ŠTÚDIA VYUŽITIA METÓDY SIT V BOJI S LYKOŽRÚTOM SMREKOVÝM *IPS TYPOGRAPHUS*

Jozef Vakula • Milan Zúbrik • Andrej Gubka • Juraj Galko • Slavomír Rell • Andrej Kunca • Michal Lalík • Roman Leontovyč • Christo Nikolov • Ján Jurica • Zuzana Balandová • Ján Bučan

Vakula, J., Zúbrik, M., Gubka, A., Galko, J., Rell, S., Kunca, A., Lalík, M., Leontovyč, R., Nikolov, C., Jurica, J., Balandová, Z., Bučan, J.: Use of the SIT method in forest protection against *Ips typographus*. APOL, 2022, vol. 3, no. 1, p. 3–14.

Abstract: Research on the SIT (Sterile Insect Technique) method has received little attention in the field of forest protection. Only a few papers have been published concerning the basic research of the SIT method on *Lymantria dispar* and *Ips typographus*. In our experiment, *Ips typographus* beetles were exposed to 20 Gy and 30 Gy gamma radiation. The effect of radiation on the vitality and reproduction of the F0 and F1 generations was studied. After irradiation, imagoes were kept on spruce logs in the insectarium and on a stem in the forest. There was a statistically significantly lower number of galleries in the 30 Gy variant, the number of galleries with larval tunnels, the number of larval tunnels per 1 maternal tunnel, and the number of F2 generation beetles in the insectarium. No statistically significant differences were found between the irradiated variants and the control beetles in the forest. After irradiation of both sexes with a dose of 30 Gy, the males were partially sterilized, which reduced the number of galleries with larval tunnels by an average of 20% and a reduction in the number of larval tunnels per 1 maternal tunnel by 57%. Our experiments to irradiate both sexes with a dose of 20 Gy and 30 Gy did not confirm the complete hereditary sterility of the *Ips typographus*, and the development of the F2 generation was successful. Radiation doses of 20 Gy and 30 Gy do not ensure sufficient sterility, but at higher doses, there is a significant increase in the mortality of the imagoes. Experiments in the forest on stem achieved lower results variability and F0 generation mortality due to more suitable environmental conditions.

Key words: SIT method; *Ips;* spruce; bark beetle

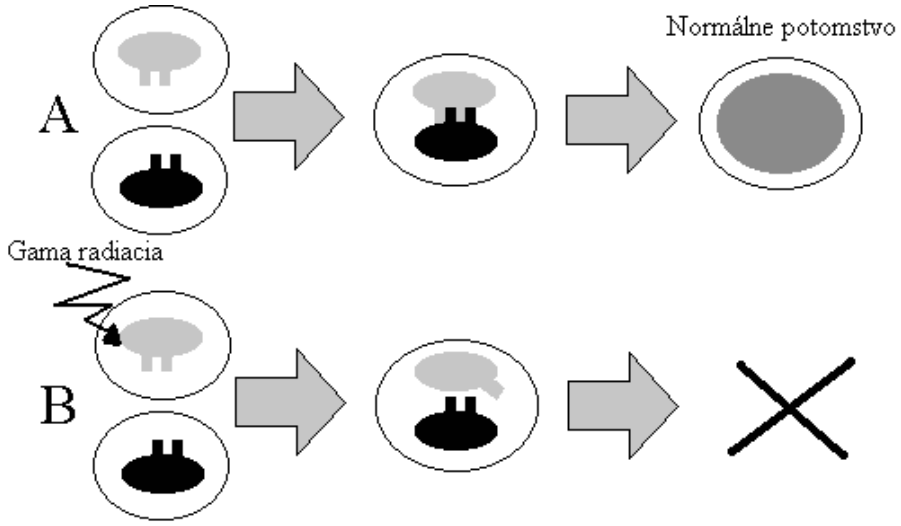
1. Problematika

Súčasným európskym trendom je znižovanie používania pesticídov, čo je zároveň jedným z cieľov integrovanej ochrany lesa. Chemické insekticídy sú relatívne lacné, ale majú mnohé nevýhody. Poškodzujú životné prostredie, ničia prirodzených nepriateľov škodlivého hmyzu, zanechávajú v prírode rezíduá a škodca si voči nim postupne vytvára rezistenciu. Aj napriek tomu, že svetové ročné náklady na použitie pesticídov sú približne 35 miliárd amerických dolárov, ktoré sú vynaložené na aplikáciu 3 miliónov ton pesticídov, je stále viac ako 40 % produkcie plodín poškodených škodcami, čo predstavuje stratu 750 miliárd dolárov (Oerke et al. 1994). Z tohto množstva poškodí práve hmyz 14 % plodín, čo je najviac. Najvyššie množstvo pesticídov sa spotrebuje v Európe, za roky 1995 – 2005 je to priemerne ročne 1 milión ton (Pimentel 2007). Neustále silnie tlak na zastavenie používania pesticídov, dochádza k zväčšovaniu území, kde nie je možné tieto prípravky používať. Sú to napr. územia s rôznym stupňom ochrany prírody, certifikované lesy alebo pásma hygienickej ochrany vodných zdrojov. Postupný ústup od aplikácie chemických prípravkov deklaruje Európska únia aj postupným prehodnocovaním a vyraďovaným účinných látok z európskeho zoznamu účinných látok. Tieto trendy však zatiaľ nie sú v adekvátnej miere kompenzované zavádzaním nových, účinných, ekologických metód ochrany lesa a účinná alternatíva tak stále chýba.

Jednou z negatív nových, enviromentálne vhodných metód je ich cena. Ako všetko nové aj tieto metódy sú často nákladnejšie ako dlhodobo zaužívané technológie. V potravinárstve však už dnes exis-

tujú určité tlaky, ktoré nútia producentov i napriek vyššej cene, používať ekologicky čisté metódy. Tu je priestor pre také metódy, ako je metóda sterilného hmyzu SIT (Sterile Insect Technique). Nemožno očakávať, že v dohľadnom čase nájde metóda SIT masové uplatnenie v lesníctve a vytlačí používanie chemických insekticídov. Na druhej strane by mohla pre budúcnosť, v prípade pozitívneho vývoja predstavovať istú alternatívu. Je len samozrejmé, že skôr ako začneme nahrádzať insekticídy inými spôsobmi ochrany, musíme objektívne zhodnotiť všetky pozitíva, ale i riziká ktoré nové metódy so sebou prinášajú. Metóda sterilného hmyzu SIT nie je nová, jej výskum začal už v 30. rokoch 20. storočia a po prvýkrát bola testovaná v terénnych podmienkach v roku 1955 (Knipling 1955; Klassen & Curtis 2005). Táto environmentálne akceptovateľná metóda bola odvtedy úspešne použitá na mnohých druhoch škodlivého hmyzu, predovšetkým v poľnohospodárstve (Lindquist 1984; Krafsur 1998). Je plne druhovo špecifická a nemá ekologicky nežiaduci dopad na iné druhy organizmov. Technológia vypúšťania sterilného hmyzu SIT je rutinne používaná v Ázii, Severnej a Južnej Amerike a čiastočne v Afrike. Najväčšie úspechy v praktickom poľnohospodárstve a lesníctve boli v tomto smere dosiahnuté v USA, Japonsku, Kanade, Mexiku, Guatemale, Kostarike, Argentíne, Peru, Brazílii, Izraeli, Sýrii a v ďalších krajinách. V USA investujú ročne do pesticídov 8 miliárd dolárov, ktoré ochránia úrodu za 30 miliárd dolárov, zatiaľ čo alternatívne nechemické metódy ochránia úrodu za ďalších približne 30 miliárd dolárov ročne (Pimentel 1997).

Metóda SIT je založená na umelej produkcií veľkého množstva jedincov, ktoré sú sterilizované a následne vypúšťané do prostredia. Metóda musí byť však použitá celoplošne, čo znamená, že ošetrená plocha nesmie priamo susediť s plochou neošetrenou. Knipling (1972) použil jednoduché modely aby dokázal, že ak zostanú v populácii škodcu čo i len malé časti územia neošetrené, môžu v krátkej dobe úplne anulovať vplyv tejto metódy na celkovú populáciu škodcu. Podstata SIT je v tom, že umelo vypustené sterilné jedince sa pária s fertilnými jedincami toho istého druhu opačného pohlavia v prirodzenom prostredí škodcu, pričom dochádza k zabráneniu normálneho reprodukčného procesu (obr. 1). Výsledkom je znížená reprodukcia škodcu, resp. jeho úplná eliminácia na ošetrovanom území. Technológia SIT má viacero limitov, vyžaduje zvládnutie umelého chovu škodcu, je vysoko náročná na manažment a znalosť biológie cieľového organizmu, musí sa aplikovať na veľkých výmerách, pretože iba vtedy je možné dosiahnuť úspech a iba vtedy je ekonomicky rentabilná (Knipling 1979). Cieľovými druhmi, proti ktorým je metóda SIT v praxi používaná sú napr. *Bactrocera* sp., *Anastrepha* sp., *Ceratitis capitata*, *Cydia pomonella, Glossina* sp. a *Lymantria dispar*. V lesníctve je zatiaľ najlepšie spracovaná a zvládnutá metóda umelého chovu mníšky veľkohlavej *Lymantria dispar*, preto je tento druh z tohto hľadiska do budúcnosti najperspektívnejší (Novotný & Zúbrik, 2003).



Obrázok 1. Princíp SIT metódy, normálny rodičovský pár (A) produkuje životaschopné potomstvo, spojenie sterilného samca a normálnej samice (B) neprodukuje potomstvo

Figure 1. *Principle of the SIT method, a normal parental couple (A) produces viable offspring, although combination of a sterile male and a normal female (B) does not produce offspring.*

Lykožrút smrekový *Ips typographus* (L.) je jedným z najvýznamnejších hmyzích škodcov dospelých smrekových lesov *Picea abies* (L.) Karst. v celej Eurázii (Sauvard 2007). Opakovane sa premnožuje, pričom bývajú napadnuté tisíce štvorcových kilometrov lesa a premnoženia majú za následok úhyn miliónov stromov. Na Slovensku je lykožrút smrekový najvýznamnejší biotický škodca lesa, premnožuje sa najčastejšie po vetrových kalamitách, posledných 20 rokov aj v suchom oslabených smrečinách. Okrem toho, že sucho a vysoké teploty pôsobia negatívne na hostiteľskú drevinu smrek, pôsobia väčšinou pozitívne na populáciu lykožrúta smrekového. Tá sa v zmenených podmienkach správa agresívnejšie, má viac generácií za rok, rýchlejší vývoj, menšiu mortalitu a pod. Vrcholy posledných dvoch gradácií lykožrúta smrekového na Slovensku boli zaznamenané v rokoch 2008 – 2010, kedy bolo spracovaných 8,9 mil. m^3 dreva a v rokoch 2017 – 2019, kedy bolo spracovaných 11,0 mil. m^3 napadnutého dreva (Vakula et al. 2021). Jedná sa vôbec o dve najväčšie gradácie lykožrúta smrekového v celej histórií evidencie, od roku 1960.

Doterajšie výskumy SIT metódy na lykožrútovi smrekovom boli zamerané predovšetkým na stanovenie optimálnej dávky žiarenia, ktorá by zabezpečovala požadovanú sterilitu, bez výrazne zvýšenej vitality ožiarených jedincov (Turčáni & Vakula 2007). Ďalší výskum bol zameraný aj na vplyv žiarenia na reprodukčné a endokrinné bunky lykožrúta smrekového (Čičková et al. 2017). Optimálna dávka gama žiarenia potrebná na vyvolanie sterility sa líši od druhu k druhu a medzi pohlaviami rovnakého druhu hmyzu. Sterilizačná dávka gama žiarenia pre hmyz z čeľade Curculionidae, kde patrí lykožrút smrekový, je menej ako 100 Gy (Bakri et al. 2005). Príliš vysoká dávka žiarenia môže viesť k vysokej mortalite ožiarených jedincov, na strane druhej, príliš nízka dávka k neúplnej sterilite. Ožiarením dochádza aj k poškodeniu tráviaceho traktu lykožrútov, konkrétne stredného čreva, čo môže viesť k ich slabej vitalite. Lauzon & Potter (2012) dokázali, že dávky žiarenia používané pri SIT spôsobujú bunkové poškodenie epitelu stredného čreva, redukciu mikrobioty stredného čreva a redukciu tvorby peritrofnej membrány u samcov ovocných mušiek *Anastrepha ludens* a *Ceratitis capitata*. Žiarenie môže spôsobiť aj zmenu správania samcov, ktoré nie sú pri rozmnožovaní konkurencieschopné neožiareným samcom, potom má metóda slabý účinok. Veľmi dôležitou vlastnosťou tejto metódy je, že aj keď sa z časti vajíčok vyliahnu jedince následnej F1 generácie, tieto sú neplodné. Jedná sa o tzv. dedičnú sterilitu hmyzu, ktorá je pri tejto metóde využívaná.

Cieľom štúdie je výskum vplyvu pôsobenia gama radiácie s dávkou 20 Gy a 30 Gy na fertilitu a vitalitu lykožrútov smrekových chovaných v insektáriu na klátoch a na kmeni v lese.

2. Materiál a metódy

2.1. Zber, uskladnenie a triedenie pohlaví

Na realizáciu pokusov je potrebné zabezpečiť dostatočné množstvo zdravých, vitálnych jedincov lykožrúta smrekového. Najvhodnejšou metódou je založenie kontinuálneho chovu v laboratórnych podmienkach. Tento spôsob umožňuje produkovať vysoké počty lykožrútov, ktoré nie sú napadnuté parazitmi a patogénmi, jedná sa o tzv. čistý chov. Tento spôsob je najvhodnejší, no vyžaduje si zvládnutie chovu na umelej potrave. V prípade podkôrneho hmyzu, ktorého larvy žijú v lyku sa takúto potravu doposiaľ nepodarilo vyrobiť. Neúspešné pokusy s vysokou mortalitou boli realizované s umelou potravou, ktorá bola zložená z agaru, mletej smrekovej kôry a vody (Simek 1993; Mattanovich et al. 1999). Ak nie je dostupný umelý ekvivalent potravy, lykožrúty je možné chovať na čerstvých smrekových klátoch v insektáriach, jedná sa o chov na prirodzenej potrave. Tento spôsob je však prácny, závislý na dodávkach čerstvých klátov a je veľmi náročný na priestory a logistiku. Ďalšou metódou získania živých lykožrútov je ich odchyt z naletených kmeňov. Naletené kmene s požerkami, v ktorých sú živé jedince lykožrútov sa prevezú do fotoeklektorov, kde sa dochovajú a po vyletení sa odchytia do nádob umiestnených na fotoeklektoroch. Pri odchyte sa využíva pozitívna fototaxia lykožrútov na svetlo. Táto metóda má svoje negatíva, akými sú náročnosť na priestory a prácnosť. Medzi odchytenými jedincami budú aj infikované alebo parazitované jedince, ktoré nám ovplyvnia výsledky pokusov. Poslednou metódou je získavanie lykožrútov z feromónových lapačov, z jednodňových odchytov. Do odchytovej nádoby lapača je potrebné vložiť papier, aby boli lykožrúty čo najmenej stresované a nedochádzalo k poškodeniu

jedincov medzi sebou. Vhodné sú objemnejšie zberné nádoby s priehľadného materiálu. Táto metóda je pomerne jednoduchá, no zdravotný stav a vitalita odchytených lykožrútov je variabilná. Odchytíme výrazne menej samcov, max. 30 %, odchytené môžu byť aj samičky, ktoré zakladajú sesterskú generáciu. Jedince z lapačov môžu byť poškodené, parazitované a infikované hubami. Preto je potrebné vyberať na pokus len vitálne a aktívne jedince.

Odchytené lykožrúty sú uskladnené v chladničke pri teplote 5 – 10 °C. Osvedčilo sa uskladnenie v tmavej podzemnej pivnici pri teplote 10 °C a vlhkosti 50 %. Do nádoby s lykožrútmi sa umiestňuje smreková vetvička a servítka. Takto je možné uskladniť lykožrúty po dobu max. 5 dní, s predlžovaním doby uskladnenie výrazne klesá ich vitalita. Triedenie na samce a samice je časovo náročné, čo stresuje lykožrúty a významne zvyšuje ich mortalitu. Pri skladovaní lykožrútov dochádza k vysokej mortalite už po 3 dňoch. Dôležité je vyhýbať sa extrémnym rozdielom teplôt. Sexuálna separácia lykožrútov sa vykonáva podľa metodiky Schlytter & Cederholm (1981). Táto metóda je založená na sledovaní troch morgfologických znakov, z ktorých je najvýznamnejšia hustota chĺpkov v pronotálnej časti (predohruď) samcov a samíc. Na triedenie pohlaví sa používa stereomikroskop so zväčšením 42-krát, s použitím studeného osvetlenia.

2.2. Ožarovanie a chov

Na sterilizáciu lykožrútov sa používa gama žiarenie, ktorého zdrojom je Cobalt 60. Ožarovanie bolo realizované v Slovenskom metrologickom ústave Bratislava. Jedince boli počas prepravy umiestnené v prenosnej chladničke s ľadom, v plastových boxoch s rozmermi 18 × 13 × 8 cm (obr. 2). Z dôvodu vytvorenia konštantných podmienok boli prevážané aj jedince z kontrolných (neožiarených) variantov. V pokusoch boli použité dávky žiarenia 20 Gy a 30 Gy. V ten istý deň, ako boli lykožrúty ožiarené, boli založené pokusy. Chov lykožrútov po ožiarení bol vykonávaný na klátoch v insektáriu a na zrezanom kmeni v lese.

Obrázok 2. Nádoby s lykožrútmi umiestnené pred zdrojom žiarenia
Figure 2. *Containers with Ips typographus placed in front of the radiation source.*

Vplyv pôsobenia gama radiácie s dávkou 20 Gy a 30 Gy na fertilitu a vitalitu lykožrútov bol sledovaný prostredníctvom základných chovných parametrov, ako sú: mortalita rodičovských imág, podiel počtu všetkých požerkov k počtu vypustených samcov, podiel počtu požerkov s materskými chodbami k počtu všetkých požerkov a podiel počtu požerkov s larválnymi chodbami k počtu všetkých požerkov. Zároveň boli hodnotené aj detailné chovné parametre, ako sú: dĺžka materskej chodby, počet larvových chodieb na 1 materskú chodbu, dĺžka larvových chodieb a počet imág F1 generácie. Pokus prebiehal v roku 2021. Z dôvodu veľkých rozdielov hodnôt pri jednotlivých variantoch a lepšej interpretácie výsledkov bolo zvolené percentuálne vyhodnotenie sledovaných parametrov. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou jednofaktorovej analýzy variancie (ANOVA).

Chov na klátoch v insektáriu

Insektárium na chov sa nachádza vo vonkajšom krytom prostredí (obr. 3). Smrekové kláty v insektáriu sú umiestnené v boxoch s rozmermi 49 × 49 × 70 cm, predný otvor má rozmery 45 × 66 cm (obr. 4). Rám boxov tvorí hliníková konštrukcia, tri steny sú vyrobené z plexiskla a štvrtá (predná) z nylonovej sieťoviny. Kláty majú hrúbku 20 – 30 cm a dĺžku 50 cm. Klát umiestnený v boxe je na spodnej strane podložený papierom a stojí na drevených podstavcoch vo výške 3 cm. Vrchné čelo klátu je prikryté papierom, aby nedochádzalo k rýchlemu vysychaniu. Kláty boli pred použitím uskladnené vo vlhkej a chladnej pivnici, do boxov boli vložené 1 deň pred začiatkom pokusu. Po vypustení lykožrútov do boxov boli boxy čistené a mŕtve lykožrúty boli odstraňované.

Obrázok 3. Vonkajšie insektárium na chov podkôrneho hmyzu
Figure 3. *Outdoor insectarium for bark beetle breeding.*

Obrázok 4. Chovné boxy so smrekovými klátmi umiestnené vo vonkajšom insektáriu
Figure 4. *Breeding boxes with spruce logs located in the outdoor insectarium.*

Do každého chovného boxu v insektáriu bolo vypustených 20 samcov a 40 samíc. Každý z variantov pokusu mal 3 opakovania. V prvom variante pokusu boli ožiarené obe pohlavia dávkou 20 Gy, v druhom variante boli ožiarené obe pohlavia dávkou 30 Gy a v treťom variante boli chované neožiarené jedince (kontrola – 0 Gy). Každý z variantov mal 3 opakovania, spolu bolo založených 9 chovných boxov. Po ukončení vývoja prvej F1 generácie na klátoch boli vyletené lykožrúty vypustené na nové kláty do boxov, kde bol sledovaný vplyv gama radiácie na následnú F2 generáciu.

Chov na kmeni v lese

Z dôvodu namodelovania prirodzených podmienok pre vývoj lykožrútov boli pokusy s chovmi založené priamo v smrekovom lese na čerstvom kmeni. Kmeň bol pripravený 2 – 3 dni pred zakladaním pokusu. Zrezaný bol zdravý smrek v zapojenom poraste s hrúbkou $d_{1,3}$ 25 cm. Smrek bol odvetvený tak, aby nebola poškodená kôra a podložený do výšky 20 cm (obr. 5). Kmeň bol rozdelený na 9 sekcií, s dĺžkou sekcie 80 cm. Hranice sekcií boli pílou okrúžkované. Na kmeň bola natiahnutá pevná nylonová sieťovina široká 110 cm, s priemerom otvorov 1 mm (obr. 6). Na bočnej strane bol spoj preložený. Jednotlivé sekcie sa medzi sebou oddelili viazacím drôtom tak, že bol drôt tesne stiahnutý do pripravenej drážky po obvode. Horizontálny spoj bol na vrchnej strane pripnutý ku kmeňu spinkami a prekrytý drevenou latou s rozmermi 2 × 4 cm, ktorá bola pritiahnutá ku kmeňu samo reznými skrutkami. Pred vypustením chrobákov bola sieť na spoji uvoľnená, lykožrúty boli vypustené pod sieť a sieť sa opäť utesnila spinkami a latou. Sekcie boli prikryté zelenými vetvami.

Do každej sekcie bolo vypustených 20 samcov a 40 samíc. V prvom variante boli vypustené a chované ožiarené samce dávkou 20 Gy s neožiarenými samicami, v druhom variante boli chované ožiarené samce dávkou 30 Gy s neožiarenými samicami a v treťom variante boli chované neožiarené jedin-

ce (kontrola). Varianty na lapáku sa medzi sebou striedali tak, aby bolo vždy jedno opakovanie v spodnej, jedno v strednej a jedno vo vrchnej časti lapáku. Sekcie na lapáku boli po 5 týždňoch odkôrnené, prevezené a následne boli požerky v laboratóriu merané. Lykožrúty F1 generácie boli v čase merania požerkov v štádiu larvy.

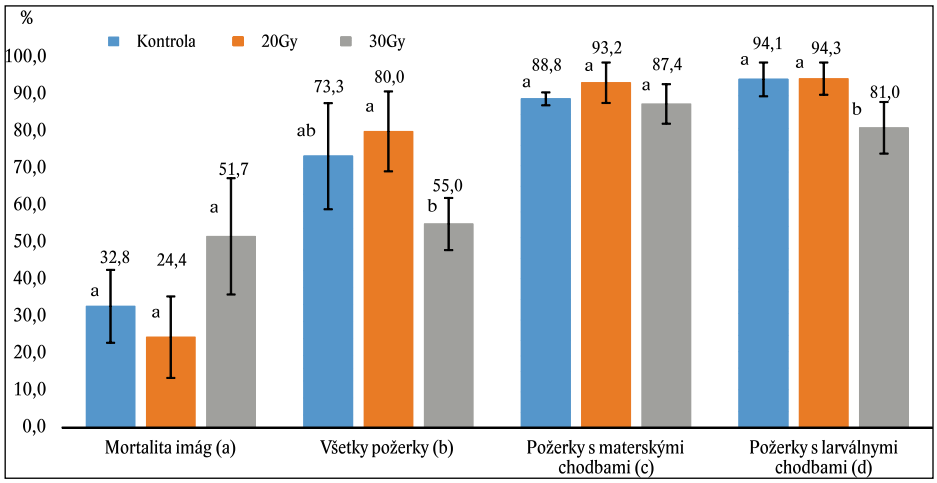
Obrázok 5. Kmeň rozdelený do sekcií, sekcie sú izolované od prostredia nilonovou sieťovinou
Figure 5. *Spruce stem separated to the sections, the sections are isolated from the forest environment by a nylon net.*

Obrázok 6. Štyri sekcie na kmeni prikryté nilonovou sieťou
Figure 6. *Four sections on the spruce stem covered by a nylon net.*

3. Výsledky a diskusia

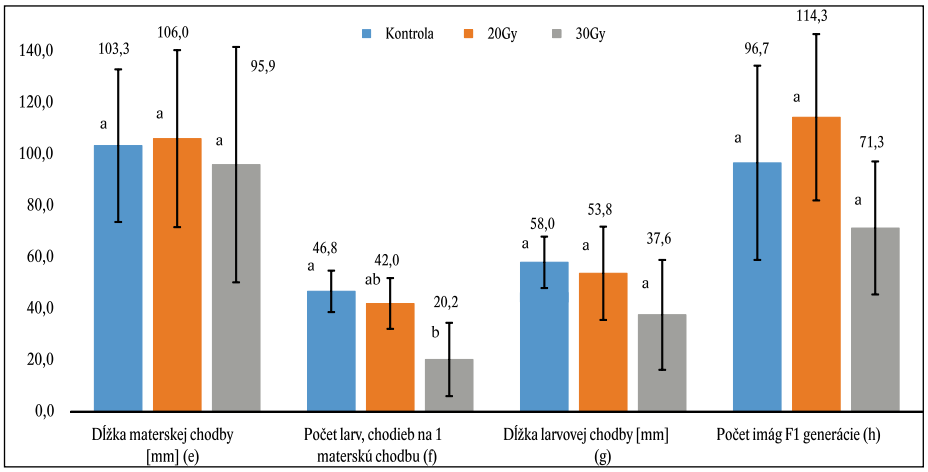
3.1. Chov na klátoch v insektáriu

Mortalita imág F0 generácie (a) bola najnižšia vo variante 20 Gy, dosahovala priemernú hodnotu 24,4 % (obr. 7). Najvyššia bola vo variante 30 Gy, dosahovala hodnotu 51,7 %. Najvyšší podiel požerkov (b) sa vyskytoval vo variante 20 Gy, dosiahol hodnotu 80,0 % a najnižší vo variante 30 Gy, s hodnotou 55,0 %. Počet požerkov s materskými chodbami (c) bol najnižší pri variante 30 Gy – 87,4 % a najvyšší pri variante 20 Gy – 93,2 %. Pri parametri počet požerkov s larválnymi chodbami (d) dosiahol najnižšiu hodnotu variant 30 Gy – 81,0 %, variant 20 Gy a kontrola dosahovali podobné hodnoty 94,3 %, resp. 94,1 %. Štatisticky významné rozdiely ($P < 0,05$) boli zistené medzi variantom 30 Gy a variantmi 20 Gy a kontrola a to v parametroch počet všetkých požerkov (b) a počet požerkov s larválnymi chodbami (d).



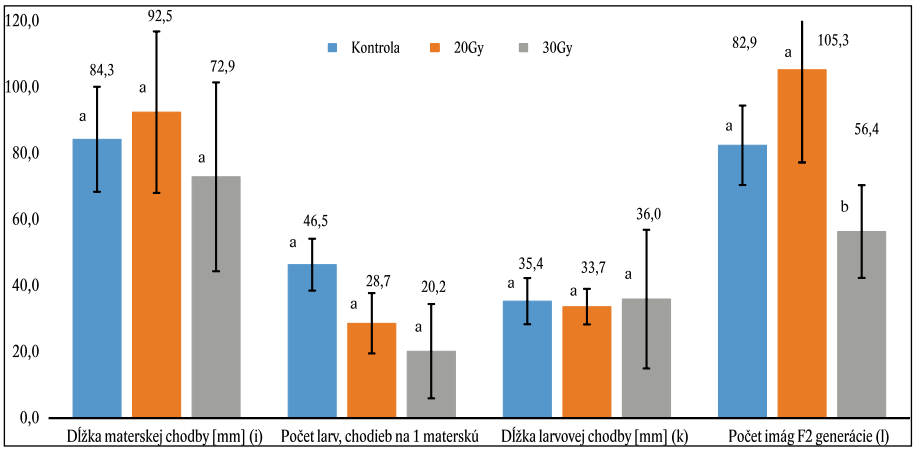
Obrázok 7. Porovnanie základných chovných parametrov generácie F0, v kontrolnom variante a ožiarených variantoch ♂♀ v insektáriu (priemerná hodnota ± smerodajná odchýlka)
Figure 7. *Comparison of basic breeding parameters of the F0 generation, in the control variant and irradiated variants ♂♀ in the insectarium (mean value ± standard deviation).*

Pri hodnotách detailných chovných parametrov mala dĺžka materskej chodby (e) pomerne vysokú variabilitu hodnôt v samotných variantoch, dosahoval priemerné hodnoty 95,9 mm pri variante 30 Gy až 106,0 mm pri variante 20 Gy (obr. 8). Hodnoty parametrov počet larvových chodieb na 1 materskú chodbu (f) a dĺžka larvovej chodby (g) sa so zvyšujúcou dávkou žiarenia znižovali, najnižšie hodnoty dosiahli pri dávke 30 Gy – 20,2 chodby, resp. 37,6 mm. Počet vyletených imág F1 generácie (h) bol najvyšší pri variante 20 Gy, z jedného klátu vyletelo priemerne 114,3 imág, zatiaľ čo pri variante 30 Gy vyletelo len 71,3 imág. Štatisticky významné rozdiely ($P < 0,05$) boli zistené v počte larvových chodieb na jednu materskú chodbu a to medzi variantom 30 Gy a variantom kontrola.



Obrázok 8. Porovnanie detailných chovných parametrov generácie F0 – F1, v kontrolnom variante a ožiarených variantoch ♂♀ v insektáriu (priemerná hodnota ± smerodajná odchýlka)
Figure 8. *Comparison of detailed breeding parameters of the F0 – F1 generation, in the control variant and irradiated variants ♂♀ in the insectarium (mean value ± standard deviation).*

Vyletené imága F1 generácie boli použité na založenie F2 generácie na nových klátoch v insektáriu. Počet požerkov s larválnymi chodbami bol pri variante 30 Gy o 20 % nižší, ako pri kontrole a o 15 % nižší ako pri variante 20 Gy. Priemerná dĺžka materskej chodby (i) bola najdlhšia pri variante 20 Gy – 92,5 mm, nasledovala kontrola – 84,3 mm a variant 30 Gy – 72,9 mm (obr. 9). Počet larvových chodieb (j) na jednu materskú chodbu bol najvyšší pri variante kontrola – 46,4 chodby, nasledoval variant 20 Gy – 28,7 chodby a variant 30 Gy – 20,2 chodby. Dĺžky larvových chodieb (k) boli veľmi podobné pri všetkých variantoch, s hodnotami 33,7 mm pri variante 20 Gy po 36,0 mm pri variante 30 Gy. Najvyššie rozdiely v priemerných hodnotách boli zistené pri počte vyletených imág F2 generácie (l), keď pri kontrole vyletelo 82 imág, vo variante 20 Gy – 105 imág a pri variante 30 Gy – 56 imág F2 generácie. Pri variante 30 Gy boli hodnoty vyletených imág štatisticky významne nižšie ($P < 0,05$), ako pri variante kontrola a 20 Gy.



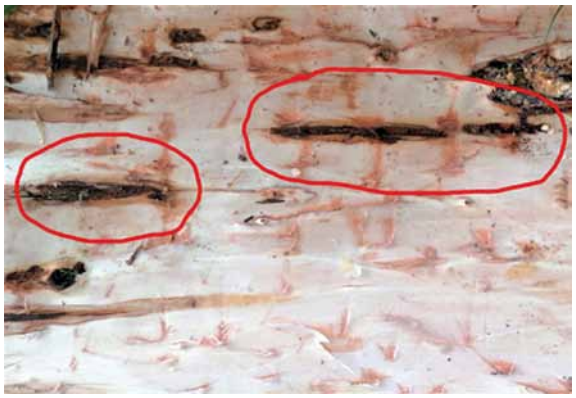
Obrázok 9. Porovnanie základných chovných parametrov generácie F1, v kontrolnom variante a ožiarených variantoch ♂♀ v insektáriu (priemerná hodnota ± smerodajná odchýlka)
Figure 9. *Comparison of basic breeding parameters of the F1 generation, in the control variant and irradiated variants ♂♀ in the insectarium (mean value ± standard deviation).*

3.2. Chov na kmeni v lese

Po odkôrnení kmeňa boli v kontrolnom variante nachádzané požerky s plne vyvinutými larválnymi chodbami (obr. 10, 11), zatiaľ čo v ožiarených variantoch boli nachádzané požerky bez larvových chodieb, resp. s redukovaným počtom larvových chodieb (obr. 12, 13). Na kmeni v lese boli rozdiely v základných chovných parametroch požerkov na lapáku minimálne, s výnimkou počtu požerkov s larválnymi chodbami, kde pri variante 30 Gy dosahoval 85 %, zatiaľ čo pri kontrole a variante 20 Gy to bolo 98 % zo všetkých požerkov. Priemerná dĺžka materskej chodby (m) dosahovala pri kontrole 83,6 mm, pri variante 20 Gy – 80,9 mm a pri variante 30 Gy – 92,0 mm (obr. 14). Počet larvových chodieb (n) bol najnižší pri variante 30 Gy – 26,2 chodby, zatiaľ čo pri variante 20 Gy to bolo 29,1 chodby a pri variante kontrola 34,5 chodby. Dĺžka larvovej chodby (o) bola najdlhšia pri kontrole – 38,9 mm a najkratšia pri variante 30 Gy – 25,6 mm. Počet jedincov F1 generácie nebol zisťovaný, pretože vývoj lykožrútov v čase odkôrňovania lapáku nebol dokončený. Štatistické významné rozdiely medzi ožiarenými variantmi a kontrolou neboli zistené.

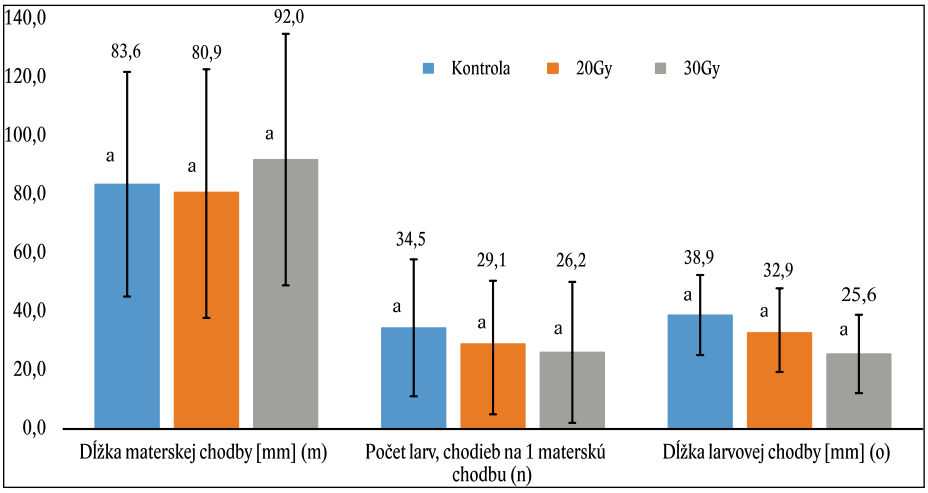
Obrázok 10. Odkôrňovanie sekcie na kmeni
Figure 10. *Debarking section on the stem.*

Obrázok 11. Odkôrnená sekcia vo variante kontrola, požerky sú plne vyvinuté
Figure 11. *Debarked section in the control variant, galleries are fully developed.*



Obrázok 12. Po odkôrnení sekcie variantu 30 Gy bola časť požerkov bez larvových chodieb
Figure 12. *After debarking the 30 Gy variant section, part of the swallow was without larval tunnels.*

Obrázok 13. Požerok s redukovaným počtom larových chodieb vo variante, kde boli samce ožiarené dávkou 30 Gy
Figure 13. *Gallery with reduced number of larval tunnels in the variant where the males were irradiated with a dose of 30 Gy.*



Obrázok 14. Porovnanie detailných chovných parametrov generácie F1–F2, v kontrolnom variante a ožiarených variantoch ♂ na kmeni v teréne (priemerná hodnota ± smerodajná odchýlka)
Figure 14. *Comparison of detailed breeding parameters of the F1 – F2 generation, in the control variant and irradiated variants ♂ on a stem in the field (mean value ± standard deviation).*

Výsledky preukázali, že pri ožiarení oboch pohlaví dávkou 30 Gy došlo k čiastočnej sterilizácií samcov, čo sa prejavilo na znížení počtu požerkov s larválnymi chodbami priemerne o 20 %. To znamená, že po nakladení znášky nedošlo k vyliahnutiu lariev s neoplodnených vajíčok. Zároveň došlo k zníženiu počtu larvových chodieb na jednu materskú chodbu F1 generácie, priemerne o 26,6 chodby, čo je o 57 % menej. Hodnoty parametrov požerkov jedincov ožiarených dávkou 20 Gy boli porovnateľné hodnotám parametrov v kontrolnom variante, v niektorých parametroch boli dokonca vyššie. Na jedince samičieho pohlavia nemá dávka 20 Gy a 30 Gy vplyv, čo sa neprejavilo na zhoršení ich reprodukčných charakteristík. Pri pokusoch s ožiarením oboch pohlaví dávkou 20 Gy a 30 Gy nebola dokázaná úplná dedičná sterilita lykožrútov, došlo k úspešnému vývoju F2 generácie. Hodnoty namerané na požerkoch na kmeni, kde boli ožiarené iba samce dosahovali nižšiu variabilitu výsledkov, čo súvisí s priaznivejšími podmienkami prostredia v lese. Tu sa znížil pri variante 30 Gy počet požerkov s larválnymi chodbami o 13 % a počet larvových chodieb bol v priemere o 8,3 chodby nižší ako pri kontrole.

Čičková et al. (2018) odporúča pre totálnu sterilitu lykožrúta smrekového dávku žiarenia 70 – 90 Gy. Táto dávka žiarenie štatisticky významne znížila úspešnosť liahnutia vajíčok v požerkoch na úroveň 17 – 27 % a zároveň znížila počet larvových chodieb na úroveň 30 % oproti kontrole. Na strane druhej táto dávka zvýšila mortalitu, čo sa prejavilo v počte požerkov, ktorých počet poklesol na polovicu oproti neožiarenému variantu. Bakri et al. (2005) odporúča sterilizačnú dávka gama žiarenia pre čeľaď Curculionidae menej ako 100 Gy. Pri pokusoch s ožarovaním lykožrúta smrekového (Vakula & Turčáni 2005 nepublikované) dosiahla mortalita pri dávke 50 Gy hodnotu 80 %, z tohto dôvodu bola v ďalších pokusoch odporúčaná dávka 10 – 30 Gy. Upozornili na to, že, veľmi dôležitými faktormi ovplyvňujúcim výsledky pokusov sú zdravotný stav ožiarených lykožrútov, kvalita potravy a podmienky prostredia. Z tohto dôvodu by bolo optimálne vykonávať pokusy priamo v lese, čo potvrdili aj výsledky našich pokusov z roku 2021. Aj keď sú experimenty vykonávané v lese prácnejšie, náročnejšie na logistiku, vykonávajú sa v menej kontrolovaných podmienkach, je mortalita ožiarenej generácie nižšia. V článkoch zaoberajúcich sa chovom a ožarovaním lykožrúta smrekového sa vyskytuje pomerne vysoká variabilita výsledkov. Toto je spôsobené jednak rôznou kondíciou lykožrútov použitých v chovoch, ale aj určitou chybovosťou pri komplikovanej separácií jedincov na samce a samice. Budúci výskum by mal byť primárne zameraný na masový chov vitálnych jedincov lykožrúta smrekového na umelej potrave a výskum jednoduchého a rýchleho triedenia pohlaví lykožrúta smrekového, ktorého pohlavný dimorfizmus je veľmi malý.

Úspešnosť metódy SIT dokumentuje množstvo príkladov v poľnohospodárstve. V Argentíne je používaná proti škodcovi citrusových plodov vrtivke mediterannej *Ceratitis capitata*. Tu bolo na výmere 290 tis. ha sadov v rokoch 1992 – 1994 vypúšťaných 70 – 200 miliónov sterilných jedincov týždenne.

Výsledkom bolo zníženie početnosti škodcu na 2 % predchádzajúcej úrovne (De Longo et al., 2000). K dosiahnutiu takto úspešných praktickým výsledkov však predchádzali desaťročia výskumu zameraného na umelý chov škodcu a samotné pokusy. V lesníctve zatiaľ nemáme praktické výsledky, výskumu SIT metódy je len na začiatku a počet projektov zameraných na túto problematiku je malý. Na rozdiel od poľnohospodárstva, kde produkcia ekologicky čistých potravín vedie pestovateľov i za cenu vyšších nákladov k použitiu ekologických metód, v lesníctve zatiaľ nie sú také vonkajšie tlaky, ktoré by nútili majiteľov lesa seriózne rozmýšľať o nahradení insekticídov inými spôsobmi obrany, napr. aj drahšími ale ekologickejšími. Väčšina nových metód v lesníctve zostáva na experimentálnej úrovni. Pritom práve lesné ekosystéme sú omnoho bohatšie, ako sú ekosystéme kultúrnej krajiny a zaslúžili by si o to väčšiu ochranu.

4. Súhrn

Výskumu metódy SIT (Sterile Insect Technique) bola doposiaľ v oblasti ochrany lesa venovaná malá pozornosť. Publikovaných bolo len niekoľko prác týkajúcich sa základného výskumu SIT metódy na mníške veľkohlavej (*Lymantria dispar*) a lykožrútovi smrekovom (*Ips typographus*). V našom pokuse boli imága lykožrúta smrekového vystavené gama žiareniu 20 Gy a 30 Gy a bol sledovaný vplyv žiarenia na vitalitu a reprodukciu F0 a F1 generácie. Lykožrúty boli po ožiarení chované na smrekových klátoch v insektáriu a na kmeni v lese. V insektáriu, kde boli chované ožiarené samce aj samice bol vo variante 30 Gy štatisticky významne nižší počet požerkov, počet požerkov s larválnymi chodbami, počet larvových chodieb na 1 materskú chodbu a počet vyletených jedincov F2 generácie. Na kmeni v lese štatistické významné rozdiely medzi ožiarenými variantmi a kontrolou neboli zistené. Po ožiarení oboch pohlaví dávkou 30 Gy došlo k čiastočnej sterilizácií samcov, čo sa prejavilo na znížení počtu požerkov s larválnymi chodbami priemerne o 20 % a znížení počtu larvových chodieb na jednu materskú chodbu o 57 %. Pri pokusoch s ožiarením oboch pohlaví dávkou 20 Gy a 30 Gy nebola dokázaná úplná dedičná sterilita lykožrútov, došlo k úspešnému vývoju F2 generácie. Dávka žiarenia 20 Gy a 30 Gy nezabezpečuje dostatočnú sterilitu, pri vyšších dávkach však dochádza k výraznému zvýšeniu mortality lykožrútov. Experimenty založené na kmeni v lese dosahovali nižšiu variabilitu výsledkov a nižšiu mortalitu F0 generácie z dôvodu vhodnejších podmienok prostredia.

Poďakovanie

Práca vznikla vďaka finančnej podpore 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, projektu „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 a projektov APVV-19-0116 a APVV-19-0119.*

Zoznam použitej literatúry

Bakri, A., Heather, N., Hendrichs, J., Ferris, I., 2005: Fifty years of radiation biolo Gy in entomolo Gy: lessons learned from IDIDAS. Ann. Entomol. Soc. Am., 98: 1–12.

Čičková, H., Kozánek, M., Žitňan, D., Roller, L., 2018: Effects of γ radiation on the reproduction and enteroendocrine cells of the spruce bark beetle *Ips typographus* and prospects for its control. Biologia, 73: 67–75.

De Longo, O., Colombo, A., Gomez-Riera, P., Bartolucci, A., 2000: The use of Massive SIT for the Control of the Medfly, *Ceratitis capitata* Strain SEIB 6-96, in Mendoza, Argentina. In: Keng-Hong Tan (ed.): Area Wide control of Fruit Flies and Other Insect Pest. Proceedings of the International Conference, PUS Malaysia, Pulau Pinang, p. 351–359.

Klassen, W., Curtis, C., F., 2005: History of the sterile insect technique. In: Dyck, V. A., Hendrichs, J. and Robinson, A. S. (eds.): Sterile Insect Technique. Dordrecht, the Netherlands, p. 39–68.

Knipling, E. F., 1955: Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. Journal of Economical Entomolo Gy, 48: 459–462.

Knipling, E. F., 1972: Entomolo Gy and the management of man's environment. Journal of the Australian Entomological Society, 11: 153–167.

Knipling E. F., 1979: The Basic Principles of Insect Population Suppression and Management. Agriculture Handbook Number 512. Washington, D.C., Science and Education Administration, United States Department of Agriculture, 659 p.

Krafsur, E. S., 1998: Sterile insect technique for supressing and eradicating insect population: 55 years and counting. J Agric Entomol, 15: 303–317.

Lauzon, C. R., Potter, S. E., 2012: Description of the irradiated and nonirradiated midgut of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) and Anastrepha ludens Lo ew (Diptera: Tephritidae) used for sterile insect technique. J Pest Sci, 85: 217–226.

Lindquist, D. A., 1984: Atoms for pest control. IAEA Bull., 26(2): 22–25.

Mattanovich, J., Ehrenhöfer, M., Vavra, C., Führer, E., 1999: Zur Weiterentwicklung eines halbsynthetischen Nährmediums für *Ips typographus* L. Anzeiger für Schädlingskunde, 72(2): 49–51.

Nicol, C. M. Y., Schmutterer, H., 1996: Control of the Gypsy Moth, *Lymantria dispar* (L.) with NeemAzal-T in Stands of Oak. In. Practised Oriented Results on Use and Production of Neem – Ingredients and Pheromones, Proceedings of the 4th Workshop, p. 95–100.

Novotný, J., Zúbrik, M., 2003. Sterile Insect Technique as a Tool for Increasing the Efficacy of Gypsy Moth Biocontrol. In: Proceedings Ecology, Survey and Management of Forest Insects. General Technical Report NE-311, p. 80–86.

Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schonbeck, F., Weber, A., 1994: Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Elsevier, Amsterdam, Netherland.

Pimentel, D. (ed.), 1997: Techniques for Reducing Pesticide Use: Environmental and Economic Benefits. John Wiley and Sons, Chichester, 444 p.

Pimentel, D., 2007: Area-wide pest management: environmental, economic and food issues, In: Vreysen, M. J. B., Robinson, A. S., Hendrichs, J. (Eds.): Area-wide control of insect pests. From research to field implementation, Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 35–47.

Salema, M. P., 2000: Area Wide control of Fruit Flies and Other Insect Pest Opening Address. In: Keng-Hong Tan (ed.), 2000: Area Wide control of Fruit Flies and Other Insect Pest. Proceedings of the International Conference, PUS Malaysia, Pulau Pinang, p. 3–7.

Sauvard, D., 2007: General biolo Gy of bark beetles. In: Lieuter, F., Day, K. R, Battisti, A., Grégoire, J. C., Evans, H. F. (eds.): Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. Springer, Dordrecht, p. 63–88.

Schlyter, F., Cederholm, I., 1981. Separation of the sexes of living spruce bark beetles *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae). Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 92: 42–47.

Simek, Z., 1993: Artificial substrate for feeding and breeding of *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae). Journal of Applied Entomolo Gy, 5: 432–439.

Turčáni, M., Vakula, J., 2007: The influence of irradiation on the behaviour and reproduction success of eight toothed bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). J For Sci, 53(Special Issue): 31–37.

Vakula, J., Galko, J., Gubka, A., 2021: Bark beetles in Slovak forests in 2021. APOL, 2(2): 216–224.

Adresa:

Ing. Jozef Vakula, PhD., Ing. Milan Zúbrik, PhD., Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Slavomír Rell, PhD., Ing. Andrej Kunca, PhD., Ing. Michal Lalík, Ph.D., Ing. Roman Leontovyč, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD.
Národné lesnícke centrum - Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Stredisko lesníckej ochranárskej služby, Lesnícka 11, 969 01 Banská Štiavnica, Slovenská republika
e–mail: jozef.vakula@nlcsk.org

Ing. Ján Jurica, Ing. Zuzana Balandová, Ing. Ján Bučan
Vojenské lesy a majetky SR, štátny podnik, Lesnícka 23, 962 63 Pliešovce, Slovenská republika
e–mail: sekretariat@vlm.sk

ŠTÚDIA VYUŽITIA METÓDY SIT V BOJI S LYKOŽRÚTOM VRCHOLCOVÝM *IPS ACUMINATUS*

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

Gubka, A., Vakula, J., Galko, J., Rell, S., Lalík, M., Zúbrik, M., Kunca, A., Leontovyč, R., Nikolov, Ch.: Use of the SIT method in forest protection against *Ips acuminatus*. APOL, 2022, vol. 3, no. 1, p. 15–27.

Abstract: Pine forests covers represents more than 6% of all forests in Slovakia. They are weakened by drought and other abiotic and biotic pests. Pine bark beetle (*Ips acuminatus*) is one of most important bark beetles attacking pine forests. To prevent forests against this pest there is necessary to keep measures in the area of forest protection. New method should be use of Sterile Insect Technique (SIT). Our research shows some potential of this technology. We tried to find proper dose (interval of doses) of radiation for *Ips accuminatus* male sterilization. Dose 20 and 100 Gy was tested with different results. In dose 20 Gy there were much more incomplete breeding chambers and maternal galleries without larval tunnels than in uniradiated beetles. In dose with 100 Gy we noticed high mortality and significantly more attempts of mating chamber creation but without maternal galleries, than in uniradiated population. Proper dose for sterilization with low mortality is probably somewhere in between these two doses, but for finding it there is necessary to perform many experiments. Successful use of this technology is highly influenced not only by proper dose of radiation, but also by our ability to breed beetles in high amounts in controlled conditions, their vitality, occurrence of pseudogamy and many other factors.

Key words: *Ips acuminatus*; gama radiation; fertility

1. Problematika

Borovica má v lesoch na Slovensku zastúpenie 6,6 % čo znamená že je to druhá najzastúpenejšia ihličnatá drevina a štvrtá celkovo (po buku, smreku a dube) (Zelená správa 2021). Najväčšie súvislé plochy borovicových porastov je možné nájsť v oblasti Záhoria. Porasty sú však dlhodobo oslabované rôznymi abiotickými a biotickými škodlivými činiteľmi (Jurica & Bartošek 2014; Kunca et al. 2017). K najvýznamnejším biotickým škodcom patrí podkôrny hmyz a z neho lykožrút vrcholcový (*Ips acuminatus*). Jedná sa o druh, ktorý je rozšírený po celej Európe od juhu Španielska až po Fínsko a rozšírenie pokračuje cez Sibír až do Číny, Japonska a Kórey (Siitonen 2014). Je považovaný za sekundárneho škodcu, avšak pri premnožení je schopný napadnúť aj zdravé stromy. Už jeho meno napovedá, že napáda predovšetkým korunové časti stromov s tenšou a hladkou kôrou a tiež mladé borovicové porasty. Z pohľadu lesného hospodárstva je jeho negatívny vplyv aj to že je prenášačom húb rodu *Ophiostoma* (Davydenko et al. 2017), ktoré spôsobujú modranie dreva a tým majú vplyv aj na jeho ďalšie spracovanie.

Lykožrút vrcholcový najčastejšie prezimuje ako dospelý jedinec v napadnutých stromoch prípadne v hrabanke (Wermelinger 2008). Aktívny začína byť na jar pri teplotách od 14 až 18 °C, podľa lokálnych podmienok (Colombari et al. 2011). Rojenie začína najčastejšie v prvej polovici mája a trvá až k prelomu júna a júla (Plewa & Mokrzycki 2017), kedy začína prebiehať aj druhé rojenie. Má teda v našich podmienkach dve generácie (Zahradník & Knížek 1999). Na stromy najskôr nalietávajú samce, ktoré vytvoria snubnú komôrku. Následne produkujú agregačné feromóny, ktorými lákajú samičky. Najčastejšie sa pári s 3 – 5 samičkami avšak zaznamenané sú aj prípady, kedy bolo v jednom požerku 2 – 12 samičiek (Plewa & Mokrzycki 2017). Samičky následne vytvárajú materské chodby, ktoré upchávajú drvinkami. Vajíčka kladú približne 1 – 2 týždne, pričom sa larvy niekedy liahnu ešte v čase

kedy samička kladie posledné vajíčka. Larválne chodby sú zväčša krátke a riedke a larvy sa v nich živia lykom a ambróziovými hubami. Larválne obdobie trvá od 4 týždňov a viac v závislosti od počasia. Kuklí sa v komôrkach, ktoré sú zarezané do beli (Zahradník & Knížek 1999).

V súčasnej dobe ochrana pozostáva najmä z vyhľadávania napadnutých stromov a ich včasnej asanácie. Pri silnejšom napadnutí to môže viesť k nežiaducemu preriedeniu porastov. Pri sanácii sa využíva pálenie, štiepkovanie prípadne sa pristúpi k aplikácii autorizovaných pesticídnych prípravkov. Z toho dôvodu sa hľadajú aj šetrnejšie a cielenejšie metódy. Jednou z metód môže byť aj využitie SIT (Sterile Insect Technique). Metóda je založená na sterilizácii veľkého počtu jedincov, ktoré sú následne vypúšťané do prírody. Musí byť však použitá celoplošne, čo znamená, že ošetrená plocha nesmie priamo susediť s plochou neošetrenou. V prípade, že v ošetrenej lokalite sa nachádzajú oblasti kde nebol sterilný hmyz vypustený, tak účinnosť tejto metódy významne klesá (Knipling 1979). V kontexte biologických metód je metóda SIT plne druhovo špecifická, s minimálnym dopadom na životné prostredie. Cieľovými druhmi, proti ktorým je metóda SIT v praxi používaná sú, napr. *Bactrocera* sp., *Anastrepha* sp., *Ceratitis capitata*, *Cydia pomonella, Glossina* sp. či *Lymantria dispar*.

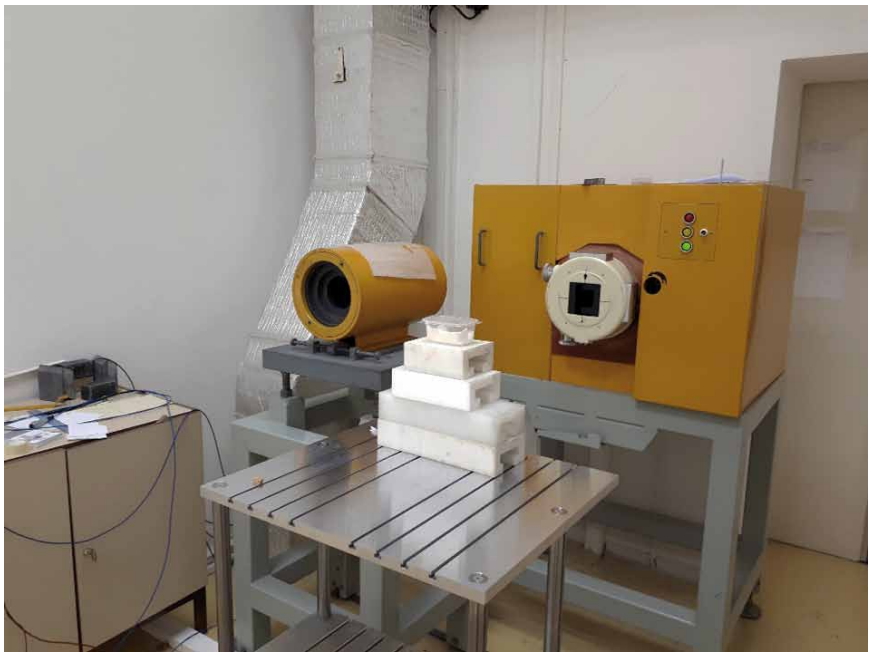
Výskum SIT zameraný na podkôrny hmyz je v súčasnosti len v začiatkoch a bol zameraný predovšetkým na snahu nájsť vhodnú dávku žiarenia a jeho vplyv na reprodukčné bunky lykožrúta smrekového (Turčáni & Vakula 2007; Čičková et al. 2018). Zatiaľ sme nezaznamenali, že by metóda SIT bola použitá alebo skúmaná pri lykožrútovi vrcholcovom.

2. Materiál a metódy

Základnou podmienkou pre výskum vplyvu pôsobenia gama radiácie na lykožrúta vrcholcového je založenie funkčného chovu, kde by bolo možné odchovať jedince do požadovaného vývojového štádia. Z toho dôvodu boli využité laboratóriá v Banskej Štiavnici. V prvom kroku boli v teréne odobrané vzorky borovicového dreva napadnuté lykožrútom vrcholcovým. Vzorky boli umiestnené do fotoeklektorov vyrobených z HDF dosák s hrúbkou 2,5 mm. Vrchné veko bolo utesnené gumovým tesnením, aby sa minimalizoval prienik svetla do fotoeklektorov. Z prednej strany boli vyrezané dva otvory na ktorých boli umiestnené priehľadné plastové zberné nádoby s navlhčenou buničinou. Takto postavená konštrukcia zabezpečovala odvod vlhkosti cez steny, aby sa spomalilo šírenie plesní a buničina v zberných nádobách poskytovala vhodné prostredie na prežitie vylietajúcim imágam lykožrúta vrcholcového do doby, kým bol prenesený do chovných klietok.

Chovné klietky majú hliníkovú konštrukciu, pričom predná časť bola zasieťovná hustým sitom. To zabezpečovalo vetranie aby sa v klietkach nekoncentrovala vo veľkom rozsahu vlhkosť. Steny sú presklené. Vďaka hliníkovej konštrukcii a skleneným stenám je možné dobre pozorovať dianie v klietkach a v prípade potreby je ich možné ľahko vyčistiť a vydezinfikovať.

Pre získanie vhodných chrobákov boli v priebehu roku 2020 a najmä v roku 2021 v spolupráci s VLM Malacky pripravené borovicové lapáky v niekoľkých sériách. Intenzívne opatrenia na úseku ochrany lesa vykonávané v porastoch VLM Malacky však udržujú stav podkôrneho hmyzu v nízkych hodnotách a preto bol dlhodobo problém získať dostatočné množstvo jedincov lykožrúta vrcholcového pre potreby založenia umelého chovu. Inštalované boli aj feromónové lapače, ktoré pracovníci VLM Malacky kontrolovali v jednodňových intervaloch. Nízke odchyty však len potvrdili nízky stav populácie lykožrúta vrcholcového v kontrolovanej oblasti. Nakoniec sa však podarilo získať vhodné časti kmeňa z naletených lapákov. Tie boli prevezené do Banskej Štiavnice, kde boli umiestnené do fotoeklektorov. Začiatkom júna začali z výrezov vylietavať imága novej generácie. Jedince sme triedili podľa pohlavia a to na základe morfologických znakov, ktoré sú pri tomto druhu dobre odlíšiteľné. Vylietavanie jedincov novej generácie však bolo roztiahnuté na väčšie časové obdobie a trvalo niekoľko týždňov. Táto skutočnosť výrazne komplikovala snahu o získanie dostatočného počtu vitálnych jedincov pre potreby ožarovania. Ožarovanie prebiehalo v dvoch fázach (20 a 100 Gy). Prvýkrát sme ožarovali 11. 6. 2021 dávkou 20 Gy. A druhýkrát 15. 7. 2021 tiež dávkou 20 Gy. V obidvoch prípadoch sme ožarovali len samcov. Ožarovanie prebiehalo na Slovenskom metrologickom ústave v Bratislave.



Obrázok 1. Ožarovanie samcov *Ips acuminatus* gama žiarením
Figure 1. *Irradiation males of Ips acuminatus with gamma radiation.*

Obrázok 2. Chovné klietky s umiestnenými borovicovými klátikmi, pre potreby chovu podkôrneho hmyzu
Figure 2. *Breeding cages with pine logs for bark beetle breeding.*

Aby sme zabezpečili približne rovnakú vitalitu jedincov, prevážali sme nielen jedince určené na ožarovanie ale aj kontrolné – neožiarené jedince. Následne sme ich vypúšťali do chovných klietok kde boli umiestnené výrezy (kláty) s rozmermi 12 – 16 cm v priemere a 40 – 50 cm dlhé. Snažili sme sa aby kláty z rovnakého stromu boli v klietkach s ožiarenými jedincami a aj s tými neožiarenými, aby sme minimalizovali vplyv rôzneho zavädnutia lyka na tvorbu požerkov. Do klietok sme umiestnili po 62 samcov a 250 samíc, čo predstavuje pomer pohlavia 1 : 4. V polovici októbra sme vykonali odkôrnenie obsadených klátov a zisťovali počty neúspešných pokusov o vytvorenie požerku, počty požerkov len s materskými chodbami a kompletné požerky. Z pomedzi ožiarených a neožiarených populácií sme vybe-

rali životaschopné jedince a preložili sme ich na čerstvé kláty za účelom zistenia sterility pri novej generácii. 3. 11. 2021 sme pristúpili k ožiareniu dávkou 100 Gy. Ožiarene boli znovu jedince samčieho pohlavia pričom bolo do klietok vypustených 92 ožiarených samcov a 370 neožiarených samíc. S rovnakými počtami sme založili aj neožiarenú kontrolu. Aj v tomto prípade sme pri kontrole vykonali odkôrnenie a evidovanie požerkov v rôznom štádiu vývoja. Údaje boli vyhodnocované pomocou programu Statistica 10.

3. Výsledky

3.1. Chov lykožrúta vrcholcového

Jedným z hlavných predpokladov pre testovanie vplyvu gama radiácie na lykožrúta vrcholcového je udržanie jednej až viac generácií v laboratórnych podmienkach. V prvom roku riešenia projektu sme sa zamerali predovšetkým na založenie laboratórneho chovu lykožrúta vrcholcového (*Ips acuminatus*). Problematické bolo už samotné založenie chovu. Vzhľadom na nepriaznivé počasie v priebehu prvého rojenia sa nám nepodarilo odchytiť dostatočné množstvo životaschopných jedincov do feromónových lapačov. V priebehu júna sa nám podarilo nájsť drevnú hmotu napadnutú lykožrútom vrcholcovým, ktorú sme umiestnili do fotoeklektorov v laboratóriách v Banskej Štiavnici. V priebehu augusta začali imága vylietavať. Tie sme následne odchytávali a umiestňovali do chovných klietok. Pre potreby ožarovania sú použiteľné hlavne imága odchované v laboratórnych podmienkach, pretože sú menej ovplyvňované pôsobením patogénnych organizmov. Ako chovný substrát sme použili konáre z borovice lesnej s priemerom asi 8 cm a dĺžkou asi 40 cm. V priebehu augusta 2020 sa nám podarilo získať ďalšiu drevnú hmotu napadnutú lykožrútom vrcholcovým. Ten sa nachádzal najčastejšie v štádiu larvy a kukly. Aj táto hmota bola umiestnená do fotoeklektorov. V druhej polovici septembra začali vylietavať imága aj z tejto hmoty. Tie sme využili na posilnenie chovu a umiestnili sme ich do chov-

Obrázok 3 – 4. Z fotoeklektorov boli odoberané rojace sa jedince a preložené do chovných klietok na čerstvé borovicové klátiky, prípadne bola časť populácie ožiarená pred umiestnením do klietok

Figure 3 – 4. *Swarming individuals were taken from the photoelectors and transferred to breeding cages on fresh pine blocks, or part of the population was irradiated before transfer to cages.*

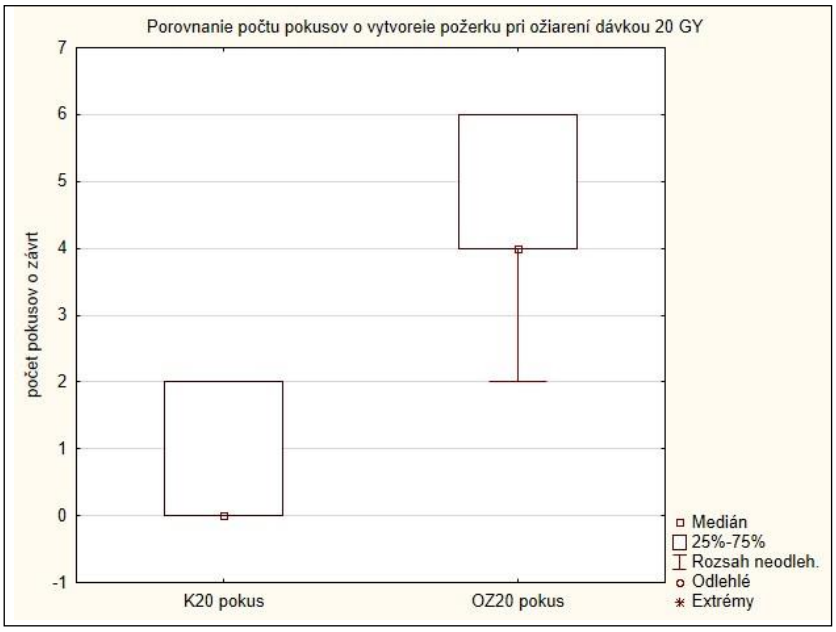
ných klietok v počte 75 až 150 imág na klietku. Ako chovný substrát boli použité vrcholové časti kmeňov mladých borovíc s priemerom 10 – 18 cm a dĺžkou asi 4 – 50 cm. Miesta rezu sme zakryli papierom alebo zaliali parafínom, aby sa znížila rýchlosť vysušovania. Obsadzovanie chovného substrátu bolo veľmi variabilné. Často sme tiež zaznamenávali vytvorenie snubných komôrok na hrane klátiku (na reze), čo malo za následok rýchle prisušenie lykovej časti a tým pádom nebol často vytvorený plnohodnotný požerok. Najlepšie výsledky sme dosahovali nakoniec na klátikoch, s dĺžkou asi 50 cm a priemerom okolo 15 cm a s hladkou borkou. Klátik s takýmito rozmermi bol dostatočne dlhý na to aby rýchlo nepresychal a poskytoval dostatočný priestor na rozvoj požerkov. Imága lykožrúta vrcholcového tak mali dostatok priestoru aby si našli pre nich vhodné miesto na založenie požerku. Ďalšou nespornou výhodou týchto rozmerov je, že sa s ním ľahšie manipuluje a aj kontrola je jednoduchšia.

3.2. Ožarovanie 20 Gy

Ako prvá bola hodnotená mortalita samcov po ožiarení. Mortalita samcov bola počítaná na základe množstva vypustených samcov do klietky a počtu vytvorených snubných komôrok prípadne požerkov. Celková mortalita ožiarených samcov bola na úrovni 31,5 % a mortalita neožiarených samcov bola na úrovni 23,9 %. Môžeme teda predpokladať, že gama radiácia na úrovni 20 Gy nemala významnejší vplyv na rýchlu mortalitu ožiarených samcov.

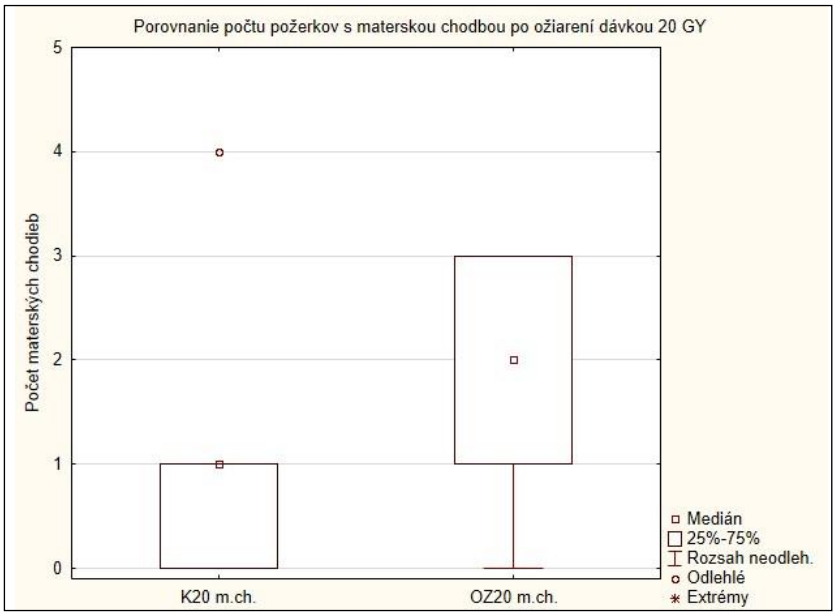
Následne bolo kontrolované v akom množstve a v akom stave boli založené požerky. Vytvorené boli tri kategórie a to pokus o vytvorenie požerku (snubná komôrka), Vytvorenie požerku a materských chodieb, avšak bez vytvorenia larválnych chodieb a kompletný požerok s larválnymi chodbami.

Rozdiely zaznamenané pri porovnaní vývinových štádií požerkov naznačujú určitý vplyv žiarenia avšak so značným rozptylom hodnôt. Väčší rozdiel bol pri pokusoch o vytvorenie snubnej komôrky avšak bez spárenia sa a vytvorenia materských chodieb, kde väčšie množstvo týchto pokusov bolo práve pri ožiarených jedincoch. Na klátoch umiestnených v klietkach, kde boli vypustené ožiarené samce sme zaznamenali najčastejšie 4 – 6 pokusov o závrt (stredová hodnota – medián 4 pokusy na jeden klát). Na kontrolných klátoch sme zaznamenali 0 – 2 pokusy, pričom najčastejšie sme na klátoch nezaznamenali ani jeden neúspešný pokus o závrt a celkovo sa pohybovali v rozpätí 0 – 2 pokusy o závrt na jednom kláte.



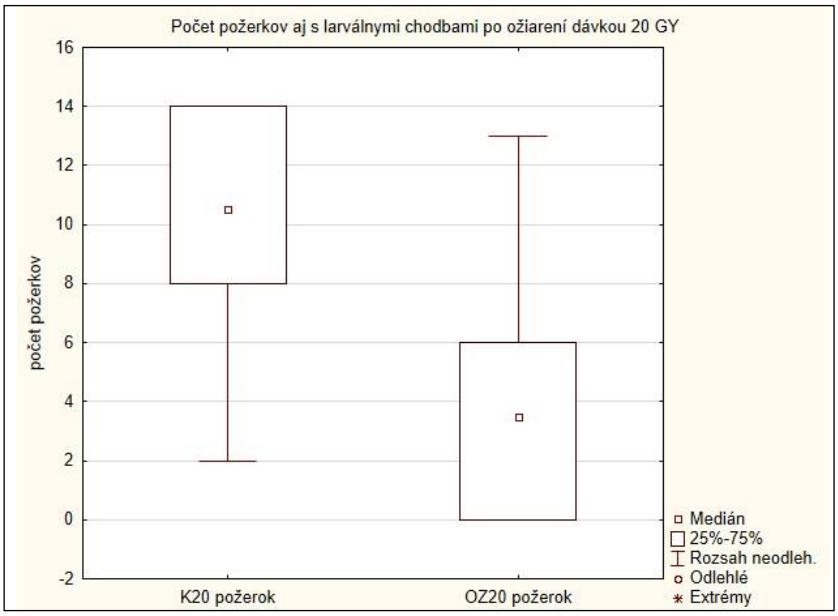
Obrázok 5. Porovnanie počtu pokusov o vytvorenie požerku pri ožiarení dávkou 20 Gy
Figure 5. *Comparison of the number of attempts to create breeding chamber after irradiation with a dose of 20 Gy.*

Pri porovnávaní počtu požerkov s materskými chodbami, no bez prítomnosti larválnych chodieb sme zaznamenali len veľmi malé množstvo takýchto požerkov na klátoch s neožiarenými jedincami. Najčastejšie sa tieto počty pohybovali v rozpätí 0 – 1 požerok s materskou chodbou na klát (medián 1). Na jednom kláte sme však zaznamenali až 4 takéto požerky, čo je v porovnaní s ostatnými klátmi hodnota vymykajúca sa z priemeru. Na klátoch, kde boli vypustené ožiarené jedince sme zaznamenali najčastejšie 1 – 3 požerky s materskou chodbou (medián 2), čo naznačuje možné zníženie plodnosti po ožiarení.



Obrázok 6. Porovnanie počtu požerkov s materskou chodbou pri ožiarení dávkou 20 Gy
Figure 6. *Comparison of the number of galleries with maternal galleries after irradiation with a dose of 20 Gy.*

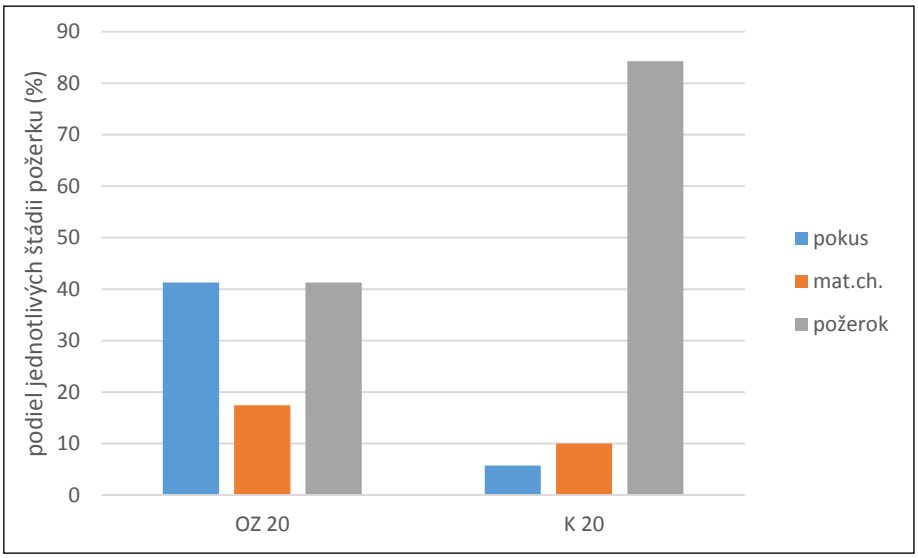
Na klátoch s ožiarenými aj neožiarenými jedincami sme zaznamenali aj plne vyvinuté požerky. Rozptyl počtu požerkov bol síce pri ožiarených a neožiarených jedincoch viac-menej rovnaký, avšak významne sa líšili svojou distribúciou. Kým na klátoch s neožiarenými jedincami boli kompletné požerky najčastejšie v počte 8 – 14, na klátoch s ožiarenými jedincami to bolo len 0 – 6 plne vyvinutých požerkov.



Obrázok 7. Porovnanie počtu úplných požerkov pri ožiarení dávkou 20 Gy
Figure 7. *Comparison of the number of fully developed galleries after irradiation with a dose of 20 Gy.*

Pre lepšie zhodnotenie je nevyhnutné je vhodné porovnať podiely jednotlivých požerkov na klátoch, kde boli vyložené ožiarené a neožiarené jedince. Ako je vidno na obrázku 8, pokusy o závrt a celé požerky pri ožiarených jedincoch mali približne rovnaký podiel (pokusy 41,2 % a kompletné požerky 41,3 %). Ak to porovnáme s podielom pokusov o požerok (5,7 %) a kompletných požerkov (84,3) na kontrole môžeme pozorovať veľký rozdiel. Tento nepomer naznačuje pravdepodobne zvýšenú mortalitu a neúspešné privábenie samičiek pri ožiarených samcoch. Veľmi zaujímavým údajom je však porovnanie podielu požerkov kde došlo k páreniu a vytvoreniu materských chodieb avšak bez vytvorenia larválnych chodieb. Kým podiel takýchto požerkov pri neožiarených jedincoch bol 10 % pri ožiarených jedincoch to bolo 17,4 % čo je takmer dvojnásobok. Stále však ostáva ešte relatívne vysoký podiel kompletných požerkov pri ožiarených jedincoch.

Zaujímavé výsledky naznačila následná generácia z ožiarených jedincov, kde 50 % požerkov skončilo v štádiu pokusu a 50 % v štádiu tvorby materských chodieb. V porovnaní s kontrolou kedy v štádiu pokusu skončilo 31 % požerkov v štádiu materských chodieb 19 % a v štádiu materských chodieb s larválnymi chodbami 50 %. Na významnejšie závery však dáta, vzhľadom na malú vzorku a kontamináciu entomopatogénnymi hubami, nestačia.

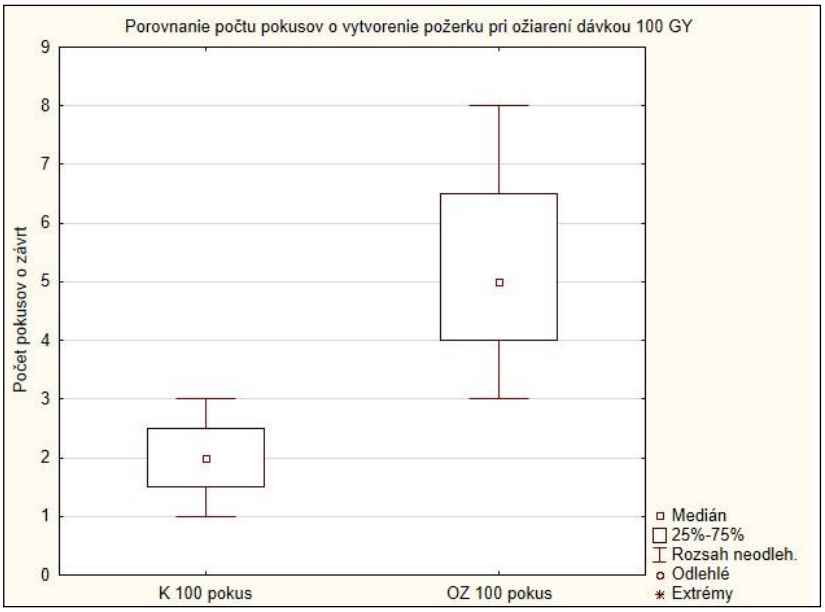


Obrázok 8. Porovnanie podielu jednotlivých štádií požerkov pri ožiarenej a kontrolnej populácií
Figure 8. *Comparison of the share of individual gallery stages in the irradiated and control population.*

3.3. Ožarovanie 100 Gy

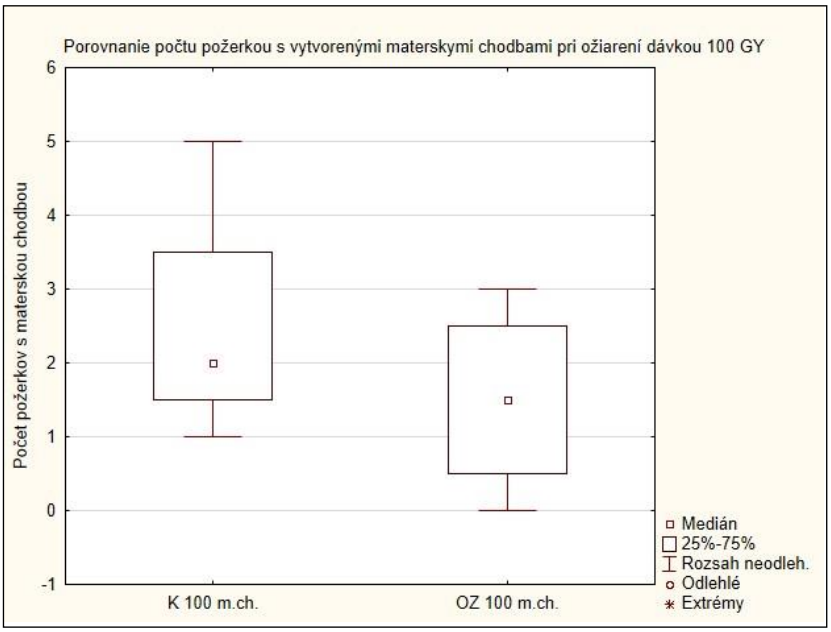
Vzhľadom na odporúčané dávky gama radiácie pre podkôrny hmyz sme v ďalšej fáze zvolili dávku 100 Gy. Aj v tomto prípade boli ožiarené len jedince samčieho pohlavia. Po vypustení jedincov do klietok bola zisťovaná aj mortalita samcov vypočítaná rovnakým spôsobom ako pri dávke 20 Gy. Pri ožiarení dávkou 100 Gy sme zaznamenali 47 % mortalitu samcov, čo je viac ako pri ožiarení 20 Gy. Mortalita pri neožiarených jedincoch bola na úrovni 29 %, čo je o málo vyššia ako sme zaznamenali pri neožiarených jedincoch v predchádzajúcom experimente, avšak výrazne nižšia ako pri ožiarených jedincoch.

Množstvo pokusov o vytvorenie požerku bol významne väčší pri ožiarených jedincoch ako pri kontrole. Počet pokusov o závrt na klátoch, kde boli vypustené ožiarené jedince bol značne variabilný a pohyboval sa od 3 do 8, pričom stredná hodnota bola na úrovni 5. Naproti tomu stredná hodnota pokusov o závrt pri neožiarených jedincoch bola na úrovni 2 s rozptylom od 1 do 3. Jedná sa však o vyššie hodnoty ako pri neožiarených jedincoch v predchádzajúcom experimente.



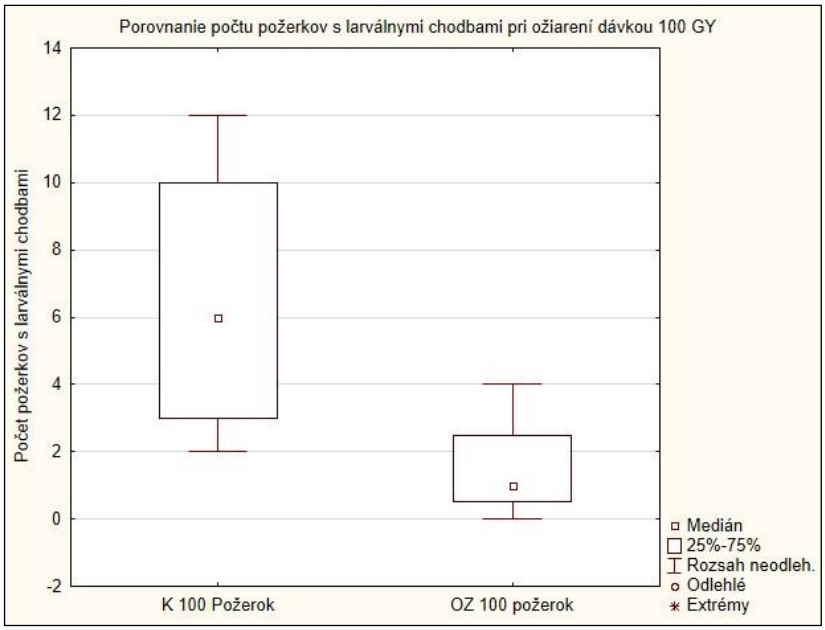
Obrázok 9. Porovnanie počtu pokusov o vytvorenie požerku pri ožiarení dávkou 100 Gy
Figure 9. *Comparison of the number of attempts to create breeding chamber after irradiation with a dose of 100 Gy.*

Zaujímavé je, že napriek vysokej dávke žiarenia bol podiel požerkov s iba materskými chodbami veľmi podobný. Dokonca pri neožiarených jedincoch sme zaznamenali väčšie množstvo takýchto požerkov s maximom 5 neúplných požerkov a stredovou hodnotou 2. Stredová hodnota pri ožiarených jedincoch je podobná ako pri neožiarených a to 1,5 a rozptyl sa pohyboval od 0 po 3.



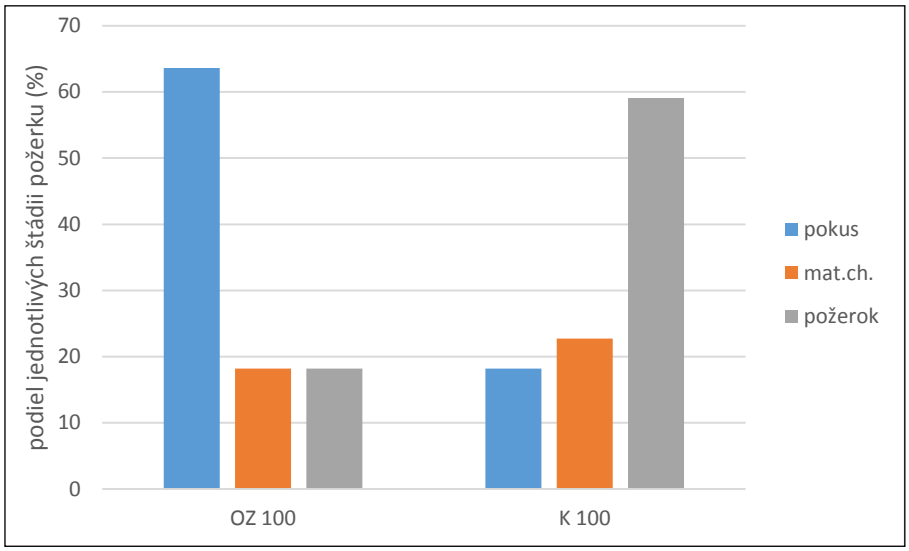
Obrázok 10. Porovnanie počtu požerkov s materskou chodbou pri ožiarení dávkou 100 Gy
Figure 10. *Comparison of the number of galleries with maternal galleries after irradiation with a dose of 100 Gy.*

Rozdiely boli zaznamenané pri porovnávaní počtu kompletných požerkov na jednotlivých klátoch. Na klátoch s kontrolnými neožiarenými jedincami sme zaznamenali výrazne väčšie množstvo kompletných požerkov. Stredová hodnota bola na úrovni 6 avšak so značným rozptylom od 2 do 12 požerkov na klát. Pri ožiarených jedincoch bola tvorba kompletných požerkov výrazne nižšia a to so stredovou hodnotou 1 a rozptylom od 0 po 4 kompletné požerky na jeden klát.



Obrázok 11. Porovnanie počtu úplných požerkov pri ožiarení dávkou 100 Gy
Figure 11. *Comparison of the number of fully developed galleries after irradiation with a dose of 100 Gy.*

Aj pri žiarení dávkou 100 Gy sme pristúpili k porovnaniu podielov jednotlivých štádií požerkov na celkovom množstve požerkov. Výrazne vyšší bol podľa očakávania podiel pokusov o vytvorenie požerku pri ožiarených jedincoch (63,6 %) ako pri kontrole (18,2 %). Zaujímavé však je, že podiel pokusov o závrt bol pri neožiarených jedincoch v experimente s dávkou 100 Gy vyšší ako pri neožiarených jedincoch v experimente s dávkou 20 Gy. Pri ožiarených jedincoch bol väčší podiel pokusov o závrt pri žiarení 100 Gy očakávaný v porovnaní s experimentom s intenzitou žiarenia 20 Gy. Prekvapivý je nižší podiel požerkov s vytvorenou materskou chodbou avšak bez larválnych chodieb pri ožiarených jedincoch (18,2 %) v porovnaní s neožiarenými (22,7). Väčší podiel neúspešných pokusov o vytvorenie požerku a požerkov len s materskými chodbami sa pri neožiarených jedincoch prejavil na podiele kompletných požerkov. Tento podiel bol menší ako pri neožiarených jedincoch v experimente s žiarením 20 Gy a to na úrovni 59,1 %. Vzhľadom na značný nárast podielu pokusov o závrt pri ožiarených jedincoch sa znížil podiel kompletných požerkov na úroveň 18,2 %.



Obrázok 12. Porovnanie podielu jednotlivých štádií požerkov pri ožiarenej a kontrolnej populácií
Figure 12. *Comparison of the share of individual gallery stages in the irradiated and control population.*

4. Diskusia

Experimentálne chovy pre potreby výskumu lykožrúta vrcholcového prebiehali v zahraničí a to najmä v Škandinávskych krajinách. Bakke (1968) svoj úspešný chov začal zberom napadnutej drevnej hmoty skoro na jar, pričom ju následne umiestnil do fotoeklektorov pri teplote 22 – 24 °C. Následne po vyrojení a pretriedení pohlavia umiestňoval imága na klátiky s dĺžkou 30 cm a priemerom od 6 do 12 cm, pričom konce zapečatil parafínom. Následne ich pri rôznych pokusoch držal pri teplote 22 – 27 °C a vlhkosti 70 %. Rovnaká metóda bola použitá aj v neskorších výskumoch (Løyning & Kirkendall 1996). V našich podmienkach sa však viac osvedčilo použitie hrubších klátikov s priemerom 12 – 15 cm a dĺžkou 40 – 50 cm. Pri užších a kratších klátikoch dochádzalo k rýchlemu vysušovaniu a jedince lykožrúta vrcholcového nestíhali dokončiť svoj vývoj.

Využitie gama radiácie nie je nová metóda, avšak veľmi náročná pre nastavenie vhodnej dávky. Tá je mimoriadne variabilná. Napríklad dávka LD50 (dávka pri ktorej uhynie 50% ožiarených jedincov) sa pri baktériách a vírusoch pohybuje od 100 do 10 000 Gy (Harrison & Anderson 1996). Pre človeka je takto nebezpečná dávka približne na úrovni 3 Gy (Rice & Baptist 1974). Dávky pre hmyz sa pohybujú od 30 do 1 500 Gy (Whicker & Schultz 1982). Dávky vhodné pre sterilizáciu hmyzu sú variabilné aj v rámci jednotlivých radov hmyzu, napríklad dávka od 130 do 400 Gy pre Lepidoptera, 30 až 280 Gy pre Acari, 40 až 200 Gy pre Coleoptera, 10 až 180 Gy pre Hemiptera, 20 až 160 Gy pre Diptera (Bakri et al. 2005). Pre Curculionidae, kam patrí aj podkôrny hmyz je potrebná dávka do 100 Gy (Bakri et al. 2005).

Použitie gama radiácie za účelom sterilizácie lykožrúta vrcholcového (*Ips acuminatus*) je v súčasnosti len veľmi málo (až vôbec) preskúmané. Pri stanovení dávky žiarenia sme vychádzali najmä z výskumov venovaných iným druhom. Využívali sme najmä poznatky z ožarovania lykožrúta smrekového (*Ips typographus*). Čičková et al. (2017) uvádzajú potrebnú dávku na sterilizáciu v rozmedzí od 70 do 90 Gy. Turčáni & Vakula (2007) vykonávali experimenty s dávkou 15 a 30 Gy. Vzhľadom na určité pozitívne výsledky, dosiahnuté pri ožarovaní lykožrúta smrekového sme zvolili dávku ožarovania na spodnej hranici 20 Gy a na hornej hranici 100 Gy, aby sme našli rozpätie v ktorom by sme sa mohli v budúcnosti pohybovať. Pri dávke 20 Gy sme síce zaznamenali zvýšenú mortalitu ale aj väčšie množstvo požerkov bez larválnych chodieb, čo naznačuje možnú sterilitu. Zaznamenané bolo však aj pomerne vysoké množstvo plne vyvinutých požerkov. Pri dávke na predpokladanej hornej hranici sme zaznamenali vysokú mortalitu a nízku úspešnosť pri zakladaní požerkov. Dosiahnuté výsledky tak naznačujú možný vplyv ožarovania na sterilizáciu jedincov lykožrúta vrcholcového a to pri žiarení 20 Gy aj 100 Gy, no je nevyhnutné pokračovať v hľadaní správnej dávky žiarenia tak aby bola zabezpečená mortalita po ožiarení v akceptovateľnom množstve, bola čo najmenej narušená vitalita ožiarených jedincov, aby boli schopné vytvoriť snubnú komôrku a spáriť sa a zároveň aby bola dosiahnutá sterilita buď pri ožiarených jedincoch alebo pri jedincoch následnej generácie.

Na výsledky experimentov s SIT a následné praktické využitie však majú vplyv rôzne faktory. Jedným z nich je vitalita jednotlivých imág, pretože pri nižšej vitalite odchovaných jedincov môže dochádzať k zvýšenej mortalite po ožiarení. Dosiahnuť dobrú vitalitu imág v umelom chove však môže byť náročné. Významný vplyv na použitie môže mať aj možná pseudogamia u lykožrúta vrcholcového. Jedná sa o rozmnožovanie pri ktorom koexistujú dva typy samičiek. Prvý typ po spárení so samčekom vytvorí generáciu kde je pomer pohlavia približne 1 : 1. Druhý typ samičiek však po spárení neprevezme genetickú informáciu samčeka ale vytvorí novú generáciu čisto zo samičiek. Samička prvého a druhého typu nie je možné fyziologicky odlíšiť (Bakke 1968; Løyning & Kirkendall 1996). Značný význam môže mať aj polygamia lykožrúta vrcholcového pričom jeden samček sa môže spáriť s 2 – 12 samičkami, pričom zaznamenaný bol aj požerok s 20 materskými chodbami.

SIT je však technológia, ktorá môže nájsť svoje miesto aj v ochrane lesa vďaka svojmu minimálnemu vplyvu na ostatné organizmy a maximálnej cielenosti na konkrétny druh. Je však nevyhnutné ešte vykonať veľké množstvo laboratórnych experimentov na určenie vhodných dávok radiácie a pre vytvorenie vhodných podmienok na kontinuálny, prípadne hromadný chov cieľových organizmov.

Obrázok 13. Časť odkôrnených borovicových klátov na ktorých vidno požerky *Ips acuminatus*
Figure 13. *Part of debarked pine logs where is possible to see Ips acuminatus galleries.*

5. Súhrn

Borovicové porasty majú viac ako 6 % podiel na lesoch Slovenska. Sú oslabované suchom a inými abiotickými a biotickými škodlivými činiteľmi. Lykožrút vrcholcový (*Ips acuminatus*) je jedným z najvýznamnejších druhov podkôrneho hmyzu napádajúcich borovicové lesy. Pre ochranu pred ním je nevyhnutné dodržiavať opatrenia na úseku ochrany lesa. Novou metódou ochrany by mohlo byť využitie technológie sterilného hmyzu (SIT). Náš výskum sa zameral na zistenie možností a potenciálu tejto metódy. Pokúsili sme sa nájsť vhodnú dávku (rozptyl dávok) radiácie pre sterilizáciu samcov lykožrúta vrcholcového. Otestovali sme hraničné dávky 20 Gy a 100 Gy. Pri dávke 20 Gy sme zaznamenali väčšie množstvá požerkov len so snubnými komôrkami a požerkov s materskými chodbami bez larválnych chodieb ako pri neožiarených jedincoch. Pri dávke 100 Gy sme zaznamenali vysokú mortalitu a významne viac pokusov o vytvorenie snubnej komôrky bez materských chodieb ako pri kontrole. Správna dávka pre sterilizáciu s nízkou mortalitou je pravdepodobne niekde medzi týmito hraničnými dávkami žiarenia, ale pre jej nájdenie bude potrebné vykonať ešte veľké množstvo experimentov. Úspešné použitie tejto metódy je však vysoko ovplyvnené nielen nájdením správnej dávky žiarenia, ale aj našou schopnosťou vychovať veľké množstvo jedincov lykožrúta vrcholcového v kontrolovaných podmienkach, ich vitalitou, výskytom pseudogamie a ďalšími faktormi.

Poďakovanie

Práca vznikla 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. A realizáciou projektu „Výskum a vývoj bezkontaktných metód pre získavanie geopriestorových údajov za účelom monitoringu lesa pre zefektívnenie manažmentu lesa a zvýšenie ochrany lesov", ITMS 313011V465 na základe podpory operačného programu integrovaná infraštruktúra financovaného z európskych štrukturálnych a investičných fondov.

Zoznam použitej literatúry

Bakke, A., 1968: Field and laboratory studies on sex ratio in *Ips acuminatus* (Coleoptera: Scolytidae) in Norway. The Canadian Entomologist, 100(6): 640–648. htpps://doi.org/doi:10.4039/Ent100640-6.

Colombari, F., Battisti, A., Schroeder, L. M. et al., 2011: Life-history traits promoting outbreaks of the pine bark beetle *Ips acuminatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) in the south-eastern Alps. Eur J Forest Res, 131:553–561. https://doi.org/10.1007/s10342-011-0528-y.

Čičková, H., Kozánek, M., Žitňan, D. et al., 2018: Effects of γ radiation on the reproduction and enteroendocrine cells of the spruce bark beetle *Ips typographus* and prospects for its control. Biologia 73: 67–75). https://doi.org/10.2478/s11756-018-0009-6.

Davydenko, K., Vasaitis, R., Menkis, A., 2017: Fungi associated with *Ips acuminatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Ukraine with a special emphasis on pathogenicity of ophiostomatoid species. European journal of entomology, 114: 77–85.

Harrison, F. L., Anderson, S. L., 1996: Taxonomic and development aspects of radiosensitivity, p. 65–88. In: B. Amiro, R. Avadhanula, G. Johansson, C. M. Larsson and M. Luning (eds.): Proceedings of the Symposium: Ioniz- ing Radiation, the Swedish Radiation Protection Institute (SSI) and The Atomic EnerGy Control Board (AECB) of Canada, 20 – 24 May, 1996, Stockholm, Sweden.

Jurica, J., Bartošek, P., 2014: Vývoj škodlivých činiteľov v borovicových porastoch VLM SR, š. p., o. z. Malacky. 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., Národné lesnícke centrum, Zvolen, s. 52–60.

Knipling, E. F., 1979: The Basic Principles of Insect Population Suppression and Management. Agriculture Handbook Number 512. Washington, D. C., Science and Education Administration, United States Department of Agriculture, 659 p.

Kunca, A., Zúbrik, M., Galko, J., Vakula, J., Leontovyč, R., Gubka, A., Nikolov, Ch., Rell, S., 2017: Najčastejšie choroby a škodcovia borovice. Les & Letokruhy, 73(9): 22–23.

Løyning, M. K., & Kirkendall, L. R., 1996: Mate Discrimination in a Pseudogamous Bark Beetle (Coleoptera: Scolytidae): Male *Ips acuminatus* Prefer Sexual to Clonal Females. Oikos, 77(2): 336–344. https://doi.org/10.2307/3546074.

Plewa, R., Mokrzycky, T., 2017: Występowanie, biologia i znaczenie gospodarcze kornika ostrozębnego *Ips acuminatus* (Gyllenhal, 1827) (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) w Polsce. Sylwan, 161(8): 619–629. https://doi.org/10.26202/sylwan.2017077

Rice, T. R., Baptist, J. P., 1974: Ecologic effects of radio- active emissions from nuclear power plants, p. 373–439. In: L. A. Sagan (ed.): Human and ecological effects of nuclear power plants. Charles C. Thomas, SpringÞeld, IL.

Siitonen, J., 2014: *Ips acuminatus* kills pines in southern Finland. Silva Fennica, 48(4 article id 1145. 7 p.

Turčáni, M., Vakula, J., 2007: The influence of irradiation on the behaviour and reproduction success of eight toothed bark beetle (*Ips typographus* L., 1758). Journal of Forest Science, 53(10): 31–37, https://doi.org/10.17221/2154-JFS

Wermelinger, B., Rigling, A., Schneider Mathis, D., Dobbertin, M., 2008: Assessing the role of bark- and wood-boring insects in the decline of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in the Swiss Rhone valley. Ecological EntomoloGy, 33(2): 239–249.

Whicker, F. W., V. Schultz, 1982: RadioecoloGy: nu- clear enerGy and the environment. CRC, Boca Raton, FL.

Zahradník, P., Knížek, M., 1999: Lýkožrout vrcholkový *Ips acuminatus* (Gyll.), Lesnická práce, 12/99, príloha, lesní ochranná služba, 4 s.

Zelená správa 2021: Zelená správa – Správa o lesnom hospodárstve v Slovenskej republike za rok 2020. Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky, Národné lesnícke centrum, ISBN 978-80-8093-328-9.

Adresa:

Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Jozef Vakula, PhD., Ing. Juraj Galko, PhD.,Ing. Slavomír Rell, PhD., Ing. Michal Lalík, Ph.D., Ing. Milan Zúbrik, PhD., Ing. Andrej Kunca, PhD., Ing. Roman Leontovyč, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD.
Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Stredisko lesníckej ochranárskej služby, Lesnícka 11, 969 01 Banská Štiavnica, Slovenská republika

e–mail: andrej.gubka@nlcsk.org

ŠTÚDIA VYUŽITIA ENTOMOPATOGÉNNEJ HUBY *BEAUVERIA BASSIANA* V INTEGROVANEJ OCHRANE LESA PROTI LYKOŽRÚTOVI SMREKOVÉMU *IPS TYPOGRAPHUS*

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

Rell, S., Vakula, J., Galko, J., Lalík, M., Zúbrik, M., Gubka, A., Kunca, A., Leontovyč, R., Nikolov, Ch.: Study of the use of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in integrated forest protection against the European spruce bark beetle *Ips typographus*. APOL, 2021, vol. 3, no. 1, p. 28–36.

Abstract: The European spruce bark beetle (*Ips typographus* L.) poses a huge risk, especially for mountain areas with a predominance of spruce, where chemical treatment is difficult to apply or prohibited. Therefore, the use of biological methods, such as the use of entomopathogenic fungi (EPF) in combination with pheromone traps, can be considered. In this study, the results of such attempt is presented. The efficacy of developed carrier of EPF was monitored, as well as the efficacy of fungus *Beauveria bassiana*. These tests were performed in a field-laboratory conditions. Results show high carrier efficacy for a relatively long time. The observations also shown, that the infected imagines are able to establish a new generation, but its quality (e.g. length of maternal galleries) is affected by the rate at which the fungus kills an adult.

Key words: pheromone trap; carrier of entomopathogenic fungi; biological methods

1. Problematika

Najmä v horských lesoch na území Slovenka často dominuje smrek obyčajný (*Picea abies* L., Karst.), v podobe umelo vytvorených monokultúr, pre ktoré lykožrút smrekový (*Ips typographus* L.) (Coleoptera: Curculionidae) predstavuje obrovské riziko, zväčša pre porasty často postihované vetrovými kalamitami. Vo všeobecnosti je lykožrút druhotným škodcom, ktorý potrebuje poškodené stromy a ku premnoženiam dochádza v prípade neobmedzených možností pre množenie, napr. po víchriciach alebo snehovým polomoch (Kreutz et al. 2004a). Ak je kalamitná hmota ponechaná v poraste, tvorí ideálne podmienky pre jeho premnoženie, následne pri nedostatku odumretej, prípadne oslabenej smrekovej hmoty, napáda aj zdravé stromy a pri početnom nápore dokáže narušiť ich prirodzený obranný mechanizmus (Kreutz at al. 2004a). Stromy tak nie sú schopné brániť sa náporu lykožrúta, čím následne vznikajú lykožrútové kalamity.

K bežným metódam regulácie početnosti lykožrúta používaným v praxi patria fytosanitárne opatrenia (Wermelinger 2004). Kým použitie lapačov slúži hlavne ako metóda monitoringu populačnej hustoty (Galko et al. 2014), fytosanitárne opatrenia sú účinné iba pokým populačná hustota lykožrúta nedosiahne kritické hodnoty (Økland et al. 2016). Možnosťou je aj použitie chemicky ošetrených lapákov, čo vyžaduje správne načasovanie (Wermelinger 2004). Pri súčasnom nátlaku na znižovanie spotreby pesticídov, ako aj ich problematická aplikácia a otázna účinnosť na stojatých stromoch, pripadá do úvahy využitie biologických metód ochrany, pri ktorých sa do prostredia vnáša patogén. V minulosti boli realizované pokusy s využitím entomopatogénnych húb (EPH), aplikáciou práškového média umiestneného do feromónového lapača (Vaupel & Zimmerman 1996; Kreutz et al. 2000; Kreutz 2002; Kunca 2009; Vakula et al. 2010, 2012; Grodzki & Kosibowicz 2015), avšak prenos infekcie na populáciu škodcu sa nepreukázal s dostatočnou účinnosťou. Problémom práškového média so spórami umiestnenými do feromónového lapača bola rýchla strata virulencie spór. Bałazy (2012) udáva nízku účinnosť v redukcii populácií lykožrúta v prírodných podmienkach, avšak laboratórne testy ukázali vysokú mortalitu imág aj lariev v uzavretých podmienkach. Riešením problému krátkej účinnos-

ti práškového média spór húb, by mohlo byť využitie nosiča, v ktorom by huby rástli, čo by zabezpečilo ich prežitie aj v extrémnych podmienkach feromónových lapačov. Táto metóda je jednoducho aplikovateľná a selektívna, nakoľko feromónové odparníky primárne lákajú cieľové druhy škodcov (Vakula et al. 2012).

2. Materiál a metódy

Terénno-laboratórny experiment účinnosti nosiča entomopatogénnych húb, bol vykonaný v priebehu rokov 2020 a 2021, vo Vojenských lesoch a majetkoch (VLM), na polesí Sklené. Cieľom bolo zistiť účinnosť nosiča udržať hubu *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. virulentnú v podmienkach feromónového lapača, kde je nosič často vystavený slnečnému žiareniu, suchu a teplu. Následne sa overovala schopnosť huby infikovať a usmrtiť imága l. smrekového.

Výber plôch vhodných pre uskutočnenie experimentov prebehol v polovici apríla 2020. Začiatkom júna boli v blízkosti porastovej steny smrekového porastu napadnutého lykožrútom smrekovým nainštalované feromónové lapače. Jednalo sa o lapače MultiWit, navnadené feromónovým odparníkom Pheroprax A. Odchytové vaničky lapačov s nosičom boli upravené a imága lykožrúta boli schopné opustiť ich, pričom sa nevyhli kontaktu s nosičom, kedy dochádzalo k infikovaniu. Imága boli odchytávané do 1 dcl plastových fľašiek, upevnených k odchytovej vaničke po dobu 4 hodín, v čase dňa s najvyššou letovou aktivitou imág (obr. 1). Imága z fľaštičiek boli ešte v priebehu toho dňa v laboratóriu umiestnené do Petriho misiek s kúskom čerstvej smrekovej kôry a navlhčenou buničitou vatou (obr. 2). Imága boli vizuálne kontrolované každý deň v priebehu 10 dní. Pozorovala sa schopnosť huby usmrtiť a prerásť imága (obr. 3) podľa troch hodnotiacich stupňov: imágo živé (0), mŕtve neprerastené (1) a mŕtve prerastené hubou (2) (stupeň prerastanie imág).

Obrázok 1. Upravená zberná vanička s nosičom huby *B. bassiana*
Figure 1. *Modified collection tray with carrier of B. bassiana fungus.*

Obrázok 2. Odchytené a chované imága lykožrúta smrekového v Petriho miskách
Figure 2. *Captured and bred imagines of I. typographus in Petri dishes.*

Obrázok 3. Imágo lykožrúta smrekového prerastené mycéliom entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana*
Figure 3. *Adult of I. typographus overgrown with mycelium of entomopathogenic fungi B. bassiana.*

V polovici apríla 2021 boli vybrané 2 plochy vhodné pre uskutočnenie experimentu a v máji boli v blízkosti porastovej steny smrekového porastu s čerstvo spracovanou vetrovou kalamitou nainštalované feromónové lapače. Na každej z plôch bolo 5 ks lapačov, 4 ks s nosičom entomopatogénnej huby a 1 ks kontrolný. Jednalo sa o lapače MultiWit BK, navnadené feromónovým odparníkom IT ECOLURE Tubus. Nosiče entomopatogénnej huby sme, ako predchádzajúci rok, vložili do upravených odchytových vaničiek, ktoré umožnili imágam lykožrúta opustiť ich po infikovaní. Lykožrúty boli odchytávané do 1 l plastových fľašiek upevnených k odchytovej vaničke po dobu asi 24 hodín (obr. 4). Uskutočnené boli 3 odchyty počas kulminácie rojenia imág. Časť imág bolo umiestnených v laboratóriu do Petriho misiek s kúskom čerstvej smrekovej kôry (potrava) a navlhčenou buničitou vatou. Podľa rovnakých hodnotiacich stupňov ako v predchádzajúcom roku sa hodnotila schopnosť huby usmrtiť a prerásť imága v priebehu 10 dní.

Obrázok 4. Upravená odchytová nádoba lapača s nosičmi entomopatogénnej huby a odchytovými fľašami
Figure 4. *Modified collection tray with carriers of entomopathogenic fungus, and trapping bottles.*

Časť odchytených imág bolo použitých na založenie chovu v externom insektáriu, kde sa sledovala schopnosť infikovaných imág založiť novú generáciu v smrekových klátoch a vplyv huby na túto generáciu.

Ďalšou etapou experimentu bolo založenie klátov priamo v teréne, kde boli imága lykožrúta vedené pomocou plastovej hadice z lapača priamo na smrekové kláty. Kláty boli obalené do sieťoviny, čím sa zabránilo naleteniu klátov bez toho, aby imága prešli cez lapač s nosičom huby (obr. 5). Po 24 hodinách boli naletené kláty umiestnené do porastu a ponechané na „samo-vývoj“ (obr. 6). Polovica klátov (5 ks) bola v polovici augusta z porastu odobratá a v laboratórnych podmienkach vykonávaná ich analýza, polovica klátov bola umiestnená do fotoeklektorov, kde sa F1 generácia nechala vyvíjať.

Obrázok 5 a 6. Lapač s hadicou zvedenou ku smrekovému klátu a kláty umiestnené v poraste
Figure 5 and 6. *Trap with a hose leading to the spruce log, and logs placed in the stand.*

Práca je zameraná na vyhodnotenie efektu nosiča EPH s hubou *Beauveria bassiana* v lapačoch, na moralitu imág l. smrekového. Použitá bola metóda zovšeobecnených lineárnych modelov s binomiálnou distribúciou a logit spojovaciou funkciou. Parametre modelu boli odhadované metódou maximalizácie vierohodnosti modelu. Koeficienty boli exponenciované aby sme dostali tzv. odds-ratios, teda pomer šancí výskytu sledovaného javu.

2.1. Efekt nosiča na mortalitu imág

Prvá analýza bola zameraná na efekt nosiča *B. bassiana* oproti kontrole pri mortalite imág l. smrekového. Imága bez znakov nákazy a jedince usmrtené EPH vstupovali do modelu ako binárna závislá premenná. Mortalita sa označila nasledovne: 0 živé imága (vrátane mŕtvych imág bez mycélia); 1 mŕtvy chrobák prerastený mycéliom. Kontrolné lapače a lapače s nosičom ako nezávislá premenná.

2.2. Účinnosť nosiča zachovať hubu Beauveria bassiana virulentnú

V ďalšej časti práce bol analyzovaný efekt účinnosti nosiča udržať hubu *B. bassiana* virulentnú. V časti lapačov (4/10) sa menil nosič EPH po 6 týždňoch za čerstvý. Lapače s vymenenými nosičmi boli porovnávané s lapačmi, kde ostal pôvodný nosič (6/10) po celú dobu experimentu. Vyhodnocovaný bol efekt výmeny nosiča na mortalitu odchytených imág spôsobenú EPH.

3. Výsledky a diskusia

3.1. Efekt nosiča na mortalitu imág

Nosič EPH umiestnený v lapači mal výrazne vyšší pomer šancí (tab. 1) na infikovanie imág l. smrekového entomopatogénnou hubou *B. bassiana*. Niektoré imága z kontrolných lapačov boli tiež infikované.

Tabuľka 1. Odhadované parametre modelu, ktorým sa hodnotil efekt nosiča na mortalitu imág l. smrekového

Table 1. *Estimated model parameters that assessed the effect of the carrier on I. typographus mortality.*

Lapač	odds-ratios	std.error	z value	2,50 %	97,50 %	Pr(>|z|)
Kontrola	0,072	0,327	−8,015	0,036	0,131	<0,0001
Nosič	69,274	0,339	12,487	37,422	143,496	<0,0001

Účinnosť nosiča zachovať hubu Beauveria bassiana virulentnú

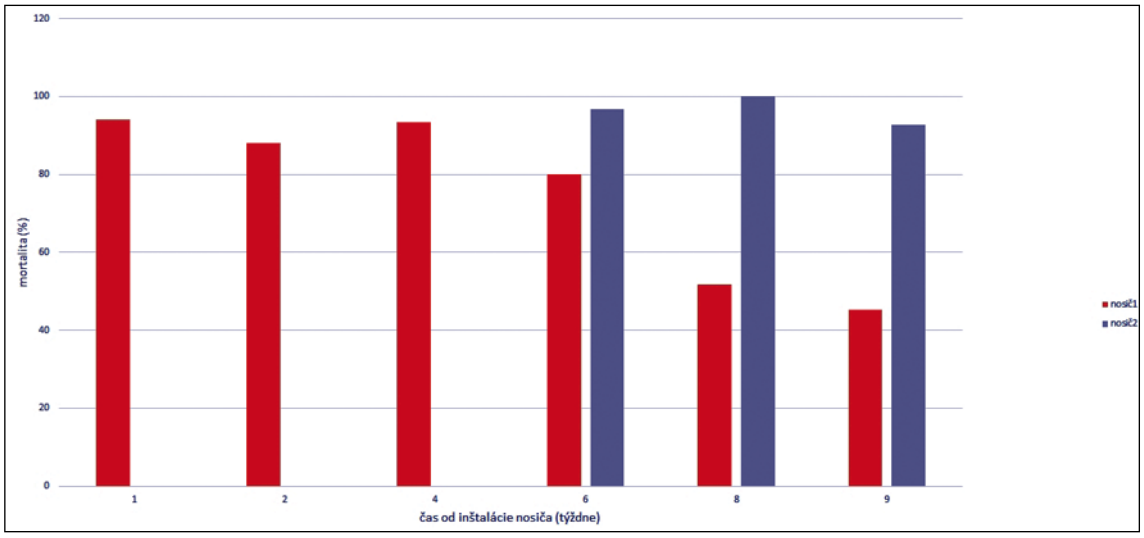
Efekt výmeny nosiča na infikovanie imág bol vyšší pri nových nosičoch (tab. 2). Pomer šancí nákazy bol 2,56 k jednej pri použití nového nosiča. Tento rozdiel bol štatisticky signifikantný.

Tabuľka 2. Odhadované parametre modelu, ktorým sa hodnotil efekt výmeny nosiča oproti lapačom, v ktorých bol ponechaný „starý“ nosič

Table 1. *Estimated model parameters that evaluated the effect of carrier replacement versus traps with „old“ carrier.*

Nosič	odds-ratios	std.error	z value	2,50%	97,50%	Pr(>|z|)
Nový	2,526	0,023	40,529	2,415	2,642	<0,0001
Starý	0,878	0,027	-4,798	0,833	0,926	<0,0001

Nosič udržal hubu vysoko virulentnú relatívne dlhé obdobie. Virulencia postupne klesala a v 6. týždni bol pre porovnanie účinnosti nosič v niektorých lapačoch vymenený za čerstvý (obr. 7).



Obrázok 7. Mortalita imág l. smrekového spôsobená hubou *B. bassiana*. z nosiča a porovnanie mortality po výmene nosiča (nosič2)
Figure 7. *Mortality of I. typographus imagines caused by the fungus B. bassiana. from carrier and comparison of mortality after carrier change (nosic2).*

K usmrteniu imága hubou došlo priemerne za 5 dní, pričom k prvotným úhynom dochádzalo už dva až tri dni od infikovania a značné percento imág uhynulo v priebehu 8 dní od infikovania. Medzi jednotlivými odchytmi boli rozdiely v priemere času, za aký huba dokázala imága usmrtiť nevýznamné. Počas experimentu došlo aj k úhynu 20 % imág odchytených z kontrolného lapača (bez nosiča huby).

Pri chovoch založených infikovanými imágami sme pozorovali prerastanie rodičovských imág (obr. 8). Značné percento z nich uhynulo ešte pred tým, ako sa dokázali zavŕtať do klátov. Infekcia sa objavila aj pri kontrolnom kláte, kde sa zrejme rozšírila vzduchom.

Obrázok 8. Imága l. smrekového prerastené entomopatogénnou hubou *B. bassiana*
Figure 8. *Imagines of I. typographus with entomopathogenic fungus B. bassiana infection.*

Pri analýze klátov ponechaných v teréne do polovice septembra sme v kontrolnom kláte nepozorovali infekciu hubou *B. bassiana* a v požerkoch boli kukly, prípadne čerstvo vyliahnuté chrobáky. Pri klátoch s infikovanými imágami sme takmer v každom požerku našli prerastené rodičovské imága (obr. 9), približne 50 % imág z celkového počtu. Pozorovali sme tiež, že niektoré materské chodby boli krátke s nízkym počtom lariev alebo nedošlo ku nakladeniu vajíčok. Domnievame sa, že vplyv na schopnosť založiť potomstvo mala rýchlosť akou huba usmrtila imága.

Napriek tomu, že väčšina rodičovských imág bola prerastená, na potomstve sme neobjavili infekciu hubou *B. bassiana*, čo môže byť spôsobené tým, že vajíčka sú uložené v lôžku, kryté a larvy postupne za sebou chodby upchávajú drvinou a trusom. Avšak, mladé imága pred vyletením vykonávajú zre-

lostný žer pod kôrou kde sa vyliahli. Predpokladáme, že takto môže dôjsť ku ich infekcii pri kontakte s prerastenými rodičovskými imágami. Z dôvodu ďalších pozorovaní bola druhá polovica klátov ponechaná v poraste do začiatku septembra, a následne presunutá do fotoeklektorov v laboratóriu, kde lykožrúty dokončia svoj vývin.

Obrázok 9. Požerky lykožrúta s prerastenými rodičovskými imágami hubou *B . bassiana*
Figure 9. *Galleries of I. typographus with parental imagines owergrown by B. bassiana.*

Výsledky experimentu aplikácie EPH *B. bassiana* do feromónových lapačov pomocou vyvíjaného nosiča ukázali vysokú účinnosť relatívne dlhé obdobie. Na rýchlosť, akou huba dokáže imágo usmrtiť má vplyv viacero faktorov. Medzi hlavné patrí koncentrácia spór, ktoré sa na imágo zachytia. Aj nízke koncentrácie sú schopné imága usmrtiť (Ansari & Butt 2012), avšak tento proces trvá dlhšie. Ku ďalším patrí životaschopnosť spór, kde poveternostné podmienky (napr. teplota, vlhkosť, UV žiarenie) (Moore et al. 1993; Morley-Davies et al. 1996) priamo ovplyvňujú klíčenie a prežívanie spór. V predchádzajúcich experimentoch obdobného charakteru bolo médium so spórami EPH aplikované do lapača vo forme prášku a dochádzalo ku rýchlej strate virulencie spór (Kunca 2009; Vakula et al. 2010, 2012; Grodzki & Kosibowicz 2015), pravdepodobne v dôsledku vysokých teplôt, prípadne navlhnutím práškového média a tým stratou priľnavosti na imága. Pri aplikácii huby pomocou nosiča, si spóry udržali vysokú virulenciu v podmienkach feromónových lapačov, čo pripisujeme tomu, že nosič je v čase aplikácie do lapača prerastený mycéliom huby, ktoré pri krátkodobých nepriaznivých podmienkach (denné teplotné maximá) dokáže prežiť vo vnútri nosiča a následne znovu vyrásť na povrch a produkovať spóry. Virulencia huby bola pozorovaná na mortalite odchytených imág l. smrekového. Pre porovnanie účinnosti nosiča z časového hľadiska, bol tento v niektorých lapačoch vymenený. Po tejto výmene sa potvrdila signifikantne vyššia virulencia huby z čerstvého nosiča, čo pripisujeme postupnému vysychaniu média, prípadne postupnému vyčerpaniu živín v médiu. Počas experimentu došlo aj k úhynu 20 % imág odchytených z kontrolného lapača (bez nosiča huby), pričom na časti bola pozorovaná infekcia hubou *B. bassiana*. Zdroj infekcie mohol byť z prírodného prostredia kde sa *B. bassiana* prirodzene vyskytuje (Kram & Kram 2012; Meyling & Eilenberg 2006; Landa ez al. 2001; Reay et al. 2010) alebo prenosom spór patogénu vzduchom z lapačov s nosičom. Tieto boli od seba umiestnené približne 20 metrov. Genetická analýza kmeňov *B. bassiana* nebola vykonaná. Z toho dôvodu by zrejme v budúcich experimentoch bolo vhodné umiestniť kontrolné lapače vo väčšej vzdialenosti od lapačov s nosičom EPH a tiež vykonať genetickú analýzu huby infikovaných imág v kontrolných lapačoch.

Experiment teda potvrdil schopnosť nosiča udržať hubu *B. bassiana* virulentnú aj v podmienkach lapača, tiež vysokú účinnosť huby v laboratórnych podmienkach. Podobné výsledky v laboratórnych podmienkach vykazujú aj práce viacerých autorov (Wegensteiner 1996; Kreutz et al. 2004b). Cieľom je aj úspešná aplikácia patogéna do populácie škodcu. Podľa doterajších pozorovaní sú aj infikované imága schopné založiť novú generáciu. Čerstvo vyliahnuté imága následnej generácie ešte pred vyletením vykonávajú tzv. zrelostný žer. Predpokladáme, že takto môže dôjsť ku vertikálnemu prenosu infekcie pri kontakte so spórami z už prerastených rodičovských imág. Túto hypotézu je však potrebné overiť.

Výhodou využitia entomopatogénnych húb v boji proti lykožrútovi smrekovému je ekologickosť, pretože sú prirodzenou súčasťou prírodného prostredia (Kram & Kram 2012; Meyling & Eilenberg 2006; Landa et al. 2001; Reay et al. 2010) a boli pozorované na podkôrnych druhoch hmyzu, najčastejšie na *Ips typographus* (Kirschner 2001; Wegensteiner 2004; Wegensteiner et al. 2007 a, b; 2015 a, b), *Ips sexdentatus* (Draganova et al. 2010; Takov et al. 2012). Nepredstavujú nebezpečenstvo pre vtáky, ryby a cicavce (Zimmermann 1993, 2007) a nepredstavujú riziko pre ľudí alebo životné prostredie (Strasser et al. 2000; Dabro & Thomas 2009). V kombinácii s feromónovým lapačom je táto metóda selektívna, nakoľko feromónové odparníky primárne lákajú cieľové druhy škodcov (Vakula et al. 2012).Výhodou je tiež ich schopnosť produkovať nové konídiá na uhynutých jedincoch. Konídiá sú tiež schopné udržať si za priaznivých podmienok (v pôde, hrabanke) klíčivosť aj niekoľko mesiacov (Ansari & Butt 2012).

Poďakovanie

Práca vznikla vďaka finančnej podpore 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, projektu „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 a projektov APVV-19-0116 a APVV-19-0119.

Zoznam použitej literatúry

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.

Bałazy, S., 2012: Antagonistyczne oddziaływania pomiędzy bezkręgowcami a ich patogenami grzybowymi w żerowiskach kambio-i ksylofagów. Ochrona lasu–wybrane problemy historyczne i współczesne. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, p. 51–63.

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.

Draganova, S., Takov, D., 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.

Galko, J., Nikolov, Ch., Rell, S., Kunca, A., Vakula, J., Gubka, A., Zúbrik, M., 2014: Vývoj nových typov feromónových lapačov. In: Kunca, A. (ed): Proceedings of the 23rd conference „Aktuálne problémy v ochrane lesa 2014", Nový Smokovec, 23. 4. – 24. 4. 2014, p. 182–187.

Grodzki, W., Kosibowicz, M., 2015: An attempt to use the fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. in forest protection against the bark beetle *Ips typographus* (L.) in the field.

Kirschner, R., 2001: Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in central Europe. Trichomycetes and other fungal groups, p.175–196.

Kram, A. A., Kram, K. J., 2012: Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review). In: J. A. Blanco (ed.): Forest Ecosystems – More than Just Trees, 482 p.

Kreutz, J., 2002: Möglichkeiten einer biologischen Bekämpfung des Buchdruckers, Ips typographus L. (Col., Scolytidae), mit insektenpathogenen Pilzen in Kombination mit Pheromonfallen. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, p. 189.

Kreutz, J., Zimmermann, G., Marohn, H., Vaupel, O. , Mosbacher, G., 2000: Preliminary investigations on the use of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and other control methods against the bark beetle, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) in the field. IOBC/WPRS-Bulletin, 23: 167–173.

Kreutz, J., Zimmermann, G., Vaupel, O., 2004a: Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. Biocontrol Science and Technology, 14(8): 837–848.

Kreutz J., Vaupel O., Zimmermann, G., 2004b: Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. Journal of Applied Entomology, 128(6): 384–389. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00813.

Kunca, A., Vakula, J., Leontovyč, R., Gubka, A., 2009: Využitie entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* v ochrane smreka. Aktuálne problémy v ochrane lesa. Zvolen, Národné lesnícke centrum Zvolen, p. 91–97.

Landa, Z., Horňák, P., Bursová, E., 2001: Entomopatogenní houby asociované s lýkožroutem smrkovým Ips typographus L. (Coleoptera, Scolytidae) v oblasti NP a CHKO Šumava. Aktuality šumavského výzkumu, p. 124–128.

Meyling, N. V., Eilenberg, J., 2006: Occurrence and distribution of soil bome entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. Agri., Ecos. & Environ., 113: 336–34I.

Moore, D., Bridge, P. D., Higgins, P. M., Bateman, R. P., Prior, C., 1993: Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Ann. Appl. Biol., 122: 605– 616.

Morley-Davies, J., Moore, D., Prior, C., 1996: Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. Mycol. Res., 100: 31–38.

Økland, B., Nikolov, C., Krokene, P., Vakula, J., 2016: Transition from windfall-to patch-driven outbreak dynamics of the spruce bark beetle *Ips typographus*. Forest Ecology and Management, 363: 63–73.

Reay, S. D., Brownbridge, M., Gicquel, B., Cummings, N. J., Nelson, T. L., 2010: Isolation and characterization of endophytic *Beauveria* spp.(Ascomycota: Hypocreales) from *Pinus radiata* in New Zealand forests. Biological Control, 54(1): 52–60.

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*, *Tolypocladium* 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.

Vakula, J., Varkonda, Š., Galko, J., Gubka, A., Kunca, A., Zúbrik, M., 2010: Rozvoj sučasných technických možnosti pri štúdiu niektorých spôsobov aplikácie entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* v rámci biologických metód ochrany lesa. Aktuálne problémy v ochrane lesa. Zvolen, Národné lesnícke centrum, p. 64–68.

Vakula, J., Gubka, A., Galko, J., Varkonda, Š., 2012: Aplikácia entomopatogénov do populácii škodcov s využitím feromónových lapačov. Aktuálne problémy v ochrane lesa. Zvolen, Národné lesnícke centrum, p. 92–96.

Vaupel, O., Zimmermann, G., 1996: Orientierende Versuche zur Kombination von Pheromonfallen mit dem insektenpathogenen PilzBeauveria bassiana (Bals.) Vuill. gegen die Borkenkäferartlps typographus L.(Col., Scolytidae). Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz, 69(8): 175–179.

Wegensteiner, R., 1996: Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera, Scolytidae). Bulletin OILB/SROP, 19(9): 186–189.

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. Mitt. Schweiz. Entomol. Ges., 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, 2015(3): 219–232.

Wermelinger, B., 2004: Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus*–a review of recent research. Forest ecology and management, 202(1–3): 67–82.

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. Jozef Vakula, PhD., Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Michal Lalík, Ph.D., Ing. Milan Zúbrik, PhD., Ing. Andrej Kunca, PhD., Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD., Ing. Roman Leontovyč, PhD.
Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Stredisko lesníckej ochranárskej služby, Lesnícka 11, 969 01 Banská Štiavnica, Slovenská republika
e–mail: slavomir.rell@nlcsk.org

ŠTÚDIA VYUŽITIA ENTOMOPATOGÉNNEJ HUBY *BEAUVERIA BASSIANA* V INTEGROVANEJ OCHRANE LESA PROTI TVRDOŇOVI SMREKOVÉMU *HYLOBIUS ABIETIS*

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

Lalík, M., Galko, J., Rell, S., Kunca, A., Vakula, J., Gubka, A., Nikolov, C., Leontovyč, R., Zúbrik, M.: Study of the use of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in integrated forest protection against the large pine weevil *Hylobius abie*tis. APOL, 2022, vol. 3, no. 1, p. 37–46.

Abstract: The large pine weevil (*Hylobius abietis*) is an important pest of freshly planted coniferous trees. Feeding damage to conifer seedlings can be prevented by protecting the seedlings (mechanically or chemically), or by reducing *H. abietis* abundance. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* has promise for *H. abietis* control. To test the effects of the *B. bassiana*-colonized carriers (25 mm in diameter and colonized by strain AMEP20, BB alpha and beta) on *H. abietis* adults that move into forest clearances, we performed several experiments. These included an experiment in Petri dishes under laboratory conditions and a field experiment. Infection by *B. bassiana* and mortality of *H. abietis* was confirmed in all experiments. The total mortality rate in two treatments Petri dishes with *B. bassiana* carriers was 100% after 15 and 23 days was 74%. The mortality of *H. abietis* adults was affected by the absence/presence of carriers in the bark on the block. The number of dead adults after 4 weeks of treatment in forest clearing were higher in plots with carriers than in the control plot. Mortality was highest for adults trapped in the plot with carriers on trap barks (52%), followed by the plot with carriers and an attractant (19%), and followed by the plots with carriers without an attractant (18%). The results suggest that carriers colonized by the entomopathogenic fungus *B. bassiana* could be suitable for reducing *H. abietis* abundance in forests. The results indicated that *H. abietis* adults may be infected by *B. bassiana* after only a short exposure to carriers. The *B. bassiana*-colonized carrier is ready-to-use, i.e., it could be immediately produced and applied.

Key words: large pine weevil; entomopathogenic fungi; carrier; forest protection

1. Problematika

Tvrdoň smrekový *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) je významným škodcom ihličnatých sadeníc (Eidmann 1974; Nordlander 1987). Veľké množstvo pňov vzniknutých náhodnou alebo úmyselnou ťažbou vytvárajú priaznivé podmienky pre nárast populácie *H. abietis*. Larvy sa vyvíjajú v čerstvých ihličnatých pňoch a považujú sa za užitočné pri rozklade pňov (Nordlander et al. 1997; Von Sydow & Birgersson 1997; Leather et al. 1999; Moore et al. 2004). Imága sa roja na jeseň toho istého roku alebo na jar nasledujúceho roku a pri nepriaznivých podmienkach na vývoj môže byť vývoj aj viac ročný (Nordenhem 1989). Na zabezpečenie dozrievania vajíčok musia dospelé samice *H. abietis* skonzumovať veľké množstvo potravy, zvyčajne vo forme kôry mladých sadeníc ihličnanov (Munro 1928; Nordenhem 1989; Leather et al. 1999; Örlander et al. 2000; Wainhouse et al. 2004). Na miestach, kde je hojný výskyt *H. abietis*, môžu poškodiť alebo úplne zničiť mladý porast. (Örlander & Nilsson, 1999; Day et al. 2004; Wainhouse & Brough 2007). V dôsledku toho sa zalesňovanie musí opakovať, čo môže podstatne zvýšiť náklady. Je známych veľa možností ochrany sadeníc pred poškodením mechanicky alebo formou chemickej ochrany, prípadne zber imág môže znížiť ich početnosť. Ďalším potenciálnym spôsobom zníženia poškodenia *H. abietis* je biologická kontrola prostredníctvom použitia entomopatogénnych háďatiek alebo húb (EPH) (Wegensteiner & Führer 1988). EPH oslabuje a zabíja svojich hostiteľov a následne sa živia extrakciou živín z ich tela (Ansari & Butt, 2012). Tieto huby sa považujú za environmentálne bezpečné (Zimmermann 2007), môžu sa hromadne vyrábať (Jaronski

2014) a majú značný potenciál kontrolovať rôznych lesných škodcov (Ansari & Butt 2012; Augustyniuk-Kram & Kram 2012). Je dostupných viac ako 50 produktov, ktoré obsahujú EPH, zvyčajne *Beauveria* spp., ktoré sú dostupné vo forme zmáčateľných práškov, koncentrovaných suspenzií alebo emulgovaných suspenzií (Mascarin & Jaronski 2016). Infekcie spôsobené EPF *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., B. *brongniartii* (Sacc.) Petch a *B. caledonica* (Bissett a Widden) sú trvalo prítomné v populáciách *H. abietis*, ale ich prevalencia je zvyčajne <6 % (Williams et al. 2013; Barta et al. 2019). Všetky vývojové štádiá *H. abietis* sú citlivé na EPF, hoci druhy a kmene húb sa líšia svojou virulenciou (Ansari & Butt 2012). Objav vysoko virulentných kmeňov *B. bassiana* má tiež vysoký potenciál pre biologickú kontrolu *H. abietis*. Skonzumovaná plocha kôry bola u *H. abietis* ošetrených *B. bassiana* nižšia ako u tých neošetrených a skonzumovaná plocha kôry sa znížila, keď sa zvýšila koncentrácia konídií *B. bassiana* aplikovaná na *H. abietis* (Barta et al. 2019). Pri celoplošnom postreku EPH na veľké plochy existujú dva problémy: Po prvé, larvy a dospelí *H. abietis* sú ukryté a po druhé, postrekovanie veľkých plôch by mohlo poškodiť necieľový hmyz, pretože väčšina EPH má široké spektrum hostiteľov (Zimmermann 2007; Devi et al. 2008). Tieto problémy by sa dali vyriešiť prilákaním *H. abietis* do oblasti, kde sa EPH vyskytujú. Nosič, ktorý je kolonizovaný *B. bassiana* má guľový tvar a má priemer približne 25 mm. EPH na tomto nosiči rastú a produkujú spóry počas celej vegetačnej sezóny. Nosič *B. bassiana* bol vyvinutý v laboratóriách Lesnej ochranárskej služby v Banskej Štiavnici (Národné lesnícke centrum, Lesnícky výskumný ústav Zvolen) bol patentovaný (PCT/SK2020/050007, Prioritné údaje: PP 79-2019).

Hlavným cieľom aktivity je testovanie biologickej účinnosti špeciálneho nosiča entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* na infekciu imág tvrdoňa smrekového (*Hylobius abietis*) na vybranej ploche (plochách), ktorý bol vyvinutý na LOS Banská Štiavnica.

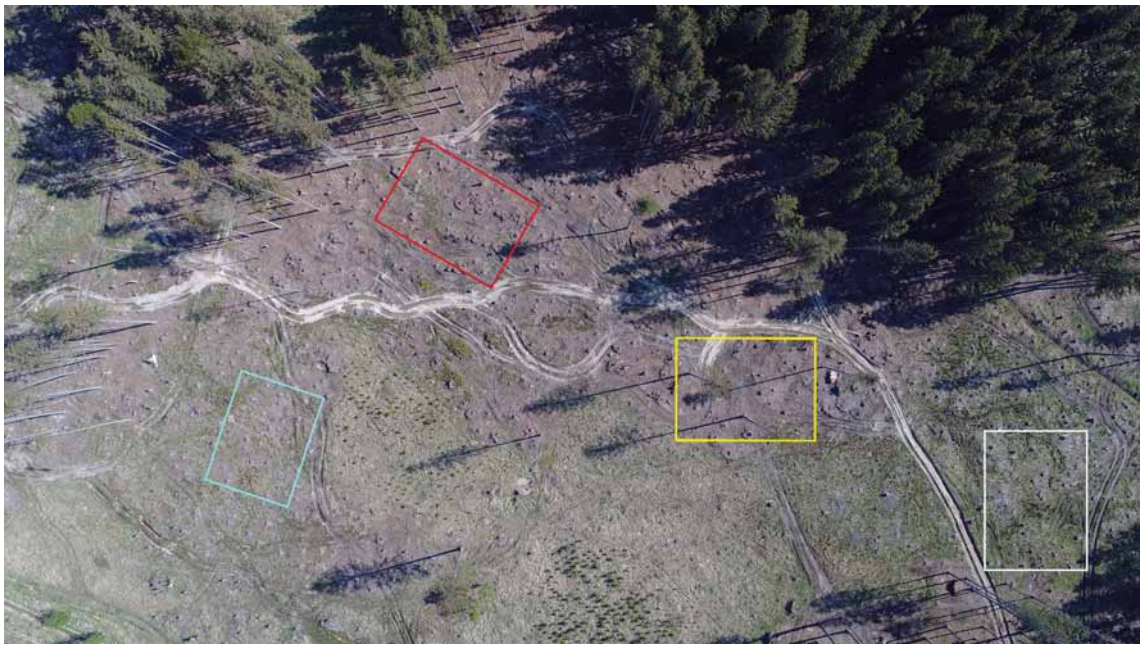
Pracovníci spoločnosti VLM SR, š. p., sa spolupodieľali na realizácii terénnych experimentov. Ich účasť na terénnych prácach pre výskum bola koordinovaná na základe pokynov NLC, pričom sa jednalo najmä o asistenciu pri výbere vhodných plôch, pri zakladaní experimentov v lesných porastoch, výrobe lapacích kôr podľa pokynov LOS, výrobe kolíkov na označenie experimentov v teréne, atď.

2. Materiál a metódy

2.1. Experiment v roku 2020

Experiment bol založený v smrekových porastoch v rámci Lesnej správy Sklené v lokalite Rovná hora. Pred založením experimentu bol vykonaný „skríning“ prítomnosti imág tvdroňa smrekového do zemných pascí na piatich lokalitách (5 pascí na každej lokalite). Na experiment sme následne vybrali plochu s najvyššou početnosťou cieľového škodcu.

Na vybranej ploche boli založené 4 rovnako veľké bloky (obr. 1). Veľkosť bloku bola približne 15 × 25 m a vzdialenosť medzi nimi 30 až 50 m (podľa podmienok prostredia). Na jednotlivých blokoch boli vykonané nasledovné ošetrenia:



Obrázok 1. Rozmiestnenie blokov po ploche (1. blok biela, 2. blok žltá, 3. blok červená, 4. blok modrá)
Figure 1*. Distribution of blocks on the surface (1st block white one, 2nd block yellow one, 3rd block red one, 4th block blue one).*

1. blok (K): Lapacie kôry bez nosiča – kontrola. V bloku sa inštalovalo 24 ks lapacích kôr (4 rady, 6 kôr v každom rade). V kôrach sa nenachádzal nosič. Vzdialenosť medzi kôrami bola približne 5 – 6 m v závislosti od podmienok terénu. Vzdialenosť medzi radmi bola 5 až 10 m. Následne sa medzi jednotlivé kôry inštalovalo 20 ks zemných pascí (5 pascí v jednom rade) na odchyt *H. abietis*.

2. blok (G): Samostatný nosič. V bloku sa inštalovalo 24 ks nosičov entomopatogénnej huby, ktoré sporulujú do prostredia spóry. Rozostupy ostali rovnaké, ako je opísané vyššie.

3. blok (A): Nosič + atraktant. V bloku sa inštalovalo 24 ks nosičov entomopatogénnej huby, ktoré sporujú do prostredia spóry, ku ktorým bol pripnutý atraktant s obsahom alfa-pinenu s etylalkoholom v pomere 1:1. Rozostupy ostali rovnaké, ako je rovnaké opísané vyššie.

4. blok (L): Lapacie kôry s nosičom. Kôry boli inštalované v tom istom dizajne opísanom pri prvom bloku, avšak vo všetkých lapacích kôrach sa nachádzal nosič (obr. 2a).

Na ochranu nosičov pred konzumáciu myšami a čiastočnú ochranu pred slnkom sme použili florbalové loptičky, ktoré sme narezali, aby do nich bolo možné vložiť nosič alebo nosič s atraktantom (obr. 2b). Bloky a jednotlivé rady boli v teréne vyznačené drevenými kolíkmi nastriekanými reflexnou farbou. Zemné pasce (lapače), ktorých bolo spolu 80 ks, sú upravené malé vedierka s objemom 1,2 litra s 10 otvormi (priemer 10 mm) v hornej časti lapača (obr. 2c). Pasce mali vrchnáky a boli zakopané do zeme tak, aby otvory, cez ktoré vchádzali imága, boli na povrchu pôdy. Ako atraktany imág t *H. abietis* sa do každej pasce použili borovicové vetvičky (dĺžka 50 mm a priemer 12 ± 2 mm), ktoré boli pripravené z jediného stromu borovice lesnej. Vetvička bola umiestnená do pasce spolu s 20 ml fľaškou obsahujúcou 70%-ný etylalkohol. Vrchnák fľaše mal šesť otvorov s priemerom 2 mm a jeden otvor s priemerom 4 mm. Steny zemných pascí boli ošetrené teflónovým sprejom, ktorý po uschnutí na stenách spôsobuje, že imága sa nedostanú po stenách z pasce von. Zemné pasce a fľašky s etanolom boli vyrobené pracovníkmi NLC.

Obrázok 2. a. nosič v lapacej kôre, b. nosič s atraktantom, c. zemná pasca s odchytenými *H. abietis*, d. odchytené imága umiestnené v laboratóriu

Figure 2. *a. carrier in the trapping bark, b. carrier with attractant, c. ground trap with captured H. abietis, d. captured image placed in a laboratory.*

Odber imág bol vykonávaný minimálne po 6-tich dňoch od umiestnenia nosičov do terénu z dôvodu, aby imága prišli do kontaktu s nosičom. Zo všetkých zemných pascí sa odoberali odchytené *H. abietis* počas niekoľkých dní. Odoberali sa pinzetou, ktorá sa po každom odbere dezinfikovala etanolom a následne boli vložené do samostatných Petriho misiek, ktoré boli prevezené do laboratórií LOS (NLC) (obr. 2d). Odoberané boli aj imága, ktoré sa odchytili priamo z lapacích kôr, v ktorých boli umiestnené nosiče (LS).

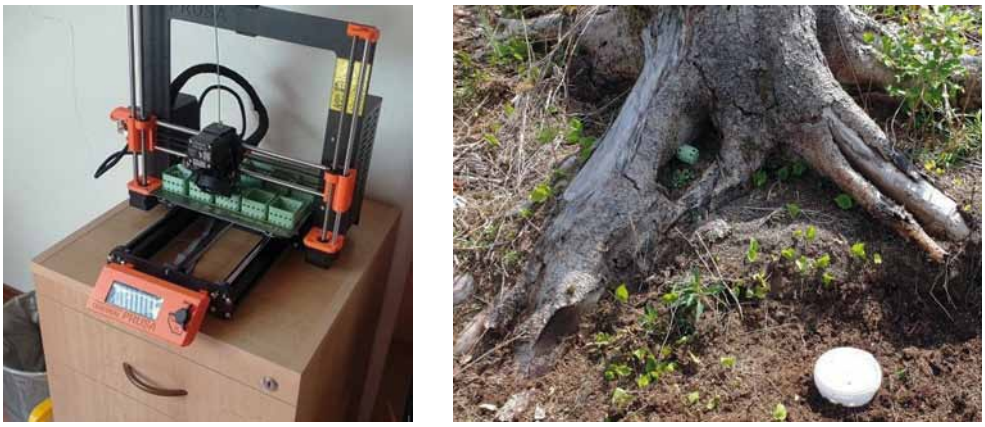
2.2. Experiment v roku 2021

Pracovníci spoločnosti VLM SR, š. p., sa spolupodieľali na realizácii terénnych experimentov. Ich účasť na terénnych prácach pre výskum bola koordinovaná na základe pokynov NLC, pričom sa jednalo najmä o asistenciu pri výbere vhodných plôch, pri zakladaní experimentov v lesných porastoch, výrobe lapacích kôr podľa pokynov LOS, odchyte *H. abietis*, výrobe kolíkov na označenie experimentov v teréne, atď.

Za účelom rozšírenia nášho terénneho výskumu o borovicové porasty na OZ Malacky, bol vyhotovený zoznam porastov, v ktorých prebiehala ťažba v posledných rokoch. Následne bol dňa 31.03.2021 vykonaný terénny skríning vybraných plôch za účelom zistenia prítomnosti poškodenia borovicových sadeníc od zrelostného žeru *H. abietis*. Bolo skontrolovaných približne 10 porastov. Nakoľko sme nenašli počas celého dňa žiadne poškodenie na sadeniciach, ďalej sme upustili od myšlienky realizovať experimenty v tejto oblasti, nakoľko sa tu cieľový škodca nachádza len v minimálnej početnosti.

Nové terénne experimenty boli teda založené opäť v smrekových porastoch v rámci Lesnej správy Sklené. Pred založením experimentu bol vykonaný „skríning" prítomnosti imág *H. abietis* do lapacích kôr na piatich lokalitách (5 pascí na každej lokalite). Na ďalšie experimenty sme následne vybrali plochy s najvyššou početnosťou cieľového škodcu.

Účinnosť nosiča sme dokázali v predošlých pokusoch. V novom experimente sme sa zamerali na vývoj a terénne testovanie špeciálnych chráničiek vytlačených na 3D tlačiarni podľa vlastného návrhu (obr. 3). Chránička má dve úlohy. Jednak ochrániť samotný nosič, aby ho nekonzumovali drobné hlodavce a jednak zabrániť kontaktu nosiča s užitočnými druhmi hmyzu, ako napr. bystrušky. Chráničky mali taký priemer otvorov, aby doň prešli imága *H. abietis,* ale nie veľké bystrušky, ktoré sú chránené.



Obrázok 3. 3D tlačiareň (vľavo) a chránička v teréne (vpravo)
Figure 3*. 3D printer (left) and field protector (right).*

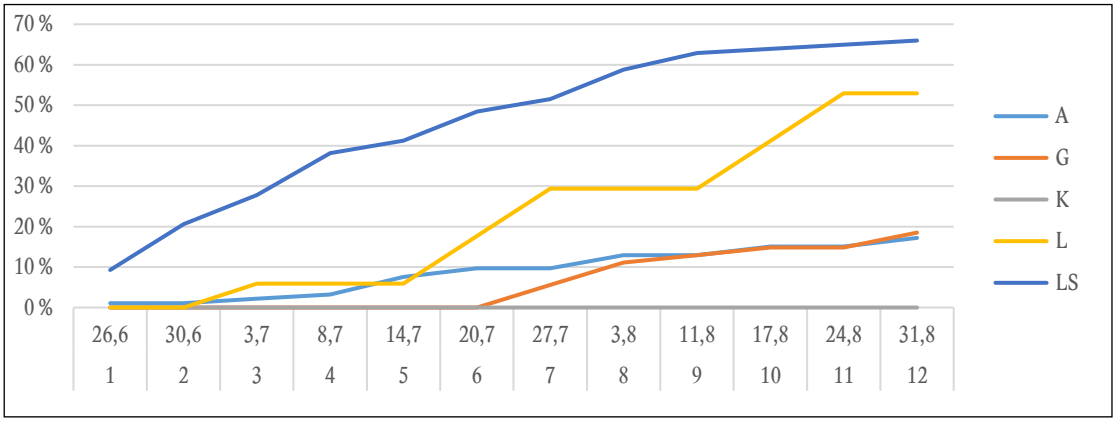
Ďalší terénny experiment v rámci LS Sklené mal za cieľ overiť účinnosť použitia nosičov priamo v lapacích kôrach, nakoľko táto kombinácia sa v predošlom roku javila ako najúčinnejšia. Pokus bol založený na 3 plochách. Na každej ploche bolo nastavených 10 kôr s nosičmi a 10 kôr bez gúľ (kontrola). Imága boli zberané priamo z lapacích kôr, následne boli prevezené do laboratóriá a ich stav bol kontrolovaný v pravidelných intervaloch.

Počas riešenia projektu sme získali ďalšie kmene entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* (pracovné názvy BB alfa a BB beta). Cieľom nášho laboratórneho pokusu bolo porovnať účinnosť a rýchlosť pôsobenia ich spór na imága *H. abietis* v porovnaní s našim používaným kmeňom (BB AMEP20) a výsledky porovnať s kontrolou. Na experiment sme použili 220 imág *H. abietis*, ktoré boli získané z LS Sklené. Imága boli rozdelené do 4 blokov (3 rôzne kmene s hubou *B. bassiana* a kontrola), v každom bloku do 11 Petriho misiek (v 1 Petriho miske bolo 5 imág). V každej miske bol kus smrekovej kôry ako potrava a kúsok navlhčenej buničiny ako zdroj vody a vlhkosti. Kontrola postupnej mortality imág bola vykonávaná každé 3 – 4 dni. Hodnotilo sa, či sú imága živé, resp. mŕtve a začínajú prerastať hubou.

3. Výsledky a diskusia

3.1. Experiment v roku 2020

V laboratóriách sa v pravidelných intervaloch (niekoľko dní) sledovalo postupné prerastanie odchytených imág *H. abietis* podľa jednotlivého spôsobu ošetrenia (obr. 4). Z výsledkov jednoznačne vyplýva vplyv nosiča na mortalitu imág *H. abietis*, keď každý spôsob použitia nosiča bol výrazne lepší ako kontrola bez nosiča. Z výsledkov môžeme konštatovať, že imága odobrané z kontrolného bloku nevykázali v podstate žiadnu mortalitu. Z výsledkov vyplýva aj to, že najvyššiu priemernú mortalitu dosiahli imága *H. abietis* odobrané priamo z lapacích kôr (66 %), nasledované imágami odchytených do zemných pascí v bloku s lapacími kôrami (cez 50 %), v ktorých boli nosiče. Varianty blokov so samostatnými nosičmi, resp. nosičmi a atraktantmi dosiahli priemernú mortalitu a prerastenie odchytených imág do 20%.



Obrázok 4. Kumulatívna mortalita imág *H. abietis* počas trvania experimentu
***Figure 4**. Cumulative mortality of H. abietis images during the experiment.*

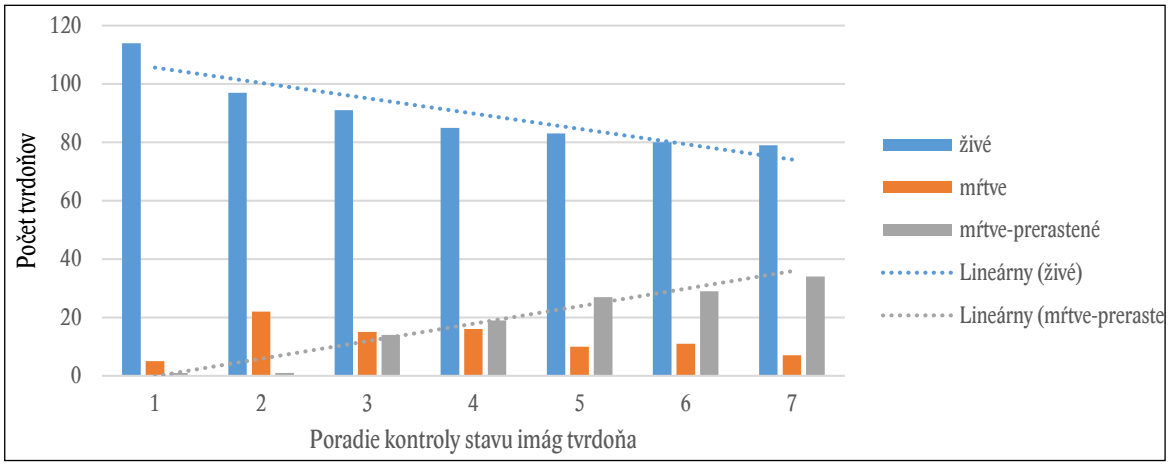
Vzhľadom na pozitívne výsledky 24-hodinovej prítomnosti nosičom pri imágach *H. abietis* v laboratórnom experimente (Lalík et al. 2021) sme očakávali, že nosiče tiež zvýšia úmrtnosť *H. abietis* v terénom experimente. Po tom, čo boli nosiči umiestnené v teréne, sme počkali 6 dní na umiestnenie pascí, aby sa mohla rozvinúť infekcia *B. bassiana* (Barta et al. 2019). Najvyššiu mortalitu sme zaznamenali v skupine imág odobratých priamo z lapacej kôry 66 %, čo je pochopiteľné, pretože títo dospelí jedinci nepochybne prišli do kontaktu s nosičom. Na rozdiel od toho jedince odchytené z lapacej pasce sa nemuseli dostať do kontaktu s nosičom, čo má za následok zníženú mortalitu. Imága *H. abietis* sú veľmi aktívni a pohybliví. Do polovice septembra lieta 50 – 60 % novovyrojených dospelých jedincov (Tan et al. 2010). Samice môžu lietať alebo prejsť veľké vzdialenosti, aby našli vhodné miesta na kladenia vajíčok (Mráček & Šrutka 1984). Dospelé jedince *H. abietis* dokážu preletieť až 2000 m na jeden krát a počas celého života môžu preletieť viac ako 80 000 m (Solbreck & Gyldberg& 1979). V holinách sa samce pohybujú v reakcii na iných samcov (Tilles et al. 1988) alebo v reakcii na samičie feromóny (Selander 1978). Napriek možnosti, že imága sa mohli presunúť na blok a potom do pasce bez toho, aby sa kontaktovali s nosičom, úmrtnosť imág na blokoch s nosičmi dosiahla 20 – 50 %. Na Slovensku sa prirodzená úmrtnosť v populáciách *H. abietis* pohybuje od 0 do 6 % v závislosti od dátumu odchytu. Po začiatku júla nebola pozorovaná žiadna nákaza (Barta et al., 2019). Toto sme potvrdili aj my, keď na našej kontrolnej ploche neboli odchytené imága, ktoré by následne v laboratórnych podmienkach zahynuli v dôsledku huby *B. bassiana*.

Domnievame sa, že na výsledky mohol mať vplyv aj fakt, že sa jedná o glejové podložie a počas daždivého roka 2020 bolo extrémne podmočené (dokonca boli zemné pasce vytlačené vodou) a koľaje po ťažbových mechanizmoch tvorili bariéry pre imága *H. abietis* (nakoľko sa po ploche pohybujú chodením a lietajú len obmedzene).

3.2. Experiment v roku 2021

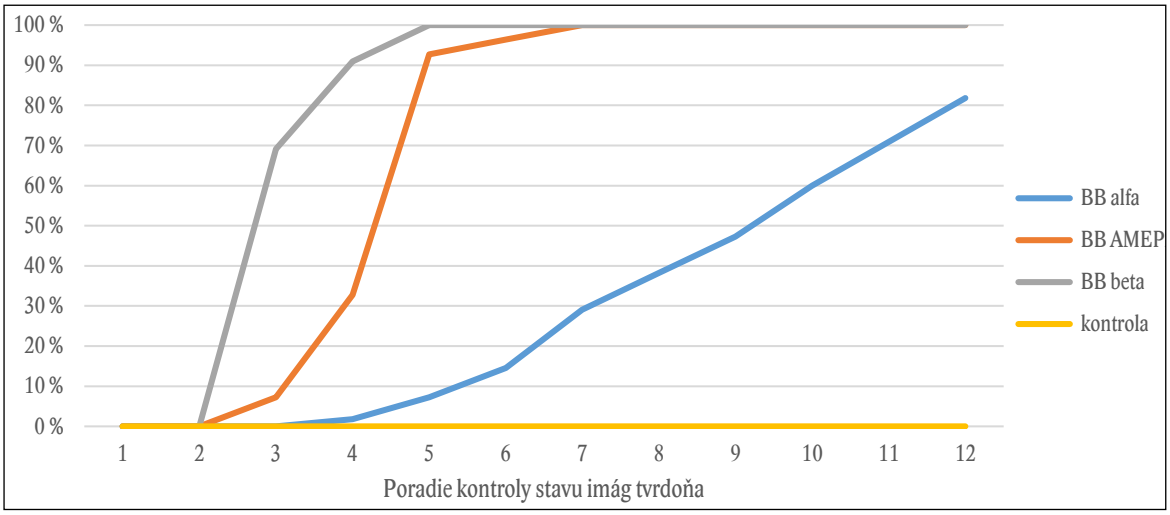
Výsledky ukázali, že chráničky dokážu zabezpečiť, aby sa bystrušky nedostali do tesného kontaktu s nosičom. Celkovo sme odchytili 87 bystrušiek, ktoré sme následne preniesli do laboratória a sledovali prerastanie. Z odchyteného množstva prerástlo 6 bystrušiek. Ďalšie druhy, ktoré sme odchytili, boli pavúky 47 ks (prerástli 4 ks), mravce 54 ks (prerástli 3 ks), lykokazy 63 ks (prerástlo 18 ks).

Sumárne výsledky zo všetkých plôch z experimentu, kde bol použitý nosič v lapacích kôrach ukázali, že živých jedincov každou kontrolou ubúdalo a naopak mortalita imág *H. abietis* a ich úspešne prerastaniu hubou postupe stúpala, čím sme opäť potvrdili účinnosť tohto nosiča v teréne (obr. 5). Imága zberané z kontroly nie sú v grafe uvedené, nakoľko sa tam nevyskytla žiadna mortalita, čo potvrdilo, že mortalita uvedená v grafe bola zapríčinená úspešnou infekciu z nášho nosiča.



Obrázok 5. prežívanie a mortalita imág *H. abietis* zberaných z lapacích kôr s nosičom
Figure 5. *Survival and mortality of H. abietis images collected from carrier traps.*

Z výsledkov porovnávania rôznych kmeňov huby *B. bassiana* vyplýva, že majú výrazne rozdielny vplyv na mortalitu *H. abietis*. Najlepšie výsledky dosiahol kmeň BB beta, kde v 15. deň pokusu bola dosiahnutá 100 % mortalita. Ako druhý najlepší vyšiel náš kmeň BB AMEP20, kde bola 100 % mortalita dosiahnutá na 23. deň. Kmeň BB alfa dokázal usmrtiť iba 82 % *H. abietis* na konci experimentu (obr. 6). Kontrolné jedince počas celého experimentu neuhynuli.



Obrázok 6. Porovnanie priebehu mortality imág *H. abietis* podľa použitého kmeňa entomopatogénnej huby *B. bassiana*
Figure 6. *Comparison of the course of mortality of H. abietis images according to the used strain of entomopathogenic fungus B. bassiana.*

Naifikovanie rôznymi kmeňmi hubou *B. bassiana* môže mať iný vplyv na mortalitu imág (Barta et al. 2019). Toto sa potvrdilo v laborátornom experimente. Testovali sa tri rôzne kmeňe huby *B. bassiana*. Dva kmeňe dosiali 100 % mortalitu imág jeden po 15 dňoch a druhý po 23 dňoch. Posledný testovaný kmeň dosiahol 82 % mortalitu imág. Podobné výsledky prezentovali Ansari & Butt (2012), ktorí uviedli, že všetky imága *H. abietis* priamo ošetrené suspenziou konídií *B. bassiana* (1×10^8 ml) boli usmrtené do 20 dní. V ďalšej štúdii spôsobila rovnaká koncentrácia konídií *B. bassiana* celkovú úmrtnosť imág *H. abietis* po 30 dňoch (Barta et al. 2019).

4. Súhrn

Výsledky naznačujú, že nosiče kolonizované entomopatogénnou hubou *B. bassiana* by mohli byť vhodné na zníženie početnosti *H. abietis* v lesoch. Výsledky ukázali, že imága *H. abietis* môžu byť infikované *B. bassiana* už po krátkom vystavení nosičom. Opísaný nosič bol vo vývoji 5 rokov a bol testovaný v laboratórnych a prírodných podmienkach. Použitie nosičov znižuje lokálnu početnosť *H. abietis* a má minimálne účinky na ostatné bezstavovce. Ak chceme tieto účinky minimalizovať, je vhodné nosič vložiť do chráničky. Okrem toho sa zdá, že s nosičom nie je potrebné použiť atraktant, ak sa správne umiestni (ku pňu alebo k sadenici). Hoci súčasná štúdia zistila, že atraktant pri nosičoch nezvýšil úmrtnosť *H. abietis*, je potrebný ďalší výskum, aby sa zistilo, či atraktant, ktorý sa pridáva priamo k nosiču, zvyšuje úmrtnosť *H. abietis*. Kvôli ekologickým rizikám spojeným s používaním tradičných insekticídov výrobcovia pesticídov čoraz viac uvažujú o vývoji a výrobe biopesticídov. Súčasné výsledky naznačujú, že nosič s *B. bassiana* bude užitočným biopesticídom na kontrolu *H. abietis* v lesoch a možno aj na kontrolu iných hmyzích škodcov v iných poľnohospodárskych kultúrach.

Poďakovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci 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. Táto publikácia vznikla aj vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt „Centrum excelentnosti lesnícko-drevárskeho komplexu LignoSilva"; (kód ITMS: 313011S735), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoj 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. Práca vznikla vďaka finančnej podpore v rámci projektov APVV-18-0086, APVV-19-0116 a APVV-19-0119 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".

Zoznam použitej literatúry

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. J. Invertebr. Pathol., 111: 33–40.

Augustyniuk-Kram, A., Kram, K. J., 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In: Blanco, J. A. (ed.): Forest Ecosystems–More than Just Trees. InTech Press, Rijeka, Croatia, p. 265–294.

Barta, M., Lalík, M., Rell, S., Kunca, A., Horáková, M. K., Mudrončekováa, 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.

Day, K. R., Nordlander, G., Halldorsson, G., 2004: General biology and life cycles of bark weevils. In: Lieutier, F. (ed.): Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 331–349.

Devi, K. U., Padmavathi, J., Rao, J. U. M., Khan, A. A. P., Mohan, M. C., 2008: A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). Biocontrol Sci. Technol., 18: 975–989.

Eidmann, H. H., 1974: *Hylobius* schonh. In: Schwenke, W. (ed.): Die Forstschadlinge Europas. 2. Kafer. Paul Parey Hamburg und Berlin, p. 275–293.

Jaronski, S. T., 2014: Mass production of entomopathogenic fungi: State of the art. In: Morales-Ramos, J. (ed.): Mass Production of Beneficial Organisms. Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, p. 357–413.

Lalík, M., Galko, J., Nikolov, C., Rell, S., Kunca, A., Zúbrik, M. et al., 2021: Potential of *Beauveria bassiana* application via a carrier to control the large pine weevil. Crop Protection, 143:1 05563.

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. Bull. Entomol. Res., 89: 3–16.

Mascarin, G. M., Jaronski, S. T., 2016: The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World J. Microbiol. Biotechnol., 32: 177.

Moore, R., Brixey, J., Milner, A. D., 2004: Effect of time of year on the development of immature stages of the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) in stumps of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Carr.) and influence of felling date on their growth, density and distribution. J. Appl. Entomol., 128: 167–176.

Mráček, Z., Šrůtka, P., 1984: Stav znalostí o možnostech obrany proti klikorohu borovému (*Hylobius abietis* L.) v zemích Evropy. Zprávy lesnického výzkumu, 29: 21–25.

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 the pine weevil *Hylobius abietis* (L.). J. Appl. Entomol., 108: 260–270.

Nordlander, G., 1987: A method for trapping *Hylobius abietis* (L.) with a standardized bait and ist potential for forecasting seedling. Scand. J. For. Res., 2: 199–213.

Nordlander, G., Nordenhem, H., Bylund, H., 1997: Oviposition patterns of the pine weevil *Hylobius abietis*. Entomol. Exp. Appl., 85: 1–9.

Örlander, G., Nilsson, U., 1999: Effect of reforestation methods on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage and seedling survival. Scand. J. For. Res., 14: 341–354.

Orlander, G., Nordlander, G., Wallertz, K., Nordenhem, H., 2000: Feeding in the crowns of Scots pine trees by the pine weevil *Hylobius abietis*. Scand. J. For. Res., 15: 194–201.

Selander, J., 1978: Evidence of pheromone-mediated behaviour in the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae). Ann. Entomol. Fenn., 44: 105–112.

Solbreck, C., Gyldberg, B., 1979: Temporal flight pattern of the large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera, Curculionidae), with special reference to the influence of weather. Z. Angew. Entomol., 88: 532–536.

Tan, J. Y., Wainhouse, D., Day, K. R., Morgan, G., 2010: Flight ability and reproductive development in newly-emerged pine weevil *Hylobius abietis* and the potential effects of climate change. Agric. For. Entomol., 12: 427–434.

Tilles, D. A., Eidmann, H. H., Solbreck, B., 1988: Mating stimulant of the pine weevil *Hylobius abietis* (L.). J. Chem. Ecol., 14: 1495–1503.

von Sydow, F., Birgersson, G., 1997: Conifer stump condition and pine weevil (*Hylobius abietis*) reproduction. Can. J. For. Res., 27: 1254–1262.

Wainhouse, D., Boswell, R., Ashburner, R., 2004: Maturation feeding and reproductive development in adult pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). Bull. Entomol. Res., 94: 81–87.

Wainhouse, D., Brough, S., 2007: Resistance of young conifers to feeding damage by pine weevil: information Note. Forestry Commission. http://www.forestresearch.gov. uk/research/archive-resistance-of-young-conifers-to-feeding-damage-by-pine-wee vil-2/. [Accessed 25 April 2022].

Wegensteiner, R., Führer, E., 1988: Zur Wirksamkeit von *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Gegen *Hylobius abietis* L. (Col.: Curculionidae). Entomophaga, 33: 339–348.

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 eradicant and prophylactic strategies. For. Ecol. Manag., 305: 212–222.

Zimmermann, G., 2007: Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Sci. Technol., 17: 553–596.

Adresa:

Ing. Michal Lalík, Ph.D., Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Slavomír Rell, PhD., Ing. Andrej Kunca, PhD., Ing. Jozef Vakula, PhD., Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD., Ing. Roman Leontovyč, PhD., Ing. Milan Zúbrik, PhD.
Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Stredisko lesníckej ochranárskej služby, Lesnícka 11, 969 01 Banská Štiavnica, Slovenská republika

e–mail: michal.lalik@nlcsk.org

ŠTÚDIA VYUŽITIA ENTOMOPATOGÉNNYCH HÚB V INTEGROVANEJ OCHRANE LESA PROTI MNÍŠKE VEĽKOHLAVEJ *LYMANTRIA DISPAR*

Milan Zúbrik • Marek Barta • Jozef Vakula • Juraj Galko • Ján Kulfan • Peter Zach • Slavomír Rell • Andrej Kunca • Roman Leontovyč • Andrej Gubka • Christo Nikolov • Michal Lalík • Jaroslav Holuša

Zúbrik, M., Barta, M., Vakula, J., Galko, J., Kulfan, J., Zach, P., Rell, S., Kunca, A., Leontovyč, R., Gubka, A., Nikolov, Ch., Lalík, M., Holuša, J.: Study of the use of entomopathogenic fungi in integrated forest protection against gypsy moth *Lymantria dispar*. APOL, 2022, vol. 3, no. 1, p. 47–55.

Abstract: This article summarizes research in the field of entomopathogenic fungi of the gypsy moth. Non-native entomopathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* appears to be the most promising species. It is relatively evenly distributed in the territory of Slovakia, while its occurrence coincides with the occurrence of its host species. It is very effective in the natural bioregulation of the gypsy moth. However, it has certain specific requirements on habitats characteristics, such as humidity, altitude, age of the forest stand, etc., which can significantly reduce its effectiveness in some years or in some localities. The artificial introduction of the fungus into new localities appears to be relatively easy, but it encounters legislative problems due to its status as a "non-native organism", resulting from the Nature Conservation Act no. 543/2002 Z. z.

Key words: *Entomophaga maimaiga*; forest pests; non-native organisms; pest control

1. Problematika

1.1. Mníška veľkohlavá

Mníška veľkohlavá *Lymantria dispar* (L.) 1758, patrí do radu Lepidoptera, čeľaď Erebidae, podčeľaď Lymantriinae, ktorá je u nás zastúpená 15 druhmi (Pastorális et al. 2013). Areál jej rozšírenia zaberá celú Európu okrem severských štátov a Írska, severnú Afriku a naprieč Áziou sa tiahne až k Japonsku a východnej Číne. Roku 1869 bola zavlečená do USA neďaleko Bostonu odkiaľ svoj areál výskytu stále rozširuje. Škodca spôsobuje defoliáciu stromov v období konca mája – jún. Poškodenie môže mať negatívny dopad na stabilitu porastov, znižuje vitalitu stromov a spôsobuje následnú mortalitu vyvolanú pôsobením sekundárnych škodcov (McManus & Csóka 2007; Zúbrik et al. 2021).

Húsenice mníšky veľkohlavej sú širokými polyfágmi. V našich podmienkach patria k najviac poškodzovaným druhom *Quercus cerris* L., *Quercus petraea* Matt., *Quercus robur* L., *Quercus rubra* L. *Tilia cordata* Mill., *Populus* spp. a *Salix* spp. (Zúbrik et al. 2021). Populácia *L. dispar* sa vyznačuje veľmi radikálnymi medzigeneračnými zmenami. Tieto zmeny v počte jedincov pripadajúcich na jednotku plochy nazývame populačnou dynamikou. Prvé zmienky o výskyte gradácií z nášho územia siahajú až do minulého storočia (Zúbrik et al. 2021).

Mníška veľkohlavá je vo svojom areáli napádaná širokým spektrom prirodzených nepriateľov. Patria k ním parazitoidy, predátory a entomopatogénne organizmy (Doane & McManus 1981). Patogény zohrávajú veľmi dôležitú úlohu pri prirodzenom zániku populácie. Patogény našli aj pomerne široké uplatnenie v umelej regulácii škodcu. Najvýznamnejšie patogény sú vírusy, baktérie, mikrosporídie a huby (Weiser 1966; Doane & McManus 1981; Hoch et al. 2001).

1.2. Hubové patogény

K bežným druhom húb, ktoré sa vyskytujú v prirodzenom bioregulačnom spektre mníšky veľkohlavej u nás, patrí napríklad *Beauveria bassiana*. Jej význam pre kolaps populácie mníšky je skôr okrajo-

vý (Zúbrik 1997). Vzhľadom na svoju polyfágnosť a nestálosť v prostredí je využitie tejto huby v umelej regulácii značne limitované a zatiaľ pomerne málo preskúmané. Z ďalších druhov húb, ktoré boli na mníške veľkohlavej zaznamenané, sú napríklad *Aspergilus flavus* alebo *Paecilomyces farinosus* (Doane & McManus 1981). Najväčší potenciál pre prirodzenú reguláciu populácie mníšky veľkohlavej majú však najmä huby rodu *Entomophaga* (Zúbrik et al. 2016, 2018a).

Entomophaga maimaiga je vysoko virulentný, hubový patogén, ktorý patrí do druhového komplexu *Entomophaga aulicae*. Na základe biochemickej analýzy bola *E. maimaiga* identifikovaná ako samostatný druh. *E. maimaiga* bola opísaná a izolovaná ako prirodzený nepriateľ mníšky veľkohlavej v centrálnej oblasti ostrova Honšú v Japonsku. Prirodzený areál rozšírenia tohto druhu zahŕňa Japonsko, Tichomorskú oblasť Číny, Južnú Kóreu, ďaleký východ Ruska a pravdepodobne aj Indiu (Soper et al. 1988; Hajek 2007).

E. maimaiga bola okolo roku 1910 zámerne introdukovaná do USA s cieľom pôsobiť ako prirodzený nepriateľ mníšky veľkohlavej. Vo voľnej prírode USA sa ale v nasledujúcich rokoch nenašla a tak sa tento pokus o jej introdukciu považoval za neúspešný (Speare & Colley 1912). Okolo roku 1990 bola v niektorých populáciách mníšky veľkohlavej v USA neočakávane zistená vysoká mortalita húseníc (Andreadis & Weseloh 1990). Laboratórne testy potvrdili, že mortalitu spôsobila *E. maimaiga* (Hajek et al. 1990). Od tej doby sa huba začala šíriť v USA a spôsobila kolaps mnohých lokálnych gradácií škodcu, pričom na niektorých miestach konkurovala aj doteraz najvýznamnejšiemu patogénu mníšky veľkohlavej v USA – vírusu NPV. *E. maimaiga* sa stala od tej doby jedným z najvýznamnejších prirodzených patogénov mníšky veľkohlavej v USA (Hajek 2007; Tobin & Hajek 2012).

V roku 1999 bola túto huba introdukovaná aj do Európy – do Bulharska (Pilarska et al. 2000). Introdukcia bola úspešná a huba sa následne začala šíriť v Európe. Postupne sa objavila vo viacerých krajinách (Tabakovic-Tosic et al. 2012; Georgieva et al. 2013; Hrašovec et al. 2013). *E. maimaiga* bola na Slovensku prvýkrát zistená až v roku 2013, pričom nie je možné vylúčiť, že sa na Slovensku vyskytovala už dlhšiu dobu (Zúbrik et al. 2014). Naše experimenty potvrdili výskyt *E. maimaiga* na viacerých miestach Slovenska (Zúbrik et al. 2018b).

Huba má niektoré vlastnosti, ktoré ju predurčujú byť úspešnou v prirodzenej regulácii mníšky veľkohlavej. Huba je mimoriadne druhovo špecifická a napáda takmer výlučne larvy mníšky veľkohlavej (Hájek et al. 1996; Zúbrik et al. 2018b). Šíri sa vzduchom a má schopnosť v krátkej dobe zasiahnuť veľkú časť populácie škodcu (Zúbrik et al. 2016).

Cieľom tejto štúdie bolo spresniť areál rozšírenia huby *E. maimaiga* na Slovensku, zistiť jej ekologické nároky a hľadať spôsob vhodného zakomponovania tohoto patogénna do umelej regulácie mníšky veľkohlavej na našom území.

2. Materiál a metódy

2.1. Zber vzoriek pre zisťovanie prítomnosti huby *E. maimaiga*

V teréne bol z každej lokality odobratý asi 1 kg pôdy do pevného papierového vrecka. Kovová lopatka, ktorá sa používala na odber vzorky, bola medzi každou plochou sterilizovaná 96%-ným alkoholom. Pôda sa odobrala najmenej z okolia 10 stromov tak, že sa lopatkou odobralo cca 100 g pôdy zo vzdialenosti nie viac ako 15 cm od päty kmeňa. Pôda sa nasypala do jedného vrecka tak, aby sa vytvorila asi 1 kg vzorka pre danú lokalitu. Zaznamenali sme číslo porastu, dielca a GPS súradnice lokality. Vrecká so zeminou sa dopravili do laboratórií NLC. V laboratóriu sa pôda spracovala (preosievaním) pre analýzu na PCR analyzátore, kde sa následne stanovila prítomnosť huby *E. maimaiga* PCR analýzou.

Stanovenie početnosti mníšky veľkohlavej

V letných mesiacoch sme umiestnili feromónové lapače na vybrané lokality, aby sme zistili početnosť samcov mníšky veľkohlavej. Použili sme lapače typu delta a feromónový odparník typu Lymowit (Witasek, Rakúsko). Lapače sme pravidelne navštevovali a zaznamenávali počet odchytených samcov.

2.2. Návrh vhodného spôsobu umelej introdukcie spór entomopatogénnej huby E. maimaiga do lokálnych populácií mníšky veľkohlavej

V mesiaci októbersa založil pokus, zameraný na overenie 4 spôsobov introdukcie inokula huby *E. maimaiga*. Pripravili sa 25 l kvetináče, ktoré sa naplnili sterilnou pôdou. Na pôdu sa naniesli (postrek vodnou suspenziou) zimné spóry huby *E. maimaiga*. Na jednu sériu experimentov sa použila pôda získaná z kontaminovanej lokality (Párovské Háje, odber október toho istého roka). Odber pôdy sa vykonal tak, že sa z lokality, na ktorej bola v predchádzajúcom roku zistená vysoká infekcia lariev mníšky veľkohlavej odoberala pôda v objeme asi 3 kg z okolia približne 30 stromov (100 g pôdy /strom), pričom sa pôda odoberala z oblasti menšej ako 10 – 15 cm od päty kmeňa. Pre každý variant sa pripravili 3 kvetináče + jedna séria ako kontrola.

Tabuľka 1. Charakteristika jednotlivých variant
Table 1. *Characteristics of individual variants.*

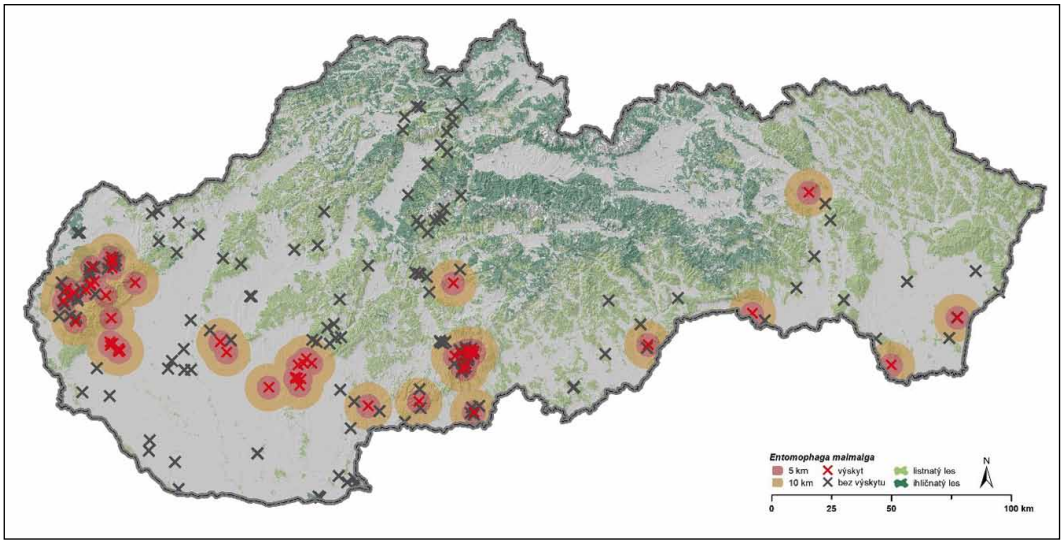
Označenie	Opis – spôsob ošetrenie jedného 25 l kvetináča
A	Kontrola – neošetrená, sterilná pôda
B	200 ml suspenzie 9,83 × 103 spór/ml (asi 2 mil. spór)
C	200 ml suspenzie 9,83 × 104 spór/ml (asi 20 mil. spór)
D	200 ml suspenzie 9,83 × 105 spór/ml (asi 200 mil. spór)
E	Pôda z lokality s prirodzene vysokým výskytom *E. maimaiga* (Párovské Háje)

Skoro na jar roku 2021 sme pokryli povrch kvetináčov nepriepustnou fóliou, aby sa zabránilo úniku spór. Pod fóliu boli umiestnené húsenice 4. instaru *L. dispar* (20 ks/kvetináč). Po 48 hodinách bez potravy boli húsenice premiestnené do laboratória, kde boli chované oddelene na umelej potrave do zakuklenia, resp. do prejavenie sa infekcie.

3. Výsledky a diskusia

3.1. Rozšírenie huby *E. maimaiga* na území Slovenska

Výsledky PCR analýzy potvrdili prítomnosť huby na 61 z 233 sledovaných lokalít. To predstavuje 26,1 % monitorovaných lokalít. Naznačuje to, že početnosť huby je na území Slovenska pomerne vysoká a je na našom území pomerne široko udomácnená (obr. 1).

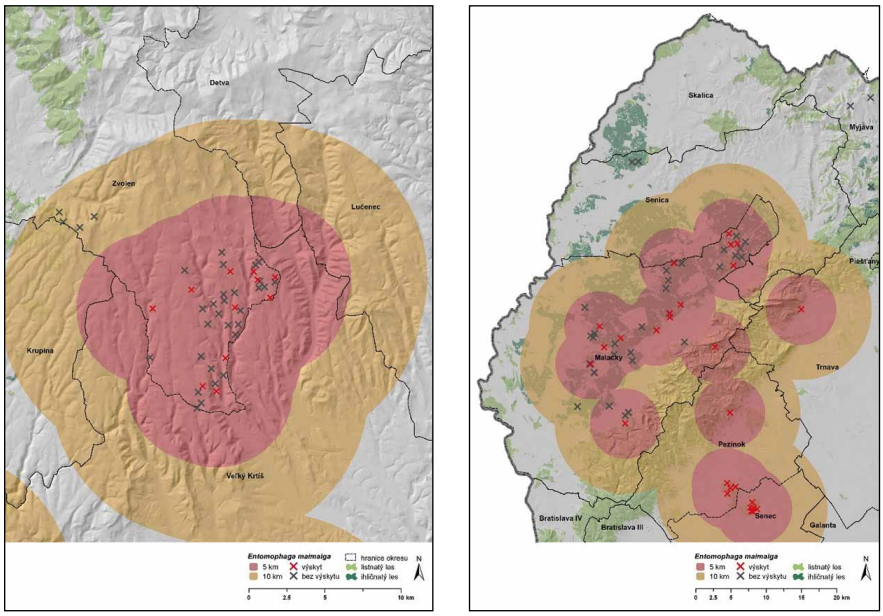


Obrázok 1. Rozšírenie huby *E. maimaiga* na území Slovenska
Figure 1. *Distribution of the fungus E. maimaiga in Slovakia.*

Jej rozšírenie v podstate kopíruje rozšírenie mníšky veľkohlavej u nás, najmä je gradačné centrá. Vyskytuje sa hojne vo všetkých štyroch gradačných územiach, ktoré definoval Zúbrik et al. (2021).

Chýba zatiaľ na juhu Podunajskej nížiny, kde sa mníška vyskytuje ostrovčekovite najmä na topoľoch. Pomerne prekvapivý a neočakávaný je jej severný výskyt v okolí Prešova. Mohlo by to znamenať, že huba môže mníšku veľkohlavú sprevádzať až na sever jej areálu a že teda ďalšie šírenie huby napríklad do Poľska by mohlo byť len otázkou času.

Podrobne sme sa v rámci nášho výskumu venovali rozšíreniu huby na dvoch územiach, v okolí Malaciek na Záhorí a v okolí Pliešoviec (obr. 2). Mníška veľkohlavá je v obidvoch oblastiach rozšírená, ale vzhľadom na minoritné zastúpenie dubov v lesných porastoch sa jej gradáciám venuje len menšia pozornosť. V okolí Malaciek, kde dominuje v porastoch borovica, je rozšírenie huby rovnomerné a je viazané na dubové porasty. V oblasti Pliešoviec, je rozšírená tiež veľmi rovnomerne. Vzhľadom na dosah spór, ktorými sa huba šíri (2 – 5 km ročne) sa dá predpokladať, že prakticky celé územie v lokalite Pliešovce je prirodzeným spôsobom chránené pred vznikom silnejšej gradácie. V lokalite Malacky sa nachádzajú časti, kde je premorenie druhom *E. maimaiga* nízke a kde sa nedá zatiaľ očakávať jej silnejší vplyv na populačnú hustotu škodcu.

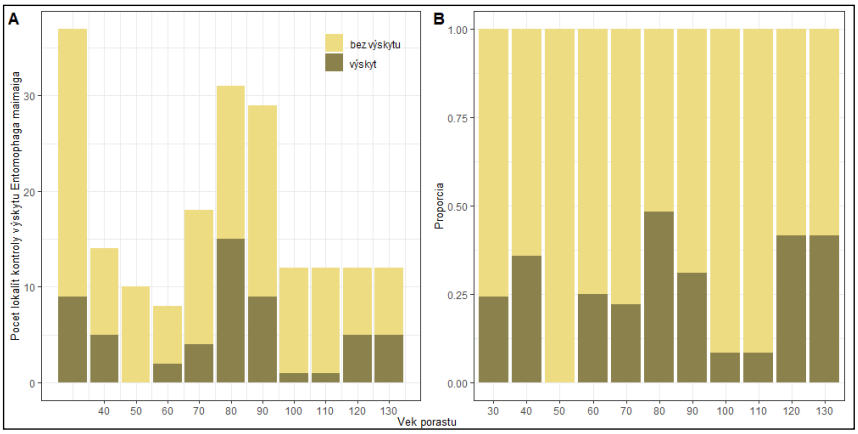


Obrázok 2. Výskyt huby *E. maimaiga* na území VLM Pliešovce (vľavo oblasť Pliešovce, vpravo oblasť Záhorie). Lokality s výskytom huby (červené krížiky) a lokality bez výskytu (čierne krížiky). Vyznačené sú 2 zóny, ružová – do 5 km a okrová do 10 km od miest potvrdeného výskytu

Figure 2. *Occurrence of the fungus E. maimaiga in the territory of VLM Pliešovce (on the left the Pliešovce area, on the right the Záhorie area). The sites with fungus presence (red crosses) and without fungus presence (black crosses) are displayed. There are 2 marked zones, pink – up to 5 km and ocher up to 10 km from the places of confirmed occurrence of the fungus.*

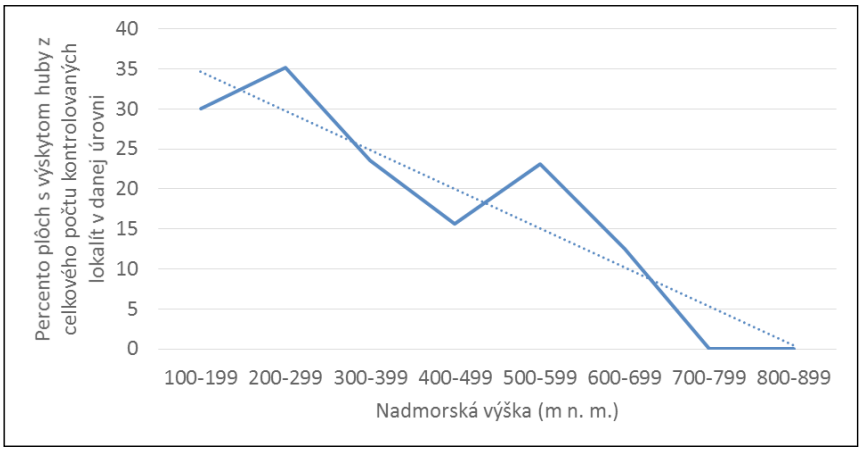
3.2. Ekologické nároky huby E. maimaiga

Na základe údajov o výskyte huby *E. maimaiga* a zozbieraných porastových charakteristík sme odvodili niektoré závislosti. Pre analýzu vplyvu veku bol použitý stredný vek porastu prevzatý z údajov programu starostlivosti o lesy. Najvyšší relatívny ale aj absolútny výskyt *E. maimaiga* bol zaznamenaný v porastoch vo veku 80 rokov (obr. 3a, 3b). Je známe už z našich predchádzajúcich štúdií, že s vekom porastu obyčajne rastie aj frekvencia výskytu *E. maimaiga*. Je teda hojnejšia v starších porastoch. Najvyšší absolútny výskyt huby zo všetkých sledovaných lokalít bol zaznamenaný v porastoch so zakmenením 8 a 9. Najvyššie proporcionálne zastúpenie výskytu huby bolo v porastoch so zakmenením 6. Najväčší proporcionálny výskyt bol zaznamenaný v porastoch s juhozápadnou a východnou expozíciou. Výskyt *E. maimaiga* v porastoch so severnou a západnou expozíciou bol najnižší. Na základe monitorovaných lokalít predpokladáme, že optimálna nadmorská výška pre výskyt *E. maimaiga* je v porastoch 100 – 300 metrov nad morom. S rastúcou nadmorskou výškou klesá zastúpenie *E. maimaiga* (obr. 4). Vo výške nad 700 m n. m. sa huba nevyskytovala.



Obrázok 3a: Absolútny výskyt *E. maimaiga* podľa vekových kategórií porastu
Figure 3a. *Absolute occurrence of E. maimaiga according to age categories of the stand.*

Obrázok 3b: Proporcionálny výskyt *E. maimaiga* podľa vekových kategórií porastu
Figure 3b. *Proportional occurence of E. maimaiga according to age categories of the stand.*



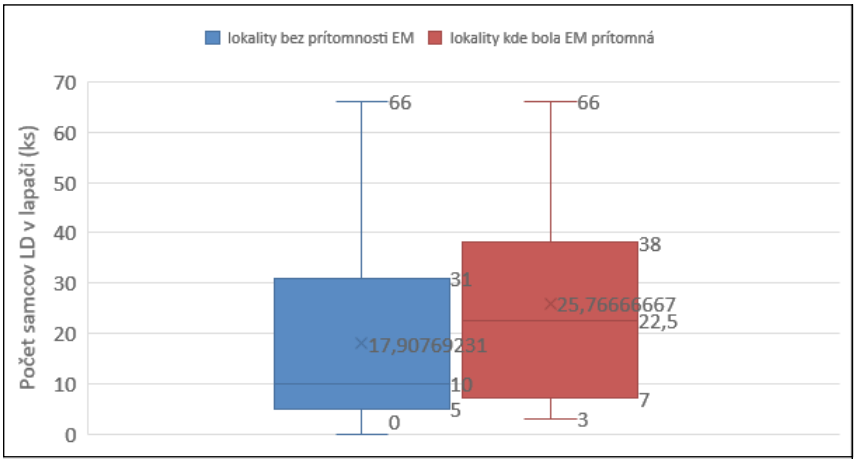
Obrázok 4. Percento plôch s výskytom huby *E. maimaiga* z celkového počtu kontrolovaných lokalít v danej nadmorskej výške
Figure 4. *Percentage of areas with the occurrence of the fungus E. maimaiga from the total number of inspected localities in the given altitude.*

Ďalej sme analyzovali závislosť medzi početnosťou mníšky veľkohlavej a prítomnosťou huby *E. maimaiga*. Frekvencia výskytu huby je vyššia na lokalitách, kde sa jej hostiteľ vyskytuje vo vyššej početnosti. Je to očakávaný výsledok, ktorý potvrdila aj analýza dát získaných v roku 2021. Platí teda, že čím je na lokalite vyššia početnosť mníšky veľkohlavej, tým vyššia je pravdepodobnosť, že sa na lokalite vyskytuje aj huba *E. maimaiga* (obr. 5).

Naše zistenia korešpondujú aj s údajmi iných autorov, ktorí študovali výskyt huby *E. maimaiga* a jej vplyv na populáciu škodcu. Ukázalo sa, že v prípade priaznivých podmienok (prítomnosť hostiteľa v určitej početnosti, vhodná pôdna a vzdušná vlhkosť, pH pôdy, nadmorská výška a pod.) dokáže huba početnosť mníšky zásadným spôsob znížiť. Známy je napríklad vzťah medzi aktivitou *E. maimaiga* a vlhkosťou, čím vlhkejšie je (resp. v období po daždi), tým viac azygospór vznikne, narastá produkcia a emisia konídií, zvyšuje sa hustota konídií vo vzduchu, infekcia azygospórami je vyššia vo vlhkom počasí a pod. (Hajek et al. 1990; Hajek 2007).

Aj keď sme v rámci nášho výskumu potvrdili pomerne plošné rozšírenie huby *E. maimaiga* na území Slovenska, neznamená to, že sa gradácie mníšky veľkohlavej u nás už v budúcnosti nebudú vyskytovať. Naše pozorovania ekologických nárokov tejto huby potvrdili, že má určité špecifické nároky na mikroklimatické podmienky, ktoré môžu jej vplyv na populáciu škodcu výrazne obmedzovať. Za priaznivých podmienok môže gradácia hostiteľa vplyvom huby skončiť kolapsom už v štádiu

progradácie a ďalšom roku prejsť do štádia latencie. Ak však huba nemá optimálne podmienky pre svoj rozvoj, jej vplyv na početnosť škodu môže byť, aj napriek tomu, že sa na lokalite vyskytuje, minoritný (Hajek et al. 1990; Hajek 2007; Zúbrik et al. 2016).

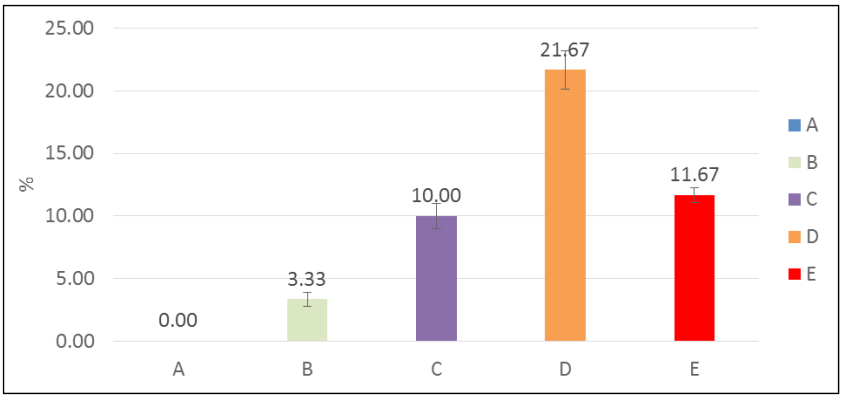


Obrázok 5. Porovnanie početnosti mníšky veľkohlavej na lokalitách s výskytom huby *E. maimaiga* a bez výskytu huby
Figure 5. *Comparison of the abundance of gypsy moth in localities with the occurrence of the fungus E. maimaiga and without the occurrence of the fungus.*

3.3. Návrh vhodného spôsobu umelej introdukcie spór entomopatogénnej huby E. maimaiga do lokálnych populácií mníšky veľkohlavej

Testy ukázali, že infekčná schopnosť testovanej suspenzie sa zvyšuje priamo úmerne koncentrácii spór, ktoré obsahuje (tab. 1, B, C, D). Najlepšiu účinnosť dosiahol variant D, infikovaných bolo 21,67 % testovaných húseníc. Infikovaná pôda z lokality Párovské Háje (E), mala tiež pomerne vysokú účinnosť. Húsenice v kontrolnej vzorke neboli infikované (obr. 6). Použitie spór vo vodnom roztoku (var. B – D), ako aj kontaminovaná pôda (E) zaistila prenos huby na novú lokalitu. Každý z uvedených variant možno odporučiť ako účinný a vhodný spôsob na umelý prenos huby *E. maimaiga* do nových oblastí.

Dodatočné polievanie miesta introdukcie (Pilarska et al. 2000) sme nerealizovali a aj napriek tomu sme dosiahli pomerne uspokojivé výsledky. V tejto oblasti sa otvára priestor pre podrobnejší výskum toho, akým spôsobom zvýšiť efektivitu umelej introdukcie huby do nových populácií hostiteľa.



Obrázok 6. Priemerný počet húseníc infikovaných hubou *E. maimaiga* v závislosti na variante ošetrenia
Figure 6. *Average number of caterpillars infected by E. maimaiga depending on the treatment variant.*

4. Súhrn

V rámci štúdie využitia entomopatogénnych húb v boji s mníškou veľkohlavou *L. dispar* sme sa zamerali najmä na druh *E. maimaiga*. Dospeli sme k nasledovným záverom.

- *E. maimaiga* je na území Slovenska pomerne rovnomerne rozšírená. Jej výskyt z väčšej časti kopíruje rozšírenie hostiteľa – mníšky veľkohlavej na našom území.
- *E. maimaiga* – má viaceré vlastnosti, ktoré ju priamo predurčujú, aby bola mimoriadne účinným bioregulátorom početnosti mníšky veľkohlavej. Má však svoje vlastné nároky na podmienky prostredia, ktoré môžu za určitých okolností jej efektivitu v biorególácii škodcu zásadným spôsobom znižovať.
- Prenos huby *E. maimaiga* do nových oblastí sa javí ako pomerne jednoduchý a to jednak pomocou vodnej suspenzie spór alebo prenosom kontaminovanej pôdy. Umelé rozširovanie areálu tejto nepôvodnej huby však naráža na administratívne problémy vyplývajúce zo Zákona o ochrane prírody a krajiny (zákaz rozširovania nepôvodných organizmov podľa Zákona o ochrane prírody a krajiny č. 543/2002 Z. z.).
- *E. maimaiga* sa na území Slovenska vyskytuje od roku 2013. Táto huba už v súčasnosti zohráva dôležitú úlohu v prirodzenej biorególácii mníšky veľkohlavej a má teda dôležité miesto aj v integrovanej ochrane lesa proti mníške veľkohlavej (Zúbrik et al. 2019).

Poďakovanie

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci 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. Táto publikácia vznikla aj vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt „Centrum excelentnosti lesnícko-drevárskeho komplexu LignoSilva"; (kód ITMS: 313011S735), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoj 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. Práca vznikla vďaka finančnej podpore v rámci projektov APVV-18-0086, APVV-19-0116 a APVV-19-0119 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".

Literatúra

Andreadis, T. G., Weseloh R. M., 1990: Discovery of *Entomophaga maimaiga* in North American gypsy moth, *Lymantria dispar*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2461–2465.

Čapek, M., 1971: Výsledky pokusov s introdukciou vaječných parazitov mníšky veľkohlavej na Slovensku. Lesn. čas., 17: 127 – 137.

Doane, C. C., McManus, M. L., (eds.), 1981: The gypsy moth: Research toward integrated pest management. USDA For. Serv. Sci. Educ., Washington D. C., Agriculture Technical Bulletin, 1584, 757 s.

Georgieva, M., Georgiev, G., Pilarska, D., Pilarski, P., Mirchev, P., Papazova-Anakieva, I., Matova, M., 2013: First record of *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in *Lymantria dispar* population in Greece and the former Yugoslavian Republic of Macedonia. Sumar list, 5–6: 307–311.

Hajek, A. E., 2007: Introduction of the Entomopathogenic Fungus *Entomophaga maimaiga* into North America. In: Vincent, C., Goettel, M. S., Lazarovits, G. (ed.): Biological control: A global perspective. CABI Publishing, Wallingford, p. 53–62.

Hajek, A. E., Elkinton, J. S., Witcosky, J. J., 1996: Introduction and spread of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* along the leading edge of gypsy moth spread. Environ Entomol, 25: 1235–1247.

Hajek, A. E., Carruthers, R. I., Soper, R. S., 1990: Temperature and moisture relations of sporulation and germination of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of *Lymantria dispar*. Environ. Entomol., 19: 85–90.

Hajek, A. E., Butler, L., Walsh, S. R. A., Silver, J. C., Hain, F. P., Hastings, F. L., O'Dell, T. M., Smitley, D. R., 1996: Host range of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) pathogen *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) in the field versus laboratory. Environ. Entomol., 25: 709–721.

Hoch, G., Zúbrik, M., Novotný, J., Schopf, A., 2001: The natural enemy complex of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae) in different phases of its population dynamics in eastern Austria and Slovakia - a comparative study. J. Appl Entomol., 125: 217–227.

Hrašovec, B., Pernek, M., Lukić, I., Milotić, M., Diminić, D., Franjević, M., Hajek, A., Linde, A., Pilarska, D., 2013: First record of the pathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu, and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) within an outbreak populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae) in Croatia. Period. Biol., 115: 379–383.

McManus, M., Csóka, G., 2007: History and Impact of Gypsy Moth in North America and Comparison to Recent Outbreaks in Europe. Acta Silv. Lignaria Hung., 3: 47–64.

Pastorális, G., Kalivoda, H., Panigaj, Ľ., 2013: Zoznam motýľov (Lepidoptera) zistených na Slovensku. Folia faunistica Slovaca, 18: 101–232.

Pilarska, D., McManus, M., Hajek, A. E., Herard, F. E., Vega, F., Pilarski, P. and Markova, G., 2000: Introduction of the Entomopathogenic Fungus *Entomophaga maimaiga* Hum., Shim. & Sop. (Zygomycetes: Entomophthorales) to a *Lymantria dispar* [L.] (Lepidoptera: Lymantriidae) Population in Bulgaria, Journal of Pest Science, 73: 125–126.

Soper, R. S., Shimazu, M., Humber, R. A., Ramos, M. E., Hajek, A. E., 1988: Isolation and characterization of *Entomophaga maimaiga* sp. nov., a fungal pathogen of gypsy moth, *Lymantria dispar*, from Japan. J. Invertebr. Pathol., 51: 229–241.

Speare, A. T., Colley, R. H., 1912: The artificial use of the brown-tail fungus in Massachusetts with practical suggestions for private experiments, and a brief note on a fungous disease of the gypsy caterpillar. Wright & Potter, Boston, Mass.

Tabaković-Tošić, M., Georgiev, G., Mirchev, P., Tošić, D., Golubović-Ćurgu, V., 2012: *Entomophaga maimaiga* – new entomopathogenic fungus in the Republic of Serbia. Afr. J. Biotechnol., 34: 8571–8577.

Tobin, P. C., Hajek, A. E., 2012: Release, establishment, and initial spread of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* in island populations of *Lymantria dispar*. Biol. Control, 63: 31–39.

Weiser, J., 1998: Pathogens of the gypsy moth in Central Europe: host range and interaction. In: McManus, M.L., Liebhold, A.M. (ed.): Population dynamics, impacts, and integrated management of forest defoliating insects. Gen. Tech. Rep. NE-247. USDA Forest Service, Northeastern Research Station, Radnor, PA, p. 322–333.

Zúbrik, M., 1997: The study of gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lep., Lymnatriidae) natural enemies complex, with special reference to the parasitoids. PhD thesis, TU Zvolen, 110 s.

Zúbrik, M., Novotný, J., 1997: Egg parasitization of *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae) in Slovakia. Biológia, 52: 343–350.

Zúbrik, M., Barta, M., Pilarska, D., Goertz, D., Uradnik, M., Galko, J., Vakula, J., Gubka, A., Rell, S., Kunca, A., 2014: First record of *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in Slovakia. Biocontrol Science and Technology, 24(6): 710–714.

Zúbrik, M., Hajek, A., Pilarska, D., Špilda I., Georgiev, G., Hrašovec, B., Hirka, A., Goertz, D. Hoch, G., Barta, M., Saniga, S., Kunca, A., Nikolov, Ch., Vakula, J., Galko, J., Pilarski, P., Csóka, G. 2016: The potential for *Entomophaga maimaiga* to regulate gypsy moth *Lymantria dispar* [L.] (Lepidoptera: Erebidae) in Europe. Journal of Applied Entomology, 140(8): 565–579.

Zúbrik, M., Pilarska, D., Kulfan, J., Bartad, M., Hajek, A.E., Bittner, T.D., Zach, P., Takov, D., Kunca, A., Rella, S., Hirka, A., Csóka, G., 2018a: Phytophagous larvae occurring in Central and Southeastern European oak forests as a potential host of *Entomophaga maimaiga* Entomophthorales: Entomophthoraceae) – A field study. Journal of Invertebrate Pathology, 155: 52 – 54, https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.05.003.

Zúbrik, M., Špilda, I., Pilarska, D., Hajek, A. E., Takov, D., Nikolov, C., Kunca, A., Pajtík, J., Lukášová, K., Holuša, J., 2018b: Distribution of the entomopathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) at the northern edge of its range in Europe. Annals of Applied Entomology, 173: 35–41, https://doi.org/10.1111/aab.12431.

Zúbrik, M., Špilda,I., Barta, M., Vakula, J., Kunca, A., Galko, J., Kulfan, J., Zach, P., Rell, S., Leontovyč, R., Gubka, A., Nikolov, Ch., 2019: Integrovaná ochrana lesa proti mníške veľkohlavej, zahrňujúca využitie hubového patogéna *Entomophaga maimaiga*. In: Kunca, A. (ed.): Aktuálne problémy v ochrane lesa 2019. Zborník referátov z medzinárodnej konferencie konanej 31. 1. – 1. 2. 2019 v Kongresovom centre Kúpeľov Nový Smokovec, a. s., Národné lesnícke centrum, Zvolen, s. 63–67.

Zúbrik, M., Kunca, A., Kulfan, J., Rell, S., Nikolov, C., Galko, J., Vakula, J., Gubka, A., Leontovyč, R., Konôpka, B., Lalík, M., Longauerová, V., Sitková, Z., Liška, J., Zach, P., Barta, M., Holuša, J., 2021: Occurrence of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) in the Slovak Republic and its outbreaks during 1945 – 2020. Central European Forestry Journal, 67: 55–71.

Adresa:

Ing. Milan Zúbrik, PhD., Ing. Jozef Vakula, PhD., Ing. Juraj Galko, PhD., Ing. Slavomír Rell, PhD., Ing. Andrej Kunca, PhD., Ing. Roman Leontovyč, PhD., Ing. Andrej Gubka, PhD., Ing. Christo Nikolov, PhD., Ing. Michal Lalík, Ph.D.
Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen, Stredisko lesníckej ochranárskej služby, Lesnícka 11, 969 01 Banská Štiavnica, Slovenská republika
e–mail: meno.priezvisko@nlcsk.org

Ing. Marek Bárta, PhD., RNDr. Ján Kulfan, CSc., Ing. Peter Zach, CSc., Ústav ekológie lesa SAV, Štúrova 2, 960 53 Zvolen, Slovenská republika
e-mail: marek.barta@savba.sk, kulfan@ife.sk, zach@ife.sk

prof. Ing. Bc. Jaroslav Holuša, Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Katedra ochrany lesa a entomologie, Kamýcká 1176, 165 21 Praha 6 - Suchdol, Česká republika
e–mail: holusa@fld.czu.cz