

# ESENCIÁLNE OLEJE A ICH VPLYV NA PODKÔRNY HMYZ

Silvia Hyblerová • Daniela Gruľová • Marek Barta

Hyblerová, S., Gruľová, D., Barta, M.: Effect of essential oils against bark beetles. APOL, 2020, vol. 1, no. 2, p. 230–237.

**Abstract:** Spruce Bark beetles (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), *Ips typographus* (IT), is considered the most destructive insect pest of spruce forests in the Palaearctic region. Essential oils (EOs) from aromatic plants have been recognized as ecological alternatives to synthetic pesticides. The aim of our study was to test the insecticidal activity and repellent effects of six EOs (extracted from *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Hyssopus officinalis*, *Mentha × piperita*, *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare*) against IT. IT adults were exposed to different concentrations of EOs, and their effects were recorded 2–96 h post-treatment. Significant differences in biological activity were observed, and the greatest insecticidal effect was detected for *O. vulgare*, *T. vulgaris*, and *P. anisum*; but *O. vulgare* EO was significantly more toxic at all doses or exposure times. Repellency index (RI) varied among the EOs and depended on dose and exposure time. At doses of 0.077 – 0.219  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , the RI increased until 4 – 6 h post-treatment; after that period, it decreased. *Pimpinella anisum*, *O. vulgare*, and *T. vulgaris* EOs showed significantly higher repellent effects compared to *F. vulgare* and *H. officinalis* EOs. *Mentha × piperita* EOs exhibited neither repellent nor insecticidal activity against IT. To our knowledge, this is the first time that EOs biological activity against IT was studied.

**Key words:** apiaceae; integrated pest management; *Ips typographus*; Lamiaceae; natural products

## Výsledky a diskusia

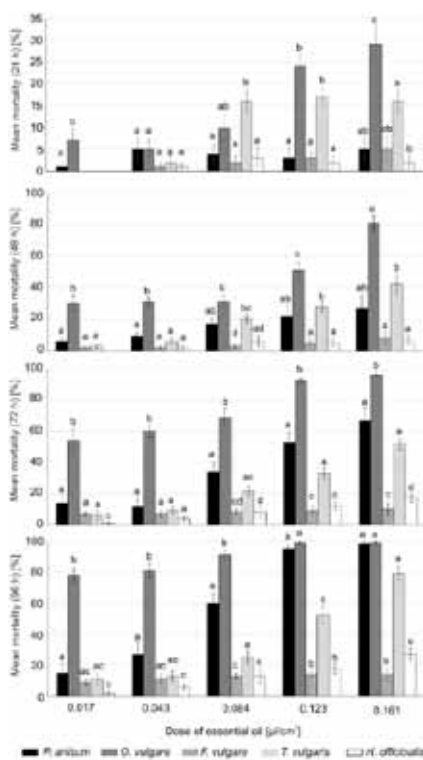
Analýzou GC–MS sme identifikovali 25 zlúčenín v EO *O. vulgare*, 20 v EO *M. piperita*, 19 v *H. officinalis* a 18 v EO *P. anisum*, *T. vulgaris* a *F. vulgare*, čo zodpovedá 99,2; 98,4; 96,8; 98,5; 99,6 a 99 percentám celkového obsahu vyizolovaného oleja, v danom poradí. Chemický profil každého EO je charakterizovaný 2 – 3 dominantnými a niekoľkými menej významnými zložkami. Hlavné zložky EO najčastejšie patria do troch chemických skupín: oksyložené monoterpény, monoterpénové uhľovodíky a fenolové zlúčeniny. Mentol (49,3 %), mentón (22,4 %) a limonén (9,4 %) dominoval v esenciálnom oleji *M. × piperita*; EO *O. vulgare* bol charakterizovaný hlavne karvacrolom (78,2 %), p–cyménom (4,4 %) a  $\gamma$ -terpinénom (3,2 %); EO *T. vulgaris* obsahoval hlavne tymol (50,4 %), limonén (33,6 %) a fenacylacetát (4,6%); EO *H. officinalis* bol charakterizovaný cis–pinocamphone (44,4%), izopinokamfón (25,2 %) a  $\beta$ -pinén (12,3 %); EO *P. anisum* obsahoval dve hlavné zložky anetolu (88,6 %) a estragolu (4,4 %); a EO *F. vulgare* väčšinou anetol (65,5 %), fenchón (20,2 %) a estragol (5,0 %). Chemický profil každého EO je podrobne popísaný v publikácii Mudrončeková et al. (2019). Napriek tomu, že účinky EO boli testované proti mnohým druhom hmyzu, tieto experimenty sú prvou správou o insekticídnej aktivite proti *I. typographus*. Bolo zistené, že by sa niektoré deriváty EO rastlín mohli použiť ako produkty vhodné na integrovanú ochranu proti škodcom, pretože sú charakterizované ako látky s nízkym alebo žiadnym škodlivým účinkom na necieľové organizmy a životné prostredie (Saroukolai et al. 2010; Arnason et al. 1989; Schmutterer 1992; Isman 2000). Mnohé EO rastlín vykazujú akútnu toxicitu proti mnohým druhom hmyzu vďaka ich zložitým zmesiam monoterpenoidov a príbuzných fenolov (Wang et al. 2009; Isman 2000). EO rastlín použité v našich experimentoch sú bohaté na anetol, karvakrol, estragol, fenchón, mentol, mentón, limonén (Esen et al. 2007; Kordali et al. 2008; Gonzalez – Coloma et al. 2013) a kvôli ich vysokej prchavosti majú často silné fumigantné účinky s insekti-

cídnou a akaricídnu aktivitou (Ho et al. 1997; Chang & Ahn 2002; Szczepanik et al. 2018; Park et al. 2017).

Insekticídny účinok sa prejavil u všetkých EO s výnimkou *M. piperita*. EO mäty neusmrtil lykožrúty v žiadnej sledovanej koncentrácii počas celej doby trvania pokusu. Pri ostatných olejoch sa miera úmrtnosti výrazne líšila v závislosti od typu EO, koncentrácie a času expozície. V kontrolnej pokusnej jednotke, počas celej doby trvania pokusu, všetky lykožrúty zostali živé a aktívne. Toxický účinok olejov sa zvyšoval so zvyšujúcou koncentráciou, ale aj v závislosti od času. Najúčinnější bol *O. vulgare*, *P. anisum* a *T. vulgare*. Pearsonova korelačná analýza potvrdila významnú pozitívnu koreláciu medzi kumulatívnou úmrtnosťou a dávkou EO ( $r = 0,975$ ,  $p = 0,005$  pre *P. anisum*,  $r = 0,963$ ,  $p = 0,008$  pre *O. vulgare*,  $r = 0,926$ ,  $p = 0,024$  pre *F. vulgare*;  $r = 0,972$ ,  $p = 0,006$  pre *T. vulgaris*; a  $r = 0,996$ ,  $p = 0,005$  pre *H. officinalis*). Významné ( $p < 0,05$ ) rozdiely v mortalite IT boli zaznamenané aj medzi EO v rámci rovnakého času expozície a letálnej dávky (obr. 1). Najvyšší insekticídny účinok sa zistil u troch EO, *O. vulgare* s celkovou úmrtnosťou 99 %, *T. vulgaris* (98 %) a *P. anisum* (78 %) na konci testu (po 96 hodinách expozície) a dávkou  $0,161 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Esenciálny olej *O. vulgare* bol významne ( $p < 0,05$ ) toxickejší takmer vo všetkých dávkach alebo časoch expozície. Esenciálne oleje *F. vulgare* a *H. officinalis* nepreukázali žiadnu alebo slabú toxicitu voči lykožrútom v závislosti od dávky a času expozície. Pri najvyššej dávke ( $0,161 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) *F. vulgare* spôsobil maximálnu mortalitu 14 % a *H. officinalis* 27 % za 96 hodín.

V prípade troch najúčinnějších EO, *O. vulgare*, *T. vulgaris* a *P. anisum* sme probitovou analýzou stanovili hodnoty letálnych koncentrácií ( $LC_{50}$ ,  $LC_{90}$ ) (tab. 1) a letálnych časov ( $LT_{50}$ ,  $LT_{90}$ ) (tab. 2) s 95 % intervalom spoľahlivosti. Hodnoty letálnych dávok boli vypočítané pre časy expozície 72 a 96 hodín v prípade olejov *P. anisum* a *T. vulgaris* a v prípade oleja *O. vulgare* 48, 72, 96 hodín. Doba expozície 24 alebo 48 hodín nebola zahrnutá do analýzy z dôvodu nízkej mortality. Z analyzovaných EO sa insekticídny účinok zvyšoval v tomto poradí *T. vulgaris* < *P. anisum* < *O. vulgare*. Čas potrebný na zabitie 50 % dospelých lykožrútov závisel od typu a dávky EO. Vo všeobecnosti najrýchlejšie usmrtil chrobáky esenciálny olej *O. vulgare* potom *P. anisum* a nakoniec *T. vulgaris*. Hodnoty letálneho času (LT) EO *O. vulgare* sa pohybovali v rozmedzí  $31,34 \pm 1,46$  h pre maximálnu dávku ( $0,161 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a  $64,03 \pm 2,83$  h pre minimálnu dávku ( $0,017 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Hodnoty LT neboli vyhodnocované pre dávky  $\leq 0,043 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$  a  $\leq 0,084 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$  v prípade olejov *P. anisum* a *T. vulgaris*, taktiež z dôvodu nízkej mortality.

Repelentný účinok bol otestovaný so všetkými olejmi okrem mäty piepornej (tab. 3). Účelom pokusu bolo stanoviť citlivosť lykožrútov na jednotlivé oleje formou preferencie jednotlivých polovíc (ošetrenej/neošetrenej) filtračného papiera (obr. 2a). Miera účinku sa medzi EO líšila v závislosti od dávky a doby expozície. Medzi EO ( $F_{(4,1495)} = 13,28$ ;  $p < 0,001$ ), dávkami ( $F_{(5,1494)} = 121,62$ ;  $p < 0,001$ ) a dobami expozície ( $F_{(4,149)} = 121,62$ ;  $p < 0,001$ ) boli zistené významné rozdiely v % jednotlivcov odpudzovaných ošetrenými filtračnými papiermi;  $F_{(4,1495)} = 13,16$ ;  $p < 0,001$ ). Všeobecne sa index odpudzovania (RI) zvyšoval v priebehu prvých 4 až 6 hodín po ošetrení a následne sa účinok nepretržite znižoval až do konca biologického testu. Tento proces bol



**Obrázok 1.** Priemerná % mortalita dospelých *Ips typographus* po ošetrení rôznymi dávkami rastlinných silíc (*Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, *Foeniculum vulgare*, *Thymus vulgaris* a *Hyssopus officinalis*) v priebehu 24 – 96 hodín. Stĺpce predstavujúce úmrtnosť a písmená nad stĺpcom znázorňujú signifikantné rozdiely medzi olejmi v rámci tej istej koncentrácie ( $P = 0,05$ ; Tukey's HSD test).

**Figure 1.** Mean % mortality of *Ips typographus* adults 24–96 h after treatment with different doses of plant essential oils (*Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, *Foeniculum vulgare*, *Thymus vulgaris* and *Hyssopus officinalis*) in the contact toxicity bioassay; columns representing IT mortality labeled with different letters within the same EO dose are significantly different ( $p = 0,05$ ; Tukey's HSD test).

pozorovaný hlavne pre EO *P. anisum*, *O. vulgare* a *T. vulgaris* a dávkach 0,0765 – 0,219  $\mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Pri najvyššej dávke (0,286  $\mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), EO *P. anisum* a na konci pokusu hladina RI mierne vzrástla (RI = 78,1 % po 12 hodinách) alebo zostala takmer na konštantných hladinách 60 – 80 % počas testu v prípade ostatných EO. Pri nízkych dávkach ( $\leq 0,013 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) sa nezistil žiadny repelentný účinok v prípade EO *H. officinalis* a *O. vulgare*, alebo účinok dosiahol nízky RI a ten sa mal tendenciu zvyšovať s dávkou v prípade *T. vulgaris* a *H. officinalis*, no nebolo to pravidlom a záviselo od EO. Esenciálny olej *Pimpinella anisum*, *O. vulgare* a *T. vulgaris* vykazovali významne vyššie repelentné účinky ( $p < 0,01$ ) voči IT ako *F. vulgare* a *H. officinalis*.

**Tabuľka 1.** Priemerná letálna dávka ( $LD_{50}$  and  $LD_{90}$ ) z probitovej analýzy testujúca insekticídnu aktivitu esenciálnych olejov proti imágam lykožrúta smrekového po 48, 72 a 96 hodinách.

**Table 1.** Mean lethal concentrations ( $LC_{50}$  and  $LC_{90}$ ) from probit analyses testing insecticidal activity of essential oils against *Ips typographus* adults for 48, 72 or 96-h exposure times ( $t_e$ ) to the oils.

Essential oils and their majority constituents	$t_e$ [h]	$LC_{50} \pm SE^*$	95 % CI	$LC_{90} \pm SE$	95 % CI	Slope $\pm SE$	$p^{**}$	$\chi^{2***}$
<i>P. anisum</i> (88,6 %)	72	$7,11 \pm 0,68$	5,99 – 8,83	$41,00 \pm 10,60$	26,94 – 77,99	$0,73 \pm 0,08$	<0,001	0,518
	96	$3,12 \pm 0,17$	2,79 – 3,46	$8,32 \pm 0,68$	7,31 – 10,07	$1,28 \pm 0,09$	<0,001	0,402
<i>O. vulgare</i> (78,2 %)	48	$5,30 \pm 0,68$	4,17 – 7,09	$79,59 \pm 37,20$	39,00 – 289,37	$0,47 \pm 0,07$	<0,001	0,307
	72	$1,18 \pm 0,19$	0,79 – 1,55	$9,50 \pm 1,64$	7,14 – 14,57	$0,61 \pm 0,08$	<0,001	0,671
	96	$0,35 \pm 0,13$	0,12 – 0,61	$3,16 \pm 0,45$	2,40 – 4,36	$0,58 \pm 0,10$	<0,001	0,421
<i>T. vulgaris</i> (50,4 %)	72	$11,99 \pm 1,66$	9,53 – 16,92	$67,44 \pm 23,23$	39,22 – 165,85	$0,74 \pm 0,10$	<0,001	0,331
	96	$6,66 \pm 0,51$	5,78 – 7,87	$28,09 \pm 5,30$	20,53 – 44,19	$0,89 \pm 0,09$	<0,001	0,505

\*SE – stredná chyby priemeru, \*\*CI – 95 % interval spoľahlivosti, \*\*\*p – hodnota regresnej analýzy, \*\*\*\* Pearsonov test  $\chi^2$  ( $p = 0,05$ ,  $df = 3$ ).

**Tabuľka 2.** Priemerný letálny čas ( $LT_{50}$  and  $LT_{90}$ ) z probitovej analýzy testujúca insekticídnu aktivitu esenciálnych olejov proti imágam lykožrúta smrekového v závislosti od času expozície pri rôznych koncentráciách (c) oleja.

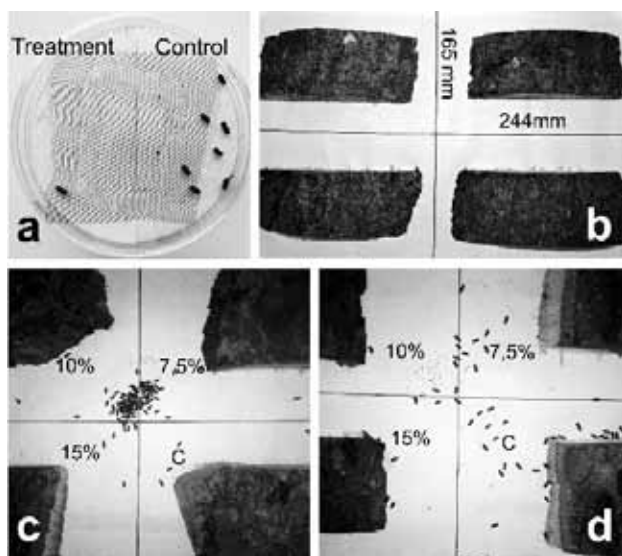
**Table 2.** Mean lethal times ( $LT_{50}$  and  $LT_{90}$ ) from probit analyses testing insecticidal activity of essential oils against *Ips typographus* adults after exposure to the oils of different concentrations (c).

Essential oils	d ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ )	$LT_{50} \pm SE^*$	95 % CI**	$LT_{90} \pm SE^*$	95 % CI**	Slope $\pm SE^*$	$p^{***}$	$\chi^{2****}$
		[h]						
<i>P. anisum</i>	0,084	$87,55 \pm 5,34$	78,70 – 100,96	$207,70 \pm 31,18$	163,31 – 304,32	$1,48 \pm 0,18$	<0,001	0,225
	0,123	$62,60 \pm 1,96$	58,79 – 66,58	$103,82 \pm 5,63$	94,58 – 117,68	$2,53 \pm 0,23$	<0,001	0,315
	0,161	$56,27 \pm 1,82$	52,68 – 59,91	$94,19 \pm 4,77$	4,77 – 105,64	$2,49 \pm 0,21$	<0,001	0,145
<i>O. vulgare</i>	0,017	$64,03 \pm 2,83$	58,76 – 70,13	$141,59 \pm 13,68$	120,46 – 178,35	$1,62 \pm 0,16$	<0,001	0,747
	0,043	$61,49 \pm 2,43$	56,85 – 66,57	$123,76 \pm 9,68$	108,39 – 148,69	$1,83 \pm 0,17$	<0,001	0,505
	0,084	$54,36 \pm 2,12$	50,24 – 58,67	$107,04 \pm 7,26$	95,23 – 125,06	$1,89 \pm 0,17$	<0,001	0,112
	0,123	$38,55 \pm 1,65$	35,24 – 41,78	$74,47 \pm 4,32$	67,24 – 84,82	$1,94 \pm 0,17$	<0,001	0,025
	0,161	$31,34 \pm 1,46$	28,36 – 34,15	$57,98 \pm 3,17$	52,62 – 65,50	$2,08 \pm 0,19$	<0,001	0,011
<i>T. vulgaris</i>	0,123	$112,64 \pm 18,17$	87,99 – 180,63	$691,84 \pm 338,90$	342,99 – 3205,12	$0,71 \pm 0,14$	<0,001	0,332
	0,161	$57,66 \pm 3,24$	51,58 – 64,69	$168,55 \pm 23,65$	134,15 – 239,02	$1,19 \pm 0,14$	<0,001	0,264

\*SE – stredná chyby priemeru, \*\*CI – 95 % interval spoľahlivosti, \*\*\*p – hodnota regresnej analýzy, \*\*\*\* Pearsonov test  $\chi^2$  ( $p = 0,05$ ,  $df = 2$ ).

**Obrázok 2.** Vizuál pokusných jednotiek, v ktorých sa testoval repelentný účinok éterických olejov na *Ips typographus*: a: Pokus v Petriho miskách sledujúca distribúciu imág *I. typographus* medzi ošetrovanou a neošetrenou polovicou filtračného papiera na dne misky, b – d: tri smrekové výrezy ošetrované EO rôznymi dávkami (1,039; 1,385 a 2,077  $\mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a jeden neošetrený (kontrolný) výrez v experimentálnej jednotke, kde sa monitorovala distribúcia lykožrútovej medzi jednotlivými výrezmi v priebehu 2 – 72 hodín.

**Figure 2.** Laboratory bioassays where the repellency effect of essential oils were tested against *Ips typographus*: a: Petri dish bioassay testing distribution of *I. typographus* adults between treated and untreated filter paper half-disks on the bottom of dish, b–d: three spruce log sections treated with essential oils of different doses (1.039, 1.385 and 2.077  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) and one untreated (control) log section in the experimental arena for monitoring distribution of *I. typographus* adults among the logs over time of 2 – 72 h post-treatment.



**Tabuľka 3.** Repelentný účinok rastlinných éterických olejov (EO) voči imágam *Ips typographus* v závislosti od času (2 – 12 hodín) preukázaný počtom jedincov distribuovaných medzi ošetrovanou polovicou filtračného papiera (T) o rôznej koncentrácii 0,5 – 10 % (v/v) EO a kontrolnou polovicou filtračného papiera (C) a indexu repelentnosti (RI)

**Table 3.** Repellent effect of plant essential oils (EOs) to *Ips typographus* over 2 – 12 h post-treatment in the Petri dish assays demonstrated by numbers of individuals distributed between the filter paper half-disk treated (T) with 0.5 – 10% (v/v) of EOs and the untreated half-disk (C) and by repellency index (RI).

Essential oil concentration		T/C (RI)				
		2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
<i>P. anisum</i>	0,5 %	40/60 (34,4) **	47/53 (11,3) –	43/57 (24,6) –	51/49 (n) –	50/50 (n) –
	1,0 %	26/74 (64,9) ***	16/84 (81,0) ***	39/61 (36,1) –	40/60 (33,3) *	40/60 (33,3) –
	2,5 %	17/83 (79,5) ***	20/80 (75,0) ***	37/63 (41,3) *	35/65 (46,2) ***	37/63 (41,3) **
	5,0 %	31/69 (55,1) ***	20/80 (75,0) ***	27/73 (63,0) ***	43/57 (24,6) **	34/66 (48,5) ***
	7,5 %	22/78 (71,8) ***	23/77 (70,1) ***	32/68 (52,9) ***	59/41 (n) ***	33/67 (50,8) ***
	10,0 %	32/68 (52,9) ***	31/69 (55,1) ***	20/80 (75,0) ***	19/81 (76,5) ***	18/82 (78,1) ***
<i>O. vulgare</i>	0,5 %	61/39 (n) *	54/46 (n) –	68/32 (n) *	70/30 (n) ***	62/38 (n) *
	1,0 %	57/43 (n) *	30/70 (57,1) ***	71/29 (n) ***	68/32 (n) ***	63/37 (n) ***
	2,5 %	42/58 (27,6) –	39/61 (36,1) **	35/65 (46,2) **	28/72 (61,1) ***	41/59 (30,5) *
	5,0 %	49/51 (3,9) –	40/60 (33,3) ***	40/60 (33,3) ***	49/51 (3,9) –	40/60 (33,3) ***
	7,5 %	39/61 (36,1) ***	39/61 (36,1) ***	42/58 (27,6) ***	49/51 (3,9) –	32/68 (52,9) ***
	10,0 %	23/77 (70,1) ***	30/70 (57,1) ***	29/71 (59,2) ***	26/74 (64,9) ***	24/76 (68,4) ***
<i>F. vulgare</i>	0,5 %	43/57 (24,6) *	53/47 (n) –	54/46 (n) –	63/37 (n) –	64/36 (n) –
	1,0 %	37/67 (41,3) **	54/46 (n) –	51/49 (n) –	42/58 (27,6) –	42/58 (27,6) –
	2,5 %	6/94 (93,6) ***	39/61 (36,1) –	40/60 (33,3) –	56/44 (n) –	48/52 (7,7) –
	5,0 %	17/83 (79,5) ***	18/82 (78,0) ***	27/73 (63,0) ***	34/66 (48,5) ***	39/61 (36,1) ***
	7,5 %	15/85 (82,4) ***	29/71 (59,2) ***	26/74 (64,9) ***	36/64 (43,8) ***	38/62 (38,7) **
	10,0 %	21/79 (73,4) ***	16/84 (81,0) ***	12/88 (86,4) ***	25/75 (66,7) ***	26/74 (64,9) ***
<i>T. vulgaris</i>	0,5 %	72/28 (n) ***	66/34 (n) ***	58/42 (n) *	54/46 (n) –	49/51 (3,9) –
	1,0 %	37/63 (41,3) –	39/61 (36,1) *	46/54 (14,8) –	51/49 (n) –	51/49 (n) –
	2,5 %	37/63 (41,3) *	35/65 (46,2) **	36/64 (43,8) ***	40/60 (33,3) **	39/61 (36,1) **
	5,0 %	29/71 (59,2) ***	33/67 (50,7) ***	36/64 (43,8) ***	31/69 (55,1) ***	37/63 (41,3) ***
	7,5 %	17/83 (79,5) ***	22/78 (71,8) ***	23/77 (70,1) ***	26/74 (64,9) ***	28/72 (61,1) ***
	10,0 %	19/81 (76,5) ***	14/86 (83,7) ***	15/85 (82,4) ***	21/79 (73,4) ***	27/73 (63,0) ***
<i>H. officinalis</i>	0,5 %	63/37 (n) *	56/44 (n) *	52/48 (n) –	52/48 (n) –	55/45 (n) –
	1,0 %	60/40 (n) –	66/34 (n) *	65/35 (n) *	65/35 (n) ***	80/20 (n) ***
	2,5 %	43/57 (24,6) –	49/51 (3,9) –	59/41 (n) *	59/41 (n) ***	74/26 (n) ***
	5,0 %	23/77 (70,1) ***	47/53 (11,3) –	56/44 (n) –	66/34 (n) *	54/46 (n) –
	7,5 %	8/92 (91,3) ***	11/89 (87,6) ***	19/81 (76,5) ***	30/70 (57,1) ***	27/73 (63,0) ***
	10,0 %	8/92 (91,3) ***	8/92 (91,3) ***	10/90 (88,9) ***	13/87 (85,1) ***	15/85 (82,4) ***

T/C – podiel [%] lykožrútov na ošetrenej (T) a kontrolnej (C) polovici filtračného papiera, RI – index repelencie ( $1 - (T/C) \times 100$  [%]) (Gutiérrez et al. 1997), n – nebol zistený žiadny repelentný účinok, Študentský t-test na počet lykožrútov medzi ošetrovanou (T) a kontrolnou (C) polovicou filtračného papiera: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*), p > 0,05 (1).

Tretím experimentom sa testovala preferencia lykožrútov topicky ošetrenej kôry EO (obr. 2 b – d). Tri EO, ktoré preukázali výrazne vyššiu insekticídnu a repelentnú aktivitu proti IT v predchádzajúcich pokusoch sa topicky aplikovali na povrch smrekových sekcií. Študoval sa repelentný účinok formou preferencie jednotlivých smrekových sekcií ošetrovaných rôznymi koncentráciami a druhmi EO. Na pokus sa použilo 100 dospelých IT vložených do boxu, kde boli umiestnené tieto smrekové sekcie ošetrované EO tromi dávkami (1,039; 1,385 a 2,077  $\mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a jeden kontrolný (acetónom ošetrovaný). Percentuálna distribúcia chrobákov medzi smrekovými sekciami sa sledovala po dobu od 2 – 72 h po aplikácii (tab. 4). Repelentný účinok bol preukázaný vo všetkých testovaných EO, dávkach alebo časoch, čo bolo potvrdené chi-kvadrátovým testom ( $p < 0,001$ ). V závislosti od EO a času expozície sa percento chrobákov, ktorí migrovali na kontrolnú sekciu, pohybovala od 66,6 % (*O. vulgare* po 2 hodinách) do 94,6 % (*P. anisum* po 72 hodinách). Výsledky ukazujú, že EO boli veľmi odpudivé a účinok sa prejavoval až do konca pokusu (tab. 4).

EO z *O. vulgare*, *T. vulgaris* a *P. anisum* mali významný insekticídny účinok proti dospelým *I. typographus*. Vzhľadom na fakt, že neexistuje štúdia testujúca vplyv esenciálnych olejov na lykožrúta smrekového, výber rastlín a ich olejov sme vyberali na základe početných správ a publikácií o insekticídnych účinkoch na druhy hmyzu z radu Coleoptera (Kim et al. 2010; Prates et al. 1998; García et al. 2005; Gonzales – Coloma et al. 2013; Nenaah & Ibrahim 2011; Pavela 2011; Saroukolai et al. 2010).

**Tabuľka 4.** Priemerný podiel (%) lykožrútov rozdelených medzi tri smrekové výrezy ošetrené éterickými olejmi o rôznych koncentráciách (1,039, 1,385 and 2,077  $\mu\text{l.cm}^{-2}$ ) a jeden neošetrený (kontrolný) výrez v čase (t) 2 – 72 h.

**Table 4.** Mean proportion (%) of *Ips typographus* adults distributed among three spruce logs treated with essential oils of different concentrations (1.039, 1.385 and 2.077  $\mu\text{l.cm}^{-2}$ ) and one untreated (control) log over time (t) of 2 – 72 h post-treatment.

t (h)	Essential oil	Logs treated with essential oils [ $\mu\text{l.cm}^{-2}$ ]			Untreated log
		1,039	1,385	2,077	
2	<i>P. anisum</i>	8,8±0,72a*	4,2±0,52a	4,4±0,78a	82,6±0,83a
	<i>T. vulgaris</i>	14,0±3,33a	6,0±2,13a	1,8±1,19b	78,4±3,90a
	<i>O. vulgare</i>	15,0±0,52a	9,6±0,89a	8,4±0,18c	66,6±1,15b
4	<i>P. anisum</i>	6,4±1,08a	3,6±0,67a	3,2±0,59a	86,8±0,66a
	<i>T. vulgaris</i>	13,0±2,92a	4,0±0,36a	1,8±1,04b	81,2±3,64a
	<i>O. vulgare</i>	13,4±1,65a	7,4±0,63b	7,4±0,18c	71,8±1,37b
6	<i>P. anisum</i>	7,2±0,87a	2,6±0,46a	1,4±0,46a	88,8±1,28a
	<i>T. vulgaris</i>	11,0±2,32a	3,4±0,33a	1,4±1,18a	84,2±3,68a
	<i>O. vulgare</i>	11,0±1,55a	7,2±0,46b	5,8±0,22b	76,0±1,63b
8	<i>P. anisum</i>	6,4±0,92a	2,8±0,33a	1,2±0,33a	89,6±1,28a
	<i>T. vulgaris</i>	8,4±2,05a	3,4±0,77a	1,0±1,18a	87,2±3,46a
	<i>O. vulgare</i>	9,4±1,04a	6,2±0,36b	5,8±0,00b	78,6±1,34b
10	<i>P. anisum</i>	6,0±0,28a	3,0±0,28a	1,0±0,28a	90,0±0,63a
	<i>T. vulgaris</i>	7,2±1,99a	4,2±1,11a	1,0±1,56a	87,6±3,89a
	<i>O. vulgare</i>	8,4±0,44a	7,2±0,72b	5,2±0,00b	79,2±0,67b
12	<i>P. anisum</i>	4,8±0,52a	3,0±0,49a	0,6±0,36a	91,6±0,67a
	<i>T. vulgaris</i>	7,8±2,02a	3,6±1,04a	0,8±1,15a	87,8±3,95a
	<i>O. vulgare</i>	9,0±1,28a	5,8±0,61a	5,4±0,18b	79,8±1,25b
24	<i>P. anisum</i>	4,6±0,36a	3,2±0,66a	0,4±0,36a	91,8±0,52a
	<i>T. vulgaris</i>	6,0±1,79a	2,4±0,96a	0,8±2,15a	90,8±4,83a
	<i>O. vulgare</i>	8,0±1,10a	4,6±0,36a	6,0±0,33b	81,4±1,37a
36	<i>P. anisum</i>	5,4±1,04a	3,0±0,28a	0,0±0,00a	91,6±1,04a
	<i>T. vulgaris</i>	6,2±1,48a	2,4±0,88a	0,6±1,99a	90,8±4,18a
	<i>O. vulgare</i>	7,2±0,18a	4,4±0,36a	6,4±0,36b	82,0±0,33a
48	<i>P. anisum</i>	5,0±0,69a	2,0±0,49a	0,0±0,00a	93,0±1,17a
	<i>T. vulgaris</i>	5,0±1,63a	2,2±0,57a	0,4±1,22a	92,4±3,21a
	<i>O. vulgare</i>	7,8±0,28a	4,0±0,33a	4,6±0,36b	83,6±0,36b
60	<i>P. anisum</i>	4,2±0,66a	2,0±0,40a	0,0±0,00a	93,8±0,95a
	<i>T. vulgaris</i>	4,8±1,31a	2,2±1,40a	0,4±1,00a	92,6±3,56a
	<i>O. vulgare</i>	7,2±0,44a	4,2±0,33a	4,6±0,36b	84,0±0,61b
72	<i>P. anisum</i>	3,6±0,46a	1,8±0,33a	0,0±0,00a	94,6±0,73a
	<i>T. vulgaris</i>	4,8±1,94a	1,6±1,34a	0,4±0,87a	93,2±4,10a
	<i>O. vulgare</i>	8,0±0,44a	4,4±0,22a	4,2±0,36b	83,4±0,59b

\* Priemerný podiel (%) lykožrútov ± štandardná chyba; stredné hodnoty označené rovnakým písmenom pre rovnaké ošetrenie a čas sa významne nelíšia (Tukeyov HSD test;  $p = 0,05$ ).

Naším cieľom bolo testovať nový potencióálny bioinsekticíd pre možnosti využitia kombinovanej metódy ochrany lesa s využitím tradičných metód. Mohli by byť užitočnými prostriedkami pre ovplyvnenie preferencie a ataku smrekov lykožrútmí, ochrany jednotlivých stromov spoločenského významu alebo skládok dreva. Záverom je, že *O. vulgare* má veľmi vysoký a rýchly nástup insekticídneho účinku a *M. piperita* sa javí ako atraktant, ktorú je nutné potvrdiť ďalšími experimentmi. Pred zavedením biologickej kontroly lykožrútov prostredníctvom esenciálnych olejov do praxe sú potrebné ešte ďalšie experimenty. Testovanie by sa malo zamerať na identifikáciu tých komponentov, ktoré sú zodpovedné za vysokú účinnosť EO a na štúdium účinnosti hlavných zložiek EO voči lykožrútovi. Ďalej repelentné účinky, či štúdium in vivo účinkov EO a ich jednotlivých zložiek na necieľové druhy je tiež dôležité. Dospeli sme k záveru, že EO môžu mať potenciál ako alternatíva k chemickej kontrole, a preto môžu byť posúdené pre začlenenie integrovanej ochrany proti škodcom tohto škodcu.

## Materiály a metódy

### Hmyz

Imága lykožrútov sa vyberali z prirodzene naletených smrekových stromov lesov TANAP-u (49.167168°N, 20.138477°E) počas júla až septembra 2016. Naletené polená lykožrútmí boli odkôrené a lykožrúty opatrne vyberané z galérii, aby nedošlo k poškodeniu tela jedinca. Použili sa len dospelé jedince, okamžite vybraté z galérii, bez predchádzajúceho uchovávaní v boxoch.

## Esenciálne oleje

EO sme nadobudli od spoločnosti Calendula a.s. (Nová Lubovňa, Slovensko) ako obchodné esenciálne oleje – štyri EO z rastlín *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Hyssopus officinalis* a *Mentha × piperita* patriace do čeľade Lamiaceae a dva druhy *Pimpinella anisum* a *Foeniculum vulgare* patriace do čeľadi Apiaceae.

## Analýza GC / MS a identifikácia komponentov

Vzorky EO sme analyzovali pomocou plynovej chromatografie / hmotnostná spektrometria (GC / MS) na Prešovskej univerzite (Prešov, Slovensko). Na analýzu sme použili zariadenie Varian 450-GC spojený s hmotnostným spektrometrom Varian 220-MS IT (Varian, Inc., CA, USA). Separácia esenciálneho oleja prebiehala na kolóne Bruker Br-5ms ms (30 m × 0,25 mm ID, hrúbka filmu 0,25 µm; Bruker Daltonics Inc., MA, USA). Injektor typu 1177 sa zahrial na teplotu 220 °C. Režim vstrekovania – mód splitless (1 µl Lanalytutv pomere 1 : 1,000 rozpúšťadla n-hexánu). Ako nosný plyn sa použilo hélium s konštantným prietokom kolóny 1,2 ml min<sup>-1</sup>. Teplotný program kolóny bol naprogramovaný do štyroch krokov: (1) 50 °C pre 10 min, (2) 100 °C pri 3 °C min<sup>-1</sup>, (3) izotermická počas 5 minúta (4) 150 °C pri 10 °C min<sup>-1</sup>. Celkový čas analýzy trval 87,67 min. Záchyt MS bol zahrievaný na 200 °C, rozdeľovač 50 °C a prenosovej línii 270 °C. Hmotnostné spektrá sa skenovali každú sekundu v rozmedzí 40 – 650 m/z. Retenčné indexy sa stanovovali vo vzťahu k hodnotám Rt homologných série n-alkánov (C10 – C35) za rovnakých podmienok. Zložky boli identifikované porovnaním ich retenčných indexov (RI) s renomovanou literatúrou. Ďalšia identifikácia sa uskutočnila porovnaním hmotnostných spektrier buď s dátami uloženými v NIST 02 alebo s literatúrou (Adams 2007). Relatívne koncentrácie zložiek boli hodnotené ako percento normalizácie plochy píku.

**Insekticídny účinok** EO bol stanovený metódou kontaktnej toxicity. Každá pokusná jednotka pozostávala zo sklenenej Petriho misky (60 × 15 mm), obsahujúca filtračný papier (priemer 60 mm; Whatman No. 1) umiestnený na dne misky. Použilo sa päť rôznych koncentrácií EO (0,017, 0,043, 0,084, 0,123 a 0,161 µl.cm<sup>-2</sup>). Na povrch filtračného papiera sme naniesli 50 µl príslušného roztoku EO. Na kontrolu bol použitý iba acetón. Po 10 minútach, akonáhle sa rozpúšťadlo odparilo, 10 dospelých lykožrútov (bez determinácie pohlavia) sa vložilo do každej Petriho misky. Petriho misky boli uložené v tme pri teplote 23 ± 1 °C a 70 – 80 % relatívnej vlhkosti. Mortalitu lykožrútov sme zaznamenávali po 24, 48, 72, 96 hodinách. Jedince sme považovali za mŕtve, až v prípade, keď pod binokulárnou lupou neboli zaznamenané žiadne pohyby nôh, alebo tykadiel ani po stimulácii entomologickou pinzetou. Experimentálny dizajn bol náhodný s desiatimi opakovaniami pre každý EO a koncentráciu. Priemerná úmrtnosť lykožrútov v teste kontaktnej toxicity sa vyhodnotila štatistickým testom ANOVA na stanovenie rozdielov medzi EO a koncentraciami. Test post-hoc Tukey HSD sa použil na rozlíšenie a porovnanie priemerov v prípade, že boli zistené významné rozdiely (p = 0,05). Kumulatívnu mortalitu z testu toxicity sme vyhodnotili probitovou analýzou (Finney 1971) na výpočet letálnych dávok (LD50, LD90) a letálnych časov (LT50, LT90) s 95 % intervalom spoľahlivosti.

**Repelentný účinok** piatich esenciálnych olejov (*Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, *Foeniculum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Hyssopus officinalis*) proti lykožrútovi smrekovému bola realizovaná podľa metodiky, ktorú použili viacerí autori (Albuquerque et al. 2013; Peixoto et al. 2015; Mishra et al. 2012). Plastové Petriho misky (90 × 15 mm), boli upravené pre potreby experimentu (obrázok 2a). Dno Petriho misky bolo pokryté filtračným papierom (priemer 90 mm; Whatman No. 1) a rozdelené na dve polovice. Každá polovica filtračného papiera sa spracovala osobitne. Na jednu polovicu sa nanieslo 100 µl acetónového roztoku testovanej koncentrácie EO, a na druhú polovicu, iba samotné rozpúšťadlo (kontrola). V experimente sme použili celkom šesť roztokov (v/v) EO/acetón s koncentraciami (0,015, 0,031, 0,077, 0,150, 0,219 and 0,286 µl.cm<sup>-2</sup>). Po odparení rozpúšťadla (10 min.), sme obe polovice filtračného papiera prilepili obojstrannou lepiacou páskou na dno Petriho misky a vložili 10 dospelých lykožrútov (bez determinácie pohlavia). Misky sme prikryli modifikovanými viečkami a udržiavali v tme pri teplote 23 ± 1 °C a 70 – 80 % relatívnej vlhkosti. Po 2, 4, 6, 8 a 12 hodinách sme zaznamenávali počet jedincov na jednotlivých poloviciach filtračného papiera. Účelom pokusu bolo

stanoviť preferenciu jedincov k jednotlivkej ošetrenej/neošetrenej polovici filtračného papiera. Experimenty boli desaťkrát opakované. Experiment sme vyhodnotili štatistickým t-testom. Index repelencie (RI%) bol vypočítaný pre každý EO (Gutiérrez et al. 1997):  $\% RI = (1 - (\% T / \% C)) \times 100$ , kde % T je percento chrobákov na ošetrenej polovici filtračného papiera a % C je percento jednotlivcov na kontrolnej polovici papiera v Petriho miske.

**Repelentný účinok sledovaný ošetrením smrekovej kôry.** Na sekcii smrekového dreva sa topicky aplikovali tri EO (*P. anisum*, *O. vulgare* a *T. vulgaris*). Tieto zlúčeniny sa vybrali na základe výsledkov opísaných v predchádzajúcom experimente. Cieľom tohto experimentu bolo otestovať repelentnú aktivitu EO voči IT, keď sa aplikuje priamo na kôru. Experimentálna jednotka pozostávala zo skleneného boxu (488 × 330 × 340 mm), ktorého dno je pokryté filtračným papierom (488 × 330 mm; Whatman č. 1) a rozdelený na rovnaké štvrtiny (244 × 165 mm) dvoma kolmými čiarami nakreslenými značkou (obr. 2b–d). Celkový povrch troch výrezov guľatiny bol postriekaný 7 ml príslušného EO dávky 1,039; 1,385 a 0,005 2,077  $\mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Štvrtá sekcia polena bola ošetrená acetónom (kontrola). Po odparení acetónu (10 minút) sa do stredu boxu umiestnilo 100 dospelých zdravých IT dospelých lykožrútov (obr. 1c). Chi-kvadrát test sa použil na porovnanie variability medzi očakávanou a pozorovanou distribúciou IT. Počet IT distribuovaných medzi ošetrenými sekciami smrekových sa podrobil ANOVA, aby sa určili rozdiely medzi EO. Všetky štatistické analýzy sa uskutočňovali s použitím Minitab 17<sup>®</sup> (© 2013 Minitab Inc.).

## Podakovanie

Práca vznikla 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 projektu VEGA č. 1/0087/20.

## Literatúra

- Adams, R. P., 2007: Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4th edn. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Albuquerque, E. L. D., Lima, J. K. A., Souza, F. R. O., Silva, I. M. A. et al., 2013: Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. In: Acta Trop., 127:181–186.
- Arnason, J. T., Philogène, B. J. R., Morand, P. et al., 1989: Naturally occurring and synthetic thiophenes as photoactivated insecticides. In: Arnason, J. T., Philogène, B. J. R., Morand, P. (eds.): Insecticides of plant origin. ACS Symp series no 387. American Chemical Society, Washington DC, p. 164–172.
- Chang, K. S., Ahn, Y. J., 2002: Fumigant activity of (E)-anethole identified in *Illicium verum* fruit against *Blattella germanica*. Pest Manag Sci., 58: 161–166.
- Esen, G., Azaz, A. D., Kurkcuglu, M., Baser, K. H. C., Tinnaz, A., 2007: Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Letswaart from the Marmara region, Turkey. Flavour Fragr J., 22: 371–376.
- García, M., Donael, O. J., Ardanaz, C. E., Tonn, C. E., Sosa, M. E., 2005: Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. Pest Manag Sci, 61:612–618.
- Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Diaz, C. E., Fraga, B. M., Santana-Meridas, O., 2013: Natural product-based biopesticides for insect control. In: Mander L, Liu HW (eds) Comprehensive natural products II. Elsevier, Oxford, p. 237–268.
- Gutiérrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R., González, C. A., 1997: Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. J Chem Ecol, 23: 1641–1650.
- Ho, S. H., Ma, Y., Huang, Y., 1997: Anethole, a potential insecticide from *Illicium verum* Hook F, against two stored product insects. International. Pest Control., 39(2): 50–51.

- Isman, M. B., 2000: Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.*, 19: 603–608.
- Kim, S. I., Yoon, J. S., Jung, J. W., Hong, K. B., Ahn, Y. J., Kwon, H. W., 2010: Toxicity and repellency of origanum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. *J Asia-Pac Entomol*, 13: 369–373.
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R. et al., 2008: Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Biores. Technol.*, 99: 8788–8795.
- Nenaah, G. E., Ibrahim, S. I. A., 2011: Chemical composition and the insecticidal activity of certain plants applied as powders and essential oils against two stored-products coleopteran beetles. *J Pest Sci*, 84: 393–402.
- Mudrončeková, S., Grulová, D., Barta, M., 2019: Insecticidal and repellent effects of plant essential oils against *Ips typographus*. *J Pest Sci*, 92: 595–608.
- Misra, G., Pavlostathis, S. G., Perdue, E. M., Araujo, R., 1996: Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45: 831–838.
- Pavela, R., 2011: Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Fabricius) adults. *Ind Crop Prod*, 34: 888–892
- Park, J. H., Jeon, Y. J., Lee, C. H., Chung, N., Lee, H. S., 2017: Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from *Thymus vulgaris* Lin. against *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., newly recorded pest. *Sci Rep.*, 7: 40902.
- Peixoto, M. G., Bacci, L., Blank, A. F., Araújo, A. P. A., Alves, P. B. et al., 2015: Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. *Ind Crop Prod*, 71: 31–36.
- Prates, H. T., Santos, J. P., Maquil, T. M., Fabris, J. D., Oliveira, A. B., Foster, J. E., 1998: Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J Stored Prod Res*, 34: 243–249.
- Saroukolai, A. T., Moharrampour, S., Meshkatalasadat, M. H., 2010: Insecticidal properties of *Thymus persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. *J Pest Sci*, 83: 3–8.
- Schmutterer, H., 1992: Control of diamondback moth by application of neem extracts. In: Talekar NS (ed) *Diamondback moth and other crucifer pests*. Proceedings of Second International Workshop Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei, Taiwan, p. 325–332.
- Szczepanik, M., Walczak, M., Zawitowska, B., Michalska-Sionkowska, M., Szumny, A., Wawrzeńczyk, C., Brzezinska, M. S., 2018: Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activity against the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) and *Artemisia dracunculus* L. essential oils. *J Sci Food Agr.*, 98: 767–774.
- Wang, J. L., Li, Y., Lei, C. L., 2009: Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Nat. Prod. Res.*, 23: 1080–1088.

---

#### Adresa:

RNDr. Silvia Hyblerová, PhD.

Výskumná stanica a múzeum Štátnych lesov TANAPu, Tatranská Lomnica 64, 059 60 Tatranská Lomnica

**e-mail:** hyblerova.silvia@gmail.com

RNDr. Daniela Grulová, PhD.

Prešovská univerzita, Fakulta humanitných a prírodných vied, Ul. 17. novembra č. 1, 080 01 Prešov

**e-mail:** daniela.grulova@unipo.sk

Ing. Marek Barta, PhD.

Ústav ekológie lesa, Akademická 2, 949 01 Nitra

**e-mail:** marek.barta@savba.sk