

# VYUŽITIE ENTOMOPATOGÉNNEJ HUBY *BEAVERIA BASSIANA* V OCHRANE SMREKA

Andrej Kunca • Jozef Vakula • Roman Leontovyč • Andrej Gubka

## Úvod

Rozsiahle kalamitné premnoženie podkôrneho hmyzu (KUNCA *et al.* 2008, KUNCA, ZÚBRIK 2008a) vyvoláva názory, že súčasné metódy boja sú nedostatočne účinné. Aj preto sa ponúkajú nové riešenia, ktoré majú aspoň teoretické predpoklady, aby veľmi dobre fungovali. Jedným z takýchto nádejných metód ochrany je aj využitie entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin.

Ide o mikroskopickú hubu, ktorá sa vyskytuje ako saprofyt v pôde bežne v prírodnom prostredí strednej Európy. Dokáže však spôsobovať aj ochorenie niektorých skupín hmyzu, ktoré je charakteristické bielym hustým vankúškovitým mycéliom a nazýva sa „white muscadine disease“, t. j. biele bobuľovité ochorenie. Pohlavné štádium bolo popísané až v roku 2001, nazýva sa *Cordyceps bassiana* Z.Z. Li, C.R. Li, B. Huang & M.Z. Fan a vyskytuje sa v prírodných podmienkach avšak len vo východnej Ázii. Jej entomopatogénne účinky však boli objavené už v roku 1835, ešte predtým ako bola pomenovaná (KUNCA, ZÚBRIK 2008b, ZÚBRIK *a kol.* 2008).

Keďže ide predovšetkým o pôdnu hubu, skúmali sa od počiatku jej patogénne účinky v prvom rade na pôdnych hmyzích škodcoch. Neskoršie výskumy ukázali, že mnoho pôdnych hmyzích škodcov má vyvinutú prirodzenú vysokú mieru tolerancie a teda nedochádza k vzniku patogénneho vzťahu. To však neplatí pre hmyzích škodcov na listoch, a preto výskum a komerčné využitie huby je v súčasnosti smerované predovšetkým proti listožravým a cicavým druhom hmyzu.

## Spôsob infekcie

Infekčným štádiom huby sú spóry, ktoré majú prirodzenú odolnosť voči prírodným podmienkam. Keď spóry huby prídu do kontaktu s hmyzom, vyklíčia, enzýmami rozpustia kutikulu a preniknú priamo cez porušenú kutikulu do vnútra tela, kde rýchlo kolonizujú mäkké pletivá. Napadnutý hmyz zomiera kvôli deštrukcii tkanív počas spotrebúvania živín mycéliom, niekedy však aj kvôli toxínom (napr. beauvericin) vyprodukovanými hubou, ktoré zoslabujú imunitný systém hostiteľa a ten zomiera na iné ochorenia. Aby huba ovládla mäkké tkanivá napadnutého hmyzu aj po jeho smrti, začína produkovať aj antibiotiká (napr. oosporein), ktorými vyraduje z konkurenčného boja črevné baktérie hmyzu. Výsledkom je, že celá dutina hmyzu je vyplnená hubovou hmotou.

Ak sú vonkajšie podmienky vhodné (napr. 92 % vlhkosť vzduchu a viac), huba preniká späť na povrch tela napadnutého hmyzu cez mäkkšie časti tela a vytvára charakteristický biely až sivý bobuľovitý vzhľad hmyzu. Na konci vzdušného mycélia sa tvoria nepohlavné spóry (konídiá) a rozširujú sa do prostredia najmä vetrom, vodou a kontaktom s inými organizmami.

Zatiaľ čo entomopatogénne vírusy a baktérie musia byť hostiteľským organizmom skonzumované, aby došlo k infekcii, u entomopatogénnych húb stačí prísť do kontaktu s povrchom hostiteľského organizmu, aby došlo k úspešnej infekcii. To je jedna z veľkých výhod aj huby *Beauveria bassiana*.

## Symptómy napadnutia

Napadnutý jedinec prestáva prijímať potravu a stáva sa letargický. Rýchlo umiera v blízkosti miesta napadnutia. Z miest „spojov telových častí“ vyrastá biele husté vankúškovité mycélium. Náchylné sú imága (dospelé jedince), ako aj vývojové štádiá.

## **Podmienky prostredia**

Podmienkou účinnosti je vlhkosť, ktorá umožní vznik infekcie. Vznik prirodzených rozsiahlejších epizootií je možný počas dlhšie trvajúcich vlhkých až mokrých období. K infekcii je však potrebná aj dostatočná teplota prostredia.

Limitujúcim faktorom je sucho, priame slnečné žiarenie (a z neho UV žiarenie), ale aj pesticídy. Je dokázané, že nielen fungicídy dokážu nepriaznivo ovplyvniť klíčenie spór a rast mycélia, ale aj napr. herbicídy.

## **Potenciálne využitie**

Súčasným problémom nie je biologická účinnosť *Beauveria bassiana*, ale spôsob prenosu jej spór na telá škodlivého hmyzu s minimálnym poškodením necielových druhov. Až sa vyrieši najvhodnejší spôsob aplikácie proti v súčasnosti modelovému druhu lykožrútovi smrekovému, vytvorí sa priestor pre boj aj proti iným podkôrníkovitým napr. *Pityogenes chalcographus*, *Ips duplicatus*, *Ips amitinus*, *Ips acuminatus*, *Ips sexdentatus*, *Scolytus intricatus*, *Scolytus scolytus*, *Hylesinus fraxini*, atď.

## **Skúsenosti s aplikáciou v roku 2008**

V roku 2008 sa realizovali pokusy s prípravkom BoVeril (dovozca BioTomal), ktorého účinnou látkou sú spóry *Beauveria bassiana* získané výberom jedného zo 4 kmeňov izolovaných na Slovensku.

## **Laboratórne pokusy**

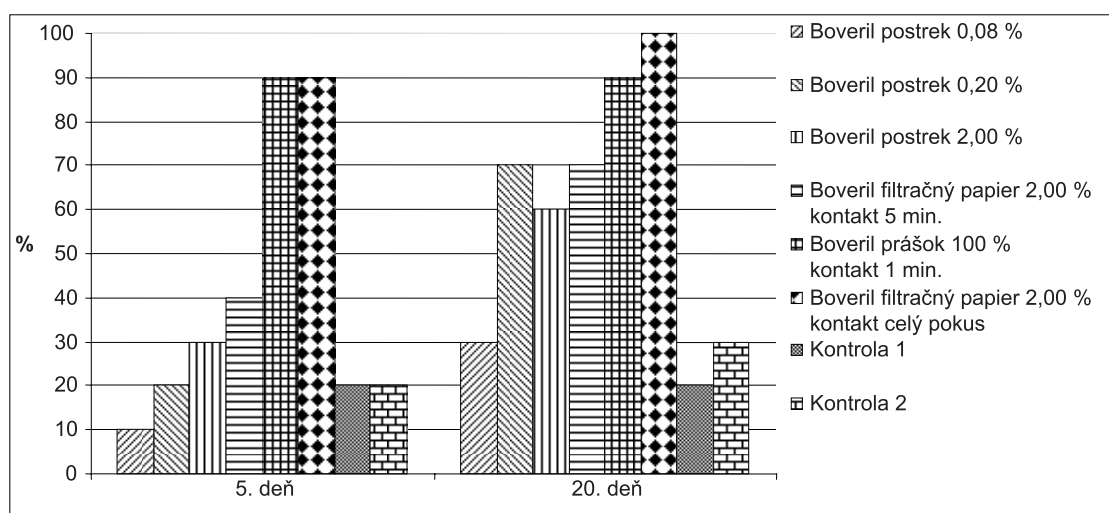
### **Metodika**

Prípravok BoVeril sa testoval v laboratórnych podmienkach Strediska lesníckej ochrannárskej služby v Banjskej Štiavnici a to chovom ošetrovaných a neošetrovaných imág lykožrúta smrekového v Petriho miskách. V pokusoch boli použité nasledovné varianty:

- priamy postrek imág 0,08 % roztokom,
- priamy postrek imág 0,20 % roztokom,
- priamy postrek imág 2,00 % roztokom,
- 5 minútový kontakt imág s filtračným papierom napusteným koncentráciou 2,00 % roztokom,
- 1 minútový kontakt imág v 100 % (čistom) prášku,
- kontakt imág počas celého pokusu (niekoľko dní do smrti imág) s filtračným papierom napusteným koncentráciou 2,00 %,
- neošetrované imága bez filtračného papiera a vody – kontrola 1,
- neošetrované imága s filtračným papierom a vodou – kontrola 2.

### **Výsledky**

Pri laboratórnom testovaní prípravku zabezpečením priameho kontaktu spór s imágami lykožrúta smrekového kolísala biologická účinnosť v závislosti od použitej varianty. Najvyššiu účinnosť (100 %) dosahoval prípravok pri priamej aplikácii suchého prášku na imága a kontakt imág s filtračným papierom napusteným 2 % roztokom BoVerilu počas celej doby pokusu. Koncentráciu prípravku 0,2 % dosahovala biologickú účinnosť 70 %. Na infikovaných jedincoch boli voľným okom viditeľné známky napadnutia hubou už po 5 dňoch od postreku (obr. 1).



Obrázok 1 Výskyt bieleho bobulovitého mycélia huby na mŕtvych imágach lykožrúta smrekového 5. a 20. deň po priamom ošetrení v laboratórnych podmienkach

## Terénne pokusy

### Metodika

Terénne testovanie sa zameralo jednak na preventívne ošetrenie nenapadnutého smrekového dreva, ako aj na asanačné (kuratívne) ošetrenie už napadnutého smrekového dreva. Použitá bola 0,1 % koncentrácia postrekovej zmesi (podľa príbalového letáku), ktorá sa po nariadení nechala odstáť 30 minút. Postrek sa vykonával v ranných hodinách, pri dennej teplote 18 – 28 °C. Na ošetrenie bol použitý 20 litrový ručný postrekovač CP3.

Testovací pokus sa založil 4. 6. 2008 na území Vojenských lesov a majetkov SR, š. p. Pliešovce, polesie Sklené, lesnícky obvod Longrunt, oddelenie 29 a 31. Zvolené boli tri lokality s rozdielnymi polohovými údajmi (tab. 2). Na predmetnom území sa vyskytuje vysoká populácia podkôrneho hmyzu, ktorý sa premnožil po snehových a vetrových polomoch v minulých rokoch.

Tabuľka 2 Stanovištné charakteristiky pokusných plôch

Plocha	Oddelenie	Súradnice GPS	Nadmorská výška [m]	Expozícia svahu	Expozícia por. steny
A	31	N 48°46,033' E 18°51,617'	732	S	Z
B	29	N 48°45,868' E 18°51,898'	741	SZ	JZ
C	31	N 48°45,569' E 18°51,855'	745	Z	J

Podľa schválenej metodiky sa zdravý smrek s výškou nad 25 m a priemerom nad 20 cm, po spílení odvetvil, rozdelil na pokusné (ošetrené) a kontrolné (neošetrené) sekcie o dĺžke 1 m, s medzerami medzi ošetrenými sekciami o dĺžke 0,2 m, bez rozpílenia kmeňa. Spílené kmene boli umiestnené v tieni a navnadené feromónovými odparníkmi IT Ecolure TUBUS, v počte 3 ks na kmeň. Pre udržanie vhodnej vlhkosti na povrchu kôry boli kmeňe prikryté vetvami.

Zvolili sa nasledovné **varianty** sekcií:

- I – prevencia, ošetrená pred naletením, BoVeril 0,1 %,
- II – ošetrená po naletení 1 týždeň, BoVeril 0,1 %,
- III – ošetrená po naletení 4 týždne, BoVeril 0,1 %,

IV – kontrola, neošetrená sekcia,

V – ošetrená po naletení 5 týždňov, BoVeril 0,1 %,

Ko – kontrola (neošetrené),

M – medzera medzi neošetrenými sekciami (neošetrená), 0,2 m.

Po rozdelení kmeňa sa pristúpilo najskôr k preventívnemu ošetreniu vo variantoch I, vo všetkých piatich opakovaníach, vždy tak, aby sa nekontaminovali susedné sekcie (prikrytie PE – plachtou). Neskôr, podľa plánovanej metodiky, sa ošetrili i ostatné sekcie. Kontroly ošetrenia (boli 4) sa robili po dvoch týždňoch od ošetrenia prípravkom. Pri odbere vzoriek sa odoberalo vždy 10 lariev alebo kukiel a 10 imág (ak boli prítomné) z ošetrenej aj z neošetrenej sekcie (kontroly), minimálne 75 jedincov. Zároveň sa odoberala i vzorka kôry z ošetrených sekcií. Celkové vyhodnotenie pokusu sa robilo v laboratóriu a bolo zamerané na výskyt huby *Beauveria bassiana* na jedincoch lykožrúta smrekového a taktiež i jej výskyt v požerkoch.

Po 8 týždňoch od založenia pokusu (v požerkoch boli larvy, kukly a žlté až hnedé imága nasledovného pokolenia lykožrútov) sa ukončil pokus a pristúpilo sa k asanačnému ošetreniu celých kmeňov prípravkom Vaztak 10 EC.

## Výsledky

Očakávali sme, že pri dobrej biologickej účinnosti:

- sa v požerkoch, na larvách, kuklách a na imágach zistí aplikovaná huba *Beauveria bassiana*,
- vývoj lariev vždy po nálete bude trvať nie viac ako 7 dní,
- a preto larválne chodby budú max. 1 – 2 cm dlhé,
- celkovo sa v oblasti zníži počet chrobákov odchytených do feromónových lapačov a zníži sa náhodná ťažba spôsobená podkôrnym hmyzom.

Pri rozboroch vzoriek kôry odobranej v októbri z kmeňov ošetrených v auguste BoVerilom bolo zistené, že:

- kôra bola husto „obsadená“ požerkami, v ktorých sa nachádzali larvy, kukly a imága,
- v larválnych chodbách a kuklových komôrkach boli zistené:
  - biele drobné kôpky mycélia huby – dodatočne v laboratóriu determinované ako entomopatogénna huba *Lecanicillium lecanii*,
  - na asi 1 – 2 mm čiernych stopkách s drobnou priesvitnou kvapkou na konci – tracheomykózna huba *Ophiostoma* sp.,
- na larvách a kuklách nebola zistená *Beauveria bassiana*,
- na chrobákoch a po kôrou *Beauveria bassiana* po 2 mesiacoch od aplikácie už nebola zistená.

Pri rozbere vzoriek sa nezistila prítomnosť huby *Beauveria bassiana* na analyzovaných jedincoch lykožrúta smrekového. Neboli zistené výrazné rozdiely v mortalite podkôrneho hmyzu na ošetrených sekciách v porovnaní s neošetrenými sekciami. Pod kôrou sa rozvinuli kompletne požerky lykožrúta smrekového. Taktiež sa nepreukázala kontaminácia rodičovských chrobákov, ktoré sa mali infikovať pri zavrtávaní cez ošetrenú kôru pri hĺbení závrtového otvoru.

Zistené huby v požerkoch *Lecanicillium lecanii* a *Ophiostoma* sp. sú prirodzenou mykoflórou požerkov, avšak na ošetrených sekciách v oveľa väčšej miere ako na neošetrených sekciách. Zatiaľ čo *Ophiostoma* sp. spôsobuje modranie dreva, *Lecanicillium lecanii* napádala larvy a kukly podkôrníkov a čiastočne spôsobovala ich mortalitu.

Príčin, ktoré spôsobili, že sa nezistila prítomnosť aplikovanej huby ako aj očakávaná biologická účinnosť biopreparátu BoVeril, mohlo byť niekoľko:

- nízka koncentrácia aplikovaného prípravku (aplikovala sa 0,1 % konc.) pri aplikačnej dávke bola 2 – 5 l roztohu na 1 m<sup>3</sup>,

- pravdepodobne kratšia doba trvania biologickej účinnosti ako 2 mesiace (čo je účinnosť registrovaných pyreteroidov), čo však treba ďalšími pokusmi overiť,
- nevhodné termínovanie aplikácie s ohľadom na vegetačné obdobie a vývojové štádium imág (aplikovalo sa v auguste na druhé rojenie),
- chýba presnejšia metodika vyhodnocovania biologickej účinnosti biopreparátu, keďže účinok nemusí byť len priamy na imága, ale aj nepriamy s ohľadom na plodnosť potomstva lykožrútov smrekových, iné entomopatogénne organizmy žijúce pod kôrou, atď.

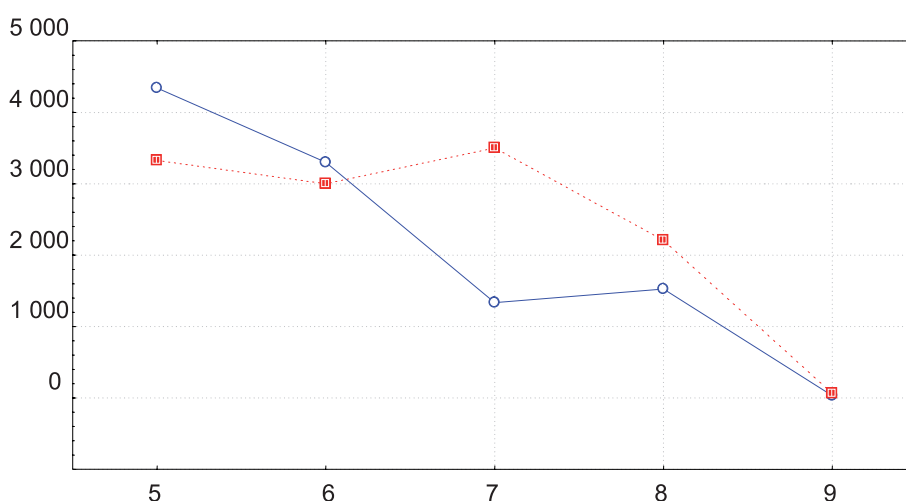
Pri hodnotení odchytov do feromónových lapačov v porastoch ošetrovaných a neošetrovaných na OZ Námestovo bolo zistené, že v júli došlo k výraznému zníženiu odchytov v porastoch ošetrovaných prípravkom BoVeril. Následne v auguste sa odchty vyrovnali (obr. 2), akoby sa účinok po mesiaci znížil až stratil. Predpokladáme, že v terénnych podmienkach je biologická účinnosť prípravku kratšia a nižšia ako v podmienkach laboratórnych. Je však potrebné overiť ich účinnosť v porovnaní s registrovanými pyreteroidmi, u ktorých je biologická účinnosť asi 8 týždňov.

Zmena aplikácia biopreparátu z letného rojenia na jarne rojenie prezimujúcej generácie môže mať zásadný vplyv na celoročný priebeh vývoja populácie podkôrníkov. Po zimnom období sú podkôrníky oslabené a teda na úspešnú infekciu a kolonizáciu stačí aj nižší počet spór. Jarne obdobie je vlhkejšie ako letné, a preto prežívanie aplikovaných spór je úspešnejšie ako v suchom a horúcom letnom období.

### Letecké postreky

Letecké veľkoplošné aplikácie prípravku Lesnícka ochranná služba neodporúča z týchto dôvodov:

- Letecké aplikácie sa vykonávajú prevažne za teplého dňa. Aj keď sa realizujú v ranných hodinách, teplo a slnečné žiarenie čiastočne inaktivujú padajúce spóry na povrch lesa.
- Cieľom je zasiahnuť lykožrútov, prípadne povrch dreva, po ktorom imága môžu prejsť. Vetvy a ihlice, ktoré sú zasiahnuté leteckým postrekom, nie sú cieľovým substrátom aplikácie prípravku (či už biologického prípravku alebo pyreteroidu).
- Aplikácia dávka roztoku by musela byť vyššia ako bežné letecké veľkoobjemové aplikácie. ULV aplikácie sú kvôli nízkej dávke vody nevhodné.
- Chýba viacej informácií o účinnosti prípravku na necieľové druhy, ktoré by tým boli výrazne zasiahnuté.



Obrázok 2 Vývoj odchytov v porastoch ošetrovaných a neošetrovaných – množstvo odobraných chrobákov v určitý mesiac (bez ohľadu na počet dní odchytu)



## Odporúčaná metodika aplikácie pre rok 2009

Pre výskum sa odкрývajú mnohé otázky, ktoré treba zodpovedať, aby používanie bioprípravku v lesnom prostredí proti kalamitne premnoženým podkôrnikom malo význam. Sú to úlohy na niekoľko rokov a aj preto sa na Stredisku LOS budujú laboratória pre výskum biologických metód ochrany lesa v rámci Centra excelentnosti biologických metód ochrany lesa. Úlohou výskumu pre rok 2009 je:

- overiť dĺžku biologickej účinnosti biopreparátu na báze *Beauveria bassiana*,
- overiť prežívanie spór vo feromónových lapačoch pri zvýšených letných teplotách,
- overiť účinnosť 0,2 % roztoku bioprípravku,
- pokračovať v overovaní metodológie aplikácie bioprípravku na lapáky a vyhodnocovanie účinnosti,
- skúmať vplyv na necieľové druhy organizmov;

Vzhľadom na skúsenosti z aplikácie biologického materiálu z predchádzajúcich rokov odporúčame obhospodarovateľom pre rok 2009 nasledujúci spôsob aplikácie prípravku BoVeril:

- Odporúčame ošetrovať lapáky a to tesne pred ich naletením v jarnom období. Pre zatriktívnenie môžu byť navrhované feromónovým odparníkom. Aplikácie v letnom období sústrediť tak, aby lapáky boli vo vlhkom prostredí a v tieni.
- Z prípravku BoVeril namiešať roztok v koncentrácii 0,2 %.
- Roztok aplikovať rosičom alebo postrekovačom v dávke 6–7 litrov roztoku na 1 m<sup>3</sup> drevnej hmoty.
- Zabezpečiť kontrolu lapáku každé 2 týždne.
- V prípade, že pri kontrole vývojových štádií na lapáku sa zistí, že vývoj podkôrnikovitých sa dostal do štádia kukly resp. žltého chrobáka, asanovať takýto lapák odkôrnením, kôru následne spáliť (KUNCA a kol. 2008) alebo registrovaným pyreteroidom.

### Zásady práce s biopreparátom:

- Používať čisté nádoby pre namiešanie prípravku a čistú nádobu postrekovača resp. rosiča. Najlepším riešením je vyhradiť samostatné nádoby pre miešanie a aplikáciu biologického prípravku.
- Používať vodu bez chlóru (pripraviť vodovodnú vodu deň pred miešaním s prípravkom).
- Prípravok pripraviť 0,5 – 3 hodiny pred aplikáciou a to v takom objeme, aby bol celý namiešaný objem spotrebovaný ešte v daný deň jeho prípravy. V ďalší deň namiešať čerstvý roztok.
- Nemiešať biopreparát s inou skupinou pesticídnych prípravkov.

### Záver

Laboratórnymi testami sa potvrdilo, že bioprípravok BoVeril pri kontakte s imágom lykožrúta smrekového ho usmrtí a to na 5. deň od aplikácie už pri koncentrácii 0,08 %. So zvyšovaním koncentrácie mortalita stúpala.

Výsledky terénneho ošetrenia lapákov v roku 2008 ukázali, že prípravok BoVeril pri danej koncentrácii má pravdepodobne kratšiu biologickú účinnosť, ako sa predpokladalo. Môže to byť dôsledok nízkej koncentrácie BoVerilu (0,1 %), veľmi teplého a suchého počasia v júli a auguste, alebo nedostatočného zabezpečenia priameho kontaktu prípravku s lykožrútom smrekovým, ktorý žije prevažnú časť života skryte pod kôrou smreka. Pravdepodobne tieto skutočnosti mali najvýraznejší podiel na nižšej spokojnosti testovaného bioprípravku v terénnych podmienkach.

Dôležitými poznatkami ďalej sú:

- *Beauveria bassiana* sa nepremnožila,
- nebol zistený nadmerný úhyn necieľových organizmov,
- nebola zistená toxicita okolitých stromov, krov a bylín,
- biologická účinnosť proti podkôrnym druhom škodcov existuje (výsledok laboratórných testov).

## Literatúra

- KUNCA, A. *et al.*, 2008: Problémy ochrany lesa v roku 2007 a prognóza na rok 2008. In Kunca, A. (Ed.), Zborník referátov z medzinárodnej konferencie Aktuálne problémy v ochrane lesa 2008, 17. – 18. 4. 2008, Nový Smokovec, p. 5–18.
- KUNCA A., ZÚBRIK M., 2008a: Dokážeme ju využiť na obranu porastov pred podkôrnym hmyzom? Jeden z patogénom lykožrúta smrekového – entomopatogénna huba *Beauveria bassiana*. Les/Slovenské lesokruhy, **64**(3–4): 38–39.
- KUNCA A., ZÚBRIK M., 2008b: Hodnotenie dynamiky vývoja populácie podkôrneho hmyzu indexnou analýzou na príklade odchytovej imág *Ips duplicatus* Sahlberg zo severozápadného Slovenska. Lesn. Čas. - Forestry Journal, **54**(2): 127–139.
- KUNCA A., ZÚBRIK M., LEONTOVÝČ R., VAKULA J., 2008: Trojstretnutie českých, poľských a slovenských špecialistov lesníckych ochranných služieb. Les/Slovenské lesokruhy, **64**:(11–12): 72.
- ZÚBRIK M., KUNCA A., NOVOTNÝ J., VARÍNSKY J., VAKULA J., 2008: Entomopatogénny podkôrny hmyz a možnosti ich použitia v biologickej ochrane lesa. In Kunca, A. (Ed.): Aktuálne problémy v ochrane lesa 2008, Zborník referátov z medzinárodnej konferencie, 17. – 18. 4. 2008, Nový Smokovec, Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen, p. 67–76.

### Adresy autorov:

**Ing. Andrej KUNCA, PhD., Ing. Jozef VAKULA, Ing. Roman LEONTOVÝČ, PhD., Ing. Andrej GUBKA, PhD.**

Národné lesnícke centrum - Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Stredisko lesníckej ochranných služieb, Lesnícka 11  
969 23 Banská Štiavnica, e-mail: priezvisko@nlcsk.org