

HENRYK MALINOWSKI

Działanie azadirachtyny na larwy boreczników (*Diprionidae*)*

Activity of azadirachtin against *Diprionidae* larvae

Abstract. Effect of different azadirachtin concentrations (0,01-0,00001%) on third instar of *Neodiprion sertifer* larvae was studied under laboratory conditions, using the method of insects exposition to treated (by dipping) pine needles. Feeding activity and body weight of larvae were strongly reduced, giving finally 100% mortality, even at the lowest concentration of azadirachtin (0,00001%).

Key words: Azadirachtin, *Diprionidae* larvae, antifeedant effect, efficacy

Wstęp

Boreczniki (*Diprionidae*) należą do ważnych z gospodarczego punktu widzenia szkodników lasu. Duża dynamika rozrodu tych owadów powoduje, że w krótkim okresie może dojść do silnego zagęszczenia ich populacji, co kończy się gołozerami w przypadku nie wykonania zabiegu ochronnego. W Polsce występuje 13 gatunków boreczników, w tym 11 na sośnie, 2 na świerku. W gradacjach boreczników zwykle jeden lub dwa gatunki są dominujące, a inne występują jako gatunki towarzyszące. Gatunkiem dominującym w gradacjach obejmujących duże powierzchnie leśne jest najczęściej borecznik sosnowiec (*Diprion pini* L.); masowo mogą również występować: borecznik podobny (*Diprion simile* Htg.), borecznik krzewian (*Gilpinia frutetorum* F.), borecznik jasnobruchy (*Gilpinia pallida* Kl.) i borecznik rudy (*Neodiprion sertifer* Geoffr.).

W celu ograniczenia nadmiernie rozmnożonych populacji boreczników i niedopuszczenia do niekorzystnej dla drzewostanów sosnowych dużej defoliacji koron, stosuje się w okresach gradacyjnych insektycydy z grupy pyretroidów i acylomocznikowych. Pierwsza z wymienionych grup insektycydów charakteryzuje się bezpośrednim działaniem na układ nerwowy owadów i w związku z tym jest mało selektywna; działa zarówno na owady szkodliwe, jak i ich wrogów naturalnych (parazytoidy i drapieżce) oraz na inne organizmy. Insektycydy acylomocznikowe są bardziej selektywne, gdyż nie działają na układ nerwowy. Mechanizm ich działania polega na zaburzeniach w odkładaniu się chityny u tych

* Praca została wykonana w ramach grantu KBN Nr 5 PO6H 075 16.

stadiów rozwojowych owadów, u których zachodzi biosynteza tego związku, a więc głównie u larw. Nie są toksyczne dla parazytoidów i drapieżców larw owadów. Mogą jednak działać na płodność niektórych gatunków, m.in. chrabąszczy; odznaczają się też dużą trwałością.

Stosowanie przez długi czas tych samych insektycydów powoduje selekcję osobników mających mechanizmy obronne, które pozwalają im na przeżycie zabiegów. Presja selekcyjna insektycydów, wywierana na wiele pokoleń owadów, powoduje powstanie odpornych populacji, które nie reagują, lub słabo reagują na stosowane uprzednio środki. Z wymienionych względów celowe jest poszukiwanie nowych, charakteryzujących się innym mechanizmem działania, a jednocześnie bardziej bezpiecznych dla środowiska, środków ochrony lasu przed szkodliwymi owadami.

Jednym z takich insektycydów jest azadyrachtyna (ang. azadirachtin), zwana również azadyrachtyną A, stanowiąca główną substancję biologicznie czynną nasion miodli indyjskiej (*Azadirachta indica* A. Juss); zawartość azadyrachtyny B w nasionach wynosi 20% zawartości azadyrachtyny A, inne azadyrachtyny (oznaczane literami C – L) występują w małych koncentracjach (Rembold 1989). Możliwości zastosowania naturalnych insektycydów z miodli indyjskiej, czyli tzw. insektycydów botanicznych, w ochronie lasu przed owadami, były już opisywane w Sylwanii (Malinowski 1997).

Dotychczasowe dane (Schmutterer 1995; Schnetter i in. 1996; Rohde 1996; Malinowski i in. 1998) wskazują, że insektycydy zawierające azadyrachtynę mogą znaleźć zastosowanie w ochronie lasu, gdyż są bezpieczniejsze dla środowiska niż syntetyczne insektycydy chemiczne. Azadyrachtyna wykazuje szereg właściwości pożądaných w nowoczesnej ochronie roślin: należy do najsilniejszych spośród znanych antyfidantów (deterentów), w większych dawkach działa jako repelent oraz antyfidant (owady powstrzymują się od żerowania) i deterent składania jaj (owady powstrzymują się od składania jaj), natomiast w mniejszych – jako regulator wzrostu i rozwoju oraz ma działanie sterylizujące. Efekt antyfidantny jest zróżnicowany w zależności od gatunku owada, podczas gdy działanie jako regulatora wzrostu i rozwoju oraz sterylizujące jest zbliżone w odniesieniu do różnych gatunków (Mordue Luntz, Blackwell 1993). Azadyrachtyna charakteryzuje się małą toksycznością dla zwierząt stałocieplnych i małą trwałością w środowisku (Koul i in. 1990; Schmutterer 1990; Mordue Luntz, Blackwell 1993; Mordue Luntz 1997); wykazuje również małą toksyczność dla organizmów nie będących celem zabiegów ochronnych, włączając wrogów naturalnych szkodników (Hoelmer i in. 1990; Stark 1992; McCloskey i in. 1993).

Celem badań było określenie wpływu azadyrachtyny, zawartej w traktowanym preparatem NeemAzal T/S igłach sosny, na pobieranie pokarmu przez larwy, ich rozwój i śmiertelność, a w konsekwencji na ustalenie stężenia do dalszych badań w warunkach terenowych.

Materiały

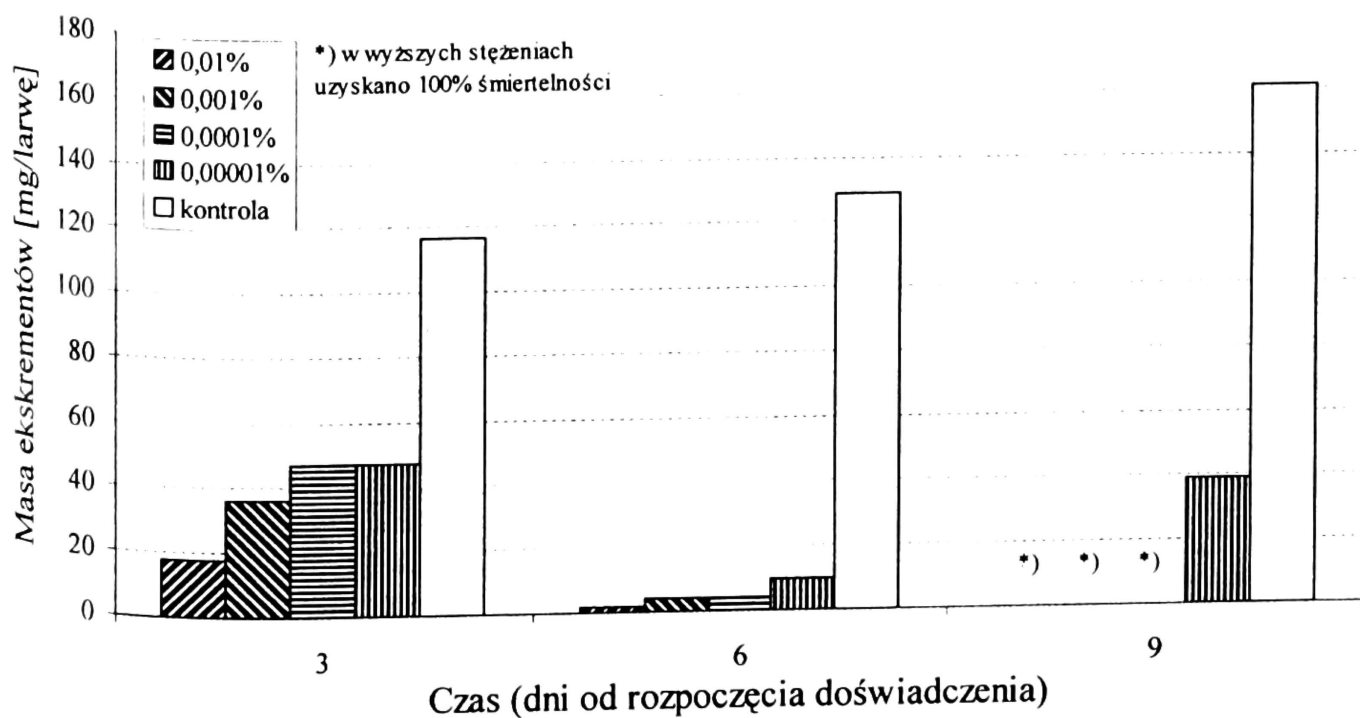
Materiał biologiczny stanowiły larwy L3 borecznika rudego (*Neodiprion sertifer* Geoffr.), pozyskane do badań z terenu Nadl. Myszyniec. W badaniach stosowano insektycyd botaniczny – azadyrachtynę w postaci koncentratu do emulgowania (EC) o nazwie NeemAzal T/S, zawierającego 10 g/l wymienionej substancji biologicznie czynnej, otrzymanego z firmy Trifolio-M GmbH (Niemcy).

Metodyka badań

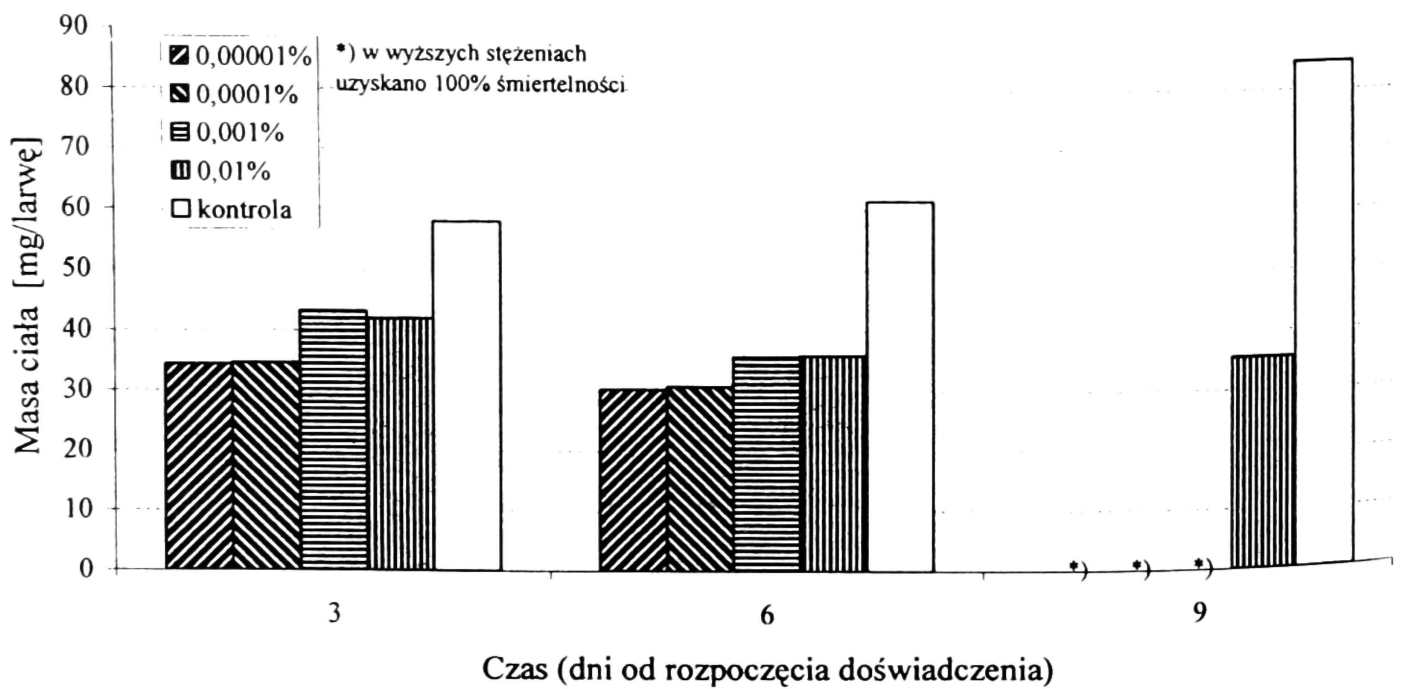
Preparat NeemAzal T/S rozcieńczano wodą destylowaną uzyskując emulsje o następujących stężeniach w przeliczeniu na substancję biologicznie czynną: 0,01; 0,001; 0,0001 i 0,00001%. Wymienione stężenia preparatu wybrano do testowania na podstawie wyników uzyskanych w badaniach na gąsienicach barczatki sosnowki (Dobrowolski 2001). Uigłone gałązki sosnowe, długości około 10 cm, zanurzano w ciągu 10 sekund w emulsjach wodnych preparatu NeemAzal T/S o podanych już stężeniach azadyrachtyny i umieszczano w płytkach Petriego o średnicy 20 cm. Po odparowaniu wody, na gałązki te наносono larwy L3 borecznika rudego w liczbie 30 na każde stężenie (w 2 powtórzeniach po 15 sztuk). Larwy żerowały 3 doby na traktowanych gałązkach sosny, następnie gałązki te usuwano i podawano owadom pokarm nietraktowany. Co trzy doby zmieniano larwom pokarm na świeży, określając jednocześnie masę wydalonych ekskrementów, co pozwoliło na prześledzenie intensywności żerowania; określano także masę ciała larw i śmiertelność. Obserwacje te prowadzono przez 12 dni, tj. do przepoczwarczenia się wszystkich larw w kombinacji kontrolnej.

Wyniki

Wpływ różnych stężeń azadyrachtyny na aktywność żerowania larw trzeciego stadium borecznika rudego, wyrażoną masą wydalonych ekskrementów w przeliczeniu na jednego osobnika przedstawiono na rycinie 1. Po trzech dniach żerowania larw na traktowanym azadyrachtyną pokarmie, masa wydalonych ekskrementów w kombinacjach doświadczalnych stanowiła – w zależności od stężenia – 15-40% masy ekskrementów w kombinacji kontrolnej. Świadczy to o bardzo silnym ograniczeniu pobierania traktowanego azadyra-



RYC. 1. Wpływ azadyrachtyny na żerowanie larw L₃ borecznika rudego, wyrażony masą wydalonych ekskrementów w przeliczeniu na jednego osobnika. Na każde stężenie eksponowano 30 larw, które karmiono trzy dni traktowanym igliwem sosnowym, a następnie hodowano na igliwiu nietraktowanym



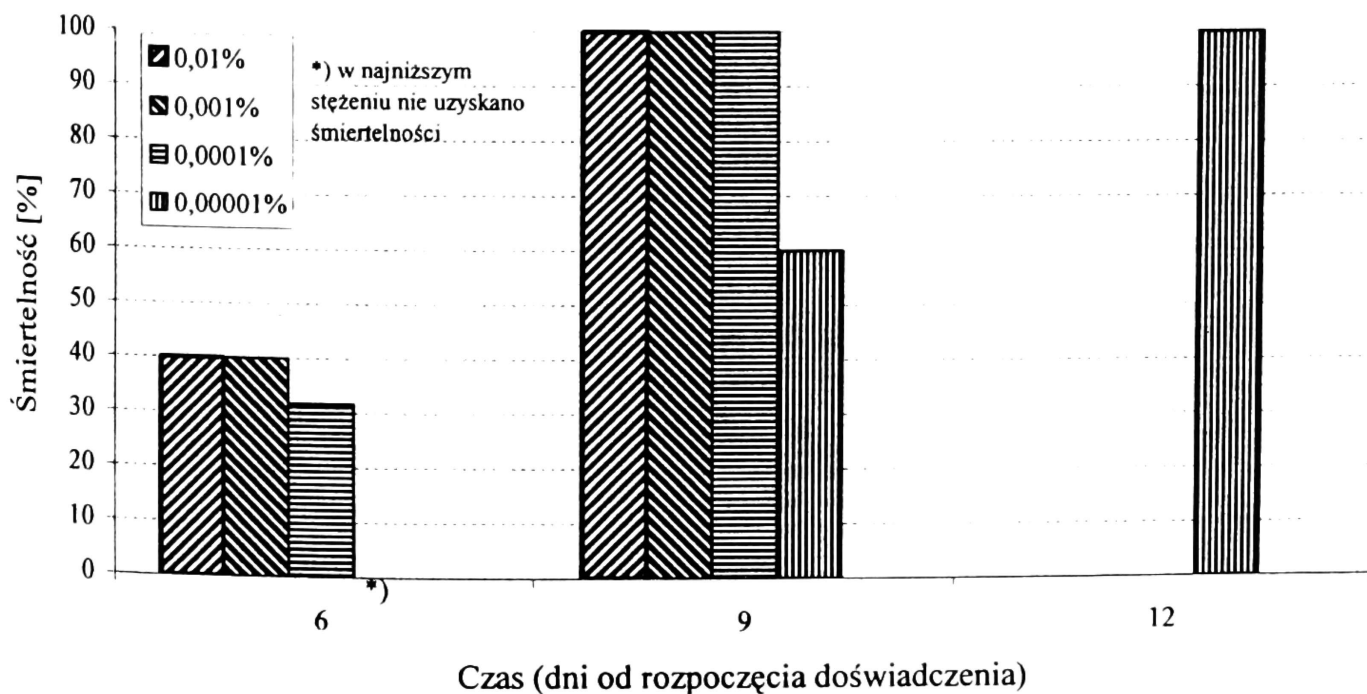
RYC. 2. Wpływ azadirachtyny na masę ciała larw L₃ borecznika rudego. Na każde stężenie eksponowano 30 larw, które karmiono trzy dni traktowanym igliwem sosnowym, a następnie hodowano na igliwiu nietraktowanym

chtyną pokarmu, przy czym wielkość tego ograniczenia zależała od zastosowanego stężenia. Największe ograniczenie pobierania pokarmu zaobserwowano w stężeniu najwyższym (0,01%).

Wyniki uzyskane po sześciu dniach wskazują, że owady przeniesione na nietraktowany pokarm praktycznie nie żerowały w trzech wyższych stężeniach azadirachtyny, a w najniższym stężeniu – żerowały w nieznacznym stopniu. Należy nadmienić, że po dziewięciu dniach od rozpoczęcia doświadczenia (po 6 dniach ekspozycji na nietraktowanym igliwiu) część owadów przeżyło tylko w kombinacji o najniższym stężeniu azadirachtyny, a zjedzony przez nich pokarm stanowił około 25% pokarmu zjedzonego w kombinacji kontrolnej.

Konsekwencją nie pobierania pokarmu przez larwy w kombinacjach doświadczalnych było obniżenie masy ich ciała (ryc. 2). Po trzech dniach żerowania larw na igliwiu traktowanym azadirachtyną, masa ich ciała wynosiła 59-72% masy ciała larw w kombinacji kontrolnej. Masa ciała larw żerujących następnie trzy dni na igliwiu nietraktowanym (6 dni od rozpoczęcia doświadczenia) nie tylko nie wzrosła, ale zmniejszyła się i wynosiła 49-58% masy ciała larw w kontroli. Masa ciała larw w kombinacji o najniższym stężeniu azadirachtyny (0,00001%) po sześciu dniach żerowania na igliwiu nietraktowanym (9 dni od rozpoczęcia doświadczenia) wynosiła około 42% masy ciała larw w kombinacji kontrolnej.

Rycina 3 ilustruje szybkość zamierania larw karmionych trzy dni igliwem traktowanym różnymi stężeniami azadirachtyny, a następnie eksponowanych dziewięć dni na pokarmie bez insektycydu. Tutaj należy dodać, że w kombinacji kontrolnej nie obserwowano śmiertelności; po 12 dniach wszystkie larwy przepoczwarczyły się. Omawiając szybkość zamierania larw w kombinacjach doświadczalnych stwierdza się, że po trzech dniach żerowania na traktowanym igliwiu sosny nie było martwych osobników w żadnym z badanych stężeń.



RYC. 3. Wpływ azadyrachtyny na śmiertelność larw L₃ borecznika rudego. Na każde stężenie eksponowano 30 larw, które karmiono 3 dni traktowanym igliwem sosnowym, a następnie hodowano na igliwiu nietraktowanym

Obserwacje po sześciu dniach od rozpoczęcia doświadczenia (po 3 dniach zjadania pokarmu bez insektycydu) wykazały, że w trzech większych stężeniach śmiertelność wynosiła 30-40%, a jedynie w najmniejszym stężeniu nie stwierdzono owadów martwych. Po dziewięciu dniach (po 6 dniach żerowania na pokarmie bez insektycydu) w trzech większych stężeniach uzyskano 100% śmiertelności larw, w najmniejszym stężeniu – 60%. W tym ostatnim stężeniu wszystkie larwy padły po 12 dniach. Można stwierdzić się, że główną przyczyną wyginięcia wszystkich larw boreczników eksponowanych na różne stężenia zadyrachtyny było prawie całkowite zaprzestanie żerowania po przeniesieniu owadów na nietraktowany pokarm oraz związany z tym spadek masy ich ciała.

Dyskusja

Wyniki otrzymane w doświadczeniach na larwach borecznika rudego świadczą o właściwościach antyfidantnych azadyrachtyny, stanowiącej główną substancję biologicznie czynną preparatu użytkowego NeemAzal T/S oraz potwierdzają dane z badań innych autorów. Znane są dwa typy efektów antyfidantnego działania azadyrachtyny: pierwotny i wtórny. Pierwotny, bezpośredni efekt antyfidantnego działania azadyrachtyny wynika z tego, że substancja ta jest rozpoznawana przez receptory smakowe owadów, które są umiejscowione na stopach i wargach. Następnie stymuluje ona komórki deterencyjne i blokuje komórki fagostymulatorowe w tych receptorach (Simmonds, Blanney 1994; Mor-due (Luntz) 1998), co prowadzi do unikania pobierania roślin traktowanych azadyrachtyną. Pierwotny efekt zależy od gatunku owada; poszczególne gatunki różnią się bowiem wrażliwością chemoreceptotów oraz mechanizmami integracyjnymi w układzie nerwowym (Simmonds and Blanney 1994). Receptory larw borecznika rudego w przeprowadzonych badaniach okazały się bardzo wrażliwe na azadyrachtynę i zostały skutecznie zablo-

kowane. Uniemożliwiło to owadom pobieranie pokarmu nawet wówczas, gdy zostały one przeniesione na igliwie nietraktowane.

Wtórny, antyfidantny efekt działania azadyrachtyny dotyczy fizjologicznych procesów (anoreksja), mających miejsce po pobraniu pokarmu zawierającego tę substancję. Można wyróżnić dwa typy fizjologicznych efektów związanych z azadyrachtyną: pośredni i bezpośredni (Mordue (Luntz) 1998). Pośrednie efekty sterowane są przez endokrylny system owada, natomiast bezpośrednie efekty mają miejsce wówczas, kiedy insektycyd działa bezpośrednio na specyficzne tkanki. W pierwszym przypadku fizjologiczne efekty działania azadyrachtyny wynikają z zablokowania wydzielania neurosekrecyjnych hormonów z mózgu: hormonu wylinkowego ecdysonu oraz hormonu juwenilnego (Mordue (Luntz), Blackwell 1993; Mordue (Luntz) 1998). Wymienione systemy hormonalne współdziałając ze sobą indukują u larw owadów wylinkę i metamorfozę do stadium owada doskonałego, a u owadów dorosłych – rozwój jaj. Zakłócenie wydzielania do hemolimfy wymienionych hormonów powoduje u larw zwolnienie rozwoju, opóźnienie lub uniemożliwienie wylinki (przejście z jednego stadium do drugiego), opóźnienie przepoczwarczenia, a także zamieranie owadów w trakcie wylinki, a w przypadku osobników dorosłych – uniemożliwienie rozwoju owariów, resorpcję jaj, obniżoną płodność oraz sterylizację. W doświadczeniach obserwowano jedynie zaburzenia w przebiegu wylinki, co kończyło się zamieraniem larw borecznika rudego.

Larwy borecznika rudego były bardzo wrażliwe na działanie azadyrachtyny; w warunkach laboratoryjnych po 12 dniach uzyskano 100% śmiertelności, nawet w najniższym z zastosowanych stężeń (0,00001%). Tak wysoka śmiertelność w bardzo małych stężeniach może być związana z innym jeszcze (niż opisano wyżej) mechanizmem działania azadyrachtyny. Zlotkin (2001) przytacza badania Scotta i in. (1999) na neuronach grzbietowych węzłów nerwowych szczura (hodowanych sztucznie), z których wynika, że azadyrachtyna modyfikuje przewodzenie jonów potasu przez błony komórek nerwowych przy mikromolarnym zakresie koncentracji. Zaburzenia w przewodzeniu jonów pierwiastków powodują zaburzenia w przewodzeniu impulsów nerwowych, co zazwyczaj kończy się paralizem i śmiercią osobnika. Mechanizmy działania insektycydów na układ nerwowy ssaków i owadów są na ogół zbliżone. Dotychczas jednak nie stwierdzono takiego mechanizmu działania azadyrachtyny na owady.

Ogólnie biorąc, uzyskane w tych doświadczeniach wyniki są zgodne z danymi zebranymi przez Schmitterera (1995), z których wynika, że ekstrakty z miodli indyjskiej (*Azadirachta indica* A. Juss) były wysoce aktywne wobec trzeciego i czwartego stadium larw borecznika sosnowca. Liczebność larw borecznika rudego była kontrolowana z pozytywnym skutkiem w drzewostanach sosnowych za pomocą preparatu Azatin (zawierającego 3% azadyrachtyny i 27% innych komponentów z miodli indyjskiej) w stężeniu 20 i 40 ppm, co odpowiada stężeniu odpowiednio 0,002 i 0,004%. Wymienione stężenia Azatinu w przeliczeniu na azadyrachtynę wynosiły zatem: 0,00006 i 0,00012%.

NeemAzal T/S jest proponowany przez firmę do praktycznego stosowania w dawce 3 l/ha (30 g azadyrachtyny/ha). Przy zabiegach naziemnych np. w sadach, czy winicach wymienioną dawkę rozcieńcza się zazwyczaj w 1000 l wody (Schirra, Friedrich 1998) uzyskując stężenie 0,003% w przeliczeniu na azadyrachtynę. W doświadczeniach laboratoryjnych i terenowych nad aktywnością azadyrachtyny w stosunku do owadów również bada się

dawki na poziomie 0,01; 0,003 lub 0.005% (Breuer, De Loof 1998). Biorąc pod uwagę wyniki badań własnych oraz przytoczone dane literaturowe, wydaje się uzasadnione określenie w badaniach terenowych przydatności do praktycznego stosowania przeciwko larwom boreczników stężeń preparatu NeemAzal T/S na poziomie 0,001-0,00001% w przeliczeniu na azadyrachtynę.

Zakład Ochrony Lasu
Instytut Badawczy Leśnictwa
Sękocin-Las, 05-090 Raszyn

Podziękowanie

Autor dziękuje firmie *Trifolio-M GmbH (Lahnau, Niemcy)* za przekazanie do badań preparatu *NeemAzal T/S*.

Literatura

1. **Breuer M., De Loof A.** 1998. Laboratory trials with NeemAzal T/S on the allergenic forest pest *Thaumetopoea processionea* (L.), in: Proc. of Practice Oriented Results on Use and Production of Neem Ingredients and Pheromones, VIII, H. Kleeberg, C.P.W. Zebitz (eds.), pp. 23-29.
2. **Dobrowolski M.** 2001. Działanie azadyrachtyny na barczatkę sosnowkę (*Dendrolimus pini* L.). Prace Inst. Bad. Leś. Seria A (w druku).
3. **Hoelmer K.A., Osborne L.S., Yokomi R.H.** 1990. Effects of neem extract on beneficial insects in greenhouse culture, in: *Neem Potential in Pest Management Programs*. J.C. Locke and R.H. Lawson (eds.), US Dep. Res. Serv., 86, 100-105.
4. **Koul O., Isman M.B., Ketkar C.M.** 1990. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. Can. J. Bot. 68, 1-11.
5. **Malinowski H.** 1997. Naturalne insektycydy z miodli indyjskiej (*Azadirachta indica* A. Juss) w ochronie lasu. Sylwan 7, 45-55.
6. **Malinowski H., Woreta D., Stocki J.** 1998. Experiments with azadirachtin to reduce the common cockchafer (*Melolontha melolontha* L.) and some leaf-eating insects from the order Lepidoptera, in: Proc. of Practice Oriented Results on Use and Production of Neem Ingredients and Pheromones, VIII, H. Kleeberg and C.P. Zebitz (eds.), pp. 5-11.
7. **McCloskey C.J., Arnason J.T., Donskov N., Chenier R., Kaminski J., Philogene B.J.R.** 1993. Third trophic level effects of Azadirachtin. Can. Entomol. 125, 163-165.
8. **Mordue (Luntz) A.J.** 1998. Azadirachtin – a review of its mode of action in insects, in: Proc. of Practice Oriented Results on Use and Production of Neem Ingredients and Pheromones, VII, H. Kleeberg (ed.), pp. 1-4.
9. **Mordue (Luntz) A.J., Blackwell A.** 1993. Azadirachtin: an update. J. Insect. Physiol. 39, 903-924.
10. **Rembold H.** 1989. Isomeric azadirachtins and their mode of action, in: Focus on Phytochemical Pesticides. Vol. 1. The Neem Tree, M. Jacobson (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 47-76.
11. **Rohde M.** 1996. Experiments to reduce melolontha hippocastani damages in the Hessian Rhein – Main – Plain, in: Proc. of the meeting Integrated Control of Soil Pests, Freiburg, Germany, IOBC/WPRS Bulletin, vol. 19(2), 89-94.
12. **Schirra K.J., Louis F.** 1998. Field investigation on the effect of NeemAzal T/S (3L/ha) on the grape leafhopper *Empoasca vitis* (Goethe) in Viticulture, in: Proc. of Practice Oriented Results on Use and Production of Neem Ingredients and Pheromones, VIII, H. Kleeberg and C.P.W. Zeibitz (eds.), pp. 13-17
13. **Schmutterer H.** 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol. 35, 271-297.

14. Schmutterer H. (ed.) 1995. The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other Meliaceous plants. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim Bundesrepublik Deutschland, 696 pp.
15. Schnetter W., Mittermuller R., Froschle M. 1996. Control of the cockchafer *Melolontha melolontha* in the Kraichgau with NeemAzal T/S, in: Proc. of the meeting Integrated Control of Soil Pests, Freiburg, Germany, IOBC Bulletin, vol. 19(2), 95-99.
16. Scott R.H., OBrien K., Roberts L., Mordue W., Mordue (Luntz) J. 1999. Extracellular and intracellular actions of azadirachtin on the electrophysiological properties of cultured rat DRG neurones. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 123, 85-93.
17. Simmons M.S.J., Blanney W.M. 1984. Some neurophysiological effects of azadirachtin on lepidopterous larvae, in: Proc. 2nd Int. Neem Conf. (H. Schmutterer and K.R.S. Ascher eds.), GTZ Eschborn, Germany, pp.163-180.
18. Stark J.D. 1992. Comparison of the impact of a neem seed-kernel extract formulation, Margosan-O and Chlorpyrifos on non-target invertebrates inhabiting turf grass. *Pest. Sci.*, 36, 293-300.
19. Zlotkin E. 2001. Insecticides affecting voltage-gated ion channels, in: *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Ishaaya I. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.43-76.

Summary

Activity of azadirachtin against *Diprionidae* larvae

Activity of azadirachtin as 10 g/l EC (NeemAzal T/S), kindly obtained from Trifolio-M GmbH (Lahnau, Germany), was studied against third instar *Neodiprion sertifer* (Geoffr.) larvae, using aqueous emulsion at four different azadirachtin concentrations: 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001%. Larvae were fed with treated (by dipping) pine twigs (with needles) during 3 days, and next they were reared on untreated foliage until pupation in the control. In all cases feeding activity and body weight of larvae were strongly reduced. Larvae did not practically feed when they were transported on untreated food and finally all died, even at the lowest concentration of azadirachtin. For experimental treatment in the field, it has been proposed the azadirachtin concentrations at the levels of 0.001-0.00001%.