

VYUŽITIE FEROMÓNOVÝCH LAPAČOV S NOSIČOM ENTOMOPATOGÉNNEJ HUBY V INTEGROVANEJ OCHRANE LESA PROTI LYKOŽRÚTOVI SMREKOVÉMU *IPS TYPOGRAPHUS*

Slavomír Rell • Jozef Vakula • Juraj Galko • Michal Lalík • Milan Zúbrik
• Andrej Gubka • Andrej Kunca • Roman Leontovyč • Christo Nikolov

Rell, S., Vakula, J., Galko, J., Lalík, M., Zúbrik, M., Gubka, A., Kunca, A., Leontovyč, R., Nikolov, C.: The use of pheromone traps with entomopathogenic fungus carrier in integrated forest protection against the European spruce bark beetle *Ips typographus*. APOL, 2022, vol. 3, no. 2, p. 239–245.

Abstract: The European spruce bark beetle (*Ips typographus* L.) poses a huge risk, especially for mountain areas with a predominance of spruce, where chemical treatment is difficult to apply or prohibited. Therefore, the use of biological methods, such as the use of entomopathogenic fungi (EPF) in combination with pheromone traps, can be considered. In this study, the results of such attempt is presented. The efficacy of developed carrier of EPF was monitored, as well as the efficacy of fungus *Beauveria bassiana*. These tests were performed in a field-laboratory conditions. Results show high carrier efficacy for a relatively long time. The observations also shown, that the infected imagines are able to establish a new generation, but its quality (e.g. length of maternal galleries) is affected by the rate at which the fungus kills an adult.

Key words: pheromone trap; carrier of entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana*; biological methods

Problematika

Lykožrút smrekový (*Ips typographus* L.) (Coleoptera: Curculionidae) predstavuje riziko v územiach s dominanciou smreka obyčajného (*Picea abies* L., Karst.), zväčša v oblastiach s porastmi postihovanými vetrovými kalamitami. Vo všeobecnosti je lykožrút druhotným škodcom, ktorý potrebuje poškodené stromy a ku premnoženiam dochádza v prípade neobmedzených možností pre množenie, napr. po víchriciach alebo snehovým polomoch (Kreutz et al. 2004a). Kalamitná hmota ponechaná v poraste tvorí ideálne podmienky pre jeho množenie. Následne pri nedostatku odumretej, prípadne oslabenej smrekovej hmoty, hromadne napáda aj zdravé stromy a dokáže tak narušiť ich prirodzený obranný mechanizmus (Kreutz et al. 2004a), čím následne vznikajú lykožrútové kalamity.

Fytosanitárne opatrenia patria ku bežným metódam regulácie početnosti lykožrúta používaným v praxi (Wermelinger 2004). Kým použitie lapačov slúži hlavne ako metóda monitoringu populačnej hustoty (Galko et al. 2014), fytosanitárne opatrenia sú účinné iba pokým populačná hustota lykožrúta nedosiahne kritické hodnoty (Økland et al. 2016). Možnosťou je aj použitie chemicky ošetrených lapákov, čo vyžaduje správne načasovanie (Wermelinger 2004). Pri súčasnom nátlaku na znižovanie spotreby pesticídov, ako aj ich problematická aplikácia a otázna účinnosť na stojatých stromoch, pripadá do úvahy využitie biologických metód ochrany, pri ktorých sa do prostredia vnáša patogén. V minulosti boli realizované pokusy s využitím entomopatogénnych húb (EPH), aplikáciou práškoveho média umiestneného do feromónového lapača (Vaupel & Zimmerman 1996; Kreutz et al. 2000; Kreutz 2002; Kunca 2009; Vakula et al. 2010, 2012; Grodzki & Kosibowicz 2015), avšak prenos infekcie na populáciu škodcu sa nepreukázal s dostatočnou účinnosťou. Problémom práškoveho média so spórami umiestnenými do feromónového lapača bola rýchla strata virulencie spór. Bažazy (2012) udáva nízku účinnosť v redukcii populácií lykožrúta v prírodných podmienkach, avšak laboratórne testy ukázali vysokú mortalitu imág aj lariev v uzavretých podmienkach. Riešením problému krátkej účinnosti práškoveho média spór húb, by mohlo byť využitie nosiča, v ktorom by huby rástli, čo by zabezpečilo ich prežitie aj v extrémnych podmienkach feromónových lapačov. Táto metóda je jednoducho apli-

kovateľná a selektívna, nakoľko feromónové odparníky primárne lákajú cieľové druhy škodcov (Vakula et al. 2012).

Materiál a metódy

V rokoch 2020 až 2021 prebiehal terénno-laboratórny experiment s imágami I. smrekového, kde sa testovala účinnosť nosiča entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. V rokoch 2020 a 2021 sa testoval kmeň huby nájdený v prírode na imágu lykožrúta. Cieľom bolo zistiť schopnosť nosiča udržať hubu virulentnú v podmienkach feromónového lapača, kde je nosič často vystavený slnečnému žiareniu, suchu a teplu. V roku 2022 sa porovnávali 2 kmene tej istej huby (francúzky a slovenský), kde sa porovnávala ich virulencia voči imágam I. smrekového.

Experimenty prebiehali vo vojenských lesoch v lokalite Sklené, kde boli v apríli v každom roku vybrané plochy v blízkosti porastov s výskytom lykožrúta. Feromónové lapače MultiWit boli inštalované podľa STN. V roku 2020 boli navnadené odparníkom Pheroprax A, v roku 2021 a 2022 odparníkom IT ECOLURE Tubus. Odchytné vaničky lapačov boli modifikované (obr. 1), aby bolo možné do nich umiestniť nosiče huby, pričom imága boli schopné vaničky opustiť tak, aby pri „prechode“ došlo ku ich kontaktu s nosičom a došlo tak k infikovaniu.

Imága boli v prvom roku odchyťované do 1 dl plastových fľašiek, upevnených k odchytovej vaničke po dobu 4 hodín, v čase s najvyššou letovou aktivitou imág. V druhom a treťom roku boli imága odchyťované do 1 l plastových fliaš v priebehu 24 hodín.

Imága boli v laboratóriu umiestnené do Petriho misiek s kúskom čerstvej smrekovej kôry a navlhčenou buničitou vatou (obr. 2). Imága boli vizuálne kontrolované každý deň v priebehu 10 dní. Pozorovala sa schopnosť huby usmrtiť a prerásť imága (obr. 3) podľa troch hodnotiacich stupňov: imágo živé (0), mŕtve neprerastené (1) a mŕtve prerastené hubou (2) (stupeň prerastanie imág).



Obrázok 1. Upravená zberná vanička s nosičom huby *B. bassiana*. Roky z ľava do prava 2020, 2021, 2022
Figure 1. Modified collection tray with carrier of *B. bassiana* fungus. Years from left to right 2020, 2021, 2022



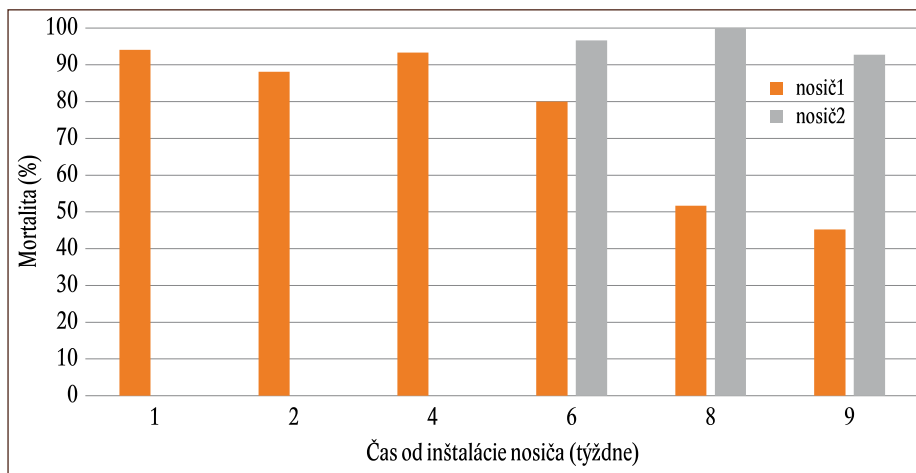
Obrázok 2. Odchytené a chované imága lykožrúta smrekového v Petriho miskách
Figure 2. Captured and bred imagines of *I. typographus* in Petri dishes



Obrázok 3. Imágo lykožrúta smrekového prerastené mycéliom entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana*
Figure 3. Adult of *I. typographus* overgrown with mycelium of entomopathogenic fungi *B. bassiana*

Výsledky a diskusia

Nosič udržal hubu relatívne vysoko virulentnú po obdobie 6 týždňov, kedy bol pre porovnanie nosič v niektorých lapačoch vymenený za čerstvý (nosič 2) (obr. 4).

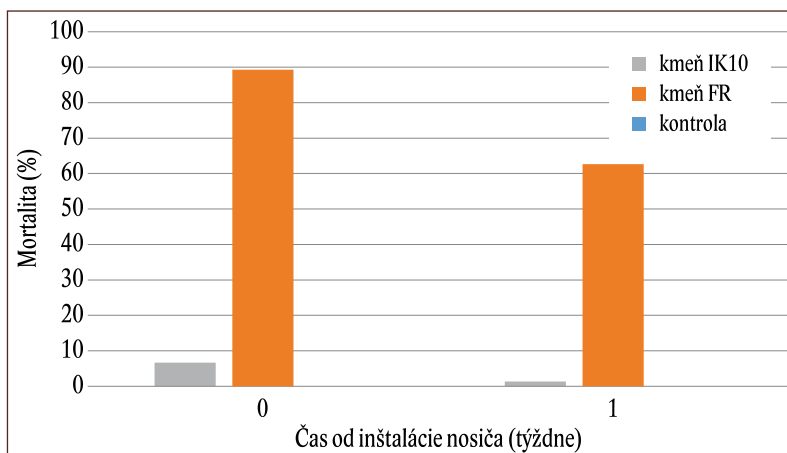


Obrázok 4. Mortalita imág I. smrekového spôsobená hubou *B. bassiana*. z nosiča a porovnanie mortality po výmene nosiča (nosič2). Sumárne za rok 2020 a 2021

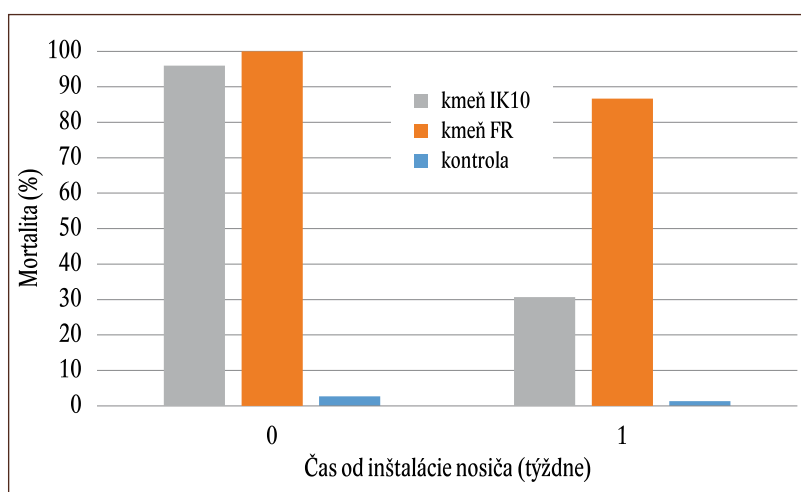
Figure 4. Mortality of *I. typographus* imagines caused by the fungus *B. bassiana*. from carrier and comparison of mortality after carrier exchange (nositc2). For year 2020 and 2021 summary

K usmrteniu imága hubou došlo priemerne za 5 dní, pričom k prvotným úhynom dochádzalo už dva až tri dni od infikovania a značné percento imág uhynulo v priebehu 8 dní od infikovania. Medzi jednotlivými odchytnami boli rozdiely v priemere času, za aký huba dokázala imága usmrtiť nevýznamné. Počas experimentu došlo aj k úhynu 20 % imág odchytených z kontrolného lapača (bez nosiča huby).

Pri porovnaní dvoch kmeňov vyšiel francúzsky kmeň (FR) účinnejší ako slovenský kmeň (IK10), kedy francúzsky kmeň dokázal imága usmrtiť rýchlejšie a tiež dosiahol vyššiu mortalitu imág (obr. 5 a 6).



Obrázok 5. Porovnanie mortality imág I. smrekového po 5 dňoch, pri 2 rôznych kmeňoch huby *B. bassiana*
Figure 5. Comparison of mortality of *I. typographus imagines* after 5 days, using two different strains of the fungus *B. bassiana*



Obrázok 6. Porovnanie mortality imág I. smrekového po 10 dňoch, pri 2 rôznych kmeňoch huby *B. bassiana*
Figure 6. Comparison of mortality of *I. typographus imagines* after 10 days, using two different strains of the fungus *B. bassiana*

Výsledky experimentu aplikácie EPH *B. bassiana* do feromónových lapačov pomocou vyvíjaného nosiča ukázali vysokú účinnosť relatívne dlhé obdobie. Na rýchlosť, akou huba dokáže imágo usmrtiť má vplyv viacero faktorov. Medzi hlavné patrí koncentrácia spór, ktoré sa na imágo zachytia. Aj nízke koncentrácie sú schopné imágo usmrtiť (Ansari & Butt 2012), avšak tento proces trvá dlhšie. Ku ďalším patrí životaschopnosť spór, kde poveternostné podmienky (napr. teplota, vlhkosť, UV žiarenie) (Moore et al. 1993; Morley-Davies et al. 1996) priamo ovplyvňujú klíčenie a prežívanie spór. V predchádzajúcich experimentoch obdobného charakteru bolo médium so spórmi EPH aplikované do lapača vo forme prášku a dochádzalo ku rýchlej strate virulencie spór (Kunca 2009; Vakula et al. 2010, 2012; Grodzki & Kosibowicz 2015), pravdepodobne v dôsledku vysokých teplôt, prípadne navlhnutím práškového média a tým stratou priľnavosti na imágo. Pri aplikácii huby pomocou nosiča, si spóry udržali vysokú virulenciu v podmienkach feromónových lapačov, čo pripisujeme tomu, že nosič je v čase aplikácie do lapača prerastený mycéliom huby, ktoré pri krátkodobých nepriaznivých podmienkach (denné teplotné maximá) dokáže prežiť vo vnútri nosiča a následne znovu vyrásť na povrch a produkovať spóry. Virulencia huby bola pozorovaná na mortalite odchytených imág I. smrekového. Pre po

rovnanie účinnosti nosiča z časového hľadiska, bol tento v niektorých lapačoch vymenený. Po tejto výmene sa potvrdila signifikantne vyššia virulencia huby z čerstvého nosiča, čo pripisujeme postupnému vysychaniu média, prípadne postupnému vyčerpaniu živín v médiu. Počas experimentu došlo aj k úhynu 20 % imág odchytených z kontrolného lapača (bez nosiča huby), pričom na časti bola po-

zorovaná infekcia hubou *B. bassiana*. Zdroj infekcie mohol byť z prírodného prostredia kde sa *B. bassiana* prirodzene vyskytuje (Kram & Kram 2012; Meyling & Eilenberg 2006; Landa et al. 2001; Reay et al. 2010) alebo prenosom spór patogénu vzduchom z lapačov s nosičom. Tieto boli od seba umiestnené približne 20 metrov.

Experiment teda potvrdil schopnosť nosiča udržať hubu *B. bassiana* virulentnú aj v podmienkach lapača, čo potvrdil laboratórny test mortality. Podobné výsledky v laboratórnych podmienkach vykazujú aj práce viacerých autorov (Wegensteiner 1996; Kreutz et al. 2004b). Cieľom je aj úspešná aplikácia patogéna do populácie škodcu. Podľa doterajších pozorovaní sú aj infikované imága schopné založiť novú generáciu. Čerstvo vyliahnuté imága následnej generácie ešte pred vyletením vykonávajú tzv. zrelostný žer. Predpokladáme, že takto môže dôjsť ku vertikálnemu prenosu infekcie pri kontakte so spórmi z už prerastených rodičovských imág. Túto hypotézu je však potrebné overiť.

Ku výhodám využitia entomopatogénnych húb je ekologickosť, sú prirodzenou súčasťou prírodného prostredia (Kram & Kram 2012; Meyling & Eilenberg 2006; Landa et al. 2001; Reay et al. 2010) a boli pozorované na podkôrných druhoch hmyzu, najčastejšie na *Ips typographus* (Kirschner, 2001; Wegensteiner 2004; Wegensteiner et al. 2007 a, b, 2015 a, b), *Ips sexdentatus* (Draganova et al. 2010, Takov et al. 2012). Nepredstavujú nebezpečenstvo pre vtáky, ryby, cicavce (Zimmermann 1993, 2007) ani pre ľudí alebo životné prostredie (Strasser et al. 2000; Dabro & Thomas 2009). V kombinácii s feromónovým lapačom je táto metóda selektívna, nakoľko feromónové odparníky primárne lákajú cieľové druhy škodcov (Vakula et al. 2012). Výhodou je tiež ich schopnosť produkovať nové konídiá na uhynutých jedincoch. Konídiá sú tiež schopné udržať si za priaznivých podmienok (v pôde, hrabanke) klíčivosť aj niekoľko mesiacov (Ansari & Butt 2012).

Podakovanie: Práca vznikla vďaka finančnej podpore v rámci projektov APVV-15-0348, APVV-19-0116 a APVV-19-0119, APVV-21-0131 financovaných agentúrou APVV a projektu “PROMOLES” - projekt financovaný z rozpočtovej kapitoly MPRV SR (prvok 08V0301). Práca ďalej vznikla vďaka finančnej podpore z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (ERDF) pre projekt č. 313011X531 „Rozvoj biologicky a biotechnicky orientovaných systémov ochrany lesov pred domácimi a nepôvodnými (inváznymi) organizmami“ a vďaka projektu realizovaného s finančnou podporou Ministerstva obrany Slovenskej republiky. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum excelentnosti lesnícko-drevárskeho komplexu LignoSilva; (kód ITMS: 313011S735), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a pre projekt Výskum a vývoj bezkontaktných metód pre získavanie geopriestorových údajov za účelom monitoringu lesa pre zefektívnenie manažmentu lesa a zvýšenie ochrany lesov (FOMON) č. p. 313011V465.

Zoznam použitej literatúry

- Ansari, M. A., Butt, T. M., 2012: Susceptibility of different developmental stages of large pine weevil *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic fungi and effect of fungal infection to adult weevils by formulation and application methods. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1): 33–40.
- Bałaży, S., 2012: Antagonistyczne oddziaływania pomiędzy bezkręgowcami a ich patogenami grzybowymi w żerowiskach kambio-i ksylofagów. *Ochrona lasu – wybrane problemy historyczne i współczesne*. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, p. 51–63.
- Dabro, J. M., Thomas, M. B., 2009: Spore persistence and likelihood of aeroallergenicity of entomopathogenic fungi used for mosquito control. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(6): 992–997.
- Draganova, S., Takov, D., Doychev, D., 2010: Naturally-occurring entomopathogenic fungi on three bark beetle species (Coleoptera: Curculionidae) in Bulgaria. *Pesticides and phytomedicine (Pesticidi i fitomedicina)* (Belgrade), 25: 59–63.

- Galko, J., Nikolov, Ch., Rell, S., Kunca, A., Vakula, J., Gubka, A., Zúbrik, M., 2014: Vývoj nových typov feromónových lapačov. In: Kunca, A. (ed): Aktuálne problémy v ochrane lesa 2014, Nový Smokovec, 23. 4. – 24. 4. 2014, p. 182–187.
- Grodzki, W., Kosibowicz, M., 2015: An attempt to use the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in forest protection against the bark beetle *Ips typographus* (L.) in the field.
- Kirschner, R., 2001: Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in central Europe. Trichomycetes and other fungal groups, p.175–196.
- Kram, A. A., Kram, K. J., 2012: Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review). In: J. A. Blanco (ed.): Forest Ecosystems – More than Just Trees, 464 p.
- Kreutz, J., 2002: Möglichkeiten einer biologischen Bekämpfung des Buchdruckers, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae), mit insektenpathogenen Pilzen in Kombination mit Pheromonfallen. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 189 p.
- Kreutz, J., Zimmermann, G., Marohn, H., Vaupel, O., Mosbacher, G., 2000: Preliminary investigations on the use of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and other control methods against the bark beetle, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) in the field. IOBC/WPRS-Bulletin, 23: 167–173.
- Kreutz, J., Zimmermann, G., Vaupel, O., 2004a: Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. Biocontrol Science and Technology, 14(8): 837–848.
- Kreutz, J., Vaupel, O., Zimmermann, G., 2004b: Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. Journal of Applied Entomology 128(6): 384–389. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2004.00813.384–389.
- Kunca, A., Vakula, J., Leontovyč, R., Gubka, A., 2009: Využitie entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* v ochrane smreka. Aktuálne problémy v ochrane lesa. Zvolen, Národné lesnícke centrum, p. 91–97.
- Landa, Z., Horňák, P., Bursová, E., 2001: Entomopatogenní houby asociované s lýkožroutem smrčovým *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) v oblasti NP a CHKO Šumava. Aktuality šumavského výzkumu, Srní 2. – 4. dubna 2001, p. 124–128.
- Meyling, N. V., Eilenberg, J., 2006: Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. In Agri., Ecos. & Environ., 113: 336–341.
- Moore, D., Bridge, P. D., Higgins, P. M., Bateman, R. P., Prior, C., 1993: Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Ann. Appl. Biol., 122: 605–616.
- Morley-Davies, J., Moore, D., Prior, C., 1996: Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. Mycol. Res., 100: 31–38.
- Økland, B., Nikolov, C., Krokene, P., Vakula, J., 2016: Transition from windfall-to patch-driven outbreak dynamics of the spruce bark beetle *Ips typographus*. Forest Ecology and Management, 363: 63–73.
- Reay, S. D., Brownbridge, M., Gicquel, B., Cummings, N. J., Nelson, T. L., 2010: Isolation and characterization of endophytic *Beauveria* spp. (Ascomycota: Hypocreales) from *Pinus radiata* in New Zealand forests. Biological Control, 54(1): 52–60.
- Strasser, H., Vey, A., Butt, T. M., 2000: Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolyocladium* and *Beauveria* species? Biocontrol Science and Technology, 10(6): 717–735.
- Takov, D., Doychev, D., Linde, A., Draganova, S. A., Pilarska, D. K., 2012: Pathogens of bark beetles (Curculionidae: Scolytinae) and other beetles in Bulgaria. Biologia, 67(5): 966–972.

- Vakula, J., Varkonda, Š., Galko, J., Gubka, A., Kunca, A., Zúbrik, M., 2010: Rozvoj súčasných technických možností pri štúdiu niektorých spôsobov aplikácie entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* v rámci biologických metód ochrany lesa. Aktuálne problémy v ochrane lesa. Zvolen, Národné lesnícke centrum, p. 64–68.
- Vakula, J., Gubka, A., Galko, J., Varkonda, Š., 2012: Aplikácia entomopatogénov do populácii škodcov s využitím feromónových lapačov. Aktuálne problémy v ochrane lesa. Zvolen, Národné lesnícke centrum, p. 92–96.
- Vaupel, O., Zimmermann, G., 1996: Orientierende Versuche zur Kombination von Pheromonfallen mit dem insektenpathogenen Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. gegen die Borkenkäferart *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae). Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz, 69(8): 175–179.
- Wegensteiner, R., 1996: Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera, Scolytidae). Bulletin OILB/SROP, 19(9): 186–189.
- Wegensteiner, R., Weiser, J., 2004: Annual variation of pathogen occurrence and pathogen prevalence in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) from the BOKU University Forest Demonstration Centre. Journal of Pest Science, 77(4): 221–228.
- Wegensteiner, R., Pernek, M., Weiser, J., 2007a: Occurrence of *Gregarina typographi* (Sporozoa: Gregarinidae) and *Metschnikowia* cf. *typographi* (Ascomycota: Metschnikowiaceae) in *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Scolytidae) from Austria. IOBC WPRS BULLETIN, 30(1): 217.
- Wegensteiner, R., Epper, C., Wermelinger, B., 2007b: Untersuchungen über das Auftreten und die Dynamik von Pathogenen bei *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) in Befallsherden. Mitt. Schweiz. Entomol. Ges., 80: 79–90.
- Wegensteiner, R., Wermelinger, B., Herrmann, M., 2015a: Natural enemies of bark beetles: predators, parasitoids, pathogens, and nematodes. Bark Beetles, p. 247–304.
- Wegensteiner, R., Tkaczuk, C., Bałazy, S., Griesser, S., Rouffaud, M. A., Stradner, A., Steinwender, B. M., Hager, H., Papierok, B., 2015b: Occurrence of pathogens in populations of *Ips typographus*, *Ips sexdentatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) and *Hylobius* spp. (Coleoptera, Curculionidae, Curculioninae) from Austria, Poland and France. Acta Protozoologica, 2015(3), p.219232.
- Wermelinger, B., 2004: Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*—a review of recent research. Forest ecology and management, 202(1–3): 67–82.
- Zimmermann, G., 1993: The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pest Management Science, 37(4): 375–379.
- Zimmermann, G., 2007: Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology, 17(6): 553–596.

Adresa:

Slavomír Rell, PhD., Ing. Jozef Vakula, PhD., Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Michal Lalík, Ph.D., Ing. Milan Zúbrik, PhD., Ing. Ing. Andrej Kunca, PhD., Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD., Ing. Roman Leontovych, PhD.
Národné lesnícke centrum - Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Lesnícka 11, SK – 969 01 Banská Štiavnica,
e-mail: slavomir.rell@nlcsk.org