

POTVRDENIE ÚČINNOSTI ENTOMOPATOGÉNNEJ HUBY *BEAVERIA BASSIANA* PROTI TVRDOŇOVI SMREKOVÉMU (*HYLOBIUS ABIETIS*)

Michal Lalík • Juraj Galko • 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.: Confirmation of the effectiveness of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against the large pine weevil (*Hylobius abietis*). APOL, 2022, vol. 3, no. 2, p. 141–145.

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. Carriers were placed in two locations and in each location in two blocks (control block, carriers placed near seedlings). Three weeks later, 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. Mortality on blocks with a carrier was 71% and 77%. In the control block, the mortality of the image caused by the fungus was 4% and 0%.

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). Odhaduje sa, že v Európe ročne spôsobí škody v hodnote 120 mil. € (Lalík et al. 2021a). 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). Bol považovaný za škodcu mladých ihličnatých lesných porastov od začiatku minulého storočia (Trägårdh 1913). Populácia *H. abietis* je závislá na množstve čerstvých pňov, v ktorých sa vyvíjajú nové jedince (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).

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 entomopato-

génnej huby *B. bassiana*. Najviac limitujúcim faktorom na prežívanie spór je slnečné žiarenie (Posadas et al. 2012). V Európe sa niekoľko výskumov zameralo na výskyt EPH v populácií *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/na ktorom dokáže rásť a produkovať spóry. Na takýto nosič sme v roku 2019 podali Slovenskú patentovú prihlášku PP-79-2019, v roku 2020 bola na tento nosič podaná medzinárodná patentová prihláška PCT/SK2020/050007 a v roku 2021 európsku patentovú prihlášku Euro-PCT č. 20764176.2. Tento nosič s hubou *B. bassiana* a s vhodným atraktantom na prilákanie *H. abietis* sa ukazuje ako dobrý nástroj na ciele znižovanie 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.

Metodika

Pre nižšie opísané terénne pokusy bol použitý kmeň entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Nosiče boli vyrobené podľa patentovej prihlášky Euro-PCT č. 20764176.2.

Boli založené dve výskumné plochy v Liptovskej Porúbke (GPS súradnice: 48.955558, 19.684768) a Liptovskej Kokave (GPS súradnice: 49.125080, 19.866849) (obr. 1). Na každej ploche bolo vysadených 100 sadeníc smreka obyčajného (*Picea abies*) v dvoch samostatných blokoch po 50 sadeníc. K 50 sadeniciam boli umiestnené nosiče s hubou *B. bassiana* (obr. 2) a 50 sadeníc bolo kontrolných (bez nosičov huby B.b.). Pokus sa zakladal 31. 5. 2022.

Po troch týždňoch 21. 6. 2022 sme na všetky 4 bloky nainštalovali po 15 zemných pascí (spolu 60 ks), ktoré slúžili na odchyt imág *Hylobius abietis*. V ďalších dňoch sme každé ráno kontrolovali zemné pasce, či sa v nich nachádzajú imága *H. abietis*. Ak sa imága nachádzali v pasci, vybrali sme ich odtiaľ a umiestnili do Petriho misky, max. po 3 kusy do jednej misky. V Petriho miske bol kúsok smrekovej kôry ako potrava a vlhká buničina ako zdroj vody. Imága sme odchytili tri dni (spolu ich bolo 253) a následne boli prenesené do laboratória (obr. 3), kde sme ich jeden mesiac kontrolovali a zaznamenávali ich mortalitu a prerastanie (obr. 4). Mŕtve imága sa z misiek od živých odoberali a umiestňovali do samostatných misiek, aby nenastala sekundárna infekcia. Prvú kontrolu sme vykonávali po 7 dňoch a následne sa kontrola vykonávala každé 3 – 4 dni a ku koncu sledovania každých 7 dní.



Obrázok 1. Výskumné plochy L. Kokava a L. Porúbka
Figure 1. Research areas L. Kokava and L. Porúbka

Obrázok 2. Sadenica s nosičom
Figure 2. Seedlings with carrier



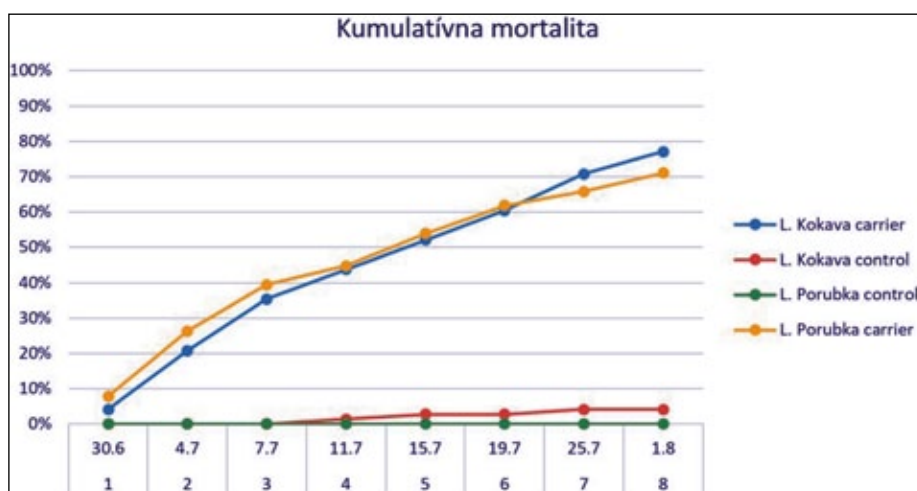
Obrázok 3. Petriho misky s chrobákmi
Figure 3. Petri dishes with beetles



Obrázok 4. Prerastené imágo *H. abietis*
Figure 4. Infected imago of *H. abietis*

Výsledky

Výsledky naznačujú, že imága odchytené z ošetrovaných blokov, kde boli umiestnené nosiče, sa dokázali infikovať spórami a následne v priebehu niekoľkých dní začali hynúť. Už počas prvej kontroly začali imága z ošetrovaných blokov s nosičom prerastať. V polovici laboratórneho sledovania (15. 7.) bola už viac ako polovica imág z oboch lokalít z infikovaných blokov prerastená. Na konci sledovania dňa 1. 8. (po 40 dňoch) dosiahla mortalita a prerastanie imág z lokality L. Porúbka 71 % a z lokality L. Kokava 77 % (obr. 5).



Obrázok 5. Kumulatívna mortalita *H. abietis* z výskumných lokalít L. Kokava a L. Porúbka
Figure 5. Cumulative mortality of *H. abietis* from L. Kokava and L. Porúbka research sites

Záver

Dosiahnuté výsledky potvrdzujú zistenia z minulých rokov. Nosiče kolonizované entomopatogénnou hubou *B. bassiana* by mohli byť vhodné na zníženie množstva *H. abietis* v lesoch. Výsledky naznačili, že imága *H. abietis* môžu byť infikované *B. bassiana* už po krátkom vystavení nosičom. Použitie nosičov znižuje miestnu početnosť *H. abietis* a pravdepodobne má minimálne účinky na ostatné bezstavovce. Počas trvania experimentu bola vysoká teplota a bez dažďových zrážok, čo tiež mohlo ovplyvniť prežívanie spór, avšak mortalita imág bola na vysokej úrovni. Okrem toho sme zistili, že s nosičom nie je potrebné používať syntetický atraktant, ale nosič stačí umiestniť k sadenici. Z dôvodu ekologických rizík spojených s používaním tradičných insekticídov výrobcovia pesticídov čoraz viac zvažujú vývoj a výrobu biopesticídov. Súčasný výsledky naznačujú, že nosič s *B. bassiana* môže byť 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-15-0348, APVV-18-0086, APVV-19-0116 a APVV-19-0119, APVV-21-0131 financovaných agentúrou APVV a projektu „PROMOLES“ – projekt financovaný z rozpočtovej kapitoly MPRV SR (prvok 08V0301). 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 realizovaného s finančnou podporou Ministerstva obrany Slovenskej republiky. Táto publikácia vznikla vďaka podpore zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a pre projekt Výskum a vývoj bezkontaktných metód pre získavanie geopriestorových údajov za účelom monitoringu lesa pre zefektívnenie manažmentu lesa a zvýšenie ochrany lesov (FOMON) č. p. 313011V465.

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, 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.
- 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. Národné lesnícke centrum - Lesnícky výskumný ústav 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 bioinsecticide. *Kavaka*, 41:23–32.
- 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, p. 171–220.
- Wallertz, K., Nordlander, G., Örlander, 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.

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

e-mail: michal.lalik@nlcsk.org