PROGRESS IN PLANT PROTECTION
62 (3): 151–158, 2022
eISSN 2084-4883

DOI: 10.14199/ppp-2022-017
Published online: 08.07.2022

Received: 21.02.2022 / Accepted: 10.05.2022

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Wpływ temperatury na wzrost akaropatogenicznych grzybów z rodzaju *Hirsutella*

The effect of temperature on the growth of acaropathogenic fungi from *Hirsutella* genus

Cezary Tkaczuk[1,A], Anna Majchrowska-Safaryan[1,B]*, Tomasz Krzyczkowski[1], Marta Wrzosek[2,C]

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu temperatury na wzrost czterech gatunków grzybów akaropatogenicznych z rodzaju *Hirsutella* (wyizolowanych z roztoczy) hodowanych w warunkach *in vitro* na dwóch podłożach Sabourauda (SDA) i Czapek-Dox. W warunkach laboratoryjnych zbadano wpływ siedmiu zakresów temperatury (5–35°C). Obserwacje wzrostu kolonii prowadzono co 5 dni aż do 25 dnia mierząc średnice kolonii w mm. Obliczono tempo wzrostu testowanych izolatów w mm na dzień. Przeprowadzone badania wykazały, że optimum termiczne większości testowanych izolatów grzybów z rodzaju *Hirsutella* zawierało się między 20°C a 25°C, przy czym poszczególne wartości były zróżnicowane w zależności od rodzaju pożywki, na której rozwijało się inokulum. Gatunkiem grzyba, który charakteryzował się największym zakresem temperaturowym wzrostu kolonii był grzyb *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa*. Był to jedyny spośród badanych szczepów grzybów akaropatogenicznych, który rozwijał się na obydwu typach podłoży hodowlanych, również w temperaturze 35°C. Najszybsze tempo wzrostu badanych izolatów grzybów akaropatogenicznych odnotowano przy temperaturze 25°C. Kultury badanych gatunków grzybów większe rozmiary osiągały na pożywce SDA niż na pożywce Czapek-Dox.

Słowa kluczowe: grzyby akaropatogeniczne, *Hirsutella* spp., temperatura, tempo wzrostu, podłoże hodowlane

Abstract

The aim of the study was to determine the effect of temperature on the growth of four species of acaropathogenic fungi of the genus *Hirsutella* (isolated from mites) grown *in vitro* on Sabouraud (SDA) and Czapek-Dox media. The effects of seven temperature ranges (5–35°C) were tested under laboratory conditions. Observations of colony growth were carried out every 5 days until day 25 by measuring the diameter of the colonies in mm. The growth rate of the test isolates was calculated in mm per day. The conducted studies showed that the thermal optimum of most of the tested isolates of acaropathogenic fungi of the genus *Hirsutella* was between 20°C and 25°C, with individual values varying depending on the type of medium on which the inoculum was developed. The fungus species with the highest temperature range of colony growth was *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa*. It was the only acaropathogenic fungus strain tested that developed on both types of culture medium, also at 35°C. The fastest growth rate of the tested isolates of acaropathogenic fungi was at 25°C. The cultures of the tested species of fungi reached larger sizes on the SDA medium rather than on Czapek-Dox medium.

Key words: acaropatogenic fungi, *Hirsutella* spp., temperature, growth rate, growing medium

[1]Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
Wydział Agrobioinżynierii i Nauk o Zwierzętach, Instytut Rolnictwa i Ogrodnictwa
ul. Bolesław Prusa 14, 08-110 Siedlce
[2]Uniwersytet Warszawski, Ogród Botaniczny
ul. Aleje Ujazdowskie 4, 00-478 Warszawa
*corresponding author: anna.majchrowska-safaryan@uph.edu.pl
ORCID: [A]0000-0002-4096-2154, [B]0000-0002-1931-8508, [C]0000-0002-5871-5020

Wstęp / Introduction

Grzyby patogeniczne względem roztoczy stanowią stosunkowo nieliczną grupę (około 50 gatunków) w porównaniu z ponad tysiącem gatunków znanych z patogeniczności względem owadów (Van der Geest i wsp. 2000; Bałazy i wsp. 2008). W sprzyjających warunkach termiczno-wilgotnościowych grzyby te intensywnie zarodnikują na ciele martwego roztocza, stwarzając tym samym warunki do rozprzestrzeniania się mykozy w populacji gospodarza (Tkaczuk i wsp. 2004; Bałazy i wsp. 2008). Najczęstszymi patogenami występującymi w zbiorowiskach roztoczy żerujących na roślinach i w drewnie zasiedlonym przez owady są gatunki grzybów z rodzaju *Hirsutella*. Dotychczas w różnych siedliskach w Europie rozpoznano 13 gatunków tych grzybów (Bałazy i wsp. 2008), ale tylko gatunki *H. kirchneri*, *H. necatrix* i *H. thompsonii* (w tym jego odmiana *synnematosa*) mogą być traktowane jako skuteczne oligofagiczne patogeny fitofagicznych roztoczy, choć ich potencjalne zasięgi żywicielskie wydają się obejmować tylko wybrane roztocze z rodzin Eriophyoidea i Tarsonemidae, a niekiedy także Tetranychidae (Lipa 1971; Minter i wsp. 1983; Miętkiewski i wsp. 2000, 2003; Bałazy i wsp. 2008).

Należące do rodziny Ophiocordycipitaceae grzyby z rodzaju *Hirsutella* stanowią bardzo szczególną grupę patogenów owadów i roztoczy, które od innych entomopatogenicznych grzybów, takich jak *Beauveria* czy *Metarhizium*, odróżniają się wolniejszym tempem wzrostu, zmniejszoną sporulacją, specyficznością w stosunku do żywiciela oraz zarodnikami pokrytymi grubą warstwą śluzu (Qu i wsp. 2014, 2017). Miętkiewski i wsp. (2003) stwierdzili, że patogeniczne grzyby z rodzaju *Hirsutella* towarzyszą praktycznie wszystkim populacjom szpecieli występujących na trawach w ciągu całego roku, z kulminacją w miesiącach późnoletnich i jesiennych. Najwyższą śmiertelność powodowały gatunki *H. kirchneri* i *H. thompsonii*, a *H. necatrix* i *H. gregis* były zwykle komponentami towarzyszącymi.

Zdolność do infekowania zdrowych osobników w populacji gospodarza jest jednym z kluczowych elementów w cyklu życiowym patogenu w znaczącym stopniu uzależnionym od czynników abiotycznych. Temperatura jest czynnikiem warunkującym relacje grzyb akaropatogeniczny–gospodarz i w dużej mierze decydującym o sukcesie zwalczania szkodników roślin (Fraguez i Luz 2000), a wymagania termiczne często zróżnicowane są nawet w obrębie jednego gatunku (Devi i wsp. 2005; Alexandre i wsp. 2006). Badania nad termicznymi wymaganiami grzybów entomopatogenicznych wiążą się głównie z określeniem minimalnej i maksymalnej temperatury, w jakiej patogen jest w stanie funkcjonować (Polar i wsp. 2005; Ibarra-Corteś i wsp. 2013).

Grzyby entomo- i akaropatogeniczne wydają się być najbardziej obiecującą grupą patogenów, które mogą być wykorzystane w biologicznym zwalczaniu szkodliwych owadów i roztoczy. W wielu przypadkach istnieje jednak konieczność doboru szczepu o szerokim spektrum tolerancji temperaturowej (Chandler i wsp. 2001; Yeo i wsp. 2003; Piątkowski i Krzyżewska 2007; Sapna i wsp. 2015; Christos i wsp. 2017). Informacja taka jest szczególnie cenna z punktu widzenia potencjalnej produkcji biopreparatów opartych na grzybach entomopatogenicznych na skalę komercyjną, pozwalając zweryfikować warunki termiczne konieczne do utrzymania ich wysokiej patogeniczności.

Celem pracy było określenie wpływu temperatury na wzrost wybranych gatunków grzybów akaropatogenicznych z rodzaju *Hirsutella* hodowanych w warunkach *in vitro* na dwóch podłożach Sabourauda (SDA) i Czapek Solution Agar (Czapek-Dox).

Materiały i metody / Materials and methods

W warunkach laboratoryjnych zbadano wpływ temperatury na wzrost kolonii czterech wybranych gatunków (5 szczepów) grzybów akaropatogenicznych z rodzaju *Hirsutella* wyizolowanych z roztoczy. Charakterystykę izolatów grzybów przedstawiono w tabeli 1. Grzyby izolowane z roztoczy oznaczono makroskopowo za pomocą kluczy (Hodge 1998), co zostało potwierdzone przez badania molekularne. Do identyfikacji wybrano marker ITS, który został zaproponowany jako uniwersalny marker kodu DNA dla grzybów (Schoch i wsp. 2012).

Identyfikację molekularną izolatów przeprowadzono w laboratorium mykologicznym Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskeigo z wykorzystaniem materiałów eksploatacyjnych firm Qiagen oraz Blirt (zestawy do izolacji DNA, zestaw do przeprowadzania reakcji PCR, zestaw do czyszczenia po reakcji). Reakcję PCR przeprowadzono według schematu zamieszczonego w pracy Kovač i wsp. (2020). Przy reakcji sekwencjonowania metodą Sangera wykorzystano pojedyncze startery ITS2, ITS3, ITS4 i ITS5 oraz zestaw BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) zawierający wyznakowane fluorescencyjnie trifosforany dideoksynukleotydów (ddNTP), trifosforany deoksynukleotydów (dNTP), polimerazę Taq FS oraz bufor. Czyszczenie produktu po sekwencjonowaniu przeprowadzono metodą sączenia molekularnego na kolumienkach z wykorzystaniem Sephadex G-50, a odczyt wyniku powierzono firmie Genomed (Warszawa). Uzyskane sekwencje zostały porównane poprzez algorytm BlastN 2.2.2 (Altschul i wsp. 1997) z sekwencjami obecnymi w bazach danych NCBI.

W przeprowadzonym doświadczeniu zostały użyte dwa podłoża hodowlane: podłoże Sabourauda (SDA) o składzie enzymatycznym: hydrolizat kazeiny – 5,0 g, enzymatyczny hydrolizat tkanek zwierzęcych – 5,0 g, glukoza – 40 g, agar – 15,0 g, wyprodukowane przez bioMérieux oraz podłoże Czapek Solution Agar (Czapek-Dox) w skład którego wchodzi: sacharoza – 30,0 g, azotan sodu – 2,0 g, wodoro-

Tabela 1. Charakterystyka izolatów grzybów akaropatogenicznych wykorzystanych w doświadczeniu
Table 1. Characteristics of acaropathogenic fungal isolates used in the experiment

Gatunek grzyba Fungal species	Gatunek roztocza Host mite species	Roślina żywicielska Host plant
Hirsutella thompsonii var. *synnematosa*	podskórnik gruszowy *Eriophyes piri* (Pgst.)	grusza pospolita *Pyrus communis* L.
Hirsutella thompsonii	przędziorek chmielowiec *Tetranychus urticae* Koch.	malina *Rubus idaeus* L.
Hirsutella nodulosa	nieoznaczony gatunek roztocza drapieżnego z rodziny *Phytoseiidae* unspecified species of predatory mite of the *Phytoseiidae* family	malina *Rubus ideaeus* L.
Hirsutella vandergeesti	*Amblyseius angulatus* Karg	jeżyna *Rubus* sp.
Hirsutella gregis	przebarwiacz malinowy *Phyllocoptes gracilis*	malina *Rubus ideaeus* L.

fosforan potasu – 1,0 g, siarczan magnezu – 0,5 g, chlorek potasu – 0,5 g, siarczan żelaza II – 0,01 g, agar – 15 g, wyprodukowane przez Becton Dickinson. Podłoża te były sterylizowane przy użyciu autoklawu parowo-ciśnieniowego w temperaturze 121°C przy ciśnieniu 1 atmosfery. Podłoża zostały przeniesione na sterylne plastikowe szalki Petriego o średnicy 90 mm.

Przed założeniem doświadczenia wybrane izolaty grzybów hodowano na podłożu SDA w temperaturze 21°C ± 1°C. Fragment grzybni z 10-dniowych kultur pobierano za pomocą ezy i inokulowano nim centralnie podłoże stałe SDA oraz Czapek-Dox. Szalki z wyszczepionymi izolatami umieszczono w inkubatorach, bez dostępu światła, w 7 zakresach temperatury: 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 35°C. Obserwacje wzrostu kolonii prowadzono co 5 dni aż do 25 dnia mierząc średnice kolonii w mm. Doświadczenie dla każdego wariantu temperatury wykonano w pięciu powtórzeniach. Obliczono tempo wzrostu kolonii testowanych izolatów w mm na dzień.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem program Statistica 13.3 TIBCO Software Inc. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) (temperatura, rodzaj podłoża hodowlanego) i post-hoc test Tukeya. Wyliczone średnie połączono w jednorodne grupy na poziomie istotności $\alpha < 0,05$.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Optimum termiczne większości testowanych izolatów grzybów akaropatogenicznych z rodzaju *Hirsutella* zawierało się między 20°C a 25°C, przy czym poszczególne wartości były zróżnicowane w zależności od rodzaju pożywki, na którym rozwijało się inokulum.

Analizując wzrost kolonii szczepu grzyba *H. thompsonii* var. *synnematosa* wyizolowanego z podskórnia gruszowego stwierdzono, że na pożywce Sabourauda (SDA) przebiegał on we wszystkich zakresach temperatur z wyjątkiem 5°C (tab. 2, 3). Kolonie testowanego gatunku grzyba osiągały najmniejsze rozmiary w temperaturze 10°C, natomiast optimum temperaturowe wynosiło 30°C. Kolonie te osiągały wówczas średnicę 47 mm w 25 dniu hodowli. Był to jedyny spośród badanych szczepów grzybów akaropatogenicznych, który rozwijał się na obydwu typach podłoży hodowlanych, również w temperaturze 35°C. Uzyskane wyniki badań własnych korespondują z wynikami Edgington i wsp. (2008), którzy zaobserwowali iż wzrost szczepów grzyba *H. thompsonii* wyizolowanych ze szpeciela będącego szkodnikiem palm kokosowych *Aceria guerreronis*, najszybciej zachodził w temperaturze 30°C. Stwierdzili oni również, że wzrost testowanych izolatów był intensywniejszy w temperaturze 35°C niż w przedziale temperatur 20–25°C. Natomiast badania polowe prowadzone przez Demite i Feres (2008) wykazały, iż optimum temperaturowe infekcji szpeciela *Calacarus heveae* przez *H. thompsonii* kształtuje się w przedziale 22,6–25,1°C. Wartości te pokrywają się z optimum termicznym dla wzrostu kolonii tego patogenu wyizolowanego z przędziorka chmielowca *Tetranychus urticae* Koch. uzyskanym w toku badań własnych.

W przypadku pożywki Czapek-Dox, wzrostu kolonii nie zaobserwowano w temperaturach 5°C i 10°C. Kultury *H. thompsonii* var. *synnematosa* osiągały najmniejsze rozmiary w temperaturze 15°C – średnio 3,3 mm, zaś największe w temperaturze 25°C – średnio 13 mm średnicy. Najszybsze tempo wzrostu badanego izolatu grzyba wyrażone w mm/dzień na pożywce SDA oznaczono w przedziale temperaturowym 25–30°C, i wynosiło ono 2 mm/dzień. Znacznie niższe, kształtujące się na poziomie 0,5 mm/dzień przy temperaturze 20–25°C tempo dziennego wzrostu izolatu *H. thompsonii* var. *synnematosa*, stwierdzono w przypadku zastosowania podłoża Czapek-Dox (rys. 1). Jak donoszą Chandrapatya i Dilokkunanant (1989), grzyb *H. thompsonii*

Tabela 2. Rozmiary średnicy kolonii [mm] grzybów akaropatogenicznych rozwijających się w różnych zakresach temperatur w 25 dniu hodowli na podłożu Sabourauda (SDA)
Table 2. Colony diameter sizes [mm] of acaropathogenic fungi developing in different temperature ranges on the 25th day of culture on Sabouraud's substrate (SDA)

Gatunek Species	Temperatura hodowli – Breeding temperature [°C]						
	5	10	15	20	25	30	35
Hirsutella thompsonii var. *synnematosa*	BW*	4,5 a	13 b	6 ab	30 c	47 d	12,8 b
Hirsutella thompsonii	BW	4,7 a	8,2 a	24,5 b	26,8 b	5,3 a	BW
Hirsutella nodulosa	BW	5,2 a	9 ab	21,3 b	20,5 b	11,8 ab	BW
Hirsutella vandergeesti	2,8 a	6,5 b	11,3 c	14,5 c	19 c	15,8 c	BW
Hirsutella gregis	BW	4 a	9,8 b	23,5 c	19,7 c	13,2 b	BW

*BW – brak wzrostu – no growth; a – istotność na poziomie α < 0,05 – significance at the level α < 0.05

Tabela 3. Rozmiary średnicy kolonii [mm] grzybów akaropatogenicznych rozwijających się w różnych zakresach temperatur w 25 dniu hodowli na podłożu Czapek-Dox
Table 3. Colony diameter sizes [mm] of acaropathogenic fungi developing in different temperature ranges on the 25th day of culture on Czapka's substrate

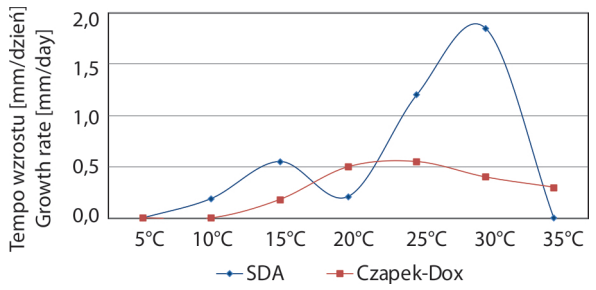
Gatunek Species	Temperatura hodowli – Breeding temperature [°C]						
	5	10	15	20	25	30	35
Hirsutella thompsonii var. *synnematosa*	BW*	BW	3,3 a	12,3 d	13 d	10 c	6 b
Hirsutella thompsonii	BW	BW	3 a	6 b	5,2 b	BW	BW
Hirsutella nodulosa	BW	BW	9,2 b	10,7 b	11,7 b	6,3 a	BW
Hirsutella vandergeesti	3 a	5,3 a	8,3 ab	10,2 b	12 b	7,5 ab	BW
Hirsutella gregis	BW	BW	4,2 a	7,5 b	8 b	5,8 a	BW

*BW – brak wzrostu – no growth; a – istotność na poziomie α < 0,05 – significance at the level α < 0.05

var. *synnematosa* może być z powodzeniem hodowany na różnych podłożach, ale najbardziej przydatne jest podłoże SDA, a następnie pożywka maltozowa i ziemniaczana (PDA). Według wspomnianych autorów optymalna temperatura dla rozwoju grzyba to 27°C (zakres 26–32°C).

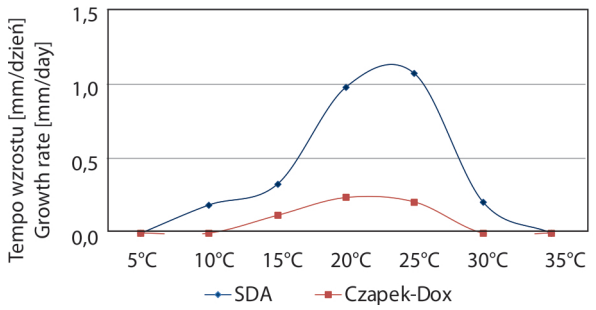
Wzrost kolonii izolatu grzyba *H. thompsonii*, pozyskanego z przędziorka chmielowca, na pożywce SDA przebiegał we wszystkich zakresach temperatur z wyjątkiem 5°C i 35°C (tab. 2, 3). Kultury tego patogenu osiągnęły najmniejszą średnicę w temperaturze 10°C – średnio 4,7 mm, natomiast optimum temperaturowe wynosiło 25°C, średnica kultur w 25 dniu hodowli wyniosła średnio 26,8 mm. Na pożywce Czapek-Dox wzrost grzyba przebiegał w trzech zakresach temperaturowych 15°C, 20°C i 25°C. Jego kolonie w 25 dniu hodowli osiągnęły najmniejszą średnicę przy 15°C (średnio 3 mm), a największą w 20°C (średnio 6 mm). Tempo dziennego wzrostu testowanego izolatu grzyba *H. thompsonii*, niezależnie od zastosowanego typu podłoża było najintensywniejsze w przedziale temperaturowym 20–25°C (rys. 2).

Kenneth i wsp. (1979) oraz McCoy (1981) stwierdzili, że optymalne warunki dla wzrostu, rozwoju procesu infekcyjnego i zarodnikowania *H. thompsonii* to 25–30°C. Z kolei Gerson i wsp. (1979) zaobserwowali, że rozwój tego grzyba zachodzi znacznie wolniej w temperaturze poniżej 13°C i powyżej 35°C. Davidson i wsp. (2003) testując wpływ temperatury na rozwój kolonii 41 szczepów grzybów z rodzajów *Beauveria*, *Hirsutella* (11 szczepów), *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* i *Verticillium*, pod kątem ich przydatności do biologicznego zwalczania groźnego ektopasożyta pszczół roztocza *Varroa destructor*, wykazali że aż osiem izolatów *H. thompsonii* było zdolnych do wzrostu w temperaturze 35°C. Dla trzech izolatów *H. thompsonii* optimum temperaturowe dla rozwoju wynosiło powyżej 30°C i warto podkreślić, że wszystkie te szczepy zostały wyizolowane z żerującego na palmach kokosowych w Afryce – szpeciela *Aceria* (= *Eriophyes*) *guerreonis*. Autorzy powyższego opracowania potwierdzili w swoich badaniach, że testowany przez nich polski izolat *H. thompsonii* var. *synnematosa*, pochodzący podobnie jak badany w tej pracy, ze szpeciela *Eriophyes piri*, również wykazywał wzrost w temperaturze 35°C (Davidson i wsp. 2003). Według Samsona i wsp. (1980) *H. thompsonii* var. *synnematosa* wydaje się być bardziej typowy dla strefy tropikalnej,



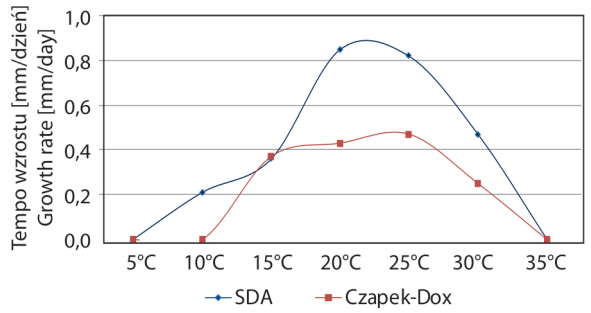
Rys. 1. Tempo dziennego wzrostu grzyba *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa* hodowanego na dwóch podłożach w różnych zakresach temperatur

Fig. 1. The daily growth rate of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa* fungus on two media at different temperature ranges



Rys. 2. Tempo dziennego wzrostu grzyba *Hirsutella thompsonii* hodowanego na dwóch podłożach w różnych zakresach temperatur

Fig. 2. The daily growth rate of *Hirsutella thompsonii* fungus on two media at different temperature ranges



Rys. 3. Tempo dziennego wzrostu grzyba *Hirsutella nodulosa* hodowanego na dwóch podłożach w różnych zakresach temperatur

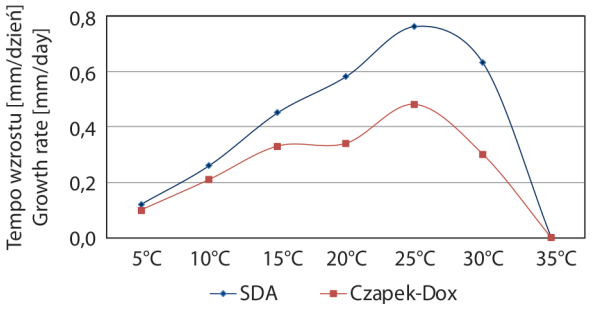
Fig. 3. The daily growth rate of *Hirsutella nodulosa* fungus on two media at different temperature ranges

głównie jako patogen szpecieli z rodzaju *Eriophyes*, z kolei *H. thompsonii* var. *thompsonii* lepsze warunki do rozwoju na roztoczach znajduje w klimacie subtropikalnym. Jednakże prowadzone w okresie ostatnich dekad badania wykazały, że grzyb ten jest również powszechnym patogenem fitofagicznych roztoczy, głównie szpecieli żerujących na trawach i drzewach owocowych w Europie Środkowej, a więc klimacie znacznie chłodniejszym (Minter i Brady 1980; Minter i wsp. 1983; Miętkiewski i wsp. 2003; Bałazy i wsp. 2008). Jak donoszą Miętkiewski i wsp. (2003) grzybowe patogeny z rodzaju *Hirsutella* spotyka się na martwych szpecielach w ciągu całego roku. Kultury *H. thompsonii* izolowano z okazów zbieranych w miesiącach zimowych również z traw wydobywanych spod śniegu. Według Qu i wsp. (2017), aby przystosować się do długotrwałego przetrwania w mroźnym środowisku, grzyby z rodzaju *Hirsutella* wytworzyły unikalną powłokę adaptacyjną na konidiach – śluz, który funkcjonuje jako ochrona zarodników i ma ważne ekologiczne znaczeniem dla dyspersji i ewolucji tych gatunków. Przeprowadzone badania własne wykazały, że większość badanych izolatów (za wyjątkiem *H. vandergeesti*) nie wykazywała wzrostu w temparaturze 5°C, ale wszystkie rosły w temperaturze 10°C. Według Miętkiewskiego i wsp. (2000) oraz Tkaczuka i wsp. (2003) w niesprzyjających warunkach u niektórych gatunków *Hirsutella* (np. *H. thompsonii*) patogen może przechodzić stadia spoczynkowe, tworząc w ciele roztocza wielojądrowe zarodniki przetrwalnikowe – chlamydospory, które są bardzo często stadium zimującym.

W przypadku grzyba *Hirsutella nodulosa* wzrostu patogenu na podłożu SDA nie obserwowano w dwóch skrajnych temperaturach 5°C i 35°C (tab. 2, 3). Kolonie w 25 dniu hodowli, osiągnęły najmniejsze rozmiary (średnio 5,2 mm) w 10°C, a optimum temperaturowe w tym przypadku wynosiło 20°C (średnica kultur 21,3 mm). Warto zaznaczyć, że w temperaturze 25°C wzrost kolonii był jedynie nieznacznie słabszy niż w 20°C, a średnica uzyskanych kolonii była mniejsza średnio tylko o 1,2 mm. Wzrost kultur *H. nodulosa* na pożywce Czapek-Dox przebiegał w temperaturze 15°C, 20°C, 25°C i 30°C. Kolonie rosły najsłabiej przy 30°C – osiągały wtedy średnio 6,3 mm średnicy. Najszybszy wzrost tego izolatu miał miejsce w 25°C, a jego kultury osiągały średnicę 11,7 mm w ostatnim dniu hodowli. Tempo dziennego wzrostu grzyba *H. nodulosa* w przypadku zastosowania podłoża hodowlanego SDA było najszybsze w zakresie temperaturowym 20–25°C i wynosiło 0,9 mm/dzień. W przypadku podłoża Czapek-Dox tempo to było niższe, osiągając maksimum na poziomie 0,5 mm/dzień, a najbardziej optymalną temperaturą było 25°C (rys. 3).

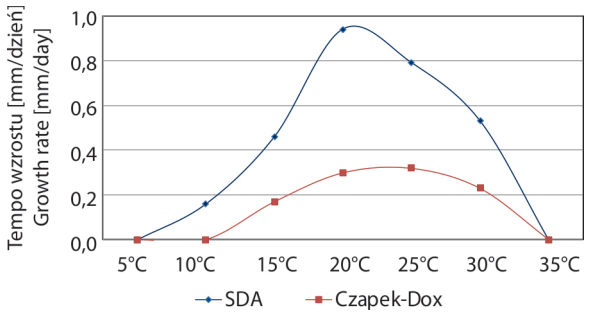
Analizując wzrost izolatu grzyba *Hirsutella vandergeesti* stwierdzono, że jego kolonie rozwijały się we wszystkich badanych zakresach temperatur oprócz 35°C (tab. 2, 3). Ich średnica była najmniejsza w temperaturze 5°C zarówno w przypadku podłoża SDA, jak i podłoża Czapek-Dox (wynosiła odpowiednio 2,8 mm i 3 mm). Przeprowadzone badania wykazały, że nieco szybsze tempo wzrostu izolatu grzyba obserwowano na podłożu SDA, gdzie dzienny przyrost kolonii kształtował się na poziomie 0,7 mm (rys. 4).

Wzrost kolonii grzyba *Hirsutella gregis* wyizolowanego z przebarwiacza malinowego na podłożu SDA odnotowano we wszystkich badanych zakresach temperatur oprócz



Rys. 4. Tempo dziennego wzrostu grzyba *Hirsutella vandergeesti* hodowanego na dwóch podłożach w różnych zakresach temperatur

Fig. 4. The daily growth rate of *Hirsutella vandergeesti* fungus on two media at different temperature ranges

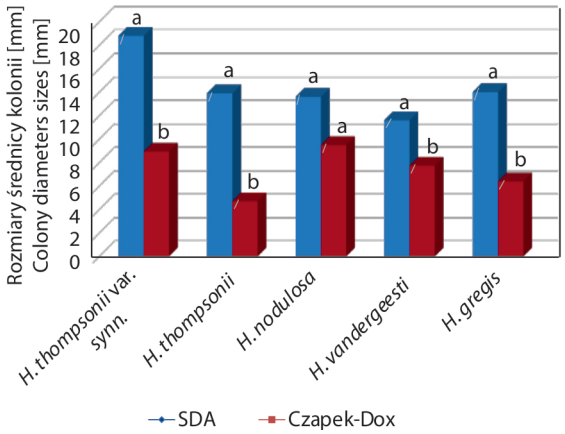


Rys. 5. Tempo dziennego wzrostu grzyba *Hirsutella gregis* hodowanego na dwóch podłożach w różnych zakresach temperatur

Fig. 5. The daily growth rate of *Hirsutella gregis* fungus on two media at different temperature ranges

5 i 35°C (tab. 2, 3). Grzyb ten najmniejsze kolonie tworzył w temperaturze 10°C (4 mm średnicy w 25 dniu hodowli), a optimum temperaturowe wynosiło 20°C. W przypadku hodowli na podłożu Czapek-Dox grzyb *H. gregis* największe rozmiary kolonii osiągał w temperaturze 20 i 25°C. Tempo dziennego wzrostu testowanego grzyba na pożywce SDA, przy optimum temperaturowym na poziomie 20–25°C, było 3-krotnie szybsze niż na pożywce Czapek-Dox i wynosiło odpowiednio 0,9 mm i 0,3 mm na dzień (rys. 5). Sztejnberg i wsp. (1997) prowadząc badania nad biologią gatunku *Hirsutella kirchneri*, który często obok *H. gregis*, infekuje populacje szpecieli żerujących na trawach w Polsce (Miętkiewski i wsp. 2003; Bałazy i wsp. 2008) stwierdzili, że optimum temperaturowe dla wzrostu kolonii tego grzyba wynosiło 25°C, a kiełkowanie zarodników przebiegało intensywnie w zakresie temperatury od 10°C do 30°C.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że poszczególne zakresy temperaturowe, w których prowadzono hodowlę w sposób istotny wpływały na wielkość kolonii badanych grzybów akaropatogenicznych (tab. 2, 3). Zastosowane w badaniach podłoże SDA okazało się istotnie lepszym podłożem do hodowli testowanych gatunków grzybów akaropatogenicznych niż podłoże Czapek-Dox i tylko w przypadku grzyba *H. vandergeesti* nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy (rys. 6).



a – istotność na poziomie α < 0,05 – significance at the level α < 0.05

Rys. 6. Rozmiary średnicy kolonii [mm] grzybów akaropatogenicznych rozwijających się w różnych zakresach temperatur w 25 dniu hodowli na testowanych podłożach (średnia dla rodzaju podłoża)

Fig. 6. Colony diameter sizes [mm] of acaropathogenic fungi developing in various temperature ranges on the 25th day of cultivation on the tested media (average for the type of medium)

Prowadzenie badań nad wymaganiami cieplnymi poszczególnych gatunków i izolatów grzybów patogenicznych w stosunku do szkodliwych owadów czy roztoczy, obok aspektu poznawczego ma także duże znaczenie praktyczne, gdyż pozwala wyselekcjonować te szczepy, które charakteryzują się szerokim spektrum tolerancji jeśli chodzi o warunki termiczne, pozwalające na zachowanie wysokiej skuteczności przy stosowaniu opartych na nich biopestycydów w warunkach polowych.

Wnioski / Conclusions

1. Przeprowadzone badania wykazały, że gatunki *H. thompsonii*, *H. nodulosa* i *H. gregis* mają zbliżone optimum termiczne wzrostu i wynosi ono 20–25°C.
2. *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa* i *H. vandergeesti* wykazują najlepszy wzrost w wyższych temperaturach, tj. 25–30°C.
3. Jedynym gatunkiem wykazującym wzrost w temperaturze 35°C był *H. thompsonii* var. *synnematosa*, z kolei w temperaturze 5°C wykazywał wzrost *H. vandergeesti*.
4. Najlepsze tempo wzrostu wykazano dla grzyba *H. thompsonii* var. *synnematosa* w optimum temperaturowym i wynosiło ono 1,85 mm na dobę. Pozostałe badane gatunki wykazywały najszybsze tempo wzrostu w zakresie 0,76–1,07 mm na dobę.

5. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że temperatura prowadzenia hodowli jest czynnikiem istotnie wpływającym na wielkość kolonii testowanych grzybów akaropatogenicznych. Podłoże SDA jest istotnie lepsze do hodowli badanych grzybów w porównaniu do podłoża Czapek-Dox z wyjątkiem grzyba *H. vandergeesti*, gdzie nie stwierdzono istotnych różnic.

Literatura / References

Alexandre T.M., Alves L.F.A., Neves P.M.O.J., Alves S.B. 2006. Effect of temperature and poultry litter on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) virulence against the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomology 35 (1): 75–82. DOI: 10.1590/s1519-566x2006000100011

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25 (17): 3389–3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389

Bałazy S., Wrzosek M., Sosnowska D., Tkaczuk C., Muszewska A. 2008. Laboratory trials to infect insects and nematodes by some acaropathogenic *Hirsutella* strains (Mycota: Clavicipitaceous anmorphs). Journal of Invertebrate Pathology 97 (2): 103–113. DOI: 10.1016/j.jip.2007.08.006

Chandler D., Sunderland K.D., Ball B.V., Davidson G. 2001. Prospective biological control agents of *Varroa destructor* n. sp., an important pest of the European honeybee, *Apis mellifera*. Biocontrol Science of Technology 11 (4): 429–448. DOI: 10.1080/09583150120067472

Chandrapatya A., Dilokkunanant U. 1989. Utilization of *Hirsutella thompsonii* (Fisher) against the citrus rust mite, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead). Research Report Submitted to National Research Council Thailand.

Christos G., Athanassiou N.G., Kavallieratos C.I.R., Demetrius C.K. 2017. Influence of temperature and relative humidity on the insecticidal efficacy of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) on wheat. Journal of Insect Science 17 (1): 1–22. DOI: 10.1093/jisesa/iew107

Davidson G., Phelps K., Sunderland K.D., Pell J.K., Ball B.V., Shaw K.E., Chandler D. 2003. Study of temperature-growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using a nonlinear model of poikilotherm development. Journal of Applied Microbiology 94 (5): 816–825. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01871.x

Demite P.R., Feres R.J.F. 2008. Seasonality of pathogenic fungi in mites of rubbery tree plantations adjacent to fragments of Cerrado. Brazilian Journal of Biology 68 (3): 533–538. DOI: 10.1590/s1519-69842008000300010

Devi K.U., Sridevi V., Mohan Ch.M., Padmavathi J. 2005. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. Journal of Invertebrate Pathology 88 (3): 181–189. DOI: 10.1016/j.jip.2005.02.001

Edgington S., Fernando L.C.P., Jones K. 2008. Natural incidence an environmental profiling of the mite-pathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* Fisher for control of the coconut mite in Sri Lanka. International Journal of Pest Management 54 (2): 123–127. DOI: 10.1080/09670870701749950

Farguez J., Luz C. 2000. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodinus prolixus*. Journal of Invertebrate Pathology 75 (3): 202–211. DOI: 10.1006/jipa.1999.4923

Gerson U., Kenneth R., Muttath T.I. 1979. *Hirsutella thompsonii* a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions. Annals of Applied Biology 91 (1): 29–40. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1979.tb07410.x

Hodge K.T. 1998. Revisionary studies in *Hirsutella* (Anamorphic *Hypocereales*: Clavicipitaceae). UMI Microform 9900074, Ann Arbor.

Ibarra-Corteś K.H., Guzmán-Franco A.W., González-Fernández H., Suarez-Espinosa J., Baverstock J. 2013. Selection of a fungal isolate for the control of the pink hibiscus mealybug *Maconellicoccus hirsutus*. Pest Management Science 69 (7): 874–882.

Kenneth R., Muttath T.I., Gerson U. 1979. *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. I. Biology of the fungus in vitro. Annals of Applied Biology 91 (1): 21–28. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1979.tb07409.x

Kovač M., Gorczak M., Wrzosek M., Tkaczuk C., Pernek M. 2020. Identification of entomopathogenic fungi as naturally occurring enemies of the invasive oak lace bug, *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). Insects 11 (10): 679. DOI: 10.3390/insects11100679

Lipa J. 1971. Microbial control of mites and ticks. s. 357–373. W: Microbial Control of Insects and Mites (H.D. Burges, N.W. Hussey, red.). Academic Press, New York, 862 ss.

McCoy C.W. 1981. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*. s. 499–512. W: Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970–1980 (H.D. Burges, red.). Academic Press, London, 949 ss. ISBN 978-012-143-36-04.

Miętkiewski R., Bałazy S., Tkaczuk C. 2000. Mythopatogens of mites in Poland – a review. Biocontrol Science of Technology 10 (4): 459–465. DOI: 10.1080/09583150050115043

Miętkiewski R., Bałazy S., Tkaczuk C. 2003. Mikozy szpecieli (*Acari: Eriophyoidea*) występujących na trawach. [Mycoses of eriophyid mites (*Acari: Eriophyoidea*) occurring on grasses]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 43 (1): 268–276.

Minter D.W., Brady B.L. 1980. Mononematous species of *Hirsutella*. Transactions of the British Mycological Society 74 (2): 271–282. DOI: 10.1016/S0007-1536(80)80157-4

Minter D.W., Brady B.L., Hall R.A. 1983. Fife hyphomycetes isolated from eriophyide mites. Transactions of the British Mycological Society 81 (3): 455–471. DOI: 10.1016/S0007-1536(83)80114-4

Piątkowski J., Krzyżewska A. 2007. Influence of some physical factors on the growth and sporulation of entomopathogenic fungi. [Wpływ czynników fizycznych na wzrost i zarodnikowanie grzybów owadobójczych]. Acta Mycologica 42 (2): 255–265.

Polar P., Aquino de Muro M., Kairo M.T.K., Moore D., Pegram R., John S.-A., Roach-Benn C. 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. Veterinary Parasitology 134 (1–2): 159–167. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.07.010

Qu J.J., Zou X., Yu J., Zhou Y.M. 2017. The conidial mucilage, natural film coatings, is involved in environmental adaptability and pathogenicity of *Hirsutella satumaensis* Aoki. Scientific Reports 7: 1301. DOI: 10.1038/s41598-017-01368-1

Qu J.J., Zou X., Zhou Y.M., Han Y.M., Liang Z.Q. 2014. Identification of a parasitic *Hirsutella* Pat. of *Bombyx mori* Linnaeus. and sporulation conditions optimization. Microbiology China 41: 1326–1333.

Samson R.A., McCoy C.W., O'Donnell K.L. 1980. Taxonomy of the acarine parasite *Hirsutella thompsonii*. Mycology 72 (2): 359–377.

Sapna M., Peeyush K., Anushree M. 2015. Effect of temperature and humidity on pathogenicity of native *Beauveria bassiana* isolate against *Musca domestica* L. Journal of Parasitic Diseases 39 (4): 697–704. DOI: 10.1007/s12639-013-0408-0

Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. PNAS 109 (16): 6241–6246. DOI: 10.1073/pnas.1117018109

Sztejnberg A., Dorn-Shloush S., Gerson U. 1997. The biology of the acaropathogenic fungus *Hirsutella kirchneri*. Biocontrol-Science of Technology 7 (4): 577–590. DOI: 10.1080/09583159730631

Tkaczuk C., Łabanowska B.H., Miętkiewski R. 2004. The influence of pesticides on the growth of fungus *Hirsutella nodulosa* (Petch) – entomopathogen of strawberry mite (*Phytonemus pallidus* ssp. *fragariae* Zimm.). [Wpływ środków ochrony roślin na wzrost grzyba *Hirsutella nodulosa* (Petch) – patogena roztocza truskawkowca *Phytonemus pallidus* ssp. *fragariae* Zimm.). Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 12: 119–126.

Tkaczuk C., Miętkiewski R., Bałazy S. 2003. Mycoses of phytophagous mites during the winter time. Proccedings of 9th European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group „Insects Pathogens and Entomoparasitic Nematodes". Salzau, Germany, 108 ss.

Van der Geest L.P.S., Elliot S.L., Breeuwer J.A.J., Beerling E.A.M. 2000. Diseases of mites. Experimental and Applied Acarology 24 (7): 497–560. DOI: 10.1023/A:1026518418163

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