

DOROTA TUMIALIS, IWONA SKRZECZ, ANNA MAZURKIEWICZ, ELŻBIETA PEZOWICZ, KATARZYNA GÓRAL

Wrażliwość larw *Hylobius abietis* (L.) na rodzime gatunki i szczepy nicieni entomopatogenicznych*

Sensitivity of *Hylobius abietis* (L.) larvae on native species and isolates of entomopathogenic nematodes

ABSTRACT

Tumialis D., Skrzecz I., Mazurkiewicz A., Pezowicz E., Góral K. 2013. Wrażliwość larw *Hylobius abietis* (L.) na rodzime gatunki i szczepy nicieni entomopatogenicznych. Sylwan 157 (10): 769-774.

The use of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.), against the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) is currently studied in many countries. They show a great potential of nematodes for *H. abietis* control in laboratory and field experiments. In 2011 similar studies began in Poland to develop new biological control method of *H. abietis* with the use of native isolates of the nematodes. The first laboratory stage of the experiments pointed at the estimation of biological activity of 3 native isolates: 2 of *Steinernema feltiae* (Filipjev) and 1 of *S. kraussei* (Steiner). The tested nematodes were applied at the dose of 100 invasive larvae per 1 larva of *H. abietis*. After 48 hours *H. abietis* larvae were sectioned and examined for a determination of their mortality, extensivity and intensity of infection. No statistical differences were found between larvae mortality and extensivity of infection by tested isolates of nematodes. In all variants the mortality and extensivity of infection were high and reached 92-100% and 80-86% respectively. Statistical differences were found between the intensity of infection, which were the highest in case of *S. feltiae* Zag15. The obtained results indicated different activity of nematode isolates within one species.

KEY WORDS

Hylobius abietis, entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae*, *Steinernema kraussei*, biological control agent

ADDRESSES

Dorota Tumialis ⁽¹⁾ – e-mail: dorota_tumialis@sggw.pl

Iwona Skrzecz ⁽²⁾ – e-mail: I.Skrzecz@ibles.waw.pl

Anna Mazurkiewicz ⁽¹⁾ – e-mail: anna_mazurkiewicz@sggw.pl

Elżbieta Pezowicz ⁽¹⁾ – e-mail: elzbieta_pezowicz@sggw.pl

Katarzyna Góral ⁽³⁾ – e-mail: katarzyna_goral@sggw.pl

⁽¹⁾ Katedra Biologii Środowiska Zwierząt; SGGW w Warszawie; ul. Ciszewskiego 8; 02-786 Warszawa

⁽²⁾ Zakład Ochrony Lasu; Instytut Badawczy Leśnictwa; ul. Braci Leśnej 3; Sękocin Stary; 05-090 Raszyn

⁽³⁾ Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt; SGGW w Warszawie; ul. Ciszewskiego 8; 02-786 Warszawa

Wstęp

W obecnych dążeniach do ograniczania stosowania chemicznych metod w ochronie lasu przed owadami wiele uwagi poświęca się badaniom aktywności chorobotwórczych mikroorganizmów oraz parazytoidów, drapieżnych owadów i kręgowców redukujących liczebność szkodliwej entomofauny.

* Badania wykonane zostały w ramach grantu nr N N309 428838 finansowanego w latach 2010-2013 przez Narodowe Centrum Nauki.

Spośród owadów wyrządzających gospodarcze szkody w najmłodszych uprawach drzew iglastych szczególnie znaczenie mają gatunki zaliczane do rodzaju *Hylobius* (*Coleoptera: Curculionidae*), a przede wszystkim szeliniak sosnowiec *Hylobius abietis* (L.).

Zabezpieczanie upraw drzew iglastych przed chrząszczami szeliniaka sosnowca jest jednym z ważniejszych problemów ochrony lasu i dlatego w wielu krajach europejskich prowadzone są badania dotyczące biologicznych czynników ograniczających liczebność populacji tego szkodnika. W Austrii wykonano próby użycia grzyba *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill wobec szeliniaka sosnowca, uzyskując ponad 80% śmiertelność chrząszczy wyłącznie w warunkach laboratoryjnych [Wegensteiner, Fuhrer 1988]. Natomiast w Wielkiej Brytanii podjęto badania nad możliwościami użycia błonkówki *Bracon hylobii* Ratz., która w Szkocji i Irlandii Północnej powoduje w warunkach naturalnych spasożytowanie nawet do 50% populacji szeliniaka sosnowca [Henry, Day 2000; Faccoli, Henry 2003]. W latach 90. ubiegłego wieku w Polsce wykonano szereg badań z użyciem saprotroficznego grzyba *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich. rozkładającego drewno pniaków sosnowych *Pinus sylvestris* L. stanowiących bazę rozwojową szkodnika. Stwierdzono, że infekowanie pniaków grzybem *Ph. gigantea* ograniczało ich zasiedlanie przez szeliniaka, a rozwijająca się w pniakach grzybnia hamowała rozwój larw szkodnika wylęgających się z nielicznie złożonych jaj [Skrzecz, Moore 1997; Skrzecz 2001]. Metoda ta jednak nie znalazła zastosowania w krajach Europy Północnej ze względu na brak rodzimych szczepów grzyba *Ph. gigantea*.

Obecnie prace nad biologicznym zwalczaniem *H. abietis* koncentrują się na wykorzystaniu nicieni entomopatogenicznych (EPNs). W najszerszym zakresie badania te prowadzone są w Wielkiej Brytanii i Irlandii [Brixey i in. 2006; Dillon i in. 2006, 2007, 2008].

EPNs z rodzaju *Steinernema* i *Heterorhabditis* są obligatoryjnymi i letalnymi pasożytami szerokiego spektrum owadów, które przynajmniej w jednym ze stadiów związane są z glebą. Stadium larwy inwazyjno-przetrwalnikowej EPNs (IJs) związane jest symbiotycznie z bakteriami należącymi do rodzaju *Xenorhabdus* (nicienie z rodziny *Steinernematidae*) i *Photorhabdus* (nicienie z rodziny *Heterorhabditidae*). Larwy IJs po aktywnym wniknięciu do ciała owada gospodarza uwalniają w jego hemocelu symbiotyczne bakterie, które doprowadzają do śmierci żywiciela w przeciągu 24-48 godzin. Nicienie entomopatogeniczne mają ponadto wiele atrybutów doskonałego czynnika biologicznego zwalczania: są bezpieczne dla środowiska, mają wysoki potencjał reprodukcyjny, larwy inwazyjne tych nicieni mogą długo przetrwać w glebie po aplikacji w formie preparatu. Ponadto istnieje możliwość namnażania ich na sztucznych podłożach [Gaugler, Kaya 1990; Ehlers i in. 2000; Adams i in. 2006].

Wprowadzając preparaty biologiczne na bazie EPNs do upraw, należy jednak wziąć pod uwagę ich wpływ na różnorodność biologiczną. Jednym z głównych zagrożeń dla bioróżnorodności jest przenikanie gatunków obcych (ich planowe lub przypadkowe introdukcje), co często powoduje wypadanie gatunków rodzimych słabszych konkurencyjnie. Oprócz tego, że nicienie są trwałym elementem zróżnicowania biologicznego ekosystemów, są również ważnym czynnikiem kształtującym bioróżnorodność w obrębie zgrupowania entomofauny związanej ze środowiskiem glebowym. W związku z tym istotne w ochronie biologicznej powinno być stosowanie takich preparatów, które są oparte na bazie lokalnych gatunków nicieni.

W 2011 roku w Polsce rozpoczęto badania nad opracowaniem biologicznej metody redukcji szeliniaka sosnowca przy użyciu krajowych gatunków nicieni. Celem przedstawionych badań była ocena biologicznej aktywności rodzimych gatunków *Steinernema feltiae* (Filipjev) i *S. kraussei* (Steiner) wobec larw szeliniaka sosnowca w warunkach laboratoryjnych.

Material i metody

W lipcu 2012 roku na terenie Nadleśnictwa Celestynów, Leśnictwa Torfy (RDLP w Warszawie) odkopano i odcięto korzenie (średnica od 2 do 5 cm) 40 pniaków *P. sylvestris* powstałych po ścięciu 100-letnich drzew. Po przewiezieniu do laboratorium korzenie okorowano i pozyskano larwy szeliniaka sosnowca.

W doświadczeniu wykorzystano 3 szczepy reprezentujące 2 gatunki EPNs z rodzaju *Steinernema* wyizolowane jesienią 2011 roku z gleby pobieranej za pomocą sondy Egnera (średnica 2,5 cm) do głębokości 30 cm (tab. 1). Na każdą z próbek składały się 4 pobrania sondą i tak pozyskaną glebę mieszano w celu uzyskania próby jednorodnej dla danego miejsca. Glebę umieszczano w foliowych workach i przewożono do laboratorium.

W laboratorium EPNs izolowano metodą pułapek glebowych z żywą przynętą (larwy barciaka większego *Galeria mellonella* L.) [Bedding, Akhurst 1975]. Wyizolowane z *G. mellonella* larwy inwazyjne nicieni (IJs) były przechowywane w zawieszynie wodnej w temperaturze 4°C do momentu wykorzystania w doświadczeniu. Identyfikacji gatunkowej nicieni dokonano na podstawie kryteriów morfometrycznych [Poinar 1990; Adams, Nguyen 2002] i metodami genetycznymi w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.

Larwy szeliniaka sosnowca umieszczano w szalkach Petriego na bibule filtracyjnej w liczbie 10 larw/szalkę. Nicienie aplikowano na bibułę filtracyjną w dawce 100 IJs/larwę *H. abietis*, a następnie szalki umieszczano w komorze inkubacyjnej w temperaturze 20°C. Każdym ze szczepów zarażono po 50 larw szeliniaka (5 powtórzeń po 10 sztuk). Po 48 godzinach od zarażenia określano śmiertelność larw *H. abietis* (procent martwych larw). Martwe larwy *H. abietis* przenoszono do pustych szalek Petriego i umieszczano je na 24 h w komorze inkubacyjnej (20°C). Po tym okresie larwy poddawano sekcji i przy użyciu binokularu (powiększenie $\times 3-5$) określono:

- ekstensywność zarażenia (procent zarażonych larw w badanej próbie),
- intensywność zarażenia (liczba nicieni stwierdzona w jednej zarażonej larwie); do określenia średniej intensywności zarażenia wzięto pod uwagę tylko liczbę zarażonych larw.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu IBM SPSS Statistics 21. W celu określenia zależności pomiędzy szczepami/gatunkami a śmiertelnością i ekstensywnością zarażenia użyto testu niezależności chi-kwadrat. Natomiast do analizy intensywności zarażenia zastosowano nieparametryczny test sumy rang Kruskala-Wallisa. W przypadku stwierdzenia różnic istotnych statystycznie do porównania poszczególnych grup parami zastosowano test U Manna-Whitneya.

Tabela 1.

Gatunki i szczepy EPNs użyte w doświadczeniu
EPNs species and strains used in the study

Gatunek/Szczep	Miejsce izolacji	
	Opis lokalizacji	Współrzędne geograficzne
<i>Steinernema feltiae</i> Zag15	dolina rzeki Zwolenki	N51° 23' 10.482"
	(Puszcza Kozienicka)	E21° 33' 15.5412"
<i>Steinernema feltiae</i> K11	uprawa pszenicy	N50° 20' 5.5968"
	koło Katowic	E19° 2' 14.0388"
<i>Steinernema kraussei</i> 400d	roczna uprawa leśna w Nadl. Mińsk	N52° 18' 3.3163"
	Mazowiecki (RDLP w Warszawie)	E21° 41' 28.0737"

Wyniki

Śmiertelność dla wszystkich badanych szczepów była wysoka i wynosiła: *S. feltiae* K11 92%, *S. kraussei* 400d 96%, *S. feltiae* Zag15 do 100%. Przeprowadzona analiza nie wykazała różnic istotnych statystycznie ($p=0,125$).

W ekstensywności zarażenia nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p=0,715$) między gatunkami/szczepami. Ekstensywność dla wszystkich badanych gatunków/szczepów wahała się od 80 do 86%.

W wyniku przeprowadzonych badań określających intensywność zarażenia stwierdzono istotne różnice ($p<0,001$) między badanymi gatunkami/szczepami (tab. 2). Dodatkowo stwierdzono, że szczep *S. feltiae* Zag15 charakteryzuje się istotnie wyższą średnią intensywnością ($p<0,001$) w porównaniu do pozostałych szczepów nicieni. Pomiędzy szczepami *S. kraussei* 400D i *S. feltiae* K11 nie ma różnic istotnych statystycznie ($p=0,215$).

Dyskusja

Do badań laboratoryjnych, których celem było znalezienie wysoce patogennego szczepu nicieni owadobójczych wobec larw *H. abietis*, wytypowano 3 szczepy reprezentujące 2 gatunki: *S. kraussei* – gatunek typowo leśny, cechujący się dużą aktywnością w niskich temperaturach [Torr i in. 2007] oraz *S. feltiae* – najczęściej izolowany gatunek w Polsce, cechujący się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi, preferujący tereny łąkowe, sady, ogrody, pola uprawne, rzadziej stwierdzany w lasach liściastych [Hominick 1996; Mraček i in. 2005; Tóth 2006].

W prezentowanych badaniach uzyskano wysoką śmiertelność larw szeliniaka sosnowca (>90%) i ekstensywność zarażenia (>80%) dla wszystkich szczepów nicieni aplikowanych w dawce 100 IJs/larwę. Są to znacznie wyższe wartości niż uzyskane przez Torra i in. [2007], którzy przy zastosowaniu tej samej dawki nicieni *Steinernema carpocapsae* (Weiser) i *S. kraussei* wykazali około 47% śmiertelność larw *H. abietis*. Natomiast ponad 90% śmiertelność szeliniaka sosnowca autorzy ci stwierdzili po zarażeniu larw dawkami 500 IJs/larwę. We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach aktywność nicieni wyrażająca się ekstensywnością zarażenia larw *H. abietis* była zbliżona. Również Torr i in. [2007] nie stwierdzili różnic istotnych statystycznie w ekstensywności zarażenia pomiędzy badanymi gatunkami nicieni.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano istotną statystycznie różnicę w intensywności zarażenia badanymi szczepami. Szczep *S. feltiae* Zag15 charakteryzował się dwukrotnie wyższą intensywnością zarażenia niż *S. feltiae* K11 i *S. kraussei* 400D.

W większości przeprowadzonych do tej pory badań terenowych skuteczność zwalczania *H. abietis* po aplikacji nicieni entomopatogenicznych wahała się od 50 do 80% w zależności od zastosowanego gatunku, warunków i sposobu aplikacji.

Tabela 2.

Intensywność zarażenia larw *H. abietis* gatunkami/szczepami EPNs
Intensity of *H. abietis* larvae infestation with various EPNs species/strains

Gatunek/Szczep	N	Średnia	Odchylenie standardowe	Min	Max	χ^2	p	df
<i>S. kraussei</i> 400D	42	19,60	12,11	1,00	43,00	56,911	<0,001	2
<i>S. feltiae</i> K11	40	22,80	11,30	3,00	40,00			
<i>S. feltiae</i> Zag15	43	50,37	18,65	11,00	83,00			

Pierwsze próby redukcji szeliniaka sosnowca przy użyciu EPNs (*Neoplectana carpocapsae* Weiser) wykonano w Szwecji, uzyskując 50-60% śmiertelności larw [Pye 1979; Pye, Burman 1985]. Zastosowanie różnych gatunków nicieni z rodzajów *Steinernema* i *Heterorhabditis* na terenie Irlandii spowodowało 60-80% redukcję larw *H. abietis* [Dillon i in. 2006, 2007, 2008]. Badania terenowe wykonane w Szkocji wykazały redukcję liczebności larw szeliniaka sosnowca na poziomie 60% [Brixey i in. 2006; Torr i in. 2007].

Pierwsze próby zastosowania preparatów komercyjnych na bazie nicieni entomopatogenicznych w Polsce dały stosunkowo niską skuteczność redukcji szkodnika, maksymalnie na poziomie 44,2% [Skrzecz i in. 2011]. Zakładając, że wyniki terenowe są niższe od testów laboratoryjnych o 15-29% [Torr i in. 2007], można przypuszczać, że zastosowanie w terenie rodzimych szczepów, a zwłaszcza *S. feltiae* Zag15, może dać lepsze wyniki niż zastosowanie preparatów komercyjnych.

Literatura

- Adams B. J., Fodor A., Koppenhöfer H. S., Stackebrandt E., Stock S. P., Klein M. G. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37: 32-49.
- Adams B. J., Nguyen K. B. 2002. Taxonomy and systematic. W: Gaugler R. [red.]. *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK, CABI Publishing. 1-33.
- Bedding R. A., Akhurst R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110.
- Brixey J. M., Moore R., Milner A. 2006. Effect of entomopathogenic nematode (*Steinernema carpocapsae* Weiser) application technique on the efficacy and distribution of infection of the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) in stumps of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Carr.) created at different times. *Forest Ecology and Management* 226: 161-172.
- Dillon A. B., Downes M. J., Ward D., Griffin Ch. T. 2007. Optimizing application of entomopathogenic nematodes to manage large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (*Coleoptera: Curculionidae*) populations developing in pine stumps, *Pinus silvestris*. *Biological Control* 40 (2): 253-263.
- Dillon A. B., Moore C. P., Downes M. J., Griffin C. T. 2008. Evict or infect? Managing populations of the large pine weevil, *Hylobius abietis*, using a bottom-up and top-down approach. *Forest Ecology and Management* 255: 2634-2642.
- Dillon A. B., Ward D., Downes M. J., Griffin Ch. T. 2006. Suppression of the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) (*Coleoptera: Curculionidae*) in pine stumps by entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. *Biological Control* 38: 217-226.
- Ehlers R.-U., Niemann I., Hollmer S., Strauch O., Jende D., Shanmugasundaram M., Mehta U. K., Easwaramoorthy S. K., Burnell A. 2000. Mass production potential of the bacteriohelminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica* - *Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Science and Technology* 10: 607-616.
- Faccoli M., Henry C. J. 2003. Host location by chemical stimuli in *Bracon hylobii* (Ratzeburg) (*Hymenoptera: Braconidae*), a larval parasitoid of *Hylobius abietis* (L.) (*Coleoptera: Curculionidae*). *Annales de la Société Entomologique de France* 39 (3): 247-256.
- Gaugler R., Kaya H. K. 1990. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL. 93-116.
- Henry C. J., Day K. R. 2000. Egg allocation by *Bracon hylobii* Ratz., the principal parasitoid of the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.), and implications for host suppression. *Agricultural and Forest Entomology* 3 (1): 11-18.
- Hominick W. M., Reid A. P., Bohan D. A., Briscoe B. R. 1996. Entomopathogenic Nematodes: Biodiversity, Geographical Distribution and the Convention on Biological Diversity. *Biocontrol Science and Technology* 6: 317-331.
- Mráček Z., Bečvář S., Kindlmann P., Jersáková, J. 2005. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control* 34: 27-37.
- Poinar G. O. 1990. Biology and taxonomy of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. W: Gaugler R., Kaya H. K. [red.]. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press Boca Raton, FL. 23-58.
- Pye A. E. 1979. Preliminary field trial of the nematode *Neoplectana carpocapsae* against larvae of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (*Coleoptera, Curculionidae*). *Annales Entomologici Fennici* 45: 3.
- Pye A. E., Burman M. 1985. Different application of the insect parasitic nematode *Neoplectana carpocapsae* to control the large pine weevil, *Hylobius abietis*. *Nematologica* 31: 109-116.
- Skrzecz I. 2001. Large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) abundance and the extent of damage in plantations established on clearcuts with pine stumps treated with the fungus *Phlebiopsis gigantea* (Fr.: Fr.) Jülich. *Folia Forestalia Polonica, Series A-Forestry* 43: 137-151.

- Skrzecz I., Moore R. 1997. The attractiveness of pine branches infected with selected wood-colonising fungi to the large pine weevil (*Hylobius abietis*). W: Gregoire J. C., Liebhold A. M., Stephen F. M., Day K. R., Salom S. M. [red.]. Integrating cultural tactics into the management of bark beetle and reforestation pests. September 1-3, 1996, Vallombrosa, Italy, 146-152.
- Skrzecz I., Pezowicz E., Tumialis D. 2011. Effect of the timing of application on efficacy of entomopathogenic nematodes in control of *Hylobius abietis* (L.). IOBC/WPRS Bulletin 66: 339-342.
- Torr P., Heritage S., Wilson M. J. 2007. *Steinernema kraussei*, an indigenous nematode found in coniferous forests: efficacy and field persistence against *Hylobius abietis*. Agricultural and Forest Entomology 9: 181-188.
- Tóth T. 2006. Collection of entomopathogenic nematodes for the biological control of insect pests. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 14 (3): 225-230.
- Wegensteiner R., Fuhrer E. 1988. Zur wirksamkeit von *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Gegen *Hylobius abietis* L. (*Col. Curculionidae*). Entomophaga 33 (30): 339-348.

SUMMARY

Sensitivity of *Hylobius abietis* (L.) larvae on native species and isolates of entomopathogenic nematodes

Protection of coniferous forest plantation against the beetles of the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) is one of the most important problems and, therefore, in many European countries research on biological factors limiting the population of this pest is being conducted. Currently, the studies on the biological control of *H. abietis* concentrate on the use of entomopathogenic nematodes. The most extensive research is carried out in the UK and Ireland.

The aim of this study was to evaluate the biological activity of the native species of entomopathogenic nematodes from *Steinernema* spp. used against the large pine weevil larvae in the laboratory conditions.

For the experiment, 150 larvae of *H. abietis* were collected from *Pinus silvestris* (L.) stumps. The insects were parasitized by 3 isolates of nematodes obtained from the soil in Central and South Poland: 2 of *Steinernema feltiae* (Filipjev) and 1 of *S. kraussei* (Steiner). Ten larvae were placed on filter paper in a Petri dish and then nematodes were applied at a dose of 100 invasive juveniles/ larva of *H. abietis*. Each of the strains was inoculated in 50 larvae. Biological activity of nematodes was determined based on larval mortality, as well as extensivity and intensity of infection.

There were no statistical differences between the mortality ($p=0.1250$) of larvae and extensivity of infection ($p=0.7150$) caused by nematodes. The insect mortality for all isolates of nematodes was high and ranged from 92 to 100%. Also the extensivity of infection for each isolates reached 80-86%. However the statistical differences were obtained for intensity of infection ($p<0.001$) which was the highest, compared to other isolates, for *S. feltiae* Zag15 originated from central Poland.