

ŠTÚDIA VYUŽITIA NOSIČA ENTOMOPATOGENEJ HUBY *BEAUVERIA BASSIANA* V INTEGROVANEJ OCHRANE LESA PROTI TVRDOŇOVI SMREKOVÉMU *HYLOBIUS ABIETIS*

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

Rell, S., Lalík, M., Galko, J., Vakula, J., Zúbrik, M., Gubka, A., Kunca, A., Leontovyč, R., Nikolov, Ch.: Study on the Use of a Carrier of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the Integrated Forest Protection against the Large Pine Weevil *Hylobius abietis*. APOL, 2025, vol. 6, no. 1, p. 180–187.

Abstract: The large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) is one of the most destructive pests of young coniferous stands in Europe, causing severe mortality of seedlings and substantial economic losses. In recent years, the reduction of chemical insecticides due to environmental concerns has increased the need for ecologically sustainable solutions. This study evaluates an entomopathogenic fungi (EPF) carrier designed to maintain the viability and sporulation under a field conditions. In recent years, a series of field and laboratory experiments were conducted in Slovakia to assess the efficacy of carriers under different application strategies. Results demonstrated high infection and mortality rates of adult *H. abietis*, ranging from 41% to over 90%, with the highest values observed when carriers were placed in bark traps or during direct contact of adults with the carrier. Field trials further confirmed that placing carriers at every third spruce seedling is sufficient, corresponding to approximately 1,000 carriers per hectare. Additional cage experiments revealed that sporulation does not significantly spread over greater distances, minimizing the risk to non-target arthropods. These findings confirm that carriers of EPF are a promising component of integrated forest protection, offering a selective, cost-efficient, and environmentally sound alternative to conventional chemical control.

Key words: biological control; conifer regeneration; insect pathogens; pest management strategies

Problematika

Tvrdoň smrekový (*Hylobius abietis* Linnaeus, Coleoptera: Curculionidae) patrí medzi najvýznamnejších škodcov mladých ihličnatých porastov v Európe a Ázii (Långström & Day 2004; Lalík et al. 2021). Dospelce obžieraním kôry na sadenicích prerušujú vodivé pletivá, čo spôsobuje ich odumieranie. Škody sú najvýraznejšie v prvých rokoch po výsadbe, pričom hospodárske straty sa v Európe odhadujú až na 120 miliónov € ročne (Gradinariu et al. 2012; Lalík et al. 2021). Okrem mladých sadeníc sa imága môžu živiť aj koreňmi a vetvami starších stromov (Eidmann 1974; Wallertz et al. 2006). Populačná dynamika tvrdoňa je úzko spojená s dostupnosťou čerstvých pňov, ktoré vznikajú v dôsledku ťažby, vetrových či podkôrníkových kalamít (Kunca et al. 2016).

Tradičná ochrana sadeníc bola dlhodobo založená na aplikácii syntetických insekticídov (Stoakley & Heritage 1990). Ich používanie je však postupne obmedzované z dôvodu negatívnych dopadov na životné prostredie a rastúceho tlaku na uplatňovanie ekologicky prijateľných postupov (Lacey et al. 2015). To vytvára priestor pre alternatívne metódy, medzi ktoré patria biologické spôsoby ochrany využívajúce prirodzených antagonistov hmyzu. Entomopatogénne huby (EPH) zohrávajú významnú úlohu ako prirodzení regulátori hmyzích populácií (Vega et al. 2012). Ich uplatnenie v biologickej ochrane bolo potvrdené v poľnohospodárstve aj lesníctve (De Faria & Wraight 2007; Augustyniuk-Kram & Kram 2012). *Beauveria bassiana* je druh huby s veľmi širokým hostiteľským spektrom, schopný infikovať viac ako 750 druhov hmyzu (Ghikas et al. 2010), vrátane tvrdoňa smrekového (Barta et al. 2019). Jej praktické využitie je však limitované environ-

mentálnymi podmienkami, najmä UV žiarením (Posadas et al. 2012) a teplotnými extrémami (Hallsworth & Magan 1999).

Jednou z perspektívnych možností je použitie špeciálneho nosiča (Slovenská patentová prihlášku PP-79-2019; medzinárodná patentová prihláška PCT/SK2020/050007), ktorý bol vyvíjaný s cieľom zabezpečiť dlhodobé prežívanie entomopatogénnych húb v prírodných podmienkach. V priebehu posledných rokov bolo uskutočnených niekoľko experimentov zameraných na overenie efektivity tejto metódy v kombinácii s rôznymi atraktantmi a rôznymi metódami aplikácie.

Materiál a metódy

V roku 2019 bola v lokalite Liptovská Teplička založená pokusná plocha, rozdelená na štyri bloky s rozmermi 15×25 m; jednotlivé bloky boli od seba vzdialené 10 m. V jednotlivých blokoch sa testovali rôzne varianty aplikácie nosičov: kontrolný variant obsahoval len lapacie kôry bez nosiča (A), v druhom variante boli umiestnené nosiče s hubou *B. bassiana* (B), tretí variant kombinoval nosič s atraktantom na báze α -pinénu a etanolu v pomere 1:2 (C) a vo štvrtom variante boli nosiče vložené priamo do lapacej kôry (D) (obr. 1). V každom bloku bolo umiestnených dvadsať zemných pascí pozostávajúcich z plastových vedier s bočnými otvormi, ktoré boli zakopané do pôdy a vybavené vetvičkami borovice slúžiacimi ako návnada. Počas deviatich dní bolo odchytených celkovo 564 imág tvrdoňa.



Obrázok 1. Rozmiestnenie pascí na ploche (biely blok – A, kontrola; zelený – B nosič; modrý – C, nosič s atraktantom; žltý – D nosiče s lapacou kôrou).

Figure 1. Distribution of traps on the plot (white block – A, control; green – B, carrier; blue – C, carrier with attractant; yellow – D, carriers with bark traps).

Odchytené jedince boli následne prenesené do Petriho misiek, v ktorých boli chované maximálne po tri kusy spolu s kúskom smrekovej kôry a navlhčenou buničinou. Misky boli uchovávané v laboratórnych podmienkach pri teplote 22 ± 2 °C a relatívnej vlhkosti 60 %, pričom vlhkosť v miskách bola udržiavaná nad 90 %. Kontroly prebiehali dvakrát týždenne počas ôsmich týždňov a pri každej kontrole bola zaznamenávaná mortalita imág a prípadné prerastanie mycéliom huby *B. bassiana* (obr. 2).

V roku 2022 boli experimenty realizované na dvoch lokalitách – Liptovská Porúbka a Liptovská Kokava (obr. 3). Na každej ploche bolo vysadených sto sadeníc smreka obyčajného (*Picea abies*), rozdelených do dvoch blokov po päťdesiat kusov. V jednom bloku bol ku každej sadenici umiestnený nosič, zatiaľ čo druhý blok slúžil ako kontrola, bez nosičov.



Obrázok 2. Imága tvrdoňa v Petriho miskách prerastené mycéliom huby *B. bassiana*.
Figure 2. Adults of large pine weevil in Petri dishes colonized by fungus *B. bassiana*.



Obrázok 3. Výskumné plochy L. Kokava a L. Porúbka.
Figure 3. Trial plots L. Kokava a L. Porúbka.

Tri týždne po výsadbe bolo na každú plochu inštalovaných pätnásť zemných pascí na odchyt imág tvrdoňa. V priebehu troch dní bolo zo všetkých blokov spolu odchytených 253 imág, ktoré boli následne prenesené do laboratórnych podmienok identických s prvým experimentom. Odchytené imága boli sledované počas štyridsiatich dní, pričom kontroly sa vykonávali každé tri až štyri dni, neskôr v týždenných intervaloch. Pri každej kontrole sa zaznamenávala mortalita a prejavy infekcie.

V roku 2023 v lokalite Liptovská Teplička, bol v experimente sledovaný vplyv hustoty aplikácie nosičov na účinnosť infekcie. Na ploche bolo vysadených 192 sadeníc smreka, ktoré boli rozdelené do troch blokov po 64 sadeníc. V prvom bloku (A) bol nosič umiestnený pri každej sadenici, v druhom (B) pri každej druhej a v treťom (C) pri každej tretej sadenici. V každom bloku bolo nainštalovaných 12 ks zemných pascí, súčasne bolo 10 kontrolných zemných pascí umiestnených mimo ošetrované bloky, vo vzdialenosti 50 m (obr. 4). Pasce boli kontrolované počas troch dní a podarilo sa odchytiť celkom 262 ks imág, z toho 46 ks v bloku A, 88 ks v bloku B, 99 ks v bloku C a 29 ks v kontrolných pasciach. Podobne, ako v predchádzajúcich experimentoch, jedince boli v laboratórnych podmienkach sledované počas dvoch mesiacov.

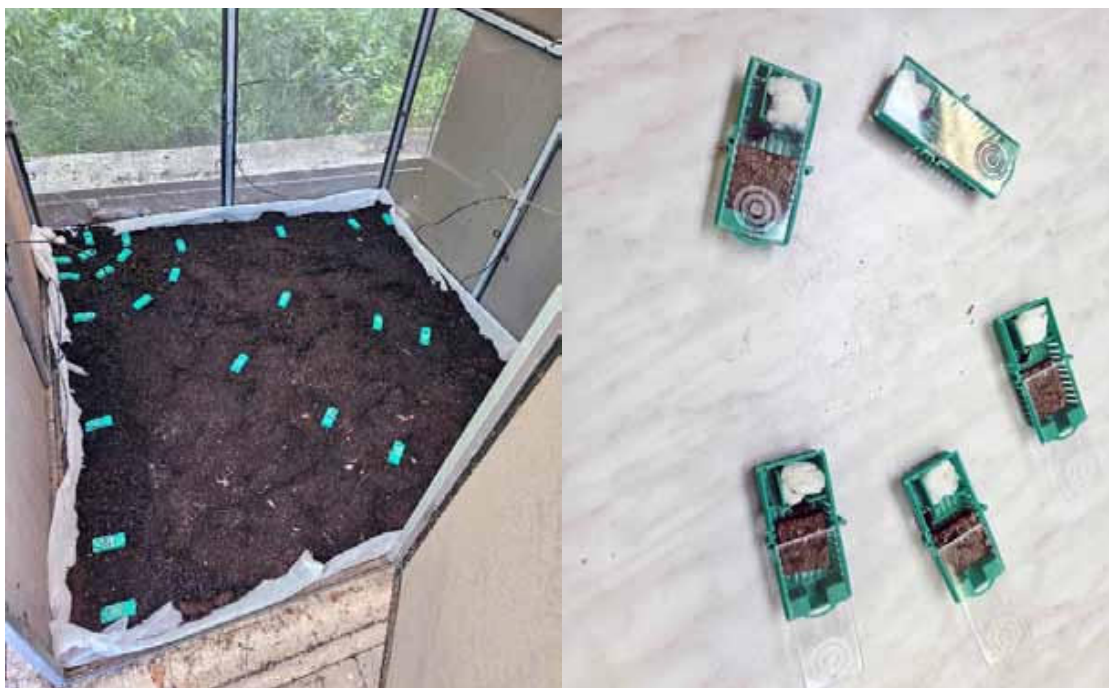


Obrázok 4. Experimentálna plocha s vysadenými sadenicami smreka a zemnými pascami.

Figure 4. Experimental plot with planted spruce seedlings and pitfall traps.

V druhej časti tretieho experimentu bol testovaný prenos infekcie zo sporulujúcich nosičov na vzdialenosť. Pokus bol založený 1. augusta.

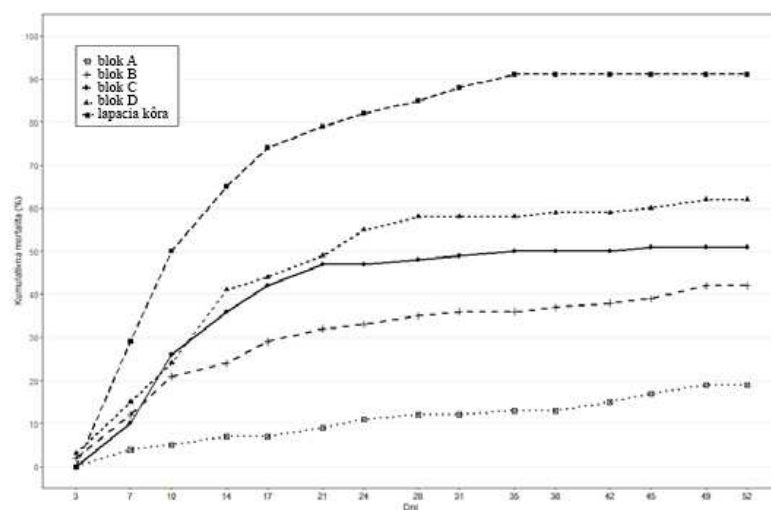
V roku 2023 prebiehalo tiež testovanie vzdialenosti prenosu spór z nosiča. Experiment prebiehal v šiestich externých chovných kliebkach s rozmermi 180 × 180 cm. Na podlahe kliebok bol rozmiestnený substrát a v každej kliebke bol v jednom rohu umiestnený nosič s *B. bassiana*. Imága tvrdoňa boli uzavreté v malých kliebkach o rozmeroch 8 × 4 × 1 cm, ktoré boli umiestnené vo vzdialenostiach 10, 25, 50, 100, 140 a 160 cm od nosiča (obr. 5). Paralelne bolo tridsať jedincov krátko (2 sekundy) priložených priamo na povrch nosiča a následne chovaných v Petriho miskách. Títo jedinci tvorili kontrolnú skupinu, ktorá slúžila na overenie sporulácie nosičov. Kontrola prebiehala v trojdňových intervaloch, neskôr raz týždenne.



Obrázok 5. Chovná kletka s nosičom a rozmiestnenými imágami tvrdoňa; kletky s imágami.
Figure 5. Rearing cage with a carrier and distributed adults of pine weevil; small cages containing adults.

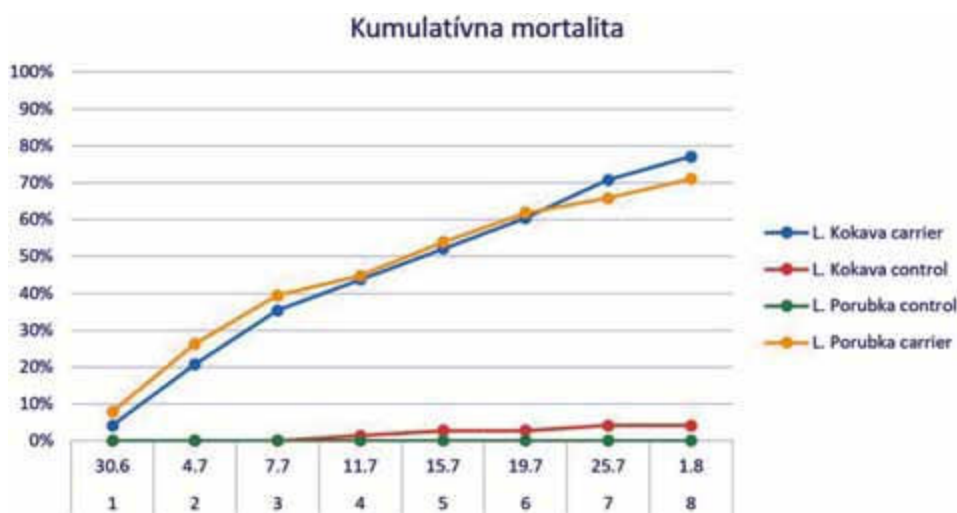
Výsledky

V experimente z roku 2019 vyšli rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Mortalita imág v kontrolnom bloku (A) dosiahla 18,7 %, zatiaľ čo v bloku s nosičmi (B) to bolo 41,6 % a v kombinácii s atraktantom (C) 51,2 %. Najvyššie hodnoty boli zaznamenané v bloku D, s nosičmi vloženými do lapacej kôry, kde mortalita dosiahla 62,2 %. Ešte výraznejší efekt sa objavil pri jedincoch priamo odchytených z lapacej kôry obsahujúcej nosič, kde mortalita dosiahla 91,2 %. Prvé známky prerastania mycéliom huby *B. bassiana* boli zaznamenané už počas prvej kontroly (obr. 6).



Obrázok 6. Denný vývoj mortality imág v závislosti od jednotlivých ošetrení počas priebehu experimentu.
Figure 6. Daily development of adult mortality in relation to the individual treatments throughout the experiment.

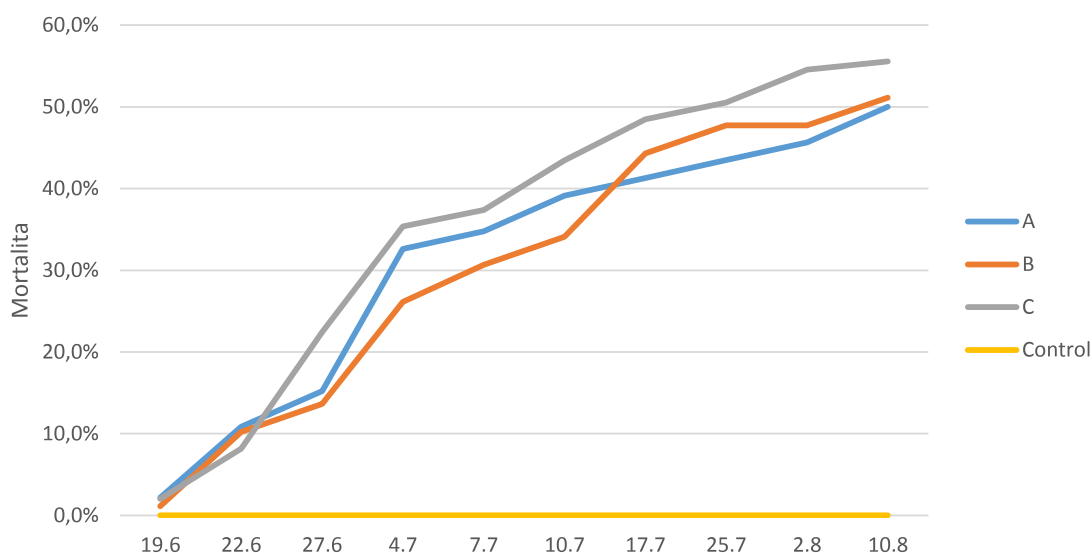
V experimente z roku 2022 bola mortalita imág v blokoch s nosičmi vysoká na oboch lokalitách, konkrétne 71 % v Liptovskej Porúbke a 77 % v Liptovskej Kokave. Naproti tomu v kontrolných blokoch bola mortalita zanedbateľná, pohybovala sa len medzi 0 až 4 %. Prvé prejavy infekcie sa objavili už po siedmich dňoch a v polovici sledovacieho obdobia bola viac ako polovica odchytených jedincov usmrtená s jasnými znakmi infekcie.



Obrázok 7. Kumulatívna mortalita imág z lokalít L. Kokava a L. Porúbka.

Figure 7. Cumulative mortality of adults from the plots of L. Kokava and L. Porúbka.

Experiment z roku 2023 skúmajúci hustotu umiestnenia nosičov preukázal, že hustota ich aplikácie nemá významný vplyv. V bloku A, s nosičom pri každej sadenici bola mortalita 50 %, v bloku B s nosičom pri každej druhej sadenici 51 % a v bloku C s nosičom pri každej tretej sadenici 55 %. V kontrolných pasciach nebola zaznamenaná žiadna mortalita spôsobená hubou. Tieto výsledky naznačujú, že aj pri nižšej hustote aplikácie je účinnosť dostatočná a postačuje umiestnenie nosiča pri každej tretej sadenici.



Obrázok 8. Kumulatívna mortalita imág v jednotlivých blokoch.

Figure 8. Cumulative mortality of adults in the individual blocks.

Experiment hodnotiaci šírenie sporulácie v externých chovných kliebkach preukázal len minimálny prenos infekcie. Z celkového počtu imág umiestnených v rôznych vzdialenostiach od nosiča bolo infikovaných iba sedem jedincov, pričom vzdialenosť od nosiča sa nepreukázala štatisticky významná. Tento výsledok kontrastoval s variantom priameho kontaktu imág s nosičom, kde mortalita dosiahla 100 % už po 21 dňoch.

Záver

Výsledky experimentov preukázali relatívne vysokú účinnosť nosičov, predstavujú perspektívnu biologickú metódu ochrany proti tvrdoňovi smrekovému. Mortalita dospelcov odchytených z plôch z rozmiestnenými nosičmi dosahuje viac ako 50 %, pri priamom kontakte s virulentným nosičom je to spravidla 100 %. Z praktického hľadiska je kľúčovým poznatkom, že účinnosť je porovnateľná aj pri nižšej hustote aplikácie – postačuje umiestnenie nosiča pri každej tretej sadenici, čo zodpovedá približne 1 000 ks nosičov na hektár.

Významným prínosom je aj ekologická bezpečnosť metódy. Experimenty naznačujú, že sa spóry na väčšie vzdialenosti nešíria. Pri použití vhodných typov atraktantov je riziko ohrozenia necieľových druhov minimálne. To robí z nosičov efektívny a zároveň environmentálne prijateľný nástroj.

Univerzálnosť nosiča, ktorý je možné kolonizovať nielen *Beauveria bassiana*, ale aj inými entomopatogénnymi hubami, poskytuje široké možnosti jeho aplikácie v lesníctve aj v poľnohospodárstve. Táto technológia tak predstavuje perspektívny pilier integrovanej ochrany lesov a významný krok k udržateľnejšiemu hospodáreniu v podmienkach meniaceho sa prostredia.

Podakovanie

Práca vznikla vďaka finančnej podpore v rámci projektov APVV-21-0131, APVV-22-0399, APVV-22-0545, APVV-23-0156 a APVV-24-0425 financovaných agentúrou APVV a projektu „PROMOLES“ – projekt financovaný z rozpočtovej kapitoly MPRV SR (prvok 08V0301). Táto publikácia vznikla aj 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. Štúdia bola financovaná Európskou komisiou v rámci projektu LignoSilva [Grant Agreement #101059552] v rámci akcie Horizon Europe Teaming for Excellence.

Literatúra

- Augustyniuk-Kram, A., Kram, K., 2012: Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). *Forest Research Papers*, 73:321–335.
- Barta, M., Lalík, M., Rell, S., Kunca, A., Horáková, M. K., Mudrončeková, S., Galko, J., 2019: Hypocrealean fungi associated with *Hylobius abietis* in Slovakia, their virulence against weevil adults and effect on feeding damage in laboratory. *Forests*, 10:634.
- De Faria, M. R., Wraight, S. P., 2007: Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43:237–256.
- Eidmann, H. H., 1974: The large pine weevil *Hylobius abietis* as a pest on coniferous plants: A review. *Studia Forestalia Suecica*, 114:1–53.
- Ghikas, D. V., Kouvelis, V. N., Typas, M. A., 2010: Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1–5.8S–ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *BMC Microbiology*, 10:174.
- Gradinariu, G., Olenici, N., Tomescu, R., Olenici, V., Duduman, M., 2012: The impact of large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) attacks in young conifer plantations from Eastern Carpathians. *Annals of Forest Research*, 55:85–96.

- Hallsworth, J. E., Magan, N., 1999: Water and temperature relations of growth of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74:261–266.
- Kunca, A., Zúbrik, M., Leontovyč, R., Vakula, J., Konôpka, B., 2016: Bark beetle outbreak in the Tatra National Park in Slovakia – a review. *Forestry Journal*, 62:203–209.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M. S., 2015: Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132:1–41.
- Lalík, M., Galko, J., Nikolov, Ch., Rell, S., Kunca, A., Zúbrik, M. et al., 2021: Potential of *Beauveria bassiana* application via a carrier to control the large pine weevil. *Crop Protection*, 143:105563.
- Långström, B., Day, K. R., 2004: Damage, control and management of weevil pests, especially *Hylobius abietis*. In: Lieutier, F., Day, K. R., Battisti, A., Grégoire, J. C., Evans, H. F. (eds.): *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Dordrecht, Springer, pp. 415–444.
- Posadas, J. B., Comerio, R. M., Mini, J. I., Nussenbaum, A. L., Lecuona, R. E., 2012: Microbial control of *Triatoma infestans* with *Beauveria bassiana* in semi-field trials in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110:134–139.
- Stoakley, J. T., Heritage, S., 1990: Evaluation of insecticides for the control of *Hylobius abietis*. *Forestry*, 63:145–162.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S. et al., 2012: Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 5:437–445.
- Wallertz, K., Nordenhem, H., Nordlander, G., 2006: Feeding on roots of conifer seedlings by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 8:273–279.

ADRESA

Ing. Slavomír Rell, PhD., Ing. Michal Lalík, PhD., Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Jozef Vakula, PhD., Ing. Milan Zúbrik, PhD., Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Andrej Kunca, PhD., Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Roman Leontovyč, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD.
Národné lesnícke centrum – Sekcia pre vedu a výskum
Lesnícka ochrannárska služba
Lesnícka 11
SK-969 01 Banská Štiavnica
e-mail: slavomir.rell@nlcsk.org