

ČIASTKOVÉ VÝSLEDKY LABORATÓRNEHO TESTOVANIA HUBY *BEAVERIA BASSIANA* NA IMAGÁCH TVRDOŇA SMREKOVÉHO

Slavomír Rell • Juraj Galko • Michal Lalík

Rell, S., Galko, J., Lalík, M.: Partial results of a laboratory testing of *Beauveria bassiana* on *Hylobius abietis* adults. APOL, 2019, vol. 1, no. 1, p. 90–95.

Abstract: The large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) (Coleoptera: Curculionidae) is considered one of the most important insect pests of newly planted coniferous seedlings. The aim is to use nature-friendly methods in forest protection, and one of them is the use of entomopathogenic fungi. In this paper, several conidia concentrations (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 conidia/ml of water suspension) of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* were tested. This strain of fungus was isolated from a dead specimen of pine weevil caught in nature. The best results were achieved with a concentration of 10^8 conidia/ml, where it took 18 days on average to kill the host, and at the end of the experiment 100% mortality was reached only in this group. In the group of 10^7 conidia/ml, it took 24 days on average to kill the host, while in lower concentration groups it was from 30 to 34 days on average, with a significantly lower mortality rate.

Key words: the large pine weevil; *Hylobius abietis*; entomopathogenic fungi; maturation feeding

Úvod

Tvrdoň smrekový (*Hylobius abietis* L.) (Coleoptera: Curculionidae) je v Európe považovaný za jedného z najvýznamnejších hmyzích škodcov novovysadených ihličnatých kultúr (Eidmann, 1974; Nordlander, 1987). Samičky sú synovigénne a teda dozrievanie vajíčok a ich kladenie je závislé na zdrojoch získaných potravou (Munro, 1928; Nordenhem, 1989; Leather et al., 1999; Örlander et al., 2000; Wainhouse et al., 2004). Imága preto vykonávajú tzv. zrelostný žer, ohlodávaním kôry na kmienkoch ihličnatých sadeníc a extrémne poškodzujú sadenice po umelej obnove porastov, ktoré v dôsledku poškodenia hynú. Ku vytváraniu priaznivých podmienok pre tvrdoňa prispievajú rozsiahle vetrové a lykožrútové kalamity. Plochy po kalamitách je potrebné umelo obnoviť, čo sa časovo často prelína s liahnutím nových imág tvrdoňa, ktoré potrebujú vykonať 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. Predovšetkým po roku 2010 sa poškodenie ihličnatých sadeníc výrazne zvýšilo a ročne tvrdoň poškodí stovky hektárov ihličnatých výsadiel (Galko et al., 2013a, b, c, 2014). Slabé poranenie nie je pre sadenicu smrteľné a rany sa pomerne dobre hoja. Pri opakovanom intenzívnom poškodení môže rýchlo dôjsť k úhynu celých výsadiel. Ku bežným metódam ochrany lesa patrí najmä chemické ošetrenie sadeníc (Varínsky, 2011; Galko et al., 2014) a používanie lapacích kôr (Galko et al., 2012, 2013a, 2014). Nevýhodou chemického ošetrenia je nutnosť jeho opakovania, pre jeho relatívne krátkodobú účinnosť a nežiadúca záťaž životného prostredia (Modlinger et al., 2018). Navyše sa škody vyskytujú častokrát v oblastiach s tretím a vyšším stupňom ochrany prírody, kde sa môžu použiť pesticídy iba na výnimku, čo je problematický a zdĺhavý proces. V týchto oblastiach prichádza do úvahy použitie lapacích kôr (Galko et al., 2012, 2013a), voskovaných sadeníc (Galko et al., 2013c) a tiež využitie biologických metód (Galko et al., 2013a). Patrí sem aj metóda s využitím entomopatogénnych húb, s ktorými bola založená séria niekoľkých experimentov. Cieľom bolo vyselektovať entomopatogénnu hubu a koncentráciu jej konídií, schopnú zlikvidovať hostiteľa (imágo tvrdoňa) v čo najkratšom čase. V tejto práci sú prezentované čiastkové výsledky jedného experimentu.

Metodika

Experiment prebehol v roku 2013. Na základe výsledkov predchádzajúcich experimentov, v ktorých vyšiel ako najúčinnjší kmeň huby *Beauveria bassiana* kultivovaný z uhynutého imága tvrdoňa, odchyteneho z prírody (2012), bol tento experiment zameraný na testovanie rozdielnych koncentrácií konidií tejto huby (tab. 1). Použitých bolo 150 ks imág v pomere pohlaví 1:1. Infikovanie imág prebehlo mokrým spôsobom, namočením imág do vodnej suspenzie konidií po dobu 5 sekúnd. Pre narušenie povrchového napätia a lepšie zmáčanie imág, bolo do suspenzie pridané zmáčadlo Tween 80 v koncentrácii 0,05 %. Po infikovaní boli imága umiestnené jednotlivo do Petriho misiek s 2 kusmi navlhčenej buničitej vaty (asi 4 × 4 cm), pre udržanie vlhkosti v Petriho miskách a tiež ako zdroj vody pre tvrdone. Ako zdroj potravy boli použité borovicové konáriky (*Pinus sylvestris*) približne 8 cm dlhé a 0,7 cm hrubé, odobraté z jedného jedinca borovice. Konáriky v Petriho miskách boli vymieňané každých 10 dní. Experiment prebehol v laboratóriu Centra excelentnosti biologických metód ochrany lesa (CEBIMOL) na Stredisku lesníckej ochrannárskej služby. Teplota vzduchu sa pohybovala v rozmedzí 18 – 24 °C a pri relatívnej vlhkosti vzduchu 50 % r.v.v. Experiment bol hodnotený v štvordňových intervaloch vizuálnou obhliadkou každého imága. Sledovaná bola mortalita imág a stupeň prerastania hubou podľa päť bodovej stupnice (tab. 2), od živého po hubou plne prerastené imágo (obr. 1). Mortalita neprerastených imág bola hodnotená ich jemným pritlačením pinzetou, na ktoré živé imága reagovali pohybom. Pinzeta bola sterilizovaná po každom hodnotenom imágu.

Tabuľka 1. Dizajn ošetrovaní imág tvrdoňa v experimente s entomopatogénnymi hubami

Table 1. Design of pine weevil adults treatment in entomopathogenic fungi experiment

Ošetrovanie	Počet použitých jedincov	
Kontrola	15♂ + 15♀	30
<i>B. bassiana</i> 10 ⁵ konidií/ 1 ml	15♂ + 15♀	30
<i>B. bassiana</i> 10 ⁶ konidií/ 1 ml	15♂ + 15♀	30
<i>B. bassiana</i> 10 ⁷ konidií/ 1 ml	15♂ + 15♀	30
<i>B. bassiana</i> 10 ⁸ konidií/ 1 ml	15♂ + 15♀	30

Tabuľka 2. Stupnica hodnotenia prerastania imág tvrdoňa smrekového hubou

Table 2. Scale for evaluation of pine weevil adults overgrowth by fungus

Stupeň prerastania	Stav
1	živé imágo
2	mŕtve imágo, bez prerastania hubou
3	mŕtve imágo, prerastené do 1/3 povrchu tela
4	mŕtve imágo, prerastené do 2/3 povrchu tela
5	mŕtve imágo, prerastené nad 2/3 povrchu tela



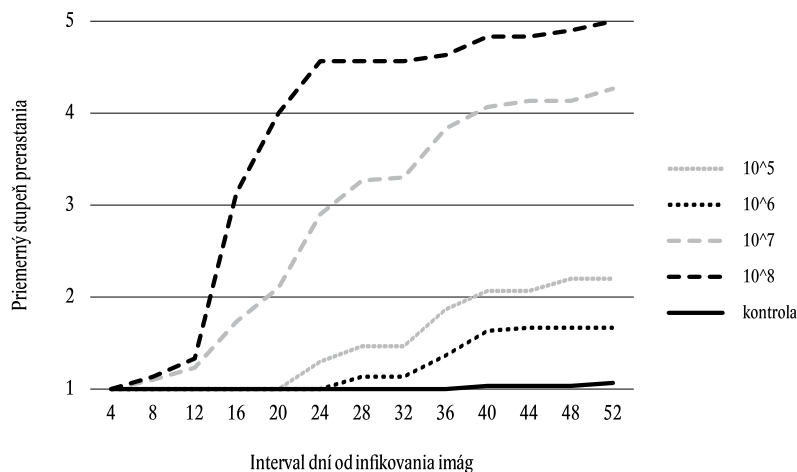
Obrázok 1. Stupne prerastania imága tvrdoňa hubou (3. až 5. stupeň) (Foto: Rell)
Figure 1. Degrees of overgrowth of pine weevil adult by fungus (3. to 5. degree) (Photo: Rell)

Výsledky

Rozdiel v účinnosti použitých koncentrácií konidií sa prejavil pri porovnaní priebehu prerastania imág hubou (obr. 2). V skupinách s vyššou koncentráciou (10⁷ a 10⁸ konidií/ 1ml.) bola zaznamenaná mortalita už pri druhom hodnotení (8 dní od infikovania). Pri poslednom hodnotení (52 dní od infikovania) bola zaznamenaná 100 % mortalita v skupine s najvyššou koncentráciou konidií (10⁸ konidií/ 1 ml) a k usmrteniu imága došlo priemerne po 18 dňoch. V skupine s koncentráciou 10⁷ konidií/ 1 ml

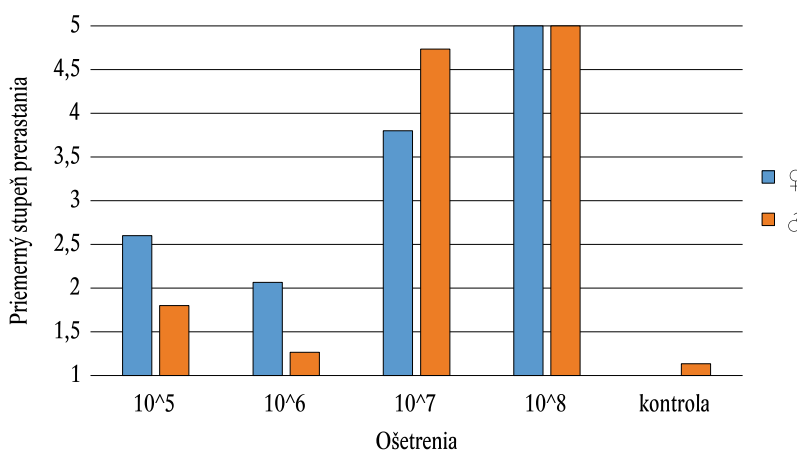
bola zaznamenaná 87 % mortalita a k usmrteniu imága došlo priemerne po 24 dňoch. V skupinách s nižšou koncentráciou bola zaznamenaná 3 až 6-násobne nižšia mortalita ako v skupine s koncentráciou 10^8 konidií/ 1 ml a usmrtenie imága trvalo priemerne 30 až 34 dni od ich infikovania.

Priemerný stupeň prerastania imág použitými koncentraciami, rozdelený podľa pohlavia znázorňuje obrázok 3. V skupinách s nižšou koncentraciou konidií boli náchylnejšie samice, pri koncentrácii 10^7 konidií/ 1 ml je tento výsledok opačný. Pri koncentrácii 10^8 konidií/ 1 ml bol výsledok rovnaký, nakoľko uhynuli všetky imága. Počas experimentu bola mortalita zaznamenaná aj v kontrolnej skupine (2 imága), avšak prítomnosť huby sa na týchto imágach nepotvrdila.



Obrázok 2. Priebeh priemerného stupňa prerastania imág tvrdoňov smrekových infikovaných testovanými koncentraciami konidií huby *B. bassiana*

Figure 2. Progression of the mean degree of overgrowth of large pine weevil adults infected with tested conidia concentrations of *B. bassiana* fungus



Obrázok 3. Priemerný stupeň prerastania imág tvrdoňa smrekového pri rozdielnych koncentraciách konidií huby *B. bassiana* na konci experimentu, rozdelený podľa pohlavia

Figure 3. Mean degree of overgrowth of *H. abietis* adults by *B. bassiana* fungus at different conidia concentrations at the end of the experiment, divided to sexes

Diskusia a záver

V súčasnosti je na trhu niekoľko prípravkov na báze entomopogénnych húb používaných v poľnohospodárstve ako napr. Melocont® a Granmet®, ktoré ako účinnú látku používajú *Beauveria brogiartii* a *Metarhizium anisopliae*. Vo svete už roky prebiehajú experimenty s entomopogénnymi hubami, ako s potenciálne účinným prostriedkom v boji proti škodám aj v lesníctve. Ansari & Butt (2012) sa zaoberali entomopogénnymi hubami *Metarhizium robertsii*, *M. brunneum* a *B. bassiana* a sledovali ich vplyv na rôzne vývojové štádiá tvrdoňa (larvy, kukly imága). Ich laboratórne experimenty do-

kázali, že všetky spomenuté vývojové štádiá tvrdoňa sú citlivé na hubové patogény a hynú niekoľko dní po inokulácii, pričom larvy a kukly sú náchylnejšie. V tejto práci bolo ako testovacie štádium použité imágo tvrdoňa, ktoré je možné získať omnoho jednoduchšie ako iné vývojové štádiá, odchytom lapacími zariadeniami. Zo štyroch testovaných koncentrácií konídií huby *B. bassiana*, vyšla signifikantne vyššia účinnosť koncentrácií 10^7 , 10^8 oproti kontrole, a koncentraciami 10^5 , 10^6 konídií. Ansari & Butt (2012) zistili, že aj nízke koncentrácie konídií sú schopné spôsobiť usmrtenie imág tvrdoňa, čo sa potvrdilo aj v tejto práci, avšak v skupinách s nižšou koncentráciou bola zaznamenaná 3 až 6 násobne nižšia mortalita. Doberski (1981) odhadol, že koncentrácia menej ako 100 konídií *M. robertsii* a *B. bassiana* môže spôsobiť infekciu imágu podkôrnika brestového (*Scolytus scolytus*, Fabricius., Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), kŕmiacom sa na kotúčoch kôry namočených v suspenzii konídií. Podobne sa infikujú aj imága tvrdoňa, kŕmiace sa kôrou ošetrovanou *B. bassiana*, ale čas prežitia imág je až 81,8 dní (Wegensteiner & Fuhrer, 1988). V tejto práci bol podobne sledovaný čas prežívania imág po ich infikovaní. V skupinách s nižšou koncentráciou konídií, imága prežívali priemerne 30 až 34 dní od ich infikovania a pri skupinách s vyššou koncentráciou to bolo 18 až 24 dní. Podľa očakávania sa so zvyšujúcou koncentráciou konídií, zvyšovala aj účinnosť ošetrovania. Spôsobené to môže byť tým, že pri nižších koncentráciách vyklíči a úspešne imágo prerastie menší počet konídií a imágo je tak schopné odolávať dlhšiu dobu. Čo sa týka ochrany sadeníc pred žerom tvrdoňa, je potrebné podotknúť, že len 3 imága žerúce na sadenici, ju dokážu za 6 dní okružkovať, čo má pre takúto sadenicu fatálne následky (Girling et al., 2010). Rýchlosť akou dokážeme ošetrovaním eliminovať škodcu zohráva dôležitú úlohu pri znížení, prípadne zabránení škôd, ktoré môže spôsobiť a teda aj pri záchrane novovysadených ihličnatých kultúr.

Výhodou používania entomopatogénnych húb je ekologickosť, sú prirodzenou súčasťou prírodného prostredia a boli pozorované aj na podkôrných druhoch, najčastejšie na *Ips typographus* (Kirschner, 2001; Wegensteiner, 2004; Wegensteiner et al., 2007, a, b, 2015, a, b) a *Ips sexdentatus* (Draganova et al., 2010, Takov et al., 2012). Nepredstavujú nebezpečie pre vtáky, ryby a cicavce (Zimmermann, 1993, 2007) a nepredstavujú riziko pre ľudí alebo životné prostredie (Strasser et al., 2000; Dabro & Thomas, 2009). Výhodou je tiež ich schopnosť produkovať nové konídiá na uhynutých jedincoch tvrdoňa. Konídiá sú tiež schopné udržať si za priaznivých podmienok (v pňoch, v pôde) klíčivosť aj niekoľko mesiacov (Ansari & Butt, 2012), čo závisí aj od teploty, v ktorej sú „uskladnené“. Ansari & Butt (2011) pozorovali klíčivosť konídií *M. anisopliae*, ktoré uskladnili po dobu 4 mesiacov pri teplote 4 a 20 °C. Zistili, že konídiá uskladnené pri nižšej teplote si životnosť udržia lepšie, ako konídiá uskladnené pri vyššej teplote.

V tejto práci bola laboratórne potvrdená účinnosť testovaného kmeňa huby *B. bassiana* izolovaného priamo z uhynutého imága tvrdoňa odchytého z prírody. Momentálne pracujeme na vývoji a patentovej ochrane nosiča, ktorý by zabezpečil prežívanie konídií a udržanie ich dlhodobej účinnosti aj v terénnych podmienkach.

Podakovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore z Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-16-0031 Výskum alternatívnych metód ochrany ihličnatých sadeníc pred hmyzími škodcami a č. APVV-15-0531 Webová GIS aplikácia pre monitoring výskytu škodlivých činiteľov v lesoch Slovenska. Ďalej bol článok podporený projektom „Výskum a vývoj na podporu konkurencieschopnosti slovenského lesníctva – SLOV-LES“, projekt financovaný z rozpočtovej kapitoly MPRV SR (prvok 08V0301).

Literatúra

Ansari, M. A., Butt, T. M., 2011: Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Journal of applied microbiology*, 110(6): 1460–1469.

- 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.
- Darbro, 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.
- Doberski, J. W., 1981: Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(2): 195–200.
- Draganova, S., Takov, D. And 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.
- Eidmann, H. H., 1974: *Hylobius* Schonh. In: Schwenke, W. (ed.). *Die Forstschadlinge Europas*. 2. Kafter. Paul Parey Hamburg und Berlin, p. 275–293.
- 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, p. 60–64.
- Galko, J. et al., 2013a: Nové metódy ochrany ihličnatých sadeníc pred poškodením tvrdoňom smrekovým. In: *Les & Letokruhy*, 69(1–2): 22–23.
- Galko, J., Kunca, A., Vakula, J., Rell, S., Gubka, A., Nikolov, Ch., Zúbrik, M., 2013b: Usmernenie Lesníckej ochrannárskej služby ku kontrole, ochrane a obrane sadeníc pred poškodením tvrdoňom smrekovým a lykokazmi rodu *Hylastes*. Zvolen, Národné lesnícke centrum, 21 p. Dostupné na internete: <http://www.los.sk>
- Galko, J., Ondruš, M., Rell, S., Gubka, A., Vakula, J., 2013c: 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, p. 142–145.
- Galko, J., Rell, S., Kunca, A., Maľová, M., Nikolov, Ch., Longauerová, V., 2014: Výskum vybraných metód a spôsobov ochrany sadeníc vo výsadbách pred lykokazmi a tvrdoňom smrekovým. In: Kunca, A. (ed.): *Aktuálne problémy v ochrane lesa 2014*, zborník referátov z 23. medzinárodnej konferencie konanej 23. – 24. 4. 2014 v Kongresovom centre Kúpeľov Nový Smokovec, a. s., Zvolen, Národné lesnícke centrum, p. 85–94.
- Girling, R. D., Ennis, D., Dillon, A. B., Griffin, C. T., 2010: The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3): 195–202.
- Kirschner, R., 2001: Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in central Europe. *Trichomycetes and other fungal groups*, p. 175–196.
- Leather, S. R., Day, K. R., Salisbury, A. N., 1999: The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): a problem of dispersal? *Bulletin of Entomological Research*, 89: 3–16.
- Munro, J. W. 1928: The biology and control of *Hylobius abietis* L. *Forestry*, 2: 31–39.
- Nordenhem, H., 1989: Age, sexual development, and seasonal occurrence of pine weevil *Hylobius abietis* (L.). *Journal of applied entomology*. 108(1–5): 260–270.
- Nordlander, G., 1987: A method for trapping *Hylobius abietis* (L.) with a standardized bait and its potential for forecasting seedling. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2: 199–213.
- Örlander, G., Nordlander, G., Wallertz, K., Nordenhem, H., 2000: Feeding in the crowns of Scots pine trees by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 15: 194–201.

- 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*, *Tolytocladium* 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.
- Varínsky, J., 2011: Používanie prípravkov na ochranu rastlín v lesoch. Zvolen, NLC, 32 p.
- Wainhouse, D., Boswell, R., Ashburner, R., 2004: Maturation feeding and reproductive development in adult pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *Bulletin of Entomological Research*, 94: 81–87.
- Wegensteiner, R., Fuhrer, E., 1988: Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Entomophaga*, 33: 339–349.
- 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. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 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*, 3: 219–232.
- 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:

Ing. Slavomír Rell, PhD., Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Michal Lalík
Národné lesnícke centrum - Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Lesnícka ochrannárska služba,
Lesnícka 11, SK – 969 01 Banská Štiavnica
e-mail: rell@nlcsk.org