

Received: 19.02.2024 / Accepted: 04.03.2024

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Wpływ zasolenia podłoża hodowlanego na wzrost grzybów entomopatogenicznych z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium*

The effect salinity culture medium on the growth of entomopathogenic fungi of *Beauveria* and *Metarhizium* genera

Anna Majchrowska-Safaryan* 

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wzrastającego stężenia NaCl (jednego z istotnych czynników stresogennych dla roślin uprawnych) na wzrost grzybów entomopatogenicznych z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium* w warunkach *in vitro*. W warunkach laboratoryjnych zbadano wpływ 1, 3, 5 i 15% stężenia NaCl na wzrost kolonii czterech wybranych gatunków grzybów *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* i *Metarhizium flavoviride*. Testowane stężenia dodawano do podłoża hodowlanego Sabourauda (SDA). Obserwacje wzrostu kolonii prowadzono co 5 dni aż do 20. dnia mierząc średnicę kolonii w mm. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowane w doświadczeniu stężenia NaCl działały w sposób zróżnicowany na wzrost kolonii testowanych gatunków grzybów entomopatogenicznych z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium*. Nieznaczne zasolenie podłoża hodowlanego (1% stężenie NaCl), niezależnie od terminu prowadzonej obserwacji wpłynęło na zwiększenie wzrostu kolonii *B. bassiana* i *B. brongniartii*, a ograniczało wzrost *M. flavoviride*. W 20. dniu prowadzonej obserwacji 3% zasolenie istotnie statystycznie stymulowało wzrost szczepu *B. bassiana* i *M. flavoviride*. Wyższe stężenie NaCl ograniczało wzrost testowanych szczepów, przy czym największą odporność wykazał grzyb *M. flavoviride*, co wskazywać może go jako gatunek wykazujący się stosunkowo wysokim potencjałem odporności na zasolenie. 15% zasolenie całkowicie hamowało wzrost wszystkich badanych grzybów entomopatogenicznych.

Słowa kluczowe: stres solny, grzyby entomopatogeniczne, wzrost kolonii, *in vitro*

Abstract

The aim of the research was to determine the effect of increasing NaCl concentration (one of the important stress factors for crop plants) on the growth of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* and *Metarhizium* *in vitro*. The influence of 1, 3, 5 and 15% NaCl concentration on the growth of colonies of four selected species of fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* was examined in laboratory conditions. Test concentrations were added to Sabouraud's culture medium (SDA). Colony growth observations were made every 5 days until day 20, measuring the colony diameter in mm. The conducted research showed that the NaCl concentrations used in the experiment had a differential effect on the growth of colonies of the tested species of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* and *Metarhizium*. A slight salinity of the culture medium (1% NaCl concentration), regardless of the date of observation, increased the growth of *B. bassiana* and *B. brongniartii* colonies and limited the growth of *M. flavoviride*. On the 20th day of observation, 3% salinity statistically significantly stimulated the growth of the *B. bassiana* and *M. flavoviride* strains. A higher concentration of NaCl limited the growth of the tested strains, with *M. flavoviride* showing the greatest resistance, which may indicate it as a species with a relatively high potential for resistance to salinity. 15% salinity completely inhibited the growth of all entomopathogenic fungi tested.

Key words: salt stress, entomopathogenic fungi, colony growth, *in vitro*

Uniwersytet w Siedlcach

Wydział Nauk Rolniczych, Instytut Rolnictwa i Ogrodnictwa
ul. Bolesława Prusa 14, 08-110 Siedlce

*corresponding author: anna.majchrowska-safaryan@uph.edu.pl

Wstęp / Introduction

W produkcji rolniczej zasolenie środowiska glebowego jest jednym z głównych czynników stresowych wpływających na ograniczenie wzrostu i rozwoju roślin, co ma szczególne znaczenie w warunkach postępujących zmian klimatycznych (Shahbaz i wsp. 2012; Santo i wsp. 2017; Tomilova i wsp. 2023). Zasolenie dotyka obecnie ponad 800 milionów hektarów gleb i dane wskazują, iż problem ten będzie narastał (Liang i wsp. 2018; Yang i Guo 2018; Tomilova i wsp. 2023). Badania prowadzone przez Jamil i wsp. (2011) wykazały, że do roku 2050 ponad 50% gruntów ornych w skali światowej ulegnie zasoleniu. Zasolenie gleb uprawnych w największym stopniu powodowane jest przez stosowanie nawożenia mineralnego, w wyniku którego do gleb dostarczane są znaczne ilości chlorku sodu (NaCl) (Shahid i wsp. 2011). Niewątpliwie stres solny wpływa w znaczący sposób na produktywność roślin uprawnych, dlatego też koniecznością staje się poszukiwanie nowych skutecznych metod jego przezwyciężenia (Chourasia i wsp. 2021). Obecnie prowadzone są badania związane z traktowaniem roślin egzogennymi fitohormonami oraz kolonizacją korzeni roślin przez mikroorganizmy endofityczne z wykorzystaniem wyselekcjonowanych gatunków bakterii i grzybów, w tym grzybów entomopatogenicznych z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium* (Dimpka i wsp. 2009; Dodd i Pérez-Alfocea 2012; Jaber i Ownley 2018; Vega 2018; Kumar i wsp. 2022). Kolonizacji roślin przez grzyby endofityczne towarzyszy aktywne wchłanianie składników odżywczych i utrzymywanie homeostazy jonowej (Na^+ i K^+). Lozano-Tovar i wsp. (2017), Raad i wsp. (2019) oraz Mantzoukas i Eliopoulos (2020) podają, że grzyby endofityczne, w tym również entomopatogeniczne związane z roślinami uprawnymi, zmniejszają działanie stresu solnego poprzez aktywację odporności ogólnoustrojowej, wytwarzanie metabolitów, aktywację układu antyoksydacyjnego i modulację fitohormonów wzrostu roślin.

W glebach Polski grzyby entomopatogeniczne występują w różnym nasileniu. Dwukrotnie większa różnorodność patogenów owadów występuje w glebie pochodzącej z obszarów leśnych niż w próbach pochodzących z pól uprawnych. Najczęściej izolowanymi gatunkami są: *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* = *Cordyceps fumosorosea* oraz *Metarhizium anisopliae*. W ściółce i glebie lasów mieszanych Polski dominują szczepy *B. bassiana*, a *M. anisopliae* jest najczęściej występującym gatunkiem w glebie uprawnej (Bałazy 2004; Tkaczuk i wsp. 2014, 2016; Zimowska i Król 2019; Wasilewska-Nascimento 2021; Majchrowska-Safaryan i wsp. 2023). Grzyby owadobójcze są pasożytami owadów roślinożernych, skutecznie ograniczając ich populację (Tkaczuk 2008). Zwiększają także wchłanianie składników odżywczych i efektywność wykorzystania wody w warunkach stresowych (Dara i wsp. 2017). Dlatego też prowadzone badania powinny uwzględniać wzajemne kompleksowe

relacje w układzie środowisko glebowe-roślina-szkodnik-odpowiednio dobrany szczep grzyba owadobójczego. Jest to układ bardzo dynamiczny, zmieniający się pod wpływem warunków środowiskowych, zarówno abiotycznych, jak i biotycznych (Wasilewska-Nascimento 2021; Majchrowska-Safaryan i Tkaczuk 2023).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wzrastającego stężenia chlorku sodu (jednego z istotnych czynników stresogennych dla roślin uprawnych) na wzrost grzybów owadobójczych z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium* w warunkach *in vitro*.

Materiały i metody / Materials and methods

W warunkach laboratoryjnych zbadano wpływ zasolenia NaCl (sól sodowa kwasu chlorowodorowego) na wzrost kolonii czterech wybranych gatunków grzybów entomopatogenicznych *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin i *Metarhizium flavoviride* W. Gams & Rozsypal. Charakterystykę testowanych izolatów grzybów przedstawiono w tabeli 1. Grzyby oznaczono makroskopowo za pomocą standardowych kluczy (Rehner i wsp. 2011; Humber 2012; Inglis i wsp. 2012), a dodatkowo ich przynależność taksonomiczną potwierdzono za pomocą badań molekularnych.

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 mikologicznym Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego z wykorzystaniem materiałów eksploatacyjnych firm Qiagen oraz Bliert (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 kolumnkach 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. Sól sodową kwasu chlorowodorowego (NaCl) w różnych dawkach dodawano do podłoża hodowlanego Sabourauda (SDA bioMérieux) o składzie enzymatycznym: hydrolizat kazeiny – 5,0 g, enzymatyczny hydrolizat tkanek zwierzęcych – 5,0 g, glukoza – 40 g, agar

Tabela 1. Charakterystyka izolatów grzybów owadobójczych testowanych w doświadczeniu
Table 1. Characteristics of entomopathogenic fungi isolates tested in the experiment

Gatunek grzyba Fungal species	Pochodzenie grzyba The origin of the fungus
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. B03-UPH	wyizolowany z gleby łąkowej za pomocą podłoża selektywnego – Klimonty (województwo mazowieckie) isolated from meadow soil using a selective medium – Klimonty (Mazowieckie Voivodeship)
<i>Beauveria brongniartii</i> (Sacc.) Petch B04-UPH	wyizolowany z gleby z zadrzewienia śródpolnego za pomocą podłoża selektywnego – Boćki (województwo podlaskie) isolated from the soil of mid-field shelterbelts using a selective medium – Boćki (Podlaskie Voivodeship)
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin M05-UPH	wyizolowany z gleby z pola uprawnego za pomocą larw <i>Galleria mellonella</i> – Chodów (województwo mazowieckie) isolated from the soil of a cultivated field with <i>Galleria mellonella</i> larvae – Chodów (Mazowieckie Voivodeship)
<i>Metarhizium flavoviride</i> W. Gams & Rozsypal M06-UPH	wyizolowany z gleby z pola uprawnego za pomocą larw <i>Galleria mellonella</i> – Samowicze (województwo lubelskie) isolated from the soil of a cultivated field with <i>Galleria mellonella</i> larvae – Samowicze (Lubelskie Voivodeship)

– 15,0 g. Podłoża te były sterylizowane przy użyciu autoklawu parowo-ciśnieniowego w temperaturze 120°C przy ciśnieniu 1 atmosfery.

W przeprowadzonym doświadczeniu NaCl dodano do podłoża hodowlanego, tak aby uzyskać stężenie 1, 3, 5 i 15%, a następnie przeniesiono na sterylne plastikowe szalki Petriego o średnicy 90 mm. Izolaty grzybów pochodziły z 10-dniowych kultur rosnących na SDA w temperaturze 21°C. Materiał pobierano za pomocą ezy i inokulowano nim centralnie podłoże stałe SDA. Szalki z wyszczepionymi izolatami umieszczono w inkubatorach, bez dostępu światła w temperaturze 22°C i co 5 dni aż do 20. dnia wzrostu mierzone średnicę kolonii. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach. Kontrolę stanowiły kultury rosnące na podłożach bez dodatku NaCl. Wyniki przedstawiono jako wielkość średnicy kolonii wyrażoną w mm.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem programu Statistica 13.3 TIBCO Software Inc. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i post-hoc test Tukey'a. Wyliczone średnie połączono w jednorodne grupy na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Obliczono odchylenie standardowe.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Grzyby owadobójcze z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium* pełnią różnorodne funkcje w agrosystemach. Prowadzone badania wskazują, że oprócz swojego podstawowego zadania jako mykoinsektycydy działają również jako bioszczepionki stymulujące wzrost i rozwój roślin w warunkach stresowych (Bidochka i wsp. 2001; Raad i wsp. 2019; Ahmad i wsp. 2020; Mantzoukas i Eliopoulos 2020; Chaudhary i wsp. 2023). W celu doboru gatunku wykazującego największą odporność na podwyższone zasolenie testowano

w warunkach *in vitro* cztery szczepy grzybów owadobójczych.

Przeprowadzone badania wykazały, że zasolenie podłoża hodowlanego w zróżnicowany sposób wpływało na wzrost kolonii testowanych gatunków grzybów entomopatogenicznych. Stwierdzono, iż ich rozwój uzależniony był od gatunku grzyba, zastosowanego stężenia NaCl oraz terminu prowadzonej obserwacji (tab. 2, 3). Kolonie *B. bassiana* na podłożu hodowlanym o stężeniu 1 i 3% NaCl, w każdym z terminów prowadzonej obserwacji osiągały rozmiary większe od kolonii kontrolnych. W dniu 15. i 20. kolonie tego szczepu największe rozmiary osiągały na pożywce o 3% stężeniu NaCl, a różnica ta była statystycznie istotna w stosunku do kolonii kontrolnych (tab. 2). Tomilova i wsp. (2023) badając wpływ zasolenia podłoża hodowlanego na wzrost grzyba *B. bassiana* stwierdzili, iż testowany szczep był w stanie aktywnie rozwijać się przy stężeniu soli 50–150 mmol/l. Autorzy podają, że w 20. dniu prowadzonej obserwacji kolonie osiągały większe rozmiary w porównaniu z obiektem kontrolnym, największe przy stężeniu NaCl wynoszącym 50 mmol/l. Grzyb *B. brongniartii* uzyskał nieznacznie większe rozmiary kolonii od kolonii kontrolnych tylko na podłożu hodowlanym o zawartości NaCl 1%, przy czym różnica ta nie była istotna statystycznie. W żadnym z terminów prowadzonej obserwacji nie stwierdzono istotnie statystycznego wpływu 3% zasolenia podłoża hodowlanego na wielkość kolonii testowanego szczepu, w odniesieniu do kontroli i 1% zasolenia. Zastosowane stężenie 5% chlorku sodu powodowało istotne statystycznie ograniczenie wzrostu *B. bassiana* i *B. brongniartii* w stosunku do kontroli. W 20. dniu prowadzonej obserwacji kolonie grzyba *B. bassiana* osiągały rozmiary mniejsze o 29%, a grzyb *B. brongniartii* o 30% mniejsze. 15% zasolenie podłoża hodowlanego całkowicie zahamowało wzrost testowanych szczepów. Cazorla Perfetti i wsp. (2007) wykazali, że szyb-

Tabela 2. Średnica kolonii grzybów *Beauveria bassiana* i *Beauveria brongniartii* w trakcie wzrostu na podłożach hodowlanych o różnym stopniu zasolenia [wyrażona w mm]**Table 2.** Colony diameter of the fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii* during growth on culture media with various degrees of salinity [expressed in mm]

Stężenie NaCl NaCl concentration [%]	Średnica kolonii grzyba [mm] – Diameter of fungus colony [mm]			
	5. dzień 5th day	10. dzień 10th day	15. dzień 15th day	20. dzień 20th day
<i>Beauveria bassiana</i>				
1	11,0 ± 1,15 a	25,3 ± 1,50 a	40,7 ± 2,98 ab	54,8 ± 4,11 ab
3	10,3 ± 0,50 a	23,0 ± 1,41 ab	43,8 ± 2,50 a	55,7 ± 5,67 a
5	5,80 ± 0,95 c	14,3 ± 2,50 c	25,0 ± 3,55 c	33,5 ± 1,73 c
15	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 d
Kontrola – Control	8,75 ± 0,57 b	20,4 ± 0,95 b	35,0 ± 4,08 b	47,3 ± 2,62 b
P-wartość – P-value	0	0	0	0
F-wartość – F-value	1779,176	2399,146	1876,876	2476,269
<i>Beauveria brongniartii</i>				
1	14,7 ± 0,50 a	29,0 ± 1,41 a	44,2 ± 1,50 a	56,5 ± 2,38 a
3	13,5 ± 0,57 a	27,0 ± 2,44 a	41,5 ± 1,29 a	53,2 ± 2,36 a
5	6,55 ± 0,54 b	19,0 ± 0,81 b	28,5 ± 0,58 b	39,5 ± 1,00 b
15	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 c
Kontrola – Control	14,5 ± 1,73 a	27,8 ± 1,70 a	42,2 ± 2,45 a	56,3 ± 2,50 a
P-wartość – P-value	0	0	0	0
F-wartość – F-value	2477,170	3645,777	9527,439	2839,083

abcd – średnie w kolumnach dla danego gatunku grzyba oznaczone tymi samymi małymi literami nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ – means within columns for a given fungus species marked with the same lowercase letters are not significant at $\alpha = 0.05$

± – odchylenie standardowe – standard deviation

kość kiełkowania zarodników *B. bassiana* znacząco zmniejszyła się wraz ze wzrostem stężenia NaCl w pożywce z 4% do 70%. Kiełkowanie zarodników całkowicie zostało zahamowane, gdy stężenie NaCl przekraczało 70% (Cazorla Perfetti i wsp. 2007).

Ahmad i wsp. (2020) oraz Chaudhary i wsp. (2023) podają, że niektóre gatunki *Metarhizium*, w tym również *M. anisopliae*, *M. robertsii* i *M. flavoviride*, są skutecznymi kolonizatorami korzeni roślin, dlatego też mogą wykazywać szeroki zakres zastosowania w rolnictwie, działając jako biopestycydy, a także jako bionawozy. Przeprowadzone badania wykazały, że 1% zasolenie podłoża hodowlanego w 10. dniu prowadzonej obserwacji istotnie statystycznie stymulowało wzrost grzyba *M. anisopliae* w stosunku do kolonii kontrolnych. 3% stężenie NaCl, w każdym z terminów ograniczało wzrost testowanego szczepu z wyjątkiem dnia 15., gdzie kolonie osiągały rozmiary większe od kolonii kontrolnych o 7,5% (tab. 3). Chaudhary i wsp. (2023) badając wpływ zasolenia na wzrost i kiełkowanie 6 różnych szczepów grzybów z rodzaju *Metarhizium* stwierdzili, iż gatunkami wykazującymi największą tolerancję na stres solny są *M. anisopliae* oraz *M. pinghaenes*. Izolaty te rosły przy poziomie zasolenia do 200 mmol/l.

Kolonie grzyba *M. flavoviride* osiągały istotnie mniejsze rozmiary od kolonii kontrolnych przy 1% zasoleniu podłoża hodowlanego. Przy 3% stężeniu NaCl w podłożu hodowlanym kolonie testowanego szczepu w 10., 15. i 20. dniu obserwacji, osiągały rozmiary większe niż kontrola, przy czym statystycznie istotny wzrost stwierdzono tylko w dniu 20. 5% zasolenie podłoża hodowlanego istotnie statystycznie ograniczyło wzrost grzybów z rodzaju *Metarhizium* w każdym z terminów prowadzonej obserwacji. W 20. dniu kolonie grzyba *M. anisopliae* osiągały rozmiary o 55% mniejsze, a grzyba *M. flavoviride* o 24% mniejsze w stosunku do kolonii kontrolnych. Przy 15% stężeniu NaCl w podłożu hodowlanym kolonie testowanych szczepów nie rozwijały się. Chen i wsp. (2016) podają, że kiełkowanie zarodników trzech różnych szczepów *Metarhizium* (MAX-2, BUM2495 i BUM723) zostało istotnie ograniczone przy stężeniu NaCl wynoszącym 0,4 i 0,8 mol/l. Liang-De i wsp. (2021) badając wpływ NaCl na rozwój grzyba *Isaria catenianulata* stwierdzili, że stężenie 0,2 mol/l NaCl stymulowało wzrost badanego szczepu o 18,02% w porównaniu z kontrolą. Natomiast wyższe stężenia NaCl, tj.: 0,6; 0,8 i 1,0 mol/l wykazały działanie inhibicyjne ograniczając wzrost kolonii odpowiednio o 12,89%; 18,15% i 31,32%.

Tabela 3. Średnica kolonii grzybów *Metarhizium anisopliae* i *Metarhizium flavoviride* w trakcie wzrostu na podłożach hodowlanych o różnym stopniu zasolenia [wyrażona w mm]

Table 3. Colony diameter of the fungus *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* during growth on culture media with various degrees of salinity [expressed in mm]

Stężenie NaCl NaCl concentration [%]	Średnica kolonii grzyba [mm] – Diameter of fungus colony [mm]			
	5. dzień 5th day	10. dzień 10th day	15. dzień 15th day	20. dzień 20th day
<i>Metarhizium anisopliae</i>				
1	13,5 ± 1,29 a	35,7 ± 5,05 a	55,2 ± 3,30 a	65,3 ± 1,73 b
3	10,3 ± 2,06 b	31,0 ± 2,00 a	53,3 ± 2,36 ab	61,2 ± 0,50 b
5	5,75 ± 0,96 c	13,7 ± 2,36 b	26,7 ± 1,89 c	34,7 ± 3,10 c
15	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 d
Kontrola – Control	14,5 ± 1,00 a	31,8 ± 0,58 a	49,5 ± 0,58 b	76,0 ± 2,16 a
P-wartość – P-value	0	0	0	0
F-wartość – F-value	988,595	1258,315	6090,569	8416,832
<i>Metarhizium flavoviride</i>				
1	7,45 ± 1,00 b	20,5 ± 2,98 b	29,5 ± 3,10 b	41,3 ± 3,78 b
3	7,65 ± 0,95 b	25,2 ± 3,50 a	36,7 ± 2,31 a	53,0 ± 3,46 a
5	3,20 ± 0,50 c	13,3 ± 1,50 c	25,0 ± 0,82 b	35,0 ± 1,41 c
15	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 d
Kontrola – Control	9,80 ± 0,96 a	23,2 ± 2,75 a	36,2 ± 1,70 a	45,7 ± 0,96 b
P-wartość – P-value	0	0	0	0
F-wartość – F-value	1035,324	555,612	1566,867	3237,885

abcd – średnie w kolumnach dla danego gatunku grzyba oznaczone tymi samymi małymi literami nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ – means within columns for a given fungus species marked with the same lowercase letters are not significant at $\alpha = 0.05$

± – odchylenie standardowe – standard deviation

W literaturze przedmiotu można znaleźć doniesienia dotyczące pożytecznych grzybów endofitycznych jako potencjalnych stymulatorów wzrostu roślin zarówno w warunkach naturalnych, jak i stresowych (Gupta i wsp. 2021; Klinsukon i wsp. 2021; Tomilova i wsp. 2023). Jan i wsp. (2019) w swoich badaniach stwierdzili, że grzyb endofityczny *Meyerozyma caribbica* wyizolowany z *Solanum xanthocarpum* wykazywał odporność na stres solny w 100, 150 i 200 mmol/l NaCl. Natomiast Badawy i wsp. (2021) podają, że grzyb endofityczny *Aspergillus ochraceus* toleruje dawkę 200 g chlorku sodu/l. Stwierdzili oni, że grzyb ten uruchamia mechanizmy pasywne, takie jak wytwarzanie pozakomórkowych polisacharydów pokrywających komórki lub zwiększających grubość ściany komórkowej oraz tworzenie zlepeków komórkowych umożliwiających przetrwanie przy wysokich stężeniach soli. Dlatego wskazane jest prowadzenie dalszych badań i poszukiwanie kolejnych szczepów grzybów entomopatogenicznych wykazujących się wysokim potencjałem odporności na stresy środowiskowe, które stosowane w ochronie roślin uprawnych mogą przynieść korzyści w ekologicznej i integrowanej produkcji.

Wnioski / Conclusions

1. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowane w doświadczeniu stężenia NaCl działały w sposób zróżnicowany na wzrost kolonii testowanych gatunków grzybów entomopatogenicznych z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium*.
2. Nieznaczne zasolenie podłoża hodowlanego (1% stężenie NaCl), niezależnie od terminu prowadzonej obserwacji wpłynęło na zwiększenie wzrostu kolonii *B. bassiana* i *B. brongniartii*, a ograniczało wzrost *M. flavoviride*. W 20. dniu prowadzonej obserwacji 3% zasolenie istotnie statystycznie stymulowało wzrost szczepów *B. bassiana* i *M. flavoviride*.
3. Wyższe stężenie NaCl ograniczało wzrost testowanych szczepów, przy czym największą odporność wykazał grzyb *M. flavoviride*, co wskazywać może go jako gatunek wykazujący się stosunkowo wysokim potencjałem odporności na zasolenie. 15% zasolenie całkowicie hamowało wzrost wszystkich badanych grzybów entomopatogenicznych.

Literatura / References

- Ahmad I., Jiménez-Gasco M. del M., Luthe D.S., Barbercheck M.E. 2020. Systemic colonization by *Metarhizium robertsii* enhances cover crop growth. *Journal of Fungi* 6 (2): 64. DOI: 10.3390/jof6020064
- 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
- Badawy A.A., Alotaibi M.O., Abdelaziz A.M., Osman M.S., Khalil A.M., Saleh A.M., Mohammed A.E., Hashem A.H. 2021. Enhancement of seawater stress tolerance in barley by the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus*. *Metabolites* 11 (7): 428. DOI: 10.3390/metabo11070428
- Bałazy S. 2004. Znaczenie obszarów chronionych dla zachowania zasobów grzybów entomopatogenicznych. [Significance of protected areas for the preservation of entomopathogenic fungi]. *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych* 53 (1) (262): 5–16.
- Bidochka M.J., Kamp A.M., Lavender T.M., Dekoning J., De Croos J.N.A. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology* 67 (3): 1335–1342. DOI: 10.1128/AEM.67.3.1335-1342.2001
- Cazorla D., Morales-Moreno P., Acosta Quintero M.E. 2007. Effects of thermal, saline and pH gradients on *in vitro* germination of a native isolate of *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin, pathogenic to *Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 17: 627–631.
- Chaudhary P.J., Raghunandan B.L., Patel H.K., Mehta P.V., Patel N.B., Sonth B., Dave A., Bagul S.Y., Divya M., Jain D., Alsahli A.A., Kaushik P. 2023. Plant growth-promoting potential of entomopathogenic fungus *Metarhizium pinghaense* AAUBC-M26 under elevated salt stress in tomato. *Agronomy* 13 (6): 1577. DOI: 10.3390/agronomy13061577
- Chen X., Xu C., Qian Y., Liu R., Zhang Q., Zeng G., Zhang X., Zhao H., Fang W. 2016. MAPK cascade-mediated regulation of pathogenicity, conidiation and tolerance to abiotic stresses in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Environmental Microbiology* 18 (3): 1048–1062. DOI: 10.1111/1462-2920.13198
- Chourasia K.N., Lal M.K., Tiwari R.K., Dev D., Kardile H.B., Patil V.U., Kumar A., Vanishree G., Kumar D., Bhardwaj V., Meena J.K., Mangal V., Shelake R.M., Kim J.-Y., Pramanik D. 2021. Salinity stress in potato: understanding physiological, biochemical and molecular responses. *Life* 11 (6): 545. DOI: 10.3390/life11060545
- Dara S.K., Dara S.S.R., Dara S.S. 2017. Impact of entomopathogenic fungi on the growth, development, and health of cabbage growing under water stress. *American Journal of Plant Sciences* 8 (6): 1224–1233. DOI: 10.4236/ajps.2017.86081
- Dimpka C.O., Merten D., Svatos A., Büchel G., Kothé E. 2009. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *Journal of Applied Microbiology* 107 (5): 1687–1696. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04355.x
- Dodd I.C., Pérez-Alfocea F. 2012. Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 63 (9): 3415–3428. DOI: 10.1093/jxb/ers033
- Gupta S., Schillaci M., Walker R., Smith P.M., Watt M., Roessner U. 2021. Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis: Current knowledge, perspectives and future directions. *Plant and Soil* 461: 219–244. DOI: 10.1007/s11104-020-04618-w
- Humber R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. s. 151–187. W: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (L.A. Lacey, red.). Academic Press, London, UK, 504 ss. Paperback ISBN 978-012-386-89-92. eBook ISBN 978-012-386-90-05.
- Inglis G.D., Enkerli J., Goettel M.S. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. *Hypocreales*. Chapter VII. s. 189–253. W: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (L.A. Lacey, red.). Academic Press, London, UK, 504 ss. Paperback ISBN 978-012-386-89-92. eBook ISBN 978-012-386-90-05.
- Jaber L.R., Ownley B.H. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control* 116: 36–45. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.018
- Jamil A., Riaz S., Ashraf M., Foolad M.R. 2011. Gene expression profiling of plants under salt stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30 (5): 435–458. DOI: 10.1080/07352689.2011.605739
- Jan F.G., Hamayun M., Hussain A., Iqbal A., Jan G., Khan S.A., Khan H., Le I.-J. 2019. A promising growth promoting *Meyerozyma caribbica* from *Solanum xanthocarpum* alleviated stress in maize plants. *Bioscience Reports* 39 (10): BSR20190290. DOI: 10.1042/BSR20190290
- Klinsukon C., Lumyong S., Kuyper T.W., Boonlue S. 2021. Colonization by arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) seedlings. *Scientific Reports* 11: 4362. DOI: 10.1038/s41598-021-84002-5
- 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
- Kumar V., Singh P., Sharma J., Sharma A. 2022. Role of brassinosteroids in plants responses to salinity stress: A review. *Journal of Applied and Natural Science* 14 (2): 582–599. DOI: 10.31018/jans.v14i2.3466
- Liang W., Ma X., Wan P., Liu L. 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (1): 286–291. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.043
- Liang-De L., Ben-Shui S., Jin-Yu L., Ding-Feng W., Guang-Yuan W.U. 2021. Effects of salt stress on the growth and gene expressions of the entomopathogenic fungus *Isaria catenianulata*. *Mycosystema* 40 (8): 2024–2042. DOI: 10.13346/j.mycosystema.210088
- Lozano-Tovar M.D., Garrido-Jurado I., Quesada-Moraga E., Raya-Ortega M.C., Trapero-Casas A. 2017. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens. *Crop Protection* 100: 186–195. DOI: 10.1016/j.cropro.2017.06.026
- Majchrowska-Safaryan A., Tkaczuk C. 2023. Wpływ bionawozów zawierających substancje humusowe na wzrost grzybów z rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium* w warunkach *in vitro*. [The effect of biofertilizers containing humic substances on the growth of *Beauveria* and *Metarhizium* fungi *in vitro*]. *Progress in Plant Protection* 63 (2): 73–79. DOI: 10.14199/ppp-2023-008

- Majchrowska-Safaryan A., Tkaczuk C., Baj-Wójtowicz B. 2023. Występowanie grzybów entomopatogenicznych w glebach siedlisk o zróżnicowanym użytkowaniu. *Agronomy Science* 78 (1): 5–18. DOI: 10.24326/as.2023.4956
- Mantzoukas S., Eliopoulos P.A. 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences* 10 (1): 360. DOI: 10.3390/app10010360
- Raad M., Glare T.R., Brochero H.L., Müller C., Rostás M. 2019. Transcriptional reprogramming of *Arabidopsis thaliana* defence pathways by the entomopathogen *Beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects. *Frontiers in Microbiology* 10: 615. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00615
- Rehner S.A., Minnis A.M., Sung G.-H., Luangsa-ard J.J., Devotto L., Humber R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103 (5): 1055–1073. DOI: 10.3852/10-302
- Santo A., Mattana E., Frigau L., Pastor A.M., Morelló M.C.P., Bacchetta G. 2017. Effects of NaCl stress on seed germination and seedling development of *Brassica insularis* Moris (Brassicaceae). *Plant Biology* 19 (3): 368–376. DOI: 10.1111/plb.12539
- 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
- Shahbaz M., Ashraf M., Al-Qurainy F., Harris P.J.C. 2012. Salt tolerance in selected vegetable crops. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31 (4): 303–320. DOI: 10.1080/07352689.2012.656496
- Shahid M.A., Pervez M.A., Balal R.M., Mattson N.S., Rashid A., Ahmad R., Ayyub C.M., Abbas T. 2011. Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Australian Journal of Crop Science* 5 (5): 500–510.
- Tkaczuk C. 2008. Występowanie i potencjał infekcyjny grzybów owadobójczych w glebach agrocenoz i środowisk seminaturalnych w krajobrazie rolniczym. Rozprawa Naukowa nr 94. Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce, 160 ss.
- Tkaczuk C., Król A., Majchrowska-Safaryan A., Nicewicz Ł. 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. *Journal of Ecological Engineering* 15 (4): 137–144. DOI: 10.12911/22998993.1125468
- Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Harasimiuk M. 2016. Występowanie oraz potencjał infekcyjny grzybów entomopatogenicznych w glebach z pól uprawnych, łąk i siedlisk leśnych. [The occurrence and infective potential of entomopathogenic fungi in the soil of arable fields, meadows and forest habitats]. *Progress in Plant Protection* 56 (1): 5–11. DOI: 10.14199/ppp-2016-001
- Tomilova O.G., Kryukova N.A., Efimova M.V., Kolomeichuk L.V., Kovtun I.S., Glupov V.V. 2023. The endophytic entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* alleviates adverse effects of salt stress in potato plants. *Horticulturae* 9 (10): 1140. DOI: 10.3390/horticulturae9101140
- Vega F.E. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia* 110 (1): 4–30. DOI: 10.1080/00275514.2017.1418578
- Wasilewska-Nascimento B. 2021. Niedoceniony potencjał grzybów owadobójczych w uprawie ziemniaka. [The underestimated potential of entomopathogenic fungi in potato cultivation]. *Ziemniak Polski* 4: 40–48.
- Yang Y., Guo Y. 2018. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist* 217 (2): 523–539. DOI: 10.1111/nph.14920
- Zimowska B., Król E.D. 2019. Entomopatogeniczne grzyby i ich znaczenie biocenotyczne. [Entomopathogenic fungi and their biocenotic importance]. *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* 58 (4): 471–482. DOI: 10.21307/PM-2019.58.4.471