

THE EVALUATION OF PLANTS AND SOIL COLONIZATION BY ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *ISARIA FUMOSOROSEA* USED FOR DRESSING MAIZE AND FABA BEAN SEEDS

Summary

The experiment was conducted at the University of Agriculture in Cracow. The aim of experiment was to evaluate the ability of entomopathogenic fungi to colonised plants phyllosphere and peat soil. The seeds of maize and faba bean were dressed with spores of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (dose $4,2 \times 10^{11}$ spores/1 kg seeds). *I. fumosorosea* was cultured on Sabouraud Dextrose Agar medium. The method of trap insects (larvae of *Tenebrio molitor* L.) was used for evaluation of soil colonization by *I. fumosorosea*. The occurrence of entomopathogenic fungus on plant leaves was also observed. The entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* applied with seeds can quickly colonizes soil and the phyllosphere of plants. The entomopathogenic fungus *I. fumosorosea* may be used to protect plants against soil and above-ground insects. The results indicate the possibility of seed dressing with entomopathogenic fungi in ecological farms.

OCENA KOLONIZACJI NADZIEMNYCH CZĘŚCI ROŚLIN ORAZ GLEBY PRZEZ GRZYBA OWADOBÓJCZEGO *ISARIA FUMOSOROSEA* STOSOWANEGO DO ZAPRAWIANIA NASION KUKURYDZY ORAZ BOBIKU

Streszczenie

Doświadczenie laboratoryjne wykonano na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, w Katedrze Ochrony Środowiska Rolniczego. Nasiona kukurydzy oraz bobiku zostały zaprawione zarodnikami grzyba owadobójczego *Isaria fumosorosea* w dawce $4,2 \times 10^{11}$ /1 kg nasion. Zarodniki grzyba owadobójczego pozyskano z hodowli na podłożu Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Celem doświadczenia było określenie możliwości kolonizacji fytosfery badanych roślin, a także gleby torfowej, do której zostały wysiane nasiona zaprawione zarodnikami grzyba owadobójczego. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania grzybów owadobójczych do zaprawiania materiału siewnego, wykorzystywanego w gospodarstwach ekologicznych. Wykazano, iż grzyb owadobójczy *Isaria fumosorosea* jest zdolny do kolonizacji fytosfery kukurydzy oraz bobiku. Zaobserwowano występowanie grzyba na liściach badanych roślin. Do oceny kolonizacji gleby zastosowano metodę owadów pułapkowych, z wykorzystaniem larw mącznika młynarka (*Tenebrio molitor* L.). Stwierdzono, że grzyb *Isaria fumosorosea* szybko rozprzestrzenia się w podłożu i wykazuje dużą patogenność w stosunku do owadów testowych. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż grzyb owadobójczy *Isaria fumosorosea* może być wykorzystany do ochrony roślin przed szkodnikami zarówno glebowymi, jak i atakującymi nadziemne części roślin.

1. Wprowadzenie

Głównym rezerwuarem grzybów owadobójczych jest gleba, w której stanowią one ważną część biomasy ziemi [9]. Ich występowanie w środowisku glebowym oraz efektywność uzależniona jest od wielu czynników, takich jak dostępność gospodarzy, pora roku, wilgotność gleby, rodzaj gleby, struktura gleby czy sposób jej użytkowania [5]. Grzyby owadobójcze są zdolne do rozprzestrzeniania się w glebie dzięki występującym w niej wolnym przestrzeniom. Mogą przyczynić się do ulepszenia struktury glebowej, wpływają na przemieszczanie się wody w glebie, ale również mogą działać niekorzystnie rozkładając materię organiczną gleby, która z kolei wpływa na agregację gleby [9]. Najważniejszą jednak cechą grzybów owadobójczych jest ich zdolność do ograniczania liczebności fauny glebowej, zwłaszcza szkodliwej dla roślin uprawnych [6].

Grzyby owadobójcze mogą występować nie tylko w glebie, ale również na nadziemnych częściach roślin. Wagner i Lewis [10] wskazują na możliwość kolonizacji kukurydzy przez grzyba owadobójczego *Beauveria bassiana*. Należy zwrócić uwagę na sposób rozprzestrzeniania się grzybów owadobójczych w środowisku. Niewiele jest publikacji na temat możliwości kolonizacji roślin przez grzyby owadobójcze

stosowane do zaprawiania nasion roślin uprawnych.

2. Cel badań

Celem badań była ocena możliwości kolonizacji nadziemnych części roślin kukurydzy i bobiku oraz podłoża przez grzyba owadobójczego *Isaria fumosorosea* stosowanego do zaprawiania nasion.

3. Materiał i metody badań

Doświadczenie wykonano w Katedrze Ochrony Środowiska Rolniczego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Zastosowano nasiona kukurydzy cukrowej odmiany Ambrozja oraz bobiku odmiany Sonet. Nasiona zaprawiono zarodnikami grzyba owadobójczego *Isaria fumosorosea* w dawce $4,2 \times 10^{11}$ /1 kg nasion. Nasiona wysiano do gleby torfowej z dodatkiem hydrożelu AgroAquaGel, pochodzącego z firmy Artagro z siedzibą w Krakowie oraz gleby torfowej bez hydrożelu. Kontrolę stanowiły nasiona nie zaprawiane wysiewane do gleby torfowej bez hydrożelu. Wysiewano po 10 nasion każdej z roślin do tacek wielodoniczkowych. Doświadczenie wykonano w pięciu powtórzeniach.

Po 5 dniach hodowli oceniono zdolność do kiełkowania

wysianych nasion. Hodowlę roślin zakończono po 10 dniach. Oceniono kolonizację nadziemnych części roślin przez grzyb *I. fumosorosea*. W tym celu na szalkach Petriego z podłożem Sabouraud Dextrose Agar (SDA) z dodatkiem chloramphenikolu wykonano odciski liści. Szalki przechowywano przez 14 dni w temperaturze 25°C. Po 2 tygodniach oceniono liczbę kolonii grzyba *I. fumosorosea* wyizolowanego z 10 liści kukurydzy oraz bobiku.

Oceniono również występowanie *I. fumosorosea* w glebie torfowej, do której wysiewano nasiona zaprawione zarodnikami grzyba owadobójczego. Obserwację wykonano z wykorzystaniem metody owadów pułapkowych. Glebę z tac wielodoniczkowych przeniesiono do sterylnych pojemników, gdzie umieszczono po 10 larw mącznika młynarka (*Tenabrio molitor* L.). Pojemniki umieszczono w cieplarni na 10 dni w temperaturze 21°C. Co 3 dni dolewano do kubków po 1 ml wody destylowanej w celu zapewnienia odpowiednich warunków wilgotnościowych dla grzybów. Po 10 dniach oceniono liczbę martwych owadów oraz liczbę owadów, na których występowała mikoza. Kontrolę stanowiły owady umieszczone w pojemnikach z glebą sterylną.

4. Wyniki i ich omówienie

Zaprawianie nasion bobiku oraz kukurydzy zarodnikami grzyba *I. fumosorosea* oraz wysiewanie ich do gleby torfowej z dodatkiem hydrożelu nie ograniczyło zdolności do kiełkowania nasion. Wszystkie nasiona kiełkowały w zbliżonym tempie porównywalnym do kontroli, z wyjątkiem nasion bobiku zaprawianych zarodnikami grzyba owadobójczego wysiewanych do gleby torfowej wymieszanej z hydrożelem, gdzie zaobserwowano większą zdolność do kiełkowania nasion o 13,3% w porównaniu do nasion w kontroli (tab. 1).

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość kolonizacji nadziemnych części roślin przez grzyba owadobójczego *I. fumosorosea*, zastosowanego do zaprawiania nasion bezpośrednio przed siewem. Z liści badanych roślin, których nasiona były zaprawiane grzybem entomopatogennym wyizolowano od 7 do 14 kolonii grzyba *I. fumosorosea* (tab. 2).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na możliwość rozprzestrzeniania się grzybów owadobójczych w glebie torfowej, do której wysiewano nasiona kukurydzy oraz bobiku zaprawiane zarodnikami grzyba owadobójczego. Świadczy

o tym liczba martwych owadów testowych oraz liczba owadów porośniętych grzybnia *I. fumosorosea* znajdującą się w pojemnikach z glebą zakażoną zarodnikami grzyba. Ponadto zaobserwowano, iż dodatek hydrożelu do gleby zmniejszył skuteczność działania grzyba owadobójczego, ponieważ liczba owadów testowych porażonych przez grzyba owadobójczego *I. fumosorosea* była mniejsza niż w pojemnikach, gdzie stosowano hydrożelu (tab. 3).

5. Dyskusja

Doglebowa aplikacja grzybów owadobójczych poprzez zaprawianie nasion zarodnikami grzybów może pozytywnie wpłynąć na ochronę roślin przed szkodnikami glebowymi. Ponadto wyniki własnych badań wskazują na możliwość kolonizacji nadziemnych części roślin przez te grzyby.

Naukowcy wskazują na możliwość kolonizacji roślin przez grzyby entomopatogeniczne poprzez wszczepianie do ich tkanek zarodników grzyba [1, 2, 3, 8]. Zarodniki są zdolne do kiełkowania wewnątrz tkanek roślinnych, nie szkodząc jednocześnie samym roślinom. Badania w tym kierunku przeprowadzili Gómez-Vidal i wsp.[4], którzy wstrzykiwali do Palmy daktylowej (*Phoenix dactylifera* L.) zarodniki grzybów owadobójczych oceniając ich szkodliwość względem rośliny. Podobne wyniki w swoich badaniach uzyskali Akello i wsp. [1], którzy wskazują na obecność grzyba owadobójczego *B. bassiana* w liściach banana nawet po czterech miesiącach od momentu zaszczepienia roślin zawieszoną zarodników. W badaniach własnych wszczepianie zarodników do roślin zastąpiono zaprawianiem nasion zarodnikami grzyba owadobójczego *Isaria fumosorosea*. Z odcisków liści badanych roślin izolowano od kilku do kilkunastu kolonii grzyba owadobójczego, stosowanego do zaprawiania nasion przed siewem. Może to wskazywać na kolonizację roślin przez grzyby entomopatogenne stosując zaprawianie nasion gotowym biopreparatem. Podobnie twierdzą Moulton i Pereira [7], którzy wysiewali nasiona pomidora oraz bawełny wraz z zarodnikami grzyba *B. bassiana*. Uzyskane przez nich wyniki wskazują na kolonizację tych roślin przez strzępki zastosowanego grzyba chroniąc jednocześnie rośliny nie tylko przed szkodnikami, ale również przed nadmiernym rozwojem grzybów chorobotwórczych, takich jak *Rhizoctonia solani* oraz *Pythium myriotylum*.

Tab. 1. Wpływ zaprawiania nasion zarodnikami *I. fumosorosea* na zdolność kiełkowania nasion
Table. 1. The effect of seed dressing *I. fumosorosea* spores on the seeds germination

Roślina uprawna /Crop	Zdolność kiełkowania nasion [%] /Germinability of seeds [%]		
	Nasiona nie zaprawione, gleba torfowa bez hydrożelu /Seeds do not dressed, peat soil without hydrogel	Nasiona zaprawiane grzybem owadobójczym <i>I. fumosorosea</i> , gleba torfowa bez hydrożelu /Seeds dressed with entomopathogenic fungus <i>I. fumosorosea</i> , peat soil without hydrogel	Nasiona zaprawiane grzybem owadobójczym <i>I. fumosorosea</i> , gleba torfowa z hydrożelem /Seeds dressed with entomopathogenic fungus <i>I. fumosorosea</i> , peat soil with hydrogel
Kukurydza /Maize	76,7	73,3	70,0
Bobik /Faba bean	76,7	83,3	90,0

Tab. 2. Ocena kolonizacji nadziemnych części roślin przez grzyba owadobójczego *I. fumosorosea*
 Table. 2. The evaluation of colonization of overground part of plants by entomopathogenic fungus *I. fumosorosea*

Roślina uprawna /Crop	jtk/liść /cfu/leaf		
	Nasiona nie zaprawione, gleba torfowa bez hydrożelu /Seeds do not dressed, peat soil without hydrogel	Nasiona zaprawiane grzybem owadobójczym <i>I. fumosorosea</i> , gleba torfowa bez hydrożelu /Seeds dressed with entomopathogenic fungus <i>I. fumosorosea</i> , peat soil without hydrogel	Nasiona zaprawiane grzybem owadobójczym <i>I. fumosorosea</i> , gleba torfowa z hydrożelem /Seeds dressed with entomopathogenic fungus <i>I. fumosorosea</i> , peat soil with hydrogel
Kukurydza /Maize	0	1,4	0,7
Bobik /Faba bean	0	1,2	1,4

Tab. 3. Kolonizacja gleby przez grzyba owadobójczego *I. fumosorosea*
 Table. 3. The colonization of peat soil by entomopathogenic fungus *I. fumosorosea*

Roślina uprawna /Crop	Oceniane parametry /Estimated parameters	Nasiona nie zaprawione, gleba torfowa bez hydrożelu /Seeds do not dressed, peat soil without hydrogel	Nasiona zaprawiane grzybem owadobójczym <i>I. fumosorosea</i> , gleba torfowa bez hydrożelu /Seeds dressed with entomopathogenic fungus <i>I. fumosorosea</i> , peat soil without hydrogel	Nasiona zaprawiane grzybem owadobójczym <i>I. fumosorosea</i> , gleba torfowa z hydrożelem /Seeds dressed with entomopathogenic fungus <i>I. fumosorosea</i> , peat soil with hydrogel
Kukurydza /Maize	Śmiertelność owadów testowych [%] Mortality of test insects [%]	8,7	58,7	34,7
	% owadów z widoczną mikozą % insects with micosis	0,0	67,9	56,7
Bobik /Faba bean	Śmiertelność owadów testowych [%] Mortality of test insects [%]	9,3	38,0	22,0
	% owadów z widoczną mikozą % insects with micosis	0,0	62,3	70,6

6. Wnioski

1. Zaprawianie nasion kukurydzy oraz bobiku zarodnikami grzyba owadobójczego *I. fumosorosea* nie wpływa na ograniczenie ich zdolności kiełkowania w glebie torfowej zarówno z dodatkiem hydrożelu, jak i bez hydrożelu.
2. Zaprawianie nasion kukurydzy oraz bobiku zarodnikami grzyba owadobójczego *I. fumosorosea* może przyczynić się do kolonizacji nadziemnych części roślin.
3. Wysiewanie nasion kukurydzy oraz bobiku zaprawionych zarodnikami grzyba owadobójczego *I. fumosorosea* przyczynia się do rozprzestrzeniania się badanego grzyba w glebie torfowej.
4. Wysiewanie nasion kukurydzy oraz bobiku zaprawionych zarodnikami grzyba owadobójczego *I. fumosorosea* przyczynia się do rozprzestrzeniania się badanego grzyba w glebie torfowej z dodatkiem hydrożelu.

7. Literatura

- [1] Akello J., Dubois T., Coyne D., Gold C.S., Kyamanywa S. Colonization and persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, in tissue culture of banana. African Crop Science Conference Proceedings, 2007, Vol. 8, s. 857-861.
- [2] Bing L.A., Lewis L.C.: Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hubner). Biocontrol Sci., 1992, Technol. 2, s. 39-47.
- [3] Bing L.A., Lewis L.C.: Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*. Entomophaga, 1992, 37, s. 525-536.
- [4] Gómez-Vidal S., Lopez-Llorca L.V., Jansson H.-B. Salinas J.: Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. Micron, 2006, 37, s. 624-632.
- [5] Marjańska-Cichoń B., Miętkiewski R., Sapięha-waszkiewicz A.: Występowanie i skład gatunkowy grzybów owadobójczych w glebach z sadów jabłoniowych. Acta Agrobotanica, 2005, Vol. 58, z. 1, s. 113-124.
- [6] Meyling N.V., Eilenberg J.: Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2006, 113, s. 336-341.
- [7] Moulton J. K., Pereira R.M.: *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98, s. 267-270.
- [8] Posada F., Vega F.E.: Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Mycoscience, 2006, 47, s. 284-289.
- [9] Ritz K., Young I.M. Interactions between soil structure and fungi. Mycologist, 2004, Volume 18, Part 2: 52-59.
- [10] Wagner B.L. i Lewis L.C.: Colonization of Corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. Applied And Environmental Microbiology, 2000, s. 3468-3473.