Ocena potencjału owadobójczego wyizolowanych grzybów entomopatogennych w kontekście ich zastosowania w biologicznej ochronie roślin

Roman Marecik[1], Wojciech Białas[1], Beata Borowiak-Sobkowiak[2], Agnieszka Wita[1], Sabina Łukaszewicz[3]

[1] Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, [2] Katedra Entomologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
[3] SMP Agro sp. z o. o, Komorniki 44, 63-004 Tulce

WPROWADZENIE

Owady stanowią jedną z najważniejszych grup organizmów odpowiedzialnych za straty w produkcji roślinnej, powodując uszkodzenia roślin oraz przyczyniając się do obniżenia jakości i wielkości plonów. Ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin sprzyja poszukiwaniu alternatywnych, bezpiecznych dla środowiska metod zwalczania szkodników. Szczególne znaczenie w biologicznej ochronie roślin przypisuje się grzybom entomopatogennym, które wykazują zdolność do infekowania i eliminowania owadów. W dobie postępujących zmian klimatycznych oraz rosnącej oporności agrofagów na syntetyczne pestycydy, te wyspecjalizowane mikroorganizmy zyskały miano jednego z najbardziej obiecujących filarów zrównoważonej ochrony roślin (integrowana ochrona roślin - IPM). Ich działanie związane jest m.in. z adhezją zarodników do powierzchni ciała owada, penetracją kutikuli oraz produkcją enzymów i metabolitów przyczyniających się do rozwoju infekcji. Izolacja i selekcja szczepów charakteryzujących się wysoką aktywnością owadobójczą może stanowić istotny etap w poszukiwaniu skutecznych czynników biologicznej ochrony roślin.

CEL PRACY

Izolacja, a następnie ocena potencjału owadobójczego wyizolowanych grzybów entomopatogennych w kontekście ich zastosowania w biologicznej ochronie roślin.



ETAPY BADAŃ

1. Izolacja grzybów entomopatogennych
2. Analiza morfologiczna i identyfikacja izolatów
3. Ocena potencjału owadobójczego

METODYKA ORAZ WYNIKI

1. Izolacja grzybów entomopatogennych (EPF)

Pobór prób do izolacji zrealizowano w dwóch cyklach: wiosennym oraz jesiennym. Próbki pobierano ze zróżnicowanych stanowisk badawczych, różniących się stopniem antropopresji i intensywnością agrotechniki (Ryc. 1):

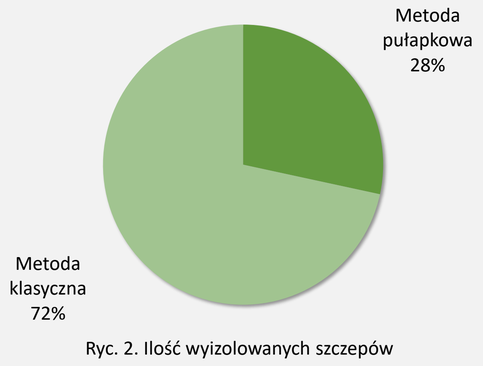
- **Stanowiska rolnicze** (z pełną ochroną chemiczną): grunty orne obejmujące uprawy roślin jednorocznych i wieloletnich oraz resztki pożniwne zbóż i rzepaku
- **Stanowiska seminaturalne i naturalne** (bez ochrony chemicznej): zadrzewienia śródpolne, zbiorowiska trawiaste (łąki) oraz kompleksy leśne (bory iglaste, lasy liściaste i mieszane).

W celu skutecznego pozyskania izolatów EPF ze środowiska naturalnego w badaniach zastosowano dwie metody izolacji:

- **Metoda klasyczna:** Bezpośrednia izolacja z prób glebowych, oparta na metodzie rozcieńczeń seryjnych oraz hodowli na podłożach stałych. Inkubację płytek prowadzono przez 7 dni w temperaturze 26°C. Po zakończeniu inkubacji dokonano liczenia wyrosłych kolonii (CFU). Kolonie o cechach morfologicznych charakterystycznych dla grzybów owadobójczych zostały rozizolowane na tożsame podłoża selektywne (Ryc. 3).
- **Metoda przynęty owadobójczej (metoda pułapkowa):** Izolacja metodą pułapkową opiera się na klasycznej procedurze według Zimmermanna (1986), wykorzystującej naturalną zdolność grzybów entomopatogennych do infekowania podatnego żywiciela. W tym celu do plastikowych pojemników (200 ml) odważano po 100 g badanej gleby, a następnie wprowadzano do nich po 5 larw *G. mellonella*. Monitoring zainfekowanych owadów prowadzony był codziennie przez okres 14 dni. Strzępki grzybów rozwijające się na powierzchni martwych larw przenoszono sterylną ezą na podłoże PDA (Ryc. 4).

Ryc. 1. Rodzaje stanowisk badawczych, z których pobierano próby

Pobór prób	System uprawy	Badane stanowiska	Gatunki
Wiosna	Ochrona Chemiczna	Grunty orne	Wyka, Lucerna, Kukurydza, Dynia, Słonecznik Groch, Bób, Soja, Fasolka
	Brak ochrony chemicznej	Zadrzewienia śródpolne	Trawa, Łąka
Jesień	Ochrona Chemiczna	Grunty orne	Resztki pożniwne (Pszenica, Jęczmień, Rzepak)
	Brak ochrony chemicznej	Zadrzewienia śródpolne	Trawa, Łąka
		Las	Las iglasty, liściasty, mieszany



Ryc. 2. Ilość wyizolowanych szczepów

2. Analiza morfologiczna i identyfikacja izolatów

Wstępną przynależność taksonomiczną określono za pomocą tradycyjnych technik mikrobiologicznych:

- Makroskopowej oceny morfologii kolonii (barwa, struktura, tempo wzrostu).
- Mikroskopowej analizy mikrostruktur (wielkość i kształt zarodników konidialnych)

W celu potwierdzenia przynależności taksonomicznej oraz precyzyjnej identyfikacji gatunkowej uzyskanych izolatów grzybów entomopatogennych (EPF), analizę morfologiczno-mikroskopową uzupełniono o nowoczesną technikę spektrometrii mas typu MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*). Przykładowe wyniki identyfikacji przedstawiono na ryc. 5.

Ryc. 5. Przykłady wyizolowanych szczepów – identyfikacja MALDI-TOF

Trichoderma hamatum	*Metarhizium sp.*	*Beauveria bassiana*
Mucor moelleri	*Actinomucor elegans*	*Cunninghamella elegans*
Trichoderma polysporum	*Absidia glauca*	*Rhizopus oryzae*

Ryc. 3. Metoda klasyczna izolacji



Ryc. 4. Metoda pułapkowa izolacji





Trichoderma sp.



Metarhizium sp.



Beauveria sp.

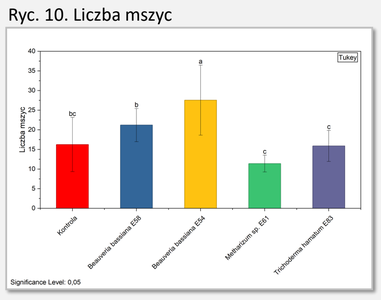
Ryc. 6. Zdjęcia makroskopowe EPF

3. Ocena potencjału owadobójczego wybranych grzybów entomopatogennych

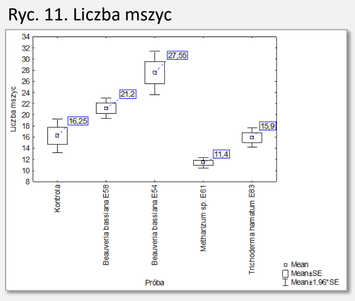
- **Ocena wybranych izolatów na płodność *Rhopalosiphum padi***

Obiekt: siewki jęczmienia (5-tygodniowe, 4 szt./doniczkę) i dorosłe samice mszyc.
Czynnik: oprysk izolatami (10^7 jtk/ml); kontrola: czysta woda.
Powtórzenia: 4 doniczki na wariant.
Insekty: 5 samic/doniczkę (20 samic/wariant), naniesione 5 h po oprysku.
Warunki: izolatory, temperatura pokojowa.
Pomiar: liczba potomstwa po 7 dniach (wskaźnik wczesnej płodności).

Ryc. 10. Liczba mszyc



Ryc. 11. Liczba mszyc





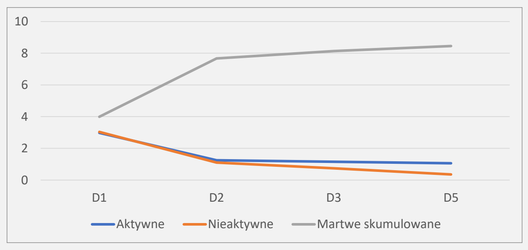
- **Ocena możliwości repelentnego oddziaływania wybranych izolatów na szkodnikach żerujących na zbożach i rzepaku**

Ryc. 9. Schemat badań

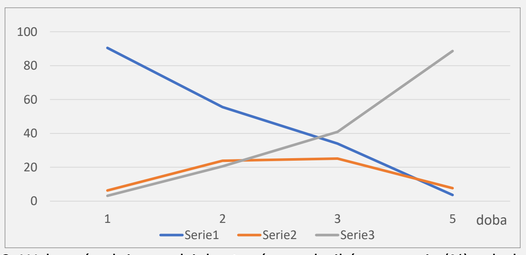
Eksperyment	Obiekt badawczy	Podłoże	Metoda aplikacji izolatu	Układ doświadczenia	Warunki	Mierzone parametry
Muchy	Larwy *Calliphora vicina*	szalki Petriego z bibułą i pokarmem białkowym (liofilizowana Artemia)	Pokarm (Artemia) nasączony 2 ml izolatu	10 larw/szalkę 5 powtórzeń (50/wariant)	komora fitotronowa (20°C, fotoperiod 12:12 L/D)	śmiertelność i aktywność (owady aktywne, nieaktywne, martwe) w 1., 2., 3. i 5. dobie
Słodyszek	Chrząszcze słodyszka	szalki Petriego z bibułą zwilżoną wodą destylowaną	Zanurzenie imago na 2 s w 1 ml izolatu	10 chrząszczy/szalkę 5 powtórzeń (50/wariant)	komora fitotronowa (20°C, fotoperiod 12:12 L/D)	deterentność i śmiertelność (aktywne, nieaktywne, martwe) w 1., 2., 3. i 5. dobie
Chowacz	Chrząszcze chowacza	szalki Petriego z bibułą zwilżoną wodą destylowaną	Zanurzenie imago na 2 s w 1 ml izolatu	10 chrząszczy/szalkę 5 powtórzeń (50/wariant)	komora fitotronowa (20°C, fotoperiod 12:12 L/D)	deterentność i śmiertelność (aktywne, nieaktywne, martwe) w 1., 2., 3. i 5. dobie



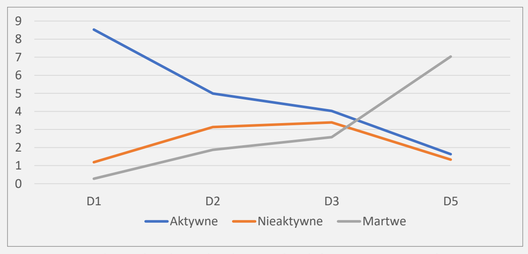




Ryc. 12. Wykres średniej liczby osobników w czasie – larwy much



Ryc. 13. Wykres średniego udziału stanów osobników w czasie (%) - słodyszki



Ryc. 14. Wykres średniej liczby osobników w czasie – chowacze

DYSKUSJA I WNIOSKI

- W wyniku prac izolacyjnych pozyskano łącznie 317 izolatów grzybowych: 227 metodą klasyczną (72%) oraz 90 metodą pułapkową (28%) (Ryc. 2). Badane entomopatogenne grzyby strzępkowe pozyskano z prób glebowych pobieranych w dwóch terminach (wiosna i jesień). Większość skutecznych izolatów wyizolowano z gleb leśnych (las iglasty, liściasty i mieszany) charakteryzujących się brakiem ochrony chemicznej. Pozostałe stanowiska badawcze obejmowały zadrzewienia śródpolne oraz grunty orne z uprawą roślin rolniczych i warzywnych.
- Analiza makroskopowa oraz identyfikacja metodą MALDI TOF pozwoliła wytypować do testów biotycznych 15 izolatów grzybów z rodzaju *Beauveria* sp., *Metharizium* sp. oraz *Trichoderma* sp. Owadami testowymi były mszyce zbożowe *R. padi* oraz larwy much z gatunku *C. vicina,* chrząszcze z gatunku *M. aeneus* (słodyszek rzepakowy) oraz *C. obstrictus* (chowacz podobnik).
- Rodzaj zastosowanego izolatu istotnie wpływał na płodność mszycy czeremchowo-owsianej. Efektywnym patogenem ograniczającym liczebność szkodnika był szczep *Metarhizium* sp. E61, który wykazał obniżenie liczby mszyc względem kontroli.
- W eksperymencie, w którym larwom much podano nasączony izolatem pokarm uzyskano zadowalające efekty. Pełną śmiertelność już w pierwszej dobie wykazała *Trichoderma hamatum* E83, dla której średnia liczba martwych owadów wynosiła 10. W grupie izolatów osiągających 100% śmiertelności w drugiej dobie znalazły się: *B. bassiana* E58, *B. bassiana* E90, *Metharizum* sp. E61, *Metharizum* sp. P63 oraz *B. bassiana* E79.
- Analiza ANOVA potwierdziła istotny wpływ szczepu, czasu oraz interakcji szczep × czas na stan słodyszków. Istotność interakcji dowodzi, że badane izolaty różniły się przede wszystkim dynamiką i tempem działania. W czasie eksperymentu liczba owadów aktywnych systematycznie spadała, kategoria nieaktywnych rosła przejściowo w środkowym okresie, a śmiertelność wyraźnie wzrastała. Najbardziej obiecujące warianty cechowały się wysoką skutecznością już w 3. dobie oraz maksymalnym udziałem osobników martwych i minimalnym aktywnych w 5. dobie
- W ocenie repelentnego oddziaływania izolatów na słodyszka rzepakowego stwierdzono, że najlepszym wariantem okazała się *B. bassiana* E70. Natomiast w przypadku chowacza podobnika najlepszym wariantem okazały się *B. bassiana* E54 i E58.

Badania realizowane w ramach projektu „Opracowanie i wdrożenie bezpiecznych preparatów mikrobiologicznych dla zrównoważonego rolnictwa ograniczających zużycie pestycydów i nawozów sztucznych” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Funduszy Europejskich dla Nowoczesnej Gospodarki. Projekt realizowany w ramach działania 1.1. Ścieżka SMART, nr umowy: **FENG.01.01-IP.02-0903/24**. Beneficjent: SMP Agro sp. z o.o z siedzibą w Komornikach, Komorniki 44, 63-004 Tulce

Fundusze Europejskie dla Nowoczesnej Gospodarki
Rzeczpospolita Polska
Dofinansowane przez Unię Europejską
smp
SCIENCE FOR AGRICULTURE
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU