

Anna KRYSA¹ i Dariusz ROPEK¹

PATOGENICZNOŚĆ WYBRANYCH SZCZEPÓW GRZYBA *METARHIZIUM ANISOPLIAE* WOBEC STONKI ZIEMNIACZANEJ (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*)

PATHOGENICITY OF SELECTED STRAINS OF FUNGUS *METARHIZIUM ANISOPLIAE* USED AGAINST COLORADO POTATO BEETLE (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*)

Abstrakt: Celem badań było określenie możliwości wykorzystania wybranych szczepów grzyba owadobójczego *Metarhizium anisopliae* do zwalczania stonki ziemniaczanej. Uzyskane wyniki wskazują, że badane szczepy *M. anisopliae* charakteryzują się stosunkowo niewielką patogennością w stosunku do larw i imago stonki ziemniaczanej. Najbardziej odporne na działanie badanych szczepów okazało się stadium larwalne L₃ oraz osobniki dorosłe stonki. Do szczepów, które mogą być wykorzystane do zwalczania stadiów larwalnych i imago stonki, zaliczono dwa szczepy, które izolowano z gleb pola uprawnego w miejscowości Gdów i Łosice.

Słowa kluczowe: stonka ziemniaczana, *Metarhizium anisopliae*, patogenność

Wprowadzenie

Na redukcję plonu ziemniaków duży wpływ ma występowanie szkodników i infekcji grzybowych niszczących powierzchnię asymilacyjną roślin ziemniaka. Straty, które powodują szkodniki w uprawie ziemniaka, mogą sięgać nawet kilkudziesięciu procent [1]. Jednym z najgroźniejszych szkodników w uprawie ziemniaka w Polsce jest stonka ziemniaczana (*Leptinotarsa decemlineata*), której liczebność praktycznie corocznie na wielu powierzchniach uprawy ziemniaka przekracza próg ekonomicznej szkodliwości. Stonka ziemniaczana ze względu na geograficzne pochodzenie jest owadem ciepłochylnym, a nasilenie jej występowania i dynamika rozmnażania zależą od stanu pogody (przede wszystkim od opadów i temperatury otoczenia) w danym sezonie wegetacyjnym [2]. W ochronie roślin, w tym ziemniaka, dominują dwie tendencje: skutecznego zwalczania szkodnika oraz ochrony środowiska naturalnego i zdrowia człowieka [2]. W większości przypadków do ochrony upraw ziemniaka przed stonką stosuje się chemiczne insektycydy, a wykorzystanie biopreparatów jest ograniczone [3].

W Polsce od dawna podejmuje się próby wykorzystania wrogów naturalnych stonki w praktyce rolniczej. Grzyby owadobójcze wykorzystywane były do zwalczania różnych szkodliwych owadów, a przede wszystkim do zwalczania szkodników roślin warzywniczych i sadowniczych [4]. Doświadczenia takie, przeprowadzone już w latach 50., wykazały duże znaczenie grzybów entomopatogenicznych w ograniczeniu liczebności populacji stonki ziemniaczanej [2, 5]. Jednym z gatunków, który znalazł zastosowanie w zwalczaniu stonki, jest grzyb *Beauveria bassiana* [6-8]. Poszczególne szczepy grzybów owadobójczych mogą różnić się znacznie patogennością względem poszczególnych szkodników [9]. Dlatego tak ważne jest prawidłowe dobranie

¹ Katedra Ochrony Środowiska Rolniczego, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, al. A. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków, tel. 12 662 44 00, fax 12 633 62 45, email: krysaania@gmail.com

odpowiedniego szczepu, który będzie najbardziej patogeniczny względem danego szkodnika i jego poszczególnych stadiów rozwojowych. Bajan i Kmitowa [10] wskazują, że największą patogeniczność wobec owadów testowych wykazują szczepy wyizolowane na terenie Polski [11, 12].

Celem projektu było określenie patogeniczności wybranych szczepów grzyba owadobójczego *Metarhizium anisopliae* wobec larw i osobników dorosłych stonki ziemniaczanej. Badania te mogą być przydatne w opracowaniu biopreparatu do zwalczania stonki ziemniaczanej w warunkach polowych.

Materiał i metody badań

W doświadczeniu oceniana była patogeniczność wybranych szczepów grzyba owadobójczego *M. anisopliae*, które izolowano z gleby za pomocą metody owadów pułapkowych. Do badań wykorzystano trzy szczepy grzyba owadobójczego *M. anisopliae*, oznaczone następującymi symbolami: **A** - PN0/0 izolowany z gleby zadrzewień śródpolnych na larwy *Tenebrio molitor* - miejscowość Gdów (woj. małopolskie), **B** - PN3/1 izolowany z gleby pola uprawnego na larwy *Tenebrio molitor* - miejscowość Gdów (woj. małopolskie), **C** - AP032 izolowany z gleby pola uprawnego na larwy *Galleria mellonella* - miejscowość Łosice (woj. mazowieckie).

Chrząższe i larwy stonki ziemniaczanej zostały zebrane na poletkach, na których uprawiano ziemniaki. Wybrane szczepy grzyba owadobójczego *M. anisopliae* były hodowane na zmodyfikowanym podłożu glukozowo-ziemniaczanym, następnie została z nich sporządzona zawiesina zarodników. Stężenie zarodników w zawiesinie zostało określone za pomocą komory Bürkera [13]. Przed przeprowadzeniem doświadczenia skontrolowano zdolność do kiełkowania zarodników tych szczepów. Patogeniczność grzyba określono wobec trzech stadiów larwalnych (L_2 , L_3 , L_4) oraz wobec imago stonki ziemniaczanej. W szalkach Petriego, wyłożonych bibułą filtracyjną, zostało umieszczonych 10 osobników odpowiedniego stadium rozwojowego owada. Larwy i chrząszcze stonki ziemniaczanej były skarmiane codziennie świeżymi liśćmi ziemniaka, skropionymi 1 cm^3 zawiesiny zarodników na ok. 5 g pokarmu. Wyjściowe stężenie zarodników grzyba wynosiło $4,87 \times 10^7$ w 1 cm^3 . Larwy i imago opryskiwane były następującymi dawkami zarodników: 1 - brak rozcieńczenia zawiesiny, 2 - 10-krotne rozcieńczenie, 3 - 100-krotne rozcieńczenie. W kontroli do opryskiwania owadów testowych zastosowano wodę destylowaną. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Codziennie sprawdzano śmiertelność owadów testowych. Szalki przetrzymywano w temperaturze 21°C przez okres 28 dni. W wynikach podano śmiertelność owadów testowych skorygowaną o ich naturalną śmiertelność. Wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 10.0 PL. W szczegółowych porównaniach średnich wykorzystano testy NIR Tukeya lub jednorodności wariancji Browna-Forsythe'a, zakładając poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki i ich omówienie

Zdolność do kiełkowania wybranych szczepów grzyba owadobójczego *M. anisopliae* wahała się od 89% dla szczepu A do niespełna 93% dla szczepu C (tab. 1). Z analizy

statystycznej wynika, że poziomy kiełkowania poszczególnych szczepów nie różniły się między sobą istotnie.

Zdolność kiełkowania grzyba owadobójczego *M. anisopliae* [%]

Tabela 1

Germination ability of spores of entomopathogenic fungus *M. anisopliae* [%]

Table 1

Szczep grzyba owadobójczego	Procent kiełkujących zarodników
A*	89,00
B	92,67
C	87,67
$F = 0,60; p = 0,57; r.n.$	

*Szczepy: A - PN0/0, B - PN3/1, C - AP032; Test jednorodności wariancji Browna-Forsythe'a; zaznaczone efekty są istotne $z p < 0,05$; r.n. - różnice nieistotne

Badania przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych wskazują na zróżnicowaną wrażliwość stadiów rozwojowych stonki ziemniaczanej na badane szczepy grzyba owadobójczego *M. anisopliae* (tab. 2). Znacznie bardziej wrażliwe na porażenie przez grzyba były młode larwy L_2 stonki ziemniaczanej niż larwy starsze L_3 . Najbardziej wrażliwe były larwy pokolenia L_2 , ich śmiertelność po dwóch dniach od rozpoczęcia doświadczenia wahała się od 0 do 30% w zależności od zastosowanego szczepu i stężenia zarodników. Po 10 dniach od rozpoczęcia doświadczenia najbardziej patogeniczny w stosunku do larw pokolenia L_2 okazał się szczep A - powodujący od 40,0 do 63,3% śmiertelności w zależności od stężenia zarodników. Zarówno szczep B, jak i C powodował najwyższą śmiertelność larw stonki, gdy stosowano maksymalne stężenie zarodników. Stadium larwalne L_3 okazało się stosunkowo odporne na działanie badanych szczepów grzyba owadobójczego - śmiertelność po 10 dniach od aplikacji wynosiła 20-23% w zależności od szczepu.

Patogeniczność wybranych szczepów *M. anisopliae* wobec larw i imago stonki ziemniaczanej

Tabela 2

Pathogenicity of selected strains of entomopathogenic fungus *M. anisopliae* against larvae and imago of Colorado potato beetle

Table 2

Szczep grzyba	Dawka zarodników	Śmiertelność poszczególnych stadiów rozwojowych [%]				
		Dzień obserwacji				
		2	4	6	8	10
Stadium larwalne L_2						
A*	1**	3,3	23,3	33,3	50,0	63,3
	2	30,0	30,0	30,0	33,3	40,0
	3	26,7	33,3	43,3	43,3	43,3
B	1	26,7	43,3	46,7	53,3	53,3
	2	3,3	6,7	16,7	26,7	36,7
	3	0,0	10,0	16,7	20,0	23,3
C	1	13,3	16,7	40,0	40,0	46,7
	2	23,3	26,7	33,3	43,3	43,3
	3	16,7	20,0	33,3	40,0	40,0
NIR(0,05) = 3,62						

Szczep grzyba	Dawka zarodników	Śmiertelność poszczególnych stadiów rozwojowych [%]				
		Dzień obserwacji				
		2	4	6	8	10
Stadium larwalne L₃						
A	1	0,0	3,3	3,3	10,0	20,0
	2	0,0	3,3	3,3	6,7	6,7
	3	0,0	3,3	3,3	3,3	3,3
B	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	10,0	13,3
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	6,7	6,7	10,0	13,3	20,0
	3	6,7	16,7	13,3	16,7	23,3
NIR (0,05) = 6,87						
Stadium larwalne L₄						
A	1	0,0	30,0	43,3	43,3	43,3
	2	0,0	0,0	0,0	3,3	3,3
	3	20,0	20,0	20,0	20,0	26,7
B	1	23,3	23,3	33,3	33,3	33,3
	2	16,3	16,3	16,3	20,0	23,3
	3	26,7	26,7	33,3	33,3	33,3
C	1	20,0	20,0	46,7	46,7	46,7
	2	26,7	26,7	36,7	43,3	43,3
	3	23,3	23,3	33,3	36,7	36,7
NIR (0,05) = 3,07						
Imago						
A	1	0,0	0,0	0,0	13,3	20,0
	2	0,0	0,0	0,0	3,3	10,0
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7
B	1	56,7	63,3	73,3	73,3	76,7
	2	0,0	3,3	3,3	23,3	23,3
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7
C	1	0,0	0,0	0,0	6,7	13,3
	2	0,0	0,0	0,0	3,3	13,3
	3	0,0	0,0	13,3	20,0	30,0
NIR (0,05) = 4,06						

*Szczepy: A - PN0/0, B - PN3/1, C - AP032; **1 - zawiesina wyjściowa ($4,87 \cdot 10^7$ w 1 cm^3), 2 - 10-krotne rozcieńczenie, 3 - 100-krotne rozcieńczenie

Najlepsze efekty w przypadku stadium L₄ uzyskano przy zastosowaniu szczepu C niezależnie od zastosowanego stężenia zarodników - po 10 dniach śmiertelność wynosiła od 36,7 do 46,7%. Najbardziej odporne na działanie szczepów grzyba owadobójczego *M. anisopliae* okazały się owady dorosłe. Jedynie w przypadku zastosowania szczepu B odnotowano dużą śmiertelność po 2 dniach, która wynosiła 56,7%. W pozostałych przypadkach pierwsze osobniki ginęły po 4, 6, 8, a nawet 10 dniach. Ogólnie śmiertelność osobników dorosłych nie przekraczała 30% po 10 dniach obserwacji, z wyjątkiem wysokiej patogeniczności szczepu B - śmiertelność osobników dorosłych wynosiła w tym przypadku ponad 76%. Zwiększenie zastosowanej dawki zarodników powodowało zwiększenie śmiertelności owadów testowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane szczepy *M. anisopliae* mogą mieć zastosowanie do zwalczania stonki ziemniaczanej. Larwy pokolenia L₂ i L₄ są najbardziej wrażliwe na

działanie szczepów A i C. Natomiast badane szczepy wykazały się małą skutecznością w stosunku do owadów dorosłych. Wskazuje to na konieczność stosowania grzyba *M. anisopliae*, w momencie kiedy szkodnik ten występuje we wczesnym stadium larwalnym. Istotny jest wybór szczepu, ponieważ poszczególne stadia rozwojowe stonki ziemniaczanej różnią się wrażliwością na szczepy grzyba *M. anisopliae*.

Wnioski

1. Najbardziej wrażliwe na działanie badanych szczepów grzyba owadobójczego *M. anisopliae* są stadia larwalne L₂, a najmniej L₃ i imago.
2. Spośród badanych szczepów *M. anisopliae* najbardziej patogeniczny wobec stadium larwalnego okazał się szczep A, a wobec osobników dorosłych szczep B.
3. Opracowując strategię zwalczania stonki ziemniaczanej za pomocą grzybów owadobójczych, należy wziąć pod uwagę wrażliwość zwalczanego stadium rozwojowego szkodnika na czynnik biologiczny.

Podziękowania

Praca finansowana z dotacji celowej nr tematu 4131/KOŚR/2012 dotyczącej badań naukowych lub prac rozwojowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w temacie „Wykorzystanie wybranych szczepów grzyba owadobójczego *Metarhizium anisopliae* do zwalczania stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata*)”.

Literatura

- [1] Radcliffe EB, Ragsdale DW, Flanders KL. Management of aphids and leafhoppers. In: Potato Health Management. Randall C. Rowe, editor. USA: St. Paul, Mn: 1993;117-126.
- [2] Sosnowska D, Pruszyński S, Lipa JJ. Ewolucja metod i środków w zwalczaniu stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin. Poznań: Institute of Plant Protection. 2009;49(2):565-576.
- [3] Kołodziejczyk M, Ropek D, Szmigiel A. Kształtowanie się powierzchni asymilacyjnej roślin ziemniaka oraz składu chemicznego bulw w zależności od metody zwalczania stonki ziemniaczanej. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin. Poznań: Institute of Plant Protection. 2010;50(1):477-481.
- [4] Żukowski K, Bajan C. Badania laboratoryjne aktywności szczepów owadobójczego grzyba *Paecilomyces farinosus* w redukcji liczebności prusaków *Blatella germanica* L. Roczn PZH. 1997;48(2):133-138.
- [5] Błońska-Pawlak A. Patogeniczne grzyby stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata* Say) z rodzaju *Beauveria*. Roczn Nauk Roln Seria A. 1957;74(2):356-372.
- [6] Bajan C. Od badań szczegółowych do preparatu grzybowego. Biotechnologia. 2000;3(50):58-64.
- [7] Boguś MI. Grzyby patogenne jako źródło insektycydów. Biotechnologia. 2000;3(50):33-46.
- [8] Kołodziejczyk M, Szmigiel A, Ropek D. Production effectiveness of potato protection using selected insecticides for potato beetle control (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Acta Sci Pol Agricultura. 2009;8(4):5-14.
- [9] Blom PE, Fleischer SJ. Dynamics in the spatial structure of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). Environmental Entomology 2001;30(2):350-364. DOI: 10.1603/0046-225X-30.2.350.
- [10] Bajan C, Kmitowa K. The effect of entomogenous fungi *Paecilomyces farinosus* (Dicks) Brown et Smith and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on the oviposition by *Leptinotarsa decemlineata* Say females and on the survival of larvae. Ekol Polska. 1972;20:432.
- [11] Huseth AS, Frost KE, Knutson DL, Wyman JA, Groves RL. Effects of landscape composition and rotation distance on *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) abundance in cultivated potato. Environmental Entomology. 2012;41(6):1553-1564. DOI: 10.1603/EN12128.

- [12] Lipa JJ, Śliżyński K. Wskazówki metodyczne i terminologia do wyznaczania średniej dawki śmiertelnej (LD50) w patologii owadów i toksykologii. *Prace Nauk Inst Ochr Roślin*. 1973;15(1):59-82.

PATHOGENICITY OF SELECTED STRAINS OF FUNGUS *METARHIZIUM ANISOPLIAE* USED AGAINST COLORADO POTATO BEETLE (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*)

Department of Agricultural Environment Protection, University of Agriculture in Krakow

Abstract: The aim of this study was to determine the possibility of using selected strains of the fungus *Metarhizium anisopliae* to control Colorado potato beetle. The results indicate that the tested strains *M. anisopliae* are characterized by relatively low pathogenicity against larvae and adults of Colorado potato beetle. The most resistant to investigated fungus strains was the larval stage L₃ and imago. Two strains that were isolated from soil in Łosice and Gdów can be used to control larvae and imago of *L. decemlineata*.

Keywords: Colorado potato beetle, *Metarhizium anisopliae*, pathogenicity