

## **PRZYDATNOŚĆ POŻYWEK DO WYKRYWANIA GRZYBÓW WYSTĘPUJĄCYCH NA CIELE CHOWACZY ŁODYGOWYCH (*CEUTORHYNCHUS PALLIDACTYLUS* I *C. NAPI*) ZASIEDLAJĄCYCH ROŚLINY RZEPAKU OZIMEGO**

MAGDALENA PODRALSKA<sup>1</sup>, ZDZISŁAW KLUKOWSKI<sup>1</sup>, EWA MOSZCZYŃSKA<sup>2</sup>

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Katedra Ochrony Roślin  
Pl. Grunwaldzki 24A, 50-363 Wrocław  
zklukowski@up.wroc.pl

<sup>1</sup> Zakład Entomologii Rolniczej

<sup>2</sup> Zakład Fitopatologii i Mikologii

### **I. WSTĘP**

Badania nad rolą owadów w rozprzestrzenianiu zarodników grzybów wymagają opracowania prostych, niedrogich i szybkich analiz mikologicznych. Obecność zarodników grzybów na powierzchni ciała owadów można stwierdzić, wykorzystując mikroskop optyczny (Jankovský i wsp. 2003) lub izolując zarodniki grzybów z powierzchni ciała różnych gatunków (Dillard i wsp. 1998). Metody te, co prawda, pozwalają określić zbiorowiska grzybów na powierzchni ciała, jednak znaczna pracochłonność oraz koszty realizacji uniemożliwiają stosowanie ich na większą skalę. Ponadto oznaczanie zarodników nawet na podstawie fotografii skaningowej może być obciążone wysokim błędem.

Wybór odpowiedniej pożywki uzależniony jest od rodzaju przeprowadzonego doświadczenia, badanego materiału oraz gatunku rośliny z jakiej został pozyskany. Problem z wyborem pożywek, w badaniu grzybów fitopatogenicznych przenoszonych przez chowacze, wynika z liczby gatunków grzybów oraz nierównomiernego ich wzrostu. Dlatego ważny jest wybór takiego podłoża, które pozwoli na najlepsze określenie składu gatunkowego grzybów występujących na ciele chowaczy łodygowych. Identyfikacji stopnia transmisji czynników chorobotwórczych przez owady od dawna poświęcano najwięcej uwagi, głównie w badaniach nad wykorzystaniem ich w ochronie biologicznej (Yamoah 2007) oraz podczas badań nad gatunkami grzybów entomopatogenicznych (Malinowski 2009).

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie metody pozwalającej na prostą i niedrogą analizę mikologiczną, umożliwiającą identyfikację gatunków ważnych w uprawie rzepaku, przenoszonych przez chowacze łodygowe *Ceutorhynchus pallidactylus* Marsh. i *C. napi* Gyll.

## II. MATERIAŁ I METODY

Izolacja zarodników grzybów, z powierzchni ciała chrząszczy, wiąże się z pozyskaniem materiału do analiz mikologicznych. W okresie nalotu chrząszczy oraz ich żeru uzupełniającego (kwiecień) pobierano próby trzykrotnie z uprawy rzepaku ozimego nieobjętego zabiegami ochrony. Odłowione osobniki umieszczano w sterylnych probówkach Eppendorf, które natychmiast schładzano.

Po przewiezieniu do laboratorium, próbówki Eppendorf z chrząszczami uzupełniano sterylną wodą do objętości 1,5 cm<sup>3</sup>, a następnie wytrząsano na termomikserze. Uzyskany w ten sposób materiał przenoszono do szklanych probówek i uzupełniano sterylną wodą do objętości 10 cm<sup>3</sup> i ponownie mieszano. Przygotowaną zawiesinę dozowano mikropipetą, w ilości po 1,5 cm<sup>3</sup> na zestawoną pożywkę na płytkach Petriego.

W analizie porównawczej wykorzystano cztery pożywki:

- PDA (Potato Dextrose Agar LAB – AGAR, BIOCORP) zakwaszoną 12 ml w 1 litrze 50% kwasu cytrynowego (standard);
- PDA wzbogaconą streptomycyną (0,015 g w 1 litrze);
- Martina (róż bengalski i chloramfenikol, Rose Bengal LAB – AGAR, BIOCORP);
- maltozową (Malt Extract LAB, AGAR, agar na brzeczce, BIOCORP).

Po dziesięciu dniach inkubacji w temperaturze 26°C, liczone kolonie grzybów strzępkowych, kolonie drożdżoidalne oraz bakterie. Pojawiające się kolonie grzybów sukcesywnie odszczepiano na skosy agarowe, w celu uzyskania czystych kultur, które następnie zidentyfikowano do gatunku według dostępnych kluczy.

Uzyskane wyniki po opracowaniu statystycznym (ANOVA; post-hoc test Tukeya) pozwoliły na wybór pożywki najlepiej nadającej się do analizowania składu gatunkowego grzybów, zasiedlających ciało chrząszczy chowaczy łądogowych, pozyskanych z uprawy rzepaku ozimego.

## III. WYNIKI I DISKUSJA

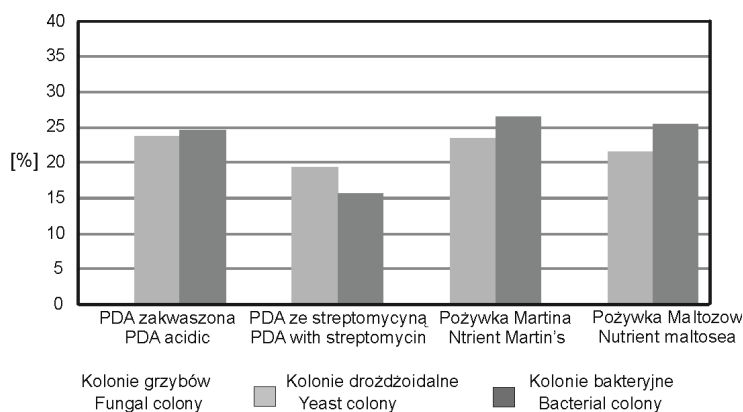
Z powierzchni ciała chowaczy łądogowych wyizolowano 24 gatunki grzybów, *Abisidia* spp., *Alternaria* spp., *Chaetomium* spp., *Chloridium* spp., *Mortierella* spp., *Penicillium* spp., kolonie drożdżoidalne oraz bakterie (rys. 3–5).

Całkowita liczba kolonii uzyskanych na czterech testowanych pożywkach wynosiła 3561 izolatów, przy czym połowę stanowiły kolonie drożdżoidalne oraz bakterie. Najliczniej reprezentowane były grzyby pleśniowe z rodzaju *Cladosporium*, *Alternaria* oraz *Penicillium*, chociaż jak podaje Macura (2008) najlepszymi podłożami dla rozwoju pleśni są pożywki Sabourauda oraz Czapek-Doxa, na których grzyby pleśniowe bardzo dobrze wytwarzają owocniki.

Gatunki mogące być patogenami w uprawie rzepaku, takie jak: *Alternaria alternata*, *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium lecanii* stanowiły 17,3% ogółu uzyskanych kolonii. Udział tych gatunków, jak sugeruje Ruszkiewicz-Michalska (2006) uwarunkowana jest, oddziaływaniem różnorodnych czynników ekologicznych: abiotycznych i biotycznych oraz zróżnicowaniem genetycznym populacji roślin i grzybów, konkurencją, stosunkami antagonistycznymi i oddziaływaniami synergistycznymi między gatunkami pasożytniczymi, saprotroficznymi i endofitycznymi zasiedlającymi ten sam substrat.

Na pożywce maltozowej uzyskano największy procentowy udział wyizolowanych mikroorganizmów (32%), natomiast na PDA wzbogaconej streptomycyną stanowiły one 14% ogółu wyizolowanych kolonii.

Największy procentowy udział grzybów (65%) oraz najniższy udział kolonii bakteryjnych (19%) uzyskano na pożywce PDA ze streptomycyną. Na pozostałych badanych pożywkach grzyby stanowiły połowę wszystkich wyosobnionych mikroorganizmów (rys. 1).



Rys. 1. Udział poszczególnych grup mikroorganizmów wyizolowanych na badanych pożywkach [%]  
Fig. 1. Contribution of microorganism groups isolated on different culture media [%]

Błażej i Tekieła (2002) zaobserwowały natomiast większą ilość kolonii grzybowych na zakwaszanej pożywce glukozowo-ziemniaczanej w porównaniu do pożywki niezakwaszanej. Na tych ostatnich bakterie pokrywały od 5 do 80% powierzchni szalek.

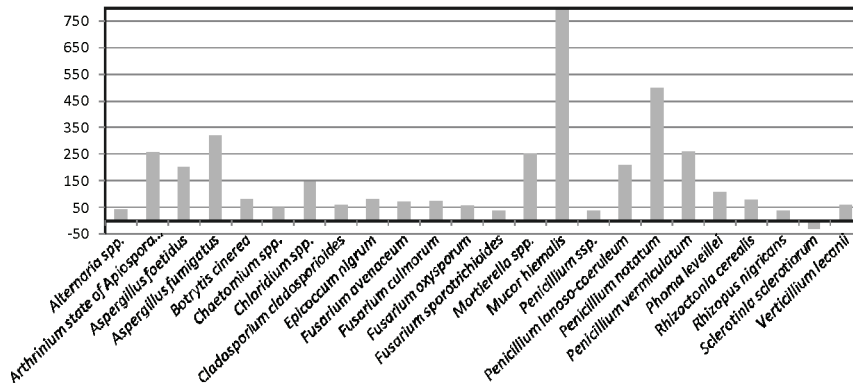
Pożywka maltozowa, w porównaniu do średniej z pożywek standardowych, wykazała selektywność dla następujących gatunków grzybów: *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium lanoso-coeruleum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium vermiculatum*, *Mortierella* spp., *Mucor hiemalis*. Natomiast gatunki patogeniczne dla rzepaku ozimego, takie jak: *Alternaria* spp., *P. lingam*, *S. sclerotiorum* i *V. lecanii* były izolowane sporadycznie (rys. 2).

Pożywka Martina największą selektywność wykazywała dla grzybów z rodzaju *Chaetomium*. Liczebność *Epicoccum nigrum* kształtowała się na poziomie średniej z pożywek standardu. Pozostałe gatunki grzybów: *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *P. lingam*, *S. sclerotiorum* i *V. lecanii* były izolowane mniej licznie (rys. 3). Pożywka Martina wykorzystywana może być również jako podłoże uzyskania szerokiego spektrum mikroorganizmów (Bryk i wsp. 2009).

Na pożywce PDA z dodatkiem streptomycyny uzyskano najmniejszą liczbę kolonii mikroorganizmów, przy jednoczesnym najwyższym procentowym udziale grzybów. Spośród wszystkich badanych pożywek, na podłożu tym, kolonie grzyba *S. sclerotiorum* były hodowane najliczniej (rys. 4).

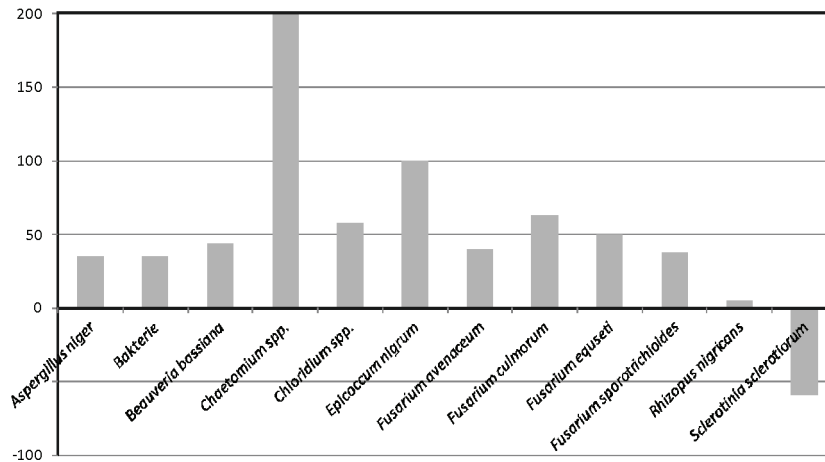
Pożywka PDA ze streptomycyną wzbogacona dodatkowo pentachloronitrobenzenem stosowana była również przez Ben-Yephet i Bitton (1985), co pozwoliło na zaha-

mowanie rozwoju rodzajów *Mucor* spp. i *Rhizopus* spp., bez wpływu na kiełkowanie askospor *S. sclerotiorum* oraz produkcję przetrwalników.



Rys. 2. Struktura ilościowa grzybów uzyskana na pożywce maltozowej [%]

Fig. 2. The quantitative fungi structure obtained on maltose nutrient medium [%]



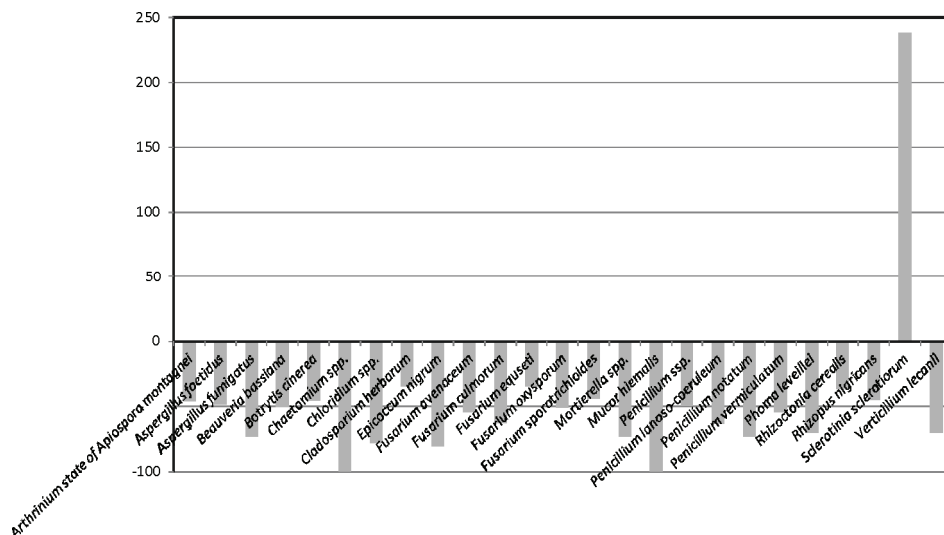
Rys. 3. Struktura ilościowa grzybów uzyskana na pożywce Martina

Fig. 3. The quantitative fungi structure obtained on Martin nutrient medium

Podczas przeprowadzonych analiz wyodrębniono trzy gatunki, w przypadku których zaobserwowano istotny wpływ rodzaju podłoża na ich rozwój. Ponadto liczebność *Cladospirium herbarum*, uzyskanych z powierzchni chowaczy łądgowych, na podłożu PDA ze streptomycyną, była niższa w porównaniu do pozostałych.

Na pożywce PDA z dodatkiem streptomycyny odnotowano istotnie najniższą statystycznie różnicę dotyczącą liczebności kolonii drożdżoidalnych, spośród wszystkich grup homogenicznych. W przypadku pozostałych trzech pożywek, liczebność kolonii była

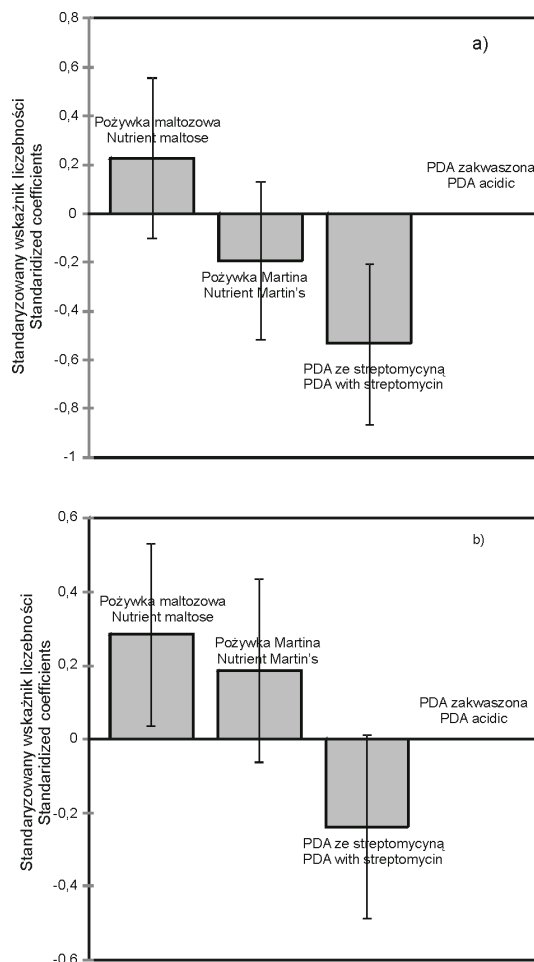
zbliżona i wyraźnie wyższa. Również kolonie bakteryjne były najmniej licznie izolowane na pożywce PDA z dodatkiem streptomycyny, natomiast największą liczebność tych kolonii uzyskano na pożywce Martina (rys. 5). Różnica ta była istotna statystycznie.



Rys. 4. Struktura ilościowa grzybów uzyskana na pożywce PDA ze streptomycyną

Fig. 4. The quantitative fungi structure obtained on PDA with streptomycin nutrient medium

W celu wyizolowania określonych gatunków mikroorganizmów w mykologii stosuje się różne metody zwiększania selektywności stosowanych podłoży hodowlanych. Znając wrażliwość i biologię gatunków, można zastosować inhibitory wzrostu niepożądanego mikroorganizmów lub dodatek stymulatorów wzrostu do podłoża. Podczas próby uzyskania określonych gatunków grzybów istnieje możliwość stosowania w podłożach dodatku fungicydów. Ben-Yephet i Bitton (1985) w badaniu nad rozprzestrzenianiem askospor *S. sclerotiorum* w celu ograniczenia liczby kolonii na eksponowanych podłożach, stosowali pożywki wzbogacone pentachloronitrobenzenem (PCNB), który wykazuje toksyczność dla *S. sclerotiorum* oraz innych gatunków występujących w siedlisku. Natomiast Steadman i wsp. (1994) w celu uzyskania podłoża półselektywnego, oprócz PCNB stosowali dodatkowo streptomycynę oraz błękit bromofenolowy. Wcześniej selektywność tych składników wykorzystali Kritzman i Netzer (1978) dla *Botrytis* spp. W przypadku analizowania składu mikroflory ciała owadów, dobór podłoża ma niezmiernie istotne znaczenie. Zastosowanie substancji hamującej lub ograniczającej wzrost kolonii, może spowodować zawężenie spektrum gatunkowego badanych mikroorganizmów. Proponowana pożywka umożliwi badanie roli chowaczy (*Ceutorhynchus* sp.) nie tylko jako wektorów chorób rzepaku, lecz również jako potencjalnego czynnika umożliwiającego zwalczanie chwastów. Na kontynencie północnoamerykańskim prowadzone są badania nad biologicznym zwalczaniem ostrożeńa polnego (*Cirsium arvense*) przez *Ceutorhynchus litura* F. i galasówkę *Urophora cardui* Meigen (Bond i wsp. 2004).



Rys. 5. Standaryzowany wskaźnik liczebności kolonii drożdżoidalnych (a.) i bakteryjnych (b.) uzyskanych na testowanych pożywkach (porównawczo do PDA zakwaszonego)

Fig. 5. The standardized coefficient of the number yeast and bacterial colony obtained on tested nutrient media (compare to acidic PDA)

#### IV. WNIOSKI

1. Tempo wzrostu oraz struktura ilościowa kolonii grzybów, organizmów drożdżoidalnych oraz bakteryjnych wykazywała zróżnicowanie w zależności od zastosowanego podłoża.
2. Pożywka PDA ze streptomycyną istotnie statystycznie najsilniej ograniczała rozwój kolonii drożdżoidalnych oraz bakteryjnych.
3. Najwyższy procentowy udział gatunków fitopatogenicznych grzybów zasiedlających powierzchnię ciała chowaczy łądogowych (*C. pallidactylus* oraz *C. napi*) uzyskano na pożywce PDA ze streptomycyną.

## V. LITERATURA

- Ben-Yephet Y., Bitton S. 1985. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica* 13: 33–40.
- Błażej J., Tekiel A. 2002. Występowanie grzybów pasożytniczych i konkurencyjnych dla pieczarki (*Agaricus bisporus* (Lange) Sing) w różnych podłożach i okrywie. *Hortorum Cultus* 1 (2): 33–41.
- Bond W., Turner R. 2004. The biology and non-chemical control of Creeping Thistle (*Cirsium arvense*). <http://www.gardenorganic.org.uk/organicweeds>
- Bryk H., Marcinkowska J., Krzewińska D. 2009. Porównanie zbiorowisk grzybów występujących w glebie zmęczonej i nowinie. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 49 (3): 1255–1259.
- Dillard H.R., Cobb A.C., Lamboy J.S. 1998. Transmission of *Alternaria brassicicola* to cabbage by flea beetles (*Phyllotreta cruciferae*). *Plant Dis.* 82 (2): 153–157.
- Jankovský L., Novotný D., Mrkva R. 2003. Induced wound response of Norway spruce *Picea abies* P. Karst. after artificial inoculation by imagoes of *Ips typographus* L. *J. Forest Sci.* 49 (9): 403–411.
- Kritzman G., Netzer D. 1978. A selective medium for isolation and identification of *Botrytis* spp. from soil and onion seed. *Phytoparasitica* 6: 3–7.
- Macura A.B. 2008. Diagnostyka grzybów. Część II. Diagnostyka grzybów pleśniowych. *Diagnosta laboratoryjny* nr 3 (18): 4–5.
- Malinowski H. 2009. Entomopatogeniczne grzyby jako insektycydy w ochronie lasu. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 49 (2): 865–873.
- Ruszkiewicz-Michalska M. 2006. Phytoparasitic micromycetes in plant communities of the Wyżyna Częstochowska upland. *Monogr. Bot.* 96, 142 pp.
- Steadman J.R., Marcinkowska J., Rutledge S. 1994. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 68–70.
- Yamoah E. 2007. A model system using insects to vector *Fusarium tumidum* for biological control of gorse (*Ulex europaeus*). National Centre for Advanced Bio-Protection Technologies, Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 213 pp.

MAGDALENA PODRALSKA, ZDZISŁAW KLUKOWSKI, EWA MOSZCZYŃSKA

### USEFULNESS OF CULTURE MEDIA TO THE DETECTION THE FUNGI OCCURRING ON THE STEM WEEVILS BODY (*CEUTORHYNCHUS PALLIDACTYLUS* & *C. NAPI*) INFESTING OILSEED RAPE PLANTS

#### SUMMARY

The aim of study was to compare four nutrient media from usefulness point of view for further analysis of fungi inhabiting stem weevils body. Yeast and bacterial organisms were amount a half of all colonies. Essential differences between media concern quantity of microorganisms species. The largest proportional part of fungi was reached on nutrient medium PDA with streptomycin. Species characterized as a pathogenic to oilseed rape plants, accounted for 17.3% of all colonies. Also on PDA with streptomycin, *Sclerotinia sclerotiorum* was isolated in the greatest colony number.

**Key words:** stem weevils, PDA with streptomycin, *Sclerotinia* sp., *Ceutorhynchus pallidactylus*, *Ceutorhynchus napi*