

Myrothecium verrucaria (Alb. et Schw.) Ditmar ex Stendel jako potencjalny patogen owadów

ZOFIA MACHOWICZ-STEFANIAK

Katedra Fitopatologii i Techniki Ochrony Roślin
Akademii Rolniczej w Lublinie

Machowicz-Stefaniak Z.: (Department of Phytopathology and Plant Protection, Agricultural Academy, Akademicka 15, 20-033 Lublin, Poland). *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schw.) Ditmar ex Stendel as potential pathogen of insects. Acta Mycol. XXI(2):247-252, 1985 (1987).

In a laboratory experiment, insects larvae were infected with spores of a strain of *M. verrucaria* to establish the fungal sensitivity of the larvae. The fungus was reisolated from 30% of dead *Scotia* sp., 6,6% *O. brumata*, 10% *P. ribesii*, 20% *Anobidae* sp., 10% *A. pomorum*. Investigated strain of *M. verrucaria* seems to be potential insect pathogens.

WSTĘP

Znanymi bioregulatorami liczebności owadów są grzyby. Oprócz entomopatogenicznych gatunków z rzędu *Entomophthorales* i owadobójczych strzępczaków obserwuje się często występowanie na martwych owadach grzybów z rodzajów *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* (Kalviš 1970; Bałazy 1976; Machowicz-Stefaniak 1976). Do grupy warunkowych patogenów owadów dotychczas zaliczono tylko niektóre szczepy *Fusarium lateritium* Nees, *Penicillium brevi compactum* Diercks., *Mucor hiemalis* Wehmer, *Scopulariopsis brevicaulis* Bainier (Morquer, Nysteraakis 1944; Müller-Kögler, Huger 1960; Heitor 1962; Bałazy 1976). Właściwości chorobotwórcze wielu innych gatunków wymienionych rodzajów grzybów względem stawonogów są problematyczne i wymagają eksperymentalnego udokumentowania. Do takich grzybów należy *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schw.) Ditmar ex Stendel (*Hyphomycetales*, ser. *Phialosporae*, *Peziza verrucaria* Alb. et Schw., *Gliocladium fimbriatum* Gilman et Abbott, *Metarrhizium glutinosum* Pope, *Starkeomyces koorchalomoides* Agni-

hothrudu). Powszechnie występuje w Północnej Ameryce, Europie oraz pasie zwrotnikowym najczęściej jako saprofit, a niekiedy można infekować żywe tkanki roślinne (White, Downing 1947).

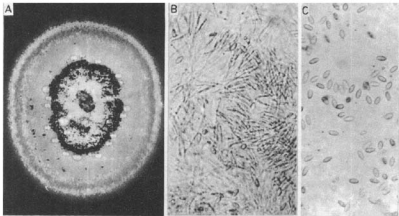
Omawiany gatunek powodował śmiertelność sztucznie infekowanych w laboratorium termitów (*Reticulitermes santonensis* de Feytaud), jednakże zamierające owady nie wykazywały zauważalnych zmian chorobowych (Toumanoff 1965). *M. verrucaria* było także izolowane z gza bydłęcego (*Hypoderma bovis* Dageer) przez Kalviša (1970), a ponadto obecność tego grzyba zanotowano na martwych larwach L₅ rolnicy zbożówki (*Scotia segetum* Schiff.) oraz na martwej przedpoczwarce *Mamestra brassicae* L. (Machowicz-Stefaniak 1976; Napiórkowska-Kowalik, Machowicz-Stefaniak 1976).

Uznano za celowe przebadanie chorobotwórczości *M. verrucaria* dla różnych gatunków owadów, ponieważ temu grzybowi dotychczas nie przypisywano większych uzdolnień entomopatogennych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

W badaniach uwzględniono jednozarodnikowe kultury *Myrothecium verrucaria*, szczep S.s.-155, przygotowany z izolatu uzyskanego wcześniej z larw L₅ *Scotia segetum* Schiff (Machowicz-Stefaniak 1976). Uzdolnienia chorobotwórcze tego grzyba badano w stosunku do dorosłych larw *Scotia* sp., *Operophtera brumata* L., *Pteronidea ribesii* Scop., *Anthonomus pomorum* L., *Anobidae* sp. Owady te zbierano w warunkach naturalnych do wysterylizowanych uprzednio naczyń hodowlanych. Materiał infekcyjny stanowiły konidia *M. verrucaria* uzyskane z jednozarodnikowych kultur wzrastających przez 21 dni na pożywce glukozowo-ziemniaczanej, przetrzymywanych w temp. 24°C w szalkach Petriego bez dostępu światła. Przed założeniem hodowli grzyb był pasażowany przez autoklawowane larwy *Scotia* sp. Zawiesina infekcyjna zawierała zmasowaną ilość zarodników w 1 ml wody destylowanej oraz kilku kropel preparatu Filpon.

Larwy infekowano wyłącznie powierzchniowo przez nanoszenie kropli wodnej zawiesiny infekcyjnej (Błaży 1962) na odwłokową część larwy. Zakażano po 30 dorosłych larw każdego gatunku owada. Zainfekowane larwy *P. ribesii*, *O. brumata* wraz ze świeżymi liśćmi stanowiącymi ich pokarm, a *A. pomorum* z pąkami kwiatowymi, umieszczano w szklanych probówkach o wymiarach 10 × 2,5 cm, po 5 larw w jednej próbówce. Otwór probówek zakrywano cienką folią polietylenową i przetrzymywano w pomieszczeniu o temp. 21-23°C (Niemczyk, Lech 1969). Zainfekowane larwy *Scotia* sp. hodowano w szalkach Petriego o średnicy 12 cm, a *Anobidae* sp. w szalkach o



Ryc. 1. *Myrothecium verrucaria*

A – dwudziestodniowa kolonia, *B* – falidy i trzonki konidialne, *C* – konidia
A – 20-day old colony, *B* – phialides and conidiophores, *C* – conidia

średnicy 6 cm (po 5 larw). We wszystkich przypadkach zakładano hodowle kontrolne larw traktowanych kroplą wyjałowionej wody destylowanej.

Obumarłe larwy sterylizowano powierzchniowo w 1% roztworze sublimatu w 70% alkoholu, następnie płukano trzykrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Z tak odkażonych larw przygotowano fragmenty wielkości 2 mm i wykładano je na pożywkę glukozowo-ziemniaczaną w szalkach Petriego. Tak samo odkażone larwy wykładano równocześnie do jałowych komór wilgotnych.

WYNIKI BADAŃ

Cechy makroskopowe i mikroskopowe szczepu *M. verrucaria* użytego do sztucznej infekcji odpowiadały podanym przez *P r e s t o n a* (1943). Grzybnia powietrzna w pierwszych dniach hodowli na pożywce glukozowo-ziemniaczanej była biała, a w miarę tworzenia zarodników konidialnych, po 5-6 dniach, przyjmowała zabarwienie ciemnooliwkowe. Zarodniki grzyba tworzyły na powierzchni kolonii ciemnozielone strefy. W ósmym dniu hodowli w centralnej części kolonii pojawiły się duże białe krople, których ilość stopniowo zwiększała się (ryc. 1A). Margines kolonii o wyrównanych brzegach osiągnął 3-4 mm szerokości. Spód kolonii, początkowo bezbarwny, przyjmował zabarwienie żółte. Trzytygodniowe kolonie grzyba osiągnęły średnicę 5,5-6 cm.

Pochodzące z trzytygodniowej kolonii seledynowej barwy konidia grzyba z dwoma, a niekiedy trzema wewnętrznymi wodniczkami były eliptyczne, o lekko ściętej podstawie i zwężającej się części szczytowej, miały wymiary $6,6-7,4(9,6) \times 2,4-3,2 \mu\text{m}$ (ryc. 1B). Fialidy o nieco zaokrąglonych szczytach, $16-17,2-19,2 \times 1,6-2,4 \mu\text{m}$, tworzyły się po 2-3 na odgałęzieniach konidioforu. Konidiofory gładkie, z przegrodami poprzecznymi, formowały zwarty, palisadowy układ typu pseudohymenium (ryc. 1C). W trzytygodniowych koloniach nie stwierdzono obecności chlamydospor.

Larwy *Scotia* sp., sztucznie zainfekowane *M. verrucaria*, żerowały mniej intensywnie od larw kontrolnych. Po 6-8 dniach od infekcji pojawiły się na grzbietowej stronie ciała larw liczne, ciemnobrązowe plamy o średnicy 2-3 mm. Po dwudziestu dniach od momentu infekcji larwy z obecnością nekrotycznych plam na powierzchni skóry zaczęły stopniowo obumierać. Po 6 dniach przetrzymywania ich w wyjałowionych komorach wilgotnych zaobserwowano postępującą mumifikację, bowiem jamę ciała wypełniały obficie białe strzępki grzybni, które następnie wydostawały się na powierzchnię ciała martwych larw. Śmiertelność ogólna zakażanych larw *Scotia* sp. wyniosła 40%, a larw kontrolnych 6,66% (tab. 1A). Reizolację *M. verrucaria* uzyskano z 30% badanych larw *Scotia* sp. (tab. 1B).

Larwy *O. brumata* i *P. ribesii* zainfekowane sztucznie były mniej aktywne i żarłoczne od larw kontrolnych. Po czterech dniach od momentu infekcji obserwowano na odwłokowych segmentach ciała ciemne plamy o średnicy 2 mm. Takie larwy zamierały po 5-7 dniach od infekcji. Odwłok martwych larw był całkowicie czarny, skurczony, niekiedy nieco wygięty do spodu. Śmiertelność ogólna eksperymentalnych larw *O. brumata* wyniosła 26,66%, larw *P. ribesii* 16,66% (tab. 1A), a śmiertelność larw kontrolnych gatunków owadów po 6,6% (tab. 1A). Po powierzchniowym odkażeniu osobników martwych i ich cztero-dniowym przetrzymywaniu w komorach wilgotnych grzybnia *M. verrucaria* wyrastała miejscowo wyłącznie ze znekrotyzowanych części oskórka larw. Reizolację *M. verrucaria* uzyskano tylko z 6,6% larw *O. brumata* i z 10% larw *P. ribesii* (tab. 1B).

Tabela 1

Śmiertelność larw sztucznie zainfekowanych zarodnikami *M. verrucaria*
Mortality of larvae infected with spores of the fungus *M. verrucaria*
/A/

| Zabieg Treatment | Liczba martwych larw Number of dead larvae /%/ | | | | |
|--|--|-------------------|-------------------|--------------|-------------------|
| | Scotia sp. | <i>O. brumata</i> | <i>P. ribesii</i> | Anobidae sp. | <i>A. pomorum</i> |
| Infekcja Application of spore suspension | 12 40,00 | 8 26,66 | 5 16,66 | 8 26,66 | 4 13,33 |
| Kontrola Application of water | 2 6,66 | 2 6,66 | 2 6,66 | 4 13,33 | 0 0,00 |

Reizolacja *M. verrucaria* z martwych larw zainfekowanych tym grzybem
M. verrucaria reisolates obtained from dead larvae
/B/

| | | | | | |
|--|------------|-----------|------------|------------|------------|
| Infekcja Application of spore suspension | 9 30,00 | 2 6,66 | 3 10,00 | 6 20,00 | 3 10,00 |
| Kontrola Application of water | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

U larw *Anobidae* sp. i *A. pomorum* sztucznie zainfekowanych przez *M. verrucaria* zaobserwowano wkrótce po infekcji brązowienie całego ciała. Obumieranie takich osobników następowało dopiero po 5-8 dniach od infekcji. Osobniki martwe miały ciało skurczone lub całkowicie płaskie. Śmiertelność ogólna eksperymentalnych larw *Anobidae* sp. wyniosła 26,66%, *A. pomorum* 13,33% (tab. 1A), a śmiertelność larw kontrolnych odpowiednio 13,33% i 0% (tab. 1A). *M. verrucaria* uzyskano ponownie z 20% martwych larw *Anobidae* sp. i z 10%

martwych larw *A. pomorum* (tab. 1B). Z dwu obumarłych larw *Anobidae* sp. uzyskano oprócz *M. verrucaria* grzyby *Penicillium stoloniferum* Thom i *P. islandicum* Sopp.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Larwy badanych owadów zakażone przez *M. verrucaria* wykazywały zahamowany wzrost i zamierały zawsze przed mającym odbyć się lnieniem. Najbardziej zauważalną oznaką chorobową, która występowała na zakażonych przez ten grzyb owadach, były miejscowe przebarwienia, a w przypadku *Scotia* sp. dodatkowo dochodziło do mumifikacji ciała larw. Można zatem przypuszczać, że testowany szczep *M. verrucaria* S.s.-155 wyisobniony pierwotnie z larwy *S. segetum* okazał się bardziej wirulentny dla *Scotia* sp., aniżeli dla owadów z bardziej odległych jednostek systematycznych. Podobną specjalizację zaobserwowano w przypadku *Beauveria tenella* (Delacr.) Siem. i *Lymantria dispar* L. oraz grzybów wyizolowanych z larw *Leptinotarsa decemlineata* Say. (K a l v i ś 1970; K m i t o w a i in. 1977). Stosunkowo wysoki procent reizolacji *M. verrucaria* z larw *Anobidae* sp. sugeruje, że *M. verrucaria* najskuteczniej zakaża owady o delikatnej budowie oskórka.

Przeprowadzone obecnie badania oraz informacje z piśmiennictwa podane we wstępie upoważniają do wniosku, że *M. verrucaria* można uznać za potencjalnego entomopatogena.

LITERATURA

- B a ł a z y S., 1962, Obserwacje nad występowaniem niektórych grzybów owadobójczych z grupy *Fungi Imperfecti* na owadach leśnych. Pol. pismo Ent. B.3-4(27): 149-164.
- B a ł a z y S., 1976, Niektóre godne uwagi grzyby nekrofityczne izolowane ze stawonogów. Pozn. Tow. Przyj. Nauk, Prace Kom. Nauk Roln. Leśn. 42: 3-17.
- H e i t o r F., 1962, Parasitisme de lessure par le champignon *Mucor hiemalis* Wehmer chez les insectes. Ann. Epiph, 13(3): 179-203.
- K a l v i ś T. K., 1970, Vozbuditeli mikozyov nekotorych poleznych i vrednych nasekomych Sibiri. Izv. Gib. Otd. A. N. ZSSR, 10: 93-98.
- K m i t o w a K., B a j a n C., W o j c i e c h o w s k a M., 1977, Differences in the pathogenicity of entomopathogenic fungi from France and Poland. Pol. Ecol. Stud. 3(2): 115-126.
- M a c h o w i c z - S t e f a n i a k Z., 1976, Występowanie owadobójczych strzępczaków (*Hyphomycetales*, *Mycophyta*) na szkodnikach sadów w okolicach Lublina ze szczególnym uwzględnieniem prządki pierścienicy *Malacosoma neustria* L. Ann. UMCS, ser. C, 15: 171-181.
- M o r g u e r R., N y s t e r a k i s F., 1944, Role des Fusaries entomophytes comme destructeurs d'insectes. Bull. Soc. Nat. Hist. Toulouse 79: 281-318.

- Müller-Kögler E., Huger A., 1960, Wundinfektionen bei Raupen von *Malacosoma neustria* L. durch *Penicillium brevi-compactum* Dierck. Zschr. ang. Ent., 45: 421-429.
- Napiórkowska-Kowalik J., Machowicz-Stefaniak Z., 1979, Wrogowie naturalni rolnicy zbożówki (*Scotia segetum* Schiff.) i piętnówki kapustówki (*Barathra brassicae* L.). Ochr. Rośl. (6): 13-15.
- Niemczyk E., Lech W., 1969, Sposób określania skuteczności preparatów bakteryjnych stosowanych do zwalczania gąsienic w sadach. Pol. Pismo Ent., 39: 181-184.
- Preston N. C., 1943, Observations on the genus *Myrothecium* Tode. I. The three classic species. Trans. Brit. Myc. Soc., 26: 158-168.
- Toumanoff C., 1965, Action de divers Champignons entomophages sur *Reticulitermes samonensis*. Aperçu général., Ann. Parasitol. Paris. 40(5): 611-624.
- White W. L., Downing M. H., 1947, The identity of "*Metarrhizium glutinosum*". Mycologia 39: 546-555.