

# POTENCIÁLNE VYUŽITIE ENTOMOPATOGÉNNYCH HÚB PROTI TVRDOŇOVI SMREKOVÉMU V LABORATÓRNYCH PODMIENKACH – ČIASTKOVÉ VÝSLEDKY

Slavomír Rell • Juraj Galko • Marek Barta

## ÚVOD

V posledných rokoch sú častým javom vetrové kalamity, zväčša v smrekových porastoch, kde množstvo vzniknutých pňov a ťažbových zvyškov, ako primárne atraktanty, lákajú imága tvrdoňa smrekového (*Hylobius abietis*, Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) a predstavujú vhodný materiál pre rozvoj jeho lariev.

Po spracovaní kalamity je potrebné tieto plochy umelo obnoviť a tu nastáva problém. Vyliahnuté imága tvrdoňa smrekového, potrebujú vykonať tzv. zrelostný žer. Keďže najbližším zdrojom potravy pre imága sú ihličnaté sadenice, môžu na takýchto plochách vzniknúť obrovské škody, často s potrebou opakovaného zalesňovania, čím sa niekoľkonásobne môžu zvýšiť náklady na obnovu. K účinným metódam boja proti tvrdoňovi patrí chemický postrek (Varínsky 2011; Galko et al. 2014), ten však naša legislatíva nepovoľuje v oblastiach s vyšším stupňom ochrany lesov, poprípade povoľuje na výnimku, ktorá je však často udelená neskoro. Riešením v takýchto oblastiach môžu byť, napr. lapacie kôry (Galko et al. 2012; 2013a) alebo mechanické metódy ochrany sadeníc použitím špeciálneho vosku (Galko et al. 2013 b, c). Biologické metódy ochrany sadeníc, využitím entomopatogénnych organizmov sú metódy, ktorých účinnosť sa momentálne skúša na viacerých vedeckých pracoviskách v Európe.

V laboratóriách Strediska lesníckej ochrannárskej služby (ďalej LOS) sa taktiež zaoberáme s biologickou ochranou, kde jedným zo spôsobov je využitie entomopatogénnych húb. V predchádzajúcich 3 rokoch sme uskutočnili niekoľko pokusov s hubami, ako *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, či *Metarhizium anisopliae*. Ich cieľom bolo vybrať druh najagresívnejší voči imágam tvrdoňa smrekového. Najlepšie výsledky sme dosiahli s entomopatogénnou hubou *B. bassiana* a ďalšie pokusy preto venujeme práve tomuto druhu. Ich cieľom je v laboratórnych podmienkach zistiť koncentráciu spór danej huby dostatočnú pre úspešné infikovanie a zahubenie škodcu a tiež nájsť vhodný a účinný spôsob aplikácie tejto metódy v terénnych podmienkach. V príspevku prinášame výsledky z jedného opakovania takéhoto pokusu.

## PRIEBEH POKUSU

Pokus sme založili 11. 8. 2014 a použili sme naň imága tvrdoňa odchytené z lapacích kôr v lokalite Liptovská Teplička (LS Liptovská Teplička, OZ Liptovský Hrádok). Celkovo sme použili 150 jedincov v pomere pohlaví 1 : 1. Pre ošetrovanie jedincov hubou sme použili suspenziu spór v koncentráciách  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  spór na 1 ml suspenzie. Ošetrovanie spočívalo v namočení jedincov do suspenzie na dobu približne dvoch sekúnd. Pre zníženie povrchového napätia suspenzie, a teda lepšieho zmáčania imág tvrdoňov, sme použili 0,05 % roztok zmáčadla Tween 80. Po namočení nasledovalo ich osušenie na buničitej vate. Založili sme teda 5 pokusných skupín. Štyri skupiny podľa koncentrácie spór, v ktorých sme aplikovali hubu a jednu skupinu jedincov sterilnú, bez ošetrovania. Táto skupina slúžila ako kontrola. Každú skupinu tvorilo 15 samcov a 15 samíc. Tie sme umiestnili samostatne do Petriho misiek (obr. 1). Do misiek sme tiež umiestnili 2 ks navlhčenej buničitej vaty, ktorá udržiavala vzdušnú vlhkosť a slúžila aj ako zdroj vody pre tvrdone. Pri hodnoteniach sme sledovali úmrtnosť jedincov a či jej skutočnou príčinou bola infekcia hubou, čo sme pozorovali prerastaním uhynutých jedincov bielim mycéliom (obr. 2). Samotné hodnotenie priebehu pokusu sme vykonávali v trojdňových intervaloch. Prvé hodnotenie sme vykonali 14. 8. 2014. Spolu sme vykonali 12 hodnotení, v priebehu 36 dní trvania pokusu. Hodnotenie jednotlivých kontrol sme vykonávali podľa nasledovných stupňov:

- stupeň 1 – imágo živé
- stupeň 2 – mŕtve, bez prerastania
- stupeň 3 – mŕtve prerastené do 1/3
- stupeň 4 – mŕtve prerastené do 2/3
- stupeň 5 – mŕtve prerastené nad 2/3



Obr. 1. Dizajn pokusu (150 Petriho misiek)



Obr. 2. Imágo tvrdoňa prerastené hubou *B. bassiana*

Ako potravu pre imága tvrdoňov sme použili borovicové konáriky o priemere 7 – 10 mm a dĺžke približne 8 cm. Potravu sme menili každých 10 dní a na odobratých konárikoch sme merali zožranú plochu v mm<sup>2</sup>.

### Čiastkové výsledky

Najvyššiu úmrtnosť dosiahli jedince ošetrované najvyššou koncentráciou spór, teda 10<sup>8</sup>/1 ml suspenzie. V tejto testovanej skupine uhynuli všetky jedince, pričom až pri 14 z 15 jedincov každého pohlavia sa ako príčina úhynu potvrdila infekcia použitou hubou. So znižujúcou koncentráciou sa úmerne tento pomer znižoval. V skupine ošetrovanej koncentráciou 10<sup>7</sup>/1 ml suspenzie uhynulo po 14 jedincov z oboch pohlaví, pričom huba, ako príčina nebola potvrdená len pri jednej samici. Pri koncentrácii 10<sup>6</sup> uhynulo 10 samcov a 13 samíc, pričom u všetkých jedincov bola príčinou cieľová huba. Pri koncentrácii 10<sup>5</sup> uhynulo 6 samcov, z ktorých 4 v dôsledku infekcie a 8 samíc, všetky uhynuté v dôsledku infekcie. V kontrolnej skupine uhynul 1 samec a 1 samica, no ani pri jednom sa nepotvrdila prítomnosť hubovej infekcie. Nepodarilo sa nám určiť príčinu mortality jedincov, u ktorých sa neprejavila prítomnosť huby. Tieto údaje znázorňuje tabuľka 1.

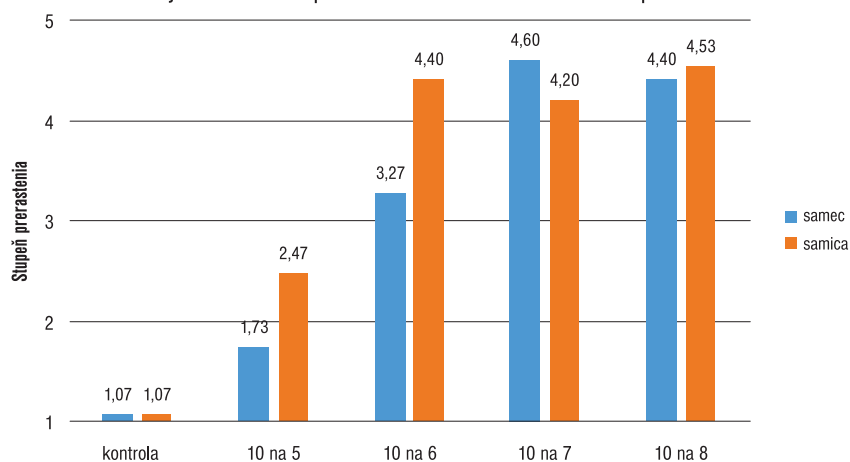
Tabuľka 1. Úmrtnosť jedincov tvrdoňa smrekového počas trvania pokusu (samce/samice)

Ošetrovanie	Kontrola	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
Mŕtve	1/1	6/8	10/13	14/14	15/15
Mŕtve a prerastené	0/0	4/8	10/13	14/13	14/14

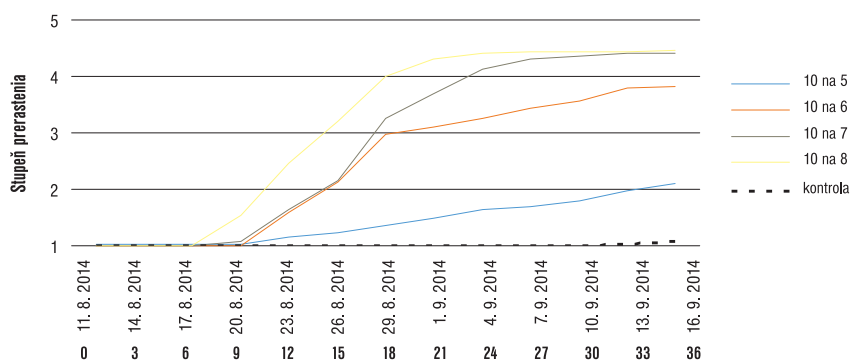
Pri vyššej koncentrácii spór je vyšší aj priemerný stupeň prerastania jedincov. Priemerná hodnota prerastania jedincov v kontrolnej skupine dosiahla 1,07 stupňa prerastania. V tejto skupine uhynuli 2 jedince, no hubová infekcia sa ani u jedného neprejavila. V skupine 10<sup>5</sup> spór dosiahol priemerný stupeň prerastania hodnotu 2,1 bez ohľadu na pohlavie. V tejto skupine už došlo k infekcii jedincov hubou, avšak mortalita a infekcia nebola dostatočne vysoká. Tá postupne so zvyšujúcou sa koncentráciou spór stúpala a stupeň prerastania v skupine 10<sup>6</sup> dosiahol hodnotu 3,8; v skupine 10<sup>7</sup> hodnotu 4,4 a v skupine 10<sup>8</sup> spór na 1 ml suspenzie dosiahol hodnotu 4,5. V tejto skupine bola dosiahnutá najvyššia mortalita a infekcia hubou. S výnimkou dvoch, sa infekcia potvrdila na všetkých pozorovaných jedincoch. Príčinou môže byť úspešnosť vyklíčenia a prerastania väčšieho počtu spór do tela jedinca, ako pri nižšej koncentrácii. Uvedené hodnoty priemerných stupňov prerastania imág hubou podľa pohlavia sú uvedené na obrázku 3.

Priemerný priebeh úmrtnosti a prerastania jedincov nám znázorňuje obrázok 4. Z obrázka môžeme vyčítať, že v kontrolnej skupine sa priebeh udržuje na 1. stupni prerastania a až ku koncu pokusu mierne narastá v dôsledku úhynu 2 jedincov. V skupine s koncentráciou spór 10<sup>5</sup> priebeh plynulo stúpa, avšak tento priebeh bol veľmi pomalý a na

konci pokusu priemer stupňa prerastania len o niečo presahuje hodnotu 2. Je predpoklad, že pri predĺžení pokusu, by tieto hodnoty stúpali, avšak toto stúpanie by aj naďalej bolo málo výrazné. V skupine s koncentráciou spór  $10^6$  je priebeh o niečo výraznejší, no v polovici trvania pokusu sa spomaľuje a pokračuje rovnobežne s priebehom predchádzajúcej skupiny, i keď s vyššími hodnotami. Ku koncu pokusu sa priemerné hodnoty prerastania v tejto skupine približujú k 4. stupňu. Naproti tomu v skupinách s vyššou koncentráciou bol priebeh prerastania výrazný a jedince podliehali infekcii rýchlejšie. V skupine s koncentráciou  $10^7$  bola maximálna hodnota dosiahnutá na 33. deň, čo je v podstate na konci trvania pokusu. V skupine s koncentráciou spór  $10^8$  boli všetky jedince uhynuté už v polovici trvania pokusu, t. j. na 18. deň od založenia pokusu a maximum priemeru prerastania bolo dosiahnuté na 27. deň, kedy bola už väčšina jedincov prerastená 5. stupňom hodnotiacej stupnice. Tento fakt bol s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobený väčšou úspešnosťou infikovania jedincov v skupinách s väčšou koncentráciou spór.



Obr. 3. Výsledné priemerné hodnoty stupňov prerastania imág tvrdého smrekového podľa pohlavia a použitej koncentrácie spór

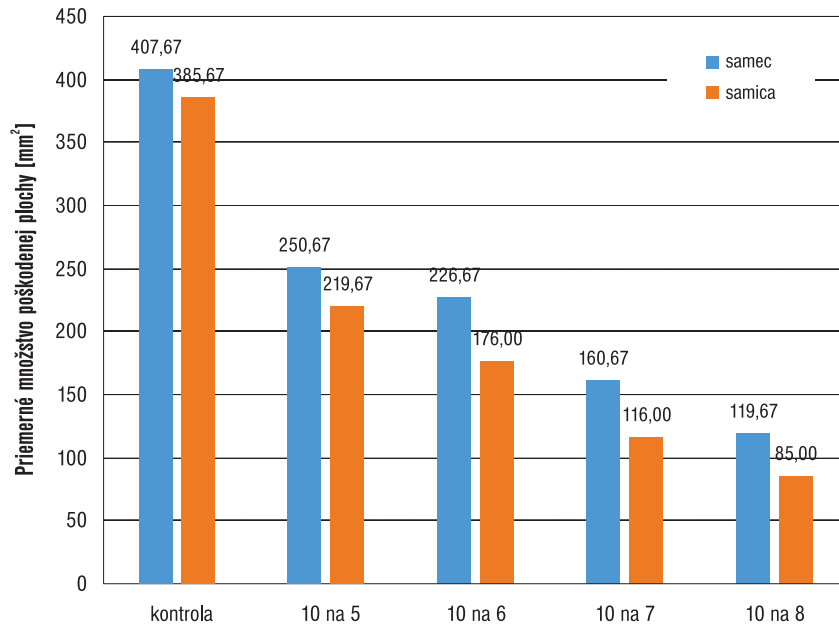


Obr. 4. Priemerný priebeh prerastania imág tvrdého smrekového oboch pohlaví podľa použitej koncentrácie spór

V pokuse sme sa tiež zameriavali na veľkosť plochy, ktorú jedince dokážu poškodiť. Priemerná plocha použitej potravy pre jedno imágo tvrdého bola  $1\,760\text{ mm}^2$ . Potrava sa menila štyrikrát a pri výmene sme na starej potrave merali ohlodanú/zožranú plochu. Obrázok 5 znázorňuje priemerný podiel plochy potravy ( $\text{mm}^2$ ), ktorú jedinec tvrdého poškodil za obdobie trvania pokusu.

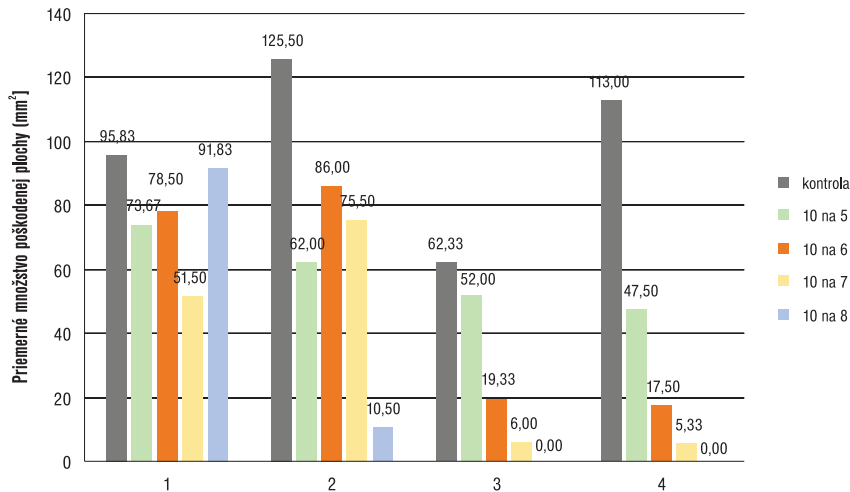
Priemerné údaje za obe pohlavia sú nasledovné. Kontrolná skupina, kde jedinec priemerne poškodil  $396,67\text{ mm}^2$  plochy, o vyše 1/3 prevyšuje skupinu s koncentráciou spór  $10^5$ , kde jedinec priemerne poškodil  $235,17\text{ mm}^2$  plochy. Priemerná poškodená plocha klesá nepriamo úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou spór. V skupine s koncentráciou  $10^6$  je to  $201,33\text{ mm}^2$ , v skupine  $10^7$  je to  $183,33\text{ mm}^2$  a v skupine  $10^8$  len  $102,33\text{ mm}^2$  jedincom priemerne poškodené plochy.

Očakávali sme, že samice budú veľkosťou poškodenej plochy prevyšovať samce čo uvádzajú aj viaceré literárne zdroje, výsledky sú však opačné. Samce v priemere poškodili väčšiu plochu ako samice, tieto rozdiely však nie sú výrazné. Čo sa týka priemerne poškodenej plochy v jednotlivých odberoch po jej výmene (obr. 6), tak ako sme predpokladali, kontrolná skupina vo všetkých odberoch prevyšuje skupiny ošetrované hubou. V prvom odbere nie je rozdiel medzi jednotlivými skupinami výrazný, je však vidno, že skupina s koncentráciou spór  $10^8$  prevyšuje priemerným poškodením ostatné hubou ošetrované skupiny. Môže to byť spôsobené už začínajúcou infekciou imág, ktoré zrejme cítia, že sú neja-



Obr. 5. Priemerné množstvo poškodenej plochy tvrdoňom podľa pohlavia a použitej koncentrácie spór za všetky výmeny potravy

kým spôsobom „choré“ a ich prirodzenou reakciou môže byť prijímanie väčšieho množstva potravy. Tento predpoklad budeme overovať na viacerých pokusoch. V druhom odbere sa oproti ostatným skupinám výrazne znížila priemerná poškodená plocha v skupine s koncentráciou spór  $10^8$ , čo už bolo spôsobené rýchlou mortalitou väčšiny jedincov. Skupiny  $10^6$  a  $10^7$  v tomto odbere prevyšujú skupinu  $10^5$ . Pravdepodobne sa v nich začali prejavovať známky infekcie a reagovali tak, ako jedince v skupine  $10^8$ , zvýšeným príjmom potravy. V ďalších dvoch odberoch už v skupine  $10^8$  nie je zaznamenaná žiadna spotreba potravy v dôsledku úhynu všetkých jedincov. V ostatných ošetrených skupinách je už oproti kontrolnej skupine viditeľný značný pokles množstva priemerne poškodenej plochy, ktoré klesá so zvyšujúcou sa koncentráciou spór. Tento fakt je samozrejme taktiež spôsobený mortalitou jedincov.



Obr. 6. Priemerné množstvo poškodenej plochy tvrdoňom, podľa použitej koncentrácie spór a podľa jednotlivých výmen potravy (1 – 4)

## ZÁVER

Z výsledkov môžeme usúdiť, že koncentrácia spór použitá na ošetrenie imág, mala významný vplyv na úspešnú mortalitu imág tvrdoňa oboch pohlaví. Tento fakt je spôsobený schopnosťou spór entomopatogénnych húb prerásť do hostiteľa len cez mäkké časti jeho tela a zvyšujúcou sa koncentráciou spór, sa tiež zvyšuje pravdepodobnosť, že tieto spóry sa na takéto miesta dostanú a úspešne vyklíčia. Z toho môžeme skonštatovať, že využitie entomopatogénnych

húb má vysoký potenciál v úspešnom boji proti tvrdoňovi smrekovému, avšak kritickým faktorom pre úspešnosť tejto biologickej metódy je použitá koncentrácia spór huby. V nasledujúcich laboratórnych pokusoch sa budeme venovať tiež rôznym iným spôsobom aplikácie huby *B. bassiana*, ktorých cieľom bude nájsť efektívnu metódu aplikácie ošetrovania aj v terénnych podmienkach.

## POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka výskumnému projektu „Výskum efektívneho využívania environmentálneho, ekonomického a sociálneho potenciálu lesov na Slovensku II“, financovaného z prostriedkov štátneho rozpočtu cez kontrakt medzi MPRV SR a NLC z rozpočtovej kapitoly MPRV SR (prvok 08V0301) a spolufinancovaného podnikom Lesy SR, š. p. (75 %) a vďaka finančnej podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt „Progresívne technológie ochrany lesných drevín juvenilných rastových štádií“ (ITMS: 26220220120) (25 %). Ďalej bola táto práca podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0707-12.

## LITERATÚRA

- Galko, J., Gubka, A., Vakula, J., 2012: Praktické skúsenosti s využitím lapacích kôr na zníženie škôd spôsobených tvrdoňom smrekovým na mladých výsadbách ihličnatých drevín. In Kunca, A. (ed.): Aktuálne problémy v ochrane lesa 2012, Zvolen, NLC, s. 60–64.
- Galko, J., Ondruš, M., Rell, S., Gubka, A., Vakula, J., 2013 a: Využitie lapacích kôr pri monitoringu populačnej hustoty tvrdoňa smrekového a lykokazov rodu *Hylastes*. In: Kunca, A. (ed.): Aktuálne problémy v ochrane lesa 2013, Zborník referátov z 22. medzinárodnej konferencie konanej 25. – 26. 4. 2013 v Novom Smokovci, Zvolen, NLC, s. 142–145.
- Galko, J., Kunca, A., Gubka, A., Vakula, J., 2013 b: Predstavenie nového spôsobu ošetrovania sadeníc voskom ako účinnej ochrany pred tvrdoňom smrekovým. In: Kunca, A. (ed.): Aktuálne problémy v ochrane lesa 2013, Zborník referátov z 22. medzinárodnej konferencie konanej 25. – 26. 4. 2013 v Novom Smokovci, Zvolen, NLC, s. 86–89.
- Galko, J., Rell, S., Kunca, A., 2013 c: Voskovanie sadeníc na Slovensku ochrana pred tvrdoňom smrekovým. In: Lesnícka práce, 92(9): 24–25.

---

Ing. Slavomír Rell, Ing. Juraj Galko, PhD.

Národné lesnícke centrum - Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Lesnícka ochranná služba, Lesnícka 11, SK – 969 23 Banská Štiavnica, e-mail: rell@nlcsk.org

Ing. Marek Barta, PhD.

Arborétum Mlyňany SAV, Vieska nad Žitavou 178, SK – 951 52 Slepčany, e-mail: marek.barta@savba.sk