

POUŽITIE NOSIČA ENTOMOPATOGÉNNEJ HUBY *BEAUVERIA BASSIANA* PROTI TVRDOŇOVI SMREKOVÉMU (*HYLOBIUS ABIETIS*)

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

Lalík, M., Galko, J., Rell, S., Kunca, A., Zúbrik, M., Vakula, J., Gubka, A., Nikolov, Ch., Leontovyč, R., Holuša, J.: Using a carrier of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against the large pine weevil *Hylobius abietis*. APOL, 2021, vol. 2, no. 1, p. 63–69.

Abstract: *Hylobius abietis* is an important pest of coniferous seedlings. In plantings, as well as in natural rejuvenation, it can cause significant damages. The adult weevils cause damage by eating the bark of seedlings around the stem, thus cut off the flow of water and nutrients, resulting in its demise. Insecticides are usually used as a form of protection against pine weevils. These are gradually reduced due to their impact on the environment. Therefore, it is necessary to look for new protection measures against pine weevil using biological methods. One of the possibilities is using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. We have developed a fungal carrier on which the fungus can survive and form spores for several months. The main objectives were to test the carrier of the entomopathogenic fungus *B. bassiana*, whether it can successfully eliminate the pine weevil, and whether attracting with various baits affects the mortality of the imagines. The carriers were placed in three blocks (*attractant, bark, carrier*), and the control block without carriers. The following week, ground traps were placed on the research site, into which the beetles were caught. After capture, the adults were placed in Petri dishes. Beetle mortality caused by an entomopathogenic fungus was then recorded. The highest mortality (62%) was at the “bark” block. On the “attractant” block, the mortality was 51%, and the “carrier” block 42%. In the control block, the mortality of the image caused by the fungus was 18%.

Key words: *Hylobius abietis*; entomopathogenic fungus; *Beauveria bassiana*; carrier

Úvod

Tvrdoň smrekový *Hylobius abietis* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) je významným lesným škodcom rozšíreným v celej Európe a Ázii (Långström & Day 2004, Lalík et al. 2021a). Bol považovaný za škodcu mladých ihličnatých lesných porastov od začiatku minulého storočia (Trägårdh 1913). Imága sú škodcami mladých ihličnatých sadeníc (Stoakley & Heritage 1990; Wallertz et al. 2006; Thorpe & Day 2008; Gradinariu et al. 2012), ale živia sa aj koreňmi alebo vetvami starších ihličnatých stromov (Eidmann 1974; Örländer et al. 2000; Wallertz et al. 2006). Odhaduje sa, že ročne spôsobí škody v hodnote 120 mil. € (Lalík et al. 2021a). Populácia *H. abietis* je závislá na množstve čerstvých pňov (Långström & Day 2004). Množstvo čerstvých pňov vhodných na vývoj sa zvyšuje z dôvodu vetrových a lykožrúťových kalamít (Kunca et al. 2016), ktoré vytvárajú viac biotopov na rozmnožovanie *H. abietis* (mŕtve a odumierajúce stromy) (Nordlander 1987). Je množstvo druhov ochrany sadeníc, ktoré sa môžu použiť proti tomuto škodcovi (Lalík et al. 2021a).

Entomopatogénne huby (EPH) sú prírodnými antagonistami článkonožcov, ktoré pomáhajú pri kontrole hostiteľskej populácie a pri prevencii vzniku ohnísk (Vega et al. 2012). Uskutočnil sa rozsiahly výskum použitia EPH ako perspektívnych biokontrolných látok hmyzích škodcov v poľnohospodárstve a lesníctve (Lacey et al. 2015) a niektoré kmene boli úspešne licencované a komercializované (De Faria 2007; Reddy 2013). Vykazujú značný potenciál na kontrolu rôznych lesných škodcov (Augustyniuk-Kram & Kram 2012).

O EPH je známe, že dokázu nakaziť hmyz takmer všetkých druhov a vývojových štádií, najmä Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera a Hymenoptera (Ramanujam et al. 2014; Khan & Ahmad 2015). Predpokladá sa, že samotná huba *Beauveria bassiana* dokáže zabiť viac ako 750 rôznych druhov hmyzu (Ghikas et al. 2010). Je dokázané, že faktory prostredia ovplyvňujú prežívanie entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Najviac limitujúcim faktorom na prežívanie spór je slnečné žiarenie (Posadas et al. 2012). Ďalším limitujúcim faktorom na prežívanie konídií je teplota maximálna približne 30 – 38 °C, v závislosti od testovaných izolátov (Hallsworth & Magan 1999). V Európe sa niekoľko výskumov zameralo na výskyt EPH v populácii *H. abietis* a druhy výskytu rodov *Beauveria* a *Metarhizium*, ktoré boli zistené od lariev až po imága. Vo všeobecnosti sú huby spojené s populáciou *H. abietis* na konštantnej, ale relatívne nízkej úrovni (Williams et al. 2013; Barta et al. 2019). Výsledky predchádzajúcich a nedávnych pokusov o použitie EPH proti *H. abietis* v laboratóriách boli buď nekonzistentné alebo nie príliš sľubné (Williams et al. 2013; Ansari & Butt 2012; McNamara et al. 2018). Napriek tomu sa predpokladá, že huby majú potenciál na úspešnú implementáciu do integrovaného systému, ktorý rieši problém poškodenia sadeníc *H. abietis*. Realizovateľnosť a udržateľnosť ich použitia ako kontrolných činiteľov *H. abietis* v teréne závisí od výberu kmeňov húb, formulácií inokula a aplikačných techník (pers. obs.). Jednou z možností aplikácie je nainfikovať EPH na nosič, v ktorom dokáže rásť a produkovať spóry. Na takéto nosič sme v roku 2019 podali Slovenskú patentovú prihlášku PP-79-2019 a v roku 2020 bola na tento nosič podaná medzinárodná patentová prihláška PCT/SK2020/050007. Tento nosič s hubou *B. bassiana* a s vhodným atraktantom na prilákanie *H. abietis* ukazuje ako dobrý nástroj na ciele znížovanie populácie (Lalík et al. 2021b).

V tomto príspevku sme sa zamerali na praktické využitie vyvinutého nosiča entomopatogénnych húb a skúmanie jeho vplyvu na populáciu tvrdoňa smrekového.

Materiál a metodika

Experiment bol založený na LS Liptovská Teplička (48.957583, 20.112700) v nadmorskej výške 990 m n. m., s juhozápadnou expozíciou. Zastúpenie smreka obyčajného bolo 100 %. Holiny vznikli po kalamitnej ťažbe na jeseň v roku 2018. Na výskumnú plochu boli umiestnené nosiče entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Umiestnenie nosičov do terénu bolo 17. júla 2019. Zber imág zo zemných pascí bol 23. – 26. júla 2019. Zber prebiehal dvakrát za deň, aby sme zamedzili dlhému pobytu imág spolu v pasci, a tým sekundárnej infekcii. Imága sme vybrali z pascí za pomocou pinzety a po každom odchytenom imágu sme pinzetu vydezinfikovali so 70 % etylalkoholom a utreli suchou buničinou. Imága zozbierané zo zemných pascí boli po vybratí umiestňované do Petriho misiek. Do jednej misky boli vložené maximálne 3 imága tvrdoňa smrekového. V miskách bola navlhčená buničina o veľkosti 2 × 2 cm, ktorá slúžila ako zdroj vody pre imága a potrava vo forme smrekovej kôry o veľkosti 2 × 2 cm. Misky s imágami boli označené písmenom bloku a číslami, ktoré opisovali postavenie pasce. Následne sa imága preniesli do laboratória, kde sme ich pravidelne sledovali. Kontrola bola vykonávaná v pondelok a vo štvrtok počas 8 týždňov. Teplota v laboratóriu bola 22 ± 2 °C a relatívna vlhkosť 60 %. Vlhosť v miskách bola 90 % a viac. Ak sme počas kontroly zistili mŕtve imágo, tak sme ho odobrali od živých a následne bolo umiestnené do samostatnej misky, aby nedošlo k sekundárnej infekcii hubou. Do misky bola umiestnená navlhčená buničina, aby vznikli vhodné podmienky na prerastanie huby.

Výskumná plocha bolo rozdelená do 4 blokov (obr. 1). Veľkosť jedného bloku bola približne 15 × 25 m a vzdialenosť medzi jednotlivými blokmi 10 m. Vzdialenosť medzi jednotlivými kôrami alebo nosičmi bola 5 – 6 m v závislosti od terénu. Prvý blok bola kontrola. Tu sa nachádzalo 24 kusov lapacích kôr (4 rady po 6 kôr) bez nosiča. Medzi kôry bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade). V druhom bloku bolo umiestnených 24 nosičov (obr. 2c) (4 rady po 6 nosičov). Medzi nosiče bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade). Tretí blok pozostával z 24 nosičov, ku ktorým bol umiestnený atraktant (obr. 2b), v ktorom bol alfa-pinen s etylalkoholom v pomere 1 : 2 (4 rady po 6 nosičov). Medzi nosiče bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade). Štvrtý blok pozostával z 24 lapacích kôr, v ktorých bolo umiestnených 24 nosičov (4 rady po 6 nosičov) (obr. 2a). Medzi nosiče bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade).



Obrázok 1. Rozmiestnenie pascí v experimente (biely blok – control, zelený – carrier, modrý – attractant, žltý – bark)

Figure 1. Distribution of traps across the research site (white – control block, green – carrier, blue – attractant, yellow – bark).



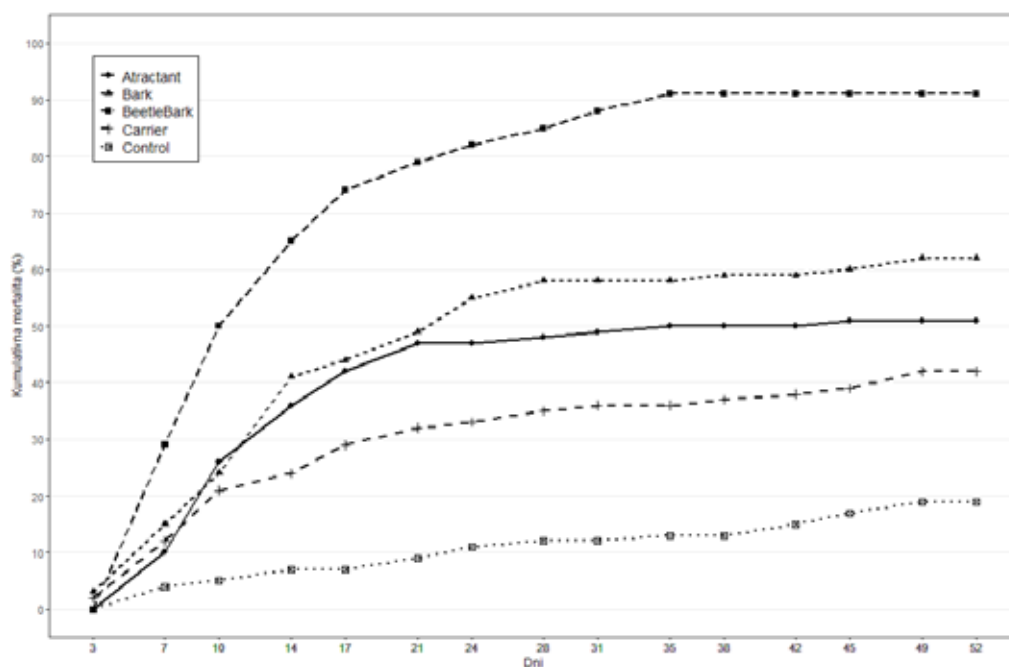
Obrázok 2. a) lapacia kôra s nosičom, b) nosič s atraktantom, c) samostaný nosič, d) zakrytý nosič chránený pred UV žiarením, e) výskumná plocha, f) pasca s odchytenými imágami

Figure 2. a) trapping bark with the carrier, b) carrier with attractant, c) separate carrier, d) covered carrier protected from UV radiation, e) research site, f) trap with captured adult beetles.

Zemné pasce sa skladali z vedier s objemom 1,2 l s 10 otvormi (priemer 10 mm) v hornej časti lapača. Pasce mali vrchnáky a boli zakopané do zeme tak, aby otvory, cez ktoré mohli vchádzať imága, boli na povrchu pôdy. Ako atraktanty do každej pasce boli použité borovicové vetvičky (dlhé 50 mm a priemer 12 ± 2 mm), ktoré boli odrezané z jediného 50-ročného stromu *P. sylvestris*. Vetvička bola umiestnená do pasce a vedľa nej bola umiestnená 20 ml fľaša obsahujúca etylalkohol. Vrchnák fľaše mal šesť otvorov s priemerom 2 mm a jeden otvor s priemerom 4 mm. Steny zemných pascí sme nastriekali teflonovým sprejom, ktorý po uschnutí na stenách spôsobil, že imága sa nevedeli po stenách pasce vyšplhať a odísť z pasce.

Výsledky

Celkovo sa na 4 blokoch za sledované obdobie 23. – 26. júl 2019 podarilo odchytiť 564 imág tvrdoňa smrekového. Tieto imága boli umiestňované do Petriho misiek, v počte maximálne 3 kusy do jednej. Sledovali sme mortalitu imág a následné prerastanie mycéliom entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Misky s imágami boli označené, aby nedošlo k zámene vzoriek a ku skresleniu výsledkov. Kontrola prerastania imág trvala od 29. júla 2019 do 18. septembra 2019, celkovo bolo vykonaných 15 kontrol v intervale 3 – 4 dni (obr. 3). Na bloku *control* sa podarilo odchytiť celkom 107 imág. Na bloku *carrier*, sme odchytili 226 imág. Na bloku *attractant* sme do zemných pascí odchytili 86 imág. Na poslednom bloku *bark* sme odchytili 111 imág zo zemných pascí a 34 imág sme odobrali priamo z lapačích kôr (*beetlebark*).



Obrázok 3. Vývoj mortality imág po jednotlivých dňoch a ošetreniach počas celého experimentu

Figure 3. Development of beetle mortality within the treatments throughout the experiment.

Najviac usmrtených imág v polovici experimentu bolo vo vzorkách imág *beetleBark*, ktoré boli v kontakte s nosičom a najmenej v kontrole. Menšia mortalita ako u imágach *beetlebark* bola u imágach *bark*, menšia v bloku *attractant* a najmenšia v bloku *carrier*.

Najviac infikovaných a usmrtených imág sme zaznamenali pri zozbieraných imágach *beetlebark*. Ich mortalita na konci experimentu bola 91,2 %.

V prípade nosiča umiestneného v kôre (*bark*) mortalita odchytených imág do zemných pascí dosiahla 62,2%. Pri kombinácii nosiča a atraktantu (*attractant*) dosiahla mortalita odchytených imág 51,2%. Najmenšiu mortalitu spôsobenú hubou dosiahol samotný nosič bez atraktantu (*carrier*) pre imága, kde dosiahla mortalita na konci experimentu 41,6%. V kontrolnom bloku (*control*), kde nebol umiestnený nosič, bola mortalita imág spôsobená entomopatogénnou hubou 18,7%.

Záver

Výsledky naznačujú, že nosiče kolonizované entomopatogénnou hubou *B. bassiana* by mohli byť vhodné na zníženie množstva *H. abietis* v lesoch. Výsledky naznačili, že dospelce *H. abietis* môžu byť infikované *B. bassiana* už po krátkom vystavení nosičom. Popísaný nosič bol vyvíjaný na Stredisku LOS 5 rokov. Použitie nosičov znižuje miestne zastúpenie *H. abietis* a pravdepodobne má minimálne účinky na ostatné bezstavovce. Okrem toho sa zdá, že s nosičom nie je potrebné používať atraktant, ale nosič by sa pravdepodobne mal používať v lapacej kôre alebo v inej chráničke, aby sa znížili účinky na iné bezstavovce. Aj keď súčasná štúdia zistila, že atraktant v pasciach nezvýšil úmrtnosť na *H. abietis*, je potrebný ďalší výskum, aby sa zistilo, či atraktant, ktorý sa pridáva priamo do nosiča, zvyšuje úmrtnosť na *H. abietis*. Z dôvodu ekologických rizík spojených s používaním tradičných insekticídov výrobcovia pesticídov čoraz viac zvažujú vývoj a výrobu biopesticídov. Súčasné výsledky naznačujú, že nosič s *B. bassiana* bude užitočným biopesticídum na ničenie *H. abietis* v lesoch a možno na ničenie ďalších hmyzích škodcov aj v poľnohospodárstve.

Podakovanie

Práca vznikla vďaka finančnej podpore v rámci projektov APVV-16-0031, APVV-18-0086. 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 „Zvyšovanie úrovne ochrany kritickej infraštruktúry – výskum nových, ekologicky akceptovateľných metód boja so škodcami lesa na území v správe podniku Vojenské lesy a majetky SR, š. p.“, ktorý je realizovaný s finančnou podporou Ministerstva obrany Slovenskej republiky.

Literatúra

- Augustyniuk-Kram, A., Kram, K. J., 2012: Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In: Blanco, J. A., Lo, Y. H. (eds.): Forest Ecosystems—More than Just Trees; Tech Press: Rijeka, Croatia, p. 265–294.
- 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: *Hylobius abietis* L., Großer Brauner Rüsselkäfer, Vol. 2. In: Schwenke W. (eds.). Die Forstschädlinge Europas. [Forest pest insects in Europe]. Paul Parey, Hamburg and Berlin, Germany, p. 277–293.
- 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 *B. brongniartii*. *BMC Microbiology*, 10:174.
- Gradinariu, F., Bodescu, C., Mutu, M. E., Jaluba, I., 2012: The dynamics of the damage caused by *Hylobius abietis* (L.) in the first two years after the spruce plantations establishment in relation to the control measures applied. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16:1015.

- Hallsworth, J.E., Magan, N., 1999: Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74:261–266.
- Khan, M. A., Ahmad, W., 2015: The management of Spodopteran pests using fungal pathogens. In: Sree, K.S., Varma, A. (eds.): *Biocontrol of lepidopteran pests*, p. 123–160.
- Kunca, A., Zúbrik, M., Vakula, J., Galko, J., Konôpka, B., Leontovyč, R. et al., 2016: Výskyt škodlivých činiteľov v lesoch Slovenska v rokoch 1960–2014, v roku 2015 a prognóza ich vývoja. *Zvolen, NLC - LVÚ Zvolen*, 139 p.
- 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., Kunca, A., Nikolov, C., Rell, S., Zúbrik, M., Dubec, M., Vakula, J., Gubka, A., Leontovyč, R., Longauerová, V., Konôpka, B., Holuša, J., 2021a: Ecology, management and damage by the large pine weevil (*Hylobius abietis*) (Coleoptera: Curculionidae) in coniferous forests within Europe. *Central European Forestry Journal*, 67(2):91–107.
- Lalík, M., Galko, J., Nikolov, C., Rell, S., Kunca, A., Zúbrik, M., Hyblerová, S., Barta, M., Holuša, J., 2021b: Potential of *Beauveria bassiana* application via a carrier to control the large pine weevil. *Crop Protection*, 143:105563.
- Långstöm, B., Day, K. R., 2004: Damage, control and management of weevil pests, especially *Hylobius abietis*. In *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe*. Springer: Dordrecht, The Netherlands, p. 415–444.
- Mc Namara, L., Kapranas, A., Williams, C. D., O’Tuama, P., Kavanagh, K., Griffin, C. T., 2018: Efficacy of entomopathogenic fungi against large pine weevil, *Hylobius abietis*, and their additive effects when combined with entomopathogenic nematodes. *Journal of Pest Science*, 91:1407–1419.
- Nordlander, G., 1987: A method for trapping *Hylobius abietis* (L.) with a standardized bait and its potential for forecasting seedling damage. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2:199–213.
- Posadas, J. B., Angulo, L. M., Mini, J. I., Lecuona, R. E., 2012: Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. *World Applied Sciences Journal*, 20:1024–1030.
- Reddy, K. R. K., Praveen Kumar, D., Reddy, K. R. N., 2013. Entomopathogenic fungi: A potential bio-insecticide. *Kavaka*, 41:23–32.
- Ramanujam, B., Rangeshwaran, R., Sivakmar, G., Mohan, M., Yandigeri, M. S., 2014: Management of insect pests by microorganisms. *Proceedings of Indian National Science Academy*, 80:455–471.
- Stoakley, J. T., Heritage, S. G., 1990: Application leaflet on the use of ‘Permit’ and ‘Permasect 25 EC’ for preplanting treatment of young trees against *Hylobius abietis* and *Hylastes* spp. *Research Information Note 177*, Farnham, Forestry Commission Research Division.
- Thorpe, K., Day, K., 2008: Reproductive maturation in the large pine weevil *Hylobius abietis*: the relative importance of larval and adult diet. *Agricultural and Forest Entomology*, 10:53–59.
- Trägårdh, I., 1913: On the chemotropism of insects and its significance for economic entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 4:113–117.

- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-Ard, J. J., Blackwell, M., 2012: Chapter 6–Fungal Entomopathogens. In: Vega, F. E., Kaya, H. K. (eds.): Insect Pathology; Academic Press: San Diego, CA, USA, p. 171–220.
- Wallertz, K., Nordlander, G., Örländer, G., 2006: Feeding on roots in the humus layer by adult pine weevil, *Hylobius abietis*. Agricultural and Forest Entomology, 8:273–279.
- Williams, C. D., Dillon, A. B., Harvey, C. D., Hennessy, R., Mc Namara, L., Griffin, C. T., 2013: Control of a major pest of forestry, *Hylobius abietis*, with entomopathogenic nematodes and fungi using eradicator and prophylactic strategies. Forest Ecology and Management, 305:212–222.
-

Adresa:

Ing. Michal Lalík Ph.D.¹, Ing. Milan Zúbrik, Ph.D.¹, Ing. Andrej Kunca, Ph.D.¹, Ing. Jozef Vakula, Ph.D.¹, Ing. Christo Nikolov, Ph.D.¹, Ing. Slavomír Rell, Ph.D.¹, Ing. Juraj Galko, Ph.D.¹, Ing. Roman Leontovyč, Ph.D.¹, Ing. Andrej Gubka, Ph.D.¹, prof. Ing. Bc. Jaroslav Holuša, Ph.D.²

¹Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Lesnícka ochranná služba, Lesnícka 11, SK – 969 01 Banská Štiavnica

²Česká zemědělská fakulta v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Kamýcká 1176, CZ – 165 21 Praha 6 - Suchbátka
e-mail: michal.lalik@nlcsk.org