T.K., Chung J.Y., Ryu M., Park G., Shim S., Hong S.B., Seo H., Bae D.W., Bae I., Kim J.J., Bae H., 2016. *Trichoderma metabolites as biological control agents against Phytophthora pathogens'. Biological Control, 92, 128-38.*).

Najczęściej patenty dotyczą biopreparatów wykorzystywanych do biokontroli *Pythium*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Sclerotium*. W przedstawionej literaturze przedmiotu do opracowania biopreparatów wykorzystywane są różne matryce/nośniki dla

zarodników grzybów z rodzaju *Trichoderma*, które są zazwyczaj jednocześnie podłożem hodowlanym, do pozyskania odpowiednio wysokiej ich biomasy.

Jednakże, brak jest rozwiązań opartych o jednoczesne zastosowanie wielu różnych szczepów *Trichoderma* spp., poprawiających udostępnianie roślinom składników pokarmowych i jakość gleby, poprzez przyspieszenie rozkładu materii organicznej w wyniku aktywnej produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych, przy jednoczesnej kontroli fitopatogenów należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora* na plantacjach malin, poprzez zdolności antagonistyczne zastosowanych szczepów *Trichoderma* spp. oraz dodatków poprawiających ich konkurencyjność pokarmową względem fitopatogenów.

Brak jest też doniesień literaturowych i patentów odnośnie suplementacji biopreparatów dodatkami należącymi do organicznych związków z grupy cukroli (adonitol, arabitol, erytrytol, mannitol i sorbitol) czy też związków organicznych z grupy nukleozydów (adenozyna), w celu poprawy konkurencyjności pokarmowej izolatów *Trichoderma* spp. względem wybranych patogenów malin.

Celem wynalazku było opracowanie biopreparatu, zawierającego szczepy *Trichoderma* spp., które się wzajemnie nie wykluczają, o silnych zdolnościach hydrolitycznych oraz o właściwościach antagonistycznych w stosunku do patogenów grzybowych *Botrytis* sp., *Verticillium* sp. *Colletotrichum* sp. i *Phytophthora* sp., oraz zawierającego substraty poprawiające konkurencyjność pokarmową szczepów *Trichoderma* spp. w stosunku do roślinnych patogenów grzybowych.

Cel ten osiągnięto opracowując sposób otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin, kompozycję biopreparatu oraz istotne do wytworzenia biopreparatu: sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie oraz kompozycję podłoża namnażającego dla grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Dzięki przeprowadzonym badaniom uzyskano unikalny, zoptymalizowany skład podłoża hodowlanego, nośników i innych suplementów, które decydują zarówno o właściwościach, jak i oryginalności opracowanego biopreparatu, stanowiąc jednocześnie zastrzeżenia patentowe.

Istotą sposobu otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum* i *Phytophthora*, oraz o właściwościach hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie, z zastosowaniem szczepów grzyba z rodzaju *Trichoderma*, jest to, że stosuje się:

- 11 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczających swojego działania następujących szczepów *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji, hodowanych na nośniku z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu;

- zmielone składniki nośnika;

- dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: adenozyiny, adonitolu, arabitolu, erytrytolu, mannitolu i sorbitolu albo ich dowolną mieszaninę.

Korzystnie, sposób otrzymywania biopreparatu obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów grzyba z rodzaju *Trichoderma*, polegający na ich hodowli na podłożu namnażającym z nośnikami, źródłem węgla i azotu, związkami mineralnymi oraz dodatkami suplementującymi, przy czym szczepy grzybów namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu PDA, w temperaturze około 26°C, przez 7-14 dni, a następnie w hodowli wytrząsanej, na podłożu PDB, w temperaturze ok. 26°C, przez 7-14 dni, korzystnie 14 dni i przy 150 rpm. Kolejno, tak przygotowanym inokulum zaszczenia się podłoże namnażające z otrąb pszennych, korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu i prowadzi hodowlę stacjonarną typu SSF - Solid State Fermentation w warunkach tlenowych, w temperaturze 25-26°C, w czasie 2-4 tygodni w kolbach, autoklawowalnych workach lub tacach, poddając mieszanemu co 2-3 dni.

Korzystnie, podłoże namnażające zawiera w 260 g jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g ±5% i sacharozę 10 g ±5%, a jako źródło azotu: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w ilości 1,5 g ±5%.

Korzystnie, podłoże namnażające zawiera: 70 g ±5% otrąb pszennych, korzystnie durum oraz 140 g ±5% suszonych wyłoków jabłkowych oraz 50 g ±5% koncentratu białek serwatkowych oraz 100 ml ±5% roztworu mikroelementów: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mg/l wody), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (80 mg/l wody), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (70 mg/l wody) oraz 150 ml ±5% wodnego roztworu zawierającego 1,5 g (±5%) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 g (±5%) glukozy i 10 g (±5%) sacharozy.

Korzystnie, po przerośnięciu podłoża namnażającego przez grzybnię i wytworzeniu zarodników uzyskane hodowle wraz z nośnikami poddaje się suszeniu, a następnie wysuszoną biomasę miele się.

Korzystnie, hodowle wraz z nośnikami suszy się w temperaturze 50-60°C przez 2-5 dni.

Korzystnie, wysuszoną biomasę rozdrabnia się do wielkości cząstek nieprzekraczającej 2 mm.
Korzystnie, stosuje się wysuszoną zmieloną biomasę każdego ze szczepów *Trichoderma* spp. zmieszaną w równym stosunku wagowym.
Korzystnie, stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej w równym stosunku wagowym adenozyne, adonitol, arabitol, erytrytol, mannitol i sorbitol.
Korzystnie, stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu w ilości 0,1-2%, korzystnie 1% końcowej masy biopreparatu.

Istotą biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, oraz właściwościach hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie, zawierający szczepy *Trichoderma* spp.: jest to, że składa się z:

- 11 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczających swojego działania następujących szczepów *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji, hodowanych na nośniku z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu;
- zmielonych składników nośnika;
- dodatku mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: adenozyne, adonitolu, arabitolu, erytrytolu, mannitolu i sorbitolu albo ich dowolną mieszaninę.

Korzystnie, kompozycja mieszanki suplementacyjnej, zawiera w równym stosunku wagowym adenozyne, adonitol, arabitol, erytrytol, mannitol i sorbitol.

Korzystnie, dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu stanowi 0,1-2%, korzystnie 1% końcowej masy biopreparatu.

Korzystnie, nośnik zawiera: 70 g \pm 5% otrąb pszennych, korzystnie durum oraz 140 g \pm 5% suszonych wyłoków jabłkowych oraz 50 g \pm 5% koncentratu białek serwatkowych.

Istota sposobu prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie do naturalizacji ryzosfery roślin malin, w którym grzyby te hoduje się na podłożu namnażającym z nośnikami, źródłem węgla i azotu, związkami mineralnymi oraz

dotatkami suplementującymi, polega na tym, że szczepy grzybów namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu PDA, w temperaturze około 26°C, przez 7-14 dni, a następnie w hodowli wytrząsanej, na podłożu PDB, w temperaturze ok. 26°C, przez 7-14 dni, korzystnie 14 dni i przy 150 rpm. Kolejno, tak przygotowanym inokulum zaszczenia się podłoże namnażające z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu i prowadzi hodowlę stacjonarną typu SSF - Solid State Fermentation w warunkach tlenowych, w temperaturze 25-26°C, w czasie 2-4 tygodni w kolbach, autoklawowalnych workach lub tacach, poddając mieszaniu co 2-3 dni.

Korzystnie, podłoże namnażające zawiera w 260 g jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g ±5% i sacharozę 10 g ±5%, a jako źródło azotu: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w ilości 1,5 g ±5%.

Korzystnie, podłoże namnażające zawiera: 70 g ±5% otrąb pszennych, korzystnie durum oraz 140 g ±5% suszonych wyłoków jabłkowych oraz 50 g ±5% koncentratu białek serwatkowych oraz 100 ml ±5% roztworu mikroelementów: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mg/l wody), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (80 mg/l wody), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (70 mg/l wody) oraz 150 ml ±5% wodnego roztworu zawierającego 1,5 g (±5%) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 g (±5%) glukozy i 10 g (±5%) sacharozy.

Korzystnie, podłoże namnażające zawiera w 260 g jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g ±5% i sacharozę 10 g ±5%, a jako źródło azotu: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w ilości 1,5 g ±5%.

Istotą kompozycji podłoża namnażającego dla grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie do naturalizacji ryzosfery roślin malin jest to, że zawiera: 70 g ±5% otrąb pszennych, korzystnie durum oraz 140 g ±5% suszonych wyłoków jabłkowych oraz 50 g ±5% koncentratu białek serwatkowych oraz 100 ml ±5% roztworu mikroelementów: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mg/l wody), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (80 mg/l wody), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (70 mg/l wody) oraz 150 ml ±5% wodnego roztworu zawierającego 1,5 g (±5%) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 g (±5%) glukozy i 10 g (±5%) sacharozy.

Korzystnie, podłoże namnażające zawiera w 260 g jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g ±5% i sacharozę 10 g ±5%, a jako źródło azotu: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w ilości 1,5 g ±5%.

Zasada działania biopreparatu według wynalazku polega na biostymulacji roślin poprzez naturalizację ryzosfery malin rodzimymi szczepami grzybów z rodzaju *Trichoderma*, wyizolowanymi ze strefy korzeniowej malin dzikorosnących. Szczepy te powodują

przyspieszenie transformacji materii organicznej w glebie i udostępnianie składników pokarmowych roślinom dzięki uzdolnieniom hydrolitycznym 11 szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* wchodzących w skład biopreparatu oraz ich zdolnościom antagonistycznym wobec patogenów roślinnych *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.. Ponadto, wyselekcjonowana na podstawie badań, wprowadzona do biopreparatu mieszanka suplementacyjna zawierająca cukrole zapewnia stymulację rozwoju grzybów z rodzaju *Trichoderma*, nie oddziałując na wymienione fitopatogeny roślinne, co zwiększa konkurencyjność pokarmową pożytecznych grzybów *Trichoderma* spp., wpływając tym samym na szybszy ich wzrost i rozwój oraz zasiedlanie niszy ekologicznej.

Wynalazek uwidoczniiony został w przykładach wykonania na rysunkach gdzie:

Fig. 1 przedstawia biostymulacyjne działanie biopreparatu na rośliny malin w doświadczeniu fitotronowym w warunkach stresu biotycznego wywołanego kontaminacją *Botrytis* sp. (G277/18): a) wariant bez naturalizacji, b) naturalizacja korzeni podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne, c) podlewanie naturalizacyjne;

Fig. 2 przedstawia biostymulacyjne działanie biopreparatu na rośliny malin w doświadczeniu fitotronowym w warunkach stresu biotycznego wywołanego kontaminacją *Phytophthora* sp. (G408/18): a) wariant bez naturalizacji, b) naturalizacja korzeni podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne, c) podlewanie naturalizacyjne;

Fig. 3 przedstawia biostymulacyjne działanie biopreparatu na rośliny malin w doświadczeniu fitotronowym w warunkach stresu biotycznego spowodowanego łączną kontaminacją patogenami *Botrytis* sp. (G277/18), *Colletotrichum* sp. (G172/18), *Phytophthora* sp. (G408/18), *Verticillium* sp. (G296/18): a) wariant bez naturalizacji, b) naturalizacja korzeni podczas sadzenia plus podlewanie naturalizacyjne, c) podlewanie naturalizacyjne;

Fig. 4 przedstawia aktywność celulolityczną w płynie pohodowlanym szczepów *Trichoderma* spp. w różnych warunkach oznaczenia a) pH 4,5 i 50°C, b) pH 7 i 50°C, c) pH 4,5 i 37°C, d) pH 7 i 37°C;

Fig. 5 przedstawia aktywność karboksymetylocelulaz w płynie pohodowlanym szczepów *Trichoderma* spp. w różnych warunkach oznaczenia a) pH 4,5 i 50°C, b) pH 7 i 50°C, c) pH 4,5 i 37°C, d) pH 7 i 37°C;

Fig. 6 przedstawia aktywność β -glukozydazy w płynie pohodowlanym szczepów *Trichoderma* spp.;

Fig. 7 przedstawia aktywność ksylanaz w płynie pohodowlanym szczepów *Trichoderma* spp.;

Fig. 8 przedstawia aktywność amylaz w płynie pohodowlanym szczepów *Trichoderma* spp.;

Fig. 9 przedstawia aktywność proteaz w płynie pohodowlanym szczepów *Trichoderma* spp.;

Fig. 10 przedstawia antagonizm izolatów *Trichoderma* spp. biopreparatu wobec patogenów *Botrytis* sp.;

Fig. 11 przedstawia antagonizm izolatów *Trichoderma* spp. biopreparatu wobec patogenów *Colletotrichum* sp.;

Fig. 12 przedstawia antagonizm izolatów *Trichoderma* spp. biopreparatu wobec patogenów *Phytophthora* sp.;

Fig. 13 przedstawia antagonizm izolatów *Trichoderma* spp. biopreparatu wobec patogenów *Verticillium* sp.;

Fig. 14 przedstawia stopień zużycia substratów przez grzyby (A 490 nm) i przyrost biomasy grzybów (A 750 nm) dla szczepów *Trichoderma* spp. i izolatów roślinnych patogenów grzybowych dla wybranych grup związków a) cukroli, b) nukleozydów; ($A > 0,2$, $n = 3$);

Fig. 15 przedstawia kultury szczepów wchodzących w skład preparatu, obserwowane na płytkach Petriego z pożywką PDA;

Fig. 16 przedstawia kultury szczepów wchodzących w skład preparatu, w pożywce PDB;

Fig. 17 przedstawia profile metaboliczne szczepów grzybów będących składnikami biopreparatu uzyskane przy testowaniu węglowodanów;

Fig. 18 przedstawia profile metaboliczne szczepów grzybów będących składnikami biopreparatu uzyskane przy testowaniu aminokwasów;

Fig. 19 przedstawia profile metaboliczne szczepów grzybów będących składnikami biopreparatu uzyskane przy testowaniu kwasów karboksylowych;

Fig. 20 przedstawia profile metaboliczne szczepów grzybów będących składnikami biopreparatu uzyskane przy testowaniu amin i amidów;

Fig. 21 przedstawia profile metaboliczne szczepów grzybów będących składnikami biopreparatu uzyskane przy testowaniu polimerów;

Fig. 22 przedstawia profile metaboliczne szczepów grzybów będących składnikami biopreparatu uzyskane przy testowaniu pozostałych związków;

Przykład 1. Kompozycja podłoża namnażającego i sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie do naturalizacji ryzosfery roślin malin

Szczepy *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji, wykorzystane do opracowania biopreparatu są izolatami środowiskowymi i zostały wyselekcjonowane w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie.

Dla ich hodowli przygotowano podłoże namnażające zawierające: 70 g $\pm 5\%$ otrąb pszennych, korzystnie durum oraz 140 g $\pm 5\%$ suszonych wytlóków jabłkowych oraz 50 g $\pm 5\%$ koncentratu białek serwatkowych oraz 100 ml $\pm 5\%$ roztworu mikroelementów: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mg/l wody), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (80 mg/l wody), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (70 mg/l wody) oraz 150 ml

±5% wodnego roztworu zawierającego 1,5 g (±5%) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 g (±5%) glukozy i 10 g (±5%) sacharozy. Otręby pszenne posiadały rozdrobnienie cząstek o wielkości 4x4 mm i przynajmniej 20% cząstek posiadało rozdrobnienie o wielkości 1x1 mm oraz wilgotność w przedziale 10-15%. Suszone wyłoki jabłkowe posiadały granulację w zakresie 1-10 mm i wilgotność w granicach 7-10%. Koncentrat białek serwatkowych zawierał następujący skład aminokwasowy: od 1,5% do 3% tyrozyny, fenyloalaniny, histydyny, glicyny, argininy; od 4% do 5% waliny, seryny, proliny, izoleucyny, alaniny; oraz >5% treoniny, lizyny, leucyny, kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego.

Tak przygotowane podłoże namnażające zawierało w 260 g jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g ±5% i sacharozę 10 g ±5%, a jako źródło azotu: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w ilości 1,5 g ±5%.

Inokulum do zaszczepienia podłoża namnażającego uzyskano w wyniku hodowli stacjonarnej grzybów na podłożu PDA – Potato Dextrose Agar, 26°C, przez 14 dni, a następnie hodowli wytrząsanej na podłożu PDB – Potato Dextrose Broth, 26°C, 14 dni, 150 rpm, zaszczepionej 10% w stosunku do ilości podłoża płynnego (15 ml inokulum/150 ml podłoża) inokulum grzybowego, wyskalowanego do 70% transmitancji, przygotowanego na jałowej wodzie. Hodowlę wytrząsaną homogenizowano i wprowadzono w całości do suchego, opisanego powyżej podłoża namnażającego typu SSF- Solid State Fermentation, jako zaszczep biomasy grzybowej. Alternatywnie zastosowano inokulum w postaci 50 ml wyskalowanej zawiesiny zarodników poszczególnych szczepów *Trichoderma* spp. (70% transmitancji na jałowej wodzie) na 260 g podłoża namnażającego, przy czym stosowano wówczas wydłużony do 4 tygodni czas hodowli grzybów w podłożu namnażającym. Hodowlę stacjonarną prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 26°C, w czasie 4 tygodni, w kolbach, poddając mieszaniną co 2-3 dni.

Przykład 2. Sposób otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin

Do otrzymania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, oraz o właściwościach hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie, zastosowano 11 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczających swojego działania następujących szczepów *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji,

hodowanych na nośniku z otrąb pszennych durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu, jak przedstawiono w Przykładzie 1. Po przerośnięciu podłoża namnażającego przez grzybnię i wytworzeniu zarodników uzyskane hodowle wraz z nośnikami suszono w temperaturze około 55°C przez 4 dni, a następnie wysuszoną biomasę zmielono do wielkości cząstek nieprzekraczającej 2 mm. Zastosowano wysuszoną zmieloną biomasę każdego ze szczepów *Trichoderma* spp. zmieszaną w równym stosunku wagowym. Dla zwiększenia konkurencyjności pokarmowej szczepów *Trichoderma* spp., poprzez sprzyjanie rozwojowi tych mikroorganizmów w glebie, zastosowano dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej w równym stosunku wagowym adenozyne, adonitol, arabitol, erytrytol, mannitol i sorbitol, który dodano do biopreparatu w ilości 1% końcowej masy biopreparatu.

Przykład 3. Biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin

Otrzymany sposobem opisanym w Przykładzie 2. biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, oraz właściwościach hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie, zawierający szczepy *Trichoderma* spp. jest to, że składa się z:

- 11 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczających swojego działania następujących szczepów *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji, hodowanych na nośniku z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu;
- zmielonych składników nośnika o składzie: 70 g \pm 5% otrąb pszennych, korzystnie durum oraz 140 g \pm 5% suszonych wyłoków jabłkowych oraz 50 g \pm 5% koncentratu białek serwatkowych;
- dodatku mieszanki suplementacyjnej zawierającej w równym stosunku wagowym adenozyne, adonitol, arabitol, erytrytol, mannitol i sorbitol, stanowiącego 1% końcowej masy biopreparatu.

Do biopreparatu, w celu kształtowania jego właściwości, można także dodawać znane i stosowane w tym celu środki, takie jak konserwanty, środki poprawiające przyczepność czy inne substancje pomocnicze.

Przykład 4. Działanie biostymulacyjne biopreparatu – stymulacja wzrostu roślin

W celu określenia biostymulacyjnego działania biopreparatu na rośliny malin przeprowadzono doświadczenie fitotronowe w warunkach stresu biotycznego wywołanego kontaminacją wybranymi patogenami grzybowymi. Doświadczenie przeprowadzono w ciągu 2 miesięcy, w kontrolowanych warunkach temperatury 20-22°C, przy fotoperiodzie 16:8 (16 godzin światła i 8 godzin ciemności). W doświadczeniu zastosowano dwa warianty aplikacji biopreparatu do naturalizacji ryzosfery malin poprzez stosowanie bezpośrednie na korzenie roślin podczas sadzenia oraz poprzez podlewanie naturalizacyjne roślin rosnących w wazonach. W przykładzie wykonania biopreparat do naturalizacji ryzosfery malin zastosowano w dawce odpowiadającej następującej wielkości populacji grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp. wchodzących w skład formułacji: 10^9 jtk na korzeń rośliny oraz 10^6 jtk na 1 cm² powierzchni gleby, odpowiednio dla bezpośredniej aplikacji na korzeń rośliny oraz w przypadku podlewania naturalizacyjnego roślin.

Aplikacja biopreparatu w obu wariantach powodowała istotną stymulację wzrostu roślin, pełniąc jednocześnie funkcję ochronną w warunkach stresu biotycznego wywołanego przez zakażenie roślinnymi patogenami grzybowymi *Botrytis* sp. (Fig. 1.), *Phytophthora* sp. (Fig. 2), oraz łączną kontaminację izolatami *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp. i *Verticillium* sp. (Fig. 3). Zastosowanie preparatu istotnie zmniejszyło stopień porażenia roślin malin przez zastosowane patogeny. Rośliny traktowane preparatem do naturalizacji wykazywały się lepszą kondycją i witalnością, w porównaniu do kontroli, w której nie stosowano biopreparatu do naturalizacji (Fig. 1-3). Efekt ten zaobserwowano w obu wariantach z zastosowaniem biopreparatu do naturalizacji, zarówno po bezpośredniej naturalizacji ryzosfery malin połączonej z podlewaniem naturalizacyjnym, jak też w wariacie obejmującym tylko podlewanie naturalizacyjne.

Zaletą preparatu jest jego duża uniwersalność, potwierdzona tym, że jest on skuteczny wobec wielu patogenów występujących na plantacjach owoców miękkich, a także fakt, że jest on oparty o naturalne składniki z uwzględnieniem szerokiej gamy rodzimych szczepów *Trichoderma* spp.,

wyodrębnionych z naturalnych siedlisk malin dzikorosnących, a tym samym przyjazny dla środowiska. Preparat dedykowany jest do naturalizacji i biostymulacji roślin maliny, jednakże może być stosowany również w innych uprawach roślin z grupy owoców miękkich.

Przykład 5. Uzdolnienia hydrolityczne szczepów *Trichoderma* spp.

W celu wykazania uzdolnień hydrolitycznych (aktywności celulolitycznej, karboksymetylocelulaz, β -glukozydazy, ksylanaz, amylolitycznej, proteolitycznej) szczepów *Trichoderma* spp. przeprowadzono badania w płynie pohodowlanym po 4-dniowej hodowli grzybów, w podłożu oraz warunkach opisanych w publikacji (Oszust K., Pawlik A., Janusz G., Ziemiński K., Cyran M., Siczek A., Gryta A., Bilińska-Wielgus N., Frąc M., 2017. *Characterization and influence of a multi-enzymatic biopreparation for biogas yield enhancement. Bioresources*, 12, 3, 6187-6206.).

Aktywność celulolityczną określono na podstawie niespecyficznej aktywności celulolitycznej (celulaz scukrzających) (Filter Paper Unit - FPU) (Mandels M., Andreotti R., Roche C., 1976. *Measurement of saccharifying cellulase'. Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6, 21-33.). Za jednostkę aktywności FPU przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty w temperaturze 50°C lub 37°C uwalnia 1 μ mol glukozy (Janas P., Targoński Z., 2014. *Effect of temperature on the production of cellulases, xylanases i lytic enzymes by selected Trichoderma reesei mutants. Acta Mycologica*, 30, 255-64.). Analizy wykonywano w trzech powtórzeniach laboratoryjnych.

Zasada metody oznaczania aktywności karboksymetylocelulaz (CMCaz) (EC 3.2.1.21) (Hankin L., Anagnostakis S.L., 1977. *Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms. Microbiology*, 98, 109-15.) polega na uwolnieniu i oznaczeniu związków redukujących z soli sodowej karboksymetylocelulozy (CMC-Na). Aktywność enzymatyczną karboksymetylocelulaz wyrażono w μ molach związków redukujących (glukozy) uwalnianych w ciągu 1 minuty przez 1 cm³ roztworu biopreparatu. Aktywność β -glukozydazy (EC 3.2.1.21) oznaczono z dodatkiem substratu p-nitrofenylo- β -D-glukozydu (pNPG), jako substratu (Deschamps F., Huet M.C., 1984. *β -Glucosidase production in agitated solid fermentation, study of its properties. Biotechnology Letters*, 6, 451-56.). Za jednostkę aktywności β -glukozydazy uznano taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty w temperaturze 37°C uwalnia 1 μ mol PNP.

Pomiar aktywności ksylanaz (EC 3.2.1.8) wykonano metodą polegającą na określeniu ilości uwolnionych z ksylanu związków redukujących (Miller G.L., 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry*, 31, 426-428.). Aktywność enzymatyczną ksylanaz wyrażono w μmol ach związków redukujących (ksylozy) uwalnianych w ciągu 1 minuty przez 1 cm^3 roztworu biopreparatu. Aktywność amylaz (EC 3.2.1) oznaczono metodą (Bernfeld P., 1955. *Amylases, α i β . Methods in enzymology*, 1, 149-58.) ze skrobią jako substratem. Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty w temperaturze 30°C uwalnia grupy redukujące w ilości równoważnej 1 μmol glukozy.

Aktywność proteaz (EC 3.4) oznaczono metodą (Anson M.L., 1938. *The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. The Journal of General Physiology*, 22, 79-89.), z kazeiną jako substratem. Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty w temperaturze 37°C uwalnia 1 μmol tyrozyny.

Dziewięć spośród badanych szczepów *Trichoderma* spp. wykazało aktywność celulolityczną w pH 4,5 i temperaturze 50°C (Fig. 4a) oraz pH 7 i 50°C (Fig. 4b), pięć w pH 4,5 i temperaturze 37°C (Fig. 4c) oraz dziewięć w pH 7 i temperaturze 37°C (Fig. 4d). Ponadto, pięć szczepów wykazało specyficzną aktywność celulolityczną (CMCaz) w pH 4,5 i temperaturze 50°C (Fig. 5a). Cztery szczepy charakteryzowały się tą aktywnością w pH 7 i temperaturze 50°C (Rys. 5b) oraz w pH 4,5 i temperaturze 37°C (Fig. 5c) oraz dziewięć w pH 7 i temperaturze 37°C (Fig. 5d). W zależności od warunków oznaczenia były to inne szczepy. Wszystkie badane szczepy *Trichoderma* spp. wykazały aktywność β -glukozydazy, przy czym najwyższą aktywnością tego enzymu wyróżniał się szczep G70/18 o sekwencji nr 7 (Fig. 6). Spośród szczepów *Trichoderma* spp. wykorzystanych do opracowania biopreparatu, dziesięć wykazało aktywność ksylanaz (G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach o nr odpowiednio: 1,2,3,4,5,7,8,9,10,11), z czego aż cztery wykazało wysoką aktywność ksylanolityczną (G65/18, G67/18, G70/18, G109/18, o sekwencjach o nr odpowiednio: 4,5,7,9) (Fig. 7). Przeprowadzone badania wykazały, że dziesięć szczepów *Trichoderma* spp. wchodzących w skład biopreparatu cechowało się aktywnością amylaz, przy czym szczep G70/18 o sekwencji nr 7 posiadał najwyższe uzdolnienia amylolityczne (Fig. 8). Ponadto, dla ośmiu szczepów *Trichoderma* spp. będących składnikami biopreparatu wykazano aktywność proteolityczną, która była najwyższa w przypadku szczepów G70/18 i G 64/18 o sekwencjach o nr odpowiednio: 7 i 3 (Fig. 9).

W związku z powyższym, wyniki wskazują, że opracowana kompozycja biopreparatu, zawierająca szczepy grzybów *Trichoderma* spp. wykazujące różnorodną aktywność hydrolityczną, zapewnia transformacje materii organicznej, wprowadzanej i występującej w glebie, a tym samym stanowi ogniwo w udostępnianiu składników pokarmowych roślinom, stymulując ich wzrost i rozwój. Ponadto, zróżnicowana aktywność enzymatyczna w zależności od warunków temperatury i pH, sprawia, że biopreparat zawiera grzyby aktywne i zdolne do przeprowadzenia procesów rozkładu materii organicznej, w tym procesu celulozy, w szerokim spektrum warunków środowiskowych, co stanowi jego zaletę i możliwość zastosowania w uprawach prowadzonych na glebach różniących się odczynem, od gleb kwaśnych po środowiska neutralne.

Przykład 6. Antagonizm *Trichoderma* spp. wobec roślinnych patogenów grzybowych

Właściwości antagonistyczne szczepów *Trichoderma* spp. będących składnikami biopreparatu, sprawdzono względem reprezentatywnej próby izolatów patogenów, wyizolowanych z polskich plantacji owoców miękkich w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki PAN. W badaniach wykorzystano dwa szczepy *Colletotrichum* sp. (G166/18, G172/18) izolowane z zakażonych owoców truskawki, trzy szczepy *Botrytis* sp. (G275/18, G276/18, G277/18), trzy szczepy *Verticillium* sp. (G293/18, G296/18, G297/18) oraz jeden szczep *Phytophthora* sp. (G408/18) wyizolowane z zakażonych korzeni roślin truskawki.

Antagonizm *Trichoderma* spp. względem izolatu danego patogenu zbadano parami na płytkach Petriego o średnicy 90 mm, na podłożu agarowym z wyciągiem ziemniaczanym (PDA – Potato Dextrose Agar). Całą powierzchnię podłoża na płytce inokulowano 100 µl zawiesiny zarodników danego grzyba fitopatogenicznego, o transmitancji 70%, a na środek płytki wyłożono krążek podłoża PDA z hodowlą danego szczepu *Trichoderma* spp.. Strefy zahamowania wzrostu patogenu lub/i zahamowania zarodnikowania grzyba fitopatogenicznego mierzono po 12 dniach hodowli w temperaturze 26°C.

Wszystkie z badanych szczepów *Trichoderma* sp. wykazały antagonistyczne działanie w stosunku do badanych patogenów w stopniu dobrym lub bardzo dobrym, hamując ich rozwój lub/i zarodnikowanie (Fig. 10-13).

Przykład 7. Konkurencyjność pokarmowa *Trichoderma* spp. w stosunku do roślinnych patogenów grzybowych

W celu wyboru odpowiednich suplementów do biopreparatu przeprowadzono badania dotyczące konkurencyjności pokarmowej między wyselekcjonowanymi pożytecznymi szczepami *Trichoderma* spp., izolowanymi z ryzosfery malin dzikorosnących, a izolatami poszczególnych roślinnych patogenów grzybowych (*Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp.), atakującymi plantacje owoców miękkich, biorąc pod uwagę stopień zużycia związków węglowych oraz intensywność wzrostu na 95 substratach zlokalizowanych na płytkach Biolog® FF MicroPlates (<https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/>). Procedurę zaszczerpienia płytek FF opłaszczonych substratami przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta w powtórzeniach (trzy osobne płytki dla każdego izolatu). Po homogenizacji zawiesiny zarodników w płynie do inokulacji (FF-IF, Biolog®) ustalono transmitancję tej zawiesiny do 75% przy użyciu mętnościomierza (Biolog®). Do każdej studzienki na płytce dodano objętość 100 µl zawiesiny komórek grzyba. Zaszczepione mikroplanki inkubowano w 26°C przez 240 godzin (10 dni).

Gęstość optyczną (OD) przy różnych długościach fali: 490 nm, opisującą zużycie substratu, tj. katabolizm substratu, czyli poziom oddychania danego izolatu, oraz 750 nm odpowiadającą zmętnieniu, tj. wzrostowi, czyli przyrostowi biomasy danego grzyba, określano w odstępach 24-godzinnych, w ciągu 240 godzin inkubacji za pomocą mikrostacji (Biolog®). Do interpretacji wybrano wyniki ze 192 godziny hodowli jako najbardziej reprezentatywne.

Wykazano bardzo dobry wzrost izolatów *Trichoderma* spp. w obecności takich substratów jak adonitol, D-arabitol, i-erytrytol, D-mannitol i D-sorbitol (Fig. 14a). Jednocześnie dla tych substratów nie zanotowano odpowiedzi badanych izolatów roślinnych patogenów grzybowych *Colletotrichum* sp., *Botrytis* sp., *Verticillium* sp. i *Phytophthora* sp. (Fig. 14a), co daje przewagę konkurencyjną pożytecznym grzybom *Trichoderma* spp. w stosunku do patogenów, w obecności tych substratów. Wykazano również, że adenozyne wzmacniają rozwój *Trichoderma* spp., przy czym jest źródłem niewykorzystywanym przez grzyby z rodzaju *Colletotrichum* (Fig. 14b), co sprawia, że dodatek adenozyne do biopreparatów zawierających szczepy *Trichoderma* spp. przynosi pozytywne działanie, szczególnie w środowiskach skażonych fitopatogenami z rodzaju *Colletotrichum*. Wyniki przeprowadzonych badań stanowiły podstawę do wytypowania wymienionych substratów jako dodatków do końcowej

formulacji biopreparatu, które poprawiają konkurencyjność *Trichoderma* spp. w zasiedlaniu danej niszy ekologicznej.

Przykład 8. Identyfikacja i charakterystyka szczepów *Trichoderma* spp. będących składnikami biopreparatu

Szczepy *Trichoderma* spp. (G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11) wykorzystane do opracowania biopreparatu są izolatami środowiskowymi, wyselekcjonowanymi w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie i znajdują się w kolekcji tego Laboratorium. Zawarte w biopreparacie szczepy grzybów zostały wyizolowane z dzikorosnących malin, przy czym G61/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18 i G109/18 o sekwencjach o nr odpowiednio 1,4,5,6,7,9 wyodrębniono z rysosfery, obejmującej glebę przylegającą do korzeni metodą seryjnych rozcieńczeń dziesiętnych, G379/18 i G398/18 o sekwencjach o nr odpowiednio 10,11 wyizolowano z powierzchni korzeni (ryzolpany), natomiast szczepy G63/18, G64/18, i G78/18 o sekwencjach o nr odpowiednio 2,3,8 pochodziły z wnętrza korzeni roślin malin. Wszystkie szczepy zostały wyizolowane poprzez wykładanie części korzeni lub posiewy powierzchniowe rozcieńczeń na podłoże ziemniaczane (PDA) i hodowlę w temperaturze 26°C w ciągu 7 dni, a następnie wielokrotne pasażowanie pojedynczych izolatów na podłoże PDA w celu uzyskania czystych kultur grzybów.

Składające się na biopreparat szczepy grzybów zidentyfikowano na podstawie badań morfologicznych, obserwując struktury typowe dla grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp., w tym trzonki konidialne z prostopadłymi rozgałęzieniami zakończonymi bulwkowatymi komórkami konidiotwórczymi, na których obserwowane były skupiska zlepionych w główki konidiów. Kultury szczepów wchodzących w skład preparatu, obserwowane na płytkach Petriego z pożywką PDA, charakteryzują się typowym zielonym wzrostem z zarodnikami, a młodsze białą grzybnią (Fig. 15), natomiast hodowle w pożywce PDB tworzą zbitą, białą, żółtą lub zieloną grzybnię w formie kuleczek lub kłaczków (Fig. 16).

Ponadto, na podstawie wyników analiz molekularnych, grzyby G63/18, G64/18, G69/18, G379/18 i G398/18 o sekwencjach o nr odpowiednio 2,3,6,10,11 zidentyfikowano w oparciu o

sekwencjonowanie fragmentu D2 kodującego dużą podjednostkę rybosomu (LSU) rDNA, a przynależność szczepów G61/18, G65/18, G67/18, G70/18, G78/18 oraz G109/18 o sekwencjach o nr odpowiednio 1,4,5,7,8,9, do rodzaju *Trichoderma* potwierdzono poprzez sekwencjonowanie regionu DNA obejmującego wewnętrzne sekwencje transkrybowane ITS. W wyniku analiz genetycznych uzyskano sekwencje, charakteryzujące testowane szczepy grzybów będące komponentami biopreparatu, przedstawione na załączonej liście sekwencji.

Wchodzące w skład preparatu szczepy grzybów poddano szczegółowym analizom fizjologicznym i biochemicznym, określając zdolności do wykorzystania (utleniania) 95 różnych substratów węglowych oraz stopień wzrostu na tych substratach, mierzony przyrostem biomasy grzybów. Profile metaboliczne szczepów grzybów będących składnikami biopreparatu (G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11), zostały przedstawione na rysunkach obejmujących poszczególne testowane grupy związków: węglowodany (Fig. 17), aminokwasy (Fig. 18), kwasy karboksylowe (Fig. 19), aminy i amidy (Fig. 20), polimery (Fig. 21) oraz pozostałe (Fig. 22).

ZASTRZEŻENIA PATENTOWE

1. Sposób otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, oraz o właściwościach hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie, z zastosowaniem szczepów grzyba z rodzaju *Trichoderma*, **znamienny tym**, że stosuje się:

- 11 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczających swojego działania następujących szczepów *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji, hodowanych na nośniku z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu;

- zmielone składniki nośnika;

- dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: adenozyiny, adonitolu, arabitolu, erytrytolu, mannitolu i sorbitolu albo ich dowolną mieszaninę.

2. Sposób otrzymywania biopreparatu wg. zastrz. 1, **znamienny tym**, że obejmuje sposób prowadzenia hodowli szczepów grzyba z rodzaju *Trichoderma*, polegający na ich hodowli na podłożu namnażającym z nośnikami, źródłem węgla i azotu, związkami mineralnymi oraz dodatkami suplementującymi, przy czym szczepy grzybów namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu PDA, w temperaturze około 26°C, przez 7-14 dni, a następnie w hodowli wytrząsanej, na podłożu PDB, w temperaturze ok. 26°C, przez 7-14 dni, korzystnie 14 dni i przy 150 rpm, a następnie tak przygotowanym inokulum zaszczepia się podłoże namnażające z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu i prowadzi hodowlę stacjonarną typu SSF - Solid State Fermentation w warunkach tlenowych, w temperaturze 25-26°C, w czasie 2-4 tygodni w kolbach, autoklawowalnych workach lub tacach, poddając mieszaniu co 2-3 dni.

3. Sposób otrzymywania biopreparatu wg. zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że podłoże namnażające zawiera w 260 g jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g $\pm 5\%$ i sacharozę 10 g $\pm 5\%$, a jako źródło azotu: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w ilości 1,5 g $\pm 5\%$.
4. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że podłoże namnażające zawiera
 - 70 g $\pm 5\%$ otrąb pszennych korzystnie durum;
 - 140 g $\pm 5\%$ suszonych wyłoków jabłkowych;
 - 50 g $\pm 5\%$ koncentratu białek serwatkowych;
 - 100 ml $\pm 5\%$ roztworu mikroelementów: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mg/l wody), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (80 mg/l wody), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (70 mg/l wody);
 - 150 ml $\pm 5\%$ wodnego roztworu zawierającego 1,5 g ($\pm 5\%$) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 g ($\pm 5\%$) glukozy oraz 10 g ($\pm 5\%$) sacharozy.
5. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz., **znamienny tym**, że po przerośnięciu podłoża namnażającego przez grzybnię i wytworzeniu zarodników uzyskane hodowle wraz z nośnikami poddaje się suszeniu, a następnie wysuszoną biomasę miele się.
6. Sposób otrzymywania biopreparatu według zastrz. 5, **znamienny tym**, że hodowle wraz z nośnikami suszy się w temperaturze 50-60°C przez 2-5 dni.
7. Sposób otrzymywania biopreparatu według zastrz. 5 albo 6, **znamienny tym**, że wysuszoną biomasę rozdrabnia się do wielkości cząstek nieprzekraczającej 2 mm.
8. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z zastrz. 5 – 7, **znamienny tym**, że stosuje się wysuszoną zmieloną biomasę każdego ze szczepów *Trichoderma* spp. zmieszaną w równym stosunku wagowym.
9. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz. **znamienny tym**, że stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej w równym stosunku wagowym adenozyne, adonitol, arabitol, erytrytol, mannitol i sorbitol.
10. Sposób otrzymywania biopreparatu według dowolnego z poprzednich zastrz. **znamienny tym**, że stosuje się dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu w ilości 0,1-2%, korzystnie 1% końcowej masy biopreparatu.
11. Biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, oraz właściwościach hydrolitycznych przyspieszających

rozkład materii organicznej w glebie, zawierający szczepy *Trichoderma* spp.: **znamienny tym**, że składa się z:

- 11 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczających swojego działania następujących szczepów *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji, hodowanych na nośniku z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu;
- zmielonych składników nośnika;
- dodatku mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: adenozyne, adonitolu, arabitolu, erytrytolu, mannitolu i sorbitolu albo ich dowolną mieszaninę.

12. Biopreparat według zastrz. 11, **znamienny tym**, że kompozycja mieszanki suplementacyjnej, zawiera w równym stosunku wagowym adenozyne, adonitol, arabitol, erytrytol, mannitol i sorbitol.

13. Biopreparat według zastrz. 11 albo 12, **znamienny tym**, że dodatek mieszanki suplementacyjnej do biopreparatu stanowi 0,1-2%, korzystnie 1% końcowej masy biopreparatu.

14. Biopreparat według dowolnego z zastrz. 11- 13, **znamienny tym**, że nośnik zawiera:

- 70 g \pm 5% otrąb pszennych korzystnie durum;
- 140 g \pm 5% suszonych wyłoków jabłkowych;
- 50 g \pm 5% koncentratu białek serwatkowych.

15. Sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie określonym zastrz. 11- 14, polegający na ich hodowli na podłożu namnażającym z nośnikami, źródłem węgla i azotu, związkami mineralnymi oraz dodatkami suplementującymi, **znamienny tym**, że szczepy grzybów namnaża się wstępnie w hodowli stacjonarnej, na podłożu PDA, w temperaturze około 26°C, przez 7-14 dni, a następnie w hodowli wytrząsanej, na podłożu PDB, w temperaturze ok. 26°C, przez 7-14 dni, korzystnie 14 dni i przy 150 rpm, a następnie tak przygotowanym inokulum zaszczenia się podłoże namnażające z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu i prowadzi hodowlę stacjonarną typu SSF - Solid State Fermentation w warunkach tlenowych, w

temperaturze 25-26°C, w czasie 2-4 tygodni w kolbach, autoklawowalnych workach lub tacach, poddając mieszaniu co 2-3 dni.

16. Sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* według zastrz. 14, **znamienny tym**, że stosuje się podłoże namnażające zawierające:

- 70 g ±5% otrąb pszennych korzystnie durum;
- 140 g ±5% suszonych wyłoków jabłkowych;
- 50 g ±5% koncentratu białek serwatkowych;
- 100 ml ±5% roztworu mikroelementów: FeSO₄ x 7H₂O (250 mg/l wody), MnSO₄ x H₂O (80 mg/l wody), ZnSO₄ x 7H₂O (70 mg/l wody);
- 150 ml ±5% wodnego roztworu zawierającego 1,5 g (±5%) (NH₄)₂HPO₄, 10 g (±5%) glukozy oraz 10 g (±5%) sacharozy.

17. Sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* według dowolnego z zastrz. 15-16, **znamienny tym**, że podłoże namnażające zawiera w 260 g jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g ±5% i sacharozę 10 g ±5%, a jako źródło azotu: (NH₄)₂HPO₄ w ilości 1,5 g ±5%.

18. Kompozycja podłoża namnażającego dla grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie określonym zastrz. 11- 14, **znamienna tym**, że zawiera:

- 70 g ±5% otrąb pszennych korzystnie durum;
- 140 g ±5% suszonych wyłoków jabłkowych;
- 50 g ±5% koncentratu białek serwatkowych;
- 100 ml ±5% roztworu mikroelementów: FeSO₄ x 7H₂O (250 mg/l wody), MnSO₄ x H₂O (80 mg/l wody), ZnSO₄ x 7H₂O (70 mg/l wody)
- 150 ml ±5% wodnego roztworu zawierającego 1,5 g (±5%) (NH₄)₂HPO₄, 10 g (±5%) glukozy oraz 10 g (±5%) sacharozy.

19. Kompozycja podłoża namnażającego według zastrz. 18, **znamienna tym**, że w 260 g zawiera: jako źródło węgla: glukozę w ilości 10 g ±5% i sacharozę 10 g ±5%, a jako źródło azotu: (NH₄)₂HPO₄ w ilości 1,5 g ±5%.

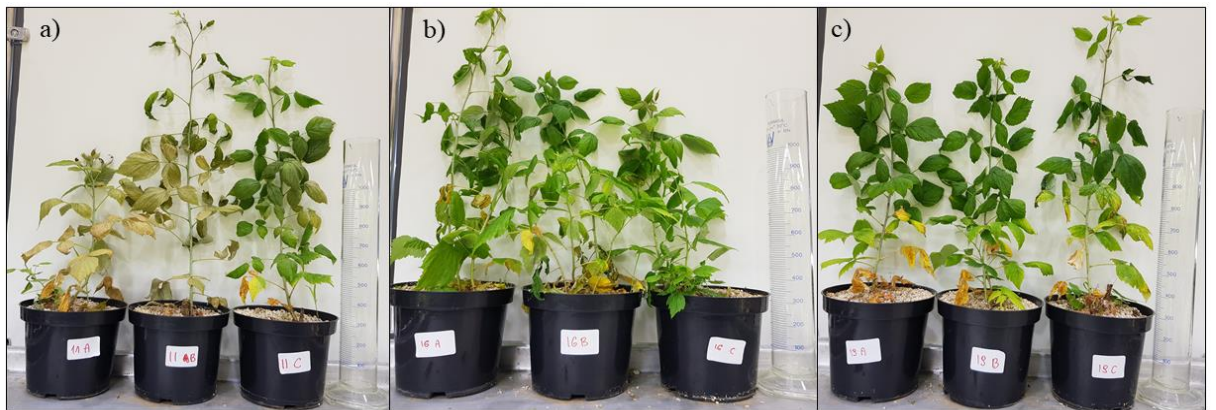


Fig. 1



Fig. 2



Fig .3

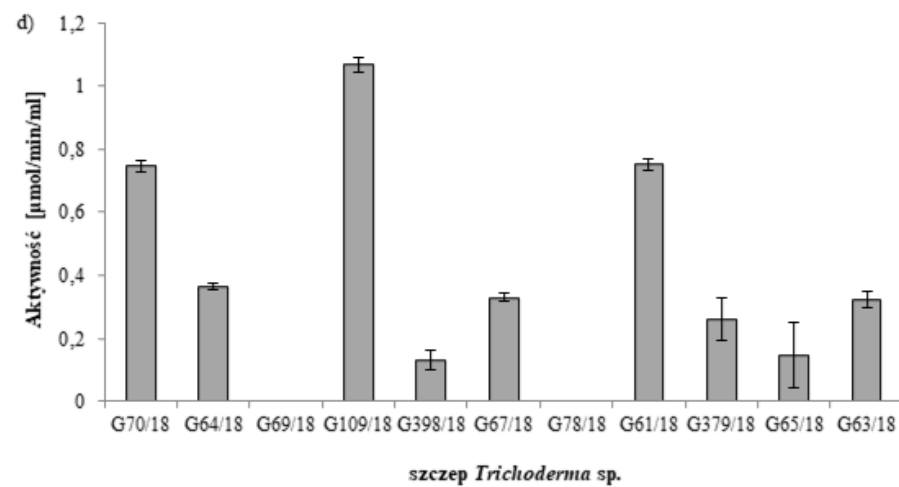
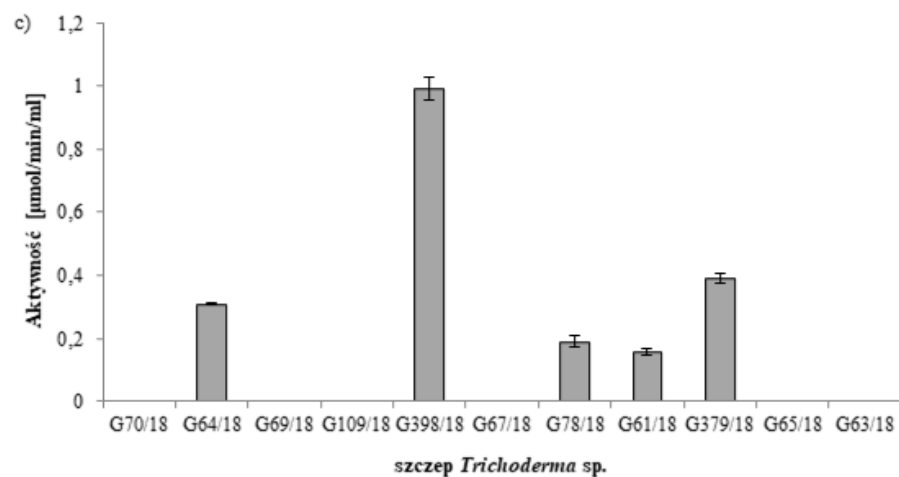
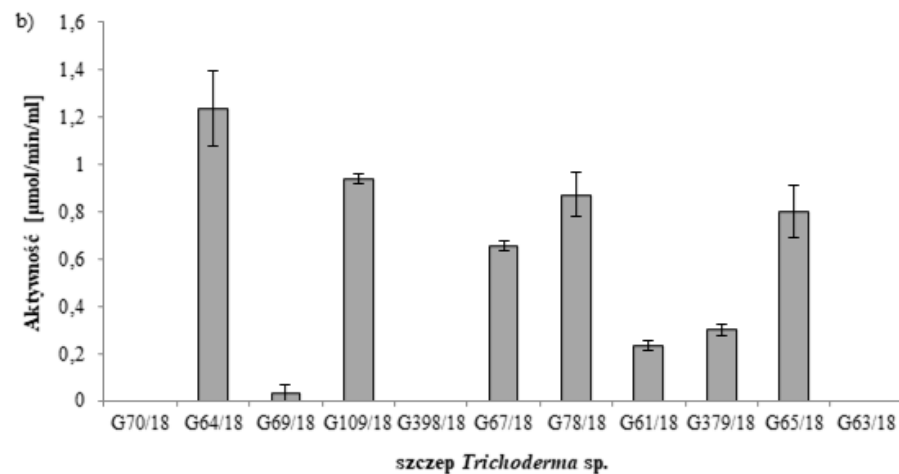
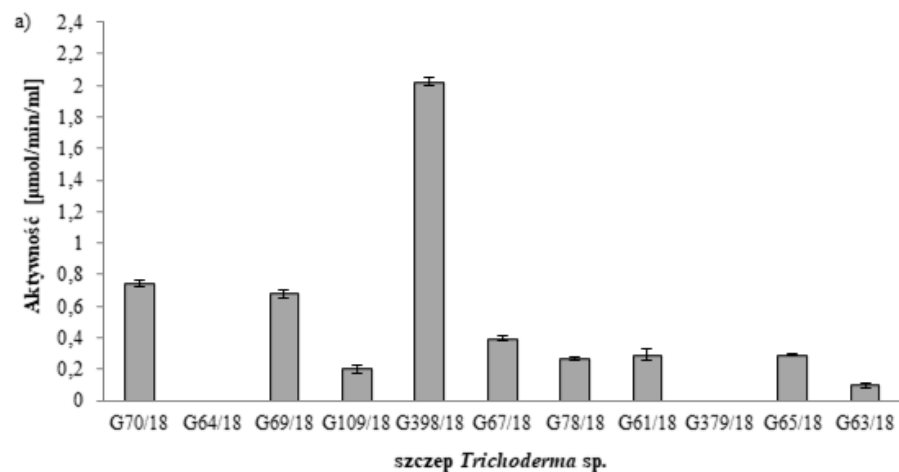


Fig. 4

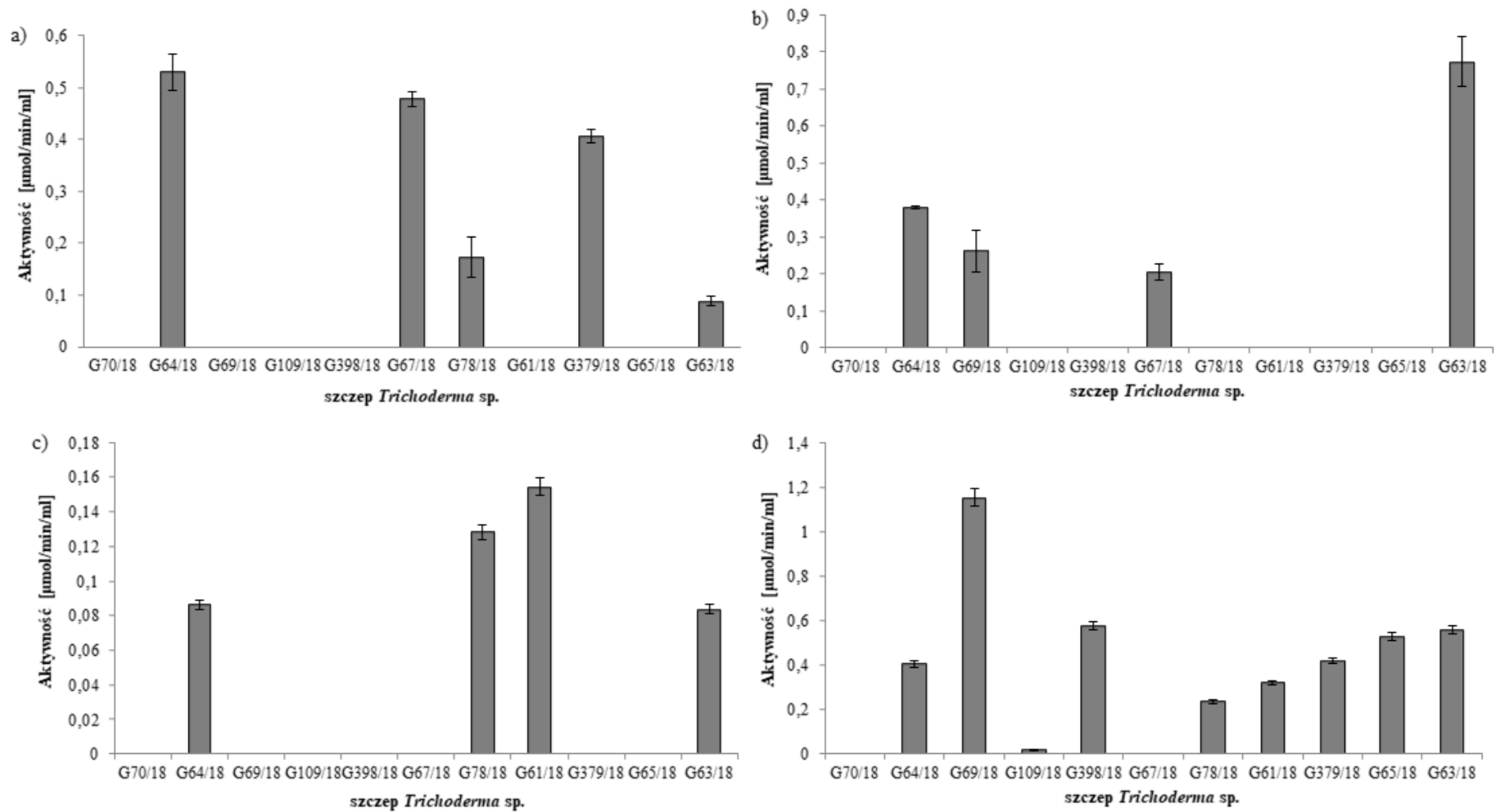
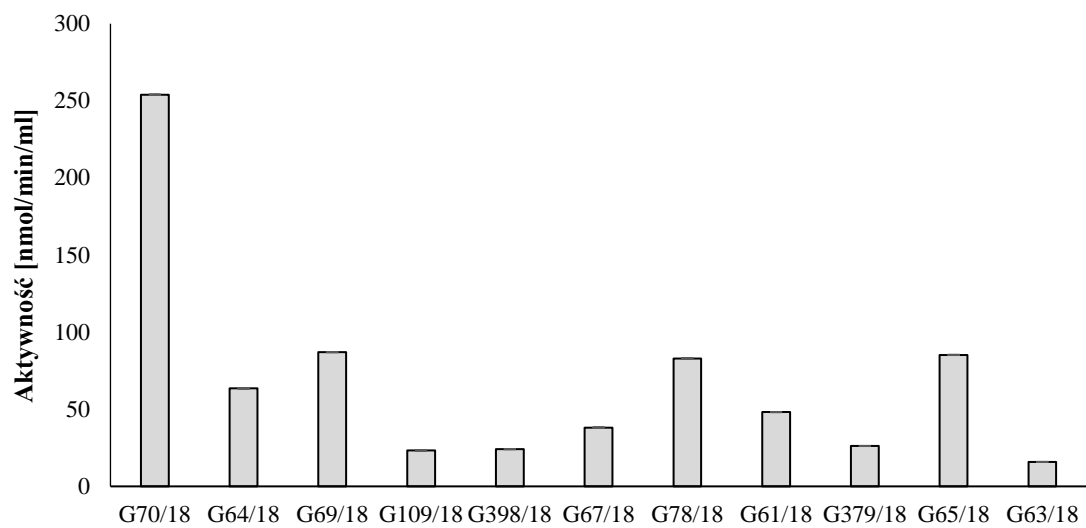
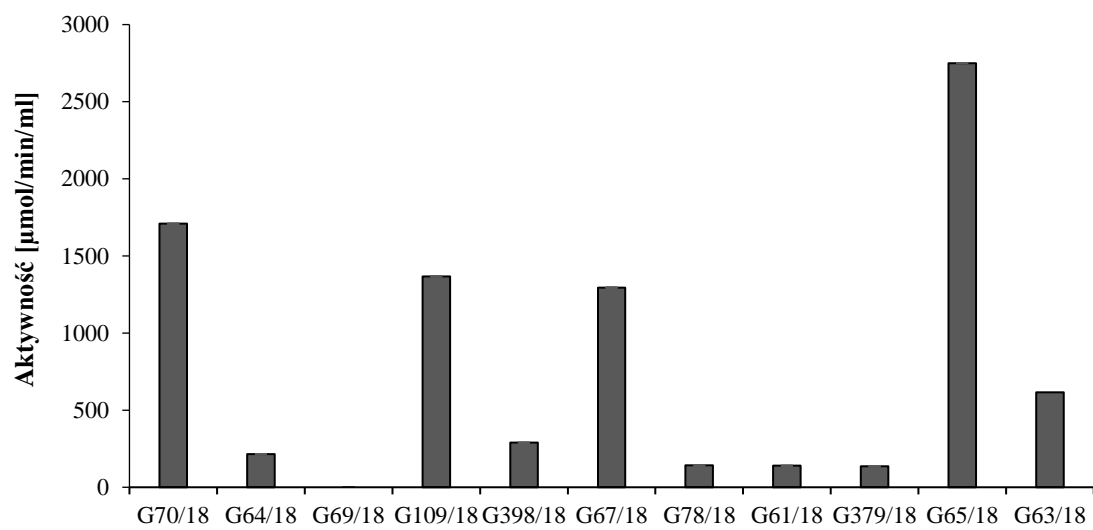


Fig. 5



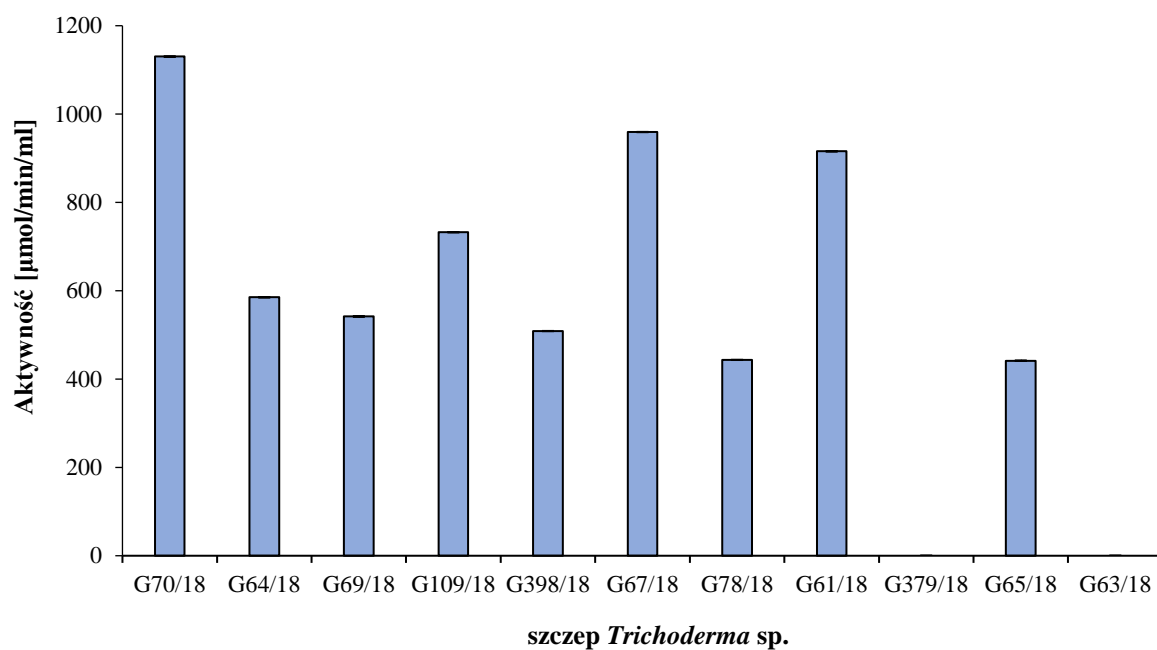
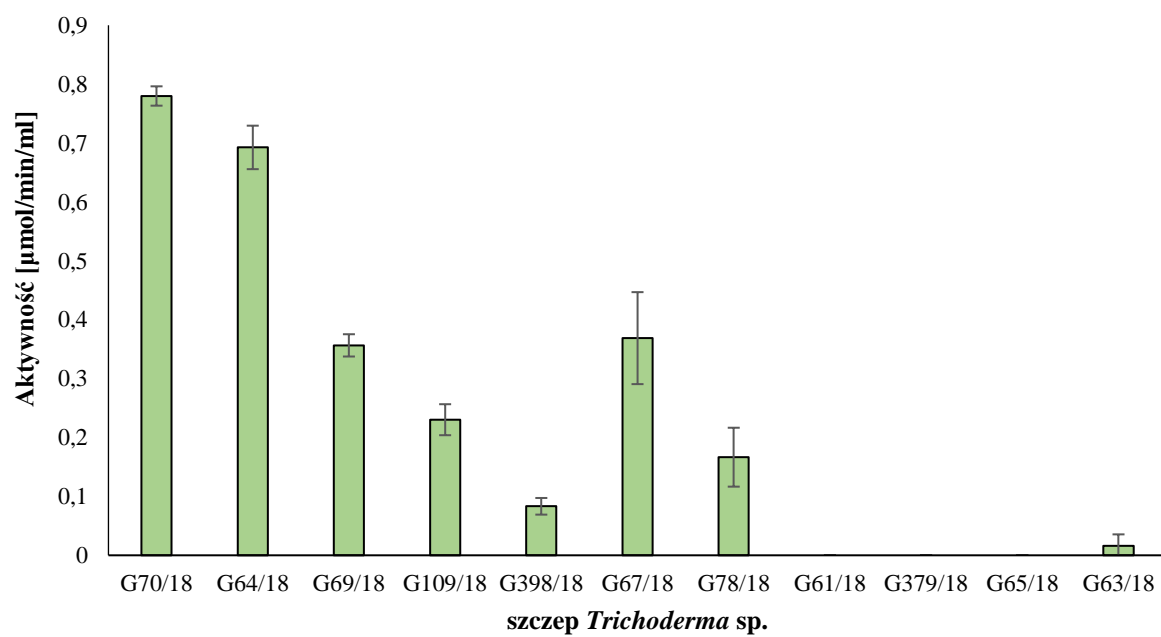
szczep *Trichoderma* sp.

Fig. 6



szczep *Trichoderma* sp.

Fig. 7

**Fig. 8****Fig. 9**

<i>Botrytis</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	Strefa zahamowania wzrostu (cm)	Odchylenie standardowe	Strefa zahamowania zarodnikowania (cm)	Odchylenie standardowe
G275/18	G61/18	46,5	3,5	-	-
	G63/18	63,9	5,5	-	-
	G64/18	69,9	4,9	-	-
	G65/18	39,0	8,5	-	-
	G67/18	60,4	13,5	-	-
	G69/18	51,0	15,6	-	-
	G70/18	32,5	7,8	-	-
	G78/18	45,6	15,1	-	-
	G109/18	38,1	4,5	-	-
	G379/18	40,1	1,4	-	-
G398/18	38,0	1,9	-	-	
G277/18	G61/18	66,8	16,4	-	-
	G63/18	52,8	15,6	-	-
	G64/18	60,4	15,9	-	-
	G65/18	55,2	11,2	-	-
	G67/18	22,5	0,7	54,0	9,9
	G69/18	39,6	5,5	-	-
	G70/18	38,7	5,5	-	-
	G78/18	37,0	1,4	-	-
	G109/18	29,1	8,0	-	-
	G379/18	36,1	2,2	-	-
G398/18	30,0	2,8	-	-	
G276/18	G61/18	40,2	9,0	-	-
	G63/18	31,2	2,5	70,8	6,9
	G64/18	71,5	17,0	-	-
	G65/18	35,5	2,0	55,9	4,0
	G67/18	14,5	3,3	38,4	27,8
	G69/18	33,5	3,4	61,3	4,5
	G70/18	31,3	4,0	-	-
	G78/18	34,4	14,9	-	-
	G109/18	34,7	13,1	-	-
	G379/18	-	-	44,5	0,0
G398/18	-	-	47,4	6,7	

Fig. 10

<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	Strefa zahamowania wzrostu (cm)	Odchylenie standardowe	Strefa zahamowania zarodnikowania (cm)	Odchylenie standardowe
G172/18	G61/18	46,7	18,1	-	-
	G63/18	45,5	8,0	-	-
	G64/18	45,9	2,6	-	-
	G65/18	32,1	1,8	-	-
	G67/18	22,3	2,0	-	-
	G69/18	38,3	7,0	-	-
	G70/18	23,9	4,7	-	-
	G78/18	31,3	1,8	-	-
	G109/18	17,1	1,2	-	-
	G379/18	-	-	-	18,0
G398/18	-	-	-	24,0	2,8
G166/18	G61/18	90,0	0,0	90,0	0,0
	G63/18	45,8	20,8	-	-
	G64/18	64,0	13,1	-	-
	G65/18	30,1	1,8	-	-
	G67/18	33,0	5,5	-	-
	G69/18	27,0	0,0	-	-
	G70/18	46,7	30,6	-	-
	G78/18	25,8	3,5	-	-
	G109/18	19,4	3,3	-	-
	G379/18	-	-	-	23,4
G398/18	-	-	-	28,8	0,0

Fig. 11

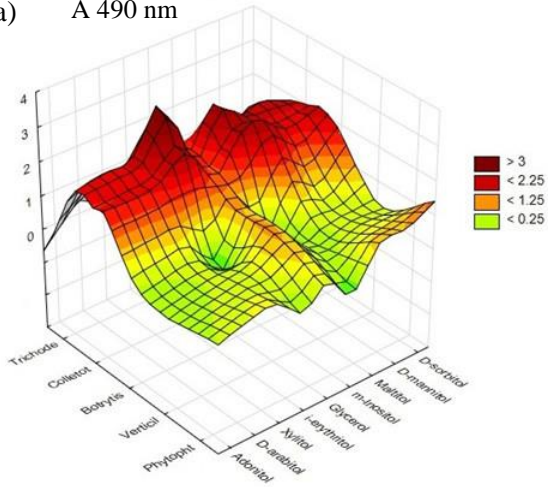
<i>Phytophthora</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	Strefa zahamowania wzrostu (cm)	Odchylenie standardowe	Strefa zahamowania zarodnikowania (cm)	Odchylenie standardowe	
G373/18	G61/18	48,3	1,3	-	-	
	G63/18	48,3	9,4	-	-	
	G64/18	54,2	16,4	-	-	
	G65/18	39,4	8,0	-	-	
	G67/18	25,7	3,9	66,6	14,9	
	G69/18	49,0	21,2	-	-	
	G70/18	37,7	10,9	-	-	
	G78/18	39,7	1,4	-	-	
	G109/18	50,2	4,0	-	-	
	G379/18	-	-	-	49,6	1,3
	G398/18	-	-	-	56,7	12,7

Fig. 12

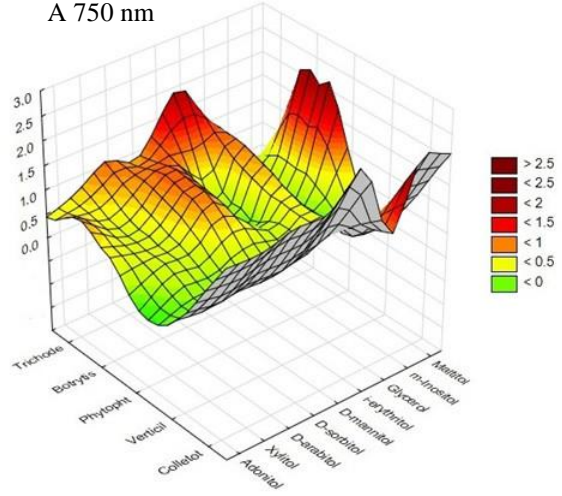
<i>Verticillium</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	Strefa zahamowania wzrostu (cm)	Odchylenie standardowe	Strefa zahamowania zarodnikowania (cm)	Odchylenie standardowe
G293/18	G61/18	22,5	1,6	70,6	3,8
	G63/18	44,2	13,0	67,5	1,2
	G64/18	42,3	5,1	72,9	3,8
	G65/18	24,2	1,2	55,8	1,8
	G67/18	47,6	10,3	-	-
	G69/18	34,7	1,8	63,4	7,3
	G70/18	40,0	0,0	-	-
	G78/18	20,7	0,6	62,4	1,1
	G109/18	53,0	13,2	-	-
	G379/18	40,5	3,5	-	-
G398/18	30,0	1,4	55,6	3,4	
G296/18	G61/18	23,4	4,4	66,6	8,1
	G63/18	33,8	8,6	72,3	11,6
	G64/18	36,9	9,7	63,4	6,1
	G65/18	25,3	0,6	59,7	5,2
	G67/18	55,1	8,9	-	-
	G69/18	37,4	12,1	68,0	10,8
	G70/18	37,6	0,6	-	-
	G78/18	21,4	0,6	56,8	10,1
	G109/18	27,8	9,3	-	-
	G379/18	-	-	55,0	15,6
G398/18	31,2	0,7	49,6	3,6	
G297/18	G61/18	29,0	2,2	73,2	12,7
	G63/18	47,1	6,1	79,3	15,2
	G64/18	55,6	12,3	83,6	9,1
	G65/18	-	-	65,8	14,2
	G67/18	61,8	4,4	-	-
	G69/18	37,1	2,7	60,0	8,5
	G70/18	40,7	0,6	-	-
	G78/18	24,7	0,0	56,2	1,7
	G109/18	25,8	5,9	-	-
	G379/18	63,1	11,7	-	-
G398/18	-	-	69,3	8,9	

Fig.13

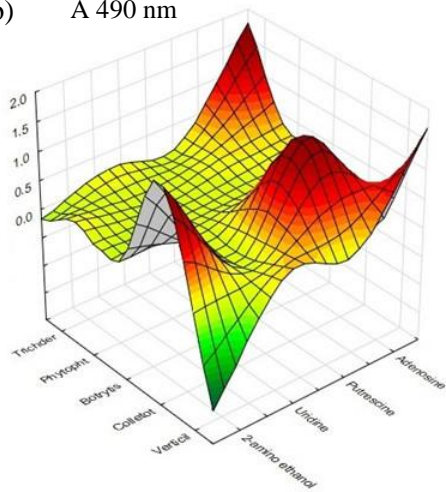
a) A 490 nm



A 750 nm



b) A 490 nm



A 750 nm

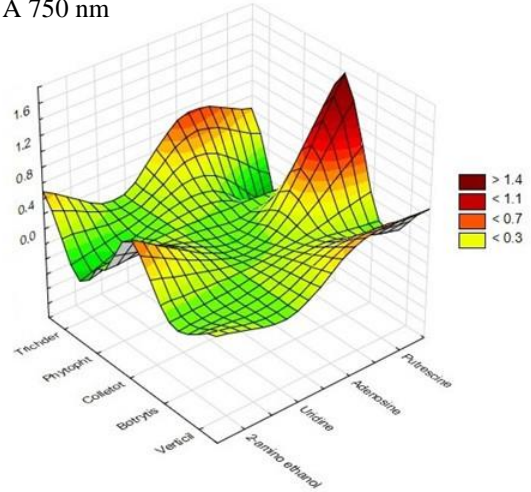


Fig. 14

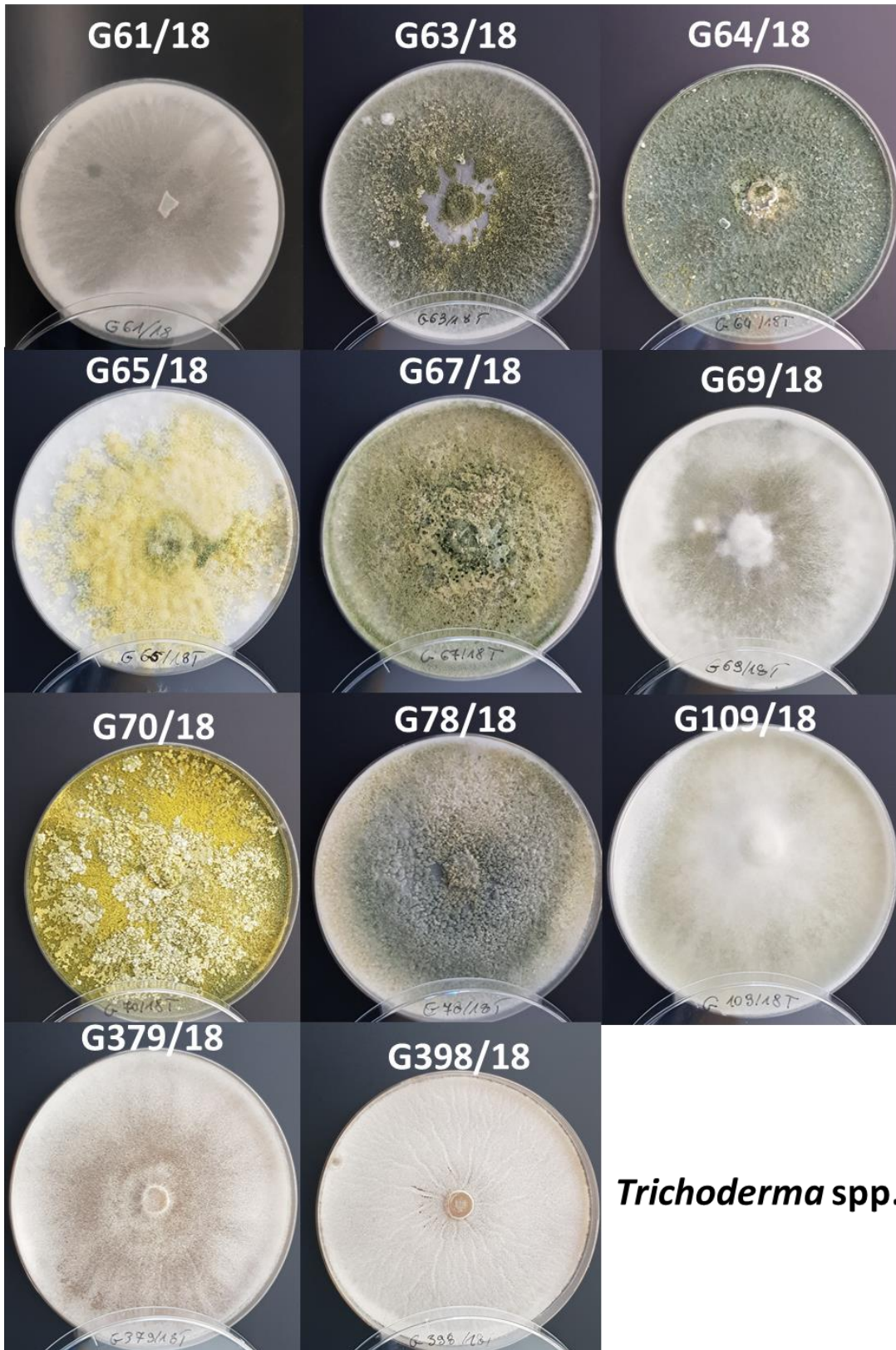
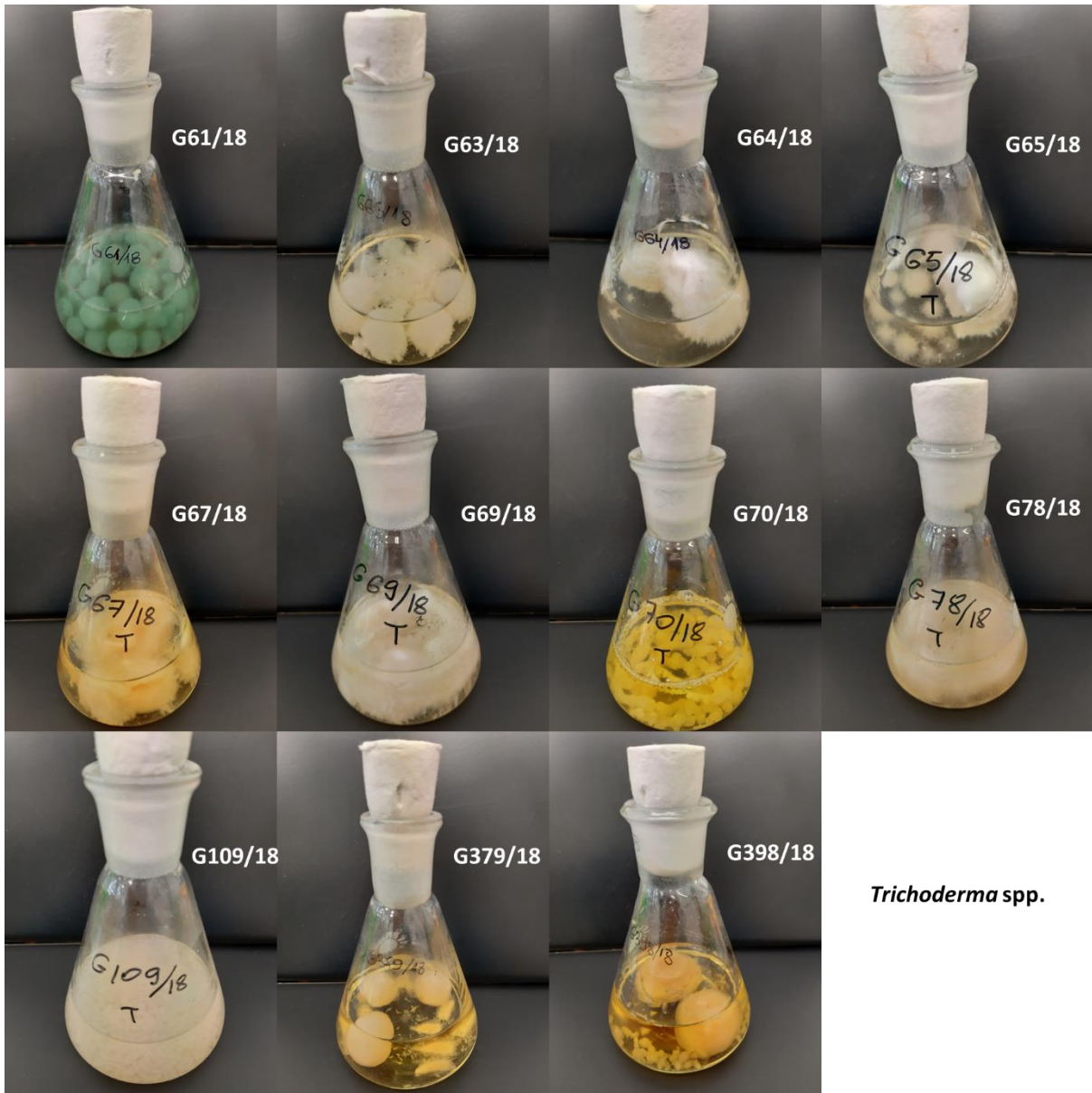


Fig. 15

**Fig. 16**

Szczep	Węglowodany																					
	N-Acetylo-D-Galaktozamina	N-Acetylo-D-Glukozamina	N-Acetylo-D-Mannozamina	Adonitol	D-Arabinoza	L-Arabinoza	D-Arabitol	Arbutyna	D-celobioza	i-Erythritol	D-Fruktoza	L-Fuktoza	D-Galaktoza	Gencjobjoza	α -D-Glukoza	m-Inozytol	α -D-Laktoza	Laktuloza	Maltitol	Maltoza	Maltotrioz a	D-Mannitol
utlenianie																						
G61/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G63/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G64/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G65/18	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
G67/18	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
G69/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G70/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
G78/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G109/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G379/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
G398/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
produkcja biomasy																						
G61/18	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G63/18	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
G64/18	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
G65/18	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
G67/18	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
G69/18	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
G70/18	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
G78/18	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
G109/18	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
G379/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
G398/18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Fig. 17

Szczep	Węglowodany																					
	D-Mannoza	D-Melezytoza	D-Melibioza	α -Metylo-D-Galaktozyd	β -Metylo-D-Galaktozyd	α -Metylo-D-Glukozyd	β -Metylo-D-Glukozyd	Palatynoza	D-Psikoza	D-Rafinoza	L-Ramnoza	D-Ryboza	Sedoheptulozan	D-Sorbitol	L-Sorboza	Stachioza	Sacharoza	D-Tagatoza	D-Trehaloza	Turanoza	Ksylitol	D-Ksyloza
utlenianie																						
G61/18	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
G63/18	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
G64/18	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
G65/18	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
G67/18	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
G69/18	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
G70/18	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
G78/18	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
G109/18	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
G379/18	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
G398/18	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
produkcja biomasy																						
G61/18	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
G63/18	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
G64/18	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
G65/18	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
G67/18	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
G69/18	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
G70/18	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
G78/18	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
G109/18	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
G379/18	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
G398/18	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Fig. 17 c.d.

Szczep	Aminokwasy												
	Kwas γ - Aminomasłowy	L-Alanina	L-Alanylo- Glicyna	L-Asparagina	Kwas L- Asparaginowy	Kwas-L- Glutaminowy	Kwas Glicylo- L- Glutaminowy	L- Ornityna	L- Feniloalanina	L-Prolina	Kwas L- Piroglutaminowy	L-Seryna	L- Treonina
utlenianie													
G61/18	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
G63/18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G64/18	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G65/18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G67/18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G69/18	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
G70/18	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
G78/18	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G109/18	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
G379/18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G398/18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
produkcja biomasy													
G61/18	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
G63/18	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
G64/18	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
G65/18	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
G67/18	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
G69/18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
G70/18	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
G78/18	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
G109/18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
G379/18	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
G398/18	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-

Fig. 18

Szczep	Kwasy karboksylowe																
	Kwas D-Galakturo nowy	Kwas D-Gluko nowy	Kwas-D-Gluko ronowy	Kwas 2-Keto-D-Gluko nowy	Kwas Fumarowy	Kwas β-Hydrok sy masłowy	Kwas γ-Hydrok sy masłowy	Kwas p-Hydrok syf enyloOcto wy	Kwas α-Ketoglu tarowy	Kwas L-Mleko wy	Kwas D-Jabłko wy	Kwas L-Jabłko wy	Kwas Chinowy	Kwas D-Gluko rowy	Kwas Sebacyno wy	Kwas Bursztyno wy	Kwas N-Acetylo L-Glu taminy
utlenianie																	
G61/18	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
G63/18	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
G64/18	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
G65/18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G67/18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
G69/18	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
G70/18	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
G78/18	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
G109/18	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
G379/18	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G398/18	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
produkcja biomasy																	
G61/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G63/18	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
G64/18	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G65/18	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G67/18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
G69/18	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G70/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G78/18	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
G109/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G379/18	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
G398/18	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-

Fig. 19

Szczep	Aminy i amidy					
	D-Glukozo- amina	Glukuronamid	Kwas Acetamido- octowy	Alaninamid	2- Aminoetanol	Putrescyna
utlenianie						
G61/18	+	-	-	-	-	-
G63/18	+	-	-	-	-	-
G64/18	+	-	-	-	-	-
G65/18	+	-	-	-	-	-
G67/18	-	-	+	-	-	-
G69/18	+	-	-	-	-	-
G70/18	+	-	-	-	-	-
G78/18	+	-	+	-	-	-
G109/18	+	-	-	-	-	-
G379/18	+	-	-	-	-	-
G398/18	+	-	-	-	-	-
produkcja biomasy						
G61/18	+	-	-	-	-	-
G63/18	+	-	-	-	-	-
G64/18	-	-	-	-	-	-
G65/18	-	-	-	-	-	-
G67/18	-	-	+	-	-	-
G69/18	+	-	-	-	-	-
G70/18	-	-	-	-	-	-
G78/18	+	-	+	-	-	-
G109/18	+	-	-	-	-	-
G379/18	+	-	-	-	-	-
G398/18	+	-	-	-	-	-

Fig. 20

Szczep	Polimery				
	Tween 80	α -Cyklo-destryna	β -Cyklo-dekstryna	Dekstryna	Glikogen
utlenianie					
G61/18	+	+	+	+	+
G63/18	+	-	-	+	+
G64/18	+	+	-	+	+
G65/18	+	+	-	+	+
G67/18	+	+	-	+	+
G69/18	+	-	-	+	+
G70/18	+	-	-	+	+
G78/18	+	-	-	+	+
G109/18	+	+	+	+	+
G379/18	+	+	-	+	+
G398/18	+	+	-	+	+
produkcja biomasy					
G61/18	-	-	-	-	-
G63/18	-	-	-	+	+
G64/18	-	-	-	-	+
G65/18	-	-	-	-	+
G67/18	-	-	-	+	+
G69/18	-	-	-	+	+
G70/18	-	-	-	+	+
G78/18	-	-	-	-	+
G109/18	-	-	-	-	-
G379/18	+	-	-	+	+
G398/18	-	-	-	+	+

Fig. 21

Szczep	Pozostałe									
	Amygdalina	Glukoza-1 Fosforan	Glicerol	Salicyna	Kwas Bromo-bursztynowy	Ester Metylowy Kwasu D-Mlekowego	Ester Mono-Metylowy Kwasu Bursztynowego	Adenozyna	Urydyna	Adenozyno - 5' Monofosforan
utlenianie										
G61/18	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
G63/18	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
G64/18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
G65/18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
G67/18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
G69/18	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
G70/18	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
G78/18	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
G109/18	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
G379/18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
G398/18	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
produkcja biomasy										
G61/18	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
G63/18	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
G64/18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
G65/18	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
G67/18	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
G69/18	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
G70/18	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
G78/18	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
G109/18	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
G379/18	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
G398/18	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+

Fig. 22

LISTA SEKWENCJI

SEKWENCJA NR 1

G61/18

>YTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCTCCAGAACCCAGTTACCAAAC
TGTTGAAAGTGCGGGTTCATTTCCCGGGTGCCTCAGAGCCCTAAACCAAGGCGCCCGGGGGACCAACC
AAAAAGTTTTGTGTATACCCCTCGCGGG<

SEKWENCJA NR 2

G63/18

>AGGGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGAATCATCC
GGGGTCTCTCCGGTGCCTTCGCCGTTCAGGCCAGCATCAGTTCGGCGCGGGGGAACAAGGCTTCGGGA
ACGTGGCTGCTCCGGCAGTGTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGCTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAA
GGATGCTGGCGTAATGGTCACCAGCGAC<

SEKWENCJA NR 3

G64/18

>ATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCGGGGTCTCCCGGTGCACTT
CGCCGTGTTCAAGCCAGCATCAGTTCGGCGCGGGGGA AAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAGTGT
TATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGCTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCAC
CAGCGAC<

SEKWENCJA NR 4

G65/18

>TCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTGGAAAGTTTTCGCGACATTTCAAATTTGAGTTTAGAGCTGTAA
AACCAATGTCAACGTGGGACTACAGAAAGAGTTGCGGGATTCCCTGCGGCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGAT
CCCATGGCGCCCCCGGAGGACCAACTCAAACCTTTTTTT<

SEKWENCJA NR 5

G67/18

>TCCGTAGGTGAACSTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACCATACCAAAC
GTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCCGCGGAGGGACCAACCA
AAACTTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAA
AACGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC<

SEKWENCJA NR 6

G69/18

>CGAGTAGAGAGCACCTTGAAAGAGGGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGANGCGCTTGTGACCAG
ACTTGGGCGCGGCGAATCATGCCGGGTTCTCTCCGNGCACTTCGCCGTGTTCAAGCNAGCATCAGTTCGGC
GCGGGGGANAAAGNNTCGGGAACGTGGCTGCTCCGGCAGTGTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGCTG
GNNTGAGGACCGCGCATCTGCNAGGANGCTGGNGTAATGGTCACCAGCGACCCGNCTTGANACACGGACCA
AGNGNACGGGGGGGGAGANCGNNCCGNNCCGGGGGGGACGNCGGGGGGGGGG<

SEKWENCJA NR 7

G70/18

>YTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAAC
TGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTAAAAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACAAC T
AAACTCTTT<

SEKWENCJA NR 8

G78/18

>GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGGAGGGATCATTACCTAGTTTAC
AAAGCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAAC TGTAAAGAGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTCGCAGCC
CCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAAC<

SEKWENCJA NR 9

G109/18

>GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGGAGGGATCATTACCTAGTTTAC
AAAGCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAAC TGTAAAGAGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTCGCAGCC
CCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAAC<

SEKWENCJA NR 10

G379/18

>GCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGGGATCATCCGGGGTTCTCTCCGGTGCCTTCGCCGCGTCTAGGCC
AGCATCAGTTCGTCGCGGGGGAAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAGTGTTATAGCCCGTTGCAT
AATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCACCAGCGAC<

SEKWENCJA NR 11

G398/18

>CCGGGAGTGTTATAGCCCGTTGCATAATACCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGC
GT<

SKRÓT OPISU

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biopreparatu do naturalizacji ryzosfery roślin malin o właściwościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów grzybowych należących do rodzaju *Botrytis*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, i *Phytophthora*, oraz o właściwościach hydrolitycznych przyspieszających rozkład materii organicznej w glebie, z zastosowaniem szczepów grzyba z rodzaju *Trichoderma*, **charakteryzujący się tym**, że stosuje się: 11 wyselekcjonowanych z ryzosfery malin dzikorosnących, niewykluczających swojego działania następujących szczepów *Trichoderma* spp.: G61/18, G63/18, G64/18, G65/18, G67/18, G69/18, G70/18, G78/18, G109/18, G379/18, G398/18, o sekwencjach nr 1-11, wskazanych na liście sekwencji, hodowanych na nośniku z otrąb pszennych korzystnie durum, suszonych wyłoków jabłkowych i koncentratu białek serwatkowych z dodatkiem wodnego roztworu mikroelementów oraz glukozy i sacharozy rozpuszczonej w wodnym roztworze wodorofosforanu amonu; zmielone składniki nośnika; dodatek mieszanki suplementacyjnej zawierającej składniki wybrane spośród: adenozyiny, adonitolu, arabitolu, erytrytolu, mannitolu i sorbitolu albo ich dowolną mieszaninę. Przedmiotem wynalazku jest również ekologiczny, suchy biopreparat do naturalizacji ryzosfery roślin malin, a także sposób prowadzenia hodowli szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zastosowania w biopreparacie oraz kompozycja podłoża namnażającego.

(19 zastrzeżeń)