

HENRYK SKRZYPEK – Lublin

JAN JAROSZ – Lublin

STRUKTURA GATUNKOWA ENTOMOPATOGENÓW NA TERENIE HISTORYCZNO-ZABYTKOWEGO PARKU W KLEMENSOWIE KOŁO ZAMOŚCIA

WPROWADZENIE

W optymalnych warunkach środowiska owady, podobnie jak inne organizmy, wykazują skłonność do nadmiernego namnażania się. Rozwój taki często doprowadza do znacznego zagęszczenia liczebności szkodnika i wyniszczenia upraw, drzewostanów lasów oraz parków. Czynniki ograniczające, abiotyczne i biotyczne, stanowiące opór środowiska, przeciwdziałają gradacjom owadów i utrzymują liczebność populacji szkodnika na względnie niskim poziomie. Do biologicznych czynników ograniczających liczebność populacji należą między innymi chorobotwórcze dla owadów drobnoustroje, grzyby i owadobójcze nicienie.

Celem badań terenowych i analiz laboratoryjnych było poznanie kompleksu wrogów naturalnych; owadobójczych drobnoustrojów, grzybów i nicieni na terenie historyczno-zabytkowego parku w Klemensowie koło Zamościa. Od wielu lat (1982-1986) nie zaobserwowano bowiem uszkodzeń drzew i krzewów na terenie parku, chociaż pierwotne ogniska gradacyjne wystąpiły w tym okresie w całym kraju, również na terenie bezpośrednio przyległym do parku w Klemensowie.

METODY

Badania identyfikacyjne entomopatogenów przeprowadzono w próbkach gleby, pobranych w czerwcu 1986 r. na terenie całego parku w Klemensowie (34

próby glebowe, w których umieszczano zazwyczaj 10 gąsienic *Galleria* w jednej próbie), metodą "pułapkową" (*Galleria* trap technique) wg Beddinga i Akhursta (1975), z użyciem gąsienic VII stadium wylinkowego barciaka większego, *Galleria mellonella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) jako owadogospodarza. Metoda ta, polecana do oceny zagęszczenia populacji nicieni entomopatogennych z grupy *Rhabditoidea* w glebie, jest także wygodną techniką izolacji entomopatogennych bakterii i grzybów. Oszacowano także stopień inwazji gąsienic *G. mellonella* przez owadobójcze nicienie oraz izolowano entomopatogenne bakterie i grzyby. Do szczegółowych badań identyfikacyjnych wybrano owady padłe, wykazujące typowe objawy porażenia przez nicienie, bakteriozy lub mykozy.

Izolacji bakterii dokonano z martwych gąsienic barciaka większego macerowanych przy użyciu mózdzierzy bakteriologicznych w 10 ml jałowego płynu Ringera dla owadów (Weevers, 1966), następnie przygotowano serię 1/10 rozcieńczeń w płynie fizjologicznym, i wysiewano inokulum w ilości 1 μ l odpowiedniego rozcieńczenia na różnicujące podłoża agarowe. Do wyosobnienia czystych kultur bakterii entomopatogennych użyto podłoża agarowego wzbogaconego o 0.5% D-glukozy.

Przy identyfikacji bakterii posłużono się *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Buchanan, Gibbons 1974), *Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites* (Poinar, Thomas 1984). Gatunki bakterii owadobójczych użyte jako szczepy referencyjne (*Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Enterobacter cloacae*), pochodziły z kolekcji entomopatogennych bakterii Zakładu Patologii Owadów UMCS.

Do izolacji grzybów chorobotwórczych dla owadów wykorzystano agar ziemniaczano-glukozowy, natomiast grzyby – wtórne patogeny – izolowano z użyciem dodatkowo agaru Sabourauda z maltozą. Kultury grzybów identyfikowano wg *Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites* (Poinar, Thomas 1984) oraz Lodder (1970), Raper i Fennel (1965), Raper i Thom (1949), z użyciem wielu chorobotwórczych dla owadów grzybów (*Beauveria bassiana*, *B. tenella*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Entomophthora grylli*, *Zoophthora radicans*, *Cordyceps militaris*) jako szczepów porównawczych, pomocnych w badaniach identyfikacyjnych.

Martwe owady o wyglądzie wskazującym na porażenie nicieniami owadobójczymi układano pojedynczo w szalkach Petriego wysłanych bibułą filtracyjną, zwilżaną 0,001% roztworem wodnym formaliny i pozostawiano w temperaturze 22-24⁰C przez okres ok. dwóch tygodni, aż do momentu wychodzenia larw inwazyjnych pasożyta. Stadium inwazyjne nicieni zbierano i przechowywano w 0,001% wodnym roztworze formaliny w temperaturze 7⁰C.

Wykorzystywano je następnie do porażania gąsienic *G. mellonella* w celu sprawdzenia inwazyjności nicieni. Część z porażonych gąsienic przeznaczano do sekcji, a pozostałe pozostawiano na produkcję larw przetrwalnikowo-inwazyjnych. Przynależność gatunkową nicieni określano na podstawie analizy ich stadiów rozwojowych uzyskanych z sekcji *Galleria*. Przy identyfikacji nicieni posłużono się *Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites* (Poinar, Thomas 1984) oraz danymi zawartymi w pracach Poinara (1979), Woutsa (1979, 1980) i Woutsa i in. (1982). Podczas identyfikacji nicieni przeprowadzono porównanie z gatunkami nicieni entomofilnych znajdujących się w kolekcji Zakładu Biologii Środowiska KUL. Jednocześnie w czasie gromadzenia próbek przeprowadzano kontrolę zarażonych owadów z uwzględnieniem obecności innych nicieni związanych z owadami.

WYNIKI

W próbach gleby pobranych na terenie parku w Klemensowie analizowano skład gatunkowy oraz procentowy udział mikroorganizmów chorobotwórczych dla owadów (bakterii, grzybów) oraz nicieni, które – jako biologiczne czynniki ograniczające – utrzymują populacje owadów szkodliwych pod względem gospodarczym na niskim poziomie liczebności, a entomopatogenne grzyby są często przyczyną łamania gradacji szkodnika w warunkach naturalnych. Wyniki analiz laboratoryjnych oraz badania identyfikacyjne nicieni w porażonych gąsienicach *G. mellonella* wskazują na bogatą, a zarazem zróżnicowaną strukturę gatunkową patogenów owadów, szczególnie w grupie owadobójczych nicieni.

Szczepy *Bacillus thuringiensis* wykazywały wrażliwość na bakteriofaga Bt i mogą stanowić interesujące biotypy patogena o wysokiej zjadliwości. Zarówno na terenie samego parku, jak i na uprawach przyległych do parku, nie stosowano bowiem dotychczas biopreparatów zawierających endospory *B. thuringiensis*.

Chociaż niezarodnikujące pałeczki Gram-ujemne: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* i *Proteus mirabilis* (Tab.), mogły namnożyć się wtórnie po wniknięciu do hemolimfy zamartwych już owadów, to ich obecność wzbogaca strukturę gatunkową i gęstość populacji chorobotwórczych bakterii w siedlisku parkowym. Można by domniemywać, że wpływają one na regulację liczebności populacji owadów.

Jak przedstawiono w tabeli, w grupie entomopatogennych grzybów stwierdzono znaczny udział procentowy *Beauveria bassiana*, sprawcy muskarydiny białej owadów. Ten grzybowy patogen utrzymuje się w glebie w postaci

zarodników konidialnych i atakuje szerokie spektrum owadów-żywcicieli, w tym szkodniki drzew liściastych. Nie znaleziono natomiast *B. tenella*, blisko spokrewnionego grzyba owadobójczego z *B. bassiana*. Nie izolowano również *Metarhizium anisopliae* z badanych próbek gleby, wysoce efektywnego patogena grzybowego owadów. Liczne izolaty grzybów wyosobnione z martwych gąsienic *G. mellonella* zidentyfikowano jako *Paecilomyces farinosus*, patogena atakującego szerokie spektrum żywicieli należących do różnych rzędów owadów. Bogaty jest również udział w glebie patogenów wtórnych, głównie grzybów z rodzaju *Fusarium*, *Pencillium*, *Aspergillus*, w mniejszym stopniu – *Candida spp.*

Tabela. Występowanie entomopatogennych bakterii i grzybów oraz nicieni entomofilnych na terenie historyczno-zabytkowego parku w Klemensowie k/Zamościa

Entomopatogeny	Stwierdzone na terenie parku	W procencie badanych prób glebowych
Bakterie:		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	9
<i>Bacillus cereus</i>	+	24
<i>Bacillus sphaericus</i>	-	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	27
<i>Serratia marcescens</i>	+	6
<i>Proteus vulgaris</i>	-	0
<i>Proteus mirabilis</i>	+	12
<i>Entomobacter cloacae</i>	+	18
Grzyby:		
<i>Beauveria bassiana</i>	+	24
<i>Beauveria tenella</i>	-	0
<i>Metarhizium anisopliae</i>	-	0
<i>Paecilomyces farinosus</i>	+	18
<i>Entomophtora gryli</i>	-	0
<i>Zoophthora radicans</i>	+	9
<i>Cordyceps militaris</i>	-	0
Nicienie:		
<i>Steinernema feltiae</i> (syn. <i>S. bibionis</i>)	+	63
<i>Seinernema carpocapsae</i>	+	6
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	-	0
<i>Pristionchus uniformis</i>	+	12
<i>P. uniformis</i> + <i>S. feltiae</i>	+	18
<i>P. uniformis</i> + <i>S. carpocapsae</i>	+	3
<i>S. feltiae</i> + <i>S. carpocapsae</i>	-	0

Zarówno duża liczba jak i zróżnicowany skład gatunkowy chorobotwórczych dla owadów nicieni (Tab.) wskazują na istotny udział larw przetrwalnikowo-inwazyjnych nicieni entomofilnych w naturalnej redukcji gęstości populacji szkodliwych owadów w parku. W licznych publikacjach (Poinar 1979, Klein 1990) wykazano ich wysoką efektywność i zabójczość dla owadów przechodzących cały cykl rozwojowy lub przebywających czasowo w siedlisku glebowym. Prawie we wszystkich próbkach gleby znaleziono duże ilości stadium inwazyjnego *Steinernema feltiae* (syn. *S. bibionis*), nicienia porażającego szerokie spektrum szkodliwych owadów, w tym muchówki. W znacznie mniejszej liczbie martwych gąsienic *Galleria* znaleziono nicienie *S. carpocapsae*. W wielu próbkach stwierdzono także obecność nicieni *Pristionchus uniformis*. W glebie bogatej w stadium inwazyjne *S. feltiae* nie znajdowano zwykle *S. carpocapsae*. Należy przypuszczać, że gatunki tych nicieni wzajemnie antagonizują się. Interesujące jest również spostrzeżenie, że w 20% badanych próbek glebowych znajdowano równocześnie nicienie *P. uniformis* i *S. feltiae* lub *S. carpocapsae*.

UWAGI KOŃCOWE I WNIOSKI

Próbki gleby do badań składu gatunkowego i liczebności entomopatogenów pobrano w połowie czerwca, a więc w okresie maksymalnego nasilenia, bądź w fazie predegradacyjnej wielu szkodników drzew i krzewów. Zróżnicowany kompleks drobnoustrojów chorobotwórczych dla owadów oraz duży ich udział procentowy (Tab.), zarówno w próbkach gleby pobranych w centralnej części parku, jak i na jego obrzeżach, zapobiega masowemu pojawowi owadów, a tym samym uszkodzeniom drzewostanu przez szkodniki. Należy również przypuszczać, że duża liczba szkodników ulega zniszczeniu w okresie zimowej diapauzy oraz w następstwie inwazji wrogów naturalnych jesienią lub na wiosnę.

Bogaty i różnorodny kompleks entomopatogenów jest zapewne wynikiem optymalnych warunków ekologicznych, jakie panują na terenie parku, związanych z wiekowym i wielogatunkowym drzewostanem. Warunki takie są niewątpliwie stymulatorem różnorodności świata organicznego, w tym dla rozwoju entomofagów i drobnoustrojów chorobotwórczych dla owadów. Próba generalnej przebudowy parku, wycinanie drzewostanu lub inna nieracjonalna ingerencja doprowadzić mogą do naruszenia tej równowagi ekologicznej i do zaniku konkurencji biotycznej w populacjach entomofagów. W wyniku takiej działalności może dojść do powstania ognisk gradacyjnych szkodników

leśnych i parkowych, co może doprowadzić do zniszczenia drzewostanu w parku.

BIBLIOGRAFIA

- B e d d i n g R. A., A k h u r s t R. J.: 1975. A simple technique for the detection of insect-parasitic rhabditoid nematodes in soil. „Nematologica” 21 s. 119-110.
- B u c h a n a n R. E., G i b b o n s N. E. (Eds.): 1974. Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. Baltimore. Wiliams and Wilkins.
- K l e i n M. G.: 1990. Efficacy against soil-inhibiting insect pest, in Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Eds. Gaugler R. and Kaya H.K. Florida, chap. 10. CRC Press, Boca Raton.
- P o i n a r G. O.: 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. Florida. CRS Press, Boca Raton.
- P o i n a r G. O., T h o m a s G. M.: 1984. Laboratory Guide to Insect Pathogen and Parasites. New York-London. Plenum Press.
- R a p e r K. B., T h o m C.: 1949. A Manual of the *Pencillia*. Baltimore. Wiliams and Wilkins.
- R a p e r K. B., F e n e l l D. I.: 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore. Wiliams and Wilkins.
- W e e v e r s R. de G.: 1966. A lepidopteran saline: effects of inorganic cations concentrations on sensory, reflex and motor response in a herbivorous insect. „Journal of Experimental Biology” 44 s. 163-175.
- W o u t s W. M.: 1979. The biology and life cycle of New Zealand population of *Heterorhabditis heliotidis* (Heterorhabditidae). „Nematologica” 25 s. 191-202.
- W o u t s W. M.: 1980. Biology, life cycle and redescription of *Neoaplectana bibionis* Bovien, 1937 (Nematoda: Steinernematidae). „Journal of Nematology” 12 s. 62-70.
- W o u t s W. M., M r a č e k Z., G e r d i n S., B e d d i n g R. A.: 1982. *Neoaplectana* Steiner, 1929 a junior synonyms of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda; Rhabditida). „Systematic Parasitology” 4 s. 147-154.

DISTRIBUTION OF ENTOMOPATHOGENS
IN THE HISTORIC – MONUMENTAL PARK KLEMENSÓW
NEAR ZAMOŚĆ

S u m m a r y

Using Galleria trap technique of Bedding and Akhurst (1975), a complex of insect-parasitic bacteria, fungi and entomogenous rhabditoid nematodes were found in soil taken samples from the park trees in Klemensów near Zamość (Poland). Such entomopathogens as *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* and *Steinernema feltiae* (*syn. S. bibionis*) predominate in most examined soil samples. Wealthy and various complex of entomopathogenous organisms resulting from the optimum habitat conditions prevail in the park, especially connected with polyspecies and secularly tree stand, can not create preferable conditions to develop of insect pest gradations, which could lead to damage of timber stand.