

EFEKTYWNOŚĆ PORĄŻANIA LARW CHRABĄSZCZA MAJOWEGO (*MELOLONTHA MELOLONTHA* L.) PRZEZ ENTOMOPATOGENICZNE NICIENIE

ANNA KREFT, HENRYK SKRZYPEK, WALDEMAR KAZIMIERCZAK,
EWELINA LECH-PITUCH, ANNA SKRABUCHA

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Konstantynów 1F, 20-718 Lublin
kreft@kul.pl

I. WSTĘP

Chrabąszcz majowy, *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) jest groźnym szkodnikiem rolniczym, leśnym oraz zieleni miejskiej w Europie. W wielu krajach trwają intensywne prace nad opracowaniem skutecznych i jednocześnie bezpiecznych metod zwalczania tego szkodnika. Alternatywą dla metod chemicznych, toksycznych dla środowiska i mało skutecznych, są metody biologiczne.

Entomopatogeniczne nicienie (EPNs) są skutecznymi organizmami w biologicznym zwalczaniu licznych szkodników roślin rolniczych i leśnych, zwłaszcza owadów (Kaya i wsp. 2006). W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój badań dotyczących zastosowania tych organizmów do zwalczania szkodników należących do Scarabaeidae (Koppenhöfer i Fuzy 2008). Wolnożyjące w glebie larwy inwazyjne entomopatogenicznych nicieni wykształciły zdolność aktywnego wyszukiwania żywiciela (Kreft i Skrzypek 2002). Nicienie entomopatogeniczne zabijają swoich żywicieli szybko, w czasie około 48 godzin. Są bezpieczne dla kręgowców, roślin i licznych bezkręgowców. W Polsce powszechnie występują entomopatogeniczne nicienie z rodzaju *Steinernema* i dość nielicznie z rodzaju *Heterorhabditis*.

Przedstawione w pracy doświadczenia mają na celu zbadać, czy entomopatogeniczne nicienie mogą być wykorzystane do skutecznego ograniczenia liczebności *M. melolontha* oraz jaka jest efektywność porażania pędraków *M. melolontha* przez różne gatunki i szczepy entomopatogenicznych nicieni i jaka jest wrażliwość tego owada na larwy inwazyjne nicieni w różnych stadiach rozwojowych.

II. MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto entomopatogenicznych nicieni (EPNs) wyizolowanych z różnych rejonów geograficznych w Polsce, zmodyfikowaną metodą Beddinga i Akhursta (1975), a następnie utrzymywanych w hodowli laboratoryjnej w Katedrze Zoologii

i Ekologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II (KUL). Larwy *M. melolontha* zostały zebrane w szkółkach leśnych: Stróżek koło Lubartowa, Borek koło Świdnika oraz na plantacji nasiennej czereśni ptasiej koło Łopiennika Nadrzecznego, w latach 2009–2010. Doświadczenia przeprowadzano w plastikowych pojemnikach o pojemności 25 ml, wypełnionych wyprażoną ziemią (3 h w temperaturze 70°C) i odpowiednio nawilżoną. W każdym pojemniku umieszczono po jednej larwie owada, a następnie introdukowano larwy inwazyjne różnych szczepów nicieni należących do gatunków: *H. bacteriophora*, *H. megidis*, *S. arenarium* i *S. feltiae*, w dawce 100 larw inwazyjnych/owada. Po 7, 14 i 21 dniach przeprowadzano kontrolę, martwe owady sekcjonowano. Obliczano śmiertelność owadów i intensywność porażenia owadów przez nicienie. W każdym wariancie doświadczenia $n = 20$.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w Ośrodku Obliczeniowym KUL, programem SPSS 14 PL. Zbadano, czy śmiertelność owadów różni się istotnie statystycznie w zależności od gatunku nicieni i czasu kontaktu owada z patogenem oraz czy intensywność porażenia owadów przez entomopatogeniczne nicienie różni się istotnie statystycznie w zależności od gatunku patogena. Zastosowano analizę wariancji jednej zmiennej (UNIANOVA), a następnie wykonano porównania wielokrotne testem Dunnetta T3.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych zarówno w 2009 r., jak i w 2010 r. wykazują, że entomopatogeniczne nicienie efektywnie porażają larwy *M. melolontha* w stadium L₁, słabiej porażają larwy L₂, a najmniej podatne na porażenie przez nicienie są pędraki w stadium L₃.

Z zastosowanych w 2009 r. gatunków nicieni, najwyższą śmiertelność larw L₁ po 7 dniach trwania doświadczenia stwierdzono po porażeniu przez *H. megidis* (62,5%) oraz *S. arenarium* (62,5%), natomiast najniższą po porażeniu *S. feltiae* (12,5%) oraz *H. bacteriophora* (12,5%). Różnice w śmiertelności larw L₁ po porażeniu różnymi gatunkami entomopatogenicznych nicieni były istotne statystycznie ($p = 0,007$). Istotne statystycznie różnice wystąpiły w porażeniach L₁ przez *S. feltiae* i *H. megidis* ($p = 0,014$) oraz między *S. feltiae* i *S. arenarium* ($p = 0,007$). Czas kontaktu patogena z larwami L₁ również istotnie statystycznie wpływał na śmiertelność owadów ($p = 0,026$), najwyższą śmiertelność larw L₁ stwierdzono po 21 dniach trwania doświadczenia, po porażeniu *H. bacteriophora* i wyniosła ona 100% (tab. 1). Entomopatogeniczne nicienie powodowały niższą śmiertelność larw L₂ *M. melolontha*. Po 7 i 14 dniach trwania doświadczenia najbardziej efektywnymi gatunkami nicieni były *H. megidis* i *S. arenarium*. Natomiast po 21 dniach najwyższą śmiertelność (50%) stwierdzono po porażeniu *S. arenarium* (tab. 1). Śmiertelność pędraków L₂ istotnie statystycznie różniła się w zależności od zastosowanego gatunku nicienia ($p = 0,043$) oraz od czasu kontaktu larw L₂ z patogenem ($p = 0,009$). Ze wszystkich stadiów larwalnych najbardziej odporne na porażenie użytych w doświadczeniu gatunków nicieni były larwy L₃. Najwyższą śmiertelność wynoszącą 20% spowodowały *H. bacteriophora* i *H. megidis*. Różnice w porażeniu przez różne gatunki entomopatogenicznych nicieni pędraków L₃ są istotne statystycznie ($p = 0,003$), natomiast czas kontaktu nie wpływał istotnie statystycznie na porażenie ostatniego stadium larwalnego chrabąszcza majowego (tab. 1).

Tabela 1. Średnia śmiertelność [%] larw L₁, L₂ i L₃ chrabąszcza majowego *M. melolontha* porażonych dawką 100 larw inwazyjnych nicieni owadobójczych na owada, po 7, 14 i 21 dniach kontaktu

Table 1. Effect of length of exposure on mortality of european cockchafer (*M. melolontha*) larvae exposed to 100 infective juveniles (IJs) of entomopathogenic nematodes per larvae

Szczep nicieni Nematode strains	L ₁			L ₂			L ₃		
	czas kontaktu [dni] days after treatment			czas kontaktu [dni] days after treatment			czas kontaktu [dni] days after treatment		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
2009									
<i>H. bacteriophora</i> Sie	12	75	100	0	20	20	20	20	20
<i>H. megidis</i> Pla	62	75	75	10	40	40	20	20	20
<i>S. arenarium</i> Lub	62	87	87	0	20	50	0	10	10
<i>S. feltiae</i> Rap	12	37	37	0	10	10	0	10	10
Kontrola – Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2010									
<i>H. megidis</i> C3	36	81	90	25	31	43	25	31	43
<i>H. megidis</i> Pysz	19	54	81	6	12	18	6	12	18
<i>S. arenarium</i> Bys	27	45	45	25	50	50	25	50	50
Kontrola – Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 2. Średnia intensywność porażenia przez entomopatogeniczne nicienie larw L₁, L₂ i L₃ chrabąszcza majowego *M. melolontha*

Table 2. Mean number of entomopathogenic nematodes penetrating into european cockchafer (*M. melolontha*) larvae

Szczep nicieni Nematode strains	L ₁	L ₂	L ₃
2009			
<i>H. bacteriophora</i> Sie	6,8±5,6	3,3±4,8	0,4±0,5
<i>H. megidis</i> Pla	23,6±31,2	5,1±7,0	12,4±25,0
<i>S. arenarium</i> Lub	28,8±24,4	21,3±18,9	5,0±10,0
<i>S. feltiae</i> Rap	0,6±0,5	1,0±2,0	0,5±0,6
2010			
<i>H. megidis</i> C3	14,7±16,4	20,8±12,2	1,8±2,2
<i>H. megidis</i> Pysz	13,3±16,7	5,7±7,0	3,2±6,6
<i>S. arenarium</i> Bys	5,0±6,3	5,6±5,1	2,9±2,6

Stwierdzono istotne różnice w intensywności porażenia wszystkich stadiów larwalnych przez poszczególne gatunki entomopatogenicznych nicieni. Najwyższą intensywność

ność porażenia larw *M. melolontha* stwierdzono w przypadku *S. arenarium*, najniższą natomiast po infekcji *S. feltiae*. Różnice w intensywności porażenia przez różne gatunki nicieni larw L_2 są istotne statystycznie ($p = 0,011$) (tab. 2).

Po analizie wyników uzyskanych w 2009 r. postanowiono do dalszych doświadczeń w 2010 r. zastosować nowowyizolowane szczepy dwóch najbardziej efektywnych gatunków *H. megidis* i *S. arenarium*: *H. megidis* C3, *H. megidis* Pysz, *S. arenarium* Bys. Uzyskane wyniki w 2010 r. wykazały, że larwy L_1 *M. melolontha* najefektywniej porażał szczep *H. megidis* C3, powodując najwyższą śmiertelność pędraków L_1 , wynoszącą po 14 dniach 81,8%, po 21 dniach 90,9% oraz najwyższą intensywność porażenia wynoszącą średnio 14,7 (tab. 1, 2). Różnice w śmiertelności L_1 spowodowanej przez różne użyte szczepy nicieni są istotne statystycznie ($p = 0,049$). Czas kontaktu również istotnie statystycznie wpływał na śmiertelność larw L_1 ($p = 0,049$). Larwy L_2 były natomiast najlepiej porażane, podobnie jak w roku 2009, przez *S. arenarium*, z maksymalną śmiertelnością wynoszącą 50% (tab. 2). Różnice w śmiertelności larw L_2 spowodowane przez różne szczepy nicieni ($p = 0,004$) oraz czas kontaktu ($p = 0,016$) były istotne statystycznie. Larwy L_3 najefektywniej porażał szczep *S. arenarium* Bys, powodując po 21 dniach śmiertelność owadów wynoszącą 37,5%. Czas kontaktu nie wpływał istotnie statystycznie na śmiertelność larw L_3 , natomiast gatunek nicienia miał istotny statystycznie wpływ na wysokość porażenia ($p = 0,007$).

Sekcja martwych larw L_1 wykazała wysoką intensywność porażenia przez szczepy *H. megidis* C3 (14,7) oraz przez *H. megidis* Pysz (13,3), natomiast larwy L_2 zostały zainfekowane z największą intensywnością przez *H. megidis* C3 (20,8) (tab. 2). Różnice w intensywności porażenia larw L_2 przez poszczególne szczepy entomopatogenicznych nicieni są istotne statystycznie ($p = 0,007$).

W poprzednich latach przeprowadzano badania dotyczące patogeniczności różnych gatunków entomopatogenicznych nicieni w stosunku do *M. melolontha*. Po zastosowaniu *S. feltiae* śmiertelność owadów wahała się w zależności od użytego szczepu od 100% do 90%, w przypadku *S. riobrave* Biosys N355 wyniosła 100%, a po użyciu *S. glaseri* NC równała się 90% (Grewal i wsp. 2005). Kowalska (2001) w przeprowadzonych badaniach terenowych w uprawie mieszanej, pięcioletniej na siedlisku lasu świeżego wykazała, że zastosowanie *Heterorhabditis megidis* w dawce 100 larw/cm² ogranicza liczebność jednorocznych pędraków *M. melolontha* i nicienie mogą stanowić alternatywę dla insektycydów chemicznych. Kowalska (2004) wykazała, że larwy inwazyjne różnych gatunków i szczepów entomopatogenicznych nicieni różnią się aktywnością i szybkością porażania owadów, co wpływa na skuteczność zwalczania pędraków chrabąszcza majowego. Badana populacja *S. arenarium* (Swiss) zawierała najmniej larw zdolnych do natychmiastowego infekowania, natomiast *S. glaseri* (Azory) i *S. arenarium* (Palestine) zawierały prawie dwukrotnie więcej larw szczególnie aktywnych w stosunku do pędraków *M. melolontha*.

IV. WNIOSKI

1. Prezentowane w pracy wyniki badań wykazują, że bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność porażen pędraków *M. melolontha* przez entomopatogeniczne nicienie jest rozwój owadów. Stadium larwalne L_1 jest najbardziej podatne na porażenie przez entomopatogeniczne nicienie, natomiast stadium larwalne L_3 najmniej.

2. Wyniki doświadczeń wykazały różnice w śmiertelności pędraków *M. melolontha* porażanych przez poszczególne gatunki i szczepy entomopatogenicznych nicieni. Larwy inwazyjne *S. arenarium* Bys. i *H. megidis* porażają efektywniej pędraki *M. melolontha* niż *S. feltiae* Rap i *H. bacteriophora* Sie.

V. LITERATURA

- Bedding R.A., Akhurst R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109–110.
- Grewal P.S., Koppenhöfer A.M., Choo H.Y. 2005. Lawn, turfgrass and pasture applications. p. 115–146. In: „Nematodes as Biocontrol Agents” (P.S. Grewal, R.U. Ehlers, D.I. Shapiro-Ilan, eds.). CABI International, Cambridge, 501 pp.
- Kaya H.K., Aguilera A., Aluma A., Choo H.Y., de la Torre M., Fodor A., Ganguly S., Hazir S., Lakatos T., Pye A., Wilson M.J., Yamanaka S., Yang H., Ehlers R.U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control* 38: 134–155.
- Koppenhöfer A.M., Fuzy E.M. 2008. Effect of the anthranilic diamide insecticide, chlorantraniliprole, on *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological Control* 45: 93–102.
- Kowalska J. 2001. Próba zastosowania nicieni owadobójczych oraz metody integrowanej w zwalczaniu pędraków chrabąszcza majowego *Melolontha melolontha* L. w uprawie leśnej. *Sylwan* 2: 89–95.
- Kowalska J. 2004. Wpływ pędraków chrabąszcza majowego *Melolontha melolontha* na liczebność aktywnych larw infekcyjnych w populacjach nowych izolatów *Steinernema* spp. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin* 44 (2): 871–874.
- Kreft A., Skrzypek H. 2002. Insect infection by entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in conditions of competition. *Ann. UMCS* 57: 39–52.

ANNA KREFT, HENRYK SKRZYPEK, WALDEMAR KAZIMIERCZAK,
EWELINA LECH-PITUCH, ANNA SKRABUCHA

THE EFFICACY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AGAINST EUROPEAN COCKCHAFFER (*MELOLONTHA MELOLONTHA* L.) GRUB

SUMMARY

Experiments done and presented below aimed at proving that applied species and Polish strains of entomopathogenic nematodes (EPNs) can be used to reduce the number of *Melolontha melolontha*. Invasive larvae of *Steinernema arenarium* Bys., *S. arenarium* Lub., *S. feltiae* Rap., *Heterorhabditis bacteriophora* Sie., *H. megidis* Pla., *H. megidis* Lub. i *H. megidis* Pla., *H. megidis* C3 were used in the experiments as biocontrol agents against the larvae L₁, L₂ and L₃ of *M. melolontha*. The experiments were done at 20°C, in 25 ml boxes filled with pasteurized (3 h at 70°C) and air-dried soil. Pathogen doses were 100 IJ/insect. The result showed that susceptibility of *M. melolontha* to EPNs depends on the insect's developmental stage. Larvae L₁ were the most susceptible. *S. arenarium* Bys. and *H. megidis* strains were more effective in infecting *M. melolontha* larvae than *S. feltiae* Rap. and *H. bacteriophora* Sie.

Key words: entomopathogenic nematodes, *Melolontha melolontha*, biological control, grubs, *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*