



OTESTOVANIE ÚČINNOSTI NOSIČA NA *MELOLONTHA* SPP. V LABORATÓRNYCH PODMIENKACH

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

Lalík, M., Galko, J., Nikolov, Ch., Kunca, A., Zúbrik, M., Vakula, J., Gubka, A., Leontovyč, R., Rell, S., Dubec, M.: Testing the efficacy of a carrier on *Melolontha* spp. in laboratory conditions. APOL, 2025, vol. 6, no. 1, p. 188–193.

Abstract: In 2023, a novel carrier of entomopathogenic fungi (EPF) was tested under laboratory conditions on larvae of *Melolontha* spp. The aim was to compare the efficacy of four *Beauveria* strains and a commercial product Nema-green containing the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. The strains used included *Beauveria bassiana* strain FR and three *B. brongniartii* strains (617, 1071, and 7528), originally isolated from *Melolontha* larvae. The experiments were conducted in two repetitions, with larvae exposed to fungal mycelium by short contact or immersed in nematode suspension. Survival of larvae was evaluated 24 days after inoculation. The highest mortality (90%) was caused by nematodes, followed by *B. bassiana* FR (58%). The *B. brongniartii* strains reached 20–33% larval mortality. No mortality was observed in the control group. The results indicate a high potential of entomopathogenic nematodes and the promising use of *B. bassiana* FR in the biological control of *Melolontha* spp. larvae.

Key words: *Melolontha* spp.; entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana*; *Beauveria brongniartii*; *Heterorhabditis bacteriophora*; biological control; carrier

Úvod

Chrásty (Coleoptera: Melolonthidae) predstavujú významných škodcov lesných a poľnohospodárskych ekosystémov. Ich larvy, známe ako pandravy, poškodzujú korene rastlín, čo vedie k oslabenému rastu a v niektorých prípadoch až k úhynu. Tradičné chemické metódy regulácie majú environmentálne a zdravotné riziká, preto sa čoraz väčší dôraz kladie na biologickú ochranu (Klingen et al. 2011).

Entomopatogénne huby (EPH) predstavujú efektívnu biologickú metódu regulácie chrústov. Medzi najčastejšie používané druhy patrí *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Beauveria brongniartii*. Tieto huby infikujú larvy a dospelé jedince, spôsobujúce ich smrť a následné šírenie spor v populácii (Hajek & St. Leger 1994; Zimmermann 2007). *Beauveria brongniartii* je špecificky účinná voči niektorým druhom chrústov a má potenciál dlhodobo redukovať populácie (Goettel et al. 2005).

Mechanizmus účinku: po kontakte s hmyzom sa spóry EPH prichytia na kutikulu a začínajú klíčiť. Huba preniká do hemolimy, produkuje toxíny a enzýmy, ktoré vedú k úhynu hostiteľa. Po smrti sa na telese jedince vyvíjajú nové spóry, ktoré môžu infikovať ďalšie jedince (Fang et al. 2006).

Aplikácia v praxi: EPF sa aplikujú vo forme granúl, práškov alebo tekutých suspenzií. V lesníctve sa nosiče často miešajú s pôdou v blízkosti koreňov, aby sa maximalizoval kontakt s larvami. *Beauveria brongniartii* sa môže aplikovať aj vo forme mycéliových blokov v lese, ktoré umožňujú postupné uvoľňovanie spór počas vegetačného obdobia (Shah & Pell 2003).

Okrem húb sa na biologickú reguláciu chrústov využívajú entomopatogénne hádatky, predovšetkým rody *Steinernema* a *Heterorhabditis*. Tieto hádatky parazitujú na larvách v pôde, vylučujú baktérie, ktoré spôsobujú smrť hostiteľa a následne sa rozmnožujú (Kaya & Gaugler 1993).

Výhody biologických metód: biologická ochrana poskytuje environmentálne šetrnú alternatívu k chemickým insekticídum. Minimalizuje riziko rezistencie, je selektívna voči cieľovým škodcom a znižuje sekundárne negatívne efekty na pôdu a necieľové organizmy (Lacey et al. 2015).

Integrácia metód: pre maximálnu účinnosť sa často odporúča kombinovaná aplikácia entomopatogénnych húb a háďatiek. Takáto integrácia zvyšuje mortalitu lariev a znižuje populačný rast chrústov. Dôležitým aspektom je aj časovanie aplikácie vzhľadom na životný cyklus škodcov (Ehlers 2001).

Výzvy a perspektívy: hlavné obmedzenia biologickej ochrany zahŕňajú citlivosť na environmentálne podmienky (teplota, vlhkosť), logistické nároky na aplikáciu a potrebu špecifického výberu EPF alebo háďatiek pre konkrétny druh chrústov (Hajek 2007; Zimmermann 2007).

Metodika

V roku 2023 sme sa experimente zamerali na otestovanie nosiča na larvy *Melolontha* spp. v laboratórnych podmienkach. Testy prebiehali so 4 kmeňmi *Beauveria* a jedným komerčným prípravkom, ktorý obsahuje entomopatogénne háďatká.

Ako entomopatogénne huby (EPH) boli použité: *Beauveria bassiana* kmeň FR. S týmto kmeňom pracujeme na našom pracovisku už niekoľko rokov a ukázal sa účinný na veľa druhov hmyzu. Ďalšie tri kmene entomopatogénnych húb *Beauveria brongniartii* boli získané z USDA-ARS Emerging Pests and Pathogens Research Unit, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health 538 Tower Road, Ithaca, New York. Tieto tri kmene boli vybraté na základe toho, že boli v minulosti odizolované priamo z lariev *Melolontha melolontha*. Je teda predpoklad, že na tieto kmene sú larvy citlivé. Išlo konkrétne o *Beauveria brongniartii*, kmeň 617, kmeň 1071 a kmeň 7528. A ako posledný bol testovaný komerčný prípravok Nema-green, ktorý obsahuje parazitické hlištice *Heterorhabditis bacteriophora*. Tento prípravok je priamo určený proti larvám *Melolontha* spp. Pred začiatkom experimentov bolo získané kmene potrebné namnožiť. Pripravili sme Sabouraud Dextrose Agar, ktorý je určený na množenie entomopatogénnych húb. Vybrané kmene sa aplikovali na agar. Po infekcii je potrebné, aby agar bol umiestnený v tmavej sterilnej miestnosti po dobu 5 dní a teplote $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, a po piatich dňoch sa v miestnosti rozsvieti svetlo a agar je nechaný na kultiváciu ďalších 5 dní. Po 10 dňoch je agar s nainfikovanými hubami pripravený na použitie.

Experiment na otestovanie nosiča na larvy *Melolontha* spp. v laboratórnych podmienkach bol v takom istom dizajne vykonaný 2-krát. Larvy sme získali z prírody, kde sme ich vykopali na vhodných lokalitách (obr. 1). Prvýkrát bol pokus založený 26. 8. 2023 a kontrolovaný 20. 9. 2023 a druhýkrát bol pokus založený 2. 10. 2023 a vyhodnotený 25. 10. 2023.



Obrázok 1. Larvy chrústov po vykopaní (vľavo) a larvy chrústov pred infekciou EPH (vpravo).

Figure 1. Cockchafer larvae after excavation (left) and cockchafer larvae before infection with EPF (right).

Jeden experiment pozostával z 11 misiek o objeme 1,2 litra, kde bol umiestnený záhradnícky substrát a trs trávy aj s koreňmi, ktorá slúžila ako potrava pre larvy (obr. 2). Do jednej misky bolo umiestnených 6 lariev pri infikovaných larvách a 10 imág v jednej miske pri kontrolných larvách. Jedno ošetrenie pozostávalo z 2 misiek a kontrolná miska bola jedna s 10 larvami. Celkovo bolo na pokus použitých 70 lariev.

Kontrolné larvy (10 kusov) neboli ošetrené. Larvy ktoré boli ošetrované kmeňmi *Beauveria*, boli priamo priložené na agar s kmeňom huby (4-krát 12 lariev). Larvy sa nechali priložené na mycéliom húb po dobu 1 sekundy a následne sa vložili do misky so substrátom. A posledných 12 lariev bolo ošetrených podľa príbalového letáku v prípravku Nema-green. Tento prípravok sme nasypali do vody, rozmiešali a do takto namiešanej suspenzie sme na jednu sekundu namočili larvy a následne ich umiestnili do pripravených misiek.

Kontrola bola vykonaná v každom experimente iba jedenkrát, aby sa zamedzilo poškodenie alebo sekundárna infekcia lariev. Na konci experimentu sme každú misku vysypali separátne a prehľadávali substrát a hľadali živé alebo mŕtve larvy.



Obrázok 2. Infekcia larvy (vľavo) a založený pokus (vpravo).
Figure 2. Infection of a larva (left) and established experiment (right).

Výsledky

Po 24 dňoch od infekcie sme pokusy vyhodnocovali. Substrát z misky sme vysypali a hľadali jednotlivé larvy (obr. 3).

Najlepšiu účinnosť na mortalitu lariev mali entomopatogénne háďatká 90 % (obr.4). Z lariev usmrtených háďatkami zostala len vonkajšia pokožka. Ako druhé najlepšie ošetrenie sa ukázala *B. bassiana* kmeň FR. Mortalita lariev s makroskopickými známkami entomopatogénnych húb dosahovala pri tomto kmeni 58 %. Dva kmene EPH *B. brongniartii* dosahovali mortalitu lariev 33 % a jeden kmeň dosiahol mortalitu lariev 20 % (obr. 5). Pri kontrolných larvách sme počas experimentov nepozorovali mortalitu.

Záver

Výsledky experimentov potvrdili vysoký potenciál biologickej regulácie lariev chrústov (*Melolontha* spp.) pomocou entomopatogénnych organizmov. Najvyššiu mortalitu (90 %) sme zaznamenali pri aplikácii entomopatogénnych háďatiek *Heterorhabditis bacteriophora* (prípravok Nema-green), ktoré sa ukázali ako mi-



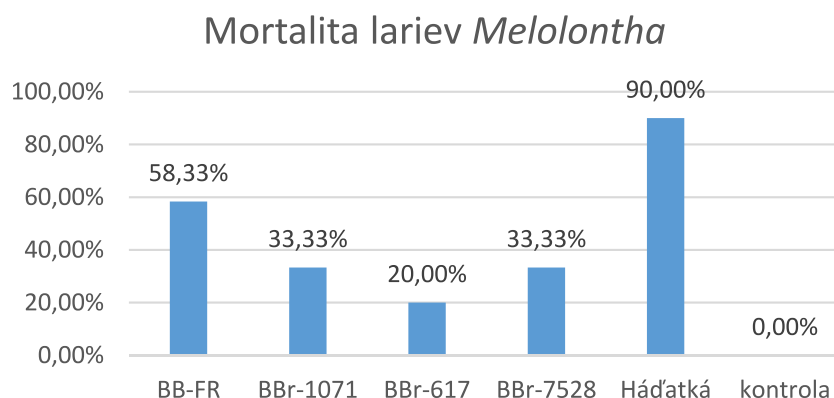
Obrázok 3. Hľadanie lariev v substráte na konci experimentov.
Figure 3. Searching for larvae in the substrate at the end of the experiments.



Obrázok 4. Larvy usmrtené háďatkami (vľavo) a larvy usmrtené EPH (vpravo).
Figure 4. Larvae killed by nematodes (left) and larvae killed by EPF (right).

moriadne účinný prostriedok pri krátkodobej eliminácii lariev. Medzi testovanými hubami dosiahol najlepšie výsledky kmeň *Beauveria bassiana* FR s mortalitou 58 %, zatiaľ čo kmene *Beauveria brongniartii* vykazovali nižšiu účinnosť (20 – 33 %). V kontrolných skupinách mortalita nebola zaznamenaná, čo potvrdzuje jednoznačný účinok použitých entomopatogénov.

Tieto výsledky poukazujú na význam kombinácie rôznych biologických agensov pri ochrane lesa. Zatiaľ čo entomopatogénne háďatká poskytujú rýchly nástup účinku, entomopatogénne huby môžu zabezpečiť dlhodobé šírenie infekcie v populácii škodcov prostredníctvom sporulácie na uhynutých hostiteľoch. Integrácia oboch metód môže byť preto efektívnym nástrojom na udržateľné znižovanie populácií chrústov a minimalizáciu škôd v lesných ekosystémoch.



Obrázok 5. Mortalita lariev *Melolontha* za obidva experimenty.

Figure 5. Mortality of *Melolontha* larvae in both experiments.

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. Štúdiá bola financovaná Európskou komisiou v rámci projektu LignoSilva [Grant Agreement #101059552] v rámci akcie Horizon Europe Teaming for Excellence.

Literatúra

- Ehlers, R.U., 2001: Mass production of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 11:645–651.
- Fang, W. et al., 2006: Pathogenicity of *Beauveria* spp. *Mycopathologia*, 162:235–245.
- Goettel, M. S., Inglis, G. D., 1997: Fungi: Hyphomycetes. In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 213–249). Academic Press.
- Hajek, A. E., 2007: Ecology of entomopathogenic fungi. *Fungal Ecology*, 1:121–130.
- Hajek, A. E., St. Leger, R. J., 1994: Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39:293–322.
- Kaya, H. K., Gaugler, R., 1993: Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38:181–206.
- Klingen, I., Meadow, R., Eilenberg, J., 2002: Formulation and application of entomopathogenic fungi for soil pests. *Biocontrol Science and Technology*, 12:91–108.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. et al., 2015: Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132:1–41.
- Shah, F. A., Pell, J. K., 2003: Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61:413–423.
- Zimmermann, G., 2007: Review on safety of entomopathogenic fungi to humans. *Biocontrol Science and Technology*, 17:553–596.

ADRESA

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