

HENRYK MALINOWSKI

## Możliwości ochrony lasu przed owadami uszkadzającymi systemy korzeniowe metodą biologiczną z wykorzystaniem entomopatogennych nicieni i bakterii

Possibility of forest protection against insects damaging root systems with the use of biological method based on entomopathogenic nematodes and bacteria

### ABSTRACT

Malinowski H. 2011. Możliwości ochrony lasu przed owadami uszkadzającymi systemy korzeniowe metodą biologiczną z wykorzystaniem entomopatogennych nicieni i bakterii. Sylwan 155 (2): 104-111.

The paper presents the mechanism of insects infection with entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis*) and bacteria, their infectivity and survival in the environment and efficacy, mainly against *Melolontha* spp. white grubs.

### KEY WORDS

entomopathogenic nematodes, entomopathogenic bacteria, *Melolontha* spp, efficacy

### ADDRESSES

Henryk Malinowski – e-mail: H.Malinowski@ibles.waw.pl

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

## Wprowadzenie

Wykrycie w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku negatywnych skutków stosowania chemicznych insektycydów spowodowało szersze zainteresowanie się biologicznymi czynnikami redukcji szkodliwych owadów, między innymi owadobójczymi grzybami, nicieniami i bakteriami. Obecnie wykorzystanie tych metod redukcji populacji szkodliwych owadów nabiera szczególnego znaczenia w związku z koniecznością ograniczenia stosowania środków chemicznych zgodnie z wymaganiami Unii Europejskiej. W poprzednich publikacjach Malinowskiego [2009, 2010] opisano możliwości wykorzystania grzybów entomopatogennych w ochronie lasu przed owadami uszkadzającymi systemy korzeniowe, zwłaszcza pędrakami chrabąszczy, które stanowią poważny problem gospodarczy. Niniejsza praca dotyczy redukcji populacji szkodników korzeni za pomocą entomopatogennych nicieni i bakterii i opisuje mechanizm zakażenia szkodliwych owadów tymi organizmami, ich infekcyjność i trwałość w środowisku oraz skuteczność.

## Entomopatogenne nicienie

Nicienie wielu rodzajów mogą infekować żywe owady. Szczególną przydatność wykazują nicienie owadobójcze z rodzajów *Steinernema* (*Steinernematidae*) żyjące w symbiozie z bakteriami z rodzaju *Xenorhabdus* (*Enterobacteriaceae*) [Thomas, Poinar 1979] i *Heterorhabditis* (*Heterorhabditidae*) żyjące w symbiozie z bakteriami z rodzaju *Photorhabdus* [Boemare i in. 1993]. Nicienie były szeroko badane jako biologiczne czynniki kontroli wielu gatunków szkodliwych owadów [Poinar 1975,

1979]. Badania te wykazały, że około 250 gatunków owadów z 10 rzędów było wrażliwych na nicienie *Steinernema feltiae* (Filipiew). Szczególnie wrażliwe były larwy chrząszczy.

### Mechanizm porażania owadów przez nicienie

Mechanizm porażania owadów przez nicienie polega na tym, że infekcyjne formy, czyli żyjące w glebie larwy trzeciego stadium, przedostają się do organizmu gospodarza w wyniku aktywnej penetracji, najczęściej przez naturalne otwory (gębowy, odbytowy, przetchlinki). Następnie przenikają one przez jelito lub ściany tchawek żywiciela do hemocelu, czyli jamy ciała, gdzie uwalniają symbiotyczne bakterie, które powodują chorobę zwaną septicemią i śmierć owada. Najważniejszą rolę w redukcji owadów odgrywają więc nie nicienie, lecz symbiotyczne z nimi bakterie. Infekcyjne larwy trzeciego stadium nicieni noszą swe bakteryjne symbionty w jelicie [Bird, Akhurst 1983] i wydzielają je do jamy ciała zaatakowanego owada. Jednocześnie bakterie te wydzielają tam produkty korzystne dla nicieni, powodujące zablokowanie systemu immunologicznego owadów. Ponadto omawiane bakterie produkują antybiotyki uniemożliwiające rozwój innych mikroorganizmów w martwych owadach [Akhurst 1982]. Owady porażone przez nicienie giną zazwyczaj w ciągu kilku, kilkunastu godzin. Nicienie natomiast namnażają się i opanowują martwego owada przed zejściem do gleby, gdzie szukają nowej ofiary [Morris 1985].

### Infekcyjność i trwałość nicieni w środowisku

Na infekcyjność i trwałość nicieni w środowisku, podobnie jak w przypadku innych żywych organizmów, wpływa szereg czynników związanych z jednej strony z ich właściwościami (zdolność do aktywnego wyszukiwania żywiciela i wniknięcia do jego organizmu), z drugiej natomiast z właściwościami żywiciela (jego podatności na wnikanie nicieni wynikającej z sił obronnych determinowanych stanem fizjologicznym, zróżnicowaniem wrażliwości stadiów rozwojowych, barierami ochronnymi itp.) i czynnikami środowiska (głównie wilgotnością i temperaturą).

Przywabiane przez wydzieliny owadów nicienie są w stanie aktywnie poszukiwać żywiciela w glebie, zlokalizować go i wniknąć do jego ciała [Isibashi, Kondo 1990]. Badania Villani'ego [1994] wykazały, że aktywność nicieni *Heterorhabditis bacteriophora* i ich migracja w glebie zależała od obecności, gęstości i dystrybucji pędraków popili japońskiej, a na aktywność pędraków oddziaływała również obecność wymienionych nicieni. Jak wspomniano wyżej, jedną z cech nicieni wpływających na ich infekcyjność jest zdolność aktywnego wyszukiwania żywiciela i wtargnięcie do jego organizmu. W wyniku selekcji genetycznej uzyskano szczepy nicieni entomopatogennych o zwiększonej aktywności penetracyjnej przez naturalne otwory owadów lub bezpośrednio przez skórę. Na przykład aktywność penetracyjna *H. megidis* (szczep HSH3) w stosunku do larw barciaka większego (*Galeria mellonella*) wzrosła z 4,8 do 18,4%, a w stosunku do *Phyllopertha horticola* – z 5,8 do 17,6% [Sulistyanto i in. 1996]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku *H. bacteriophora*.

Jednym z głównych czynników ograniczających stosowanie nicieni *Heterorhabditis* spp., które w wielu przypadkach są bardziej efektywne 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]. Zmniejszenie się rezerw pokarmowych, takich jak tłuszcze, ogranicza ich żywotność. Obniżenie zawartości lipidów poniżej 10% prowadziło do małej ruchliwości nicieni i małej zdolności do infekowania owadów [Vanninen 1990]. Należy nadmienić, że *Heterorhabditis* spp. w przeciwieństwie do *Steinernema* spp. nie mogą być hodowane bez swych symbiotycznych bakterii *Photorhabdus luminescens*. Bakterie te stanowią źródło pokarmu dla swych nicieni, niezbędne do ich rozwoju i reprodukcji.

Wrażliwość entomopatogennych nicieni na ekstremalne czynniki środowiska jest przeszkodą w wykorzystaniu ich pełnego potencjału jako biologicznego czynnika kontroli szkodliwych owadów. Szczególnie niebezpieczne dla nich czynniki to wysoka temperatura, susze i promieniowanie słoneczne, powodujące zanik ich żywotności i nieskuteczność w warunkach terenowych. Przeprowadzono z pozytywnym skutkiem szereg doświadczeń, mających na celu wyprowadzenie szczepów nicieni zmienionych genetycznie w kierunku zwiększonej tolerancji na ekstremalne czynniki środowiska. Metodą selekcji uzyskano szczepy tolerujące wysoką temperaturę. Między innymi wyselekcjonowano z naturalnej populacji *H. bacteriophora* nowy szczep (IS5), charakteryzujący się tolerancją na wysoką temperaturę, przy czym cecha ta jest uwarunkowana genetycznie [Shapiro i in. 1991]. Infekcyjność i potencjał reprodukcyjny nowego szczepu nicieni były wyższe lub zbliżone do szczepu porównawczego [Glaser i in. 1991].

### Skuteczność nicieni w redukcji populacji pędraków

Przeprowadzono wiele badań laboratoryjnych i terenowych nad efektywnością działania biopreparatów zawierających nicienie entomopatogenne w stosunku do różnych gatunków owadów. Lacey i in. [1994] podają, że badania polowe nad aktywnością nicieni z rodzaju *Steinernema*, szczególnie *S. glaserii*, w odniesieniu do pędraków popilii japońskiej (*Coleoptera; Scarabaeidae*) były bardzo obiecujące zarówno w sensie redukcji populacji pędraków, jak i trwałości stadium inwazyjnego nicieni w różnych warunkach na wyspie Terceira (Azory). Redukcja pędraków wynosiła w większości przypadków 80-100% w stosunku do kontroli. Nie wszystkie doświadczenia opisane przez Lacey'a i in. [1994] dały tak wysoki poziom redukcji pędraków. Ekstremalnie suche lato w 1991 roku było przyczyną słabej skuteczności biopreparatów nicieniobójczych stosowanych tej wiosny. Na szczęście na większości doświadczeń stwierdzono zainfekowane nicieniami pędraki, co świadczy, że rozwój nicieni był możliwy mimo niekorzystnych warunków. Kontrola przeprowadzona w maju 1992 roku wykazała, że efektywne kontynuowanie redukcji populacji pędraków było możliwe po jednorazowej aplikacji nicieni. Najbardziej efektywne było podlewanie darni płynnymi kulturami nicieni. Redukcja pędraków przy tej metodzie wynosiła 56-94%.

W badaniach laboratoryjnych w Kalifornii [Kaya i in. 1994] wykazano, że pędraki *Cyclocephala hirta* (*Coleoptera; Scarabaeidae*) zainfekowane bakteriami *Bacillus popilliae* były bardziej wrażliwe na nicienie *H. bacteriophora* i *S. glaserii*. Przy stosowaniu nicieni zaobserwowano istotne różnice w śmiertelności pędraków zainfekowanych wymienionymi bakteriami w porównaniu do śmiertelności pędraków kontrolnych. W pierwszym przypadku nicienie zniszczyły ponad 78% pędraków, w drugim – poniżej 55%. W Niemczech [Ehlers i in. 1996] przeprowadzono w maju 1994 roku doświadczenia z płynnymi kulturami *H. megidis* i *H. bacteriophora*. Stosowano larwy inwazyjne wymienionych nicieni w liczbie 0,5 i 1,5 mln/m<sup>2</sup> przeciwko pędrakom *Phyllopertha horticola* i *Aphodius* sp. na polach golfowych. 42 dni po stosowaniu *H. megidis* skuteczność w stosunku do pędraków *Aphodius* sp. wynosiła 40 i 53% odpowiednio przy niższej i wyższej dawce. Po 29 dniach od aplikacji *H. bacteriophora* śmiertelność pędraków obu badanych gatunków owadów wynosiła 55-62%. W sierpniu redukcja populacji pędraków *P. horticola* spowodowana przez *H. megidis* wynosiła 52 i 70%. We wrześniu redukcja pędraków 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 populacji pędraków *Aphodius* sp., natomiast na poletkach traktowanych *H. megidis* wystąpiły znaczne szkody, gdyż nicienie te nie przetrwały w glebie. Zimmermann [1992] podaje, że w badaniach laboratoryjnych z nicie-

niami z rodzajów *Steinernema* i *Heterorhabditis*, użytymi do redukcji pędraków chrabąszcza majowego we Francji, osiągnięto śmiertelność na poziomie 80-100%, natomiast w doświadczeniach terenowych w latach 1989-1990 uzyskano niezadowalające wyniki. W badaniach przeprowadzonych na łąkach doliny Aosta (Włochy) biopreparat handlowy Biovector zawierający nicienie *Steinernema carpocapsae*, stosowany w stężeniu 250-500 tysięcy nicieni/m<sup>2</sup>, powodował śmiertelność pędraków chrabąszcza majowego na poziomie 60-80% [Zimmermann 1992]. W Holandii [Vlug 1996] wykonano doświadczenia laboratoryjne nad zastosowaniem *Steinernema glaserii* (szcep 326) w ograniczaniu liczebności 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 S1 powodowała 90%, a generacja S2 – 100% śmiertelności. Natomiast badania polowe nad zastosowaniem nicieni *S. glaserii* i *Heterorhabditis* sp. w ograniczaniu liczebności pędraków chrabąszczy nie dały pozytywnych wyników; larwy infekcyjne stosowane w liczbie 250 tys./m<sup>2</sup> znikły z nieznanymi przyczynami z gleby w krótkim okresie.

W Polsce badania nad wykorzystaniem nicieni owadobójczych do zwalczania pędraków chrabąszczowatych prowadzone są od dawna, jednak przeciwko najbardziej szkodliwym pędrakom chrabąszcza majowego (*Melolontha melolontha*), chrabąszcza kasztanowca (*Melolontha hippocastani*) i guniaka czerwcyzka (*Amphimallon solstitiale*) uzyskano tylko ograniczoną skuteczność [Lipa i in. 2010]. Pozytywne wyniki uzyskano przy stosowaniu nicieni entomopatogenicznych do zwalczania ogrodnicy niszczylistki (*Phyllopertha horticola*) [Kowalska 2003]. Wrażliwe okazały się również gąsienice rolnicy czopówki (*Agrotis exclamationis*) na nicienie *Heterorhabditis megidis* [Kowalska, Jakubowska 2006]. Mniejszą wrażliwością na nicienie owadobójcze charakteryzowały się gąsienice rolnicy zbożówki (*Agrotis segetum*) [Kowalska, Jakubowska 2007].

### **Prawdopodobne przyczyny niepowodzeń w stosowaniu nicieni przeciwko pędrakom chrabąszczy**

Trudności w infekowaniu pędraków przez nicienie wynikają z mechanizmów obronnych poszczególnych gatunków owadów, przeciwko którym zostały one użyte. Pędraki posiadają bardzo dobrze rozwinięty system immunologiczny, zdolny do unieszkodliwiania nicieni i ich symbiontów, przy czym właściwość ta jest zróżnicowana w zależności od gatunku. Pędraki ogrodnicy niszczylistki zamierają po iniekcji czterech przedstawicielami nicieni *Heterorhabditis* spp., a wstrzyknięcie pędrakom guniaka czerwcyzka do 16 wymienionych nicieni/osobnika nie powoduje żadnej śmiertelności. Natomiast wstrzyknięcie nicieni pędrakom *Melolontha melolontha* powoduje bardzo intensywną reakcję melanizacji i zamieranie wszystkich osobników [Smith 1992]. Ponadto skóra pędraków jest twarda, a naturalne otwory są dobrze pokryte szczecinkami i drobnymi włoskami lub siateczkami, co w dużym stopniu chroni owady przed wtargnięciem pasożytów. Pędraki występują w glebie w strefie dużego zagęszczenia korzeni roślin, co może utrudniać nicieniom ich znalezienie. Są również 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 szybkie ruchy, pędraki zrzucają nicienie ze swego ciała, a następnie szybko uciekają z miejsc, w których one występują [Schroeder i in. 1993]. Tym można częściowo tłumaczyć różnice między wynikami doświadczeń laboratoryjnych i polowych.

Pędraki chrabąszczy mogą również aktywnie niszczyć larwy inwazyjne nicieni, jak to opisano w przypadku popilii japońskiej [Gaugler i in. 1994]. Wnikające przez otwór gębowy pędraków larwy infekcyjne nicieni są niszczone przez ich żuwaczki. Potwierdzają to pośrednio

badania Kowalskiej [2004], w których stosowano wybrane izolaty nicieni *Steinernema arenarium*, *S. arenarium*, *S. glaseri*, *S. glaseri*, *Steinernema* sp. oraz jako owady pułapkowe gąsienice *Galeria mellonella* i pędraki *M. melolontha* w stadium L3. Do pojemników z wilgotnym, sterylnym torfem wkładano pędraki, a po 24 godzinach na powierzchnię torfu наносono nicienie w dawce 1 milion/m<sup>2</sup>. Po upływie 5 godz. pędraki usuwano, a na ich miejsce wprowadzono gąsienice *G. mellonella*, które wyjmowano po 72 godz. i poddawano sekcji pod mikroskopem elektronowym oraz określano liczebność nicieni. W kombinacji kontrolnej jako owady pułapkowe stosowano tylko gąsienice *G. mellonella*. Przed omawianiem wyników tych doświadczeń należy podać, że zgodnie z danymi literaturowymi [m.in. Hominic, Reid 1990] tylko około 40% nowego pokolenia larw infekcyjnych nicieni z rodziny *Steinernematidae* jest zdolnych do natychmiastowego rozpoczęcia procesu infekowania owadów, natomiast pozostała część nabiera tej zdolności dopiero po pewnym czasie. Z badań Kowalskiej [2004] wynika, że populacje stosowanych izolatów nicieni zawierały różną liczbę larw zdolnych do natychmiastowego infekowania pędraków chrabąszczy. Najwięcej larw nicieni szczególnie aktywnych w stosunku do pędraków chrabąszczy, które zostały zniszczone przez te pędraki w czasie prób ich infekowania, stwierdzono w populacjach *S. glaseri* i *S. arenarium*. Szybka eliminacja z populacji najaktywniejszych larw infekcyjnych nicieni przez pędraki może być przyczyną często obserwowanych niepowodzeń w praktycznym ich stosowaniu.

### Entomopatogenne bakterie

Jednym z możliwych czynników biologicznej kontroli pędraków chrabąszczowatych są bakterie. *Bacillus popilliae* została po raz pierwszy opisana przez Dutky'ego [1940] jako patogen pędraków popilii japońskiej. Jest to formująca spory, fakultatywna anaerobowa bakteria, która tworzy podczas sporulacji parasporalne kryształki białkowe, pozostające w sporangium (komórce bakterii). *B. popilliae* jest obligatoryjnym patogenem pędraków *Scarabaeidae*, tzn. takim, który jest przystosowany do jednego lub najwyżej kilku spokrewnionych żywicieli i może się rozmnażać jedynie kosztem żywych komórek [Bulla i in. 1978]. W przypadku zjedzenia sporangium tej bakterii przez pędraki, spory kiełkują w jelicie, następnie przenikają przez nabłonek i przedostają się do hemolimfy, gdzie następuje sporulacja [Kawanishi i in. 1978]. Końcowa przyczyna padania pędraków nie jest znana, ale za istotne uważa się zmniejszenie ciał tłuszczowych w organizmie i ogólne osłabienie.

Bakteria *B. popilliae* subsp. *Melolontha* została po raz pierwszy wyizolowana z pędraków chrabąszcza majowego przez Hurpina i Vago [1958]. Bakteria ta, stwierdzana w warunkach naturalnych w wielu populacjach pędraków różnych gatunków *Scarabaeidae*, wykazywała długotrwałą efektywność w ograniczaniu populacji popilii japońskiej. W warunkach naturalnych obserwowano niekiedy bardzo wysoki poziom zainfekowania pędraków. Na przykład w Kalifornii obserwowano infekcję pędraków *Cyclocephala hirta* na poziomie 71% [Kaya i in. 1994]. Nowy izolat *B. popilliae* subsp. *Melolontha* HD-1, opisany w Niemczech [Franken i in. 1996], był badany pod kątem przydatności do zwalczania pędraków chrabąszcza majowego. Omawiany izolat tylko w dużych dawkach (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>/pędraka) powodował chorobę mleczną u 20-25% osobników. Podobne wyniki uzyskano podając doustnie 10<sup>8</sup> sporangiów/pędraka popilii japońskiej. Uzyskany niski poziom infekcji był związany ze słabym kiełkowaniem spor. Omawiany izolat okazał się mało efektywnym czynnikiem kontroli pędraków *Scarabaeidae* (obecnie *Melolonthidae*).

Bakterie z rodzaju *Serratia* (*Entomobacteriaceae*) były również badane pod kątem ich przydatności do ograniczania populacji pędraków, gdyż były często izolowane z chorych i martwych larw różnych gatunków owadów, w tym z pędraków *Melolontha* spp. Jednak ich rola w pato-

genezie nie została do końca wyjaśniona. Badania wykazały, że niektóre izolaty powodowały u pędraków chrabąszcza kasztanowca efekt antyfidantny [Jackson, Zimmermann 1996]. Efekt ten był trwały, gdyż pędraki przeniesione na świeży, nietraktowany bakteriami pokarm, nie wznawiały żerowania i zamierały przed przepoczwarczeniem. Efekt antyfidantny i reakcja patologiczna są związane ze specyficznością działania poszczególnych szczepów tych bakterii.

W 1990 roku zarejestrowano w Nowej Zelandii biopreparat Inwade, oparty na bakterii *Serratia entomophila*, przeznaczony do ograniczania populacji pędraków *Costelytra zealandica* [Jackson 1994]. Preparat ten daje pozytywne wyniki i jest uważany za bardzo skuteczny czynnik redukujący populację pędraków wymienionego gatunku owadów.

Prowadzi się badania poszukiwawcze nad wykryciem nowych szczepów *Bacillus thuringiensis*, aktywnych wobec pędraków *Melolonthidae*. Wykryto szereg szczepów aktywnych wobec larw *Lepidoptera*, *Coleoptera* i owadów z innych rzędów, włączając takie szkodniki korzeni jak *Diabrotica* sp., *Popilia japonica* [Felteison 1994]. Niestety nie znaleziono izolatu aktywnego wobec pędraków chrabąszczy *Melolontha* spp. W Japonii [Sato i in. 1994] wyizolowano nowy szczep *B. thuringiensis* o nazwie Buibui, działający na wiele gatunków *Melolonthidae*, za wyjątkiem jednak pędraków *Melolontha* spp. Wydaje się, że możliwości znalezienia odpowiedniej bakterii przeciwko tym chrabąszczom są niewielkie. Obecnie badania są ukierunkowane na wykrycie bakterii przydatnych do zwalczania patogenów odlegbowych – sprawców chorób [Saniewska i in. 1998; Stachowiak i in. 2007].

## Podsumowanie

Nicienie mają wiele cech, które czynią z nich jeden z głównych, potencjalnych czynników biologicznej kontroli pędraków, w tym pędraków chrabąszczy *Melolontha* spp. Mogą niszczyć pędraki wielu gatunków owadów oraz mogą być masowo produkowane i nie jest wymagana ich rejestracja. Nicienie zdolne zabić pędraki muszą efektywnie wyszukać żywiciela, wtargnąć do niego i zniszczyć jego system immunologiczny. Pędraki chrabąszczy są trudnym obiektem do zwalczania. Żyją w glebie w okresie 3-4-letnim i mają odpowiednie mechanizmy obronne przeciwko nicieniom zaadaptowały się do współżycia z nimi. Mechanizmy obronne pędraków są głównymi przeszkodami w stosowaniu tych czynników biologicznej kontroli owadów na szerszą skalę. Wyniki wskazują, że w odniesieniu do niektórych obiektów będzie to możliwe. Bakterie, zwłaszcza z rodzaju *Serratia* (*Entomobacteriaceae*), mają zastosowanie do redukcji populacji pędraków tylko niektórych gatunków owadów. Jednakże wykorzystanie ich do zwalczania pędraków *Melolontha* spp. w najbliższych latach wydaje się mało realne.

## Literatura

- 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.
- Bird A. F., Akhurst R. J. 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family *Sterneinematidae*. 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.
- Bulla L. A., Costilow R. W., Sharpe E. S. 1978. Biology of *Bacillus popilliae*. Adv. App. Microbiol. 23: 1-18.
- Dutky S. R. 1940. Two new spore-forming bacteria causing milky disease of the Japanese beetle larvae. J. Econ. Entomol. 34: 217-218.
- Ehlers R. V., Sulistyanto D., Marini J. 1996. Control of scarabaeid larvae in golf course turf with *Heterorhabditis megidis* and *H. bacteriophora*. IOBC/WPRS Bulletin 19 (9): 84-85.
- Felteison J. S. 1994. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. Proc. Of VI Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbiol. Control. 28 Aug. – 2 Sept. 1994, Montpellier, France 1: 184.



- Franken E., Krieger L., Schnetter W. 1996. *Bacillus popilliae*: a difficult pathogen. IOBC/WPRS Bulletin 19 (2): 40-45.
- Gaugler R., Wang Y., Cambell J. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popilia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. J. Invert. Pathology 64:193-199.
- 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.
- Hominick W., Reid A. 1990. Perspectives of entomopathogenic nematology. W: Gaugler R., Kaya H. [red.]. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton. 327-345.
- Ishibashi N., Kondo E. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. W: Gaugler R., Kaya H. [red.]. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton
- Jackson T. A. 1994. Progress in bacterial control of grass grub using Invade, a commercial biocotrol. Proc. VI Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug.-2 Sept. 1994, Montpellier, France 1: 401-406.
- Jackson T. A., Zimmermann G. 1996. Is there a role for *Serratia* spp. in the biocontrol of *Melolontha* spp. IOBD/WPRS Bulletin 19 (2): 47-53.
- 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., 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 the VI Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. – 2 Sept. 1994, Montpellier (France) 1: 395-400.
- Kowalska J. 2003. Śmiertelność pędraków *Phyllopertha horticola* przy łącznym stosowaniu *Heterorhabditis megidis* i diazynonu. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 43 (2): 735-740.
- Kowalska J. 2004. Wpływ chrabąszcza majowego *Melolontha melolontha* na liczebność aktywnych larw infekcyjnych w populacjach izolatów *Steinernema* spp. Prog. Plant Protection/Post Ochr. Roślin 44 (2): 857-860.
- Kowalska J., Jakubowska M. 2006. Ocena wrażliwości *Agrotis exclamationis* L. na wybrane gatunki nicieni owadobójczych. Prog. Plant Protection/Post Ochr. Roślin 46 (2): 349-351.
- Kowalska J., Jakubowska M. 2007. Ocena wrażliwości rolnicy zbożówki (*Agrotis segetum* Den & Schiff.) na wybrane gatunki nicieni owadobójczych w różnych warunkach. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 47 (4): 172-175.
- 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 VI Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. – 2 Sept., 1994, Montpellier (France) 1: 409-415.
- Lipa J. J., Fiedler Ž., Sosnowska D., Tomalak M. 2010. Znaczenie Sesji Naukowych Instytutu Ochrony Roślin w rozwoju biologicznej ochrony roślin. W: 50 lat Sesji Naukowych IOR (1961-2010). Wyd. Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. 107-139.
- Malinowski H. 2009. Możliwości ochrony lasu przed owadami uszkadzającymi systemy korzeniowe metodą biologiczną z wykorzystaniem grzybów entomopatogennych. I. Mechanizm zakażenia owadów grzybami entomopatogennymi i czynniki wpływające na infekcję. Sylwan 153 (12): 795-804.
- Malinowski H. 2010. Możliwości ochrony lasu przed owadami uszkadzającymi systemy korzeniowe metodą biologiczną z wykorzystaniem grzybów entomopatogennych. II. Skuteczność bioinsektycydów grzybowych w ograniczaniu liczebności pędraków chrabąszczy (*Melolontha* spp.) i innych szkodników korzeni. Sylwan 154 (1): 15-23.
- Morris O. N. 1985. Susceptibility of 31 species of agricultural insect pests to the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Can Entomol. 117: 401-407.
- Poinar G. O. 1975. Entomopathogenous nematodes – a manual and host list of insect nematode associations. Brill, Leiden.
- Poinar G. O. 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton.
- Saniewska A., Orlikowski L. B., Wojdyła A. T., 1988. Wykorzystanie *Bacillus polymyxa* w zwalczaniu patogenów doglebowych i nalistnych. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 38 (1): 198-203.
- Sato R., Sugimura M., Tani R., Takeuchi K., Ogiwara K., Minami M., Suzuki N., Kaji Y., Hori H., Assano S., Ohba M., Iwahana H. 1994. A novel scarabeid delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* serowar japonensis strain buibui. Proc. of the VI Intern. Colloq. on Invert. Pathol. and Microbial Control. 28 Aug. – 2 Sept. 1994, Montpellier, France 1: 177-179.
- Schroeder P. C., Villani M. G., Ferguson 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 microsoms. 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.
- Smits P. H. 1992. Control of white grubs, *Phyllopertha horticola* and *Amphimallon solstitialis*, in grass with *Heterorhabditis* nematodes. W: Glare T. R., Jackson T. A. [red.]. Use of pathogens in scarab pest management. Intercept, Andover, UK. 229-235.
- Stachowiak B., Trojanowska K., Gulewicz K. 2007. Fungistatyczne oddziaływanie szczepu *Bacillus coagulans* w porównaniu z oddziaływaniem wybranych fungicydów. Prog. Plant Protection/Post Ochr. Roślin 47 (2): 338-342.

- Sulistyanto 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.
- Tiilikala K. A. 1992. Influence of soil temperature on initial energy reserves of *Globrotera rostochiensis* larvae. Fundamental Applied Nematology 15 (1): 49-54.
- 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.
- Villani M. G. 1994. Behavioral response of scarabs to inundative release of entomopathogens in turfgrass mesocosm: implications for consistent results in the field. Proc. VI Intern. Colloq. on Invert. Path. and Microbial Control, 28 Aug.– 2 Sept. 1994, Montpellier (France) 1: 417-423.
- Zimmermann G. 1992. Maikafer – Tangung 21-23 November 1991. Versuchszentrum Laimburg/Italien. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz 44: 91-93.

## SUMMARY

### Possibility of forest protection against insects damaging root systems with the use of biological method based on entomopathogenic nematodes and bacteria

Entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. show the promising properties from the point of view of *Melolonthidae* white grubs control. They destroy white grubs of wide range of species, effectively locate hosts and kill them quickly. They are able to grow on artificial media and to survive even unsuitable conditions. Besides, the registration of bio-preparations based on entomopathogenic nematodes is not necessary. White grubs are difficult objects to control. Having suitable defense mechanisms against nematodes they adapted to live with them. However results showed that the practical use of this biological control agents against white grubs of some *Scarabaeidae* species (except *Melolontha* spp. white grubs) in a larger scale is possible. Bacteria, mainly from the *Serratia* (*Entomobacteriaceae*) genus are used to control white grubs of some *Scarabaeidae* species. However, it seems that their use against *Melolontha* spp. white grubs is little realistic.