

Wpływ inhibitorów syntezy chityny na wzrost grzybów owadobójczych *in vitro*

ANNA SAPIEHA, RYSZARD MIĘTKIEWSKI

Zakład Ochrony Roślin, Wyższa Szkoła Rolniczo-Pedagogiczna,
Siedlce

Sapieha A., Miętkiewski R.: (Department of Plant Protection, Agricultural and Teachers University, Prusa 14, Siedlce, Poland). *The influence of chitin synthesis inhibitors on growth of entomopathogenic fungi in vitro*. Acta Mycol. XXVII (2): 189-195, 1991-1992.

Beauveria bassiana, *Paecilomyces farinosus*, *Verticillium lecanii*, *Conidiobolus thromboides*, *Erynia pieris*, *E. radicans* were examined on medium to which were added three chitin synthesis inhibitors.

WSTĘP

W początku lat siedemdziesiątych odkryta została nowa grupa insektycydów – pochodnych acylomocznikowych, od sposobu działania nazywanych inhibitorami syntezy chityny (P o s t i w s p., 1973).

W Polsce zarejestrowanych jest osiem preparatów z tej grupy o różnej formie użytkowej opartych na następujących substancjach aktywnych: diflubenzuronie, chlorfluazuronie, flufenoksuronie, hexafluronie, teflubenzuronie i triflumuronie (M a l i n o w s k i, 1990). Inhibitory działają na owady w sposób odmienny od klasycznych insektycydów. Prowadzą do zaburzeń procesów enzymatycznych odpowiedzialnych za prawidłową syntezę chityny. Inhibitory niszczą przede wszystkim stadia larwalne owadów, które giną podczas linienia nie mogąc wytworzyć normalnego szkieletu (S u s k i, 1983). Specyficzne działanie inhibitorów syntezy chityny stwarza przesłanki do stosowania ich łącznie z preparatami grzybowymi. Grzyby owadobójcze są bowiem jedynymi patogenami owadów infekującymi je przez osłony ciała; w połączeniu z inhibitorami miałyby one ułatwione działanie. Od dawna prowadzono badania nad łącznym stosowaniem niektórych preparatów grzybowych z małymi dawkami insektycydów. Podnosiłoby to skuteczność preparatu biologicznego, a zarazem byłoby bezpieczniejsze dla środowiska naturalnego.

Istotne stało się zatem określenie bezpośredniego wpływu insektycydów na wzrost i rozwój grzybów owadobójczych. Jako jedne z pierwszych testowano insektycydy z grupy chlorowanych węglowodorów uzyskując często rozbieżne wyniki (Kral, Neubauer, 1953, 1956; Telenga i in., 1959; Kerner, 1959). Preparaty fosforoorganiczne zwykle ograniczały wzrost i rozwój grzybów entomopatogenicznych, jakkolwiek zdarzały się również przypadki stymulacji wzrostu (Sechurina, 1958; Majchrowicz, Miętkiewski, 1976; Miętkiewski i in., 1989/90). Popularne i szeroko propagowane pyretroidy najczęściej w niewielkim stopniu hamowały wzrost grzybów owadobójczych (Fedorko, 1985; Bajan, 1985; Bajan, Fedorko, Kmitowa, 1986; Vänninen, Hokkanen, 1988). Niedawno podjęto badania nad wpływem najnowszej grupy insektycydów – inhibitorów syntezy chityny – na grzyby owadobójcze, w tym głównie na *Beauveria bassiana* (Gardner i in., 1979; Anderson i Roberts, 1983; Anderson i in., 1989).

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu trzech najpopularniejszych inhibitorów na wzrost entomopatogenicznych grzybów z rzędów *Moniliales* i *Entomophthorales*.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Do badań użyto trzech preparatów z grupy inhibitorów syntezy chityny: Alsystinu, Dimilinu i Nomoltu. (tab. 1).

Tabela 1 – Table 1

Wykaz i charakterystyka badanych preparatów
The list and characteristic of investigated preparations

Preparat Preparation	Nazwa i zawartość s.a. Name and content a.i. %	Klasa toksyczności Class of toxicity	Dawka zalecana Dose recommended w (in) g lub (or) ml/l l	Zakres zwalczania szkodników gryzących Range of pest control activity	Producent Manufacturer
Dimilin 25 WP	diflubenzuron 25	IV	0,4	<i>Lepidoptera</i> i <i>Coleoptera</i>	Duphar B.V. Holandia
Nomolt SC 15	teflubenzuron 15	V	0,2	<i>Lepidoptera</i> i <i>Coleoptera</i>	Shell East Eu- rope Services Co. Ltd.
Alsystin 25 EC	triflumuron 25	V	0,4	<i>Lepidoptera</i> i <i>Coleoptera</i>	Bayer A. G. Levercusen RFN

Na pożywkach z dodatkiem wyżej wymienionych preparatów badano wzrost sześciu gatunków grzybów entomopatogennych.

Grzyby z rzędu *Moniliales*: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. z *Brosicus cephalotes* L., *Paecilomyces farinosus* (Dicks ex Fr.) Brown et Smith z nieokreślonego gatunku gąsienicy, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas z *Arge berberidis* Schrank., hodowano na podłożu Sabouraud'a.

Dla grzybów z rzędu *Entomophthorales*: *Conidiobolus thromboides* Drechsler (z *Aphis fabae* Scop.), *Erynia pieris* Li et Humber (z *Pieris rapae* L.) oraz *Erynia radicans* (Bref.) Humber (z *Pieris brassicae* L.) przygotowano pożywkę Sabouraud'a z dodatkami: do jednego litra jałowej pożywki Sabouraud'a dodano 16 g osobno wysterylizowanego mleka oraz 12 żółtek jaj kurzych (wysterylizowanych powierzchniowo w 50 % alkoholu przez 30 min.); pożywkę schłodzono do temp. 60°C, a następnie dodano do niej odpowiednią ilość inhibitorów syntezy chityny (tab. 1). Ustalono trzy różne koncentracje dla każdego preparatu w pożywce:

- A – stężenie 10-krotnie niższe od zalecanej dawki połowej,
- B – stężenie odpowiadające dawce połowej,
- C – stężenie 10-krotnie wyższe od zalecanej dawki połowej.

Kolejne stężenia uzyskano metodą rozcieńczeń. Tak przygotowane pożywki rozlano do wyjałowionych szalek Petriego o średnicy 9 cm. Grzyby zostały wyszczepione po upływie dwu dni. Wszystkie kombinacje doświadczenia prowadzono w pięciu powtórzeniach. Hodowlę prowadzono w temperaturze około 21-23°C. Obserwacje wykonywano w odstępach pięciodniowych. Mierzono średnicę kolonii aż do pokrycia przez grzybnicę całej powierzchni szalki.

WYNIKI BADAŃ

Badane inhibitory syntezy chityny w różny sposób wpływały na wzrost grzybów z rzędu *Moniliales* (tab. 2). D i m i l i n dodany do pożywki w stężeniu zalecanym i 10-krotnie niższym od zalecanego w niewielkim stopniu stymulował wzrost wszystkich badanych gatunków. Grzyby rosnące na podłożach z tym insektycydem o koncentracji 10-krotnie wyższej od zalecanej miały w początkowym okresie hodowli znacznie ograniczony wzrost, ale na koniec doświadczenia wielkość ich kolonii zrównała się z kontrolnymi.

N o m o l t praktycznie nie oddziaływał na badane grzyby. Wielkość kolonii rosnących na podłożach z tym preparatem była zbliżona do wielkości kolonii kontrolnych. Jedynie *Beauveria bassiana* rozpoczynała wzrost dopiero po 5 dniach, później jednak rozwijała się równomiernie przez cały czas trwania doświadczenia wielkością dorównując kolonom kontrolnym. *Paecilomyces farinosus* rósł intensywniej w ciągu pierwszych 5 dni, a *Verticillium lecanii* w ciągu pierwszych 15 dni hodowli (tab. 2).

Tabela 2 - Table 2

Wielkość kolonii grzybów na pożywce z dodatkiem inhibitorów syntezy chityny
(wyrażona w % w stosunku do kontroli)
Diameter of the fungal colony on the medium containing chitin synthesis inhibitors
(given in % of control)

Gatunek Species	Nr Observacji Observation No	Nazwa insektycydu - Name of insecticide									
		Alsystin EC			Dimilin 25 WP			Nomolt SC-15			
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	
I	<i>Beauveria bassiana</i>	1	św	św	św	100	111	67	św	św	św
		2	75	80	80	116	116	95	97	93	101
		3	79	83	85	111	111	96	101	101	103
		4	84	86	85	114	113	103	99	100	104
		5	85	86	86	111	111	104	98	93	97
	<i>Paecilomyces farinosus</i>	1	92	72	110	100	108	38	114	104	127
		2	76	84	84	107	108	72	98	96	102
		3	81	84	87	105	105	85	97	98	102
		4	90	91	89	106	104	90	100	100	101
		5	92	92	88	100	102	92	98	98	98
	<i>Verticillium lecanii</i>	1	70	94	99	92	85	54	102	113	124
		2	76	93	90	86	83	67	107	111	111
		3	85	96	93	103	103	79	104	107	103
		4	88	97	94	100	104	85	97	99	105
		5	88	95	93	111	112	93	98	98	101
II	<i>Conidiobolus thromboides</i>	1	110	87	110	98	84	51	107	112	103
		2	116	92	120	99	98	84	117	121	114
	<i>Erynia picris</i>	1	210	121	210	95	79	św	96	88	128
		2	202	105	172	89	83	29	117	114	123
	<i>Erynia radicans</i>	1	139	111	132	112	107	23	163	212	141
		2	176	92	98	100	113	49	164	173	142

I - Moniliales, II - Entomophthorales; A-C - Stężenie insektycydu w dawce (Concentration of insecticide): A - 10-krotnie niższej od zalecanej (10-times less than the field dose), B - zalecanej (approached to the field dose), C - 10-krotnie wyższej od zalecanej (10-times higher than the field dose); św - ślady wzrostu (mark of growth)

Preparat *A l s y s t i n*, jako jedyny z testowanych inhibitorów syntezy chityny, przez cały czas trwania doświadczenia nieznacznie ograniczał wzrost badanych grzybów. Najwrażliwszym na obecność *A l s y s t i n* u w pożywce była *Beauveria bassiana*, kolonie jej miały wielkość 75-86 % kolonii kontrolnych.

Zastosowane w doświadczeniu 3 różne koncentracje preparatów *N o m o l t* i *A l s y s t i n* nie wpływały istotnie na wielkość kolonii rosnących na nich grzybów, zaś w przypadku *D i m i l i n* u jedynie koncentracja 10-krotnie wyższa od zalecanej ograniczała wzrost grzybów w pierwszej fazie hodowli.

Grzyby z rzędu *Entomophthorales* charakteryzuje szybsze tempo wzrostu niż grzyby z rzędu *Moniliales*, w związku z tym możliwe było przeprowadzenie jedynie dwu obserwacji ich wzrostu (tab. 2).

Preparat N o m o l t niezależnie od zastosowania stężenia stymulował wzrost grzybów z rzędu *Entomophthorales*, a ich kolonie były znacznie większe od kolonii kontrolnych. Szczególnie intensywnie rosła *Erynia radicans*. W dziesiątym dniu hodowli kolonie tego grzyba były o 42-73 % większe od kontroli.

A l s y s t i n w większości przypadków również stymulował wzrost badanych grzybów. Najintensywniej na podłożach z tym preparatem rozwijał się *Erynia pieris*, a wielkość kolonii dochodziła do 210 % w stosunku do kontroli. *Erynia radicans* początkowo rosła intensywnie w obecności A l s y s t i n u, jednak pod koniec hodowli tempo jej wzrostu na podłożach zawierających koncentrację zalecaną i 10-krotnie wyższą, znacznie zmalało. *Conidiobolus thromboides* jedynie przy stężeniu zalecanym A l s y s t i n u tworzył kolonie nieco mniejsze od kontrolnych.

D i m i l i n zastosowany w koncentracji 10-krotnie wyższej od zalecanej, jako jedyny z badanych preparatów, silnie ograniczał wzrost przedstawicieli *Entomophthorales*. Na koniec hodowli *Erynia radicans* osiągnęła 49 % wielkości w stosunku do kolonii kontrolnych, a *E. pieris* zaledwie 29 %. *Conidiobolus thromboides* i *Erynia pieris* pod wpływem niższych dawek D i m i l i n u tworzyły kolonie o wielkości od 79 do 99 % kolonii kontrolnych. Jedynie *Erynia radicans* – na podłożach z dawką zalecaną i 10-krotnie niższą D i m i l i n u – rosła intensywniej niż w kontroli.

DYSKUSJA

Badane związki z grupy inhibitorów syntezy chityny wykazały dużą selektywność w stosunku do grzybów entomopatogenicznych, jakkolwiek reakcje poszczególnych gatunków grzybów różniły się między sobą. Uzyskane wyniki badań nad wpływem D i m i l i n u na wzrost grzybów z rzędu *Moniliales*, pokrywają się w części z badaniami A n d e r s o n a i R o b e r t s a (1983). Autorzy ci stwierdzili, że D i m i l i n praktycznie nie oddziaływał na wzrost *Bauveria bassiana*. Z badań naszych wynika, że niższa i zalecana dawka D i m i l i n u nie tylko nie ograniczały wzrostu grzybów entomopatogenicznych, ale go stymulowały. Dawka 10-krotnie wyższa od zalecanej ograniczała w mniejszym lub większym stopniu wzrost wszystkich badanych grzybów. Podobne wyniki uzyskali G a r d n e r i in. (1979). Wykazali oni, że wysokie stężenie diflubenzuronu (0,4 %) hamuje wzrost grzybnii *Bauveria bassiana*. A n d e r s o n i in. (1989) stwierdzili niewielkie, ale statystycznie istotne nasilenie wzrostu kolonii *B. bassiana* pod wpływem A l s y s t i n u; badania nasze tego nie potwierdziły. Przeciwnie – na podłożu z A l s y s t i n e m – grzyby z rzędu *Moniliales* tworzyły kolonie nieco mniejsze niż w kontroli. Wyrażna stymulacja wzrostu pod wpływem A l s y s t i n u charakteryzowała gatunki

z rzędu *Entomophthorales*.

Preparat N o m o l t miał najkorzystniejszy wpływ na badane grzyby, nie ograniczał wzrostu gatunków z rzędu *Moniliales*, zaś wzrost grzybów z rzędu *Entomophthorales* wyraźnie stymulował.

Wyniki naszych badań wskazują, że możliwość łącznego stosowania inhibitorów syntezy chityny z grzybami owadobójczymi przeciwko szkodnikom roślin jest w pełni uzasadnione.

SUMMARY

The growth of six entomopathogenic fungi was examined on medium to which three chitin synthesis inhibitors were added. The following fungi belonging to two orders: *Moniliales* and *Entomophthorales* were investigated in this experiment. All insecticides were added to the medium at three concentrations (the following doses were used: one used in the field, ten times lower and ten times higher).

Hypomyces fungi showed better growth on medium containing Dimilin at lower concentration than in the control. The insecticide used at ten times higher concentration than the field dose inhibited growth of fungi.

Nomolt added to the medium did not effect the growth of *Hypomyces* fungi, Alsystem, however, inhibited the growth of this group of fungi. *Entomophthoraceus* fungi grew better than *Hypomyces* ones on the medium containing chitin synthesis inhibitors.

Nomolt and Alsystem stimulated the growth of *Entomophthoraceus* fungi. Only Dimilin given on doses ten times higher than the field one strongly inhibited the growth of *Entomophthoraceus* fungi.

LITERATURA

- Anderson T.E., Roberts D.W., 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) control. *J. Econ. Entomol.* 76: 1437-1441.
- Anderson T.E., Hajek A.E., Roberts D.W., Preisler H.K., Robertson J.L., 1989. Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*); Effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 82(1): 83-89.
- Bajan C., 1985. Vlijanje piretroidov sumicidin, fastak i decis na razvitije stammov griba *Paecilomyces farinosus*. Ekolog. Kooperacija, Bratislava: pp. 63-66.
- Bajan C., Fedorko A., Kmitowa K., 1986. Vlijanje piretroidov na entomopatogenne griby. Ekolog. Kooperacija, Bratislava: pp. 131-136.
- Fedorko A., 1985. Vlijanje piretroidov na razvitije stammov griba *Verticillium lecanii*. Ekolog. Kooperacija, Bratislava: pp. 59-62.
- Gardner W.A., Sutton R.M., Noblet R., 1979. Evaluation of the effects of six selected pesticides on the growth of *Nomuraea rileyi* and *Beauveria bassiana* in broth cultures. *J. Georgia Entomol. Soc.* 14 (2): 106-113.
- Kerner G., 1959. Eine Mycose bei *Dasychira pudibunda* L. und ihre Verwendung zur biologischen Bekämpfung von anderen Forst - insekten. *Trans. I Int. Conf. Ins. Path. Biol. Contr.* (Praha, 1985): 169-176.
- Kral J., Neubauer S., 1953. Pouziti entomofytnich hub rodu *Beauveria* proti mandelince bramborove. *Zool. Ent. Listy*, 2: 241-250.
- Kral J., Neubauer S., 1956. Pouziti entomofytnich hub rodu *Beauveria* proti mandelince bramborove II. *Zool. Listy*, 5: 178-186.
- Malinowski H., 1990. Przegląd grup zoocydów o niekonwencjonalnych mechanizmach działania. *Mater.*

- Konf. Nauk. Niekonwencjonalne metody walki ze szkodnikami, IOR, Poznań: pp. 5-29.
- Majchrowicz L., Miętkiewski R., 1976. Wpływ insektycydów stosowanych w ochronie ziemniaka i buraków na rozwój grzybów owadobójczych *in vitro*. Zesz. Nauk. AR Szczecin. 53: pp. 133-142.
- Miętkiewski R., Sapięha A., Miętkiewska Z., (1989)1990. Wzrost grzybów owadobójczych na pożywkach zawierających herbicydy stosowane w sadownictwie. Acta Mycol. XXV (2): 35-50.
- Post L. C., Vincent W. R., 1973. A new insecticide inhibits chitin synthesis. Naturwiss. 60: 431-432.
- Sechurina T. A., 1958. Rezultaty issledovanija griba beloj muskardiny v smesi s insekticidami protiv vrednoj cerepaski. Kisiniew: pp. 55-56.
- Suski Z. W., 1983. Preparaty benzoylo-mocznikowe – nowa grupa insektycydów. Ochrona roślin 1: 12-16.
- Telenga N. A., Djadecko N. P., Zigaev G. N., Fedotova K. N., 1959. Primenenie griba beloj muskardiny (*Beauveria bassiana*) dlja borby s vrediteljami selskocozjajstvennych kultur. Trudy Ukrain. Nauč. – Issled. Inst. Zašč. Rast. 8:16-42.
- Vänninen I., Hokkanen H., 1988. Effect of pesticides on four species of entomopathogenic fungi *in vitro*. Ann. Agric. Fenn., Vol. 27: 345-353.