

Henryk MALINOWSKI

Zakład Ochrony Lasu

Instytut Badawczy Leśnictwa

ul. Bitwy Warszawskiej 1920 Roku nr. 3, 00-973 Warszawa

e-mail: tarwackg@ibles.waw.pl

STAN BADAŃ NAD WYKORZYSTANIEM CZYNNIKÓW BIOLOGICZNYCH DO OGRANICZANIA POPULACJI OWADÓW ŻERUJĄCYCH NA KORZENIACH

STATE OF STUDIES ON USE OF BIOLOGICAL CONTROL AGENTS
AGAINST PESTS OF ROOTS

Abstract. *State of studies on the practical use of biological control agents such as fungi, bacteria and nematodes against the larvae and adults of Scarabaeidae family and other insects feeding on roots is presented.*

Key words: *Entomopathogenic fungi, entomopathogenic bacteria, entomopathogenic nematodes, Scarabaeidae larvae, Melolontha spp., root pests.*

1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zagrożenia szkótek oraz upraw leśnych i rolniczych (sadowniczych, warzywniczych itp.) przez larwy owadów z rodziny żukowatych (*Coleoptera: Scarabaeidae*) zwane pędrakami oraz przez gąsienice motyli (*Lepidoptera: Noctuidae*), larwy sprężykowatych (*Col.: Elateridae*) i inne owady żerujące na korzeniach w Polsce, innych krajach europejskich (Szwajcaria, Niemcy, Włochy, Francja, Holandia), a także w Ameryce i Japonii. W Polsce największy problem stanowią przejmowane do zalesienia nieuprawiane od kilku lat grunty porolne, gdzie pędraki znalazły doskonałe warunki rozwoju. Najczęściej dotychczas stosowaną w naszym kraju metodą ograniczania liczebności pędraków było używanie środków chemicznych. Ostatnio zaczęto wykorzystywać w większym stopniu zabiegi profilaktyczne i metody mechaniczno-uprawowe opisane uprzednio (MALINOWSKI 1998).

Wymienione zabiegi niechemiczne są stosowane w krajach zachodniej Europy jako podstawowe, istotnie ograniczające populacje pędraków. Środki chemiczne przeciwko pędrakom nie są tam używane, co wynika ze sprzeciwu administracji leśnej oraz z przekonania, że wpływają one ujemnie na środowisko, są kosztowne, pracochłonne i nie zawsze dają pożądany efekt.

Oprócz zabiegów mechanicznych, w krajach zachodniej Europy wprowadza się do stosowania przeciwko pędrakom biopreparaty oparte na entomopatogenicznych grzybach, nicieniach i bakteriach. W Polsce nie prowadzono dotychczas szerszych badań nad wykorzystaniem wymienionych czynników biologicznych do ograniczania populacji pędraków chrabąszczy i innych owadów żerujących na korzeniach. Mając na uwadze celowość podjęcia prac nad wdrożeniem metod biologicznych w ochronie szkótek i upraw przed pędrakami również w naszym kraju, przedstawiono w niniejszym opracowaniu dotychczasowy stan badań nad wykorzystaniem czynników biologicznej kontroli owadów żerujących na korzeniach.

2. ENTOMOPATOGENICZNE GRZYBY

Z przeprowadzonych dotychczas badań* wynika, że spośród entomopatogenicznych grzybów na szczególną uwagę zasługuje *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch jako potencjalny czynnik praktycznej kontroli pędraków różnych gatunków owadów.

* Niniejsza praca została wykonana głównie w ramach projektu badawczego Komitetu Badań Naukowych nr 828/P06/96/11.

Możliwości wykorzystania grzyba *B. brongniartii* do ograniczania populacji chrabąszczy (*Melolontha sp.*) jako pierwszy zauważył Leopold le Moutl około roku 1880. Zaobserwował on, że wymieniony grzyb może porażać wszystkie stadia rozwojowe chrabąszczy. Niektóre przeprowadzone we Francji na szeroką skalę próby terenowe dały obiecujące wyniki. Pozytywne wyniki tych prób zdecydowały o podjęciu podobnych badań w innych krajach (Szwajcaria, Austria), w tym również w Polsce. Przeprowadzone w tym okresie w naszym kraju próby ograniczania populacji pędraków chrabąszczy za pomocą *B. brongniartii* nie były pozytywne (WOSPIEL 1895; JANECKO 1906).

Ponownie przeprowadzono w Polsce badania nad użyciem grzyba *B. brongniartii* (określanego mianem *B. densa*) przeciwko pędrakom i owadom doskonałym chrabąszczy w latach 1934-1935 na terenie Nadl. Pożarzyn (KARPIŃSKI 1950). Obserwacje wykonano w laboratorium, gdzie zarodnikami grzyba zakażono pędraki, poczwarki i owady doskonałe chrabąszczy majowego i kasztanowca oraz w terenie, opylając owady w czasie rójki sproszkowanymi kulturami grzyba. Badania te nie dały jednak jednoznacznej odpowiedzi odnośnie możliwości wykorzystania *B. brongniartii* w praktyce leśnej. Skutki zastosowania grzyba przeciw pędrakom były niezadowolające, a w przypadku postaci doskonałych chrabąszczy redukcja wynosiła 20% (KARPIŃSKI 1937).

W wielu przypadkach obserwowano jednak w warunkach naturalnych wyraźną redukcję populacji chrabąszczy (*Melolontha spp.*) przez omawiany gatunek grzyba. W Polsce występowanie grzyba *B. brongniartii* w warunkach naturalnych stwierdzono w Nadl. Rudka na Białostocczyźnie w 1936 roku (BAJER 1937). Grzyb ten masowo porażał pędraki chrabąszcza kasztanowca, w wyniku czego uzyskano istotne zmniejszenie liczebności owadów doskonałych i osłabienie ich rójki. Powyższy przykład może świadczyć o tym, że w warunkach Polski jest możliwe ograniczanie populacji chrabąszczy za pomocą zabiegów przeprowadzonych przy użyciu grzyba *B. brongniartii*. Na udane przeprowadzenie zabiegów ma wpływ szereg czynników decydujących o możliwościach i przebiegu zakażenia, rozwoju choroby oraz szybkości zamierania owadów. Do tych czynników można zaliczyć między innymi: termin zabiegu, dawkę i formę użytkową preparatu, rodzaj składnika biologicznego (strzępki grzybni, zarodniki konidialne, blastospory), sposób stosowania i trwałość biopreparatu w środowisku.

2.1. Charakterystyka grzyba *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch

Gatunek *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch należy do grzybów niedoskonałych *Deuteromycetes* (*Fungi Imperfecti*). Jest to sztucznie utworzona grupa, u której nie wykryto dotychczas rozmnażania płciowego. Ważniejsze synonimy tego gatunku to: *B. tenella* Delacr., *B. densa* Pic. i *B. melolonthinae* Sacc. (SIEMASZKO 1937). *B. brongniartii* można odróżnić od *B. bassiana* (Bals.) Vuill. po kształcie, rozmiarach i proporcji zarodników konidialnych, które mogą być kuliste

i owalne. U *B. brongniartii* 98% zarodników ma kształt owalny, a u *B. bassiana* 50% zarodników ma kształt kulisty, a 50% – owalny.

B. brongniartii jest drugim po *B. bassiana* sprawcą białej muskardyny. Mianem tym określa się choroby grzybowe, przy których grzybnia i zarodniki konidialne pokrywają grubą warstwą ciało martwego owada. Zakażenie owada grzybem następuje najczęściej przez oskórek. Zarodnik konidialny, lub innego typu, trafiając na oskórek owada w odpowiednich warunkach temperatury i wilgotności kiełkuje po około dwóch dniach, a wyrastająca strzępka wrasta do jamy ciała. Powstająca w owadzie grzybnia wnika do różnych jego tkanek i stopniowo wypełnia całą jamę ciała. W miejscu wnikięcia strzępki do organizmu owada powstają na oskórku brązowe lub żółte plamy. Chory owad stopniowo traci apetyt, aktywność, a często przyjmuje charakterystyczne pozycje. Ciało zakażonego owada jest sztywne na skutek przerośnięcia grzybnią jego tkanek. Chory osobnik ulega paraliżowi i zamiera. Tuż przed śmiercią i w krótkim okresie po śmierci u larwalnych stadiów owadów, zwłaszcza tych o jasnym oskórku, ich barwa staje się czerwona. Wkrótce po śmierci owada (po 24 godz.) grzybnia wyrasta na zewnątrz i pokrywa jego ciało grubą, białą warstwą trzonków i zarodników konidialnych, przez które następuje zakażenie nowego żywiciela.

Wewnątrz ciała owada powstają zarodniki spoczynkowe (przetrwalnikowe) tzw. blastospori, które z uwagi na swą odporność na warunki zewnętrzne umożliwiają grzybom przeżycie w okresie od śmierci poprzedniego żywiciela aż do zetknięcia się ze zdrowym owadem.

Zakażenie grzybem *B. brongniartii* może również nastąpić w wyniku zjedzenia zarodników konidialnych, jak to stwierdzono (HURPIN, VAGO 1958) u *Melolontha melolontha* (L.) w przypadku *B. bassiana*. Zaobserwowano również, że muskardyna (choroba wywołana przez *B. brongniartii*) może rozprzestrzeniać się nie tylko przez zarodniki konidialne, lecz także innymi drogami, np. przez strzępki grzybni. Roznosicielami choroby mogą być gąsienice, u których grzyb rozmnaża się w jamie ciała; przy zranieniu oskórka chorej gąsienicy wydobywająca się hemolimfa ze strzępkami może stanowić źródło infekcji dla zdrowych gąsienic. Podobnie odrzucony oskórek chorej gąsienicy po linieniu może być źródłem infekcji.

Zarodniki *Beauveria* spp. odznaczają się dużą żywotnością i jak podaje LIPA (1967), zarodniki *B. bassiana* w suchych warunkach zachowują zdolność zakażenia owadów przez 5 lat. Jest to cecha bardzo istotna z punktu widzenia stosowania tych grzybów w ograniczaniu populacji szkodliwych owadów. Szybkość zarażenia się owadów grzybem *B. brongniartii*, jak również czas trwania choroby, zależą od wielu czynników, zwłaszcza od sposobu wnikięcia grzyba do owada, temperatury i wilgotności.

Jak już wspomniano, podstawowym miejscem wnikięcia patogena jest oskórek owadów, którego mechaniczne lub inne uszkodzenie może powodować zwiększenie infekcyjności. Wynika to z budowy oskórka. Składa się on z warstwy

nabłonka i wytwarzanych przez nabłonek warstw prokutikuli i epikutikuli zbudowanych z białka i chityny. W skład epikutikuli wchodzi również substancje woskowe i tłuszczowe, które utrudniają wnikanie patogena do organizmu owadów. Grzyb pokonując tę barierę wydziela enzymy hydrolizujące kutikulę. Przenikanie strzępki przez oskórek ma charakter mechaniczny i enzymatyczny.

Grzyby mogą również zakażać swych żywicieli przez przewód pokarmowy, w którym rozrastająca się grzybnia przenika do jamy ciała i powoduje śmierć owadów. Ponadto grzyby mogą wnikać do organizmu owadów przez tchawki. Jednakże najczęściej zakażenie owadów następuje przez zraniony oskórek.

Porażenie zależy również od zjadliwości patogena, a ta z kolei – od wielu czynników o charakterze fizjologicznym. Owady osłabione, np. innymi pasożytami lub czynnikami niebiologicznymi, są bardziej wrażliwe na zakażenie przez grzyby niż owady zdrowe. Niekiedy owady porażone grzybami zamierają na skutek bakteriozy, której sprawcą jest *Micrococcus* sp., jak np. chrabąszcze (*Melolontha* spp.) (LIPA 1967).

Temperatura i wilgotność są najważniejszymi czynnikami warunkującymi przebieg zakażenia i decydującymi o przebiegu choroby, a także zarodnikowania grzyba. Najbardziej udane zakażenia mają miejsce w temperaturze ok. 20 °C. W temperaturze poniżej 10 °C nie stwierdzano zakażenia owadów (SCHAERFENBERG 1964). Aby zakażenie było udane wymagana jest na ogół wilgotność wyższa niż 70%. Stwierdzono (HURPIN, VAGO 1958), że chrabąszcz majowy jest zakażany przez grzyby w większym procencie w glebach wilgotnych niż w suchych. W glebach o odczynie kwaśnym również na ogół owady łatwiej ulegają zakażeniu przez grzyby niż w glebach o innym odczynie.

2.2. Badania nad wykorzystaniem grzyba *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch do ograniczania populacji pędraków i owadów doskonałych chrabąszczy

Uaktywnienie się populacji chrabąszczy (*Melolontha* spp.) i innych gatunków owadów żerujących na korzeniach w latach osiemdziesiątych naszego wieku w krajach zachodniej Europy spowodowało ponowne zainteresowanie się grzybem *Beauveria brongniartii* jako naturalnym czynnikiem ich redukcji.

Pozytywne wyniki uzyskane w Szwajcarii (KELLER 1983, 1986) były inspiracją do podjęcia prób terenowych z użyciem biopreparatów *B. brongniartii* przeciwko pędrakom i owadom doskonałym chrabąszczy (*Melolontha* spp.) m.in. we Włoszech i w Niemczech (ZIMMERMANN 1992a). Chrabąszcze w czasie rójki opryskiwano płynnymi biopreparatami zawierającymi spory patogena, a do ograniczania populacji pędraków w glebie stosowano zainfekowane grzybem ziarno zbóż. W większości przeprowadzonych prób nie uzyskano pozytywnych wyników, jeżeli chodzi o działanie natychmiastowe badanych biopreparatów. W przypadku stosowania biopreparatów przeciw owadom doskonałym

chrabąszczy obserwowano zbyt długi okres czasu między infekcją a śmiercią owadów, pozwalający zainfekowanym samicom na złożenie jaj. Jednakże zainfekowane samice składając jaja przenosiły jednocześnie grzyb do gleby, który następnie mógł porażać pędraki. Działanie grzyba objawiało się więc w dłuższym czasie.

Przy ograniczaniu populacji pędraków za pomocą zainfekowanego grzybem ziarna zbóż, napotymano na problemy związane z jakością stosowanego biopreparatu, z trudnościami z dobrym wprowadzeniem i zmieszaniem ziarna z glebą oraz niemożliwością jego umieszczenia pod środkowe korzenie drzew owocowych, gdzie pędraki występowały najliczniej. Zastosowanie zainfekowanego ziarna w dawkach 25-50 kg na 1 ha sadu nie dawało na ogół wystarczającego rozrzedzenia populacji pędraków (poniżej progu szkodliwości). Konieczne były dalsze badania mające na celu ustalenie optymalnych warunków, od których zależy działanie owadobójcze *B. brongniartii*.

We Włoszech wykonano szereg badań nad zjadliwością grzyba wyizolowanego z prób zainfekowanych pędraków zebranych w glebach Valle d'Aosta (Północne Włochy), gdzie wyrządzają one duże szkody w uprawach rolniczych i leśnych. W przeciwieństwie do innych terenów występowania chrabąszcza majowego, w glebach Valle d'Aosta zainfekowanie grzybem *B. brongniartii* stadiów larwalnych w warunkach naturalnych było nieznaczne, znajdowano także nieliczne martwe osobniki dorosłe przerośnięte grzybnią i zarodnikami tego gatunku. Jak wykazały badania CRAVANZOL i in. (1994 b), przyczyny słabego zakażenia pędraków grzybem nie były związane z jego małą zjadliwością. W rzeczywistości izolaty (szczepy) grzyba wyizolowane z zainfekowanych pędraków zebranych z różnych powierzchni powodowały w warunkach laboratoryjnych 70 do 100% śmiertelności pędraków po 35-63 dniach. Ponadto te same szczepy zastosowane na różne gleby Vale d'Aosta wykazały wystarczającą aktywność wobec pędraków; liczebność grzyba, jego rozprzestrzenienie i trwałość w analizowanych glebach byłyby również dobre. Zjadliwość szczepów była ciągle obserwowana po 4 latach od inokulacji gleb (CRAVANZOLA i in. 1994 a).

Dalsze badania polegały na ustaleniu zależności między poziomem rozprzestrzenienia *B. brongniartii* w glebach a występowaniem i porażaniem pędraków (CRAVANZOLA i in. 1996). W większości prób (79,8%) patogen był nieobecny, a w pozostałych 20,2% prób grzyb występował w bardzo małej gęstości. Nie stwierdzono istotnej zależności między dystrybucją *B. brongniartii* w glebach a poziomem porażenia pędraków chrabąszcza majowego.

W Niemczech badano zjadliwość 26 szczepów *B. brongniartii* różnych pochodzeń wobec larw drugiego i trzeciego stadium *M. hippocastani* Fabr. zebranych na obszarze gradacji na północ od Karlsruhe (TRZEBITZKY 1996). W badaniach tych stwierdzono, że szczepy można dobrze scharakteryzować stosując koncentrację 10^6 konidiów/ml. Zastosowanie wyższej koncentracji (10^7 konidiów/ml) powodowało 100% śmiertelności owadów w ciągu 4 tygodni, przy

wszystkich badanych szczepach. Nie jest możliwe zwiększenie śmiertelności i szybkości infekcji owadów przy stosowaniu wyższych koncentracji. Jeżeli liczebność zarodników grzyba na powierzchni owada jest zbyt wysoka występuje między nimi konkurencja o pożywienie i wodę.

Stosowanie niskiej koncentracji grzyba (10^5 konidiów/ml) prowadziło do bardzo długiego okresu inkubacji – powyżej czasu trwania doświadczenia (powyżej 90 dni). Przy niektórych szczepach *B. brongniartii* nie obserwowano wyrastania grzybni na zewnątrz owada (po jego śmierci) i zarodnikowania. Przed zastosowaniem danego szczepu w warunkach terenowych należałoby sprawdzić, czy nie występuje opisana wyżej właściwość.

Wrażliwość na infekcję grzybem *B. brongniartii* może być również związana ze stadium rozwojowym chrabąszczy. Z omawianych badań niemieckich wynika, że pędraki chrabąszcza kasztanowca w drugim stadium rozwojowym były nieco mniej wrażliwe na infekcję wymienionym grzybem niż pędraki tego gatunku w trzecim stadium rozwojowym.

Stwierdzono (TRZEBITZKY 1996), że przy niskich temperaturach (8-12 °C) okres inkubacji był bardzo długi, a śmiertelność owadów była zbliżona do kombinacji kontrolnej. Jednakże kiełkowanie zarodników na oskórku owadów było ciągle możliwe w niskich temperaturach, ale trwało dłużej, niż to wynika z badań na stałej pożywce. Po 48 godz. przy temperaturze 7 °C tylko 10% zarodników kiełkowało, przy 15 °C – 10 do 50%, a przy 25 °C – wszystkie zarodniki kiełkowały w ciągu 36 godzin.

Wystąpiły duże różnice w zjadliwości miejscowych szczepów (TRZEBITZKY 1996). Izolaty pochodzące z miejsc o dużym poziomie infekcji charakteryzowały się nie największą zjadliwością. Największą zjadliwość wykazały izolaty z miejsc o średnim poziomie liczebności pędraków i małym stopniu ich zainfekowania. Dwa szczepy wyizolowane z chrabąszcza majowego (otrzymane ze Szwajcarii) były również bardzo aktywne przeciw pędrakom chrabąszcza kasztanowca.

Badania wykonane w Niemczech (TRZEBITZKY 1996) na obszarze gradacji chrabąszcza kasztanowca na północ od Karlsruhe wykazały również, że najważniejszymi patogenami pędraków w warunkach naturalnych były: *Beauveria brongniartii* i *Rickettsiella melolonthae*. *B. brongniartii* stanowiła 50% wszystkich stwierdzonych u pędraków infekcji, pozostałe patogeny – *R. melolonthae* – około 20%, nicienie – około 15%, *Pleistophora tenua* sp. nov. Trzebitzky – około 13% i *Nosema melolonthae* – około 2%. Natomiast w odniesieniu do owadów doskonałych największy udział w infekcji miały *B. brongniartii* i nicienie (po ok. 40%), pozostałe patogeny stanowiły: *P. tenua* – ok. 12%, *R. melolonthae* – ok. 8%.

Zaobserwowano, że tylko w przypadku jednoczesnego wystąpienia w populacji pędraków tych dwóch patogenów: *B. brongniartii* i *R. melolonthae* może dojść do załamania się gradacji w ciągu jednego pokolenia. Jeśli populacja nie osiągnie poziomu 80 larw L_1 na 1 m^2 lub 30 larw L_2 na 1 m^2 , presja infekcyjna

wydaje się być za niska, żeby wywołać szybką epizootę. Chociaż wymienione patogeny są obecne w populacjach, niektóre drzewostany cierpią od chrabąszczy występujących poniżej wymienionego poziomu przynajmniej przez 3 generacje. Pozostałe patogeny *R. melolonthae*, *P. tenua* i nicienie, aczkolwiek występują w populacji chrabąszcza kasztanowca, to jednak mają mały wpływ na dynamikę zamierania owadów (TRZEBITZKY 1992).

Różne stadia pędraków odbywają pionową migrację na różne głębokości. W okresie zimy niektóre pędraki osiągają w glebach piaszczystych głębokość 1 m. *B. brongniartii* była obserwowana na wszystkich poziomach pionowej migracji pędraków, a infekcja – w ciągu całego roku, co wskazuje na pewną niezależność zakażenia od temperatury (TRZEBITZKY 1996).

Uważa się, że głębokość w której przebywają pędraki podczas rocznej migracji i wilgotność gleby mogą mieć duże znaczenie przy zakażeniu omawianym grzybem. Jeżeli zima poprzedzająca rójkę chrabąszczy jest umiarkowana i wilgotna, wówczas postacie doskonałe są wrażliwe na infekcję przez *B. brongniartii*, która obejmuje duży procent osobników; zamierają one przed wyjściem z gleby. Sytuację taką obserwowano w okresie zimy 1991/92; na badanym terenie (na północ od Karlsruhe w Niemczech) stwierdzono zamieranie owadów doskonałych chrabąszcza kasztanowca powyżej 60% (TRZEBITZKY 1996). Nowe infekcje wywołane omawianym grzybem następują głównie po wiosennej migracji pędraków ku górze. Najwyższy poziom infekcji stwierdza się, gdy pędraki znajdują się na głębokości około 20 cm. Szczególnie w czerwcu podczas wylinki wszystkie stadia występują na tym poziomie.

Określenie okresu od zakażenia do śmierci (czasu inkubacji) owada w warunkach naturalnych jest niezwykle trudne, chociaż bardzo istotne dla skuteczności zabiegu. W przeprowadzonych badaniach (TRZEBITZKY 1996) okres inkubacji grzyba *B. brongniartii* w próbach pędraków i postaci dorosłych chrabąszcza, zainfekowanych w sposób naturalny w polu, a następnie przeniesionych do laboratorium był przy temperaturze 19 °C następujący: połowa zainfekowanych osobników zmarła w ciągu 4 tygodni, około 90% – w ciągu 90 dni. Należy zwrócić uwagę, że owady przeniesione z pola do laboratorium są poddane różnego rodzaju stresom i w związku z tym ich wrażliwość może być inna (mogą być bardziej wrażliwe) niż w warunkach naturalnych. Ponadto badania przeprowadzono w temperaturze wyższej od tej, jaka normalnie występuje w glebie. Okres inkubacji grzyba jest bardzo istotny dla praktycznej kontroli szkodliwych owadów, które chociaż zainfekowane kontynuują żer dopóki nie nastąpi ich śmierć.

Dla efektywnej kontroli pędraków, grzyb musi być równomiernie rozprowadzony w glebie. We Francji przeprowadzono wiele testów laboratoryjnych i terenowych z zastosowaniem konidiów lub blastospor *B. brongniartii* przeciwko pędrakom chrabąszcza majowego (JACKSON, GLARE 1992). Spory były stosowane specjalnym urządzeniem do podlewania gleby. Przy dawce 2×10^{10} konidiów/m² uzyskiwano śmiertelność pędraków od 38 do 80%. W niektórych kra-

jach (Szwajcaria) *B. brongniartii* jest produkowana na ziarnie zbóż i stosowana dogłębowo przeciw pędrakom za pomocą siewników zbożowych (JACKSON, GLARE 1992).

Rozsiewanie i umieszczenie grzyba *B. brongniartii* na odpowiedniej głębokości w glebie jest trudnym problemem do rozwiązania w rejonach silnego nasłonecznienia. W Stacji Doświadczalnej w Laimburgu (Włochy) opracowano specjalny siewnik umożliwiający umieszczenie zainfekowanego grzybem ziarna zbóż na odpowiednią głębokość w glebie. Stosowanie wymienionej techniki nie jest możliwe na dużych powierzchniach i na terenach pagórkowatych. W związku z tym podjęto prace (BONDAZ, VALLET 1996) nad ulepszeniem metody rozmieszczania zainfekowanego ziarna (200 g/m^2 , co odpowiada $6-10 \times 10^{10}$ spor/ m^2). Badania wykazały m.in., że wysoka trawa, w którą wysiewano rzutowo zainfekowane ziarno była w stanie ochronić grzybnię przed działaniem słońca do czasu niezbędnego na jej umiejscowienie się w glebie. Stwierdzono ponadto, że grzyb charakteryzuje się zdolnością penetracji w głąb gleby, nawet po jednorazowym zabiegu.

Badano również wpływ rodzaju gleby na efektywność działania grzyba *B. brongniartii* na pędraki, gdyż niektóre próby terenowe wykazały większą jego skuteczność na łąkach niż w sadach. Wyniki badań (KELLER i in. 1996) pozwoliły na stwierdzenie, że nie ma istotnej różnicy w rozwoju grzyba na glebach z łąk i z sadów. Różnice w skuteczności *B. brongniartii* mogą wynikać ze specyficznych zabiegów agrotechnicznych wykonywanych w wymienionych glebach. Ponadto zaobserwowano, że wzrost i rozwój *B. brongniartii* w glebach pasteryzowanych był lepszy niż w niepasteryzowanych. Z tego wynika, że – niezależnie od pochodzenia gleby – występujące mikroorganizmy mogą blokować rozwój omawianego grzyba. Wcześniej stwierdzono (KELLER 1991), że występujące w glebach grzyby, np. *Penicillium* i *Paecilomyces* sp. nie współdziałają z *B. brongniartii* w sensie wirulencji i specyficzności gatunkowej. Może natomiast wystąpić synergistyczny efekt (wzmożenie efektywności) przy jednoczesnym oddziaływaniu na pędraki grzyba *B. brongniartii* i bakterii *Bacillus popilliae* Dutky (FRANKEN i in. 1996).

Grzyb *B. brongniartii* stosowano również przeciwko imagines chrabąszczy, używając konidia lub blastosporę do opryskiwania drzewostanów (MULLER-KÖGLER 1965; KELLER 1989). Porażenie owadów doskonałych było na ogół duże; w większości przypadków jednak zainfekowane samice zdążyły złożyć jaja do gleby.

Badania nad stosowaniem *B. brongniartii* przeciwko postaciom doskonałym i pędrakom chrabąszczy przeprowadzono m.in. w południowym Tyrolu (Włochy). W 1989 roku, w czasie trwającej rójki chrabąszczy opryskano blastosporami grzyba obrzeża drzewostanów, uzyskując wysoki poziom porażenia owadów doskonałych. Efektywność zabiegu była jednak niewystarczająca, gdyż samice były w stanie złożyć jaja (ZELGER 1993). W tym samym czasie wysiano

specjalnym siewnikiem, na 80% powierzchni sadów zagrożonych przez pędraki, ziarno jęczmienia przerośnięte grzybem *B. brongniartii* w dawce 30 kg/ha, powtarzając zabiegi w następnym roku. Działanie inicjalne zastosowanego biopreparatu w odniesieniu do pędraków było nieznaczne. Uwidoczniło się natomiast jego działanie długookresowe. Liczebność pędraków zmniejszała się stopniowo i po 2 latach obniżyła się do poziomu nieszkodliwego dla upraw sadowniczych. Przykład ten dowodzi, że jest możliwe istotne ograniczenie populacji pędraków za pomocą grzyba *B. brongniartii*.

3. ENTOMOPATOGENNE NICIENIE

W ostatnich latach zwrócono większą uwagę na możliwość wykorzystania niektórych gatunków nicieni do ograniczania populacji żyjących w glebie stadiów larwalnych różnych gatunków owadów. Szczególną przydatność wykazują nicienie entomofilne z dwu rodzajów: *Steinernema* (*Steinernematidae*), żyjące w symbiozie z bakteriami z rodzaju *Xenorhabdus* (*Enterobacteriaceae*) (THOMAS, POINAR 1979) oraz *Heterorhabditis* (*Heterorhabditidae*) – z bakteriami z rodzaju *Photorhabdus* (BOEMARE i in. 1993).

Entomofilne nicienie z rodzajów *Steinernema* i *Heterorhabditis* były szeroko testowane jako biologiczne czynniki przeciwko wielu gatunkom szkodliwych owadów (POINAR 1975, 1979). Stwierdzono, że około 250 gatunków owadów z 10 rzędów było wrażliwych na nicienie *Steinernema feltiae* (Filipjev) (DD-136 strain), a szczególnie wrażliwe były larwy chrząszczy (POINAR 1979).

Mechanizm porażania owadów przez nicienie jest następujący: infekcyjne formy (larwy trzeciego stadium) żyjące w glebie przedostają się do organizmu gospodarza w wyniku aktywnej penetracji, najczęściej przez naturalne otwory (gębowy, odbytowy, przetchlinki). Następnie przenikają przez jelito lub ściany tchawek żywiciela do hemocelu (jamy ciała), gdzie są uwalniane symbiotyczne bakterie, które powodują septicamię i śmierć owada. Nicienie natomiast namnażają się i opanowują martwego owada przed zejściem do gleby, gdzie szukają nowej ofiary (LEWIS, RAUN 1978; MORRIS 1985). Owady porażone przez nicienie giną zazwyczaj w ciągu kilkunastu godzin.

Wykonano szereg badań wyjaśniających mechanizm redukcji owadów za pomocą nicieni żyjących w symbiozie z bakteriami. Najważniejszą rolę w redukcji owadów odgrywają nie nicienie, lecz symbiotyczne bakterie z rodzajów *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*. Infekcyjne larwy trzeciego stadium nicieni noszą swe bakteryjne symbionty w jelicie (BIRD, AKHURST 1983) i wydzielają je do jamy ciała zaatakowanego owada. Bakterie rozmnażając się powodują śmiertelną dla owadów septicamię, ale jednocześnie wydzielają produkty korzystne dla nicieni, powodujące zablokowanie systemu immunologicznego owadów. Bakteria *Pho-*

tis, produkuje również antybiotyki uniemożliwiające rozwój innych niż nicienie mikroorganizmów w martwych owadach (AKHURST 1982; POINAR, THOMAS 1966).

Entomopatogeniczne nicienie w postaci gotowych biopreparatów są systematycznie wprowadzane do obrotu handlowego w niektórych krajach. Biopreparaty zawierające nicienie produkuje się na skalę półprzemysłową w odpowiednich bioreaktorach. Badania wykazały, że nicienie *Heterorhabditis* spp. nie mogą być hodowane bez swoich symbiotycznych bakterii *Photorhabdus luminescens* w przeciwieństwie do nicieni *Steinernema* spp. Nie wszystkie szczepy *P. luminescens* mogą być jednak użyte jako źródło pokarmu dla *Heterorhabditis* spp. Bakterie *P. luminescens* stanowią źródło pokarmu dla swych nicieni, niezbędne do ich rozwoju i reprodukcji. Wymienione bakterie ulegają zmianie i mogą występować w dwu wariantach, opisywanych jako formy pierwszorzędowe i drugorzędowe. Mechanizmy i funkcje wymienionych form bakterii nie są bliżej znane. Wiadomo, że obie formy różnią się wieloma cechami (aktywnością luminescencyjną, produkcją antybiotyków itp.), które nie muszą koniecznie wpływać na rozwój i reprodukcję nicieni. Wydajność produkcji nicieni jest często bardzo niska, nawet w tych kulturach, w których nie wykryto drugorzędowych form bakterii. Wiele zagadnień pozostaje nadal niewyjaśnionych.

Badania wzrostu i rozwoju bakterii *P. luminescens* w hodowli prowadzonej na pożywce w chemostacie (MATJE i in. 1996) wykazały, że ich aktywność luminescencyjna i produkcja antybiotyków po pewnym czasie uległy zanikowi. Dodanie świeżej pożywki spowodowało przywrócenie bakteriom wymienionych właściwości.

Zdolność nicieni z rodzajów *Steinernema* i *Heterorhabditis* do lokalizowania szkodliwych owadów w glebie jest często podkreślana jako jedna z wielu ich pozytywnych cech. Chociaż wiadomo, że nicienie są przywabiane przez wydzieliny wielu gatunków owadów (ISIBASHI, KONDO 1990), to mechanizm lokalizacji owadów w glebie jest ciągle mało zrozumiały. Rozproszenie nicieni i ich zatrzymanie (areszt) blisko przyszłej ofiary są rzadko brane pod uwagę jako mechanizm lokalizacji owadów w glebie. Wykonano szereg doświadczeń mających na celu zbadanie rozproszenia i zdolności znajdowania larw owadów *Tipula oleraceae* L. i *Galleria mellonella* L. w piasku przez nicienie *Steinernema feltiae*. Nie stwierdzono (PETERS i in. 1996) różnic w agregacji nicieni jako reakcji na larwy obu badanych gatunków owadów, natomiast przenikanie ich do larw *G. mellonella* było lepsze niż do larw *T. oleraceae*. Wynika to raczej ze specyficzności gatunkowej gospodarza niż ze zdolności nicieni do znajdowania ofiary. Inne badania (VILLANI 1994) wykazały, że rozprzestrzenienie nicieni *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar w glebie zależało od obecności, gęstości i dystrybucji pędraków popilii japońskiej (*Popilia japonica* Newman) (*Scarabaeidae*), a na aktywność lub behavior pędraków oddziaływała również obecność wymienionych nicieni.

Trwałość i infekcyjność entomopatogenicznych nicieni w glebie zależy m.in. od ich redystrybucji po zastosowaniu biopreparatu. Badania (MIDUTURI i in. 1996) sugerują, że zawartość w glebie piasku i substancji organicznej może wpływać na dystrybucję entomopatogenicznych nicieni w naturalnych ekosystemach. Zaobserwowano bowiem, że nicienie *Steinernema* spp. wykazywały negatywną korelację z zawartością substancji organicznej w glebach, a *Heterorhabditis megidis* (typ NWE) – pozytywną.

Na trwałość nicieni w glebie i ich infekcyjność mogą mieć wpływ stosowane pestycydy. Użycie nicieni w integrowanych programach kontroli owadów wymaga określenia wpływu pestycydów na te organizmy. Testowanie 32 pestycydów (13 insektycydów, 12 fungicydów, 7 herbicydów) (BARBAROSSA i in. 1996) wykazało, że nicienie *Steinernema carpocapsae* Weiser (larwy inwazyjne trzeciego stadium) były bardzo tolerancyjne w stosunku do analizowanych środków; tylko nieliczne środki powodowały śmiertelność nicieni powyżej 10%. Zaobserwowano natomiast, że niektóre pestycydy (abamectin, mankozeb, karbendazym) silnie redukowały, bądź całkowicie blokowały ruch nicieni w piasku, którym były wypełnione kolumny testowe.

Stosowane obecnie biopreparaty, zawierające jako czynnik aktywny nicienie entomopatogeniczne, mają krótki okres magazynowania, w czasie którego nicienie nie tracą aktywności. Niesatysfakcjonujący czas magazynowania, szczególnie w przypadku nicieni z rodzaju *Heterorhabditis*, jest ciągle przeszkodą w rozszerzeniu ich stosowania. Inwazyjne larwy nicieni starzeją się wraz z okresem przechowywania. Wyraża się to spadkiem rezerw energii i utratą żywotności.

Warunki produkcji oraz wiele abiotycznych i biotycznych czynników (temperatura, wilgotność, skażenie innymi mikroorganizmami) mogą wpływać na długość okresu magazynowania, w czasie którego nie tracą żywotności larwy inwazyjne. Zarówno proces starzenia się nicieni, jak i wpływ na nie różnych czynników nie jest dobrze poznany. Nie jest również rozeznana rola symbiotycznych bakterii w tym procesie. Badania (JUNG 1996) wykazały, że nicienie inwazyjne z rodzaju *Heterorhabditis* hodowane w temperaturze 20 °C osiągnęły wyższy poziom infekcyjności niż hodowane w temperaturze 5 °C. Jeżeli chodzi o liczebność symbiotycznych bakterii otrzymano zróżnicowane wyniki w zależności od szczepu nicieni. Ogólnie można stwierdzić, że uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze obserwacje na temat uzależnionego od temperatury wzrostu liczby bakterii (JUNG 1994). Jednakże liczba bakterii nie wpływała bezpośrednio na ich infekcyjność w stosunku do owadów.

Jak już wspomniano, jednym z głównych czynników ograniczających stosowanie nicieni *Heterorhabditis* spp., które w wielu przypadkach są bardziej zjadliwe niż nicienie *Steinernema* spp., jest ich mała żywotność. Przy braku gospodarza, zarówno w warunkach naturalnych w glebie, jak i podczas magazynowania, nieodżywiające się inwazyjne larwy zużywają zgromadzone rezerwy energii (TIILIKKALA 1992). Zmniejszanie się rezerw pokarmowych, takich jak

tluszcze (lipidy) prawdopodobnie ogranicza ich żywotność. Stwierdzono (VANINNEN 1990), że obniżenie zawartości lipidów poniżej 10% prowadzi do małej ruchliwości nicieni i małej zdolności do zakażenia.

Szersze zastosowanie entomopatogenicznych nicieni (*Steinernema* i *Heterorhabditis* spp.) wiąże się z opracowaniem odpowiednich formułacji, dających możliwość magazynowania tych biopreparatów przez okres minimum 6 miesięcy bez utraty przez nicienie żywotności i zjadliwości. Wykonano więc badania (NEUMANN, EHLERS 1996) mające na celu określenie wpływu niektórych, stosowanych obecnie handlowych formułacji na przeżywalność i infekcyjność larw inwazyjnych nicieni *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar w różnych temperaturach (5, 10 i 24 °C). Przeżywalność i infekcyjność nicieni była wyższa w niższych temperaturach; nie stwierdzono różnicy między temperaturą 5 i 10 °C. W temperaturze 24°C nicienie padły po 2 tygodniach, niezależnie od formułacji. Nie stwierdzono różnic między formułacjami opartymi na glinkach bentonitowych i attapulgitowych. Przeżywalność nicieni w wodzie (kombinacja kontrolna) i w formułacji opartej na zmielonej gąbce naturalnej była dłuższa niż w wymienionych glinkach. Wyniki wskazują, że żadna z testowanych formułacji nie gwarantowała wystarczającej przeżywalności i infekcyjności nicieni w ciągu okresu trwania doświadczenia (2 miesiące).

Wrażliwość entomopatogenicznych nicieni na ekstremalne czynniki środowiska jest przeszkodą w wykorzystaniu ich pełnego potencjału jako biologicznego czynnika kontroli szkodliwych owadów. Szczególnie niebezpieczne dla nicieni z rodzaju *Steinernema* i *Heterorhabditis* są wysokie temperatury, susze i promieniowanie słoneczne, które powodują zanik ich żywotności i nieskuteczność w warunkach terenowych (KAYA, GAUGLER 1993). Zwiększenie tolerancji nicieni na wymienione czynniki środowiska zwiększy ich skuteczność i rozszerzy zakres stosowania.

W ostatnich latach przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu wyprowadzenie szczepów nicieni zmienionych genetycznie w kierunku zwiększonej tolerancji na ekstremalne czynniki środowiska. Można je otrzymać różnymi drogami. Selekcja linii (szczepów) wykazujących zwiększoną tolerancję, np. na wysokie temperatury, może zakończyć się sukcesem, o ile cecha ta występuje w selekcyonowanej populacji (GLAZER i in. 1991). Alternatywną metodą jest stosowanie mutagenów i selekcja potomstwa osobników (mutantów) charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na ekstremalne czynniki środowiska. Tą drogą otrzymano utrwalone genetycznie mutanty nicieni *H. bacteriophora* (KOLTAI i in. 1994). Inną metodą jest zgromadzenie kolekcji szczepów nicieni, pochodzących z różnych terenów charakteryzujących się ekstremalnymi czynnikami środowiska, a następnie badanie ich pod kątem zwiększonej tolerancji.

Stosując ostatnią metodę wyselekcjonowano z naturalnej populacji nicieni *H. bacteriophora* nowy szczep IS5, charakteryzujący się tolerancją na wysokie temperatury. Cecha ta jest uwarunkowana genetycznie (SHAPIRO i in. 1996).

Wirulencja, infekcyjność i potencjał reprodukcyjny nowego szczepu IS5 były wyższe lub zbliżone do szczepu porównawczego HP88, stosowanego w praktyce.

W wyniku selekcji genetycznej udało się również uzyskać szczepy nicieni entomopatogenicznych o zwiększonej aktywności penetracyjnej (przez naturalne otwory owadów lub bezpośrednio przez skórę) (SULISTYANTO i in. 1996). Aktywność penetracyjna nicieni *H. megidis* (HSH₃) w stosunku do barciaka większego (*Galeria mellonella* L.) wzrosła z 4,8% do 18,4%, a w stosunku do *Phyllopertha horticola* L. – z 5,8% do 17,6%. Podobne wyniki uzyskano w przypadku *H. bacteriophora*.

Badania genetyczne nad nicieniami *Steinernema feltiae*, w kierunku uzyskania szczepów charakteryzujących się korzystnymi właściwościami z punktu widzenia możliwości zastosowania ich w praktyce, prowadzone są również w Polsce (TOMALAK 1994). Uzyskano wiele interesujących wyników, jednak dotychczas nie znaleziono szczepu możliwego do praktycznego zastosowania. Ponadto przebadano m.in. wpływ wewnątrzpopulacyjnych czynników na intensywność infekcji owadów przez nicienie *S. feltiae* (BEDNAREK, NOWICKI 1994), obserwując silną korelację liniową między liczbą larw inwazyjnych obecnych w komorze badawczej, a gęstością pasożyta występującego na żywicielu.

Przeprowadzono wiele badań laboratoryjnych i terenowych nad efektywnością działania entomopatogenicznych nicieni w stosunku do pędraków różnych gatunków owadów. Wstępne badania polowe nad aktywnością nicieni z rodzaju *Steinernema*, szczególnie *S. glaseri* w odniesieniu do pędraków popilii japońskiej były bardzo obiecujące zarówno w sensie redukcji populacji pędraków jak i trwałości stadium inwazyjnego nicieni w różnych warunkach na wyspie Terceira (Azory) (LACEY i in. 1994).

Dalsze badania miały na celu ustalenie efektywnego dawkowania, metody i terminu aplikacji oraz szczepu nicieni. Redukcja pędraków wynosiła często 80-100% w stosunku do kontroli. Nie wszystkie doświadczenia dały tak wysoki poziom redukcji pędraków. Na przykład w 1991 roku ekstremalnie suche lato było przyczyną słabej aktywności biopreparatów nicieniobójczych stosowanych tej wiosny. Na szczęście stwierdzono zainfekowane przez nicienie pędraki na większości doświadczeń, co świadczy, że rozwój nicieni był możliwy mimo niekorzystnych warunków. Kontrola w maju 1992 roku wykazała, że efektywne kontynuowanie ograniczenia populacji pędraków było możliwe na niektórych powierzchniach po jednorazowej aplikacji nicieni.

Z zastosowanych metod aplikacji, najbardziej efektywne okazało się podlewanie darni płynnymi kulturami nicieni; redukcja pędraków przy tej metodzie wyniosła 56-94%. W warunkach wyspy Terceira badano optymalny termin aplikacji nicieni *S. glaseri*, stosując te mikroorganizmy co miesiąc, począwszy od listopada 1990 roku do kwietnia 1991 roku. Ocena przeprowadzona w maju 1991 roku wykazała dobrą redukcję larw popilii japońskiej na poletkach traktowanych w listopadzie i w marcu wynoszącą odpowiednio 89 i 82%. Najwyższą liczbę

zainfekowanych nicieniami larw ($1,94$ zainfekowanych larw/m²) znaleziono na poletkach traktowanych w kwietniu. Dane te dowodzą, że chociaż temperatura w czasie aplikacji jest czynnikiem ograniczającym udane infekcje, inwazyjne larwy nicieni mogą przetrwać niższe temperatury nie tracąc żywotności i infekcyjności i wykazać swą aktywność, gdy warunki są bardziej sprzyjające. Obserwacje przeprowadzone w roku następnym wykazały na poletkach zabiegowych 65-100% redukcji larw popilii japońskiej. Na terenie wyspy Terceira badano również handlowe formułacje nicieni *S. glaseri* i *Heterorhabditis bacteriophora*, stwierdzając dobrą żywotność inwazyjnych stadiów, ale ogólnie niski poziom redukcji larw popilii. Przyczyny tkwiły prawdopodobnie we właściwościach stosowanych szczepów.

W badaniach polowych w Kaliforni (KAYA i in. 1994) nie stwierdzono wpływu stosowanych nicieni *H. bacteriophora* i *S. feltiae* ($2,7 \times 10^9$ nicieni/ha) na redukcję pędraków *Cyclocephala hirta* (Scarabaeidae). W badaniach laboratoryjnych natomiast wykazano, że larwy *C. hirta* zainfekowane bakteriami *Bacillus popilliae* były bardziej wrażliwe na nicienie *H. bacteriophora* i *S. glaseri*. Zaobserwowano (po 15 dniach) istotne różnice w śmiertelności zainfekowanych bakteriami *B. popilliae* larw *C. hirta*, wywołanej wymienionymi nicieniami w porównaniu do śmiertelności larw kontrolnych (nie zainfekowanych *B. popilliae*). W pierwszym przypadku nicienie redukowały ponad 78% larw *C. hirta*, w drugim – poniżej 55%.

W Kanadzie, badania przydatności entomopatogenicznych nicieni do redukcji populacji szkodliwych owadów leśnych są zaawansowane (WEST i in. 1994). Służba Ochrony Lasu (Canadian Forest Service) oceniła pozytywnie w doświadczeniach laboratoryjnych i terenowych następujące szczepy nicieni z rodzaju *Steinernema*: *S. carpocapsae* – szczepy: ALL i UMEA, *S. feltiae* – szczep 27, *S. glaseri* – szczep 326 oraz *S. feltiae* – szczep L₁C. Dwie firmy zajmują się handlową produkcją nicieni: “Biosys” (szczepy: ALL, 27, 326) i “Biologic” (szczep UMEA). Szczep L₁C, wyizolowany z gleb Nowofunlandii w 1980 roku, jest produkowany w niewielkich ilościach przez firmę “Biosys” do celów eksperymentalnych. Pozytywne wyniki uzyskuje się przy stosowaniu (doglebowym lub dolistnym) wymienionych nicieni przeciwko szkodliwym owadom z rzędu *Lepidoptera*: *Operoptera brumata* L., *Actebia fenica* Tauscher; *Coleoptera*: *Pyrrhalta luteola* Muller, *Hylobius congener* Dalle Torre, *Otiorhynchus sulcatus* Fabr., *Pissodes strobi* Hart.; *Hymenoptera*: *Acantholyda erythrocephala* L. i *Diptera*: *Strobilomyia appalachensis* Michelsen. Na uwagę zasługuje praktyczne stosowanie nicieni *Steinernema carpocapsae* – szczep UMEA do kontroli szeliniaka *H. congener* w dawce 300 tys. inwazyjnych larw/roślinę i szczepu ALL – do kontroli *O. sulcatus* w dawce 400 tys. inwazyjnych larw/roślinę.

Jak podaje ZIMMERMANN (1992a), w badaniach polowych przeprowadzonych na łąkach Aosta-Tal (Włochy), biopreparat handlowy Biovector oparty na nicieniach *S. carpocapsae*, w stężeniu 250-500 tysięcy nicieni/m² powodował

śmiertelność pędraków chrabąszcza majowego na poziomie 60-80%. W badaniach laboratoryjnych z nicieniami z rodzajów *Steinernema* i *Heterorhabditis* użytymi do redukcji larw chrabąszcza majowego przeprowadzonych we Francji, osiągnięto śmiertelność 80-100%, natomiast w doświadczeniach terenowych w latach 1989-1990 uzyskano niezadowalające wyniki.

W Holandii (VLUG 1996) wykonano doświadczenia laboratoryjne nad zastosowaniem nicieni *S. glaseri* (szcep 326) w ograniczaniu populacji pędraków chrabąszcza majowego, uzyskując śmiertelność na poziomie 68%. Wyizolowane z martwych pędraków infekcyjne larwy nicieni były dalej badane pod kątem ich aktywności w stosunku do pędraków: generacja S_1 powodowała 90% śmiertelności, a generacja S_2 – 100%. Badania polowe z nicieniami *S. glaseri* i *Heterorhabditis* spp. nie dawały pozytywnych wyników; larwy infekcyjne stosowane w dawce 250 tys./m² zniknęły z nieznanymi przyczyn z gleby w krótkim czasie.

W Niemczech (EHLERS i in. 1996) przeprowadzono w maju 1994 roku doświadczenia na polach golfowych z płynnymi kulturami nicieni *H. megidis* i *H. bacteriophora* w dawkach 0,5 i 1,5 mln larw inwazyjnych /m² przeciwko pędrakom *Phyllopertha horticola* L. i *Aphodius* spp. Liczenie pędraków *Aphodius* spp., wykonane 42 dni po zabiegu *H. megidis*, wykazało 40 i 53% śmiertelności odpowiednio przy niższych i wyższych dawkach nicieni, a po 29 dniach od aplikacji *H. bacteriophora* śmiertelność obu gatunków pędraków wynosiła od 55 do 62%. Redukcja populacji pędraków *P. horticola* spowodowana przez *H. megidis* osiągnęła w sierpniu 52 i 70%. We wrześniu, redukcja larw wymienionego gatunku owadów wywołana przez *H. bacteriophora* wynosiła 65 i 83%, a szkody były istotnie ograniczone. Obserwacje wykonane w marcu następnego roku wykazały, że tylko w przypadku poletek traktowanych nicieniami *H. bacteriophora* uzyskano istotną redukcję larw *Aphodius* spp., podczas gdy na poletkach traktowanych *H. megidis* wystąpiły znaczne szkody, gdyż nicienie nie przetrwały w glebie.

4. ENTOMOPATOGENICZNE BAKTERIE

Jednym z czynników biologicznych mogących znaleźć zastosowanie w ograniczaniu populacji pędraków chrabąszczy są bakterie *Bacillus popilliae* Dutky, które zostały po raz pierwszy opisane w 1940 roku (DUTKY 1940) jako patogeny larw popilii japońskiej. Jest to formująca spory, fakultatywna, anaerobowa bakteria, która tworzy podczas sporulacji parasporalne kryształki białkowe. Po sporulacji spory i kryształki białkowe pozostają w sporangium (komórce bakterii), natomiast autoliza (powszechna dla wielu gatunków *Bacillus*) nie występuje. *B. popilliae* jest obligatoryjnym patogenem pędraków *Scarabaeidae* (BULLA i in. 1978), tzn. takim, który jest przystosowany do jednego lub kilku spokrewnionych

gatunków żywicieli i może się rozmnażać jedynie kosztem żywych komórek. W przypadku zjedzenia sporangium przez pędraki, spory kiełkują w jelicie, przenikają przez nabłonek i przedostają się do hemolimfy, gdzie następuje sporulacja (SPLITTSTOESSER i in. 1978, KAWANISHI i in. 1978). Końcowa przyczyna padania pędraków nie jest znana, ale za istotne czynniki uważa się zmniejszenie ciał tłuszczowych w organizmie i ogólne osłabienie. Bakteria *B. popiliae* subsp. *melolontha* została po raz pierwszy wyizolowana z pędraków chrabąszcza majowego (HURPIN, VAGO 1958). Wydaje się, że bakterie *B. popiliae* powodujące tzw. chorobę mleczną u pędraków różnych gatunków żukowatych należą do obiecujących czynników biologicznej kontroli tych owadów. Bakterie te, stwierdzone w warunkach naturalnych w wielu populacjach larw *Scarabaeidae*, wykazywały długotrwałą efektywność w ograniczaniu populacji popilii japońskiej (KLEIN 1992). W Kalifornii obserwowano infekcję larw *C. hirta* przez *B. popiliae* na poziomie 71% (KAYA i in. 1994).

W Niemczech (FRANKEN i in. 1996) opisano nowy izolat *B. popiliae* ssp. *melolontha* HD-1. Wzrost wegetatywny bakterii na kompleksowej pożywce z dodatkiem aktywowanego węgla drzewnego odbywa się w optymalnej temperaturze 30 °C, ale sporulacja nie występuje. Kiełkowanie spor tej bakterii było bardzo słabe (tylko ok. 1%). Badania infekcyjności tego izolatu, stosując sporangia per os, wykazały specyficzną infekcję u pędraków *Melolontha* spp., które pobrały przynajmniej 2×10^8 spor /pędraka. Wegetatywne komórki bakterii pobrane per os nie powodowały infekcji, ale podane przez iniekcję wywoływały objawy tzw. choroby mlecznej. Badania wykazały ponadto, że infekcyjność i specyficzność bakterii *B. popiliae* jest skorelowana ze zdolnością kiełkujących komórek do przenikania przez nabłonek jelita owadów.

Omawiany izolat *B. popiliae* ssp. *melolontha* HD-1 tylko w dużych dawkach (10^8 - 10^9 sporangiów) powodował chorobę mleczną u 20-25% pędraków chrabąszcza majowego. Podobne wyniki (20% zainfekowanych osobników) uzyskano podając doustnie 1×10^8 suchych sporangiów *B. popiliae* ssp. *popilia* pędrakom popilii japońskiej (JULIAN i in. 1978).

Niski poziom infekcji, związany ze słabym kiełkowaniem spor powoduje, że w chwili obecnej bakterie *B. popiliae* należy zaliczyć do mało efektywnych czynników biologicznej kontroli pędraków *Melolontha* spp. (FRANKEN i in. 1996). Badania powinny być ukierunkowane na zwiększenie kiełkowania spor. Ponadto, tylko w przypadku produkcji infekcyjnych spor in vitro jest możliwe uzyskanie interesujących pod względem ekonomicznym produktów handlowych *B. popiliae*. Zastosowanie *B. popiliae* w warunkach terenowych może być celowe w kombinacji z innymi patogenami pędraków, jak grzyby i nicienie (THURSTON i in. 1993).

Jak wspomniano w rozdziale dotyczącym nicieni, pędraki *C. hirta* zainfekowane bakteriami *B. popiliae* łatwiej są atakowane przez nicienie *H. bacteriophora* i *S. glaseri*. W przypadku pędraków chrabąszczy (*Melolontha* spp.) zachoro-

walność wzrosła, gdy infekowano je równocześnie bakteriami *B. popilliae* i grzybem *B. brongniartii* (FRANKEN i in. 1996). Wyniki te wskazują na synergistyczny mechanizm (wzmożenie aktywności) działania tych patogenów.

Bakterie z rodzaju *Serratia* (*Entomobacteriaceae*) są również badane pod kątem ich przydatności do ograniczania populacji pędraków. Bakterie te były często izolowane z chorych i martwych larw różnych gatunków owadów (spora-dycznie z larw *Melolontha* spp.), ale ich rola w patogenezie nie jest do końca wyjaśniona. Wymienione bakterie są również znajdowane w glebie. Podjęto badania (JACKSON, ZIMMERMANN 1996) z użyciem różnych izolatów *Serratia* spp. w celu wyjaśnienia ich działania na pędraki *M. hippocastani*. Niektóre izolaty tych bakterii pochodzące z innych gatunków owadów, podane do spożycia pędrakom w postaci traktowanych korzeni marchwi, powodowały efekt antyfidantny (wstrzymanie się od żerowania). Efekt ten był trwały; pędraki przeniesione następnie na świeżą, nietraktowaną marchew nie wznawiały żerowania i zamierały przed przepoczwarczeniem. Wiele szczepów *Serratia* spp., izolowanych z różnych typów gleb w Europie, również wywoływało u pędraków *M. hippocastani* wymieniony efekt antyfidantny. Niektóre izolaty *Serratia* spp. i *S. entomophila* wyodrębnione z pędraków *Costelytra zealandica* White (Nowa Zelandia) nie powodowały efektów chorobowych u badanego gatunku pędraków. Reakcja na omawiane szczepy bakterii była jednakowa u 2. i 3. stadium pędraków chrabąszcza kasztanowca. Badania wskazują, że efekt antyfidantny i reakcja patologiczna są związane ze specyficnością działania poszczególnych szczepów bakterii. Zaprzestanie żerowania sugeruje, że badane bakterie mogą wytwarzać toksyny lub rozpocząć patogenicznych dla owadów efektów. Wyizolowanie z martwych owadów szczepów bakterii użytych do traktowania korzeni marchwi świadczy o ich infekcyjności, ale nie wyjaśnia mechanizmu patogeniczności. Zaprzestanie żerowania jest jednym z pierwszych objawów w patogenezie tzw. choroby bursztynowej, wywołanej przez bakterie *S. entomophila* u larw *C. zealandica* (JACKSON i in. 1993). W przypadku larw *M. hippocastani*, wykazujących reakcje antyfidantne, nie zaobserwowano przejaśnienia jelita – objawu typowego dla tej choroby.

W Nowej Zelandii zarejestrowano w 1990 roku biopreparat Invade, oparty na bakterii *S. entomophila*, do ograniczania populacji pędraków *C. zealandica* (JACKSON 1994). Chorobę bursztynową pędraków wymienionego gatunku owadów, powodowaną przez entomopatogenne szczepy *S. entomophila* i *S. proteamaculans*, po raz pierwszy rozpoznano w 1981 roku. Badania (JACKSON i in. 1993) wykazały, że ma ona nietypową patogenezę, opierającą się na kolonizacji jelita przez bakterie. Biopreparat stosuje się rzędowo (w rzędy co 15 cm), osiągając lokalną gęstość bakterii 105 komórek/g gleby. Liczebność bakterii obniża się w ciągu 1 miesiąca o jeden rząd przy braku gospodarza, ale pozostaje na wysokim poziomie w obecności porażonych larw. Spadek liczebności bakterii następuje zazwyczaj w okresie letnim, ale wzrasta wraz z liczbą larw w okresie

drugiej jesieni po aplikacji i w następnych sezonach. Miesiąc po zabiegu stwierdza się chorobę u 15-20% osobników traktowanej populacji owadów, a w ciągu pierwszego sezonu następuje redukcja około 50% populacji, w porównaniu do kontroli. Dalsza redukcja owadów w następnych sezonach zależy od gęstości ich populacji. Im większa liczebność owadów, tym większa ich redukcja spowodowana chorobą bursztynową może być spodziewana.

Stosowanie biopreparatu na suche gleby może spowodować zabicie bakterii. Zbyt późna aplikacja daje bardziej zróżnicowane wyniki niż wczesna – na młodsze pędraki 3. stadium (stosowanie biopreparatów w końcu lata i na początku jesieni), gdy temperatura gleby jest wystarczająco wysoka dla aktywności larw i możliwości ich zakażenia. W ciągu ostatnich 4 lat biopreparat Invade był stosowany z wyboru na 10 000 ha pastwisk jako skuteczny czynnik biologiczny, ograniczający populacje pędraków *C. zealandica*.

Prowadzi się również intensywne badania poszukiwawcze nad wykryciem nowych szczepów bakterii *Bacillus thuringiensis* aktywnych wobec larw *Scarabaeidae*. W firmie Mycogen Corp. (San Diego CA) wykryto m.in. szczepy aktywne wobec larw *Lepidoptera*, *Coleoptera*, włączając takie szkodniki korzeni jak *Diabrotica* spp., *Popilia japonica* Newman i inne (FEITELSON 1994). W Japonii wyizolowano z gleby nowy szczep nazwany Buibui, wykazujący działanie wobec pędraków niektórych gatunków *Scarabaeidae* włączając *Anomala cuprea* Hope, *A. Albopilosa* Hope, *A. Rufocuprea* Motschulsky, *A. Daimiana* Harold, *A. Schonfeldti* Ohaus, *P. japonica*, *Mimela splendens* Gyllenhal i *Bilitopertha orientalis* Waterhouse; szczep ten nie działa na stonkowate (*Chrysomelidae*), ani na larwy *Lepidoptera*, *Diptera* i *Orthoptera* (SATO i in. 1994). Prawdopodobnie nie działa również na pędraki chrabąszczy (*Melolontha* spp.) (T. BOWEN 1997, informacja ustna). Szczep ten wykazuje wyższą aktywność w odniesieniu do wymienionych gatunków *Coleoptera* niż znane dotychczas szczepy *B. thuringiensis*.

5. PODSUMOWANIE

Z przedstawionego przeglądu metod biologicznych wynika, że istnieją możliwości użycia zarówno grzybów, nicieni, jak i bakterii do ograniczania populacji pędraków różnych gatunków żukowatych. Wydaje się jednak, że w najbliższej przyszłości szersze praktyczne zastosowanie mogą znaleźć biopreparaty oparte na grzybach, zwłaszcza na *Beauveria brongniartii* i nicieniach z rodzajów *Heterorhabditis* i *Steinernema*.

5.1. *Beauveria brongniartii*

Praktyczna kontrola pędraków za pomocą grzyba *B. brongniartii* ma obecnie miejsce w niektórych krajach na niedużą skalę. Można stwierdzić, że możliwe są dwie strategie kontroli za pomocą grzyba *B. brongniartii*:

1) zabiegi przeciwko pędrakom przez dogłębne stosowanie konidiów, blastospor, ziarna przerośniętego grzybem lub strzępek grzybni;

2) zabiegi przeciwko owadom doskonałym przez stosowanie z samolotów konidiów lub blastospor i przenoszenie grzyba do gleby przez samice składające jaja.

Celem pierwszej strategii jest redukcja liczebności pędraków do poziomu nieszkodliwego dla chronionych roślin. Cel ten można osiągnąć tylko wówczas, gdy stosuje się odpowiednie formułacje, dobre wymieszanie biopreparatu z glebą oraz gdy występują sprzyjające warunki meteorologiczne (wilgotność, temperatura). Jednorazowe zastosowanie biopreparatu na ogół nie jest wystarczające do obniżenia liczebności pędraków w ciągu jednej generacji szkodnika. Zabiegi należy wykonywać 2-3-krotnie. Najczęściej stosowaną formacją jest ziarno zbóż przerośnięte grzybem, które wysiewa się za pomocą siewników zbożowych. Ostatnio opracowano do stosowania dogłębowego różne formułacje *B. brongniartii*, np. suche strzępki grzybni lub granulowana grzybnia (ZIMMERMAN 1994). W przypadku tych nowych formułacji, infekcyjne konidia są produkowane dopiero po wysianiu biopreparatu do gleby.

Celem drugiej strategii (kontrola imagines) jest zainfekowanie owadów doskonałych i przeniesienie grzyba do gleby przez samice składające jaja. Biopreparat stosuje się techniką samolotową, uzyskując pewną redukcję imagines w stosunkowo krótkim czasie; redukcja ta jest niewystarczająca do obniżenia liczebności pędraków. Ważniejszą sprawą przy stosowaniu tej strategii jest przeniesienie grzyba poprzez zainfekowane samice do gleby i zakażenie nim pędraków, których populacja powinna stopniowo ulegać zmniejszeniu. W warunkach doświadczeń terenowych stwierdzono, że grzyb *B. brongniartii* wprowadzony do gleby powodował śmiertelność pędraków i imagines chrabąszczy jeszcze w ciągu dwu następnych generacji (ZIMMERMANN 1992b).

W wielu krajach zaleca się stosowanie *B. brongniartii* przeciw pędrakom np., w Szwajcarii, Francji. Według opinii ekspertów (BUCHGRABER 1994) w Austrii stosowanie grzyba *B. brongniartii* jako obiecującej metody ochrony upraw przed pędrakami jest celowe. W 1994 roku podjęto badania (obejmujące 3-letni cykl rozwojowy chrabąszcza majowego) mające na celu zarejestrowanie tego biopreparatu jako czynnika biologicznej kontroli chrabąszczy. W rezultacie tych badań nastąpi uruchomienie produkcji patogena i jego stosowanie na szeroką skalę (STRASSER, SCHINNER 1996). We Włoszech (ZELGER 1996), na powierzchniach o niskiej populacji pędraków, zaleca się stosowanie grzyba *B. brongniartii*, nato-

miast przy dużej gęstości populacji stosuje się zabiegi mechaniczne i przykrywanie siatkami z polietylenu powierzchni zagrożonych przez pędraki.

5.2 Nicienie

Nicienie mają wiele cech, które czynią z nich jeden z głównych potencjalnych czynników biologicznej kontroli pędraków (SMITS 1994). Są zdolne niszczyć pędraki wielu gatunków, aktywnie przemieszczają się w glebie w poszukiwaniu żywiciela oraz mogą być masowo produkowane. Mechanizmy obronne pędraków i w niektórych przypadkach ograniczona aktywność nicieni są ciągle głównymi przeszkodami w stosowaniu ich na szeroką skalę.

Dane literaturowe wskazują, że na ogół izolaty nicieni *Heterorhabditis* powodują wyższy poziom śmiertelności pędraków niż izolaty *Steinernema* (za wyjątkiem *S. glaseri*). O aktywności nicieni w stosunku do pędraków świadczą wymienione niżej wyniki badań. LD₅₀ (dawka powodująca 50% śmiertelności owadów) określone dla pędraków *Phyllophaga hirticula* wynosiło w przypadku *H. helioidis* – 12, *S. glaseri* – 86 i *S. carpocapsae* – 210 nicieni/pędraka (FORSCHLER, GARDNER 1991). Na podstawie 82 prób polowych z zastosowaniem nicieni przeciwko pędrakom popilii japońskiej stwierdzono, że *H. bacteriophora* zapewnia kontrolę porównywalną do chemicznych pestycydów, a *S. carpocapsae* nie daje pozytywnych wyników (GEORGIS, GAUGLER 1991). Ostatnio wykazano, że izolat 326 *S. glaseri* daje w badaniach laboratoryjnych i terenowych wyniki porównywalne lub nawet lepsze od *Heterorhabditis* spp. (SMITS i in. 1994).

Trudności w stosowaniu nicieni wynikają często z właściwości pędraków poszczególnych gatunków owadów, przeciwko którym zostały użyte. Pędraki posiadają bowiem bardzo dobrze rozwinięty system immunologiczny, zdolny do unieszkodliwiania nicieni i ich symbiontów; właściwość ta jest zróżnicowana w zależności od gatunku. Przykładowo można podać, że pędraki *Phyllophaga hirticola* zamierają po iniekcji 4 nicieni *Heterorhabditis* spp., a po wstrzyknięciu pędrakom *Amphimallon solstitialis* do 16 wymienionych nicieni/osobnika nie powoduje żadnej śmiertelności. Natomiast wstrzyknięcie nicieni do larw *M. melonontha* powoduje bardzo intensywną reakcję melanizacji i zamieranie wszystkich osobników (SMITS 1992).

Skóra pędraków jest twarda i prawdopodobnie zapobiega wnikaniu nicieni, a naturalne otwory są dobrze pokryte szczecinkami i drobnymi włoskami lub siateczkami chroniącymi owady przed wtargnięciem pasożytów. W jelicie natomiast, poza jego ściankami, plejotroficzna membrana może być istotną przeszkodą w przenikaniu nicieni (FORSCHLER, GARDNER 1991).

Pędraki występują w glebie w strefie dużego zagęszczenia korzeni roślin, co może stwarzać nicieniom problemy ich lokalizacji. Są one bardzo wrażliwe na kontakt z nicieniami i reagują bardzo energicznie, gdy inwazyjne larwy nicieni występujące w glebie usiłują po ich odnóżach dostać się do naturalnych otworów.

Wykonując energiczne ruchy, pędraki zrzucają nicienie ze swego ciała, a następnie szybko uciekają z miejsc ich występowania (SCHROEDER i in. 1993). Tym można częściowo wytłumaczyć częste różnice między wynikami doświadczeń laboratoryjnych i polowych.

Główną przeszkodą rozszerzenia stosowania nicieni w praktyce przeciwko pędrakom jest brak wystarczającej wiedzy na temat biologii zarówno nicieni, jak i pędraków, brak powtarzalnej skuteczności w warunkach polowych, a szczególnie brak izolatów nicieni aktywnych w warunkach terenowych.

SMITS (1994) uważa, że wiele gatunków nicieni jest przekazywanych w celach badawczych z jednego laboratorium do drugiego od lat i w związku z tym jest wątpliwe, czy ciągle zachowały one swe oryginalne biologiczne charakterystyki. Wydaje się, że byłoby lepiej rozejrzeć się za nowym materiałem, który mógłby być przechowywany w płynnym azocie w celu uniknięcia przekrzyżowania i zmiany podstawowych właściwości.

Pędraki są trudnym obiektem do kontrolowania. Żyją one i odżywiają się w glebie w okresie 3-4-letnim. Mając odpowiednie mechanizmy obronne przeciwko nicieniom zaadaptowały się do współżycia z nimi. Nicienie będące w stanie zabić pędraki muszą mieć szczególną charakterystykę. Muszą efektywnie poruszać się w glebie w celu lokalizacji żywiciela, wtargnąć do niego niszcząc jego system immunologiczny, co nie jest sprawą łatwą do wykonania.

Praca została przyjęta przez Komitet Redakcyjny 4 marca 1998 r.

STATE OF STUDIES ON USE OF BIOLOGICAL CONTROL AGENTS AGAINST PESTS OF ROOTS

Summary

Based on literature, the present state of studies on the practical use of biological control agents such as entomopathogenic fungi, nematodes and bacteria against pests of roots was presented in the paper.

Among the entomopathogenic fungi, *Beauveria brongniartii* is used in practical scale against the larvae of *Scarabaeidae* in some European countries (France, Switzerland, Italy, Austria). The entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*, are also very potential biological agents against root pests and they gave good results in the field trials. There are the positive examples of the practical use of the bacteria *Serratia entomophila* to control the larvae of *Costelytra zealandica* in New Zealand.

Further studies on the practical use of the above mentioned biological control agents against pests of roots are needed.

PIŚMIENICTWO

- AKHURST R. J. 1982: Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the family *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*. J. Gen. Microbiol., 128: 3061-3065.
- BAJER J. 1937: Chrabąszcz kasztanowiec w nadleśnictwie Rudawka. Las Pol., 4.
- BARBAROSSA B., FRULLA R., GRAZZI G., ROVESTI L. 1996: Compatibility of *Steinernema carpocapsae* with pesticides. IOBC/WPRS Bulletin 19 (9): 136-139.
- BEDNAREK A., NOWICKI T. 1986: Effect of intrapopulation factors in the nematode *Steinernema feltiae* (*Steinernematidae*) on intensity of insect infestation. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 323: 199-212.
- BIRD A.F., Akhurst R.J. 1983: The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family *Steinernematidae*. Int. J. Parasit., 13: 599-606.
- BOEMARE N. E., AKHURST R. J., MURANT R. G. 1993: DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*) symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 43: 249-255.
- BONDAZ F., VALLET S. 1996: Essai d'épandage à la volée de graines enrobées de *Beauveria brongniartii*, insertion et pénétration dans le sol. Proc. of the meeting "Integrated Control of Soil Pests", 23-25 October, Freiburg, Germany, IOBC WPRS Bulletin, 19(2): 65-68.
- BUCHGRABER K. 1994: Engerlinge schädigen unsere Wiesen. Der Fortschrittliche Landwirt, 9: 5-7.
- BULLA L. A., COSTILOW R. W., SHARPE E. S. 1978: Biology of *Bacillus popilliae*. Adv. App. Microbiol. 23: 1-18.
- CRAVANZOLA F., PIATTI P., BONDAZ F., OZINO O. J. 1994a: Development and persistence of a virulent strain of *Beauveria brongniartii* in an inoculated soil in Vale d'Aosta. VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microb. Control, 28 Aug. – 2 Sept., Montpellier, France, Abstracts V, II, 134.
- CRAVANZOLA F., PIATTI P., MIOLETTI S., OBERT F., CURTO M., PICCINI M., BRUNO R., OZINO O. J., RINAUDO M. T. 1994b: Trehalase activity in parasitic and saprophytic strains of *Beauveria brongniartii* and *Verticillium lecanii*. VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microb. Control, 28 Aug. - 2 Sept., Montpellier, France, Abstracts V, II, 135.
- CRAVANZOLA F., PIATTI P., OZINO O. J., BONDAZ F., VALLET S. 1996: Occurrence of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* in the soil of Valle d' Aosta and infestation level of *Melolontha melolontha*. Proceedings of the meeting "Integrated control of soil pests", 23-25 October, Freiburg, Germany. IOBC/WPRS Bulletin vol. 19 (2): 59-64.
- DUTKY S. R. 1940: Two new spore-forming bacteria causing milky disease of the Japanese beetle larvae. Gentlemen. Econ. Entomol., 34: 217-218.
- EHLERS R. V. SULISTYANTO D., MARINI J. 1996: Control of Scarabeid larvae in golf course turf with the *Heterorhabditis megidis* and *H. bacteriophora*. Proceedings of the first joint meeting. Working groups "Insects pathogens and insect parasitic nematodes" (IOBC/WPRS and IOBC/EPRS). 27 Aug. – 1 Sept. 1995, Poznań, Poland, IOBC/WPRS Bulletin, vol. 19 (9): 84-85.
- FEITELSON J. S. 1994: Novel pesticidal delta – endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. Proc. of the VIth Inter. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbiol. Control. 28 Aug. – 2 Sept., 1994, Montpellier, France, vol. 1, 184.
- FORCHLER B. T., GARDNER W. A. 1991: Concentration mortality responses of *Phyllophaga hirticula* (*Coleoptera: Scarabaeidae*) to three entomogenous nematodes. J. Econ. Entomol. 84: 841-843.

- FRANKEN E., KRIEGER L., SCHNETTER W. 1996: *Bacillus popilliae*: a difficult pathogen. Proceeding of the meeting "Integrated control of soil pests", 23-25 October 1995, Freiburg, Germany, IOBC/WPRS Bulletin, vol. 19 (2): 40-45.
- GEORGIS R., GAUGLER R. 1991: Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. J. Econ. Entomol., 84: 713-720.
- GLASER I., GAUGLER R., SEGAL D. 1991: Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88: the diversity of beneficial traits. J. Nematod., 23: 324-333.
- HURPIN B., VAGO C. 1958: Les maladies du Hanneton commun (*Melolontha melolontha* L.) (*Col. Scarabaeidae*). Entomophaga, 3: 258-330.
- ISHIBASHI N., KONDO E. 1990: Entomopathogenic nematodes in biological control (eds: Gaugler R., Kaya H. K.), CRC Press, Boca Raton, USA. 130-150.
- JACKSON T. A. 1994: Progress in bacterial control of grass grub using Invade, a commercial biocontrol. Proc. of the VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. - 2 Sept., 1994, Montpellier, France, vol. I: 401-406.
- JACKSON T. A., GLARE T. R. (eds.), 1992: Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Intercept, Andover, 298.
- JACKSON T. A., HUGER A. M., GLARE T. R. 1993: Pathology of amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica* (*Coleoptera: Scarabaeidae*). J. Invert. Pathol., 61: 123-130.
- JACKSON T. A., ZIMMERMANN G. 1996: Is there a role for *Serratia* spp. in the biocontrol of *Melolontha* spp.? Proc. of the meeting „Integrated Control of Soil Pests” 23-25 October, Freiburg, Germany, IOBC WPRS Bulletin. 19(2): 47-53.
- JANECZKO M. 1906: O tępieniu szkodliwych owadów w szkółkach. Sylwan, 41-49.
- JULIAN G., BULLA L. A., DETROY R. W. 1978: Stored *Bacillus popilliae* spores and their infectivity against *Popillia japonica* larvae. J. Invert. Pathol., 32: 258-263.
- JUNG K. 1996: Storage of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* at two temperatures. Effect on infectivity, energy reserve and number of bacteria. IOBC/WPRS Bulletin, 19(9): 103-106.
- KARPIŃSKI J. J. 1937: Próba walki z chrabąszczem (*Melolontha* sp.) za pomocą grzyba *Beauveria densa* Pic. Roczn. Nauk. Roln. Leśn. 41.
- KAWANISHI C. Y., SPLITTSTOESSER C. M., TASHIRO H. 1978: Infection of the European Chafer, *Amphimallon majalis*, by *Bacillus popilliae*: ultrastructure. J. Invert. Pathol., 31: 91-102.
- KAYA H. K., GAUGLER R. 1993: Entomopathogenic nematodes. Ann. Rev. Entomol., 38: 181-206.
- KAYA H. K., KLEIN M. G., THURSTON G. S., BURLANDO T. M. 1994: *Bacillus popilliae* and entomopathogenic nematodes for control of the masked chafer, *Cyclocephala hirta*. Proc. of VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. - 2 Sept. 1994, Montpellier, France. I: 395-400.
- KELLER S. 1983: Die mikrobiologische Bekämpfung des Maikäfers (*Melolontha melolontha* L.) mit dem Pilz *Beauveria brongniartii*. Mitt. Schweiz. Landw., 31: 61-64.
- KELLER S. 1986: Ein grosversuch zur Bekämpfung des Maikäfers (*Melolontha melolontha* L.) mit dem Pilz *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. Mitt. Schweiz. Ent. Ges., 59: 47-56.
- KELLER S. 1989: Proceedings Int. Conf. on "Biopesticides, theory and practice." Ceske Budyovice, Czech Rep., 25-28 Sept. 1989.
- KELLER S. 1991: Pilzkrankheiten bei Schädlingen und ihre praktische Bedeutung. Landwirtschaft Schweiz Band, 4: 219-230.
- KELLER S., PÄRLI B., JACOB C. 1996: The influence of soils on the growth of *Beauveria brongniartii*. Proceedings of the meeting "Integrated control of soil pests", 23-25 October 1995, Freiburg, Germany, IOBC WPRS Bulletin, 19 (2): 74-78.
- KLEIN M. G. 1992: Use of pathogens in scarab pest management (T. A. Jackson, T. R. Glare eds). Inetrap Limited, Andover, England. 179-189.

- LACEY L., AMARAL J. J., KLEIN M. G., SIMOES N. J., MARTINES A., MENDES C. 1996: Microbial control of the japanese beetle, *Popilia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) on Teiceira island (Azores, Portugal): the role of operational research. Proc. of VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. – 2 Sept., 1994, Montpellier, France, I: 409-415.
- LEWIS W. G., RAUN E. S. 1978: Laboratory and field evaluation of the DD-136 strain of *Neoplectana carpocapsae* for the control of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. Iowa State J. Res., 52: 391-392.
- LIPA J. J. 1967: Zarys patologii owadów. PWRiL, Warszawa, ss. 342.
- MALINOWSKI H. 1998: Profilaktyka i metody ochrony szkólek i upraw leśnych przed owadami żerującymi na korzeniach. Prace Inst. Bad. Leśn., Ser. B, 34: 55-73.
- MATJE C., SMITS P. H., GERRITSEN L. J. M., EHLERS R. U. 1996: Growth and metabolism of *Photorhabdus luminescens* under continuous culture conditions. IOBC/WPRS Bulletin. 19(9): 93-98.
- MORRIS O. N. 1985: Susceptibility of 31 species of agricultural insect pests to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Can. Entomol. 117: 401-407.
- MULLER-KOGLER E. 1965: Pilzkrankheiten bei Insekten. P. Parey, Berlin, ss. 444.
- NEUMANN A., EHLERS R. V. 1996: Influence of different formulations on entomopathogenic nematode survival and infectivity. IOBC/WPRS Bulletin vol. 19 (9): 147-151.
- PETERS A., HUNEKE K., UHLERS R. U. 1996: Host finding by the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. IOBC WPRS Bulletin. 19 (9): 99-102.
- POINAR G. O. (Jr) 1975: Entomogenous nematodes – a manual and host list of insect nematode associations. Brill, Leiden.
- POINAR G.O.(Jr) 1979: Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton.
- POINAR G. O., THOMAS G. M. 1966: Significance of *Achromobacter nematophilus* (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp., *Steinernematidae*). Parasitology, 56: 385-390.
- SATO R., SUGIMURA M., TANI R., TAKEUCHI K., OGIWARA K., MINAMI M., SUZUKI N., KAJI Y., HORI H., ASANO S., OHBA M., IWAHANA H. 1994: A novel scarabeid delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strains buibui. Proc. of the VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. – 2 Sept., 1994, Montpellier, France. I: 177-179.
- SCHAERFENBERG B. 1964: Biological and environmental conditions for the development of mycoses by *Beauveria* and *Metarrhizium*. J. Insect. Pathol., 6: 8-12.
- SCHROEDER P. C., VILLANI M. G., FURGUSON C. S., NYROP J. P., SHIELDS E. J. 1993: Behavioral interactions between Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs and an entomopathogenic nematode (Nematoda, Heterorhabditidae) within turf microcosms. Environ. Entomol., 22: 595-600.
- SHAPIRO D. I., GLAZER I., SEGAL D. 1996: Preservation of natural beneficial traits under laboratory conditions: The case of IS5, a heat tolerant isolate of *Heterorhabditis bacteriophora*. IOBC/WPRS Bulletin. 19 (9): 107-111.
- SIEMASZKO W. 1937: Studia nad grzybami owadobójczymi Polski. Arch. Nauk Biol. Tow. Nauk Warsz., 6(1): 1-82.
- SMITS P. H. 1992: Control of white grubs, *Phyllopertha horticola* and *Amphimallon solstitialis*, in grass with *Heterorhabditis* nematodes. T. R. Glare and T. A. Jackson eds. Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Intercept, Andover, UK, 229-235.
- SMITS P. H. 1994: Biological control of scarabs with entomopathogenic nematodes. Proc. of the VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. – 2 Sept. 1994, Montpellier, France. I: 145-150.
- SPLITTSTOESSER C. M., KAWANISHI C. Y., TASHIRO H. 1978: Infection of the European chafer *Amphimallon majalis*, by *Bacillus popilliae*: light and electron microscope observations. J. Invert. Pathol., 31: 84-90.

- STRASSER H., SCHINNER F. 1996: Current status of *Melolontha melolontha* control by the fungus *Beauveria brongniartii* in Austria. Proceedings of the meeting "Integrated control of soil pests", 23-25 October 1995, Freiburg, Germany, IOBC WPRS Bulletin. 19 (2).
- SULISTYANO D., GOTTORF-FOLGERT I., EHLERS R. U. 1996: Bioassay for the genetic selection of entomopathogenic nematodes with increased penetration activity. IOBC /WPRS Bulletin. 19(9): 140-143.
- THOMAS G. M., POINAR G. O. 1979: *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic and entomophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 29: 352-360.
- THURSTON G. S., KAYA H. K., BURLANDO T. M., HARRISON R. E. 1993: Milky diseases bacterium as a stressor to increase susceptibility of Scarabaeid larvae to an entomopathogenic nematode. J. Invert. Pathol. 61: 167-172.
- TIILIKALA K. A. 1992: Influence of soil temperature on initial energy reserves of *Globtrottera rostochiensis* larvae. Fundamental Applied Nematology, 15(1): 49-54.
- TOMALAK M. 1995: New mutant and recombinant phenotypes of infective juveniles in *Steinernema feltiae*. Proc. of the VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. – 2 Sept. 1994, Montpellier, France. I: 120-125.
- TRZEBITZKY C. 1992: Die Pathogene des Waldmaikäfers, *Melolontha hippocastani*, in Südwestdeutschland und Beschreibung einer neuen Microsporidie der Gattung Pleistophora. Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent. 8: 279-283.
- TRZEBITZKY C. 1996: Strain selection and epizootic in microbial grub control with *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. Proceedings of the meeting "Integrated control of soil pests", 23-25 October 1995, Freiburg, Germany, IOBC/WPRS Bulletin. 19 (2): 54-58.
- VÄNNINNEN I. 1990: Depletion on endogenous lipid reserves in *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* and effect on infectivity. Pro. Vth Int. Colloq. on Invert. Pathol., 20-24 Aug. 1990, Adelaide, Australia, 232.
- VILLANI M. G. 1994: Behavioral response of scarabs to inundative release of entomopathogens in turfgrass mesocosm: implications for consistent results in the field. Proc. VIth Intern. Colloq. on Invert. Path. and Microbial Control, 28 Aug. - 2 Sept. 1994, Montpellier, France. I: 417-423.
- VLUG H. J. 1996: Occurrence and biocontrol of grass grubs, especially of *Melolontha melolontha*. Proc. of the meeting "Integrated Control of Soil Pests", 23-25 October, Freiburg, Germany, IOBC WPRS Bulletin. 19(2): 35-36.
- WEST R., DURLING D., TURSTON G., SWEENCY J., EOLIT D., KETTELA E., ZERVOS S., WEAVER C., LYONS B. 1994: Use of entomopathogenic nematodes for control of forest insect pests in Canada. Proc. of VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control., 28 Aug. – 2 Sept. 1994, Montpellier, France. I: 371-374.
- WOSPIEL J. 1895: O szkodach wyrządzanych przez pędraki chrabąszcza majowego w lasach Łopatyńskich. Sylwan, 89-92.
- ZELGER R. 1993: Maikäfer. Versuchbericht 1992. Schriftenreihe Laimburg 3, 126-342.
- ZELGER R. 1996: The population dynamics of the cockchafer in South Tyrol since 1980 and the measures applied for control. Proceedings of the meeting "Integrated control of soil pests", 23-25 October, Freiburg, Germany, IOBC WPRS Bulletin. 19(2): 109-113.
- ZIMMERMANN G. 1992a: Maikäfer – Tagung 21-23 November 1991. Versuchszentrum Laimburg/Italien. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz., 44: 91-93.
- ZIMMERMANN G. 1992b: Use of Patogens in Scarab Pest Management. Jackson I.A. and Glare T.R. (eds), Intercept, Andover, 199-208.
- ZIMMERMANN G. 1994: Strategies for the utilization of entomopathogenic fungi. Proceedings of VIth Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control, 28 Aug. – 2 Sept., 1994, Montpellier, France. I: 67-73.

- STRASSER H., SCHINNER
Beauveria brongnia
pests", 23-25 Octob
- SULISTYANO D., GOTTOF
entomopathogenic
19(9): 140-143.
- THOMAS G. M., POINAR
tomophilic bacteria
- THURSTON G. S., KAYA I
as a stressor to increa
J. Invert. Pathol. 61:
- TILIKALA K. A. 1992: Inf
chiensis larvae. Func
- TOMALAK M. 1995: New
feltiae. Proc. of the V
Sept. 1994, Montpel
- TRZEBITZKY C. 1992: Di
deutschland und Be
Dtsch. Ges. Allg. Ar
- TRZEBITZKY C. 1996: St
brongniartii (Sacc.)
October 1995, Freib
- VÄNNINEN I. 1990: De
terorhabditis bacter
20-24 Aug. 1990, A
- VILLANI M. G. 1994: Bel
turfgrass mesocosm
on Invert. Path. and M
- VLUG H. J. 1996: Occurre
Proc. of the meeting
IOBC WPRS Bullet
- WEST R., DURLING D., T
LYONS B. 1994: Use
da. Proc. of VIth Int
1994, Montpellier, F
- WOSPIEL J. 1895: O szko
tyńskich. Sylwan, 89
- ZELGER R. 1993: Maikäf
ZELGER R. 1996: The pop
sures applied for coi
October, Freiburg, G
- ZIMMERMANN G. 1992a
burg/Italien. Nachric
- ZIMMERMANN G. 1992b:
(eds), Intercept, Anc
- ZIMMERMANN G. 1994:
VIth Intern. Colloq.
pellier, France. 1: 67