PROGRESS IN PLANT PROTECTION
61 (2): 121-127, 2021
eISSN 2084-4883

DOI: 10.14199/ppp-2021-013
Published online: 12.05.2021

Received: 31.03.2021 / Accepted: 05.05.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Ocena potencjału lokalnych izolatów grzybów owadobójczych jako biologicznych środków ochrony roślin

Assessment of the potential of local entomopathogenic fungi isolates as biocontrol agents

Danuta Sosnowska[A,1]*, Henryk Ratajkiewicz[B,2]

Streszczenie

Substancje czynne biopestycydów mikrobiologicznych są pozyskiwane ze środowiska. Pierwszym etapem opracowania nowego biopestycydu jest selekcja izolowanych szczepów pod względem hodowli laboratoryjnej i skuteczności w zwalczaniu agrofagów. Celem przeprowadzonych badań było wstępne określenie potencjału lokalnych szczepów grzybów owadobójczych: *Isaria fumosorosea* i *Beauveria bassiana* jako biopestycydów do zwalczania mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* F.) i mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood). Oceniono wzrost, zarodnikowanie i patogeniczność szczepów w warunkach kontrolowanych. Najlepsze właściwości wykazano dla szczepu Pfr 311 A *I. fumosorosea*. Szczep ten istotnie najlepiej ze wszystkich badanych zarodnikował w temperaturze 20°C, przy czym najintensywniejszy wzrost wykazał w temperaturze 25°C. Szczep Pfr 311 A był też najskuteczniejszy w zwalczaniu mszycy zbożowej i larw L3-L4 mączlika szklarniowego w warunkach kontrolowanych. Wyselekcjonowany szczep powinien być badany pod kątem opracowania nowego biopestycydu.

Słowa kluczowe: grzyby owadobójcze, hodowla laboratoryjna, patogeniczność, pluskwiaki

Abstract

The active substances of microbial biopesticides are obtained from the environment. The first step in the development of a new biopesticide is the selection of isolated strains in terms of laboratory screening and effectiveness in pest control. The aim of the conducted research was to initially determine the potential of local strains of entomopathogenic fungi: *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* as biopesticides for the control of grain aphids (*Sitobion avenae* F.) and greenhouse whiteflies (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood). The sporulation, growth and pathogenicity of the strains were assessed under controlled conditions. The best properties were demonstrated for the Pfr 311 A *I. fumosorosea* strain. This strain showed the best sporulation compare to all tested strains at the temperature of 20°C, with the most intensive growth at the temperature of 25°C. Strain Pfr 311 A was also most effective in controlling grain aphids and larvae L3-L4 greenhouse whiteflies under controlled conditions. The selected strain should be tested for the development of a new biopesticide.

Key words: entomopathogenic fungi, laboratory culture, pathogenicity, Hemiptera

[1]Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
[2]Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań
*corresponding author: d.sosnowska@iorpib.poznan.pl
ORCID: [A]0000-0002-0463-5973, [B]0000-0002-3512-1350

Wstęp / Introduction

Grzyby owadobójcze należą do najważniejszych czynników metod biologicznych. W warunkach naturalnych redukują populacje wielu szkodliwych owadów, w tym powodują ich epizoocje. Grzyby te są łatwe i tanie w hodowli oraz porażają szerokie spektrum szkodników. Są pierwszymi mikroorganizmami, które zostały zastosowane w praktyce ochrony roślin. Ponad 700 gatunków grzybów z około 90 rodzajów jest chorobotwórczych dla owadów (Khachatourians i Qazi 2008).

Stadium infekcyjnym grzyba jest zarodnik, który musi dostać się na powierzchnię ciała owada – kutikulę, na której kiełkuje. Wyrastająca strzępka kiełkowa tworzy appresorium i wydziela różne enzymy oraz przenika przez oskórek do wnętrza ciała owada. Strzępki intensywnie rozrastają się w hemocelu, a dodatkowo metabolity grzybów zaburzają funkcjonowanie organizmu, co prowadzi do śmierci owada. Po jego śmierci grzybnia strzępkowa przerasta na zewnątrz dając początek trzonkom konidialnym oraz zarodnikom, które następnie rozprzestrzeniane są przez wodę, wiatr i inne owady na osobniki zdrowe, wywołując kolejne infekcje. W procesie chorobowym bardzo ważny jest pierwszy etap porażenia szkodnika przez grzyba. Aby zarodnik skiełkował musi wystąpić odpowiednia temperatura i wilgotność (Fargues i wsp. 1992; Miętkiewski i wsp. 1994; Yeo i wsp. 2003; Fiedler i Sosnowska 2006).

Najwięcej zarejestrowanych bioinsektycydów powstało w oparciu o gatunek *Beauveria bassiana* (33,9%) oraz *Metarhizium anisopliae* (33,9%). Znacznie mniej preparatów wytworzono z zastosowaniem *Isaria fumosorosea* (5,8%) oraz *Beauveria brongniartii* (4,1%) (De Faria i Wraight 2007). Bioinsektycydy tworzone są na bazie różnorodnych szczepów. Dane literaturowe wskazują między innymi na duże zróżnicowanie pomiędzy szczepami grzyba *I. fumosorosea* pod względem zarodnikowania i wzrostu (Avery i wsp. 2015; Gandarilla-Pacheco i wsp. 2019).

Anamorficzny gatunek *I. fumosorosea* (Wize) (dawniej pod nazwą *Paecilomyces fumosoroseus*) jest znany od ponad 30 lat i wykorzystywany do zwalczania mączlików (Zimmerman 2008). Po raz pierwszy został opisany w 1832 roku przez Friesa i w 1904 roku przez Wize (Zimmerman 2008). Wywołuje on chorobę zwaną różową muskardyną, którą stwierdza się u wielu szkodników roślin, m.in. takich jak: śmietka kapuściana, owocówka jabłkóweczka, brudnica nieparka, białka wierzbówka i wielu innych (Lipa 1967).

Grzyb *B. bassiana* (Bals.) Vuill. należy do najbardziej pospolitych gatunków spotykanych na owadach, również w Polsce. Zainfekowane osobniki wkrótce po śmierci przybierają czerwoną barwę, później ich ciało pokrywa się białą warstwą trzonków i zarodników konidialnych. W Polsce obserwowano go na 80 gatunkach owadów, głównie chrząszczy i motyli (Lipa 1967). Badania wskazują na dominację *B. bassiana* w próbach gleby i ściółki leśnej w Polsce. Występuje on często na owadach przebywających w glebie lub zimujących w jej wierzchniej warstwie (Tkaczuk i wsp. 2012, 2014). Z kolei grzyb *I. fumosorosea* dominuje w glebach z pól uprawnych (Karg i Bałazy 2009).

W ostatnich latach w związku z ochroną środowiska wzrasta zainteresowanie stosowaniem metod biologicznych w celu redukcji lub eliminacji chemicznych środków ochrony roślin. Poszukuje się nowych szczepów grzybów owadobójczych, które wykazują dobre parametry hodowlane i dużą patogeniczność w stosunku do szkodników roślin.

Celem przeprowadzonych badań było określenie zróżnicowania pomiędzy szczepami dwóch gatunków grzybów owadobójczych: *I. fumosorosea* i *B. bassiana* pod względem wzrostu, zarodnikowania i patogeniczności w stosunku do mszycy zbożowej i mączlika szklarniowego.

Materiały i metody / Materials and methods

W doświadczeniach zastosowano trzy szczepy *I. fumosorosea* izolowane z gleby w Polowej Stacji Doświadczalnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego (IOR – PIB) w Winnej Górze. Szczepy pochodzą z kolekcji grzybów owadobójczych znajdującej się w Zakładzie Metod Biologicznych IOR – PIB w Poznaniu. Są to szczepy pochodzące z uprawy bezorkowej roślin podanych poniżej:

– Pfr 312 A (łubin),
– Pfr 311 A (pszenica zwyczajna),
– Pfr 108 A (rzepak).

Zastosowano również jeden szczep Bb 311 B *B. bassiana*, izolowany z gleby z uprawy orkowej pszenicy zwyczajnej.

Próby gleby pobierano za pomocą laski glebowej z głębokości do 20 cm w 10 miejscach z poletka. Grzyby izolowano metodą pułapkową (Zimmermann 1986). Owadem pułapkowym były larwy barciaka większego (*Galleria mellonella* L.). Zmieszaną i przesianą przez sito glebę z każdego poletka umieszczano w szalkach Petriego o średnicy 9 cm (pojemność 100 ml). Do każdej szalki wkładano po 10 larw barciaka. Na każdą kombinację przeznaczono 3 szalki (30 larw). Larwy z glebą przechowywano w temperaturze 20°C przez około 25 dni. Po 5 dniach kontaktu larw z glebą przeprowadzono obserwacje ich śmiertelności, i kolejne co 3–4 dni.

W warunkach laboratoryjnych szczepy zostały zbadane pod kątem wzrostu i zarodnikowania w zależności od temperatury. Średnicę kolonii i intensywność zarodnikowania badano na podłożu glukozowo-ziemniaczanym (PDA – Potato Dextrose Agar) w temperaturach: 10, 15, 20 i 25°C. Hodowlę prowadzono przez 5 dni na szalkach Petriego w termostatach. W ostatnim dniu hodowli określono liczbę zarodników za pomocą hemocytometru i obliczono powierzchnię kolonii w cm^2.

Skuteczność szczepów grzybów w zwalczaniu mszycy zbożowej (*S. avenae*) określono na naturalnie zasiedlonym przez mszyce jęczmieniu w warunkach szklarniowych stosując szklane izolatory. Dla każdego szczepu zastosowano 4 powtórzenia, które stanowiły doniczki w izolatorach. Na 10 roślinach w każdej doniczce (w sumie 40 roślin w wariancie) policzono liczbę żywych mszyc. Wodną zawiesinę zarodników przygotowywano w laboratorium. Z dziesięciodniowych kultur grzybów hodowanych na PDA zeskrobano grzybnię z zarodnikami i rozdrobniono w ręcznym homogenizatorze. Koncentrację zarodników obliczono za pomocą komory Bürkera metodą kolejnych rozcieńczeń aż do uzyskania wymaganej koncentracji zarodników, czyli 10^7 w 1 ml.

Rośliny traktowano zawiesiną zarodników w koncentracji 10^7 szt. w l ml z dodatkiem surfaktanta Triton X-100 opryskiwaczem ręcznym. Po pięciu dniach od zabiegu na każdej roślinie liczono osobniki żywe mszyc. Skuteczność zabiegu obliczano według wzoru Hendersona i Tiltona (1955):

$$\%\ \text{skuteczności} = \left(1 - \frac{T_a \times K_b}{K_a \times T_b}\right) \times 100,$$

gdzie:

T_a – liczebność na obiekcie traktowanym zawiesiną zarodników po zabiegu,

K_a – liczebność na obiekcie kontrolnym po zabiegu,

T_b – liczebność na obiekcie traktowanym zawiesiną zarodników przed zabiegiem,

K_b – liczebność na obiekcie kontrolnym przed zabiegiem.

Śmiertelność larw mączlika szklarniowego (*T. vaporariorum*) określano w warunkach laboratoryjnych w szalkach Petriego (średnica 15 cm) na liściach pomidora naturalnie zasiedlonych larwami mączlika. W trzech losowo wybranych miejscach na liściu policzono larwy L3-L4 na powierzchni 1 cm^2. Liście opryskiwano zawiesiną zarodników jak w doświadczeniu doniczkowym opisanym powyżej. Szalki umieszczono w termostacie z temperaturą 25°C. Śmiertelność larw mączlika (%) określano po 6 dniach licząc osobniki martwe i żywe w trzech miejscach na powierzchni 1 cm^2 powierzchni liścia.

Zbadano również skuteczność zabiegów zwalczania mączlika szklarniowego w warunkach kontrolowanych w fitotronach w temperaturze 25°C. W izolatorach umieszczono po jednej roślinie pomidora zasiedlonej przez mączlika szklarniowego. Zastosowano po 4 powtórzenia, gdzie jedna roślina w izolatorze stanowiła jedno powtórzenie. Rośliny pomidora opryskiwano jak w doświadczeniu doniczkowym omówionym powyżej. W 4. i 7. dniu po zabiegu z każdej rośliny pobierano 5 liści i pod mikroskopem stereoskopowym określono śmiertelność larw L3-L4, tak jak w doświadczeniu szalkowym.

Kontrolę we wszystkich eksperymentach stanowiły rośliny/liście nieopryskiwane zawiesiną zarodników.

Analiza statystyczna

Dla porównania wartości średnich przeprowadzono jednoczynnikową lub dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla porównań post-hoc posłużono się testem HSD Tukeya na poziomie istotności $\alpha = 0{,}05$.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Selekcja szczepów grzybów ze środowiska jest pierwszym etapem w pozyskiwaniu substancji czynnych grzybów owadobójczych do produkcji biopreparatów. Bardzo ważna jest wstępna charakterystyka izolowanego szczepu, w tym jego skuteczność i wydajność. Takie badania prowadzą firmy i naukowcy. Zanim szczep grzyba owadobójczego znajdzie się w biopreparacie jako substancja czynna musi być przede wszystkim izolowany ze środowiska i przebadany pod różnym kątem przez wiele lat. Marrone (1999) podaje, że jedna z firm biotechnologicznych przebadała ponad 20 000 mikroorganizmów, przeprowadziła badania polowe i wybrała z nich szczepy najbardziej obiecujące do produkcji biopreparatu. Hall (1981) badał naturalne izolaty grzybów owadobójczych pod względem zarodnikowania, wpływu czynników biotycznych i abiotycznych na jego skuteczność i pod względem wielu innych aspektów.

Według Ravensberga (2011) najważniejszymi kryteriami w selekcji szczepów grzybów owadobójczych są: dawka powodująca wysoki poziom śmiertelności, sposób działania, szybkość zabijania gospodarza i wpływ czynników abiotycznych. Z kolei Meekes (2001) uważa, że najistotniejszym kryterium jest produkcja zarodników i wirulentność.

Przeprowadzone badania dotyczyły wielu aspektów. Jednym z nich był wpływ temperatury na intensywność zarodnikowania szczepów grzybów. W temperaturze 10°C nie obserwowano istotnych różnic w zarodnikowaniu pomiędzy szczepami, tak samo jak w temperaturze 15°C. Największe zarodnikowanie obserwowano w temperaturze 20°C dla szczepu Pfr 311 A grzyba *I. fumosorosea* (tab. 1). Wynosiło ono $4{,}2 \times 10^6$ w 1 ml substancji i istotnie różniło się od zarodnikowania pozostałych szczepów tego gatunku grzyba. Szczep Bb 311 B grzyba *B. bassiana* zarodnikował znacznie słabiej w tej temperaturze. W temperaturze 25°C największe zarodnikowanie obserwowano dla szczepu Pfr 108 A grzyba *I. fumosorosea*, ale nie było istotnych różnic pomiędzy szczepami tego gatunku. Najmniejsze zarodnikowanie w tej temperaturze wykazywał szczep *B. bassiana*. Z badań wynika, że szczep Pfr 311 A *I. fumosorosea* preferuje najbardziej temperaturę 20°C do zarodnikowania.

Stadium infekcyjnym grzyba są zarodniki, dlatego mają one największe znaczenie w biopreparacie do zwalczania szkodników. To właśnie po skiełkowaniu zarodnika na powierzchni jego kutikuli, grzyb dostaje się do wnętrza ciała owada powodując po pewnym czasie jego śmierć. O znaczeniu zarodników pisali m.in. Ferron (1978), Parades i wsp.

Tabela 1. Zarodnikowanie szczepów *Isaria fumosorosea* i *Beauveria bassiana* w hodowli szalkowej w zależności od temperatury wyrażone uzyskaną liczbą zarodników [10^6 szt./ml]

Table 1. Sporulation of *Isaria fumosorosea* (Pfr) and *Beauveria bassiana* (Bb) strains in a dish culture depending on temperature expressed by the number of spores obtained [10^6 pcs/ml]

Szczep Strain	Temperatura hodowli – Culture temperature			
	10°C	15°C	20°C	25°C
Pfr 311 A	0,18 ± 0,05 a*	0,48 ± 0,22 a	4,2 ± 0,52 d	1,68 ± 0,05 bc
Pfr 312 A	0,20 ± 0,12 a	0,20 ± 0,00 a	2,17 ± 0,92 c	1,95 ± 0,86 c
Pfr 108 A	0,28 ± 0,05 a	0,20 ± 0,00 a	1,85 ± 0,24 c	2,03 ± 0,05 c
Bb 311 B	0,75 ± 0,06 ab	0,48 ± 0,15 a	0,83 ± 0,74 ab	0,50 ± 0,00 a

± SD – odchylenie standardowe – Standard Deviation

*wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy α = 0,05 – data marked with the same letter do not differ statistically at α = 0.05

(2017) oraz Corrêa i wsp. (2020). Właśnie selekcja najlepszych szczepów pod względem zarodnikowania jest pierwszym etapem, na którym bazują kolejne badania. Prezentowane wyniki pokazują, że szczep Pfr 311 A *I. fumosorosea* wypełnił najlepiej to pierwsze kryterium selekcji szczepu, co wstępnie kwalifikuje go do produkcji biopreparatu.

Szczep Pfr 311 A wykazał największy wzrost kolonii w temperaturze 25°C (tab. 2), przy czym nie było korelacji pomiędzy zarodnikowaniem i wzrostem. W temperaturze 25°C szczep ten wykazał najmniejsze zarodnikowanie. Natomiast w temperaturze 20°C przy słabym wzroście kolonii wykazał największe zarodnikowanie w porównaniu z innymi szczepami (tab. 2). Wzrost kolonii nie jest brany pod uwagę przy selekcji szczepów. Wśród kryteriów wyboru szczepu jako potencjalnego kandydata do produkcji biopreparatu najważniejsze jest zarodnikowanie. Otrzymane w badaniach wyniki wskazują, że szczep Pfr 311 A *I. fumosorosea* ma największy potencjał, a jego dodatkowym atutem jest produkcja największej liczby zarodników na małej powierzchni kolonii.

Isaria fumosorosea jest jednym z grzybów owadobójczych o dużym zróżnicowaniu pomiędzy szczepami pod względem wzrostu i zarodnikowania (Gandarilla-Pacheco i wsp. 2019). Preferuje różne temperatury. Izolaty *I. fumosorosea* z Francji rosły w przedziale temperatur od 11 do 30°C (Fargus i wsp. 1992). Zróżnicowanie wśród szczepów tego gatunku obserwował Avery i wsp. (2015). W Polsce, Miętkiewski i wsp. (1994) badali wzrost grzyba w przedziale od 5 do 32°C i wykazali, że warunki sprzyjające występowały w temperaturach z przedziału od 8 do 30°C, a maksimum wzrostu obserwowano w zakresie od 20 do 25°C. Podobne wyniki uzyskano w wykonanych badaniach nad szczepami pochodzącymi z gleby z pól uprawnych.

Patogeniczność grzybów owadobójczych jest jednym z najważniejszych kryteriów w selekcji szczepów do produkcji biopreparatu (Hall 1981; Gillespie i Moorhouse 1990; Meekes 2001; Posada i Vega 2005; Behle i wsp. 2006). W badaniach skupiono się na skuteczności grzybów w zwalczaniu mszycy zbożowej i mączlika szklarniowego. Mszyca zbożowa była skutecznie zwalczana przez *I. fumosorosea*, natomiast grzyb *B. bassiana* okazał się nieskuteczny (tab. 3). Szafranek i wsp. (2001) wykazali, że badane przez nich grzyby owadobójcze *B. bassiana* i *I. fumosorosea* miały słabą aktywność w stosunku do mszycy zbożowej *S. avenae*. Autorzy uważają, że słaba skuteczność grzybów owadobójczych w zwalczaniu mszyc jest związana z obecnością wolnych kwasów tłuszczowych w lipidach kutikuli (Szafranek i wsp. 2001).

Obserwuje się różną skuteczność grzybów owadobójczych w zwalczaniu wielu innych gatunków mszyc. Z literatury wiadomo, że w warunkach polowych *B. bassiana* porażała 50,7% kolonii mszycy *Diuraphis noxia* na psze-

Tabela 2. Wzrost szczepów *Isaria fumosorosea* i *Beauveria bassiana* w hodowli szalkowej w zależności od temperatury wyrażony powierzchnią grzybni po 5 dniach inkubacji [cm^2]

Table 2. Growth of *Isaria fumosorosea* (Pfr) i *Beauveria bassiana* (Bb) strains in a dish culture depending on temperature, expressed by mycelial surface after 5 days of incubation [cm^2]

Szczep Strain	Temperatura hodowli – Culture temperature			
	10°C	15°C	20°C	25°C
Pfr 311 A	0,68 ± 0,08 a*	2,01 ± 0,20 cd	2,78 ± 0,54 de	7,30 ± 0,45 h
Pfr 312 A	0,57 ± 0,08 a	1,77 ± 0,19 bc	3,46 ± 0,00 e	6,20 ± 0,00 g
Pfr 108 A	0,50 ± 0,00 a	1,69 ± 0,24 bc	2,71 ± 0,55 de	5,30 ± 0,46 f
Bb 311 B	1,13 ± 0,00 ab	2,00 ± 0,00 cd	6,16 ± 0,61 g	7,80 ± 0,45 h

± SD – odchylenie standardowe – Standard Deviation

*wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy α = 0,05 – data marked with the same letter do not differ statistically at α = 0.05

nicy (Abebe i wsp. 2020). Vandenberg (1996) wykazał, że grzyb *I. fumosorosea* był bardziej skuteczny w zwalczaniu mszycy *D. noxia* niż *B. bassiana*. Nazir i wsp. (2019) wykazali dużą wirulentność trzech szczepów *B. bassiana* w stosunku do mszycy brzoskwiniowo-ziemniaczanej (*Myzus persicae*), w koncentracji zarodników 1×10^7 w 1 ml powodowały śmiertelność tej mszycy na poziomie 75%. W badaniach Elmekabaty i wsp. (2020) wszystkie badane szczepy *B. bassiana* nie były skuteczne w zwalczaniu dużej mszycy malinowej (*Amphorophora idaei*), natomiast szczepy *I. fumosorosea* były skuteczne.

W przeprowadzonych badaniach szczepy *I. fumosorosea* różniły się patogenicznością. Szczep Pfr 311 A spowodował ponad 73% śmiertelność mszycy zbożowej po pięciu dniach od zabiegu opryskiwania, podczas gdy szczep Pfr 108 A wykazał już tylko 42% skuteczności, a szczep Pfr 312 A ponad 54% (tab. 3). Jednak różnice te nie były istotne. Natomiast skuteczność szczepu Pfr 311 A grzyba *I. fumosorosea* istotnie różniła się od skuteczności szczepu Bb 311 B grzyba *B. bassiana* (tab. 3). Kolejne kryterium selekcji szczepów dla biopreparatu pokazało, że szczep Pfr 311 A był najskuteczniejszy w zwalczaniu mszycy zbożowej.

W doświadczeniu laboratoryjnym największą śmiertelność larw L3-L4 mączlika szklarniowego w temperaturze 25°C powodował szczep Pfr 311 A grzyba *I. fumosorosea* (58,9%) (tab. 4) i różniła się ona istotnie od pozostałych szczepów tego gatunku. Szczepy Pfr 108 A i Pfr 312 A powodowały odpowiednio 8,9% i 23% śmiertelności. Szczep Bb 311 B *B. bassiana* był najmniej skuteczny.

W warunkach kontrolowanych w fitotronach do zwalczania mączlika szklarniowego na pomidorze nie zastosowano szczepu Pfr 108 A *I. fumosorosea*, gdyż był on najmniej skuteczny w warunkach laboratoryjnych. W 7. dniu od zabiegu opryskiwania największą śmiertelność larw L3-L4 mączlika szklarniowego powodował szczep Pfr 311 A *I. fumosorosea* (87,1%) (tab. 5), a najmniejszą szczep Bb 311 B *B. bassiana* (65,3%). Wyniki nie różniły się istotnie.

Tabela 3. Skuteczność szczepów *Isaria fumosorosea* (Pfr) i *Beauveria bassiana* (Bb) w zwalczaniu mszycy zbożowej (*Sitobion avenae*) na jęczmieniu w doświadczeniu doniczkowym 5 dni po zabiegu [%]

Table 3. Efficacy of *Isaria fumosorosea* (Pfr) and *Beauveria bassiana* (Bb) strains in *Sitobion avenae* control on barley in a pot test 5 days after treatment [%]

Szczep Strain	Skuteczność biologiczna Biological efficacy
Pfr 311 A	73,1 ± 19,1 b*
Pfr 312 A	54,2 ± 8,7 ab
Pfr 108 A	42,2 ± 23,4 ab
Bb 311 B	37,8 ± 4 a

± SD – odchylenie standardowe – Standard Deviation
*wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy α = 0,05 – data marked with the same letter do not differ statistically at α = 0.05

Isaria fumosorosea i *B. bassiana* są w praktyce stosowane w formie bioinsektycydów do zwalczania mączlików (Lindquist 1996). Przed rejestracją bioinsektycydy muszą być testowane w warunkach produkcyjnych do zwalczania szkodników roślin. Badania przeprowadzone w Polsce w warunkach szklarniowych wykazały, że bioinsektycyd oparty na szczepie Apopka 97 *I. fumosorosea* wykazał 92% skuteczności w zwalczaniu mączlika szklarniowego w uprawie pomidora (Sosnowska i Piątkowski 1996). Poprawski i wsp. (2000) obserwowali lepszą skuteczność szczepów *I. fumosorosea* w zwalczaniu larw L3 mączlika szklarniowego (*T. vaporariorum*) na liściach ogórka niż pomidora. Badacze ci udowodnili, że glikoalkaloidy znajdujące się w pomidorach hamują wzrost tego grzyba. Różną skuteczność szczepów *I. fumosorosea* w stosunku do owadów dorosłych obserwował Avery i wsp. (2015).

Tabela 4. Śmiertelność larw L3-L4 mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum*) po zastosowaniu szczepów *Isaria fumosorosea* (Pfr) i *Beauveria bassiana* (Bb) w teście szalkowym 6 dni po zabiegu [%]

Table 4. Mortality of *Trialeurodes vaporariorum* L3-L4 larvae in dishes test after using *Isaria fumosorosea* (Pfr) and *Beauveria bassiana* (Bb) strains 6 days after treatment [%]

Szczep Strain	Śmiertelność Mortality
Pfr 311 A	58,9 ± 16,39 b*
Pfr 312 A	23,0 ± 24,72 a
Pfr 108 A	8,9 ± 12,96 a
Bb 311 B	7,6 ± 10,48 a
Kontrola – Control	0 ± 0 a

± SD – odchylenie standardowe – Standard Deviation
*wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy α = 0,05 – data marked with the same letter do not differ statistically at α = 0.05

Tabela 5. Śmiertelność larw L3-L4 mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum*) po zastosowaniu szczepów *Isaria fumosorosea* (Pfr) i *Beauveria bassiana* (Bb) w teście doniczkowym 4 i 7 dni po zabiegu [%]

Table 5. Mortality of *Trialeurodes vaporariorum*on L3-L4 larvae in pots test after using *Isaria fumosorosea* (Pfr) and *Beauveria bassiana* (Bb) strains 4 and 7 days after treatment [%]

Szczep Strain	Śmiertelność – Mortality	
	po 4 dniach after 4 days	po 7 dniach after 7 days
Pfr 311 A	43,5 ± 15,69 bc*	87,1 ± 13,84 d*
Pfr 312 A	42,6 ± 13,46 bc	79,0 ± 19,13 cd
Bb 311 B	24,8 ± 17,79 ab	65,3 ± 27,51 cd
Kontrola – Control	0 ± 0 a	0 ± 0 a

± SD – odchylenie standardowe – Standard Deviation
*wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy α = 0,05 – data marked with the same letter do not differ statistically at α = 0.05

Spośród dwóch badanych gatunków grzybów, *I. fumosorosea* okazał się skuteczniejszy niż *B. bassiana* w stosunku do obu rozpatrywanych szkodników. Za najlepszy szczep *I. fumosorosea* można uznać Pfr 311 A, który wyróżniał się pod względem patogeniczności i produktywności zarodników. Przypuszczać należy, że grzyb może być patogeniczny w stosunku do wielu innych szkodników. Zróżnicowanie aktywności szczepów grzyba *I. fumosorosea* w stosunku do różnych szkodników jest znane z literatury. Zemek i wsp. (2012) wykazali, że szczepy tego grzyba powodowały śmiertelność sówki bawełnówki egipskiej *Spodoptera littoralis* od 65 do 93%. Śmiertelność owadów wynosiła od 56 do 98% w zależności od zastosowanego szczepu grzyba. Chow i wsp. (2018) piszą wszakże, że szczepy *I. fumosorosea* nie były patogeniczne w stosunku do chrząszczy kózki azjatyckiej (*Anoplophora glabripennis*), natomiast w stosunku do owadów wysysających soki roślinne, do których należy miodówka obserwowali spasożytowanie tym gatunkiem grzyba. Corrêa i wsp. (2020) badali w Brazylii skuteczność blastospor różnych izolatów *B. bassiana* i *Cordyceps fumosorosea* w stosunku do szkodników soi, takich jak: *Bemisia tabaci*, *Spodoptera frugiperta* i *Chrysadeixis includens*. Najbardziej skuteczny był izolat ESALQ-1296 grzyba *C. fumosorosea*.

Zaprezentowane badania potwierdzają istnienie znacznego zróżnicowania patogeniczności szczepów *I. fumosorosea* w stosunku do szkodników i celowość poszukiwania najbardziej aktywnych izolatów. Podnoszenie skuteczności metod biologicznych w praktyce rolniczej z wykorzystaniem grzybów owadobójczych wymaga dokładnych i często żmudnych badań szczepów w obrębie jednego gatunku grzyba. Poszukiwanie najbardziej wirulentnych szczepów jest ogromnym wyzwaniem dla naukowców i firm produkujących biopreparaty. Oczekiwania społeczne znacznej redukcji chemicznych środków ochrony roślin i idące w ślad za tym zmiany prawne wychodzą naprzeciw metodom biologicznym, w tym poszukiwaniu najbardziej skutecznych bioinsektycydów.

Wnioski / Conclusions

1. Szczep Pfr 311 A grzyba owadobójczego *I. fumosorosea* może być potencjalnym kandydatem do badań pod kątem możliwego wykorzystania w produkcji bioinsektycydu.
2. Szczep Pfr 311 A istotnie najintensywniej zarodnikował w temperaturze 20°C, a najintensywniejszy wzrost wykazał w temperaturze 25°C.
3. Szczep Pfr 311 A był najskuteczniejszy w zwalczaniu mszycy zbożowej (*S. avenae*) i larw L3-L4 mączlika szklarniowego (*T. vaporariorum*) w warunkach kontrolowanych.
4. Skuteczność grzybów owadobójczych w zwalczaniu szkodników jest uzależniona od gatunku i właściwości szczepów.

Literatura / References

Abebe N., Negri M., Getu E., Selvaraj T. 2020. Effect of integrating entomopathogenic fungi and botanical extracts against Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* Mordwilko (Hemiptera: Aphididae) in West Showa, Ethiopia. Journal of Entomology and Nematology 12 (1): 18–24. DOI: 10.5897/JEN2019.0244

Avery P.B., Simmonds M.S.J., Faull J. 2015. Comparative growth and efficacy of Trinidadian strains of *Isaria fumosorosea* blastospores for controlling *Trialeurodes vaporariorum* on bean plants. Journal of Biopesticides 8 (1): 1–12.

Behle R., Garcia C., Tamez-Guerra P., McGuire M.R. 2006. Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. Southwestern Entomologist 31 (4): 289–295.

Chow A., Dunlap C.A., Jackson M.A., Avery P.B., Patt J.M., Setomou M. 2018. Field efficacy of autodissemination and foliar sprays of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordicipitaceae), for control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), on residential citrus. Journal of Economic Entomology 111 (5): 2089–2100. DOI: 10.1093/jee/toy216

Corrêa B., da Silveira Duarte V., Silva D.M., Mascarin G.M., Delalibera Júnior I. 2020. Comparative analysis of blastospore production and virulence of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps fumosorosea* against soybean pests. BioControl 65: 323–337. DOI: 10.1007/s10526-020-09999-6

De Faria M.R., Wraight S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43 (3): 237–256. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2007.08.001

Elmekabaty M.R., Hussain M.A., Ansari M.A. 2020. Evaluation of commercial and non-commercial strains of entomopathogenic fungi against large raspberry aphid *Amphorophora idaei*. BioControl 65: 91–99. DOI: 10.1007/s10526-019-09981-x

Fargues J., Maniania N.K., Delmas J.C., Smits N. 1992. Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes. Agronomie 12 (7): 557–564.

Ferron P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology Biological 23: 409–442. DOI: 10.1146/annurev.en.23.010178.002205

Fiedler Ż., Sosnowska D. 2006. Wpływ temperatury na efektywność patogenów grzybowych w ograniczaniu liczebności różnych stadiów rozwojowych *Frankliniella occidentalis* (Pergande). [The influence of temperature on effectiveness of the fungi pathogens in reduction of difference stages of *Frankliniella occidentalis* (Pergande)]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 46 (2): 487–490.

Gandarilla-Pacheco F.L., Elias-Santos M., Aleman-Huerta M.E., de Luna-Santillana E. de J., Quintero-Zapata I. 2019. Conidia production of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) in organic substrates through two propagation techniques. Bioscience Journal 35 (4): 1227–1236. DOI: 10.14393/BJ-v35n4a2019-42107

Gillespie A.T., Moorhouse E.R. 1990. The use of fungi to control pests of agricultural and horticultural importance. s. 55–84. W: Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth: 16 (British Mycological Society Symposia, Series Number 16) (J.M. Whipps, R.D. Lumsden, red.). Cambridge University Press, 316 ss. ISBN 978-0521382366.

Hall R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. s. 483–498. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980 (H.D. Burges, red.). Academic Press, London, 949 ss. ISBN 978-012-143-36-04.

Henderson C.F., Tilton E.W. 1955. Tests with acaricides against the brown wheat mite. Journal of Economic Entomology 48 (2): 157–161.

Karg J., Bałazy S. 2009. Wpływ struktury krajobrazu na występowanie agrofagów i ich antagonistów w uprawach rolniczych. [Effect of landscape structure on the occurence of agrophagous pests and their antagonists]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 49 (3): 1015–1034.

Kepler R.M., Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Quandt C.A., Sung G.-H., Rehner S.A., Aime M.C., Henkel T.W., Sanjuan T., Zare R., Chen M., Li Z., Rossman A.Y., Spatafora J.W., Shrestha B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordicipitaceae* (*Hypocreales*). IMA Fungus 8: 335–353. DOI: 10.5598/imafungus.2017.08.02.08

Khachatourians G.G., Qazi S.S. 2008. Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology. W: Human and Animal Relationships. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research) Vol. 6 (A.A. Brakhage, P.F. Zipfel, red.). Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-540-79306-9. DOI: 10.1007/978-3-540-79307-6_3

Lindquist R. 1996. Microbial control of greenhouse using entomopathogenic fungi in the USA. IOBC/WPRS Bulletin 19 (9): 153–156.

Lipa J.J. 1967. Zarys patologii owadów. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 342 ss.

Marrone P.G. 1999. Microbial pesticides and natural products as alternatives. Outlook on Agriculture 28 (3): 149–154. DOI: 10.5367/000000099101292917

Meekes E.T.M. 2001. Entomopathogenic fungi against whiteflies: tritrophic interactions between *Aschersonia* species, *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia argentifolii*, and glasshouse crops. Ph.D. Thesis. Department of Entomology, Wageningen University, 181 ss.

Miętkiewski R., Tkaczuk C., Żurek M., van der Geest L.P.S. 1994. Temperature requirements of four entomopathogenic fungi. Acta Mycologica 29 (1): 109–120. DOI: 10.5586/am.1994.012

Nazir T., Basit A., Hanan A., Majeed M.Z., Qui D. 2019. *In vitro* pathogenicity of some entomopathogenic fungal strains against green peach aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Agronomy 9 (1): 7. DOI: 10.3390/agronomy9010007

Parades F.M., Hernandez F.M., Loera O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33: 57. DOI: 10.1007/s.11274-017-2229-2

Poprawski T.J., Greenberg S.M., Ciomperlik M.A. 2000. Effect of host plant on *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* – induced mortality of *Trialeurodes vaporariorumm* (Homoptera: Aleyrodidae). Environmental Entomology 29 (5): 1048–1053. DOI: 10.1603/0046-225X-29.5.1048

Posada F.J., Vega F.E. 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. Journal of Insect Science 5 (1): 37. DOI: 10.1093/jis/5.1.37

Ravensberg W.J. 2011. A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. Springer, Netherlands, 386 ss. ISBN 978-94-007-0436-7.

Sosnowska D., Piątkowski J. 1996. Efficacy of entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) in greenhouse tomato cultures. W: Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes (P.H. Smits, red.). IOBC/WPRS Bulletin 19 (9): 179–182.

Szafranek B., Maliński E., Nawrot J., Sosnowska D., Ruszkowska M., Pihlaja K., Trumpakaj Z., Szafranek J. 2001. *In vitro* effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. ARKIVOC 2001: 81–94.

Tkaczuk C., Król A., Majchrowska-Safaryan A., Niecewicz Ł. 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated as conventional and organic system. Journal of Ecological Engineering 15 (4): 137–144. DOI: 10.12911/22998993.1125468

Tkaczuk C., Krzyczkowski T., Wegensteiner R. 2012. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from mid-field woodlots and adjacent small-scale arable fields. [Występowanie grzybów entomopatogenicznych w glebach z zadrzewień śródpolnych i sąsiadujących z nimi małoobszarowych pól uprawnych]. Acta Mycologica 47 (2): 191–202.

Vandenberg J.D. 1996. Standardized bioassay and screening of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). Journal of Economic Entomology 89 (6): 1418–1423. DOI: 10.1093/jee/89.6.1418

Yeo H., Pell J.K., Alderson P.G., Clark S.J., Pye B.J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Management Science 59 (2): 156–165. DOI: 10.1002/ps.622

Zemek R., Hussein H.M., Prenerova E. 2012. Laboratory evaluation of *Isaria fumosorosea* against *Spodoptera littoralis*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University 77 (4): 685–689.

Zimmerman G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. Biocontrol Science and Technology 18 (9): 865–901. DOI: 10.1080/09583150802471812

Zimmermann G. 1986. The "Galleria bait method" for detection of entomopathogenic fungi in soil. Journal of Applied Entomology 102 (1–5): 213–215. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x