



<sup>1</sup> Instytut Rolnictwa i Ogrodnictwa, Wydział Agrobioinżynierii i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, Konarskiego 2, 08-110 Siedlce, Polska

<sup>2</sup> Taylor Institution, Uniwersytet w Oksfordzie, St Giles', Oxford OX1 3NA, United Kingdom

\*e-mail: [anna.majchrowska-safaryan@uph.edu.pl](mailto:anna.majchrowska-safaryan@uph.edu.pl)

ANNA MAJCHROWSKA-SAFARYAN<sup>1\*</sup>, CEZARY TKACZUK<sup>1</sup>,  
BARBARA BAJ-WÓJTOWICZ<sup>2</sup>

## Występowanie grzybów entomopatogenicznych w glebach siedlisk o zróżnicowanym użytkowaniu

Occurrence of entomopathogenic fungi in the soils of habitats of various use

**Streszczenie.** Celem pracy było porównanie składu rodzajowego oraz nasilenia występowania grzybów entomopatogenicznych w glebach pól uprawnych z ochroną chemiczną i bez niej, a wśród nich gleb z systemu uprawy agroleśnej. Materiał do badań stanowiły próby gleb uprawnych pobrane w 2021 r. (wiosna, jesień) w indywidualnym gospodarstwie rolnym o powierzchni 7,42 ha, położonym w miejscowości Kołodziej, woj. mazowieckie. Obiektami badawczymi bez ochrony chemicznej były próby glebowe pobrane z łąki, zadrzewienia śródpolnego oraz uprawy agroleśnej alejowej (Sosnówka, woj. lubelskie) w 2022 r. Grzyby entomopatogeniczne izolowano, stosując metodę owadów pułapkowych oraz izolacji na podłożu selektywnym. W trakcie prowadzonych badań wyizolowano grzyby owadobójcze z rodzajów: *Beauveria*, *Metarhizium* i *Cordyceps*. Oceniając łączne nasilenie oznaczonych rodzajów grzybów owadobójczych w obu terminach badań, stwierdzono, że najwięcej larw owada pułapkowego zainfekowanych było przez grzyby w glebach pobranych z zadrzewień śródpolnych i gleb łąkowych (bez ochrony chemicznej). Przeprowadzone badania wykazały, że w glebach gruntów ornych, na których zastosowano ochronę chemiczną, wyizolowane rodzaje grzybów entomopatogenicznych produkowały mniej jednostek tworzących kolonie (jtk) niż na glebach, na których nie stosowano ochrony chemicznej.

**Słowa kluczowe:** grzyby entomopatogeniczne, ochrona chemiczna, brak ochrony chemicznej, system agroleśny

---

Majchrowska-Safaryan A., Tkaczuk C., Baj-Wójtowicz B., 2023. Występowanie grzybów entomopatogenicznych w glebach siedlisk o zróżnicowanym użytkowaniu. *Agron. Sci.* 78(1), 5–18.

## WSTĘP

Jednym z bardzo ważnych obszarów polityki Europejskiego Zielonego Ładu, a w jego ramach strategii „Od pola do stołu”, związanym z rolnictwem jest zmniejszenie wykorzystywania chemicznych środków ochrony roślin, co wpływa na ochronę i odbudowę ekosystemów, a także zwiększenie bioróżnorodności organizmów (Strategia Bioróżnorodności na rok 2030) [Augustyniak-Kram 2010, Ginter 2021, Majchrowska-Safaryan 2022]. Skutkuje to wprowadzaniem nowych systemów prowadzenia działalności rolniczej. Jednym z takich systemów rolnictwa, zyskujących coraz większe znaczenie, staje się uprawa agroleśna [Baj-Wójtowicz i Osińska 2020, Worms 2020]. Stosowanie środków chemicznych w produkcji rolnej jest czynnikiem niezbędnym, ale takim, który powoduje zanieczyszczanie środowiska glebowego oraz produkowanej żywności pozostałościami pestycydów, jak również przyczynia się do wzrostu odporności agrofagów na aplikowane preparaty chemiczne. W rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. [Dz.U. L 309 z 24.11.2009, s. 1] czytamy, że „w celu zapewnienia wysokiego poziomu ochrony zdrowia ludzi i zwierząt oraz środowiska, środki ochrony roślin powinny być stosowane w sposób właściwy, zgodnie z wydanym zezwoleniem z uwzględnieniem zasad integrowanej ochrony roślin, przy czym zawsze gdy jest to możliwe, priorytetowo należy traktować niechemiczne i naturalne rozwiązania alternatywne”. Jednymi z najmniej obciążających środowisko naturalne metod ochrony roślin uprawnych przed agrofagami są metody agrotechniczne i biologiczne [Lipa 2000, Tkaczuk 2008]. We współczesnym rolnictwie biopestycydy, które mają pochodzenie naturalne, stają się alternatywą dla tradycyjnych chemicznych środków ochrony roślin [Martyniuk 2012]. Grzyby owadobójcze są jednymi z najbardziej znanych i skutecznych mikroorganizmów, które infekują i prowadzą proces chorobowy, doprowadzając do śmierci szkodników roślin [Augustyniak-Kram 2010, Sosnowska 2018, 2019]. W warunkach klimatu umiarkowanego najczęściej izolowanymi grzybami entomopatogenicznymi, które skutecznie ograniczają populację szkodników występujących w glebach uprawnych, są grzyby z rodzaju *Beauveria*, *Metarhizium* i *Cordyceps* [Tkaczuk 2008, Tkaczuk i in. 2016].

Celem pracy było porównanie składu rodzajowego oraz nasilenia występowania grzybów entomopatogenicznych w glebach pól uprawnych z intensywną ochroną chemiczną z glebami bez ochrony, a wśród nich gleb z systemu uprawy agroleśnej. Założono hipotezę, że nasilenie występowania grzybów owadobójczych w glebach bez zastosowanej ochrony chemicznej będzie większe niż w glebach gruntów ornych z intensywną ochroną chemiczną.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próby gleby pobrane w roku 2021 (wiosna – maj, jesień – listopad) w indywidualnym gospodarstwie rolnym o powierzchni 7,42 ha, położonym w miejscowości Kołodziej, gmina Wodynie, powiat siedlecki, woj. mazowieckie (współrzędne geograficzne: 52°00'06"N i 21°57'33"E). Na badanych stanowiskach

w wiosennym terminie badań gatunkami uprawnymi były: żyto ozime (*Secale cereale* L.), GO-1 o powierzchni 2,7 ha, pszenżyto ozime (*Triticosecale*), GO-2 o powierzchni 3,3 ha oraz rzepak ozimy (*Brassica napus* L. var. *napus*), GO-3 o powierzchni uprawy 1,42 ha. Jesienią na dwóch z trzech badanych pól uprawnych GO-1 i GO-3 zasiano żyto ozime. Obiektami badawczymi bez ochrony chemicznej były łąka oraz przylegające do niej zadrzewienie śródpolne. Jako metodę ochrony upraw przed agrofagami w badanym gospodarstwie wybrano intensywne stosowanie chemicznych środków ochrony roślin. Wykorzystano herbicydy: Fundamentum 700 WG (tribenuron metylowy – 400 g·kg<sup>-1</sup>, metsulfuron metylowy – 135 g·kg<sup>-1</sup>, florasulam – 165 g·kg<sup>-1</sup>), Navigator 360 SL (chlopyralid – 240 g·dm<sup>-3</sup>, pikloram – 80 g·dm<sup>-3</sup>, aminopyralid – 40 g·dm<sup>-3</sup>), Expert Met 56 WG (metrybuzyna – 140 g·kg<sup>-1</sup>, flufenacet – 420 g·kg<sup>-1</sup>), fungicydy: Atak 450 EC (prochloraz – 450 g·dm<sup>-3</sup>), Kier 450 SC (azoksystrobina – 200 g·dm<sup>-3</sup>, difenokonazol 125 g·dm<sup>-3</sup>, tebukonazol – 125 g·dm<sup>-3</sup>) oraz adiuwant Asystent+ (modyfikowany polieterem trisiloksan i niejonowy zwilżacz). Dobór zastosowanych preparatów wykonano, stosując się do zaleceń Instytutu Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu. W analizowanym sezonie wegetacyjnym zastosowano również nawożenie mineralne (tab. 1).

Tabela 1. Zastosowane środki ochrony roślin oraz nawozy mineralne  
Table 1. Plant protection products and mineral fertilizers used

Grunt orny Arable land	Wiosna/Spring			Jesień/Autumn		
	gatunki uprawne cultivated species	środki ochrony roślin plant protection products	nawożenie mineralne mineral fertilization	gatunki uprawne cultivated species	środki ochrony roślin plant protection products	nawożenie mineralne mineral fertilization
GO-1 2,7 ha	żyto ozime <i>Secale cereale</i> L.	Atak 450 EC (1 dm <sup>3</sup> ·ha <sup>-1</sup> ) Fundamentum 700 WG (25 g·ha <sup>-1</sup> ) + + Asystent+ (0,1 dm <sup>3</sup> ·ha <sup>-1</sup> )	saletra amonowa (370 kg·ha <sup>-1</sup> ), mocznik (10 kg·ha <sup>-1</sup> )	żyto ozime <i>Secale cereale</i> L.	Expert Met 56 WG (0,35 kg·ha <sup>-1</sup> )	Polifoska 5 (200 kg·ha <sup>-1</sup> )
GO-2 3,3 ha	pszenżyto ozime <i>Triticosecale</i>	Atak 450 EC (1 dm <sup>3</sup> ·ha <sup>-1</sup> ) Fundamentum 700 WG (25 g·ha <sup>-1</sup> ) + + Asystent+ (0,1 dm <sup>3</sup> ·ha <sup>-1</sup> )	saletra amonowa (350 kg·ha <sup>-1</sup> ) Amofoska NPK 4–12–12 (180 kg·ha <sup>-1</sup> )	–	–	–
GO-3 1,42 ha	rzepak ozimy <i>Brassica napus</i> L. var. <i>napus</i>	Kier 450 SC (1,0 dm <sup>3</sup> ·ha <sup>-1</sup> ) Navigator 360 SL (0,3 dm <sup>3</sup> ·ha <sup>-1</sup> )	Amofoska NPK 4–12–12 (240 kg·ha <sup>-1</sup> ) mocznik (30 kg·ha <sup>-1</sup> )	żyto ozime <i>Secale cereale</i> L.	Expert Met 56 WG (0,35 kg·ha <sup>-1</sup> )	Polifoska 5 (200 kg·ha <sup>-1</sup> )

Próby glebowe z systemu uprawy agroleśnej alejowej pobrano w latach 2021 i 2022 z gospodarstwa rolnego położonego w Sosnowce, powiat bialski, woj. lubelskie (51°45'15"N i 23°20'22"E). Plantację założono w 2018 r. Roślinami uprawnymi były:

róża pomarszczona (*Rosa rugosa* L.) odmiany Hansa i malina moroszka (*Rubus chamaemorus* L.). Przed założeniem plantacji zastosowano nawożenie naturalne w postaci podłoża popieczarkowego (20–30 t·ha<sup>-1</sup>) oraz jako przedplon facelię błękitną (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) na przyoranie. W zależności od wymagań glebowych przyszłych nasadzeń wykorzystano nawozy potasowo-fosforowe, Potafoskę (550 kg·ha<sup>-1</sup>). W uprawie nie stosowano ochrony chemicznej roślin przed agrofagami. Zarówno róża pomarszczona, jak i malina moroszka wymagają kwaśnego podłoża o odczynie 3,5–4,5 pH [Osińska i in. 2020]. Próby glebowe pobierano za pomocą laski glebowej do głębokości 20 cm z 15–20 punktów rozmieszczonych losowo na każdym stanowisku badawczym. Z próbek sporządzono próbę średnią (ok. 1,0–1,5 kg gleby). Przed założeniem doświadczenia w laboratorium glebę doprowadzono do odpowiedniej wilgotności (ok. 15–20% maksymalnej pojemności wodnej), optymalnej dla rozwoju grzybów entomopatogenicznych, a ograniczającej rozwój nicieni entomofilnych. Następnie glebę przesiano przez sito o średnicy oczek 1 mm w celu oddzielenia większych frakcji i zanieczyszczeń.

Grzyby owadobójcze z poszczególnych prób glebowych izolowano, wykorzystując dwie metody badawcze: owadów pułapkowych oraz izolacji na podłożu selektywne opracowane przez Strassera i in. [1996].

W metodzie pułapkowej jako owada testowego użyto larw barciaka większego (*Galleria mellonella* L.). W laboratorium napełniono pobranymi próbkami gleby 5 plastikowych pudełek o pojemności 200 ml. Masa każdego z pudełek wynosiła 155–160 g. Do każdego tak przygotowanego pojemnika wyłożono po 10 larw *G. mellonella* (owada testowego), co łącznie stanowiło 50 larw. Pudełka z owadami pułapkowymi i z glebą zostały umieszczone w cieplarni w temperaturze wynoszącej 22 ±1°C. Pierwsza kontrola śmiertelności owada testowego została wykonana po 7 dniach od założenia doświadczenia, a następne w odstępach 3-dniowych, do momentu śmierci wszystkich larw. Rozwijające się na owadach grzyby wraz z zarodnikami badano makroskopowo, a następnie sporządzano preparaty mikroskopowe, na których podstawie oznaczano przynależność rodzajową występujących na owadach grzybów.

W celu oceny ilościowej jednostek infekcyjnych grzybów owadobójczych w badanych glebach przeprowadzono badania za pomocą podłoża selektywnego o następującym składzie: 20 g glukozy, 10 g peptonu, 18 g agaru, które zostały rozpuszczone w 1 dm<sup>3</sup> wody destylowanej, a następnie sterylizowane w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut. Do przygotowanego w ten sposób podłoża, po schłodzeniu go do temperatury 50°C, dodano składniki selektywne: 0,6 g streptomycyny, 0,05 g tetracykliny i 0,1 g dodyny. Podłoże selektywne rozlano do szalek Petriego. Z pobranej próby glebowej odważono po 2 g gleby, a następnie zalano 18 ml wody destylowanej z dodatkiem środka zmniejszającego napięcie powierzchniowe (Triton X-100). Za pomocą automatycznej pipety pobierano 0,1 ml roztworu glebowego i przenoszono na powierzchnię podłoża selektywnego. Posiewy wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej próby glebowej. Szalki z naniesionym roztworem glebowym przeniesiono do komory cieplej o temperaturze 21°C bez dostępu światła i po 10 dniach określono liczbę rozwijających się na podłożu hodowlanym jednostek tworzących kolonie (jtk) grzybów entomopatogenicznych. Liczebność grzybów entomopatogenicznych przedstawiono w jtk·g<sup>-1</sup> s.m. gleby. Grzyby owadobójcze zidentyfikowano mikroskopowo w oparciu o morfologię ich mikrostruktur (poprzez określenie wielkości i kształtu konidiów, komórek konidiogennych) oraz morfologię kolonii, posługując się standardowymi kluczami

[Rehner i Buckley 2005, Rehner i in. 2011, Humber 2012, Inglis i in. 2012]. Biorąc pod uwagę, że do identyfikacji grzybów stosowano wyłącznie metody morfologiczne, zostały one określone do rangi rodzaju, ponieważ jak wykazały najnowsze badania filogenetyczne oparte na sekwencjonowaniu DNA [Bischoff i in. 2006, 2009, Kepler i in. 2017], istnieje wiele gatunków grzybów w obrębie rodzajów *Beauveria*, *Cordyceps* i *Metarhizium*, których rozróżnienie jest prawie niemożliwe bez zastosowania metod molekularnych.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem programu Statistica 13.3 TIBCO Software Inc. Przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) czynników głównych i post-hoc test Tukeya. Wyliczone średnie połączono w jednorodne grupy na poziomie istotności  $\alpha < 0,05$ .

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że w glebach gruntów ornych, gdzie zastosowano ochronę chemiczną, jak również w glebach bez ochrony chemicznej w obu terminach badań stwierdzono występowanie trzech rodzajów grzybów entomopatogenicznych *Beauveria*, *Metarhizium* i *Cordyceps* (tab. 2 i 3). Dominację tych rodzajów grzybów entomopatogenicznych w glebach Polski potwierdzili w swoich badaniach Miętkiewski i in. [1991, 1993], Tkaczuk [2008], Tkaczuk i in. [2016] oraz Majchrowska-Safaryan [2022]. Oceniając nasilenie ich występowania na podstawie śmiertelności larw owada testowego (*G. mellonella*), stwierdzono, że w największym nasileniu wystąpiły grzyby z rodzaju *Metarhizium* spp. niezależnie od terminu prowadzonych badań i wykorzystanego systemu ochrony (tab. 2). Śmiertelność larw zainfekowanych przez grzyby owadobójcze z rodzaju *Metarhizium* spp. kształtowała się od 62% do 70% w glebach z zastosowaną ochroną chemiczną i od 52% do 64% w glebach bez takiej ochrony. Według Vänninen [1995] grzyb *M. anisopliae* jest gatunkiem najbardziej tolerancyjnym w stosunku do zabiegów rolniczych, takich jak orka czy stosowanie chemicznej ochrony roślin. Najlepiej znosi również okresową nieobecność potencjalnych żywicieli w środowisku. Gatunek ten częściej izolowany jest z gleb użytkowanych rolniczo niż środowisk leśnych, co potwierdzają badania przeprowadzone przez Quesadę-Moragę i in. [2007], Tkaczuka [2008], Tkaczuka i in. [2016]. Grzyby z rodzaju *Beauveria* spp. spowodowały śmierć larw owada testowego na zbliżonym poziomie kształtującym się w granicach 2–16%, przy czym nieco większe nasilenie stwierdzono w glebach bez ochrony chemicznej. Porażenie larw owada pułapkowego grzybami z rodzaju *Cordyceps* spp. w glebach gruntów ornych stwierdzono tylko w jednym przypadku i średnio dla dwóch terminów badawczych wynosiło ono 5% (GO-2). Znacznie większą, kształtującą się w granicach 8–20%, śmiertelność larw *G. mellonella* spowodowaną przez ten rodzaj grzybów stwierdzono w glebach łąkowych i zadrzewień śródpolnych, czyli bez ochrony chemicznej. Grzyby z rodzaju *Cordyceps* spp. nie wywołały infekcji u larw owada testowego w glebach pobranych z systemu uprawy agroleśnej, co może być związane z wysokim zakwaszeniem środowiska wynoszącym od 3,5 do 4,5 pH, koniecznym do wzrostu gatunków roślin kwaśnolubnych. Na występowanie i aktywność grzybów owadobójczych wpływają czynniki środowiskowe, w tym pH gleby. Gondek i Ropek [2007] w swoich badaniach podają, że niższe wartości pH w glebie łąkowej są przyczyną mniejszej intensywności porażenia owada pułapkowego przez grzyby entomopatogeniczne.

Oceniając łączne nasilenie oznaczonych rodzajów grzybów owadobójczych w obu terminach badań, stwierdzono, że najczęściej larw owada pułapkowego zainfekowanych było przez grzyby w glebach pobranych z zadrzewień śródpolnych i gleb łąkowych bez ochrony chemicznej – średnio, odpowiednio: 85% i 80% (tab. 2). Gleby łąkowe oraz z zadrzewień śródpolnych cechują się bogatym składem gatunkowym grzybów będących patogenami owadów. Potwierdzają to badania Miętkiewskiego i in. [1993], Tkaczuka [2008], Tkaczuk i in. [2016], którzy stwierdzili większą różnorodność gatunkową grzybów owadobójczych w glebach użytków zielonych i środowisk seminaturalnych niż w sąsiadujących z nimi gruntach ornych. Chen i in. [2021] podają, że w Chinach gleby łąkowe charakteryzują się wysokim wskaźnikiem izolacji grzybów entomopatogenicznych, wynoszącym nawet 88%. W glebach gruntów ornych nasilenie to kształtowało się na zbliżonym poziomie i wynosiło maksymalnie 76%.

Tabela 2. Śmiertelność larw *Galleria mellonella* (%) w glebach z ochroną chemiczną i bez niej (terminy: wiosenny i jesienny)

Table 2. Mortality of *Galleria mellonella* larvae (%) in soils with and without chemical protection (spring and autumn)

Czynnik śmiertelności Mortality factor	System uprawy/ Cultivation system											
	ochrona chemiczna chemical protection						bez ochrony chemicznej no chemical protection					
	*GO-1		GO-2		GO-3		Ł		ZŚ		SA	
	W	J	W	J	W	J	W	J	W	J	W	J
<i>Beauveria</i> spp.	10	12	2	12	4	14	–	12	14	6	12	16
<i>Metarhizium</i> spp.	64	64	68	58	70	62	64	62	62	58	52	52
<i>Cordyceps</i> spp.	–	–	6	4	–	–	14	8	10	20	–	–
Ogółem/Total	74	76	76	74	74	78	78	82	86	84	64	68
<i>Aspergillus</i> sp.	2	8	–	2	–	2	2	–	2	2	8	6
<i>Fusarium</i> sp.	10	2	12	4	4	6	4	4	6	2	8	6
<i>Mucor</i> sp.	2	–	–	4	4	–	–	–	–	–	4	2
GNO	2	6	2	4	8	6	4	4	2	6	6	8
Ogółem/Total	16	16	14	14	16	14	10	8	10	10	26	22
Nicienie/Nematodes	6	8	8	10	4	2	4	8	2	4	6	8
Brak czynnika No factor	4	–	2	2	6	6	8	2	2	2	4	2
Ogółem/Total	10	8	10	12	10	8	12	10	4	6	10	10

\* GO – grunt orny/ arable ground, Ł – łąka/meadow, ZŚ – zadrzewienie śródpolne/ mid-field trees, SA – system agroleśny/ agroforest system, GNO – grzybnia nieowocująca/ non-fruiting mycelium, W – wiosna/spring, J – jesień/autumn

Badając nasilenie występowania grzybów entomopatogenicznych metodą posiewu na podłoże selektywne, stwierdzono, że zagęszczenie jednostek tworzących kolonie (jtk) oznaczonych rodzajów grzybów było uzależnione od terminu prowadzonych badań oraz systemu ochrony przed agrofagami (tab. 3). W wiosennym terminie badań jednostki two-

rzące kolonie grzybów z rodzaju *Beauveria* spp. stwierdzono tylko w glebach pobranych z gruntu ornego (GO-1), gdzie uprawianą rośliną było żyto ozime oraz w glebie pobranej z systemu uprawy agroleśnej, natomiast w terminie jesiennym – w próbach ze wszystkich środowisk, a liczba jednostek tworzących kolonie wynosiła od 0,5 do 1,5 jtk  $\times 10^3 \cdot g^{-1}$  (w glebie z zastosowaną ochroną chemiczną). Sharma i in. [2021] podają, że stosowanie chemicznych środków ochrony roślin w ochronie portugalskich winorośli nie miało istotnego wpływu na obecność grzybów entomopatogenicznych i były one w podobnym stopniu izolowane zarówno z obiektów badawczych poddanych działaniu herbicydów, jak i niepoddanych zabiegowi. Grzyby entomopatogeniczne z rodzaju *Metarhizium* spp. wytworzyły jednostki infekcyjne (jtk) we wszystkich badanych próbkach gleby niezależnie od terminu badań. W wiosennym terminie badań rodzaj ten najwięcej jtk wytworzył w glebie gruntu ornego (GO-3) i łąkowej, odpowiednio: 3,8 i 3,3  $\times 10^3 \cdot g^{-1}$ . Wcześniejsze badania Miętkiewskiego i in. [1991], Tkaczuka [2008] oraz Tkaczuka i in. [2012, 2014, 2016, 2019] wykazały dominację grzybów *M. anisopliae* w glebach uprawnych w Polsce.

Tabela 3. Oznaczone rodzaje oraz liczba jednostek tworzących kolonie grzybów entomopatogenicznych (jtk  $\times 10^3 \cdot g^{-1}$ ) w glebach z ochroną i bez ochrony chemicznej (terminy: wiosenny i jesienny)

Table 3. Identified genera and number of colony forming units of entomopathogenic fungi (cfu  $\times 10^3 \cdot g^{-1}$ ) in soils with and without chemical protection (spring and autumn)

System uprawy Cultivation system		Rodzaj grzybów entomopatogenicznych Genus of entomopathogenic fungi					
		<i>Beauveria</i> spp.		<i>Metarhizium</i> spp.		<i>Cordyceps</i> spp.	
		W	J	W	J	W	J
GO-1*	OCh	0,5 $\pm$ 0,03	1,3 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3	–	–
GO-2		–	0,5 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,05
GO-3		–	1,5 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,5	–	–
Ł	BOCh	–	1,4 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,02
ZŚ		–	1,5 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,0	11,5 $\pm$ 2,1
SA		0,5 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,4	–	–

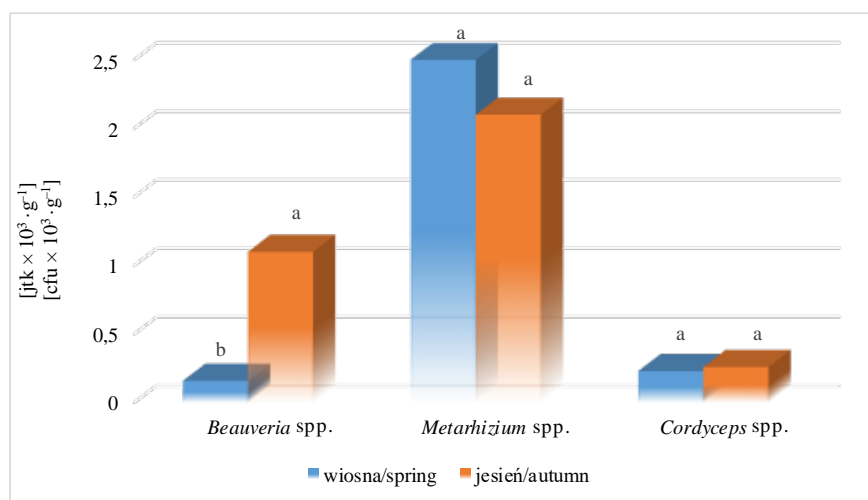
\* GO – grunt orny/ arable ground, Ł – łąka/meadow, ZŚ – zadrzewienie śródpolne/ mid-field trees, SA – system agroleśny/ agroforest system, OCh – ochrona chemiczna/ chemical protection, BOCh – bez ochrony chemicznej/ no chemical protection, W – wiosna/spring; J – jesień/autumn, SD – odchylenie standardowe/ standard deviation

Jesienią największą liczbę jednostek tworzących kolonie oznaczono w glebie pobranej z systemu uprawy agroleśnej (3,8 jtk  $\times 10^3 \cdot g^{-1}$ ). Należy zaznaczyć, że również w okresie wiosennym w glebie tej liczba jtk grzybów z rodzaju *Metarhizium* spp. była stosunkowo wysoka i wynosiła 2,3 jtk  $\times 10^3 \cdot g^{-1}$  gleby. Uzyskane wyniki wskazują, że pomimo wysokiego poziomu zakwaszenia środowiska grzyby te były w stanie wytworzyć jednostki infekcyjne. Grzyby z rodzaju *Cordyceps* spp. największą liczbę kolonii tworzyły w glebie pobranej z zadrzewienia śródpolnego 11,5 jtk  $\times 10^3 \cdot g^{-1}$ . Obecności grzybów z rodzaju *Cordyceps* spp. nie stwierdzono natomiast w żadnym terminie badania w glebie pobranej

z uprawy agroleśnej, na co wpłynęło najprawdopodobniej wysokie zakwaszenie podłoża. Hallsworth i Magan [1996] oraz Chandra i Rahman [2017] stwierdzili, że optymalną wartością pH dla wzrostu takich gatunków grzybów owadobójczych, jak *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *P. farinosus* (= *Cordyceps farinosa*), jest zakres pH od 5 do 8. Majchrowska-Safaryan [2022] w swoich badaniach wykazała istotne korelacje między wartością pH gleb łąkowych a występowaniem grzybów entomopatogenicznych z rodzaju *Lecanicillium*. Według Karga i Bałazego [2009] wprowadzenie upraszczania upraw i chemiczne zwalczanie agrofagów eliminują z pól patogeny stawonogów na równi z pasożytami i drapieżcami jako grupy troficzne o szczególnych wymaganiach środowiskowych i pokarmowych.

Mimo to większość z nich, w tym grzyby entomopatogeniczne, które są mikroorganizmami charakteryzującymi się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi do niekorzystnych warunków otoczenia, mogą w krótkim czasie zasiedlać środowiska, z których w wyniku zabiegów agrotechnicznych zostały wyeliminowane, o ile w arealach lub otoczeniu pól znajdują się odpowiednie dla nich środowiska ostojowe, takie jak miedze, zadrzewienia śródpolne czy gleby łąkowe [Tkaczuk i in. 2016].

Rozpatrując średnie zagęszczenie jednostek tworzących kolonie grzybów entomopatogenicznych w obu terminach badań na gruntach ornych, na których zastosowano ochronę chemiczną, zaobserwowano, że grzyby z rodzaju *Beauveria* spp. i *Cordyceps* spp. występowały liczniej w terminie jesiennym, natomiast grzyby z rodzaju *Metarhizium* spp. – wiosennym. Statystycznie istotną różnicę stwierdzono tylko dla grzybów z rodzaju *Beauveria* spp. (ryc. 1).



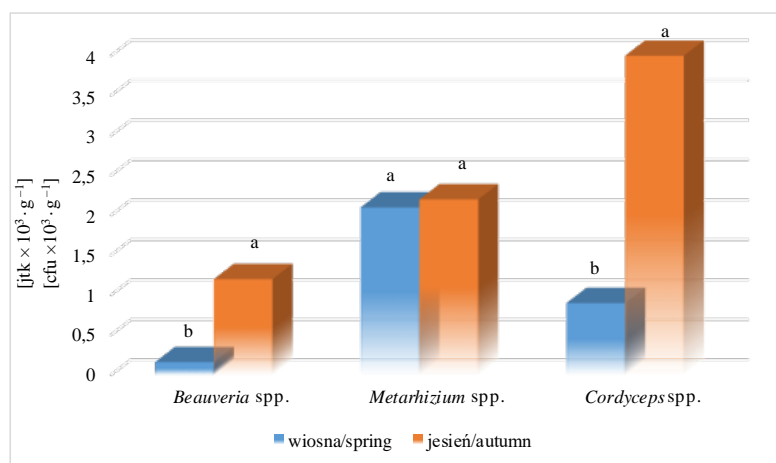
a, b – istotność na poziomie  $\alpha < 0,05$ / a, b – significance at the level of  $\alpha < 0.05$

Ryc. 1. Średnie zagęszczenie jednostek tworzących kolonie grzybów entomopatogenicznych (jtk) w obu terminach badań na gruntach ornych, na których zastosowano ochronę chemiczną

Fig. 1. Mean density of entomopathogenic fungi colonies forming units (cfu) at both test dates on arable land where chemical protection was applied



W glebach pobranych ze środowisk bez ochrony chemicznej wszystkie oznaczone rodzaje grzybów entomopatogenicznych występowały liczniej w jesiennym terminie prowadzonych badań. W stosunku do grzybów z rodzaju *Beauveria* spp. i *Cordyceps* spp. różnice te były statystycznie istotne (ryc. 2).



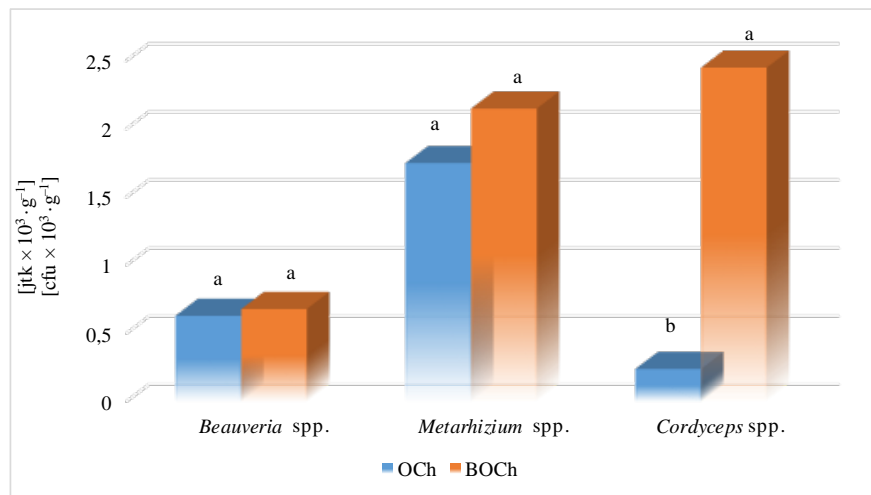
a, b – istotność na poziomie  $\alpha < 0,05$ / a, b – significance at the level of  $\alpha < 0.05$

Ryc. 2. Średnie zagęszczenie jednostek tworzących kolonie grzybów entomopatogenicznych (jtk) w obu terminach badań dla gleb bez ochrony chemicznej

Fig. 2. Mean density of entomopathogenic fungi colony forming units (cfu) at both test dates for soils without chemical protection

Przeprowadzone badania wykazały, że w glebach gruntów ornich, na których zastosowano ochronę chemiczną, grzyby entomopatogeniczne występowały mniej licznie niż w glebach, na których nie stosowano takiej ochrony, zwłaszcza glebach zadrzewień śródpolnych. Rodzajem grzybów, w stosunku do którego różnica ta była największa, jest rodzaj *Cordyceps* spp., w którego przypadku w glebach bez ochrony chemicznej średnio liczba jednostek infekcyjnych wynosiła  $2,45 \text{ jtk} \times 10^3 \cdot \text{g}^{-1}$ , a w glebach z zastosowaną ochroną chemiczną –  $0,24 \text{ jtk} \times 10^3 \cdot \text{g}^{-1}$ . Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że różnica ta była statystycznie istotna (ryc. 3). Znaczenie pasów zadrzewień śródpolnych jako źródła gatunków i różnorodności szczepów grzybów owadobójczych zostało podkreślone przez Meylinga i Eilenberga [2006a]. Medo i Cagań [2011] po przebadaniu aż 45 prób glebowych pochodzących z zadrzewień śródpolnych z różnych rejonów Słowacji stwierdzili, że gatunek *Isaria fumosorosea* (= *Cordyceps fumosorosea*) był wykrywany znacznie częściej niż w glebach z innych środowisk w agrocenozach. Według powyższych autorów zadrzewienia wydają się być odpowiednim środowiskiem dla rozwoju tego gatunku grzyba, a jego wysoka częstotliwość występowania w glebach z tych siedlisk została odnotowana również w innych badaniach [Steenberg 1995, Chandler i in. 1997, Meyling i Eilenberg 2006b]. Podobnie Kleespies i in. [1989] stwierdzili dwukrotnie niższe nasilenie grzybów owadobójczych

w glebie z pól uprawnych niż przylegających do nich miedz w okolicach Darmstad w Niemczech. Tkaczuk i in. [2019] podają, że system produkcji i ochrony w sadach (konwencjonalny oraz integrowany) jest czynnikiem istotnie wpływającym na nasilenie występowania i liczbę jednostek infekcyjnych grzybów entomopatogenicznych.



OCh – ochrona chemiczna/ chemical protection, BOCh – bez ochrony chemicznej/ no chemical protection; a, b – istotność na poziomie  $\alpha < 0,05$ / a, b – significance at the level of  $\alpha < 0.05$

Rys. 3. Średnie zagęszczenie jednostek tworzących kolonie grzybów entomopatogenicznych (jtk) wyizolowanych z gleb z ochroną chemiczną i bez niej (niezależnie od terminu prowadzenia badań)

Fig. 3. Mean density of colony forming units of entomopathogenic fungi [cfu] isolated from soils with and without chemical protection (regardless of the date of the research)

W krajobrazie rolniczym pola uprawne otoczone są przez siedliska seminaturalne niepoddawane zabiegom chemicznym i stanowią swoiste refugia dla flory i fauny, która nie występuje na polach [Meyling 2005, Tkaczuk 2008, 2016]. Siedliska te są optymalnym miejscem dla zimowania wielu gatunków stawonogów będących potencjalnymi gospodarzami dla grzybów entomopatogenicznych [Pywell i in. 2005, Tkaczuk 2008].

#### WNIOSKI

1. W glebach uprawnych z ochroną chemiczną oraz glebach bez ochrony chemicznej, a wśród nich w glebach z systemu uprawy agroleśnej alejowej, występują grzyby entomopatogeniczne z rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium* i *Cordyceps*.

2. Dominującym rodzajem grzybów entomopatogenicznych w badanych glebach oznaczonych metodą pułapkową w obu terminach badań (wiosennym i jesiennym), niezależnie od zastosowanej ochrony roślin, był *Metarhizium* spp., natomiast w glebach oznaczonych metodą posiewu na podłoże selektywne – grzyby z rodzaju *Cordyceps* spp.

3. Oceniając średnie zagęszczenie jednostek tworzących kolonie badanych rodzajów grzybów entomopatogenicznych, stwierdzono, że grzyby z rodzaju *Beauveria* spp. i *Cordyceps* spp. liczniej występowały w terminie jesiennym, natomiast grzyby z rodzaju *Metarhizium* spp. w okresie wiosennym.

4. Prowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że wyizolowane rodzaje grzybów owadobójczych tworzyły średnio o 39% więcej jednostek infekcyjnych w glebach bez ochrony chemicznej niż w glebach gruntów ornych, na których zastosowano środki ochrony roślin.

5. Analiza statystyczna wykazała, że skład rodzajowy oraz nasilenie występowania grzybów owadobójczych w badanych glebach są uzależnione od terminu poboru prób glebowych w stosunku do rodzaju *Beauveria* spp. i *Cordyceps* spp. oraz zastosowanego systemu ochrony roślin uprawnych w odniesieniu do rodzaju *Cordyceps* spp.

6. Czynnikiem determinującym skład rodzajowy oraz nasilenie występowania grzybów entomopatogenicznych w glebach uprawianych w systemie agroleśnym alejowym może być wysokie zakwaszenie podłoża konieczne do uprawy roślin kwaśnolubnych.

#### PIŚMIENNICTWO

- Augustyniak-Kram A., 2010. Organizmy pożyteczne w strategiach biologicznego zwalczania – grzyby owadobójcze. Stud. Ecol. Bioeth. 8(1), 45–54.
- Baj-Wójtowicz B., Osińska E., 2020. Agroleśnictwo. W: E. Osińska, B. Baj-Wójtowicz (red.), Agroleśnictwo – najważniejsza innowacja w rolnictwie. Poznań, 5–10.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101(4), 512–530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A., 2006. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and member of the *M. flavoviride* complex. Mycologia 98(5), 737–745. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.5.737>
- Chandler D., Hay D., Reid A.P., 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. Appl. Soil Ecol. 5(2), 133–141.
- Chandra Teja K.N.P., Rahman S.J., 2017. Effect of media pH on the growth of entomopathogenic fungi isolated from different rhizosphere soils. Int. J. Bioassays 6(3), 5325. <https://doi.org/10.21746/ijbio.2017.03.009>
- Chen W., Xie W., Cai W., Thaochan N., Hu Q., 2021. Entomopathogenic fungi biodiversity in soil of three provinces located in southwest China and first approach to evaluate their biocontrol potential. J. Fungi 7(11), 984. <https://doi.org/10.3390/jof711098>
- Ginter A., 2021. Małe gospodarstwa rolne wobec wyzwań zrównoważonego rozwoju i Zielonego Ładu. Wyd. Nauk. UPH w Siedlcach, Siedlce.
- Gondek K., Ropek D., 2007. Wybrane właściwości gleby pod trwałym użytkowaniem zielonym oraz aktywność owadobójczych nicieni i grzybów. Acta Agrophys. 10(2), 327–340.
- Hallsworth J.E., Magan N., 1996. Culture age, temperature, and pH after the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Appl. Environ Microbiol. 62, 2435–2442.
- Humber A.R., 2012. Identification of entomopathogenic fungi. W: L.A. Lacey (red.), Manual of techniques in invertebrate pathology. Academic Press, London, 151–187.
- Inglis G.D., Enkerli J., Goettel M.S., 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: hypocreales. W: L.A. Lacey (red.), Manual of techniques in invertebrate pathology. Academic Press, London, 189–253.

- Karg J., Bałazy S., 2009. Wpływ struktury krajobrazu na występowanie agrofagów i ich antagonistów w uprawach rolniczych. *Prog. Plant Prot.* 49(3), 1015–1034.
- Kepler R.M., Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Quandt C.A., Sung G.-H., Rehner S.A., Aime M.C., Henkel T.W., Sanjuan T., Zare R., Chen M., Li Z., Rossman A.Y., Spatafora J.W., Shrestha B., 2017. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). *IMA Fungus* 8(2), 335–353. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>
- Kleespies R., Bathon H., Zimmermann G., 1989. Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von entomopathogenen Pilzen und Nematoden in verschiedenen Böden in der Umgebung von Darmstadt [Investigations on the natural occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in different soils in the surroundings of Darmstadt]. *Gesunde Pflanz.* 41(10), 350–355.
- Lipa J.J., 2000. Obecne i przyszłe miejsce biologicznej i innych niechemicznych metod ochrony roślin. *Prog. Plant Prot.* 40(1), 62–70.
- Majchrowska-Safaryan A., 2022. Występowanie grzybów entomopatogenicznych w glebach murszowo-glejowych doliny rzecznej Liwca. *Prog. Plant Prot.* 62(2), 91–99. <https://doi.org/10.14199/ppp-2022-011>
- Martyniuk S., 2012. Factor affecting the use of microbial biopesticides in plant protection. *Prog. Plant Prot.* 52(4), 957–962.
- Medo J., Cagaň L., 2011. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biol. Control.* 59(2), 200–208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.020>
- Meyling N.V., 2005. Population ecology and genetic diversity of entomopathogenic fungi (Ascomycota: Hypocreales) in agroecosystems and field margins. Ph. D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Meyling N.V., Eilenberg J., 2006a. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycol. Res.* 110, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.008>
- Meyling N.V., Eilenberg J., 2006b. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113(1–4), 336–341.
- Miętkiewski R., Tkaczuk C., Badowska-Czubik T., 1993. Entomogenous fungi isolated from strawberry plantations soil infested by *Otiorrhynchus ovatus* L. *Rocz. Nauk Rol., Seria E – Ochrona Roślin* 22(1–2), 39–46.
- Miętkiewski R., Tkaczuk C., Żurek M., Bałazy S., 1991. Występowanie entomopatogenicznych grzybów w glebie ornej, leśnej oraz ściółce. *Rocz. Nauk Rol., Seria E – Ochrona Roślin* 21(1–2), 61–68.
- Osińska E., Rosłon W., Jakubowska Z., Baj-Wójtowicz B., 2020. Uprawa róży owocowej (*Rosa rugosa* Thunb) z maliną moroszką (*Rubus chamaemorus* L.) i bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.) z miodunką (*Pulmonria obscura* Dumort.) w systemie agroleśnym. *Agroleśnictwo*. W: E. Osińska, B. Baj-Wójtowicz (red.), *Agroleśnictwo – najważniejsza innowacja w rolnictwie*. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Oddz. w Poznaniu, Poznań, 150–171.
- Pywell R.F., James K.L., Herbert I., Meek W.R., Carvell C., Bell D., Sparks T.H., 2005. Determinants of overwintering habitat quality for beetles and spiders on arable farmland. *Biol. Conserv.* 123(1), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.10.010>
- Quesada-Moraga E., Navas-Cortés J.A., Maranhao E.A., Ortiz-Urquiza A., Santiago-Álvarez C., 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol. Res.* 111(8), 947–966. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.006>
- Rehner S.A., Buckley E.P.A., 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1), 84–98. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>

- Rehner S.A., Minnis A.M., Sung G.H., Luangsa-ard J.J., Devotto L., Humber R.A., 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5), 1055–1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywę Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG (Dz.U. L 309 z 24.11.2009, s. 1).
- Sharma L., Oliveira I., Gonçalves F., Raimundo F., Singh R.K., Torres L., Marques G., 2021. Effect of soil chemical properties on the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in portuguese grapevine fields. *Pathogens* 10(2), 137. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020137>
- Sosnowska D., 2018. Konserwacyjna metoda biologiczna wsparciem integrowanej ochrony roślin i rolnictwa ekologicznego. *Prog. Plant Prot.* 58(4), 288–293. <https://doi.org/10.14199/ppp-2018-040>
- Sosnowska D., 2019. Grzyby pasożytnicze i antagonistyczne w biologicznej ochronie roślin w Polsce. *Prog. Plant Prot.* 59(4), 223–231. <https://doi.org/10.14199/ppp-2019-029>
- Steenberg T., 1995. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with fokus on infectivity to *Sitona* species and other insects in lucerne. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.
- Strasser H., Forer A., Schinner F., 1996. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. W: T.A. Jackson, T.R. Glare (red.), *Microbial control of soil dwelling pests*. AgResearch, Lincoln, New Zealand, 125–130.
- Tkaczuk C., 2008. Występowanie i potencjał infekcyjny grzybów owadobójczych w glebach agrocenoz i środowisk seminaturalnych w krajobrazie rolniczym. Rozprawa Naukowa nr 94. Wyd. Akademii Podlaskiej, Siedlce.
- Tkaczuk C., Król A., Majchrowska-Safaryan A., Niecewicz Ł., 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. *J. Ecol. Eng.* 15(4), 137–144. <https://doi.org/10.12911/22998993.1125468>
- Tkaczuk C., Krzyczkowski T., Wegensteiner R., 2012. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from mid-field woodlots and adjacent small-scale arable fields. *Acta Mycol.* 47(2), 191–202. <https://doi.org/10.5586/am.2012.024>
- Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Harasimiuk M., 2016. Występowanie oraz potencjał infekcyjny grzybów entomopatogenicznych w glebach z pól uprawnych, łąk i siedlisk leśnych. *Prog. Plant Prot.* 56(1), 5–11. <https://doi.org/10.14199/ppp-2016-001>
- Tkaczuk C., Tipping C., Majchrowska-Safaryan A., Król A., Wyrzykowska M., 2019. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from apple orchards protected in different farming systems. *Fresen. Environ. Bull.* 28, 7906–7914.
- Vänninen I., 1995. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycol. Res.* 100(1), 93–101.
- Worms P., 2020. Agroleśnictwo – przyszłość europejskiego rolnictwa. W: E. Osińska, B. Baj-Wójtowicz (red.), *Agroleśnictwo – najważniejsza innowacja w rolnictwie*. Poznań, 11–19.

**Źródło finansowania:** Zadanie badawcze 44/20/B.

**Summary.** The aim of the study was to compare the generic composition and the intensity of occurrence of entomopathogenic fungi in the soils of farmlands with intensive chemical protection and soils without pesticide protection, including soils from the agroforestry cultivation system. The research material consisted of samples of arable soils collected in 2021 (spring, autumn) on an individual farm with an area of 7.42 ha, located in the town of Kołodziej, voivodeship masovian. The research objects without pesticide protection were soil samples taken from the meadow, mid-field forest and agroforestry cultivation along the avenue (Sosnówka, Lublin voivodeship) in 2022. Entomopathogenic fungi were isolated using the trapping method and isolation

on a selective medium. In the course of the research, insect pathogenic of the genera *Beauveria*, *Metarhizium* and *Cordyceps* were isolated. When assessing the total severity of the marked types of entomopathogenic fungi in both study dates, it was found that the greatest number of trap insect larvae were infected by fungi in soils collected from mid-field trees and meadow soils (without chemical protection). The conducted research showed that in the soils of arable lands where pesticide protection was applied, the isolated genera of entomopathogenic fungi formed less colony-forming units (CFU) than in soils where no chemical protection was applied.

**Key words:** entomopathogenic fungi, chemical protection, no chemical protection, agroforestry systems

Otrzymano/Received: 10.10.2022  
Zaakceptowano/Accepted: 24.02.2023