

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie

**Moderné biotechnologické možnosti obrany proti tvrdoňovi  
smrekovému (*Hylobius abietis*)**

Dizertačná práca

Autor: Ing. Michal Lalík

Školitel: prof. Ing. Bc. Jaroslav Holuša, Ph.D.

2021

**Czech University of Life Sciences**

Faculty of Forestry and Wood Sciences

Department of Forest Protection and Entomology

**Modern biotechnological control of pine weevil (*Hylobius abietis*)**

Ph.D. Thesis

Author: Ing. Michal Lalík

Supervisor: prof. Ing. Bc. Jaroslav Holuša, Ph.D.

2021

Prehlasujem, že dizertačnú prácu na tému „Moderné biotechnologické možnosti obrany proti tvrdoňovi smrekovému (*Hylobius abietis*)“ vypracoval samostatne s použitím uvedenej literatúry a na základe konzultácii a doporučení školiteľa. Súhlasím so zverejnením dizertačnej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v platnom znení, a to bez ohľadu na výsledok jej obhajoby.

V Prahe dňa

Podpis autora

## **Pod'akovanie**

Ďakujem svojmu školiteľovi prof. Ing. Bc. Jaroslavu Holušovi, Ph.D. za odborné vedenie dizertačnej práce, konzultácie k metodike a vlastnému zostaveniu práce. Ďakujem svojmu konzultantovi Ing. Romanovi Modlingerovi, Ph.D. za konzultácie. Ďalej ďakujem svojim kolegom Ing. Jurajovi Galkovi, PhD. za pomoc pri pripravovaní metodík pokusov a pripomienok k samotnej práci a Ing. Christovi Nikolovovi, PhD. pri štatistickom spracovaní získaných výsledkov. Ďakujem všetkým spoluautorom odborných publikácií. Finančne bol výskum podporený najmä projektom APVV-16-0031 „Výskum alternatívnych metód ochrany ihličnatých sadeníc pred hmyzími škodcami“.



## Abstrakt

Tvrdoň smrekový (*Hylobius abietis*) je škodca ihličnatých semenáčikov a sadeníc. Dospelé jedince požierajú kôru sadeníc, čím prerušujú tok živín, a tým dochádza k uhynutiu sadeníc. Vo výsadbách, ako aj v prirodzenom zmladení, dokáže spôsobiť veľké škody. Preto je potreba ochraňovať sadenice pred žerom. Vo svojej práci som otestoval niekoľko možností boja proti imágam tvrdoňa smrekového. Hlavnými cieľmi bolo porovnať moderné biotechnologické metódy ochrany sadeníc proti zrelostnému žeru tvrdoňa smrekového, otestovať možnosti hromadného odchyту tvrdoňa smrekového do zemných pascí a v laboratórnych podmienkach otestovať účinnosť entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* na mortalitu imág tvrdoňa smrekového. Celkovo bolo vykonaných osem experimentov, niektoré aj vo viacerých opakovaníach.

Z porovnania jednotlivých typov ošetrení sadeníc vyšlo, že v laboratórnych poloprirodných podmienkach sú viac poškodzované neošetrené sadenice smreka pred duglaskou. Pri ošetrených sadenicích (KVAAE wax, Vaztak 10 EC) bola naopak viac poškodzovaná duglaska ako smrek.

Pri druhom experimente boli použité už iba smrekové sadenice neošetrené, a ošetrené tromi metódami (KVAAE wax, lepidlo Vermifix a Vaztak Active) pri umiestnení dvoch a štyroch imág v kletke. Najviac boli poškodzované neošetrené sadenice. Z ošetrených sadeníc boli najviac poškodené sadenice ošetrené Vermifixom, nasledovalo ošetrenie Vaztakom a najmenej boli poškodené sadenice ošetrené metódou KVAAE wax. Tieto výsledky boli rovnaké pre dve, ako aj pre štyri imága v kletke. Vo vonkajších podmienkach dokážu najlepšie ochrániť sadenice vosk KVAAE typ F a C a insekticíd Vaztak Active, ostatné typy ošetrení, golieriky Snap guard a lepidlo Vermifix, dokážu taktiež ochrániť sadenice, ale nie už v takom rozsahu.

Ako ďalším cieľom bolo otestovať možnosti hromadného odchytu tvrdoňa smrekového do zemných pascí. Najviac imág do zemných pascí sme odchytili na borovicovú vetvičku s alkoholom vo fľaštičke. Z použitých syntetických atraktantov najviac imág odchytil atraktant alfa-pinén s etanolom v pomere 1 : 2. Tento atraktant však odchytil o polovicu menej imág ako borovicová vetvička. O niečo menej odchytil atraktant Hylodor. Ďalšie dva atraktanty odchytili iba štvrtinové množstvo oproti borovicovej vetvičke.

Ako posledným cieľom bolo v laboratórnych podmienkach otestovať účinnosť entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* na mortalitu imág tvrdoňa smrekového. Z

týchto pokusov sme vyselekovali kmeň huby *Beauveria bassiana* AMEP20, ktorý najrýchlejšie dokázal usmrtiť imága tvrdoňa smrekového.

Tento kmeň sme použili do nosiča, s ktorým sme vykonali niekoľko druhov testov. V laboratórnych podmienkach sme testovali niekoľko čerstvých nosičov a niekoľko druhov nepriaznivých vplyvov na nosiče (mráz -18 °C, UVC žiarenie, imága umiestnené na 24 hodín k nosiču, dvoj mesačné nosiče).

Vykonávané boli dva experimenty. Obidva experimenty vyšli podobne pre *two months*, a to, že dokázali usmrtiť imága v priebehu 17 dní. Ostatné ošetrenia dosiahli v druhom experimente 100 % mortalitu. Pri prvom experimente sme nedosiahli také dobré výsledky a mortalita nedosiahla 100 % pri ošetreniach, okrem *two months*.

Ďalší experiment s nosičmi bol vykonaný v poloprirodných podmienkach v chovných klietkach. Pri tomto experimente sme porovnávali množstvo skonzumovanej kôry na sadenicích, prežívanie sadeníc a množstvo usmrtených imág. Zistili sme, že na skonzumovanej kôre huba nemá vplyv. Množstvo usmrtených sadeníc v klietkach s nosičmi bolo menšie a mortalita imág bola väčšia v klietkach s nosičom.

Ako posledný experiment sme testovali nosiče priamo v teréne. Nosiče boli umiestnené v troch blokoch a mali sme aj kontrolný blok. Ďalší týždeň sme na plochu umiestnili zemné pasce, do ktorých sme imága odchyťovali. Imága boli po odchytení umiestnené do Petriho misiek. Sledovala sa mortalita imág spôsobená entomopatogénnou hubou. Najlepšiu mortalitu dosiahli imága z bloku *beetlebark* 91 %. Nasledovali imága z bloku *bark* 62 %. Na bloku *attractant* , bola mortalita imág 51 %. Na bloku *carrier*, bola mortalita 42 %. Na bloku control bola mortalita imág spôsobená hubou 18 %. Na nosič sme podali v roku 2019 Slovenskú patentovú prihlášku a v roku 2020 Medzinárodnú patentovú prihlášku. Zo všetkých dosiahnutých výsledkov v tejto práci môžeme pozorovať, že akákoľvek ochrana sadeníc proti tvrdoňovi smrekovému je lepšia ako žiadna ochrana.

**Kľúčové slová:** tvrdoň smrekový, poškodenie, ochrana sadeníc, *Beauveria bassiana*, nosič

## Abstract

The large pine weevil (*Hyllobius abietis*) is a pest of coniferous saplings and seedlings. Imagoes feed on seedlings' bark and thus they interrupt the sap flow, which results in seedling mortality. It can cause great damage in planting and natural regeneration. Due to this, seedlings should be protected against its feeding. In my work I tested several possibilities how to cope with imagoes of the large pine weevil. The main goals were to compare modern biotechnical methods of seedling protection against maturation feeding of the large pine weevil, to test possibilities of mass trapping of the large pine weevil with pitfall traps, and to test the effectiveness of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on mortality of the large pine weevil imagoes under laboratory conditions. In total, eight experiments were performed, some of them in multiple repetitions.

The comparison of individual types of seedling protection revealed that under laboratory semi-natural conditions untreated spruce seedlings were more damaged than Douglas fir. In the case of treated seedlings (KVA AE wax, Vaztak 10 EC), Douglas fir was more attacked than spruce.

In the second experiment we placed two and four imagoes in a cage and used spruce seedlings only, some of which were left untreated, and others were treated with one of the three methods (KVA AE wax, Vermifix glue, and Vaztak Active). Untreated seedlings were damaged most. Out of treated seedlings, seedlings treated with Vermifix were damaged most, followed by Vaztak and the least damaged seedlings were those treated with KVA AE wax. The results were the same for two and four imagoes in a cage. Under field conditions, KVA AE wax type F and C and Vaztak Active insecticide protected seedlings best. Other protection types, i.e. Snap guard collars and Vermifix glue, were also able to protect seedlings, but to a lesser extent.

The next goal was to test the possibilities of the large pine weevil mass trapping using the pitfall traps. Most imagoes were caught in pitfall traps if a pine twig with alcohol in a bottle were used as bait. From the synthetic attractants, most imagoes were caught with alpha-Pinene attractant with ethanol in a ratio 1: 2. This attractant managed to catch only a half of the imagoes caught with the pine twig. Hylodor attractant caught slightly fewer imagoes. Two other attractants caught only one quarter of imagoes that were caught with the pine twig.

The last goal was to test the effectiveness of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* causing mortality of the large pine weevil imagoes under laboratory conditions. From these experiments we selected the AMEP20 order of the *Beauveria bassiana* fungus, which was able to kill imagoes of the large pine weevil within the shortest time. This order was used in a carrier that was tested in multiple ways. Under laboratory conditions we tested several fresh carriers, and several unfavourable conditions for carriers (frost -18°C, UVC radiation, imagoes placed next to the carrier for 24 hours, two-month-old carriers).

We performed two experiments. Both experiments provided similar results for two-month that caused mortality of imagoes within 17 days. In the second experiment, other treated caused 100% mortality. The first experiment did not provide such good results and 100% mortality was observed only in the case of two months.

The subsequent experiment with carriers was performed in breeding cages under semi-natural conditions. This experiment focused on the comparison of the amount of consumed bark on seedlings, survival of seedlings, and the number of dead imagoes. We found that the fungus did not have an impact on the amount of consumed bark. The number of dead seedlings was lower, and mortality of imagoes was greater in cages with carriers. In the last experiment we tested carriers directly in the field. Carriers were placed in three blocks, and one additional block was a control one. One week after the beginning of the experiment we placed pitfall traps, which were used for trapping of imagoes, at the plot. After the imagoes had been caught, they were placed in Petri dishes. We monitored mortality of imagoes caused by the entomopathogenic fungus. The highest mortality imagoes with block beetlebark 91%. The second highest mortality wiht block 62%. In the block with the attractant, was mortality of imagoes equal to 51%. In the block carrier, mortality of imagoes was 42%. In the control block mortality of imagoes caused by fungus was 18%. We filed a Slovak patent application for the carrier in 2019 and an International patent application in 2020. From all achieved results in this work we can conclude that it is better to do something to protect seedlings than to do nothing..

**Key words:** large pine weevil, damage, seedlings protection, *Beauveria bassiana*, carrier

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>Ciele práce .....</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>Problematika .....</b>	<b>13</b>
3.1.	Bionómia a životný cyklus .....	13
3.1.1.	Párenie .....	15
3.1.2.	Kladenie vajíčok a plodnosť .....	15
3.1.3.	Larválny vývoj.....	16
3.1.4.	Stav a poškodenie škodcami.....	17
3.1.5.	Migrácia.....	18
3.2.	Spôsoby ochrany sadeníc.....	19
3.2.1.	Chemická ochrana sadeníc.....	19
3.3.	Mechanická ochrana sadeníc .....	21
3.3.1.	Voskovanie sadeníc .....	21
3.3.2.	Pieskovanie sadeníc Conniflex .....	22
3.3.3.	Olepovanie sadeníc .....	23
3.3.4.	Ochranné goliere .....	24
3.3.5.	Lapacie kôry .....	26
3.3.6.	Zemné pasce .....	28
3.4.	Biologické metódy proti tvrdoňovi smrekovému .....	30
3.4.1.	Entomopatogénne huby .....	30
3.4.2.	Entomopatogénne háďatká .....	32
<b>4.</b>	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Experiment I. Poloprírodný experiment s rôznymi ochrannými metódami proti <i>Hylobius abietis</i> .....	34
4.2.	Experiment II. Terénny experiment s rôznymi ochrannými metódami proti <i>Hylobius abietis</i> .....	39
4.3.	Experiment III. Použitie zemných pascí na odchyt imág <i>Hylobius abietis</i> . ....	41
4.4.	Experiment IV. Laboratórny experiment s <i>Beauveria bassiana</i> na <i>Hylobius abietis</i> .....	46
4.5.	Experiment V. Vonkajšie testovanie <i>Beauveria bassiana</i> na smrekových sadeniciach.....	47
4.6.	Experiment VI. Laboratórny experiment s nosičmi nainfikovanými <i>Beauveria bassiana</i> .....	49

4.7.	Experiment VII. Pokus s nosičom <i>Beauveria bassiana</i> v poloprírodných podmienkach.....	52
4.8.	Experiment VIII. Testovanie nosiča entomopatogénnej huby v prírodných podmienkach.....	55
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>59</b>
5.1.	Experiment I. Poloprírodný experiment s rôznymi ochrannými metódami proti <i>Hylobius abietis</i> .....	59
5.2.	Experiment II. Terénny experiment s rôznymi ochrannými metódami proti <i>Hylobius abietis</i> .....	63
5.3.	Experiment III. Použitie zemných pascí na odchyt imág <i>Hylobius abietis</i> . ....	68
5.4.	Experiment IV. Laboratórny experiment s <i>Beauveria bassiana</i> na <i>Hylobius abietis</i> .....	72
5.5.	Experiment V. Vonkajšie testovanie <i>Beauveria bassiana</i> na smrekových sadeniciach.....	73
5.6.	Experiment VI. Laboratórny experiment s nosičmi nainfikovanými <i>Beauveria bassiana</i> .....	74
5.7.	Experiment VII. Pokus s nosičom <i>Beauveria bassiana</i> v polo prírodných podmienkach.....	77
5.8.	Experiment VIII. Testovanie nosiča entomopatogénnej huby v prírodných podmienkach.....	80
<b>6.</b>	<b>Diskusia.....</b>	<b>83</b>
6.1.	Ošetrovanie sadeníc rôznymi ochrannými metódami .....	83
6.2.	Použitie zemných pascí na odchyt <i>Hylobius</i> spp.....	87
6.3.	Experimenty s entomopatogénnou hubou <i>Beauveria bassiana</i> .....	91
6.4.	Experimenty s nosičom entomopatogénej huby.....	95
<b>7.</b>	<b>Záver a odporúčania pre prax.....</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>Prílohy.....</b>	<b>123</b>
9.1.	Príloha č.1: Non-pesticide alternatives for reducing feeding damage caused by the large pine weevil ( <i>Hylobius abietis</i> L.).....	123
9.2.	Príloha č.2: Simple is best: Pine twigs are better than artificial lures for trapping of pine weevils in pitfall traps .....	134
9.3.	Príloha č.3: Hypocrealean fungi associated with <i>Hylobius abietis</i> in Slovakia, their virulence against weevil adults and effect on feeding damage in laboratory.....	150

## 1. Úvod

Výmera lesov Európy bez Ruska je 202 139 km<sup>2</sup>, z toho približne polovicu tvoria ihličnaté lesy (fra-platform.herokuapp.com). Ihličnaté lesy sú náchylnejšie na zvyšujúci sa počet poškodení ako sú silné lesné požiare a veterné kalamity (Kurz et al., 2008; Seidl et al., 2014). Na takto poškodených a oslabených stromoch sa môže populačná hustota podkôrneho hmyzu výrazne zvýšiť, čo vedie k rozsiahlym výskytom ohnísk podkôrneho hmyzu (Vega & Hofstetter 2015). Po vyťažení poškodených porastov zostáva veľké množstvo pňov, na ktorých sa vyvíja tvrdoň smrekový *Hylobius abietis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) (Bejer-Petersen et al., 1962, Scott and King, 1974). Je považovaný za škodcu mladých lesných porastov od začiatku 20. storočia (Trägårdh, 1913). V Európe je tento druh značne rozšírený a vyskytuje sa od južných (Španielsko, Zas et al. 2006; 2014) až po severské krajiny (Švédsko, Fínsko, Nordlander, 1990; 1991). *H. abietis* sa vyvíja v pňoch a koreňoch umierajúcich a uhynutých ihličnatých stromov. Vajíčka sú nakladené v malých jamkách, na kôre koreňov, vyhryzenými imágami koncom jari (Scott and King, 1974; Nordenhem and Nordlander, 1994 Inward et al., 2012). Prejdú štyrmi larválnymi štádiami pred kuklením (Pye and Claesson, 1981). Čerstvo vykuklené imágo vykonávajú zrelostný žer na sadenicach dva až tri týždne pokiaľ dosiahnu pohlavnú zrelosť (Bejer Petersen et al., 1962; Nordenhem, 1989). Živia sa rastlinným materiálom s priemerom od 2 mm do 20 mm, pričom uprednostňujú priemer okolo 10 mm vo všetkých typoch potravy (sadenice, vetvy, korene) (Örlander et al., 2000; Wallertz et al., 2005). Najväčšie škody ale spôsobujú na sadenicach, pri ktorých kŕmenie môže ľahko viesť k úplnému obžratiu kôry a následnej smrti sadenice. Bez preventívnych opatrení môže byť úmrtnosť extrémne vysoká, viac ako 80 % (Pettersson and Örlander, 2003). Je preskúmané a dostupné veľké množstvo metód ako znižovať škody spôsobené *H. abietis*. Možno ich rozdeliť do niekoľkých kategórií: chemická kontrola (Luoranen and Viiri, 2005; Hardy et al., 2020; Willoughby et al., 2020; Lalík et al., 2020), biologická kontrola (Williams et al., 2013; Barta et al., 2019), fyzické bariéry (Pettersson et al., 2004; Hardy et al., 2020), príprava miest pred zalesňovaním (Wallertz et al. 2018), použitie väčšieho (Thorsen et al. 2001; Nordlander et al., 2011) alebo menšieho sadbového materiálu (Pettersson et al., 2008), oneskorené výsadba (Moore, 2004), použitie antiatraktantov (Unelius et al., 2018) a zvýšenie obranyschopnosti rastlín (Lundborg et al., 2016; Zas et al. 2014). Každá z používaných metód dokáže znížiť poškodenie sadeníc alebo znížiť početnosť tvrdoňov na ploche.

## 2. Ciele práce

Porovnať moderné biotechnologické metódy ochrany sadeníc proti zrelostnému žeru tvrdoňa smrekového (*Hylobius abietis*). Otestovať možnosti hromadného odchyty tvrdoňa smrekového do zemných pascí. V laboratórnych, poloterénnych a terénnych podmienkach otestovať účinnosť entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* na mortalitu imág tvrdoňa smrekového.



### 3. Problematika

#### 3.1. Bionómia a životný cyklus

Tvrdoň smrekový, *Hylobius abietis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae), je významným lesným škodcom rozšíreným v celej Európe a Ázii (Scott and King, 1974). Je nebezpečným škodcom v 15 európskych krajinách, kde predstavuje hrozbu na 3,4 miliónoch hektárov lesov (Långström and Day, 2004). Bol považovaný za škodcu mladých ihličnatých lesných porastov od začiatku minulého storočia (Trägårdh, 1913).

Imágo *H. abietis* je tmavohnedé so žltými alebo svetlohnedými škvrnami, usporiadanými v nepravidelných radoch na krovkách (obr.1). Jeho veľkosť sa pohybuje od 10 do 14 mm, hlava je predĺžená do výrazného nosa s tykadlami a ústnym otvorom na jeho konci (Zubřík et al. 2013).

*Hylobius abietis* sa vyvíja v pňoch a koreňoch umierajúcich a uhynutých ihličnatých stromov. Vajíčka sú nakladené v malých jamkách, na kôre koreňov, vyhryzenými dospelými tvrdoňmi koncom jari (Scott and King, 1974; Nordenhem and Nordlander, 1994). Prejdú štyrmi larválnymi štádiami pred kuklením. Uvádza sa, že vajíčka sú uložené v kôre koreňov alebo pňov, tesne pod povrchom pôdy, a larvy ďalej migrujú do koreňov po vyliahnutí (Pye and Claesson, 1981). V závislosti od mikroklímy a kvality hostiteľských pňov sa môže larva vyvinúť v dospelé imágo počas jedného roka od nakladenia vajíčok alebo sa larvy zakuklia a dospelé imágo sa môže vyvinúť až nasledujúci rok. V chladnejších klimatických podmienkach trvá vývoj lariev zvyčajne dva roky a môže trvať až päť rokov. Avšak 75 % jednotlivcov v Európe sa vyvíja do jedného roka (Bejer-Petersen et al., 1962).

Dospelé tvrdone sa začnú prebúdzat' z hibernácie na jar, keď teploty dosahujú 8 – 9 °C (Munro, 1928; Nordenhem, 1989). Imága sa na jar živia kôrou ihličnanov a iných drevín, pričom dochádza k pohlavnému dozrievaniu pred párením a kladením vajíčok. Po nakladení vajíčok na jar zostávajú imága na mieste po zvyšok leta. Niektorí dospelí jedinci vylezú z kuklových komôrok na konci leta (júl až september), aj keď veľká časť prezimuje v kuklovej komôrke (Nordenhem, 1989). Prezimovanie sa teda môže uskutočňovať v tretej alebo štvrtej instarovej fáze a v dospelom štádiu. Priemerný bod podchladenia pre larvy je -12,6 °C (Luik and Woolma, 1989). Táto teplota nie je obzvlášť nízka (Leather et al., 1993), a je to pravdepodobne jeho adaptáciou na chránené lokality prezimovania. Dospelé tvrdone môžu žiť až štyri roky (Eidmann, 1979; Leather, 1999).

Pomer pohlavia je okolo 50 : 50, aj keď pomer odchytených do pasce môže byť v rozsahu od 20 % do 70 % samiciek, v závislosti od ročného obdobia (Långström, 1982; Tilles et al., 1986; Djeddour, 1996; Lalík et al., 2019). Čerstvo vykukleným samicám, vo svojej prvej sezóne kladenia vajíčok, trvá dva až tri týždne pokiaľ dosiahnu pohlavnú zrelosť, samicčky v druhom alebo treťom roku sú pripravené na okamžité párenie a kladenie vajíčok (Bejer-Petersen et al., 1962; Nordenhem, 1989). Po párení samicčky vyhľadávajú čerstvé pne ihličnatých stromov, pretože sú vhodné na kladenie vajíčok. Vyhrýzajú jamky v kôre, do ktorých znášajú po jednom až piatich vajíčkach (Salisbury, 1996). Obdobie kladenia vajíčok trvá od mája do septembra, ale vrchol je v polovici mája až začiatkom júna (Bejer-Petersen et al., 1962; Lekander et al., 1985). Pne môžu zostať vhodné na kladenie vajíčok až tri roky (Nordenhem, 1989). Keď teplota klesá pod 8 °C, dospelé tvrdone sa zahrabávajú pod zem a začínajú hibernovať (Munro, 1928). Často sa nachádzajú v rozhraní pôdy hrabanka dospelých lesných porastov (Leather, 1999).



Obrázok 1. *Hylobius abietis*

*Hylobius pinastri*

### 3.1.1. Párenie

Bolo zistené, že imága *H. abietis* rozpoznávajú opačné pohlavie na základe feromónov, na malé ale aj väčšie vzdialenosti (Selander and Jansson, 1977; Tilles et al., 1988). Prchavé látky extrahované z rôzne starých imág vyvolávajú rôzne reakcie (Selander et al., 1976) a imága novej generácie oboch pohlaví nereagujú na sexuálne feromóny niekoľko týždňov (Selander, 1978). V procese párenia sú prítomné dva feromóny, jeden produkovaný samčekom na podporu agregácie a druhý produkovaný samičkami na stimuláciu párenia (Selander, 1978). Oba tieto feromóny môžu byť účinné len na krátke vzdialenosti. Orientácia na dlhé vzdialenosti je založená na uvoľňovaní prchavých látok hostiteľskej rastliny z vhodného materiálu, napr. vyrúbané stromy (Selander et al., 1974). Pri príchode na miesto, tvrdone, ktoré sú na rúbanisku, vylučujú agregáčny feromón. Pohlavný feromón priťahuje samcov k samiciam (Tilles et al., 1988), ten zároveň spôsobuje, že samice zostávajú nepohyblivé a umožňujú párenie (Selander and Jansson, 1977). Ďalšie štúdium správania párenia, najmä identifikácia agregácie a párenia feromónov, by mohlo viesť k rozvoju silného nástroja na monitorovanie, predpovedanie a kontrolu *H. abietis*.

### 3.1.2. Kladenie vajíčok a plodnosť

Kladdenie vajíčok a plodnosť u hmyzu sú ovplyvnené množstvom faktorov, napr. veľkosť, dĺžka života, výživa pre imága a larvy, a stimulanty rastlín (Leather, 1987; 1988; Leather et al., 1995). Účinok, aký má výživa dospelých a prchavé látky hostiteľskej rastliny na plodnosť a dlhovekosť *H. abietis*, nie je známy. Larválna výživa môže byť dôležitá pri dosiahnutej veľkosti dospelého jedinca, ale keďže *H. abietis* je relatívne dlho žijúci hmyz, je pravdepodobné, že výživa imág a faktory, ktoré ju ovplyvňujú, budú mať najvýraznejší vplyv na plodnosť. Avšak imága, ktoré pochádzajú z lariev, ktoré sa vyvíjajú v smrekových pňoch, sú menšie a menej plodné ako tie, ktoré sa vyvíjajú v pňoch borovic (Guslits, 1970). Najčastejšie sa znášky vyskytujú v horných 100 mm pňoch, hoci vajíčka boli nájdené v hĺbkach väčších ako 400 mm (Pye and Claesson, 1981). V terénnych podmienkach s tvrdým substrátom sa nakladené vajíčka nachádzajú v hornej časti 50 mm. Larvy potom vykonávajú žer smerom nadol k vhodnejším miestam kŕmenia (Pye and Claesson, 1981). Keď sú oblasti pňa bližšie k povrchu pôdy teplejšie ako tie, ktoré sú hlbšie pod zemou, vývoj vajíčok a lariev je rýchlejší. Rýchly vývoj zvyšuje šancu na prežitie kvôli súrodeneckému kanibalizmu (Henry, 1995) a prirodzeným nepriateľom (Pye and Claesson, 1981). Dospelé samičky tvrdoňov môžu naklásať minimálne 25 vajíčok

v priebehu roka a ich vyliahnutie trvá 12 – 14 dní pri 15°C (Salisbury, 1998). Existuje pozitívna korelácia medzi veľkosťou samíc, meranou dĺžkou elytrónu a počtom vajíčok obsiahnutých v reprodukčnom trakte (potenciálna plodnosť) (Christiansen, 1971a). V Nórsku sa priemerný počet vajíčok nachádzajúcich sa vo vajcovodoch reproduktujúcich samíc pohybuje od 2,4 do 3,6, hoci najväčší počet vajec zaznamenaných vo vajcovodoch bol 13 (Christiansen, 1971a).

### 3.1.3. Larválny vývoj

Larva je belavá, s hnedou hlavou, beznohá, slabo oblúkovito ohnutá a dosahuje veľkosť 12 až 23 mm. Kukla je voľná, biela, mäkká, s pomerne dlhými a úzkymi prívieskami. Sú na nej zreteľné časti tela budúceho imága, vrátane nosa (Zúbrik et al., 2013).

Vývoj lariev je veľmi závislý od teploty a klímy. Generačný čas (z vajíčka na vajíčko) sa môže v západnej a strednej Európe a južnej časti Švédska meniť od jedného roka (Bakke and Lekander, 1965; Scott and King, 1974) až po štyri roky na severe Fínska (Bejer-Petersen et al., 1962). Umiestnenie lariev v pni a osvetlenie pňa slnkom tiež ovplyvňujú vývoj lariev. Larvy bližšie k povrchu pôdy sa vyvíjajú rýchlejšie ako tie, ktoré sú hlbšie v pni (Fraser, 1952; Bakke and Lekander, 1965) a tiež v pňoch, ktoré sú vystavené slnečnému žiareniu dlhšie (Bakke and Lekander, 1965). Eidmann (1963) skúmal vplyv teploty v laboratóriu na larvy *H. abietis* a zistil, že vyššie teploty do 25°C urýchlili vývoj a tiež ovplyvnili nástup a trvanie diapauzálneho obdobia od 60 do 220 dní pri teplotách medzi 10 °C a 20 °C, ale iba 17 dní pri 25°C. Christiansen (1971b) tiež skúmal vplyv teploty na vývoj lariev a zistil, že pri 23°C vývoj lariev trval len 40 dní, keď sa larvy vyvíjali v kmeňoch *Pinus sylvestris* L. Zistil tiež významnú negatívnu koreláciu medzi hustotou populácie lariev a hmotnosťou dospelých jedincov. Veľkosť dospelých sa však zvyšuje keď sa larvy vyvíjajú pri vyšších teplotách (Inward et al., 2012), na rozdiel od väčšiny druhov hmyzu (Kingsolver and Huey, 2008). Otepľovanie klímy by preto mohlo viesť k väčšiemu počtu väčších imág, ktoré spôsobujú väčšie škody na jednotlivých sadenicích. Okrem toho, väčšia matka znáša väčšie vajcia, z ktorých sa liahnu silnejšie larvy, a nie je taká veľká mortalita a následne by sa mohla zvýšiť veľkosť miestnej populácie.

### 3.1.4. Stav a poškodenie škodcami

Imága *H. abietis* sú škodcami mladých ihličnatých sadeníc ako je *Abies alba* Miller, *Larix decidua* Miller, *Picea* spp., *Pinus* spp, *Pseudotsuga menziensi* Franco (Stoakley and Heritage, 1990; Wallertz et al., 2006; Thorpe and Day, 2008; Gradinariu et al., 2012), ale živia sa aj koreňmi alebo vetvami starších ihličnatých stromov (Eidmann, 1974; Örlander et al., 2000; Wallertz et al., 2006). Larvy *H. abietis* sú lepšie prispôsobené na vývoj v pňoch borovic (Munro, 1928), imága sa dokážu živiť jemnou kôrou nielen ihličnatých drevín, ale aj rôznych hostiteľských drevín, napr. lieska (*Corylus avellana*), dub (*Quercus* spp.) a dokonca vres (*Calluna vulgaris*) (Munro, 1928; Djeddour, 1996). Tvrdoň smrekový sa živí rastlinným materiálom s priemerom od 2 mm do 20 mm, pričom uprednostňuje priemer okolo 10 mm vo všetkých typoch potravy (sadenice, vetvy, korene) (Örlander et al., 2000; Wallertz et al., 2005). Imága sa živia aj floemom vetiev dospelých stromov, najväčšie škody ale spôsobujú na sadenicach, pri ktorých kŕmenie môže ľahko viesť k úplnému obžratiu kôry a následnej smrti sadenice. Bez preventívnych opatrení môže byť úmrtnosť extrémne vysoká, viac ako 80 % (Petersson and Örlander, 2003). Je známych niekoľko faktorov, ktoré ovplyvňujú škody spôsobené imágami tvrdoňov, sú to rok výsadby vo vzťahu k času ťažby (Örlander and Nilsson, 1999), čas výsadby vo vegetačnej sezóne (Wallertz et al., 2016; Nordlander et al., 2017a), typ pôdy a prítomnosť vegetácie obklopujúcej sadenice (Petersson and Örlander, 2003; Örlander a Nordlander, 2003; Nordlander et al., 2011), prítomnosť materského porastu (Nordlander et al., 2003a), typ a veľkosť sadeníc (Thorsén et al., 2001), kondícia sadeníc (Wainhouse et al., 2004a, Zas et al., 2006), genetika sadbového materiálu (Zas et al., 2017, Puentes et al., 2018). Existuje niekoľko prác, ktoré naznačujú, že niektoré dreviny, ktoré sa bežne nachádzajú na miestach prijímania potravy, napr. jaseň (*Fraxinus excelsior*), breza (*Betula pendula*) a javor (*Acer pseudoplatanus*), môžu mať odpudzujúce a možno dokonca toxické účinky na imága *H. abietis* (Leather et al., 1994; Manlove et al., 1997). Ukázalo sa, že verbenón asociovaný s mikrobiálnym rozpadom rastlinného tkaniva odrádza od kŕmenia *H. abietis* a môže napomáhať pri výbere vhodného hostiteľa (Lindgren et al., 1996). V terénnych skúškach výsledky s rôznymi prirodzenými návnadami z rôznych častí Európy ukazujú, že polená a kláty *P. sylvestris* sú oveľa atraktívnejšie ako kláty *P. abies* (Långström, 1982), hoci v prípade chýbajúcich borovicových klátov sú kláty *Pices sitchensis* atraktívnejšie ako polená iných druhov ihličnanov (Wilson and Day, 1995). Jednoduchý výber testov v laboratóriu ukazuje, že dospelé tvrdone preferujú ihličnaté stromy pred listnatými stromami, ako je breza alebo

javor. Vo všetkých uvedených štúdiách sa zistilo, že *P. sylvestris* je najvýhodnejšia potrava, pričom *P. abies* je druhá najbližšia (Leather et al., 1994; Djeddour, 1996; Manlove et al., 1997). Aj keď sú samičky ťažšie ako samce, množstvo spôsobených škôd a druh krmiva sa medzi pohlaviami významne nelíši (Djeddour, 1996). Preferenciou potravinového materiálu môže mať priamy vzťah k štádiu vývoja lariev. Uvádza sa, že larvy *H. abietis* sa vyvíjajú rýchlejšie v pňoch *Pinus* spp. ako v prípade *Picea* spp. (Bejer-Petersen et al., 1962). Napriek veľkému množstvu prác vykonaných na čuchové reakcie *H. abietis* na hostiteľské prchavé látky (napr. Selander et al., 1973; 1974; 1976; Nordlander, 1990; 1991; Nordenhem and Eidmann, 1991; Voolma and Sibul 2006; Moreira et al. 2008; Olenici et al., 2016; Lalík et al., 2019) bolo relatívne málo prác zameraných na účinky hostiteľskej rastliny na prežitie imág, plodnosť a výber miesta kladenia vajíčok. Väčší dôraz na tento aspekt biológie a správania *H. abietis* môže umožniť lepšie pestovanie lesov, ktoré sú menej vhodné pre tvrdoňa, a tým by sa znížila úroveň poškodenia, ktoré sa v súčasnosti pozoruje.

### 3.1.5. Migrácia

Dospelce *H. abietis* sú schopné migrovať na dlhé vzdialenosti (Munro, 1925; Solbreck, 1980; Nilssen, 1984), ale je málo známe o ich pohybe v rámci určitého územia, keď sa vyroja zo svojho miesta zimovania a migrujú do novej oblasti. K rojeniu a následnému letu v reakcii na vyparovanie vonných látok hostiteľskej dreveniny dochádza, keď sa teploty pohybujú v rozmedzí 13 – 16°C, zvyčajne počas sedemtyždňového obdobia počas mája a júna (Munro, 1928; Solbreck and Gyldberg, 1979; Schlyter et al., 2004) a odhaduje sa, že niektoré tvrdone môžu preletieť niekoľko kilometrov (Solbreck and Gyldberg, 1979). Je známe, že jednotlivé tvrdone zostanú na vhodnom mieste aj niekoľko mesiacov (Munro, 1925; Leather et al., 1995). Pohyb a obdobie pobytu na jednej lokalite neboli dobre zdokumentované, hoci predbežné práce naznačujú, že niektoré tvrdone sa v priebehu leta pohybujú len niekoľko metrov (Swaine, 1951; Eidmann, 1968; Leather 1999) a možno niekoľko sto metrov od príľahlých porastov (Munro, 1928; Zumr and Stary, 1994). To je v súlade s úzko súvisiacimi severoamerickými druhmi *H. radialis*, o ktorých sa predpokladá, že sa zriedkavo premiestňujú letom (Rieske and Raffa, 1990b). Tvrdone vypustené na holé plochy v horúcich letných dňoch majú tendenciu odísť z miesta vypustenia a hľadať úkryt pod pôdou alebo vo vegetácii, zatiaľ čo tvrdone vypustené v starých porastoch majú tendenciu lietať smerom nahor ku korunám (Leather, 1999). Úloha, ktorú v tomto scenári zohrávajú hostiteľské prchavé látky rastliny, je do

značnej miery neznáma. Štruktúra biotopov má jednoznačne vplyv na pohyb tvrdoňov. V terénnej štúdiu, ktorá zahŕňala porovnanie čerstvých, jednoročných a dvojročných rúbanísk autori zistili, že najviac imág bolo nachytaných na rúbaniskách bez ponechaných ťažbových zvyškov, zatiaľ čo množstvo poškodených sadeníc v oblastiach s ťažbovými zvyškami a bez nich bolo podobné (Örlander et al., 1997).

Pred vytvorením účinných stratégií kontroly sa musí dosiahnuť oveľa väčšie pochopenie faktorov, ktorými je riadené správanie dospelých tvrdoňov. Je potrebné vykonať štúdie o migrácii tvrdoňov medzi miestami rozmnožovania a miestami hibernácie. Ukázalo sa, že larvy *H. abietis* sa pohybujú nielen v jednom pni, ale pri nedostatku potravy migrujú do ďalšieho pňa (Nordenhem and Nordlander, 1994; Salisbury and Leather, 1998), a to môže súvisieť s etanolom a alfa-pinénom (Nordenhem and Nordlander, 1994). Larvy sa môžu úspešne presúvať do vzdialenosti 350 mm, a hoci sú náchylné na predátorov ako sú napríklad bystrušky, predpokladá sa, že riziko predácie je nižšie ako riziko neúspešného vývoja v rýchlo sa zhoršujúcom zdroji potravy (Salisbury, 1996; Salisbury and Leather, 1998).

## **3.2. Spôsoby ochrany sadeníc**

### **3.2.1. Chemická ochrana sadeníc**

Chemické ošetrenie sadeníc sa postupne stávalo hlavným obranným opatrením proti tvrdoňovi smrekovému. V 50. a 60. rokoch 20. storočia sa v bývalom Československu veľmi intenzívne používali insekticídy na základe chlórovaných uhlíkov s dlhou dobou pôsobenia, v ktorých bola účinná látka dichlórdifenyiltrichlórétán (DDT). Pre svoje negatívne účinky na človeka, napr. ovplyvňovanie nervového systému, narušovanie metabolizmu, karcinogénne účinky (rakovina pečene), ovplyvňovanie reprodukčného systému a vývoja plodu (Harte et al., 1991) boli prípravky na základe DDT postupne obmedzované až zakázané. Medzi prvými štátmi, ktoré v roku 1970 zakázali DDT boli Nórsko a Švédsko. Jeho celosvetový zákaz používania bol vydaný až v roku 2001 Štokholmským dohovorom o perzistentných organických polutantoch (Milton 2011). V Československu bolo DDT zakázané v roku 1974 (Mráček, 1984). V roku 1967 objavila skupina vedcov pod vedením profesora Elliota v Anglicku syntetické pyretroidné insekticídy. Bolo vyvinutých celkom 6 skupín pyrethroidov s odlišnými účinnými látkami (bioallethrin, permethrin, cypermethrin, deltamethrin, cyhalothrin, alfamethrin) (Elliott, 1977). Fyziologické účinky syntetických

pyrethroidov priamo na *H. abietis* boli testované Dobrowolskim (2000). Zistil že imága *H. abietis* ktoré sa živili sadenicami ošetrovanými deltametrínom, mali rôzne príznaky, ale len málo z nich počas obdobia kŕmenia uhynulo. Hlavnými príznakmi boli ochrnutie alebo ukončenie kŕmenia. Po vystavení pôsobeniu deltametrínu však imága *H. abietis* hynuli pomaly alebo vôbec. 5-dňové kŕmenie bolo príliš krátke na to, aby umožnilo detekciu úmrtnosti alebo iných závažných toxických symptómov deltametrínu. Uvádza sa však, že hodnota LD50 deltametrínu pre imága po 10 dňoch expozície bola 0,71 mg g<sup>1</sup> a hodnota LD90 2,63 mg g<sup>1</sup>. Lempérièrem and Julienem (2003) použili na ochranu sadeníc insekticíd na báze karbosulfánu, ktorý bol vo forme granúl a zapracovával sa priamo do pôdy v čase výsadby. Zistili, že takto ochránené sadenice sú dostatočne chránené po dobu najmenej tri roky od výsadby. Rose et al. (2005) ukázali, že aplikácia pyretroidného alebo neonicotinoidového insekticídu na mladé stromy (*P. sylvestris*) zabraňovala ich napádaniu *H. abietis*. Rose et al. (2006) testovali insekticíd s obsahom lambda-cyhalothrin. Zistili, že smrekové vetvičky sú poškodzované 5 -7 krát menej oproti neošetrenej kontrole. V poslednej dobe vzniklo väčšie množstvo prác, ktoré porovnávajú chemické ošetrovanie voči fyzickým bariéram (Hardy et al., 2020; Willoughby et al., 2020; Lalík et al., 2020). V týchto prácach sú použité rôzne insekticídy v rôznych koncentráciach a obsahujú iné účinné látky. Všetky použité insekticídy dokázali znížiť mortalitu sadeníc voči kontrole o viac ako polovicu.

V súčasnosti sa postupne upúšťa od používania insekticídov v lesníctve. Na Slovensku je momentálne registrovaných a povolených niekoľko prípravkov na ochranu sadeníc proti tvrdoňovi smrekovému (Vaztak Active, Karate Zeon 5 CS, Lambdol, Fury 10 EW, Greenfury, Zetta) (UKSUP, 2019). V Českej republike je momentálne povolených niekoľko prípravkov na ošetrovanie sadeníc proti tvrdoňovi smrekovému (Alfametrin ME, Decis Mega, Decis Protech, Forester, Vaztak Active, Vaztak Les) (Zahradník and Zahradníková 2019).

Ošetrovanie insekticídmi je dovolené len jednotlivým postrekom sadeníc. Ošetriť sadenice jednotlivo sa dá tromi spôsobmi, a to ošetrovanie sadeníc v škôlke priamo na záhone pred vyzdvihovaním, namočenie nadzemnej časti zväzkov v insekticídnom roztoku pred výsadbou, postrek sadeníc insekticídmi po výsadbe (Varinský 2011).



### 3.3. Mechanická ochrana sadeníc

#### 3.3.1. Voskovanie sadeníc

Spoločnosť Norsk Wax od roku 1992 vyvíja vosk KVAAE, ktorý má chrániť kmenky sadeníc pred žerom *H. abietis*. Vosk pokryje tenkou vrstvou kmenok sadenice a počas dvoch alebo viacerých vegetačných sezón. V priebehu mnohých rokov bol vosk KVAAE používaný, testovaný a zahrnutý do štúdií fyziológie rastlín a rastových charakteristík. Pridaním bieleho pigmentu do vosku sa sadenice chránia pred slnečnými lúčmi. Svetlý vzhľad kmenka sadeníc, ktorý je výsledkom aplikácie vosku, tiež pôsobí ako odstrašujúci prostriedok pre *H. abietis*. V predchádzajúcich pokusoch sa vyskytovali problémy s popraskaním vosku, keď rastliny rástli a zväčšoval sa ich priemer kmenka. V roku 2010 boli do vosku zavedené nové prísady šetrné k životnému prostrediu, vďaka ktorým je vosk pružnejší, a tie mu dávajú správne fyzikálne vlastnosti, aby bol schopný držať krok s rastom sadenice (<http://kvaee.no/why/>).



Obrázok 2. Voskovanie sadeníc a voskovací stroj

Pri zakladaní lesa vyberá lesník známe metódy ochrany sadeníc. Teraz môžete využiť sadenice, ktoré budú chránené pred tvrdoňmi produktom, ktorý nepoškodzuje životné prostredie. Všetko v KVAAE bolo navrhnuté tak, aby chránilo rastlinu a zároveň zostalo neškodné pre životné prostredie (<http://kvaee.no/why/>). Na Slovensko sa podarilo

voskovací stroj zakúpiť LESOM SR š. p. v roku 2013. Ide o tzv. „fontánovú mašinu“ s dvomi fontánami (obr. 2). Je to v podstate jednoduchý pracovný stroj, do ktorého sa vkladajú dosky stuhnutého vosku, pričom stroj pojme celkovo až približne 300 kg vosku. V stroji sa tento vosk roztopí pri teplote 85 °C tak, aby mohol cirkulovať cez tzv. „fontánu“. Sadenice sa ošetrujú ich vkladáním do fontány a jeho aplikáciou o šírke približne 10 – 15 cm od koreňového krčka. Týmto spôsobom sa ošetrí približne 2000 sadeníc za hodinu, pričom na jednu sadenicu sa spotrebuje asi 5 – 10 g vosku (na obalované sadenice asi 4 g). Keďže vosk je po nanesení na sadenicu horúci, sadenica sa zchladzuje v studenej vode a vosk okamžite tuhne. V záujme zníženia nákladov a zjednodušenia samotnej prevádzky s voskovacím strojom sa ochladzovanie sadeníc spája s ich oštrením proti vysychaniu koreňového systému (Ondruš et al., 2014).

### 3.3.2. Pieskovanie sadeníc Conniflex

Conniflex je nový, účinný a ekologický spôsob ochrany sadeníc, ktorý chráni sadenice pred napadnutím tvrdoňom smrekovým. Túto metódu ochrany vyvinuli vedci zo Švédskej univerzity poľnohospodárskych vied (SLU) (Nordlander et al., 2009).



Obrázok 3. Sadenica ošetrená metódou Conniflex.

Conniflex možno jednoducho opísať ako pieskovú bariéru na kmienkoch sadenice (obr.3). Týmto spôsobom je možné ošetrovať iba krytokorenné sadenice. Sadenice v sadbovačoch sa najskôr umyjú od nečistôt za pomoci dýz, následne je nanosené lepidlo na báze vody (<http://www.bccab.com>). Po nanosení lepidla sa sadenice otočia do vodorovnej polohy a posypú sa jemným pieskom z dvoch strán (veľkosť častíc 0,2 mm) (Nordlander et al., 2009). Proces ochrany sadeníc je ukončený v sušiackej jednotke na vytvrdnutie lepidla. Tento proces trvá 30 – 35 minút. Povlak je pružný a s rastom sadenice sa rozširuje (<http://www.bccab.com>). Nezávislí vedci vykonali početné terénne testy Conniflexu, ktoré sa začali pred niekoľkými rokmi. Výsledky jasne demonštrovali podobné úrovne ochrany pri použití Conniflexu v porovnaní s insekticídmi (Nordlander et al., 2009; Nordlander et al., 2011). Ošetrovanie sadeníc Conniflexom však na rozdiel od insekticídov nemá žiadny vplyv na životné prostredie a je pre personál škôlky bezpečný. Sadenice sa ošetrí Conniflexom v škôlke skôr ako sa zabalia a odošlú vlastníčkovi lesa. Na účinnú ochranu počas dvoch rokov je potrebné iba jedno ošetrovanie v škôlke. Conniflex sa môže používať na všetky druhy sadeníc v kontajneroch.

Metóda ochrany pieskovaním bola vyvinutá vo Švédsku a od roku 2003 je používaná v praxi. Conniflex je spolupráca medzi BCC a 100 % dcérskou spoločnosťou Sveaskog, Svenska Skogsplantor (<http://www.bccab.com>).

### **3.3.3. Olepovanie sadeníc**

Ochrana stromov za pomoci lepu vo forme lepových pásov je používaná hlavne v záhradách na ovocných stromoch alebo v lesníctve. Tieto pásy znižujú pohyb lariev alebo nelietajúcich samíc z kmeňov do korún stromov (Webb et al., 1995; Berlinger et al., 1997; Mayo, 2003). Ochrana sadeníc za pomoci lepu je v štádiu testovania. Tieto testy boli vykonávané na základe toho, že sa lep aplikuje na ochranu iných stromov. Predpokladáme, že sadenice, na ktoré je nanosený lep, nie sú tak atraktívne pre žer imág tvrdoňa smrekového. Lep imágam sťažuje pohyb po kmienku sadenice, a tým to imága odrádza, ale pri pokuse žrať kôru aj s lepovou vrstvou sa lep dostane medzi hryzadlá, a tak odrádza imága od prijímania takejto kôry (obr. 4). Tento typ ochrany sadeníc môžeme zaradiť do individuálnej ochrany po vysadení.



Obrázok 4. Sadenica s naneseným lepom Vermifix

### 3.3.4. Ochranné goliere

Ochranné goliere (obr.5) na ochranu sadeníc boli vyvinuté koncom 70. rokov 20. storočia po ústupe insekticídneho prípravku DDT (Lindstöm et al., 1986). Na konci 80. a začiatkom 90. rokov sa vyvinulo a otestovalo množstvo ďalších kŕmnych bariér, napríklad „pančuchy“ (Eidmann and von Sydow, 1989) alebo „BEMA“ obal z plastových vlákien (Hagner and Jonsson, 1995). Ďalším vývojom vzniklo viacej typov kŕmnych bariér.

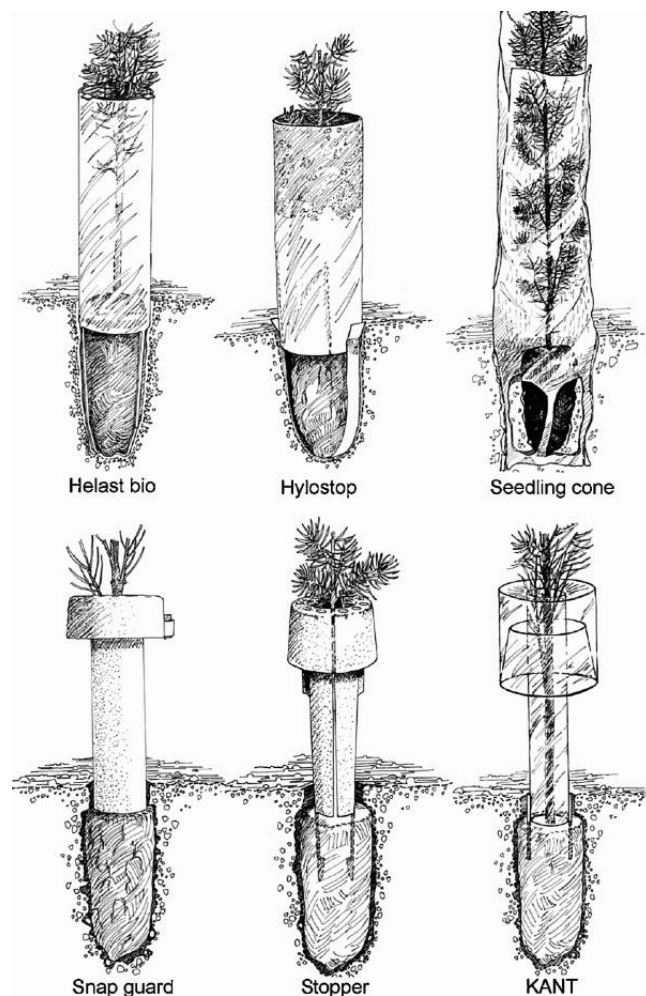
Helast bio je 125 mm vysoký plastový (polypropylénový) valec so štyrmi tenkými prúžkami rovnakého materiálu, ktoré obklopujú koreňový substrát. Povrch valca je hladký, čo sťažuje šplhanie imágam tvrdoňov (Petersson et al., 2004).

Hylostop je 140 mm vysoký valec vyrobený z tvrdého papiera potiahnutého polyvinylchloridom (PVC). Koreňový substrát obklopujú dva pruhy papiera bez PVC. Vonkajšia horná časť bariéry je potiahnutá fluómom (malé častice polytetrafluóretylénu), ktorý znemožňuje vyšplhanie po bariére. Fluón je pre imága klzký a nedokážu sa na tomto povrchu udržať (Eidmann et al., 1996).

The seedling cone je kužeľ na sadenice s výškou 280 mm vyrobený z tenkého, mäkkého, priehľadného plastu, ktorý je perforovaný, aby sa znížilo zahrievanie slnečným žiarením.

Koreňový substrát obklopujú štyri prúžky z rovnakého materiálu (Petersson et al., 2004). Snap guard je ochranný kryt, štít vyrobený z polypropylénu s golierom v hornej časti, ktorý sťažuje preliezanie imág. Golier sa inštaluje otvorením zámku, jeho umiestnením okolo sadeníc zo strany a následným zatvorením zámku. Golier sa zatlačí 1 cm do zeme aby sa predišlo podlezaniu imág (Petersson et al., 2004).

Stopper je úzky lievik s výškou 65 alebo 95 mm, vyrobený z polypropylénu. Spätný golier v hornej časti sťažuje prekonanie. Tento štít má podobný dizajn ako ochranný kryt Snap, ale inštalovať sa má v čase sejby a priamo v golieri vyrastú sadenice. Puzdro je pripevnené ku koreňovému substrátu dvoma kolíkmi (Petersson et al., 2004).



Obrázok 5. Rôzne typy ochranných golierov (Petersson et al., 2004)

KANT je štít s výškou 150 mm, ktorý sa skladá z vnútornej trubice pripevnenej ku koreňu a goliera, ktorý zabráňuje tomu, aby sa tvrdoň dostal k sadenici. Golier má spätý golier, ktorý je navrhnutý tak, aby ho tvrdone neprekonali. Použitá verzia bola skorým prototypom vyrobeným z priehľadného plastu na báze škrobu (Petersson et al., 2004)



V súčasnosti je na trhu dostupný ochranný golier typu Snap guard (obr. 6). Tento golier je vyrobený v dvoch prevedeniach, a to z polypropylénu, ktorý sa dá opakovane použiť, a biodegradovateľného plastu, ktorý sa rozloží po 4 rokoch ([www.grube.sk](http://www.grube.sk)). Nevýhody ochranných golierov sú ich obstarávacia cena. Zámky na golieroch nie celkom dobre priliehajú, ich zatváranie je v niektorých prípadoch zložité. Avšak najväčšou nevýhodou je, že ak tvrdoň prekoná ochranný golier a dostane sa ku kmienku sadenice, len ťažko sa vie stadiaľ dostať. V golieri má navyše ideálne podmienky na skrýšu a potravu, tak sa tam zdrží dlhšiu dobu a požiera kôru sadenice, čím dôjde k jej skoršiemu úhynu.



Obrázok 6. Ochranný golier typ Snap guard použitý v našich experimentoch

### 3.3.5. Lapacie kôry

Hromadný odchyt *H. abietis* pomocou materiálov, ktoré ich priťahujú, bol praktizovaný pred ochranou sadeníc. Hromadný odchyt sa objavuje v literatúre už v roku 1839 (Ratzeburg, 1839).

Ďalšie práce, ktoré popisujú použitie lapacích kôr (obr. 7), pochádzajú z konca 19. storočia (Altum, 1889), z územia súčasnej Českej republiky ich popisuje Burket (1905). Ešte Escherich (1923) kladie dôraz na zber chrobákov a uplatnenie lapacích kôr ako

ochrannej metódy. Avšak už Komárek (1924) upozornil, že metódy odchyty chrobákov majú skôr kontrolný charakter, čo potvrdil i rozsiahlymi výskumami Schmidt (1934), kde dospel k záveru, že by muselo byť odchytených 96 % chrobákov, aby nedochádzalo k premnoženiu tvrdoňa. Materiály použité na prilákanie *H. abietis* boli čerstvá kôra, čerstvé vetvy alebo čerstvé polená. V každom prípade sa kôra, polená alebo vetvy (získané z hostiteľských druhov) rozmiestnili na rúbanisko a po určitom časovom období sa spolu s nalákanými chrobákmi odstránili. Nevýhodou je, že priťahovaní dospelí jedinci zostali nažive a musia sa zbierať a zabíjať ručne. Lapacie kôry boli zatriktívnené voľne umiestnenými borovicovými vetvičkami do dvoch kusov smrekovej kôry (Pfeffer et al., 1961). Ešte v 80. rokoch 20. storočia boli v Československu lapacie kôry využívané ako obranná metóda s cieľom znížiť početnosť tvrdoňov na rúbanisku (Novák, 1965). Pre splnenie týchto očakávaní bolo však nutné použiť na jeden ha i cez 100 kusov lapacích kôr. Práca potrebná na odobratie *H. abietis* z lapacej kôry sa môže znížiť spracovaním kôry syntetickým pyretroidom alebo iným insekticídum tak, že sa zabijú chrobáky. V Európe sa však táto metóda v súčasnosti používa iba v niekoľkých krajinách (Långstöm et al., 2004; Modlinger and Knížek 2009; Galko et al., 2012). Hlavným dôvodom zníženého používania tejto metódy ochrany sadeníc je náročnosť prípravy lapacej kôry a potreba častej kontroly a výmeny.



Obrázok 7. Lapacia kôra

Lapacie kôry sa zhotovujú z plátov čerstvej smrekovej kôry s lykom, do ktorých je vložená borovicová vetvička, ktorá môže byť zbavená ihličia. Veľmi časté je použitie otrávených lapacích kôr, kde použité vetvičky sú namočené v insekticíde, čo sú v súčasnosti v Českej republike bez výnimky syntetické pyrethroidy. Je všeobecne známe, že pyrethroidy majú pre hmyz odpudzujúci účinok (Rose et al., 2005). Táto vlastnosť je pri kuratívnom ošetrení krčku sadeníc vhodná, ale v prípade lapacej kôry, ktorá by mala tvrdone lákať, nie je žiadúca.

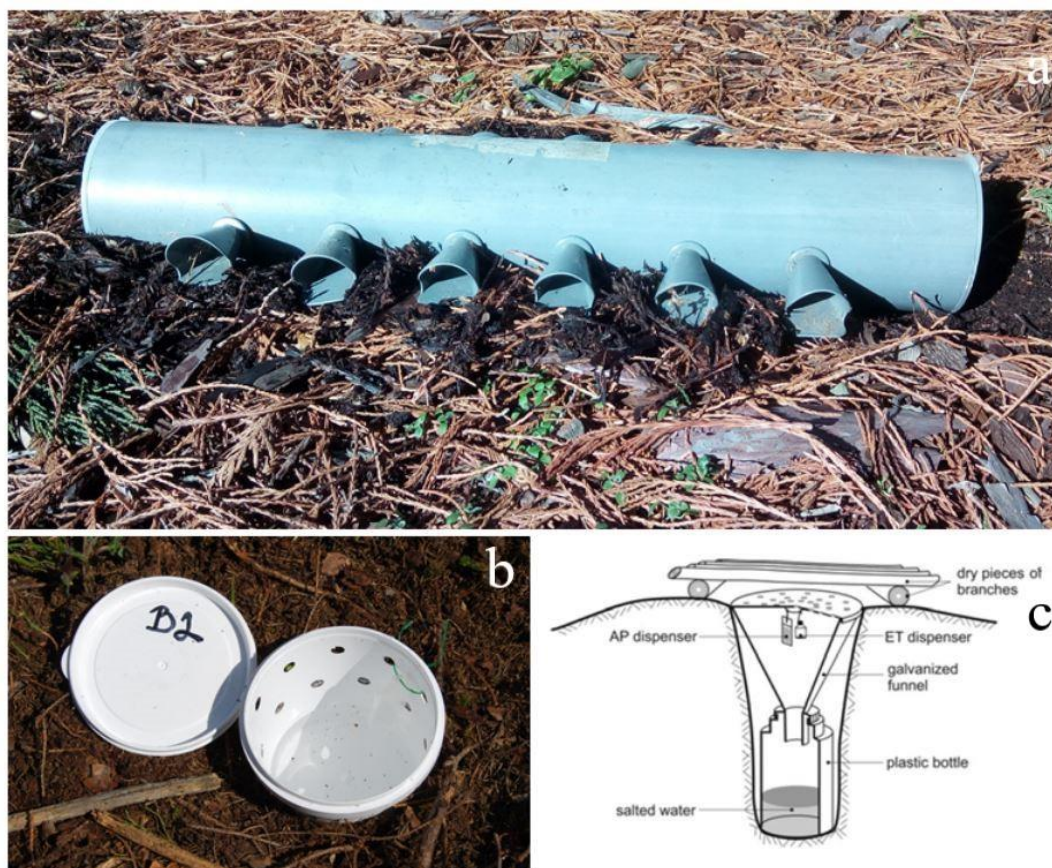
Použitie lapacích kôr patrí k tradičným postupom v ochrane výsadiieb proti *H. abietis*. V praxi sa od používania lapacích kôr za účelom zníženia početnosti tvrdoňa na Slovensku už upustilo. Táto metóda však zostáva vhodná pre signalizáciu výskytu imág pred plánovaným kuratívnym postrekom. STN 48 27 12 uvádza na kontrolu minimálne 20 až 30 ks/ha lapacích kôr. Lapacia kôra je zhotovená z plátu čerstvej smrekovej kôry a je do nej umiestnená borovicová vetvička. Rozmer kôry sa odporúča 50 × 25 cm. Kôra sa prehne na polovicu, čím vznikne rozmer 25 × 25 cm. Umiestniť kôru je najlepšie na pôdu medzi koreňové nábehy čerstvých pňov. Borovicovú vetvičku v kôre je potrebné vymeniť, keď je obžratá alebo po 7 dňoch. Lapacie kôry sa vymieňajú najneskôr po 14 dňoch, alebo ak začnú plesnivieť, je nutné ich vymeniť aj skôr. Kontrolu je potrebné vykonávať každých 3 až 5 dní (Galko et al., 2016).

### **3.3.6. Zemné pasce**

Ako pasce sú najčastejšie používané jednoduché plastové vedierka o objeme 1,2 l, kde vo vrchnej časti pod vrchnákom je navrtaných 10 otvorov o priemere 10 mm (obr. 8b). Pasca je do zeme zakopaná tak, aby spodný okraj vstupných dier bol zároveň s terénom a imága mohli do pasce jednoducho vchádzať. Tento istý typ pascí použilo



viacero autorov (Tilles et al., 1986; Nordlander, 1987; Nordlander, 1990; Zumr and Starý 1992; Voolma et al., 2001; Erbilgin et al., 2001; Lalík et al., 2019).



Obrázok 8. Rôzne typy zemných pascí a) pasca IBL-4, b) plastové vedrá o objeme 1,2 l, c) lievikovitá pasca s fľašou 2 dcl

Sú rôzne modifikácie zemných pascí, napr. v Poľsku bol vyvinutý typ pasce IBL-4, čo je v podstate PVC rúra z oboch strán uzavretá a sú do nej navŕtané otvory, do ktorých sa zastrčia špeciálne lieviky, cez ktoré vchádzajú imága do vnútra pasce (obr. 8a). Spodný okraj vstupných lievikov je zarovno s terénom, aby bolo umožnené jednoduché vchádzanie imág (Skrzecz, 2003). Olenici et al. (2016) použili na odchyt lievikový typ pasce, kde v zemi bola umiestnená fľaška o objeme 2 dcl. Nad fľaškou bol umiestnený lievik, ktorý sústreďoval chrobáky do pasce a lievik bol prekrytý vrchnákom, v ktorom boli navŕtané diery o priemere 10 mm, skadiaľ prepadávali imága (obr. 8c).

Vo všetkých typoch pascí je možnosť odchytať imága hmyzu živé, tzv. suchý typ odchyto. Pri tomto type však vzniká riziko úniku imág z pascí. Tento typ je vhodné používať ak chceme získať chrobáky na ďalšie experimenty. Druhý typ odchyto je tzv. mokry odchyt, kedy sa do pasce naleje tekutina. Je vhodné pre ďalšiu determináciu použiť propylénglykol s vodou v pomere 1 : 1, alebo ako lacnejší variant postačuje aj voda

s prídavkom 5 % NaCl. Zemné pasce nie sú úspešné na odchyt ak sa do nich neumiestní vhodný atraktant, ktorý priťahuje imága tvrdoňa smrekového. Boli použité mnohé druhy atraktantov, vrátane drevených valcov a diskov (Nordenhem, 1989; Skłodowski and Gadziński, 2001; Moreira et al., 2008; Kuźmiński and Bilon 2009), ale na pôvodnú návnadu z pascí kôry, t. j. borovicové vetvičky (Pfeffer et al., 1961), sa zabudlo. Tento typ návnady sa používa iba v jednom modernom diele, v ktorom sa okrem kôry používajú aj vetvičky zo smreka (Zumr and Stary 1992).

Alfa-pinén kombinovaný s etanolom je pre *H. abietis* veľmi atraktívny, čo je pochopiteľné, pretože alfa-pinén je jednou zo zlúčenín v živici ihličnatých stromov (Tilles et al., 1986). Pasce obsahujúce alfa-pinén s etanolom sú účinnejšie ako pasce, ktoré obsahujú iba alfa-pinén alebo iba etanol (Nordlander, 1987). Medzi tieto atraktanty zvyčajne patrí použitie dvoch „odparovačov“ (kontajnerov, ktoré držia atraktant a uvoľňujú jeho pachy) na zachytávač zrážky, t. j. alfa-pinén v jednom odparovači a 70 % etanol v druhom odparovači (Tilles et al., 1986; Erbilgin et al., 2001; Nordlander, 1990; Olenici et al., 2016). Tieto chemikálie sa používajú aj na zvýšenie príťažlivosti kôry a iných prírodných materiálov (Moreira et al., 2008).

Pasce s atraktantmi môžu byť použité ako na sledovanie, tak na kontrolu populácií škodcov (Nordenhem, 1989; Kuźmiński and Bilon 2009). Takéto pasce spolu s chemickou ochranou sadeníc sa v Poľsku často používajú (Stocki, 2000). Pasce IBL-4 obsahujúce Hylodor, agregáčny feromón *H. abietis* (Skrzecz, 2003), chytili významne viac *H. abietis* ako prírodné návnady (konáre, disky) (Kuźmiński and Bilon, 2009).

### **3.4. Biologické metódy proti tvrdoňovi smrekovému**

Ide o cieľavedomé využívanie živých organizmov alebo ich produktov pre udržanie škodcov pod prahom hospodárskej škodlivosti. Podstatou je cielené ničenie iba úzkej skupiny škodcov. Pri tvrdoňovi k nim patria napríklad metódy s využitím entomopatogénnych háďatiek, entomopatogénnych húb, parazitoidov, prípadne mravcov (Vakula et al., 2015).

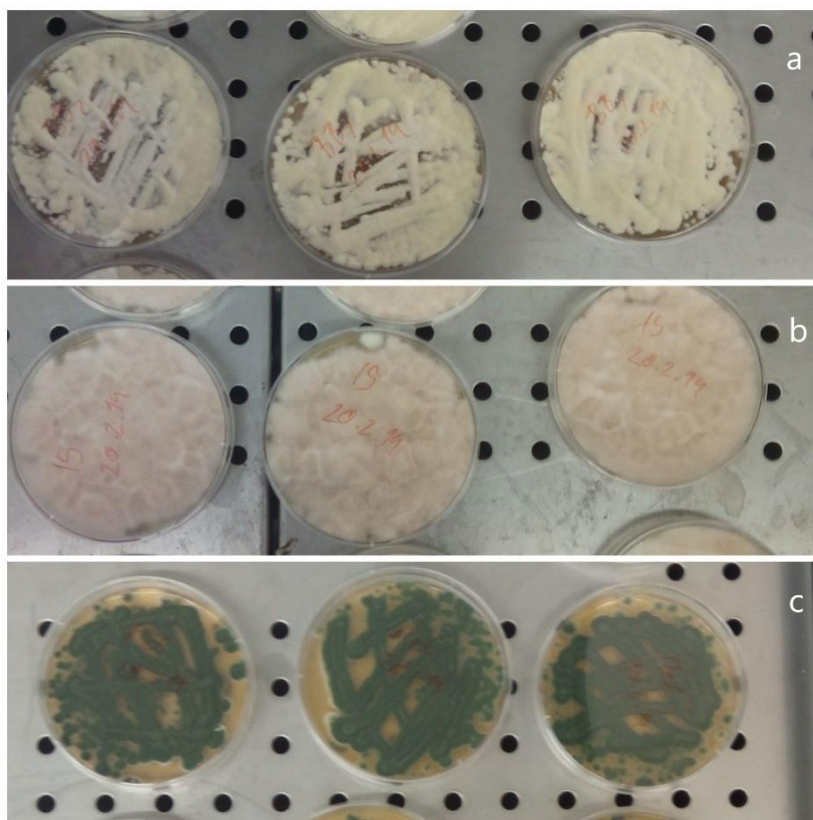
#### **3.4.1. Entomopatogénne huby**

Entomopatogénne huby (EPH) sú prírodnými antagonistami článkonožcov, ktoré pomáhajú pri kontrole hostiteľskej populácie a pri prevencii vzniku ohnísk (Vega et al., 2012). Uskutočnil sa rozsiahly výskum použitia EPH ako perspektívnych biokontrolných látok hmyzích škodcov v poľnohospodárstve a lesníctve (Lacey et al., 2015), a niektoré

kmene boli úspešne licencované a komercializované (De Faria, 2007; Reddy, 2013). Tieto huby sa považujú za environmentálne bezpečné (Zimmermann, 2007) a môžu sa hromadne vyrábať (Jaronski, 2014). Vykazujú značný potenciál na kontrolu rôznych lesných škodcov (Augustyniuk-Kram and Kram, 2012). O EPH je známe, že dokážu nakaziť hmyz takmer všetkých druhov a vývojových štádií, najmä Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera a Hymenoptera (Ramanujam et al., 2014; Khan and Ahmad, 2015). Predpokladá sa, že samotná huba *Beauveria bassiana* Vuill. (obr. 9a) dokáže zabiť viac ako 750 rôznych druhov hmyzu (Ghikas et al., 2010). Je dokázané, že faktory prostredia ovplyvňujú prežívanie entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Najviac limitujúcim faktorom na prežívanie spór je slnečné žiarenie (Gardner et al., 1977; Huang and Feng, 2009; Posadas et al., 2012). Testy viacerých autorov v laboratórnych podmienkach potvrdili, že aj krátke pôsobenie UV-C dokáže v priebehu 16 minút zabiť 99 % konídií, UV-A a UV-B po 31 minútach (Krieg et al., 1981). Po ožiarení simulovaným slnečným svetlom Ignoffo and Garcia (1992) a Fargues et al., (1996) zistili, že po dvoch hodinách bola polovica konídií usmrtených. Prežitie konídií v oleji bolo lepšie na skle (74 % mortalita po 60 minútach) ako na listoch (97 % mortalita po 60 minútach). Významné rozdiely sú aj v citlivosti na simulované slnečné svetlo medzi izolátmi *B. bassiana* (Morley-Davies et al., 1995).

Ďalším limitujúcim faktorom na prežívanie konídií je teplota. Pre *B. bassiana* je optimálna teplota 23 – 28 °C, minimálna 5 – 10 °C a maximálna približne 30 – 38 °C, v závislosti od testovaných izolátov (Müller-Kögler, 1965; Roberts and Campbell, 1977). Tieto hodnoty neskôr potvrdili iní vedci (napr. Hywel-Jones and Gillespie, 1990; Fargues et al., 1997; Hallsworth and Magan, 1999). Bod usmrtenia spór je teplota 50°C počas doby 10 minút (Walstad et al., 1970). V Európe sa niekoľko výskumov zameralo na výskyt EPH v populácií *H. abietis* a druhy výskytu rodov *Beauveria* a *Metarhizium*, ktoré boli zistené od lariev až po imága. Vo všeobecnosti sú huby spojené s populáciou *H. abietis* na konštantnej, ale relatívne nízkej úrovni (Williams et al., 2013; Wegensteiner et al., 2015; Gerdin, 1977; Glare, 1967; Barta et al., 2019). Výsledky predchádzajúcich a nedávnych pokusov o použitie EPH proti *H. abietis* v laboratóriách boli buď nekonzistentné, alebo nie príliš sľubné (Williams et al., 2013; Ansari and Butt, 2012; Samsinakova and Novák, 1967; Waldenfels, 1975; Wegensteiner and Führer, 1988; Wegensteiner, 1989; McNamara et al., 2018). Napriek tomu sa predpokladá, že huby majú potenciál na úspešnú implementáciu do integrovaného systému, ktorý rieši problém poškodenia sadeníc tvrdoňom smrekovým. Realizovateľnosť a udržateľnosť ich použitia

ako kontrolných činiteľov *H. abietis* v teréne závisí od výberu kmeňov húb, formulácií inokula a aplikačných techník.



Obrázok 9. Entomopatogénne huby a. *Beauveria bassiana*, b. *Isaria fumosorosea*, c. *Metarhizium anisopliae*

### 3.4.2. Entomopatogénne háďatky

Je známych viac ako 30 čeľadí háďatiek (EPHa) parazitujúcich alebo inak spojených s hmyzom (Poinar, 1990; Kaya and Stock, 1997). V dôsledku potenciálu biologickej kontroly sa uskutočnili výskumy 7 čeľadí, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae a Heterorhabditidae. Posledným dvom čeľadiam sa doteraz venovala najväčšia pozornosť, pretože sa môžu kultivovať, formulovať a použiť na kontrolu širokého spektra hmyzích škodcov v krátkom časovom období (Lacey et al., 2001).

EPHa môžeme nájsť vo väčšine ekosystémov celého sveta a na všetkých kontinentoch okrem Antarktídy. V súčasnosti je známych viac ako 70 druhov čeľadi Steinernematidae a 15 druhov z čeľadi Heterorhabditidae. Z tohto počtu bolo asi 40 druhov popísaných v posledných 10 rokoch. Na území Českej republiky bolo popísaných 10 druhov rodu

*Steinernema* a dva z rodu *Heterorhabditis* (Nermut et al., 2012). EPHa čeľadi Steinernematidae a Heterorhabditidae sú letálnymi patogénmi hmyzu. V prírode zohrávajú úlohu pri regulácii prirodzenej populácie hmyzu, ich hlavný typ aplikácie je vo forme zálievky vodného roztoku ako biokontrolného činidla. Jedinečné partnerstvo medzi EPHa a symbiotickými patogénnymi baktériami pre hmyz pomohlo zabezpečiť ich úspech ako činidla pre biologickú kontrolu (Griffin et al., 2005).

Aj keď si *Heterorhabditis* a *Steinernema* osvojili rovnaký životný štýl, patria do rôznych rodov (Heterorhabditidae a Steinernematidae) (Blaxter et al., 1998). Medzi ich podobnosti patrí spojenie so symbiotickými baktériami, o ktorých sa predpokladá, že pochádzajú z konvergentnej evolúcie (Poinar, 1983). Obidve čeľade, Steinernematidae a Heterorhabditidae, majú jediné voľne žijúce štádium infekčná larva (IL) tretieho instaru, ktorá prenáša symbiotické baktérie z rodu *Xenorhabdus* a *Photorhabdus* v tomto poradí (Boemare et al., 1993). IL môže do hmyzu vniknúť cez ústnu dutinu, konečník alebo dýchacie otvory a potom sa pohybovať smerom k hemolymfe. Niektoré druhy majú schopnosť preniknúť cez kutikuly hmyzu (Bedding and Molyneux, 1982; Peters and Ehlers, 1994). Napríklad *Heterorhabditis* je schopná tak urobiť pomocou predného dorzálneho zubu (Bedding and Molyneux 1982).

*Steinernema carpocapsae* (Weiser) vylučuje proteíny potlačujúce imunitný systém hostiteľa, čo by mohlo napomáhať uvoľňovanie ich symbiotických baktérií (Simoes, 1998). Nie je známe, či sa podobné proteíny vylučujú *Heterorhabditis* (Forst & Clarke 2002).

Akonáhle je IL vo vnútri hemolymfy hostiteľa, EPHa uvoľňujú symbiotické baktérie. Hemolymfa hmyzu je mimoriadne bohatá na živiny a baktérie sa exponenciálne množia, čím spôsobujú smrť hmyzu v priebehu 24 – 48 hodín. IL sa živia symbiotickými baktériami a rozkladajúcim hostiteľským tkanivom. Po začatí prijímania potravy sa EPHa vyvíjajú do štvrtej larválnej fázy a následne do štádia dospelosti, aby sa rozmnožili. V závislosti od dostupných živín a zdrojov sa vo vnútri hostiteľského hmyzu môže vyskytnúť viac ako jedna generácia EPHa (Dix et al., 1992).

*Steinernema* a *Heterorhabditis* majú odlišný spôsob reprodukcie. Prvú generáciu druhých menovaných tvoria samooplodňujúce hermafrodity, pričom samce a samice sa vyvíjajú v nasledujúcich generáciách (Dix et al., 1992). Pokiaľ ide o *Steinernema*, všetky generácie sa môžu reprodukovať prostredníctvom amfimixy (t. j. krížového oplodnenia u samcov a samíc) (Poinar, 1990). Preto vo všeobecnosti môžeme povedať, že keď napadne hostiteľský hmyz iba jedna IL, *Heterorhabditis* je schopný rozmnožovať sa a vyvíjať,

zatiaľ čo väčšina *Steinernema* vyžaduje, aby boli pred rozmnožovaním prítomní dvaja jedinci, jeden samec a jedna samica (Griffin et al., 2005).

Najskôr sú vajíčka kladené samicami alebo hermafroditmi do usmrteného jedinca, pričom u starších samíc alebo hermafroditov sa vajíčka vyľiahnu v maternici a novovyľiahnuté larvy konzumujú najskôr rodiča a neskôr prechádzajú na hostiteľa. Príslušný proces je známy ako *endotokia matricida* (Johnigk and Ehlers, 1999). Ak je k dispozícii dostatočný prísun potravy, larvy sa vyvíjajú na dospelých a celý vývoj sa opakuje. Ak sú podmienky vo vnútri mŕtveho hmyzu preplnené a sú obmedzené zdroje potravy, IL sa ďalej vyvíjajú iba do tretieho larválneho instaru. U veľkého hmyzieho hostiteľa sa môžu vyvinúť stovky tisíc IL, ktoré sa vyroja z mŕtveho hmyzu v priebehu niekoľkých dní, a potom začnú hľadať nového hostiteľa hmyzu (Griffin et al., 2005).

Keď sa IL dostanú z tela hostiteľa, zachovávajú si pokožku predchádzajúceho instaru ako plášť. Plášť napomáha pri prevencii vysušenia, zmrazenia a infekcie hubovými patogénmi, najmä u *Heterorhabditis* (Wharton and Surrey, 1994). *Steinernema* strácajú svoj plášť celkom ľahko, keď sa pohybujú po pôde, zatiaľ čo puzdro *Heterorhabditis* je pevnejšie prichytené k telu a larvy ho tak ľahko nezvlečú (Dempsey and Griffin, 2003). EPHA sú sľubným nástrojom na kontrolu tvrdoňa smrekového. Aplikujú sa na pne inundatívnym (zalievkovým) spôsobom, keď sú prítomné larvy neskorého instaru alebo kukly prvej generácie tvrdoňov, jeden až dva roky po vyťažení stromov (Torr et al., 2005; Brixey et al., 2006; Dillon et al., 2006; 2007; 2008; Williams et al., 2013; Kapranas et al., 2017a).

## 4. Materiál a metodika

Experimenty, ktoré boli vykonané, môžeme rozdeliť do troch kategórií, a to: ochrana sadeníc mechanickými a chemickými spôsobmi, ochrana za pomoci entomopatogénnych húb a hromadný odchyt imág do zemných pascí. Celkovo bolo vykonaných osem laboratórnych a terénnych experimentov.

### 4.1. Experiment I. Poloprírodný experiment s rôznymi ochrannými metódami proti *Hylobius abietis*

#### Lokalita a materiál

Experiment sa zakladal v zatienenom vonkajšom inšektáriu nevystavenému priamemu slnku na Stredisku lesníckej ochrannárskej služby (LOS) v Banskej Štiavnici,



Slovensko (48.464089, 18.904954) (obr. 10a), v chovných klietkach o rozmere výška 70 cm, šírka 50 cm, hĺbka 50 cm (obr. 10b). Dno klietok a rám je tvorený drevotrieskou. Rám je z troch strán tvorený sieťkou proti hmyzu, dvierka a vrch klietky sú vyplnené sklom (príl. č.1).

Imága tvrdoňa smrekového boli na pokus chytané priebežne počas celej doby experimentov do lapacích kôr v Nízkych Tatrách (49.005810° N, 20.041072° E). Po odchyte boli imága umiestené do chladničky s teplotou 4°C po dobu vloženia k sadeniciam. Na pokus boli vyberané životaschopné imága s priemernou veľkosťou 12 mm. Imága boli ponechané v boxoch s predloženou potravou a vodou, boli vybrané len zreteľne zdravé a nepoškodené imága, ktoré javili známky rovnakej kondície. Imága boli každé dva týždne vymieňané za nové imága.

Sadenice na pokus dodal OZ Semenoles Liptovský Hrádok (LESY SR, š.p.). Boli použité 1,5 ročné krytokorenné sadenice smreka obyčajného (*Picea abies*) a duglasky tisolistej (*Pseudotsuga menziesii*), pestované v sadbovači s objemom bunky 90 cm<sup>3</sup>. V každej klietke bol umiestnený črepník s rozmermi výška 7 cm, šírka vrchná 40 × 40 cm, šírka spodná 32 × 32 cm, objem črepníka 10,08 l. Každý črepník bol naplnený substrátom pre ihličnaté dreviny KEKKILÄ PROFESSIONAL (Vantaa, Finland).

Posudzovali sme poškodenie kôry mladých sadeníc imágami *H. abietis* na neošetrených sadeniciah a na sadeniciah ošetrených lepidlom Vermifix®, voskom KVAAE® typu C a insekticídom VAZTAK®, ktorý obsahuje alfa-cypermetrín.

Lepidlo Vermifix (biely minerálny olej, oligoméry polyolefíny, rozpúšťadlo, plyn; Papierne Moudrý s.r.o., Židlochovice, Česká republika) (obr. 10c) sa striekalo priamo na kôru sadeníc zo vzdialenosti 5 až 10 cm. Lepidlo bolo nanosené tak, aby tvorilo rovnomernú, súvislú a tenkú vrstvu na kmienku sadenice od substrátu do výšky 15 cm.

Vosk KVAAE (hydrocarbon waxes (petroleum), microcrystalline, hydrotreated, rosin, hydrogenated, Titandioxid; NORSK WAX, Stavern, Nórsko) (obr. 10d) sa aplikoval na stonky pred výsadbou, ponorením sadeníc do nádoby naplnenej roztaveným (zahrievaným) voskom pomocou voskovacieho stroja. Po nanosení vosk rýchlo stvrdne. Aby sa predišlo prehriatiu, ošetrené sadenice sa ihneď ochladili vodou; rastliny sa umiestnili na 7 m dlhý dopravný pás, na ktorom sa postriekali vodou.



Obrázok 10. a) Vonkajšie insektárium, b) sadenice umiestnené v klietke, c) sadenica ošetrovaná lepom, d) sadenica ošetrovaná voskom

Sadenice boli ošetrované syntetickým pyretroidným insekticídom Vaztak 10 EC v experimente I a syntetickým pyretroidným insekticídom Vaztak Active v experimente II (BASF SE, Ludwigshafen, Nemecko). Tieto mikroemulzie sú stabilné na svetle a nastriekajú sa na rastliny. Ako účinnú látku obsahuje Vaztak 10 EC  $100 \text{ g/l}^{-1}$  alfa-cypermetrínu a Vaztak Active obsahuje  $50 \text{ g/l}^{-1}$  alfa-cypermetrínu. Tieto boli aplikované v 1 % koncentrácií bezprostredne po vysadení. Kmenky sadenice sa postriekali pomocou postrekovača Solo 402 s dýzou typu FE, ktorá rozprašovala kvapôčky s priemerom  $300 \text{ }\mu\text{m}$ . Podľa výrobcu sú oba pesticídy účinné 28 dní po aplikácii. Počas dvoch experimentov boli použité tri rôzne spôsoby ochrany sadeníc pred žerom tvrdoňa smrekového.



## Dizajn

### *Pokus 2016*

V pokuse 2016 sa použilo desať rovnakých kliebok. Každá kliebka obsahovala šesť sadeníc (tri sadenice smreka obyčajného a tri sadenice duglasky tisolistej). Priemerná výška a priemer (v koreňovom krčku)  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) sadeníc smreka bola  $30,53 \pm 6,78$  cm a  $6,84 \pm 1,19$  mm. Priemerná výška a priemer koreňového krčku sadeníc duglasky bol  $34,32 \pm 6,86$  cm a  $6,57 \pm 1,19$  mm. Sadenice sa zaliali 1 litrom vody bezprostredne po výsadbe a potom 0,5 litrom vody v týždenných intervaloch. V každej kliebke boli ošetrené voskom KVA AE® dve sadenice (jeden smrek a jedna duglaska); ďalšie dve sadenice (jeden smrek a jedna duglaska) boli ošetrené insekticídnom Vaztak 10 EC (obr. 11a) (1 % koncentrácia); a zostávajúce dve sadenice (jeden smrek a jedna duglaska) boli neošetrené kontroly. Sadenice v každej kliebke boli náhodne usporiadané do šesťuholníkového vzoru s 10 cm rozstupmi (obr. 11b). Usporiadanie sadeníc bolo v každej kliebke rozdielne. Na začiatku experimentu sa do každej kliebky umiestnili dve dospelé imága *H. abietis* (neurčené pohlavie), ktoré boli každé 2 týždne nahradené novými imágami, ktoré boli vymieňané skoro ráno, kedy ešte imága boli na sadeniach alebo povrchu pôdy.



Obrázok 11. Pokus v roku 2016. a) postrekovanie sadeníc, b) vysadené sadenice pred umiestneným do kliebok

Pokus 2016 prebiehal 16 týždňov (od 3. mája 2016 do 23. augusta 2016). V týždenných intervaloch bola vykonávaná kontrola poškodenia sadeníc (plocha zožratej kôry), na zožratú časť kôry bol položený priehľadný milimetrový papier, aby sa zmerala plocha poškodenia každej sadenice.

### ***Pokus 2017***

Na pokus 2017 sa použilo dvadsať kliebok. Každá kliebka obsahovala štyri sadenice smreka obyčajného. Priemerná výška a priemer sadeníc (na koreňovom krčku)  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) na začiatku experimentu boli  $31,59 \pm 5,07$  cm a  $6,9 \pm 1,49$  mm. Sadenice sa poliali 1 litrom vody bezprostredne po výsadbe a potom 0,5 litrom vody v týždenných intervaloch. V každej kliebke bola jedna sadenica smreka obyčajného buď neošetrená (kontrola), alebo bola ošetrená Vaztak Active 1 %, voskom KVAAE, alebo lepidlom Vermifix. Sadenice v každej kliebke boli náhodne usporiadané do štvorca s 25 cm rozstupmi medzi sebou. Usporiadanie sadeníc bolo v každej kliebke rozdielne. Na začiatku experimentu sa do každej z 10 kliebok umiestnili dvaja dospelí *H. abietis* (neurčené pohlavie) a do každej z ďalších 10 kliebok sa umiestnili štyria dospelí *H. abietis* (neurčené pohlavie). Tieto boli nahradené novými dospelými každé 2 týždne. Experiment sa uskutočňoval 16 týždňov (od 9. mája 2017 do 29. augusta 2017). Kfmmne jamky boli merané týždenne priehľadným milimetrovým papierom ako v pokuse 2016.

### **Štatistická analýza**

Účinky ošetrení na poškodenú plochu kôry sme analyzovali pomocou lineárneho zmiešaného modelu (RStudio, verzia 1.1.423 - © 2009-2018 RStudio, Inc., balík lme4, verzia 1.1-19; Bates et al., 2015). Poškodené plochy na sadenicích v oboch pokusoch boli transformované pomocou transformácie Yeo-Johnson (R, package best Normalize; verzia 3.4.1; Peterson 2017) aby sa zlepšila homogenita rozptylu a normálnosť distribúcií. Účinky ochrany sadeníc sa analyzovali v dvoch časových bodoch v každom experimente, t. j. v 8. a 16. týždni.

Kôra koreňových krčkov a kmienkov bola v priebehu pokusov poškodená a priemer väčšiny sadeníc sa zmenšil. Okrem toho sa znížila výška sadeníc v dôsledku poškodenia imágami. Tieto parametre boli vylúčené z ďalších analýz.

Na analýzu poškodenej oblasti v pokuse 2016 sme použili lineárne hierarchické (zmiešané) modely (linear mixed effects models – LMEM) zahŕňajúcimi ošetrenie a druhy stromov (s. obyčajný a d. tisolistá) ako fixné efekty a kliebka ako náhodný efekt. Interakčné termíny medzi ošetrením a drevinou boli zahrnuté pre poškodenú oblasť,

pretože oba faktory boli významné ( $p < 0,05$ ). Test vierohodnosti (log-likelihood ratio test) porovnávajúci úplný a znížený model pri hladiny významnosti  $p < 0,05$ .

V pokuse 2017 sa údaje analyzovali osobitne pre 2 a 4 imága *H. abietis* na klietku. LMEM sa použil s liečbou ako s fixným efektom a klietkou ako s náhodným efektom.

Párové rozdiely priemerov LS pre vybrané faktory v modeloch pre oba roky boli vypočítané pomocou balíka lmerTest (verzia 3.0-1; Kuznetsova et al., 2017).

## 4.2. Experiment II. Terénny experiment s rôznymi ochrannými metódami proti

### *Hylobius abietis*

#### Lokalita a materiál

Terénny experiment bol založený na lesnej správe Liptovská Teplička, ošetrovanie sadeníc a ich prvé meranie bolo uskutočnené 9. 4. 2018. Založený bol na holine (obr. 12), ktorá vznikla podkôrníkovou kalamitou v marci 2018. Nadmorská výška na ploche je od 1134 do 1168 m. n. m. Zastúpenie drevín na ploche 95 % smrek obyčajný 5 % iné dreviny.



Obrázok 12. Výskumná plocha na testovanie roznych druhov ochranných metód

Sadenice boli ošetrované niekoľkými spôsobmi.

*Insekticídnym prípravkom Vaztak Active (BASF SE, Ludwigshafen, Nemecko)*

Tieto mikroemulzie sú stabilné na svetle a nastriekajú sa na rastliny. Ako účinnú látku obsahuje  $50 \text{ g/l}^{-1}$  alfa-cypermetrínu. Koncentrácia prípravku je 1 % a aplikoval sa kuratívny postrek pred živným žerom škodcov na kmienku a hlavných koreňoch sadeníc. Dávka aplikačného roztoku je 60 – 80 l/ha (1,5 – 2,0 l na 100 sadeníc). Preventívne sa

aplikuje v apríli až máji, kuratívne podľa potreby. Postrek sa usmerňuje od oblasti koreňového krčku sadeníc do výšky minimálne 15 centimetrov od zeme.

#### *Lep Vermifix*

Lep Vermifix v spreji je určený na ochranu stromov pred lezúcimi škodcami a tiež k príprave lepových pascí všetkého druhu. Lep je možné nastriekať priamo na zrelú kôru (borku) stromov, najlepšie zo vzdialenosti 5 – 10 cm v tenkej vrstve, pretože čerstvo nanesený lep v silnejšej vrstve má snahu stekať. Lepom sa vytvorí bariéra, ktorá nedovolí lezúcim škodcom prejsť. Lepová plocha je úplne aktívna deň po aplikácii. Pred použitím treba dobre pretrepať. Lepidlo Vermifix slúži k monitoringu a signalizáciu náletu či výskytu škodlivého hmyzu – skočiek, molíc, vošiek, nosáčikov, smutníc, strapiek, vrtalek, vrtuľí čerešňovej, mravcov, piadiviek a puklíc na ovocných stromoch, okrasných stromoch, skleníkových kultúrach, zelenine, izbových rastlinách a poľných plodinách.

#### *Vosk Kvaae wax typ C a typ F*

Ochrana kmienkov ihličnatých sadeníc vrstvou parafínového vosku sa testovala od polovice 90. rokov 20. storočia. Vosk poskytuje relatívne dobrý ochranný účinok proti chrobákovi najmenej prvý rok v teréne. Prvotné zloženie vosku malo sklon k skorému rozpadu, ale výrobca vosku Norsk Wax neustále vyvíjal nové varianty vosku s vyššou toleranciou na UV žiarenie, čo zlepšuje ochranu aj v druhom roku po vysadení. V prvých pokusoch s voskom sa použili do vosku prísady, ktoré spôsobili poškodenie kambia. Vosk, ktorý sa dnes používa, je zmes, ktorá ma bielu farbu a pri nových typoch voskoch nebolo zaznamenané žiadne podobné poškodenie pri ošetrení. V našich pokusoch sme skúšali dva varianty voskov, a to vosk typu C a F. Na sadenice bol vosk nanesený do výšky 15 cm od koreňového krčku. Na sadenice je vosk nanášaný za pomoci špeciálneho stroja priamo v lesnej škôlke. Vosk sa roztopí a cirkuluje cez fontánu, do ktorej sa ponorí kmienok sadenice a následne sa sadenica schladí. Takto ošetrené sadenice sú pripravené na výsadbu.

#### *Golieriky, ktoré sa nasadzujú na sadenice*

V našom experimente sme použili ochranný golier typu Snap guard, ktorý je dostupný na trhu. Tento golier je vyrobený v dvoch prevedeniach, a to z polypropylénu, ktorý sa dá opakovane použiť a biodegradovateľného plastu, ktorý sa rozloží po 4 rokoch ([www.grube.sk](http://www.grube.sk)). Ochranný golier je štít s golierom v hornej časti, ktorý sťažuje preliezanie imág. Golier sa inštaluje otvorením zámku, ich umiestnením okolo sadeníc zo strany a následným zatvorením zámku. Golier sa zatlačí 1 cm do zeme aby sa predišlo podlezeniu imág (Petersson et al., 2004).

## Dizajn

Na výskumnej ploche bolo použitých 5 typov ochranných metód a kontrola (neošetrené sadenice). Celkom bolo vysadených 600 voľnokorenných sadeníc smreka obyčajného, vek sadeníc bol 5 rokov. Priemerná výška a priemer sadeníc (na koreňovom krčku)  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) na začiatku experimentu boli 35,85 cm  $\pm$  11,2 cm a 5,92  $\pm$  3,22 mm. Sadenice boli zasadené do 10 blokov po 60 sadeníc. V jednom bloku bolo 6 radov, pričom každý rad predstavoval iný druh ošetrovania. Spon medzi jednotlivými sadenicami bol 1  $\times$  1 m. Rozmiestnenie radov v jednotlivých blokoch bolo náhodné. Opakované ošetrovanie lepom a insekticídmi bolo vykonané 12. júna a 10. augusta 2018.

## Štatistická analýza

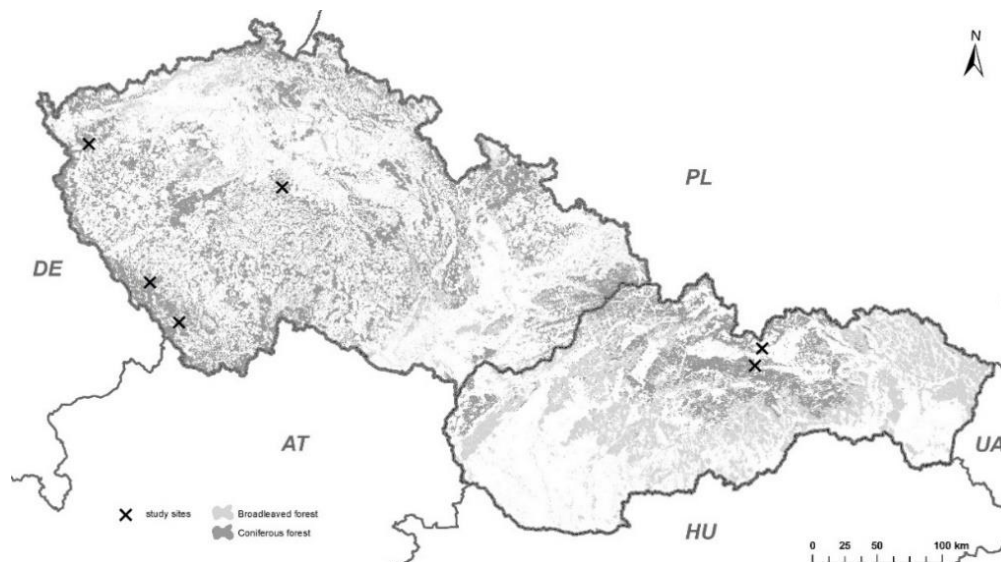
Údaje veľkosti poškodenia sadeníc sme testovali na normalitu rozdelenia Shapiro-Wilk testom:  $W = 0.45563$ ,  $p\text{-value} < 2.2e-16$  a na homogenitu variancií Bartlettov test: Bartlett's K-squared = 375.1,  $df = 5$ ,  $p\text{-value} < 2.2e-16$ . Obidva testy vyšli signifikantné. Na základe charakteru údajov, kde bol experiment rozdelený do viacerých blokov a bola narušená normalita a homogenita variancií, sme účinnosti ochrany sadeníc vyhodnocovali pomocou zovšeobecnených lineárnych zmiešaných modelov (Generalized Linear Mixed Model - GLMM) RStudio, verzia 1.1.423 - © 2009-2018 RStudio, Inc., balík lme4, verzia 1.1-19; Bates et al., 2015). S Poissonovou distribúciou, log spojovacíou funkciou (log link function) a Laplace metódou odhadu parametrov (Laplace approximation). Faktor s fixným efektom v modeli predstavuje ošetrovanie sadeníc a faktor s náhodným efektom blok. Rozdiely medzi ochrannými opatreniami boli analyzované odhadom marginálnych stredných hodnôt (Estimated Marginal Means) a Tukeyovov metódou viacnásobného porovnania (Russell 2020).

### 4.3. Experiment III. Použitie zemných pascí na odchyt imág *Hylobius abietis*.

#### Lokality a materiál

Pokusy sme uskutočnili v porastoch s. obyčajného na štyroch lokalitách v Českej republike a na dvoch lokalitách na Slovensku (obr. 13). Zastúpenie smreka v porastoch bolo najmenej 90 % (tab. 1).





Obrázok 13. Umiestnenie šiestich výskumných lokalít pre testovanie atraktantov v zemných pasciach

Tabuľka 1. Opis študovaných lokalít, kde boli osadené zemné pasce

Krajina/lokality	Geografické súradnice	Plocha (ha)	Nadmorská výška	Orientácia	Vznik holiny	zastúpenie smreka (%)
CZ/Arnoštov	48.8890528N 13.9529108E	0.74	944–946	Juho- východná	ťažba september 2017	95
SK/Vyšné Hágy	49.120814N 20.102610E	21.5	1216–1220	Južná	vetrová kalamita máj 2014	95
CZ/Kašperské Hory	49.1343394N 13.5876222E	0.81	780–785	Juho- západná	ťažba Október 2017	100
CZ/Kostelec n. Č. L	49.9198067N 14.840943E	0.62	402–404	Južná	ťažba December 2017	90
SK/Liptovská Teplička	48.995592N 20.038704E	10.4	1115–1127	Severná	Podkôrniková kalamita Február 2018	100
CZ/Mariánske Lázně	50.0246936N 12.7173419E	0.45	819–820	rovina	Podkôrniková kalamita Máj 2017	100

#### Atraktanty a odparníky

Boli testované borovicové vetvičky a štyri chemické atraktanty. Všetky vetvičky (dlhé 50 mm a priemer  $12 \pm 2$  mm) boli odrezané z jediného 50-ročného stromu *P. sylvestris* dňa 10. apríla 2018. Vek konára bol 4 – 6 rokov. Vetvičky sa skladovali v hermeticky utesnených polyetylénových vreckách pri teplote  $-20$  °C. Jedna rozmrazená vetvička bola umiestnená do pasce a vedľa vetvičky bola umiestnená 20 ml fľaša obsahujúca

etylalkohol (obr. 14a). Vrchnák fľaše mal šesť otvorov s priemerom 2 mm a jeden otvor s priemerom 4 mm. Na zavesenie fľaše v lapači sa použila polypropylénová šnúra, ktorá bola pripevnená k väčšej diere a k okraju lapača (príl. č.2).

Ďalej sme porovnávali štyri druhy atraktantov. Jedným z nich bol Hylodor (obr. 14b), (A) (Z.D. Chemipan), čo je komerčne dostupný odparník, a atraktant (zmes organických a anorganických látok) vyrobený v Poľsku (tab. 2). Ďalším typom odparníku bol polypropylénový tubus (obr. 14 c, d) vyrobený spoločnosťou Fytofarm Ltd. Co. (Bratislava, Slovensko) (tab. 2). Polypropylénové tubusy sa použili pre ďalšie tri druhy atraktantov a kontrolu. Po naplnení sa odparníky uzavreli a obsah sa uvoľnil iba cez polypropylénové steny.

Tabuľka 2. Opisy atraktantov použitých v zemných pasciach

Atraktant	Denný výpar (g) **	Zloženie atraktantu	Pomer zložiek
<b>A—Hylodor</b>	0.012	zmes organických a anorganických látok	-
<b>B—alpha-Pinene + etanol *</b>	0.070	zmes of alpha-pinene (1R)-(+)-alpha-pinene (98%) CAS7785-70-8, EINECS: 232087-8 + ethanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6	1:2 ***
<b>C— Terpentínový olej + etanol oddelene *</b>	1st tube: 0.023	1.tubus : etanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6	100%
	2nd tube: 0.241	2. tubus: terpentínový olej CAS: 7785-70-8, EINECS: 232087-8	100%
<b>D— Terpentínový olej + etanol*</b>	0.093	zmes: terpentínový olej CAS: 7785-70-8, EINECS: 232087-8 + etanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6	2:1 ****
<b>PC—Borovicová vetvička + etanol vo flaštičke</b>	0.402	etanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6	-

\* Odparníkmi pre tieto atraktanty boli polypropylénové tubusy (priemer = 23 mm, výška = 49 mm, objem = 12.5 ml, váha bez atraktantu = 3.5 to 4.0 g). Každý tubus obsahoval 6 mL atraktantu. \*\* výpar v laboratórnych podmienkach bol  $19.54 \pm 1.73$  °C,  $36.53 \pm 3.12$  %; \*\*\* Použilo sa podľa Nordlander (1987); \*\*\*\* Použilo sa podľa Moreira et al. (2008).

## Dizajn

Zemné pasce sa skladali z vedier s objemom 1,2 l s 10 otvormi (priemer 10 mm) v hornej časti lapača (obrázok 14a). Pasce mali viečka a boli zakopané do zeme tak, aby otvory, cez ktoré mohli chrobáky prechádzať boli na povrchu pôdy. Spodok každého lapača obsahoval 200 ml propylénglykolu (CAS: 57-55-6, EINECS: 200-338-0) zmiešaného s vodou (pomer 1 : 1) a zmáčadlo Tween 80 (Carl Roth, CAS 9005-65 -6). Táto zmes zabila a konzervovala chrobáky, ktoré padli do pasce. Jeden odparník v každej pasci, v ktorom bol umiestnený atraktant, bol zavesený na hornom okraji každej zemnej pasce tak, že visel pozdĺž vnútornej steny lapača a nad zmesou propylénglykol+voda.

Celkovo bolo na jednej lokalite umiestnených 36 pascí na plochu  $22,0 \times 28,5$  m. Vzdialenosť medzi pascami bola 5 – 6 m v závislosti od prekážok v teréne. Spomedzi 36 pascí sa na každej lokalite nachádzalo 24 chemických atraktantov, 6 pascí obsahovalo jednu borovicovú vetvičku + etanol vo fľaši a 6 bolo bez akéhokoľvek atraktantu a slúžili ako negatívna kontrola. Pasce boli rozmiestnené na ploche tak, aby sa špecifický typ atraktantu nenachádzal v blízkosti toho istého typu atraktantu (obr. 15).



Obrázok 14. Zemné pasce s rôznym typom návnady. a) borovicová vetvička + etanol 70 %, b) Hylodor, c) alfa - Pinene + etanol 70 %, d) terpentínový olej + etanol 70 % oddelene

Pokus sa začal 13. apríla 2018 a skončil sa 31. augusta 2018. Pasce sa kontrolovali každý týždeň, na každej lokalite, v ten istý deň v týždni; všetky odchytené chrobáky sa odstránili z pasce a umiestnili do označeného vrečka. V prípade pascí s vetvičkami sa vetvičky vymieňali a do fliaš sa každý týždeň pridal čerstvý etanol. V prípade pascí so syntetickými atraktantmi boli atraktanty nahradené počas 8. a 16. týždňa experimentu.



A - Hylodor

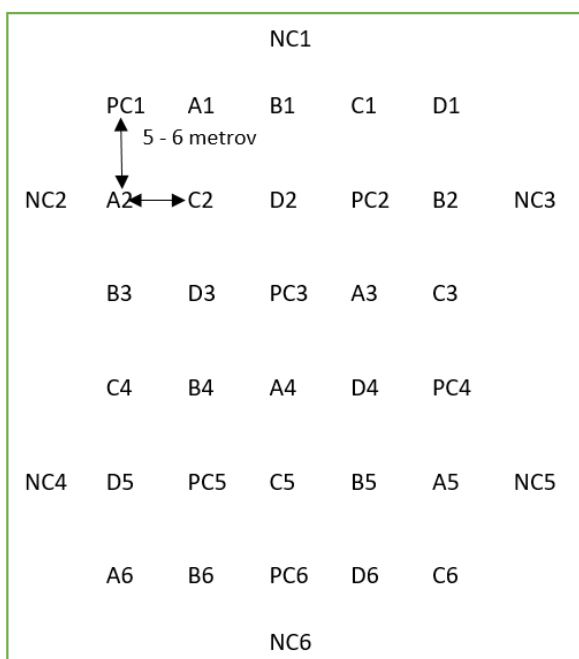
B – Alfa-pinene + etanol 70% 1 : 2

C–Terpentínový olej +etanol 70% oddelene

D – Terpentínový olej + etanol 2 : 1

NC – Negatívna kontrola

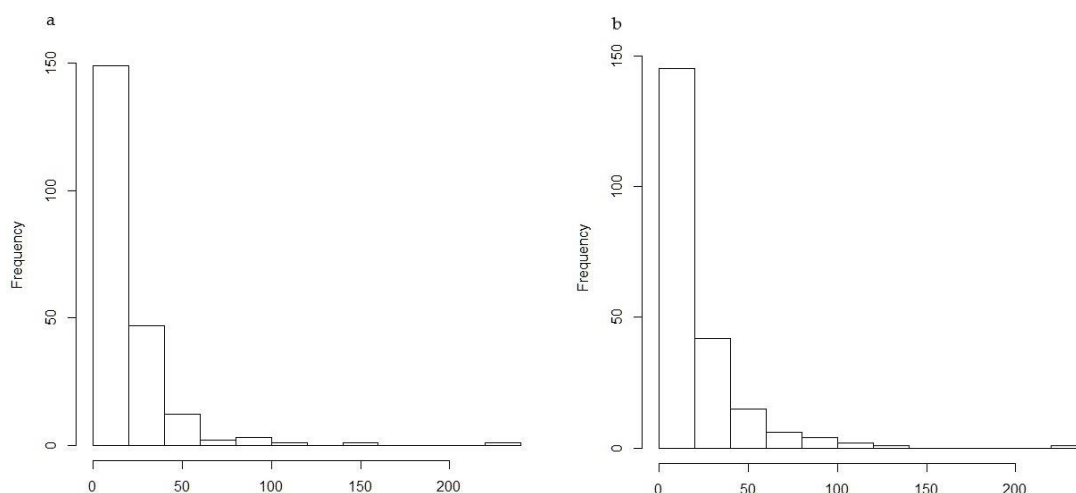
PC – Borovicová vetvička+ etanol



Obrázok 15. Umiestnenie pascí v teréne

### Štatistická analýza

Kumulatívny počet dospelých samcov *H. abietis* a dospelých samíc chytených do všetkých typov pascí sa nezhodoval s normálnym rozdelením (obr. 16). Bartlettov test homogenity variancií týkajúceho sa účinkov atraktantu a lokality bol signifikantný (Bartlettova K -squared = 206,72, df = 5, p-hodnota <math><0,001 = 2,2 \times 10^{-16}</math>). Na základe vlastností údajov sme na vyhodnotenie použili zovšeobecnený lineárny model (Generalized Linear Model - GLM).



Obrázok 16. Frekvenčné rozdelenie počtu dospelých samcov (a) a samíc (b) *H. abietis* chytených do pascí na všetky typy atraktantov

Výsledky modelu GLM boli testované pomocou ANOVA na detekciu rozdielov a ich veľkostí medzi rôznymi ošetreniami a lokalitami. Štatistické analýzy boli realizované v programe R (RStudio, verzia 1.1.423, © 2009 – 2018 RStudio, Inc., balík lme4, verzia 1.1-19, Boston, MA, USA).

#### **4.4. Experiment IV. Laboratórny experiment s *Beauveria bassiana* na *Hylobius abietis***

##### **Lokalita a materiál**

Experiment bol založený v laboratóriu na LOS v Banskej Štiavnici (48.464011, 18.904514). V laboratóriu bola pri pokuse konštantná teplota  $22 \pm 1$  °C.

Imága tvrdoňa smrekového boli na pokus chytané priebežne počas celej doby experimentov do lapacích kôr v Nízkych Tatrách (49.005810° N, 20.041072° E). Po odchyte boli imága umiestené do chladničky s teplotou 4°C po dobu vloženia k sadeniciam.

Sabourade dextrose agar (4 %) s nakultivovanou entomopatogénnou hubou *B. bassiana* sa vhodí do pripraveného roztoku vody 500 ml a zmáčadla 0,05 % (hmotn./obj.) Tween®80 vo vnútri 1000 ml reakčnej banky. Banka sa 60 sekúnd ručne pretrepávala a myceliálne zvyšky sa zo suspenzie odstránili filtráciou cez sterilnú 10 µm nylonovú membránu (Spectra Mesh®, Spectrum Chemical Mfg. Corp., New Brunswick, NJ, USA). Koncentrácia konídií bola stanovená pomocou Burkerovej počítacej komôrky a požadovaná koncentrácia zásobnej suspenzie bola získaná zriedením s 0,05 % (hmotn./obj.) Tween®80.

##### **Dizajn**

V laboratórnom teste s entomopatogénnou hubou *B. bassiana* sme zisťovali mortalitu imág spôsobenou hubou a vplyv huby na príjem potravy. Celkovo jeden experiment pozostával zo 150 imág (15 samcov a 15 samičiek), ktoré boli jednotlivo naočkované suspenziami konídií pri štyroch úrovniach koncentrácie ( $1 \times 10^5$  do  $1 \times 10^8$  konídií ml<sup>-1</sup>). Imága boli ošetrené ponorením do suspenzií počas 10 sekúnd a ďalšia skupina 15 samcov a 15 samičiek boli ošetrené sterilným 0,01 % (hmotn./obj.) Tween®80 ako kontrola. Nainfikované a kontrolné imága boli individuálne umiestnené v Petriho miskách (120 × 20 mm) s mokrým filtračným papierom na dne pri  $22 \pm 1$  °C a prirodzenou fotoperiódou. Do každej Petriho misky sa vložila čerstvá borovicová vetvička (približne 100 mm dlhá a 7 mm hrubá). Borovicové vetvičky, pred ich použitím ako potrava, boli

povrchovo dezinfikované germicídny (UV-C) ožarovaním počas 30 minút za aseptických podmienok v laminárnej prietokovej komore.

Imága boli monitorované 46 dní. Každé 3 alebo 4 dni bola zaznamenávaná úmrtnosť a 11., 22. a 33.dni sa vymieňala potrava za novú. Množstvo poškodenia potravou z vetvičiek sa vyhodnotilo modifikovanou metódou podľa Leather et al. (1994). Plocha poškodenia na vetvičkách sa merala za pomoci transparentného milimetrového papiera, ktorý sa prikladal na jednotlivé zožrané plochy kôry. Experiment sa uskutočnil v troch opakovaníach (príl. č.3).

Stupeň prerastania imág sa hodnotil vo všetkých experimentoch rovnako podľa nasledovnej stupnice:

Stupnica pre hodnotenie:

1 – živý, 2 – mŕtvy, bez prerastania, 3 – mŕtvy, prerastený do 1/3, 4 – mŕtvy, prerastený do 2/3, 5 – mŕtvy, prerastený viac ako 2/3

### Štatistická analýza

Letálne koncentrácie pre najvirulentnejšie kmene sa testovali pomocou ANOVA a post-hoc Tukeyho HSD testu na jednotlivé ošetrenia s porovnaním priemerov s hladinou významnosti ( $\alpha = 0,05$ ). Analýza sa vykonávala v programe Minitab 17® (© 2013 Minitab Inc., State College, PA, USA).

## 4.5. Experiment V. Vonkajšie testovanie *Beauveria bassiana* na smrekových sadeniciach

### Lokalita a materiál

Experiment bol založený vo vonkajších podmienka na LOS v Banskej Štiavnici (48.463993, 18.904599). Na simuláciu externých podmienok bola pripravená vonkajšia skúška na vyhodnotenie účinku *B. bassiana* na imága *H. abietis*. Dvojročné sadenice s obyčajného (vysoké 25 – 30 cm) sa vysádzali do kvetináčov (priemer 10 cm, objem 470 ml) a vo vonkajších podmienkach sa rovnomerne rozmiestnili (obr. 17).

### Dizajn

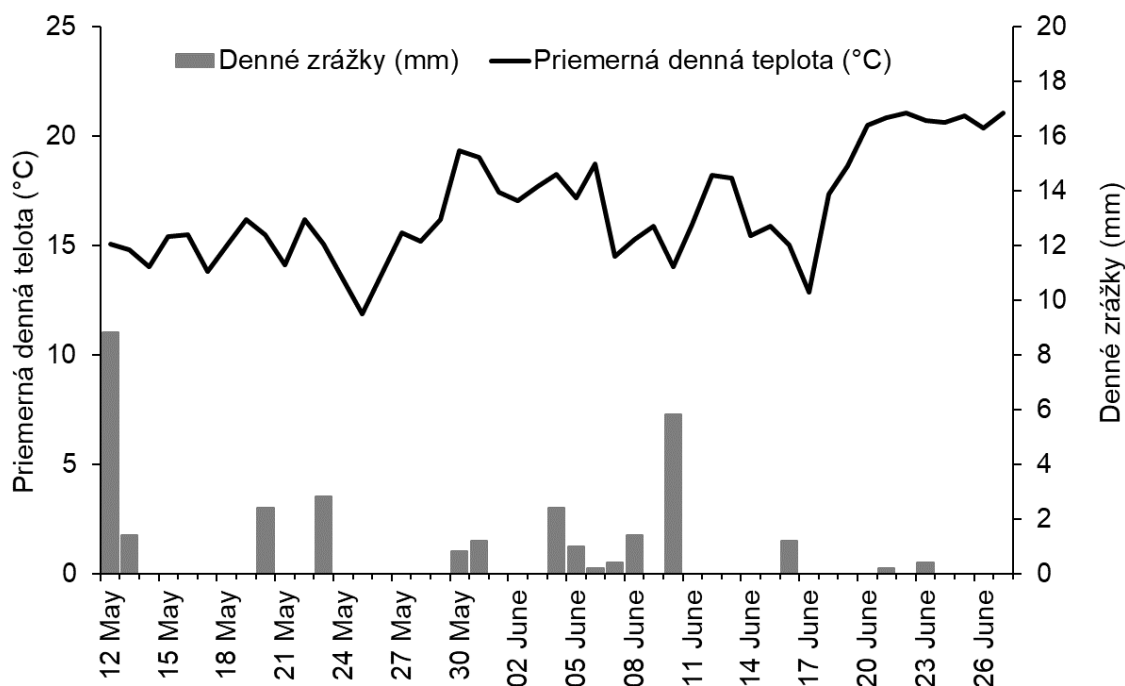
Skupina 147 sadeníc bola ošetrená suspenziou konídií ( $1 \times 10^8$  konídií ml  $\sim 1$ ) kmeňa AMEP20 pomocou ručného postrekovača Solo 402 s dýzou typu FE, ktorá rozprašovala kvapôčky s priemerom 300 um. Každá sadenica bola ošetrená 0,95 ml suspenzie. Skupina 21 sadeníc bola ošetrená sterilným 0,01 % (hmotn./obj.) Tween®80

ako kontrola. Ďalšia skupina 21 sadeníc bola tiež ošetrovaná sterilným 0,01 % (hmotn./obj.) Tween®80, ale k týmto sadeniciam boli pridané imága nainfikované entomopatogénnou hubou. Ku každej sadenici bolo pridané jedno imágo.



Obrázok 17. Vonkajšie testovanie účinku ošetrovaní smrekových sadeníc *Beauveria bassiana* proti žeru *Hylobius abietis*

Zasadené sadenice v črepníkoch boli prikryté valcovitým puzdrom z bieleho polyamidového pletiva (otvor 0,5 mm), aby sa zabránilo úniku dospelých *H. abietis*. V deň začatia experimentu (deň 0) bol do každej z 21 kontrolných sadeníc a 21 sadeníc ošetrovaných suspenziou vhozené jedno imágo *H. abietis* neurčeného pohlavia. Počas nasledujúcich šiestich dní (1. až 6. deň) sa každý deň infikovali ďalšie skupiny 21 sadeníc ošetrovaných suspenziou dospelými jedincami *H. abietis*. Spolu 147 jedincov ošetrovaných suspenziou a 21 kontrolných stromčekov bolo zamorených jediným *H. abietis*. V skupine 21 sadeníc postriekanej Tween®80 sa v deň 0 pridalo jedno k jednej sadenici, ktoré bolo ošetrované rovnakou suspenziou konídií ( $1 \times 10^8$ ) ako postriekané sadenice jediným *H. abietis*, ošetrovanie imág bolo zhodné ako je opísané pri teste v laboratórnych podmienkach. Mortalita *H. abietis* sa skontrolovala dvakrát v priebehu testu, 32 a 46 dní.



Obrázok 18. Denné údaje o teplote a zrážkach počas trvania experimentu

Vonkajší test sa začal 12. mája a skončil sa 27. júna 2018. Priemerná denná teplota sa pohybovala od 11,9 do 21,0 °C ( $\bar{X} = 16,7$  °C) počas biologického testu a denné celkové množstvo zrážok sa pohybovalo od 0 do 8,8 mm ( $\Sigma = 30,4$  mm) (obr. 18). Denné údaje o teplote a zrážkach sa získali z miestnej automatickej meteorologickej stanice na LOS.

### Štatistická analýza

Na testovanie životaschopnosti spór na sadeniciach bol použitý Chi-kvadrát test. Test sa použil na testovanie hypotézy, že neexistujú žiadne rozdiely ( $\alpha = 0,05$ ) vo výskyte úmrtnosti medzi imágami *H. abietis* priamo ošetrovanými suspenziou konídií a imágami vloženými ku sadeniciam ošetrovaných konídiami vo vonkajšom experimente. Analýza sa vykonávala s použitím Minitab 17® (© 2013 Minitab Inc., State College, PA, USA).

#### 4.6. Experiment VI. Laboratórny experiment s nosičmi nainfikovanými *Beauveria bassiana*

##### Lokalita a materiál

Experiment bol založený v laboratóriu na stanici LOS v Banskej Štiavnici (48.464011, 18.904514). V laboratóriu bola pri pokuse konštantná teplota  $22 \pm 1$  °C.

Na všetky experimenty boli použité imága tvrdoňa smrekového získané z terénnych podmienok z oblasti Nízkych Tatier (Lesná správa Liptovská Teplička, sever stredného Slovenska) z lesných porastov s dominantným zastúpením smreka *P.abies* z nadmorskej výšky 800 – 1000 m. n. m. Imága boli získavané odchytom do lapacích kôr a následne boli prevezené do laboratórií. Imága boli skladované v chladničke pri teplote 4°C v boxoch s rozmerom 30 × 30 × 50 cm. Ako potrava boli v boxoch použité vetvy 20 až 25 cm dlhé kúsky z borovice lesnej (*Pinus sylvestris* L.). Pred každým pokusom sa najskôr sledoval zdravotný stav imág. Na pokus boli vyberané životaschopné imága s priemernou veľkosťou 12 mm. Imága boli ponechané v boxoch s predloženou potravou a vodou, boli vybrané len zreteľne zdravé a nepoškodené imága, ktoré javili známky rovnakej kondície. Na experimenty boli použité iba imága rovnakej veľkosti a v dobrej zdravotnej kondícii. Pohlavie sme určovali podľa rozdielnosti zadného sternitu samčeka od samičky podľa (Eidmann 1974).

Vo všetkých experimentoch bola použitá entomopatogénna huba *B. bassiana*, konkrétne kmeň AMEP20, ktorý sme vyselektovali v našej predošlej štúdií (Barta et al., 2019). Vývoj nosiča entomopatogénnych húb a jeho výroba prebiehala v laboratóriách LOS Banská Štiavnica (Národné lesnícke centrum, Lesnícky výskumný ústav) od roku 2015. Nosič entomopatogénnej huby *B. bassiana* je vyrobený z materiálu (šrot, múka, vajcia), na ktorom dokáže táto huba rásť a následne vytvárať spóry. Je v tvare gule o priemeru 25 mm. Jeho povrch je prerastený mycéliom húb, ktoré tvoria konídiá, ktoré sa zachytia na telo hmyzu a pri vhodných podmienkach ho usmrtia. Inkubácia nosiča prebieha nasledovne: vysterilizovaný nosič v autokláve sa zaleje suspenziou s koncentráciou konidií  $1 \times 10^{-8}$  a vloží sa do laminárneho boxu. Nosič sa 5 – 7 dní nechá inkubovať v úplnej tme, za túto dobu sa vytvorí na povrchu nosiča mycélium. Keď je vytvorené mycélium, zapne sa na nosič svetlo, čím simulujeme podmienky vhodné na sporuláciu. Po 5 – 7 dňoch ako je nosič osvetlený sa vytvoria konidiospóry, ktoré sú aktívne a po prichytení na hostiteľa začnú klíčiť a prerastú cez kutikulu do tela hostiteľa, a tým ho usmrtia. Takto pripravené nosiče sme následne vkladali ku chrobákovi alebo niektoré z nich boli vystavené nepriaznivým podmienkam.

## Dizajn

Na jeden experiment bolo celkovo použitých 60 Petriho misiek s rozmerom 200 × 30 mm (obr. 19). Do jednej Petriho misky bolo umiestnených 6 imág *H. abietis* (3 samce a 3 samice), samice boli na krovkách označené bielou farbou, aby sa dali rozlíšiť.

Celkovo bolo použitých 360 imág (180 samcov a 180 samíc). Pokus bol založený v laboratórnych podmienkach pri teplote  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  a relatívnej vlhkosti  $60 \pm 10\%$ .



Obrázok 19. Experiment s nosičmi prerastenými *Beauveria bassiana* a ich dopad na *Hylobius abietis* v laboratórnych podmienkach

Bolo spravených 6 blokov po 10 misiek v roku 2016 a 2018. V každom bloku boli nosiče ošetrené iným spôsobom aby sa simulovali rôzne nepriaznivé vplyvy (tab. 3).

Ako potrava imág bola v každej miske umiestnená borovicová vetvička dlhá 150 mm s priemerom od 7 do 12 mm a dva kusy mokrej buničiny. Potrava sa vymieňala každých 10 dní. Buničina sa pri výmene potravy opätovne namáčala. Pri výmene potravy sme na každú guľu nakvapkali pipetou 1 ml vody. Úmrtnosť imág a následné prerastenie mycéliom sa kontrolovalo každé 3 – 4 dni.

Tabuľka 3. Ošetrenia experimentu testujúce dopad *Beauveria bassiana* na úmrtnosť *Hylobius abietis* v laboratóriu

Popis	oznacenie	
	2016	2018
čerstvé nosiče pod žiadnym negatívnym vplyvom	Fresh	Fresh
nosiče vložené na 48 alebo 120 hodín pod UVC lampu	UVC 48 h	UVC 120 h
nosiče vložené do mrazničky na 48 alebo 120 hodín pri teplote -18°C	Frozen 48 h	Frozen 120 h
imága tvrdoňa smrekového boli umiestnené k nosičom na 24 hodín a následne premiestnené do sterilnej Petriho misky *	Beetles 24 h	Beetles 24 h
dva mesiace staré nosiče skladované v chladničke pri teplote 4 °C	Two months	Two months
kontrolné chrobáky bez gule	Control	Control

\* Po úmrtí imága v bloku D bolo toto odobrané od ostatných živých imág, aby sa zamedzilo kontaktu s ešte živými. Každé mŕtve imágo bolo umiestnené do zvlášť petriho misky s vlhkou buničinou a tam sa sledovalo prerastanie.

### Štatistická analýza

Účinky nosičov na úmrtnosť *H. abietis* v rokoch 2016 a 2018 sa analyzovali s použitím zovšeobecného lineárneho modelu (GLM) s binomickým rozdelením a spojovacou funkciou logit link. Model bol prispôsobený mortalite, ako závislej premenej a ošetreniu, ako nezávislej premennej. Odchýlka bola odhadnutá pre každé ošetrenie. Úmrtnosť sa označila nasledovne: 0 živé imága (vrátane mŕtvych imág bez mycélia); 1 mŕtvy chrobák prerastený mycéliom. Nezávislá premenná „pohlavie“ bola z modelu vylúčená, pretože táto premenná nemala žiadny vplyv na úmrtnosť ani v jednom z rokov experimentu ( $p = 1$ ). Dáta boli analyzované po 14 dňoch experimentu, napr. jedna kontrola (3 dni) predtým, ako pri jednom ošetrení zahynulo 100 % chrobákov. Ako kontrolné opatrenie slúžila skupina bez nosiča („kontrola“): 1. skontrolovať náhodnú prítomnosť/šírenie *B. bassiana* cez Petriho misky (PD); 2. úmrtnosť nesúvisiaca s napadnutím. Na základe toho sme predpokladali, že experiment sa uskutočnil v prostredí bez spór *Beauveria*. Ošetrenia sa porovnávali pomocou Tukeyovej metódy.

### 4.7. Experiment VII. Pokus s nosičom *Beauveria bassiana* v poloprirodných podmienkach

#### Lokalita a materiál

Experiment bol založený v poloprirodných podmienkach vo vonkajšom insektáriu na stanici LOS v Banskej Štiavnici (48.464089° N, 18.904954° E) od 5. júna 2018 do 30. augusta 2018. Imága tvrdoňa smrekového boli na pokus chytané priebežne počas celej doby experimentov do lapacích kôr v Nízkych Tatrách (49.005810° N, 20.041072° E). Po odchyte boli imága umiestnené do chladničky s teplotou 4°C po dobu vloženia k



sadeniciam. Na pokus boli vyberané životaschopné imága, s priemernou veľkosťou 12 mm. Imága boli ponechané v boxoch s predloženou potravou a vodou, boli vybrané len zreteľne zdravé a nepoškodené imága, ktoré javili známky rovnakej kondície. Imága boli dopĺňané každé dva týždne.

Sadenice na pokus dodal OZ Semenoles Liptovský Hrádok (LESY SR, š.p.). Boli použité 1,5 ročné krytokorenné sadenice s. obyčajného pestované v sadbovači s objemom bunky 90 cm<sup>3</sup>. Na pokus bolo použitých 20 chovných klietok o rozmere: výška 70 cm, šírka 50 cm a hĺbka 50 cm (obr. 20a). Dno klietok a rám je tvorený drevotrieskou. Rám je z troch strán tvorený sieťkou proti hmyzu, dvierka a vrch klietky sú vyplnené sklom. V každej klietke bol umiestnený črepník s rozmermi: výška 7 cm, šírka vrchná 40 × 40 cm a šírka spodná 32 × 32 cm, objem črepníka 10,08 l. Každý črepník bol naplnený substrátom pre ihličnaté dreviny KEKKILÄ PROFESSIONAL (Vantaa, Finland).

## Dizajn

Do 20 chovných klietok bolo zasadených 80 sadeníc smreka obyčajného (obr. 20a), 4 sadenice v jednej klietke. Sadenice boli zasadené do štvorca v rozstupe 25 cm a do stredu medzi sadenice bola umiestnená lapacia kôra. Neprehnutá kôra mala rozmer 10 × 20 cm, po prenutí 10 × 10 cm. Do každej klietky boli na začiatku pokusu umiestnené 4 imága *H. abietis*. Kontrola sadeníc sa vykonávala každé 2 týždne, vymieňala sa lapacia kôra a kontrolovala sa zožratá plocha na lapacej kôre a sadeniach za pomoci transparentného milimetrového papiera. Pri kontrole sa vkladali do klietok 4 nové imága, tie boli dopĺňané štyrikrát a staré imága sa tam ponechávali. Do 10 klietok bol do vnútra lapacej kôry umiestnený nosič s hubou *B. bassiana* (obr. 20b) a 10 klietok bolo bez nosiča (kontrola).

Na konci experimentu sa hľadali imága *H. abietis* a to tak, že sa substrát dôkladne prehrabal. Rozlišovali sa tri úrovne imág, a to živé, mŕtve a mŕtve so znakmi entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Mŕtve imága bez známk *B. bassiana* boli umiestňované samostatne do Petriho misky na navlhčenú buničinu aby vznikli vhodné podmienky na prerastenie. Imága sa takto ponechali jeden týždeň a zhodnotilo sa, či sa prejavila infekcia.



Obrázok 20. Experiment v poloprírodných podmienkach. a) vysadené sadenice pred pokusom, b) nosič v lapacej kôre s prerastenými imágami

### Štatistická analýza

V experimente sme analyzovali dve charakteristiky, a to množstvo skonzumovanej kôry na sadenici a lapacej kôre a úmrtnosť chrobákov.

#### *Účinnok na skonzumovanú plochu na sadeniciach a lapacej kôre*

Účinky nosičov s *B. bassiana* na veľkosť poškodenej plochy kôry ( $\text{mm}^2$ ) na sadeniciach a lapacích kôrach sme vyhodnotili pomocou dvojvýberového Welch-ovho t-testu. Predpoklad normality údajov sa testoval pomocou Shapiro-Wilkovho testu normality a predpoklad homogenity variácie pomocou Leveneho testu. Oba predpoklady boli porušené. Dáta boli preto transformované metódou Ordered Quantile normalizing transformation v programe R pomocou balíka *bestNormalize package* (Peterson 2019).

### *Mortalita Hylobius abietis*

Účinky *B. bassiana* na mortalitu *H. abietis* sa analyzovali pomocou logistickej regresie s funkciou logit link. Vstupné údaje boli v širokom binomickom formáte. Podiel chrobákov, ktorí uhynuli v dôsledku infekcie huby *Beauveria*, sa použil ako binomická fixná premenná. Prítomnosť/neprítomnosť nosiča s hubou bola nezávislá premenná. Ako váha sa použil celkový počet chrobákov v skupine.

Všetky údaje boli analyzované pomocou softvéru R 3.6.2 a RStudio 1.2.5033. balík lme4, verzia 1.1-19; Bates et al., 2015. Párové rozdiely priemeru LS vo všetkých modeloch vypočítali pomocou balíka lmerTest (verzia 3.0-1; Kuznetsova et al., 2017). Logistická regresia sa vyhodnocovala na stupnici pomerov logaritmu.

## **4.8. Experiment VIII. Testovanie nosiča entomopatogénnej huby v prírodných podmienkach**

### **Lokalita a materiál**

Experiment bol založený na LS Liptovská Teplička (48.957583, 20.112700) v nadmorskej výške 990 m n. m., s juhozápadnou expozíciou. Zastúpenie s. obyčajného bolo 100 %. Holiny vznikli po kalamitnej ťažbe na jeseň v roku 2018. Na výskumnú plochu boli umiestnené nosiče entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Umiestnenie nosičov do terénu bolo 17. júla 2019. Zber imág zo zemných pascí bol 23. – 26. júla 2019. Zber prebiehal dvakrát za deň, aby sme zamedzili dlhému pobytu imág spolu v pasci, a tým sekundárnej infekcie. Imága sme vybrali z pascí za pomocou pinzety a po každom odchytenom imágu sme pinzetu vydezinfikovali s 70 % etylalkoholom a utreli suchou buničinou. Imága zozbierané zo zemných pascí boli po vybratí umiestňované do Petriho misiek. Do jednej misky boli vložené maximálne 3 imága tvrdoňa smrekového. V miskách bola navlhčená buničina o veľkosti 2 × 2 cm, ktorá slúžila ako zdroj vody pre imága a potrava vo forme smrekovej kôry o veľkosti 2 × 2 cm. Misky s imágami boli označené písmenom bloku a číslami, ktoré opisovali postavenie pasce. Následne sa imága preniesli do laboratória, kde sme ich pravidelne sledovali. Kontrola bola vykonávaná v pondelok a vo štvrtok počas 8 týždňov. Teplota v laboratóriu bola 22±2°C a relatívna vlhkosť 60 %. Vlhkosť v miskách bola 90 % a viac. Ak sme počas kontroly zistili mŕtve imágo, tak sme ho odobrali od živých a následne bolo umiestnené do samostatnej misky, aby nedošlo k sekundárnej infekcií hubou. Do misky bola umiestnená navlhčená buničina, aby vznikli vhodné podmienky na prerastanie huby.



## Dizajn

Výskumná plocha bolo rozdelená do 4 blokov (obr. 21). Veľkosť jedného bloku bola približne  $15 \times 25$  m a vzdialenosť medzi jednotlivými blokmi 10 m. Vzdialenosť medzi jednotlivými kôrami alebo nosičmi bola 5 – 6 m v závislosti od terénu. Prvý blok bola kontrola. Tu sa nachádzalo 24 kusov lapacích kôr (4 rady po 6 kôr) bez nosiča. Medzi kôry bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade). V druhom bloku bolo umiestnených 24 nosičov (obr. 22c) (4 rady po 6 nosičov). Medzi nosiče bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade). Tretí blok pozostával z 24 nosičov, ku ktorým bol umiestnený atraktant (obr. 22b), v ktorom bol alfa-pinen s etylalkoholom v pomere 1 : 2 (4 rady po 6 nosičov). Medzi nosiče bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade). Štvrtý blok pozostával z 24 lapacích kôr, v ktorých bolo umiestnených 24 nosičov (4 rady po 6 nosičov) (obr. 22a). Medzi nosiče bolo osadených 20 zemných pascí (5 pascí v jednom rade).



Obrázok 21. Rozmiestnenie pascí po ploche na testovanie nosiča entomopatogénnej huby

Zemné pasce sa skladali z vedier s objemom 1,2 l s 10 otvormi (priemer 10 mm) v hornej časti lapača. Pasce mali vrchnáky a boli zakopané do zeme tak, aby otvory, cez ktoré mohli vchádzať imága, boli na povrchu pôdy. Ako atraktany do každej pasce boli použité borovicové vetvičky (dlhé 50 mm a priemer  $12 \pm 2$  mm), ktoré boli odrezané z jediného 50-ročného stromu *P. sylvestris*. Vetvička bola umiestnená do pasce a vedľa nej bola umiestnená 20 ml fľaša obsahujúca etylalkohol. Vrchnák fľaše mal šesť otvorov s



priemerom 2 mm a jeden otvor s priemerom 4 mm. Steny zemných pascí sme nastriekli teflonovým sprejom, ktorý po uschnutí na stenách spôsobil, že imága sa nevedeli po stenách pasce vyšplhať a odísť z pasce.



Obrázok 22. a) lapacia kôra s nosičom, b) nosič s atraktantom, c) samostatný nosič, d) zakrytý nosič chránený pred UV žiarením, e) výskumná plocha, f) pasca s odchytenými imágami

Tabuľka 4. Ošetrenia experimentu testujúceho vplyv *Beauveria bassiana* na úmrtnosť *Hylobius abietis* v prírodných podmienkach

Popis	Označenie
samostatný nosič bez prirodzeného alebo syntetického atraktantu	Carrier
nosič pri ktorom bol umiestnený syntetický atraktant	Atractant
nosič umiestnený v lapacej kôre	Bark
kontrolný blok bez nosičov	Control
imága pozbierané priamo z lapacích kôr	BeetleBark

### Štatistická analýzy

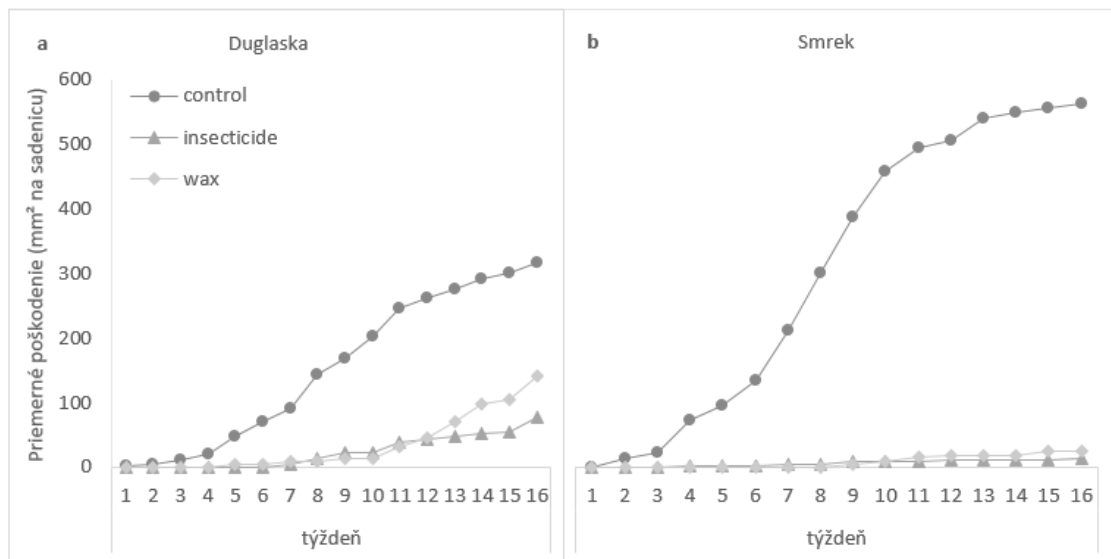
Účinky každého ošetrenia (tab. 4) na mortalitu *H. abietis* sa analyzovali pomocou GLM s binomickým rozdelením a spojovacou funkciou logit link. Mortalita vstupovala do modelu ako závislá premenná a ošetrenie ako nezávislá premenná. Mortalita bola označená ako: 0 živé alebo mŕtve imága bez prerastenia; 1 mŕtve imága prerastené *B. bassiana*. Mortalita bola analyzovaná uprostred a na konci experimentu. Liečby sa porovnávali pomocou Tukeyovej metódy.

## 5. Výsledky

### 5.1. Experiment I. Poloprírodný experiment s rôznymi ochrannými metódami proti *Hylobius abietis*

Pokus v roku 2016

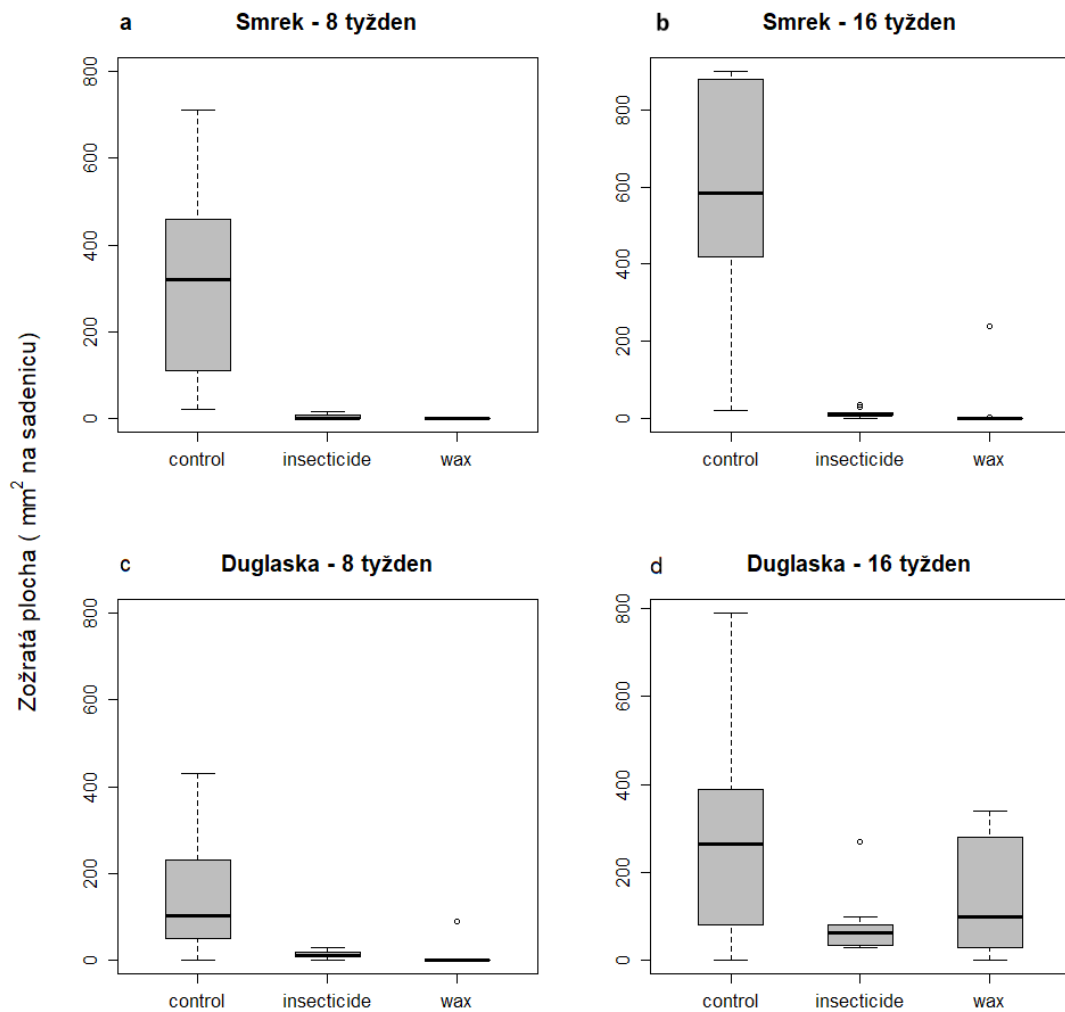
Ošetrenie voskom aj insekticídmi významne znížilo poškodenú plochu kôry zapríčinenú žerom tvrdou smrekovým (obr. 23 a, b). Po 8 týždňoch trvania pokusu poškodenie sadeníc smreka obyčajného bolo priemerná plocha kŕmnych jamiek (vosk = 0,4 mm<sup>2</sup>, insekticíd = 4,5 mm<sup>2</sup>; obidve  $p < 0,001$ ) a sadeníc duglasky tisolistej (vosk = 9,0 mm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ; insekticíd 12,8 mm<sup>2</sup>,  $p = 0,006$ ) v porovnaní s kontrolou (smrek = 301,2 mm<sup>2</sup>, duglaska = 144,5 mm<sup>2</sup>) (obr. 24 a, c). Priemerná plocha kŕmnych jamiek bola nižšia u voskovaných sadeníc ako u sadeníc ošetrených insekticídmi (smrek:  $p = 0,074$ , duglaska:  $p < 0,001$ ).



Obrázok 23. Týždenné zmeny poškodenia kmeňkov *Hylobius abietis* na neošetrených sadeniciach (kontrola), ošetrených voskom KVA AE, insekticídmi Vaztak. a) sadenice duglasky tisolistej, b) sadenice smreka obyčajného

Na konci experimentu (16. týždeň) boli účinky ošetrenia na plochu kŕmnych jamiek významné iba pre sadenice s. obyčajného (kontrola = 562,2 mm<sup>2</sup>, vosk = 24,0 mm<sup>2</sup>, insekticíd = 13,6 mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$  pre obidve ošetrenia). Priemerná plocha kŕmnych jamiek bola nižšia u ošetrených sadeníc d. tisolistej ako u kontrolných sadeníc, ale účinky neboli štatisticky významne odlišné (kontrola = 317,0 mm<sup>2</sup>, vosk = 141,5 mm<sup>2</sup>, insekticíd = 76,7 mm<sup>2</sup>;  $p > 0,1$  pre obidve ošetrenia) (obr. 24 b, d).





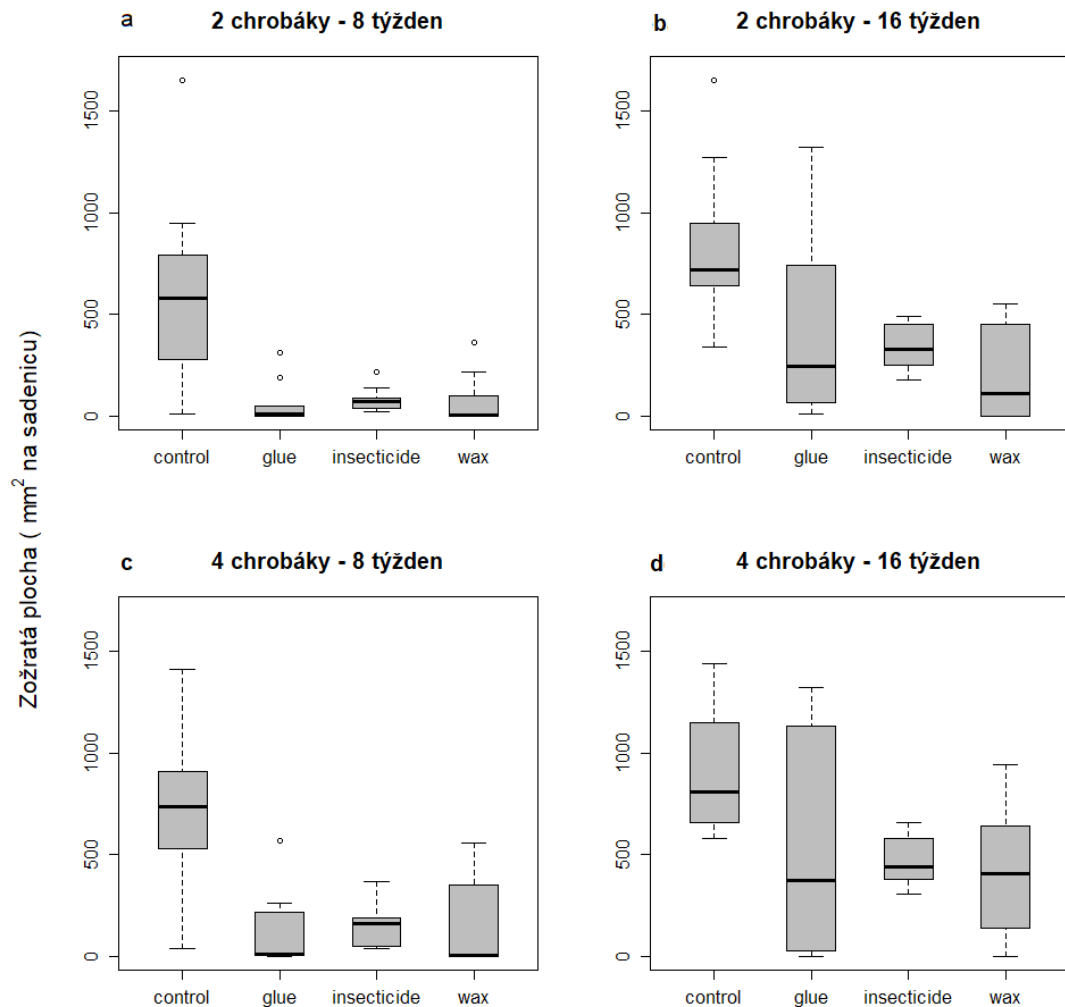
#### Ošetrenie

Obrázok 24. Plocha poškodená kŕmením *Hylobius abietis* na kmienkoch sadeníc neošetrených (kontrola), ošetrených voskom KVAAE, alebo insekticídnom Vaztak sadenice duglasky tisolistej (a a b) alebo sadenice smreka obyčajného (c a d) v 8. týždni a 16. týždni v pokuse 2016 (hrubá čiara medián; boxplot.25 % a 75 %; stĺpce minimum a maximum)

Voskový povlak fungoval lepšie ako insekticíd na oboch druhoch rastlín po 8 týždňoch, ale na konci experimentu bola plocha kŕmnych jamiek pri ošetrení insekticídmi menšia ako pri sadeniciach ošetrených voskom. Priemerná plocha jamiek po kŕmení v 16. týždni bola významne vyššia u kontrolných sadeníc smreka obyčajného ako u kontrolných sadeníc duglasky. Oproti tomu ošetrené sadenice smreka boli významne menej poškodené ako ošetrené sadenice duglasky. Počas experimentu u v dôsledku kŕmenia dve sadenice smrekov a jedna sadenica duglasky (všetky neošetrené).

Počas výmeny chrobákov sme našli 131 mŕtvych chrobákov z celkového počtu 160 chrobákov použitých v experimente (úmrtnosť = 81,9 %).

*Pokus v roku 2017*

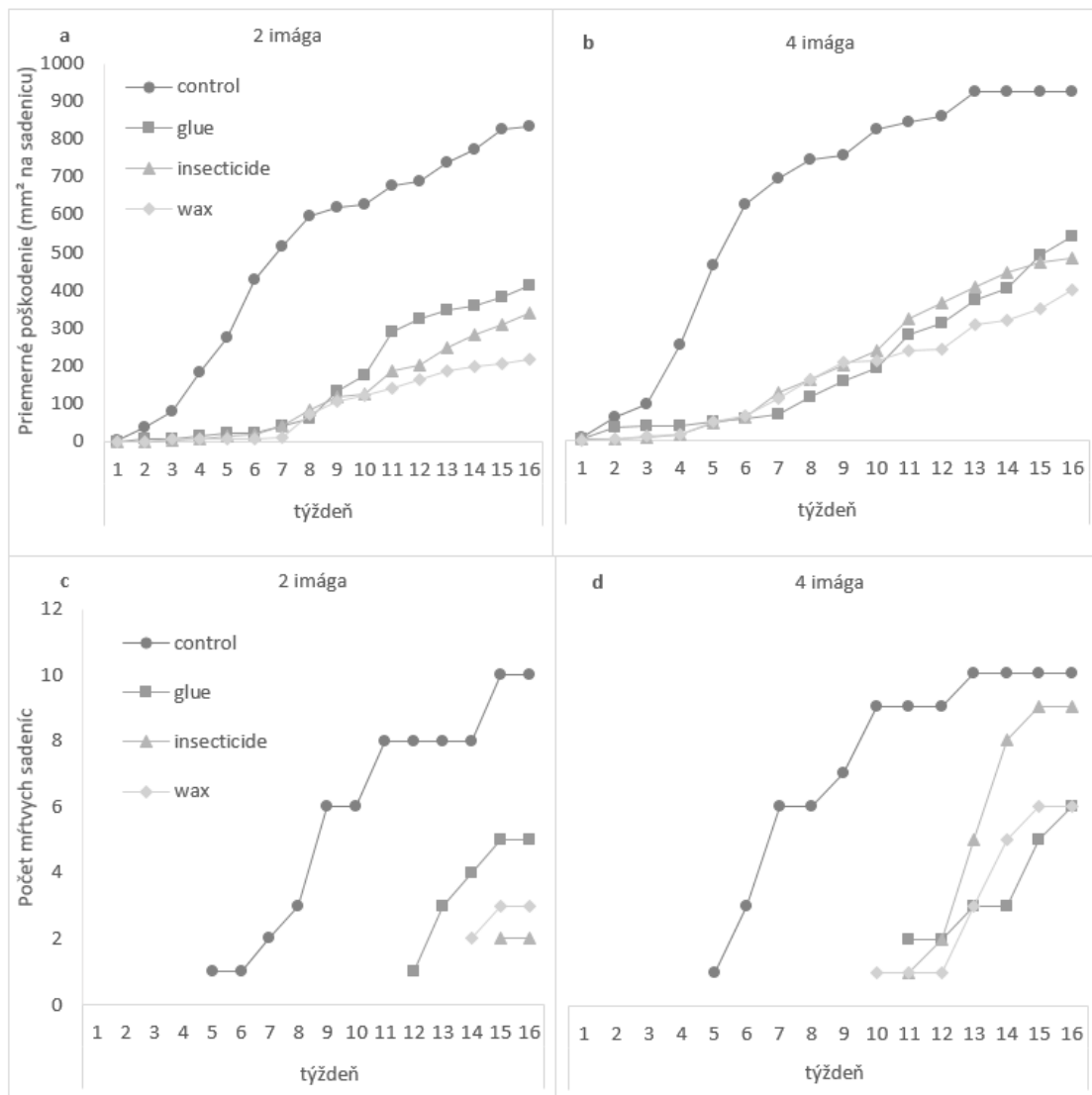


Ošetrenie

Obrázok 25. Plocha poškodená kŕmením *Hylobius abietis* na kmienkoch sadeníc neošetrených (kontrola), ošetrených insekticídnom Vaztak, ošetrenými lepidlom Vermifix a voskom KVA AE na smrekových sadenicích pri dvoch imágach (a a b), štyroch imágach (c a d), 8. týždeň a 16. týždeň v pokuse 2017 (hrubá čiara medián; boxplot.25 % a 75 %; stĺpce minimum a maximum)

V kliečkach s 2 a 4 imágami tvrdoňa smrekového bolo poškodenie sadeníc kŕmnymi jamkami po 8. týždňoch výrazne nižšie u ošetrených sadeníc smreka obyčajného (priemerná plocha kŕmných jamiek s dvomi tvrdoňmi: lep = 58,5 mm<sup>2</sup>, p <0,001;

insekticíd = 81,0 mm<sup>2</sup>, p = 0,028; vosk = 71,2 mm<sup>2</sup>, p <0,001; so štyrmi tvrdoňmi: lep = 110,5 mm<sup>2</sup>, p = 0,017; insekticíd = 157,0 mm<sup>2</sup>, p = 0,049; vosk = 159,5 mm<sup>2</sup>, p <0,001) a poškodenie kontrolných sadeníc (2 tvrdone = 594,0 mm<sup>2</sup>; 4 tvrdone = 737,0 mm<sup>2</sup>) (obr. 25 a, c.). Plocha kŕmnych jamiek bola menšia u sadeníc ošetrených lepidlom a voskom ako u sadeníc ošetrených insekticídmi.



Obrázok 26. Týždenné zmeny poškodenia kmienkov od *Hylobius abietis* na neošetrených sadeniciach (kontrola), ošetrených insekticídmi Vaztak, ošetrenými lepidlom Vermifix a voskom KVA AE v kliečkach s dvoma dospelými (a) alebo štyrmi dospelými (b) a zmeny v počte sadeníc, ktoré uhynuli v kliečkach s dvoma (c) alebo štyrmi dospelými (d) v pokuse 2017

V kliečkach s 2 tvrdoňmi bolo poškodenie kmienkov kŕmnymi jamkami po 16. týždňoch významne nižšie u sadeníc s obyčajného ošetrených voskom a významné aj keď nie

signifikantne. Bol zistený rozdiel aj u sadeníc ošetrených insekticídmi (dva tvrdone: lep = 412,5 mm<sup>2</sup>, p = 0,038; insekticíd = 339,0 mm<sup>2</sup>, p = 0,174; vosk = 217,2 mm<sup>2</sup>, p < 0,001). V kliečkach so 4 tvrdoňmi boli významne nižšie poškodenia zaznamenané na sadenicích ošetrených lepom a voskom: lep = 533 mm<sup>2</sup>, p = 0,017; insekticíd = 477 mm<sup>2</sup>, p = 0,318; vosk = 394 mm<sup>2</sup>, p = 0,019) (obr. 25 b, d) v porovnaní s kontrolnými sadenicami (2 tvrdone = 835 mm<sup>2</sup>; 4 tvrdone = 913 mm<sup>2</sup>). Plocha kŕmnych jamiek bola menšia u sadeníc ošetrených voskom (2 tvrdone: p = 0,002; 4 tvrdone: p = 0,028) ako u sadeníc ošetrených insekticídmi.

Obe ošetrenia znížili poškodenie kmeňkov sadeníc voči neošetreným sadenicám (obr. 26 a, b). Kontrolné sadenice začali odumierať skôr ako ošetrené sadenice. Na konci experimentu boli všetky kontrolné sadenice mŕtve, s dvoma aj štyrmi imágami v kliečke (obr. 26 c, d). S dvoma dospelými v kliečke odumrela polovica sadeníc ošetrených lepidlom do 16. týždňa, ale iba tri sadenice odumreli ošetrením voskom a iba dve odumreli pri ošetrení insekticídmi (obr. 26 c). Do 16. týždňa so štyrmi dospelými v kliečke odumrelo vysoké percento ošetrených sadeníc (obr. 26 d).

Počas výmeny imág sme našli 88 mŕtvych chrobákov z celkového počtu 160 chrobákov použitých v kliečkach s dvoma chrobákmi (úmŕtnosť = 55,0 %); z celkového počtu 320 chrobákov použitých v kliečkach so 4 chrobákmi sme našli 184 mŕtvych chrobákov (úmŕtnosť = 57,5 %).

## **5.2. Experiment II. Terénny experiment s rôznymi ochrannými metódami proti**

### ***Hylobius abietis***

Výsledky terénneho experimentu s rôznymi ošetreniami sadeníc proti zrelostnému a úživnému žeru sadeníc ukazuje, že ošetrenia dokážu znížiť poškodenie a mortalitu sadeníc. Ošetrenie sadeníc a ich prvé meranie bolo uskutočnené 9. apríla 2018 a hodnotenie poškodenia a prežívanie sadeníc bolo vykonávané 10. októbra 2018. Ošetrovanie sadeníc lepom Vermifix a insekticídmi Vaztak sa aplikovalo opakovane každé dva mesiace. Zo 606 sadeníc, ktoré boli vysadené v 10 blokoch po 60 sadeníc (v niektorých prípadoch sa vyskytlo 11 sadeníc v rade) sa z hodnotenia vylúčili sadenice, ktoré uhynuli z dôvodu poškodenia lykokazom *Hylastes*, z dôvodu sucha alebo z nesprávneho uskladnenia sadeníc pred výsadbou (tab.5).

Tabuľka 5. Počet sadeníc po jednotlivých ošetreniach, množstvá sadeníc, ktoré uhynuly

Ošetrovanie	Počet sadeníc	vylúčené sadenice	sadenice usmrtené Hylastesom	sadenice a mŕtve z iného dôvodu	sadenice použité do výsledkov	mŕtve sadenice 10.10.2018	% z mŕtvych
<b>Kontrola</b>	101	22	9	13	79	24	30,8
<b>Vaztak</b>	100	10	1	9	90	15	16,7
<b>Vermifix</b>	101	19	5	14	82	5	6,1
<b>Golieriky</b>	102	20	16	4	82	12	14,6
<b>starý vosk typ C</b>	100	37	13	24	63	2	3,2
<b>nový vosk typ F</b>	102	18	8	10	84	0	0
<b>Celkom</b>	<b>606</b>	<b>126</b>	<b>52</b>	<b>63</b>	<b>480</b>	<b>58</b>	

Najviac poškodzované sadenice boli kontrolné sadenice (neošetrené). Toto potvrdzuje množstvo odumretých sadeníc v deň jesenného merania (58 ks) ako aj priemerná poškodená plocha na jednu sadenicu, 168,4 mm<sup>2</sup>. Najvyššie poškodenie spomedzi ošetrovaných sadeníc dosiahla ochrana za pomoci golierikov. Priemerné poškodenie na sadenicu bolo 31,3 mm<sup>2</sup>. Nasledovalo ošetrovanie lepom Vermifix (25,2 mm<sup>2</sup>), insekticídom Vaztak (23,7 mm<sup>2</sup>) a starým voskom typ C (13,2 mm<sup>2</sup>). Najmenej poškodzované boli sadenice ošetrované novým voskom typ F (1,3 mm<sup>2</sup>) (tab. 6).

Tabuľka 6. Priemerná poškodená plocha a smerodajná odchýlka sadeníc ošetrovaných rôznymi metódami

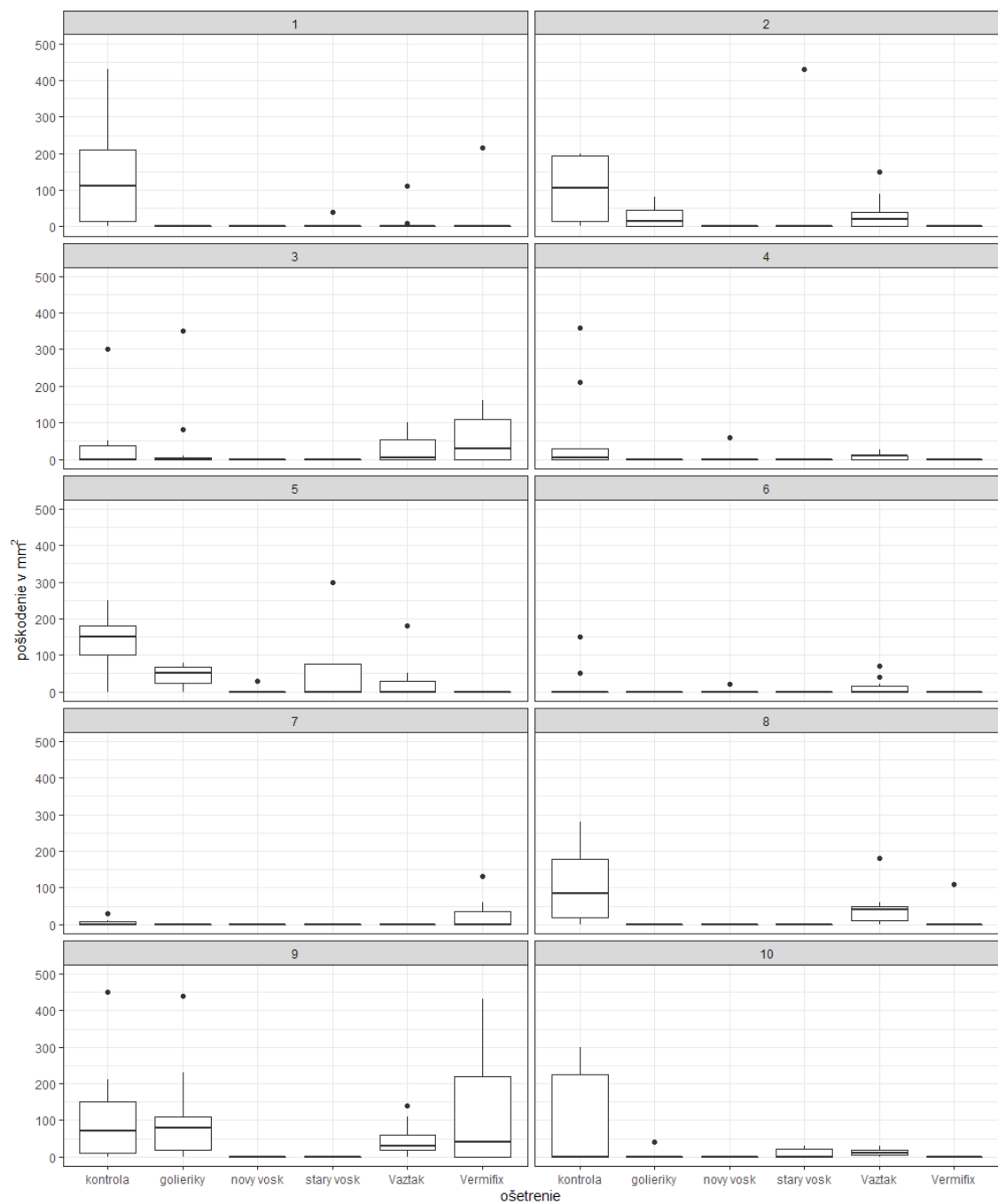
Ošetrovanie	priemerné poškodenie v mm <sup>2</sup>	smer. odchýlka
<b>Kontrola</b>	81,3	112.6
<b>Vaztak</b>	23.7	39.7
<b>Vermifix</b>	25.2	68.6
<b>Golieriky</b>	23.8	69.2
<b>starý vosk typ C</b>	13.2	65.7
<b>nový vosk typ F</b>	1.3	7.6

Rozdelenie poškodenia po jednotlivých blokoch sa značne odlišovalo (obr. 27). Vo všetkých blokoch bola najviac poškodzovaná kontrola (obr. 28). Najmenej poškodzované ošetrovanie bolo novým voskom typu F. Niektoré poškodenia sa v rámci ošetrovaní po blokoch odlišovali. Toto mohlo byť spôsobené aplikáciou daného ošetrovania (tab 7). Ako najviac konzistentné sa ukázalo ošetrovanie novým voskom.

Tabuľka 7. Odhadované parametre účinku ošetrovania na kontrole pri poškodení *Hylobius abietis* voči ošetrovaným sadeniciam

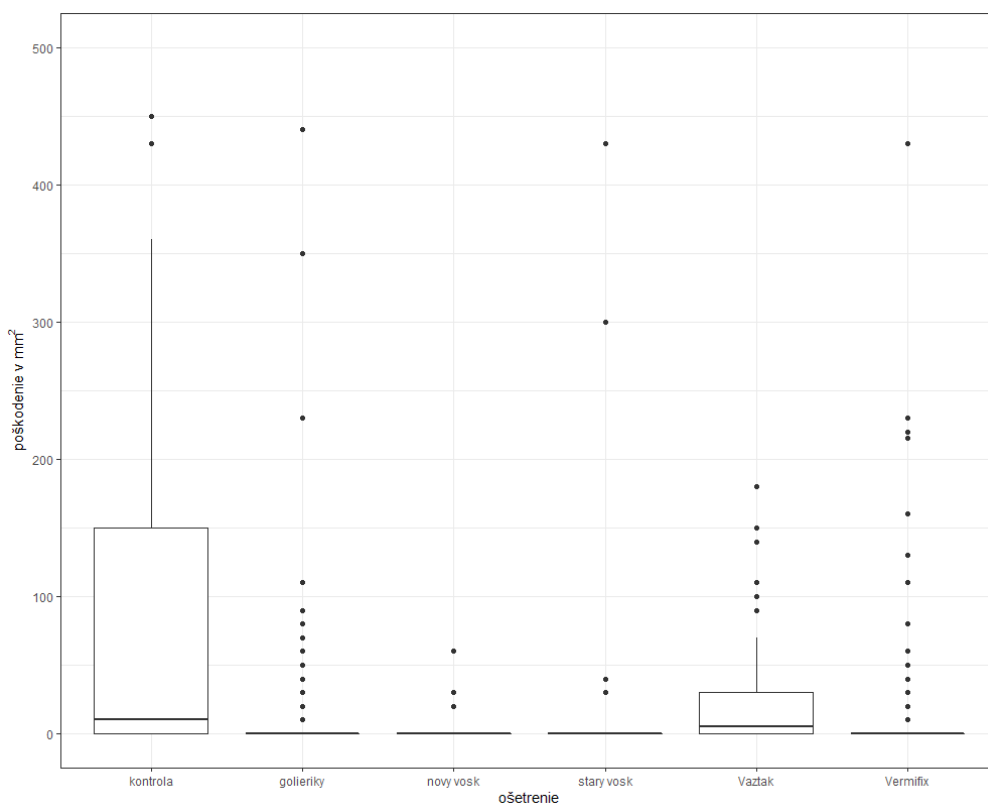
Ošetrovanie	odd-ratios	2.50 %	97.50 %	z val.	p
<b>kontrola (Intercept)</b>	66.512	40.712	108.663	16.76	<0.0001
<b>Golieriky</b>	0.295	0.281	0.311	-46.882	<0.0001
<b>nový vosk</b>	0.016	0.013	0.02	-42.809	<0.0001
<b>starý vosk</b>	0.152	0.142	0.164	-50.924	<0.0001
<b>Vaztak</b>	0.28	0.266	0.294	-50.861	<0.0001
<b>Vermifix</b>	0.301	0.286	0.316	-47.289	<0.0001

Stupeň korelácie medzi triedami bol 0.39 (SD 0.79). To znamená, že 39 % variácie výslednej premennej môže byť pripočítaných zoskupením údajov do blokov. Preto sme použili viacúrovňový – hierarchický všeobecný model.



Obrázok 27. Poškodenie sadeníc ošetrených rôznymi metódami žerom *Hylobius abietis* po jednotlivých blokoch





Obrázok 28. Histogram rozdelenia poškodenia podľa ošetrení

Tabuľka 8. Parametre porovnania rôznych typov ošetrení

Contrast	Ratio	SE	z.ratio	p.value
kontrola/golieriky	3.3858	0.08808	46.882	<.0001
kontrola/nový vosk	61.4605	5.91273	42.809	<.0001
kontrola/starý vosk	6.5658	0.24263	50.924	<.0001
kontrola/Vaztak	3.5758	0.08958	50.861	<.0001
kontrola/Vermifix	3.3277	0.0846	47.289	<.0001
golieriky/nový vosk	18.1527	1.77976	29.566	<.0001
golieriky/starý vosk	1.9392	0.08044	15.966	<.0001
golieriky/Vaztak	1.0561	0.03323	1.736	0.5075
golieriky/Vermifix	0.9829	0.03107	-0.547	0.9942
nový vosk/starý vosk	0.1068	0.01085	-22.029	<.0001
nový vosk/Vaztak	0.0582	0.00569	-29.084	<.0001
nový vosk/Vermifix	0.0541	0.0053	-29.795	<.0001
starý vosk/Vaztak	0.5446	0.02232	-14.829	<.0001
starý vosk/Vermifix	0.5068	0.02086	-16.512	<.0001
Vaztak/Vermifix	0.9306	0.02878	-2.326	0.1836

Pomocou Tukeyovej metódy pre viacnásobné porovnanie sme zistili, že väčšina ošetrení sa od seba významne odlišuje, p hodnota < 0,0001 okrem porovnania medzi ošetreniami golieriky/Vaztak, golieriky/Vermifix, Vaztak/Vermifix, kde bola p hodnota > 0,05 a kde efekt ošetrenia nebol významne odlišný (tab.8).

### 5.3. Experiment III. Použitie zemných pascí na odchyt imág *Hylobius abietis*.

Hlavnými druhmi odchytenými v zemných pasciach boli *H. abietis* a *H. pinastri*. Celkovo bolo vo všetkých zemných pasciach na všetkých lokalitách zachytených 8266 imág *H. abietis* a 2040 imág *H. pinastri*. Počet *H. abietis* odchytených na lokalite a pre každý typ atraktantu korelovala s počtom *H. pinastri* odchytených na mieste a pre každý typ atraktantu ( $y = 10,08 + 0,20x$ ,  $r = 0,90$ ;  $p = 0,0000$ ;  $r^2 = 0,81$ ). Počet odchytených dospelých jedincov (spolu oba druhy) bol najvyšší pri borovicovej vetvičke + etanol (tab. 9). Spomedzi chemických atraktantov bol počet odchytených dospelých jedincov (celkovo oboch druhov) najvyšší pri použití alfa-pinénu + etanol, po ktorom nasledoval Hylodor, potom terpentínový olej + etanol (separovaný); toto číslo bolo najnižšie pri terpentínovom oleji + etanol (kombinované) (tab. 9).

Tabuľka 9. Počty *Hylobius abietis* a (/) *Hylobius pinastri* v pasciach na jednotlivých študijných lokalitách navnadených rôznymi atraktantami

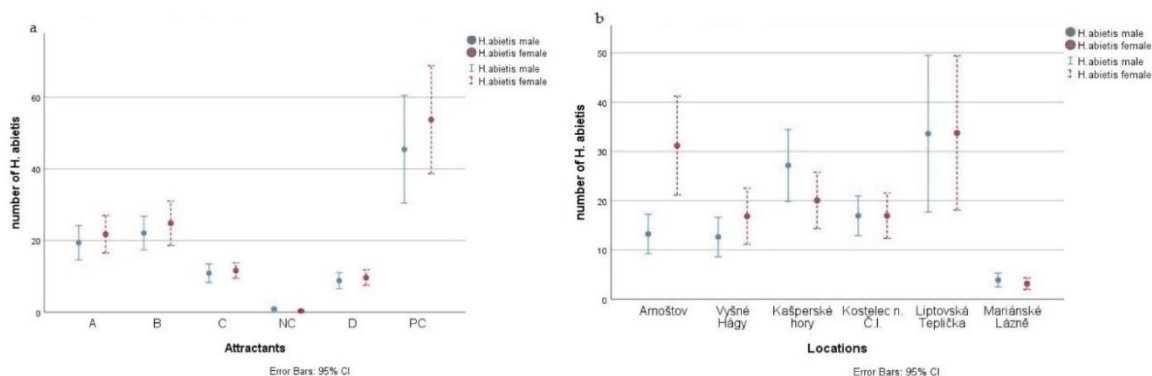
Lokalita	Atraktant					
	Hylodor	Alpha-Pinene + Etanol	Terpentínový olej +Etanol oddelene	Terpentínový olej +Etanol spolu	Negatív. kontrola	Bor. vetvička + Etanol
Arnoštov	269/38	405/74	137/9	102/2	8/0	681/144
Vyšné Hágy	150/72	265/96	130/48	59/9	1/0	449/185
Kašperské Hory	343/79	273/54	205/63	205/76	23/0	656/202
Kostelec n. Č.L	228/72	286/65	200/51	139/37	0/0	367/95
Lip. Teplička	456/88	416/80	103/18	137/35	9/0	1310/226
Mar. Lázně	34/7	47/17	32/10	22/18	2/0	117/69
<b>Spolu</b>	1480/356	1692/387	807/199	664/177	43/0	3580/921

Pomer pohlavia *H. abietis* sa medzi lokalitami líšil. Dve lokality mali pohlavný pomer 50 : 50, dve mali viac samčekov ako samičiek a dve mali viac samičiek ako samčekov (tab. 10). Na všetkých lokalitách bol priemerný počet odchytených imág na ha > 14 000 pre *H. abietis* a > 3 000 odchytených imág *H. pinastri* (tab. 10). Počet dospelých odchytených imág *H. abietis* sa výrazne líšil medzi lokalitami, najvyšší počet bol v Liptovskej Tepličke a najnižší v Mariánských Lázních (tab. 10).

Tabuľka 10. Počet samčekov a samičiek a populačné hustoty *Hylobius abietis* a *Hylobius pinastri* (obidve pohlavia) odchytených na jednotlivých lokalitách (\* priemer)

Lokality	Počet odchytených samčekov <i>H. abietis</i>	Počet odchytených samičiek <i>H. abietis</i>	Pomer pohlavia samcov : samíc	Celkový počet odchytených <i>H. abietis</i>	Počet odchytených <i>H. abietis</i> /Ha	Celkový počet odchytených <i>H. pinastri</i>	Počet odchytených <i>H. pinastri</i> /Ha
Arnoštov	480	1122	30:70	1602	16 584	267	2764
Vyšné Hágy	456	598	43:57	1054	10 910	411	4255
Kašperské Hory	979	726	57:43	1705	17 650	474	4907
Kostelec n. Č.L.	610	610	50:50	1220	12 630	320	3313
Liptovská Teplička	1212	1219	50:50	2431	25 165	447	4627
Mariánské Lázně	140	114	55:45	254	2630	121	1253
<b>Celkom priemer</b>	<b>3877</b>	<b>4389</b>	<b>47:53 *</b>	<b>1378</b>	<b>14 261*</b>	<b>340</b>	<b>3520 *</b>

Počet odchytených jedincov sa medzi lokalitami a atraktantmi výrazne líšil (obr. 29, obr. 30). Odchyt bol najvyšší pri vetvičke borovice + etanol. Odchyty boli v priemere podobné pri Hylodore a alfa-pinéne + etanol, ale Hylodor zaznamenal na niektorých lokalitách (Kašperské Hory, Liptovská Teplička) vyššie odchyty a naopak alfa-pinéne + etanol zaznamenal na iných lokalitách vyššie odchyty (Arnoštov, Vyšné Hágy, Kostelec n. Č. L., Mariánské Lázně). Odchyty boli významne nižšie u terpentínového oleja + etanol (oddelené) a terpentínového oleja + etanol (kombinované) ako u borovicovej vetvičky + etanol, Hylodoru alebo alfa-pinénu + etanol.



Obrázok 29. Počet (priemer  $\pm$  SE) *Hylobius abietis* v pasci s jednotlivými atraktantmi, a) na všetkých lokalitách, b) na jednotlivých lokalitách so všetkými atraktantmi vrátane kontroly

Na všetkých lokalitách bol odchyt najvyšší na začiatku mája a potom postupne klesal. Na konci experimentu bolo v každej lokalite zachytených iba niekoľko jedincov (obr. 30).

Tabuľka 11. Párové porovnanie účinnosti atraktantov pri odchyťovaní samčiekov *Hylobius abietis* (na základe počtu jedincov odchytených na všetkých lokalitách)

Atraktanty pár	Absolútny rozdiel	Štandardná chyba	z-hodnota	p-hodnota
<b>B-A</b>	0.4400	0.1471	2.991	<0.02791 *
<b>C-A</b>	-0.4595	0.1844	-2.492	0.10974
<b>NC-A</b>	-2.5390	0.4241	-5.987	<0.001 ***
<b>D-A</b>	-0.7198	0.2005	-3.591	<0.00368 **
<b>PC-A</b>	0.9268	0.1355	6.838	<0.001 ***
<b>C-B</b>	-0.8995	0.1712	-5.254	<0.001 ***
<b>NC-B</b>	-2.9789	0.4185	-7.118	<0.001 ***
<b>D-B</b>	-1.1598	0.1884	-6.155	<0.001 ***
<b>PC-B</b>	0.4868	0.1170	4.162	<0.001 ***
<b>NC-C</b>	-2.0794	0.4330	-4.802	<0.001 ***
<b>D-C</b>	-0.2603	0.2188	-1.190	0.82316
<b>PC-C</b>	1.3863	0.1614	8.591	<0.001 ***
<b>D-NC</b>	1.8192	0.1614	4.133	<0.001 ***
<b>PC-NC</b>	3.4657	0.4146	8.360	<0.001 ***
<b>PC-D</b>	1.6466	0.1795	9.171	<0.001 ***

(Signif. codes: 0 '\*\*\*'; 0.001 '\*\*'; 0.01 '\*')

A – Hylodor, B – Alfa-pinene + etanol 70 % 1 : 2, C–Terpentínový olej +etanol 70 % oddelene, D – Terpentínový olej + etanol 2 : 1, NC – Negatívna kontrola, PC – Borovicová vetvička+ etanol

Tabuľka 12. Párové porovnanie účinnosti atraktantov pri odchyťovaní samičiek *Hylobius abietis* (na základe počtu jedincov odchytených na všetkých lokalitách)

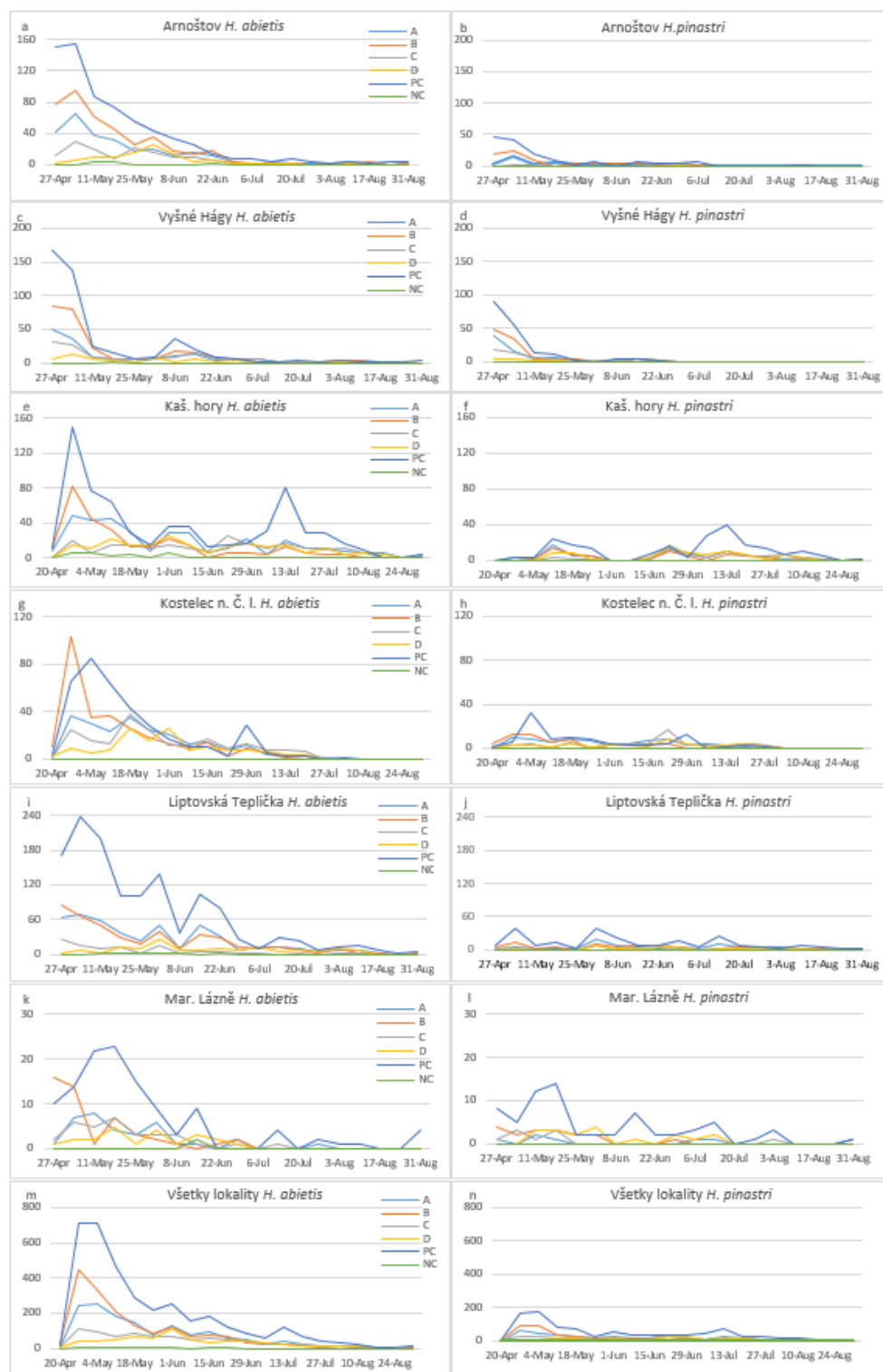
Atraktanty pár	Absolútny rozdiel	Štandardná chyba	z-hodnota	p-hodnota
<b>B-A</b>	0.39330	0.09315	4.222	<0.001 ***
<b>C-A</b>	-0.77405	0.12813	-6.041	<0.001 ***
<b>NC-A</b>	-4.56954	0.71076	-6.429	<0.001 ***
<b>D-A</b>	-1.08830	0.14341	-7.589	<0.001 ***
<b>PC-A</b>	0.92557	0.08506	10.882	<0.001 ***
<b>C-B</b>	-1.16736	0.12138	-9.618	<0.001 ***
<b>NC-B</b>	-4.96284	0.70957	-6.994	<0.001 ***
<b>D-B</b>	-1.48160	0.13741	-10.782	<0.001 ***
<b>PC-B</b>	0.53227	0.07450	7.145	<0.001 ***
<b>NC-C</b>	-3.79549	0.71501	-5.308	<0.001 ***
<b>D-C</b>	-0.31425	0.16316	-1.926	0.337
<b>PC-C</b>	1.69963	0.11528	14.744	<0.001 ***
<b>D-NC</b>	3.48124	0.71790	4.849	<0.001 ***
<b>PC-NC</b>	5.49512	0.70856	7.755	<0.001 ***
<b>PC-D</b>	2.01388	0.13205	15.251	<0.001 ***

(Signif. codes: 0 '\*\*\*'; 0.001 '\*\*'; 0.01 '\*')

A – Hylodor, B – Alfa-pinene + etanol 70 % 1 : 2, C–Terpentínový olej +etanol 70 % oddelene, D – Terpentínový olej + etanol 2 : 1, NC – Negatívna kontrola, PC – Borovicová vetvička+ etanol

Párové porovnanie účinnosti atraktantov pri odchyťovaní *H. abietis* (na základe počtu jednotlivcov podľa pohlavia odchytených na všetkých lokalitách) (tab. 11, tab. 12). Takmer všetky páry boli štatisticky odlišné. U samčiekov i samičiek boli odchyty vždy najvyššie s borovicovou vetvičkou s etanolom a vždy najnižšie s kontrolou bez atraktantu. Odchyty sa významne nelíšili medzi terpentínovým olejom + etanol (separovaný) a

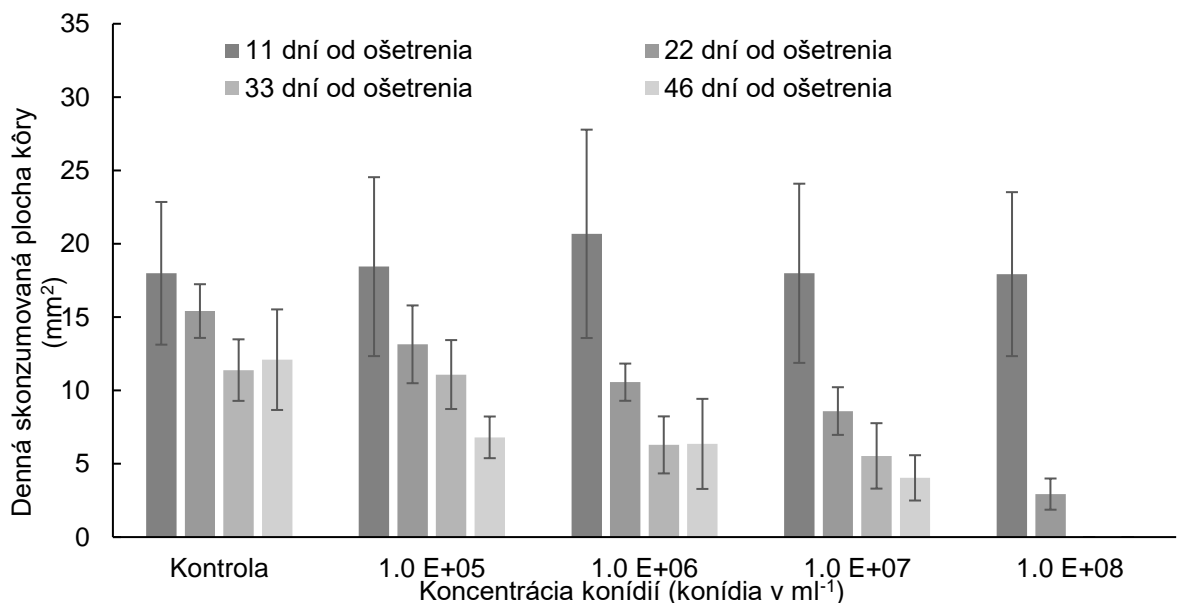
terpentínovým olejom + etanol (kombinovaný) pre samčekov a samičky, alebo medzi terpentínovým olejom + etanol (separovaný) a Hylodor pre samčekov.



Obrázok 30. Počty dospelých *Hylobius abietis* (a, c, e, g, i, k, m) a *Hylobius pinastri* (b, d, h, j, l, n) v čase odchyty typu použitého atraktantu a lokality. A – Hylodor, B – Alfa-pinene + etanol 70 % 1:2, C–Terpentínový olej +etanol 70 % oddelene, D – Terpentínový olej + etanol 2 : 1, NC – Negatívna kontrola, PC – Borovicová vetvička + etanol

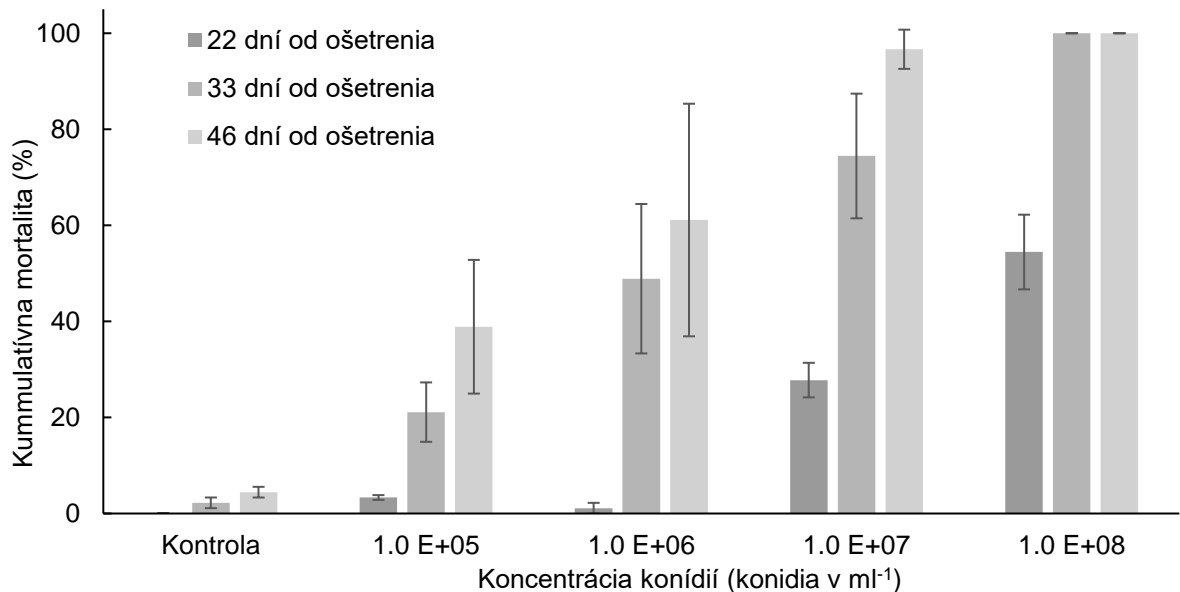
#### 5.4. Experiment IV. Laboratórny experiment s *Beauveria bassiana* na *Hylobius abietis*

Ošetrenie imág tvrdoňa smrekového suspenziou *B. bassiana* ovplyvnilo ich prijímanie potravy vo forme kôry z vetvičiek borovice lesnej. Ošetrené imága tvrdoňa smrekového suspenziou *B. bassiana* poškodili menšiu plochu kôry za deň ako neošetrené imága a priemerná denná poškodená plocha kôry sa znížila so zvyšujúcou sa koncentráciou konídií použitých na ošetrenie tvrdoňov (obr. 31). Účinok *B. bassiana* na poškodenie sa zvyšuje s časom a bol výraznejší, aj keď nie štatisticky významný ( $p > 0,05$ ), pri vyšších ( $\geq 1 \times 10^7$  konídií  $\text{ml}^{-1}$ ) koncentráciách konídií. Kým celková skonzumovaná plocha kôry na jednu vetvičku bola 197,8  $\text{mm}^2$  pre neošetrené imága, pre ošetrené *B. bassiana* bola v 11. dni hodnotenia 197,2 – 227,4  $\text{mm}^2$ . Skonzumovaná plocha kôry na jedného neošetreného jedinca medzi 33. – 46. dňom ošetrenia klesol na 157,2  $\text{mm}^2$  a 0 – 88,4  $\text{mm}^2$  pri jedincoch ošetrených *B. bassiana*. Nepozoroval sa žiadny významný rozdiel v prijímaní potravy medzi samičkami a samcami v neošetrenej kontrole ( $F_{(1,4)}=0,05, p=0,84$ ) alebo po naočkovaní suspenziami konídií ( $F_{(1,4)}=0,07, p=0,81$ ), na  $1 \times 10^5$  konídií  $\text{ml}^{-1}$ ;  $F_{(1,4)}=0,05, p=0,83$  pre  $1 \times 10^6$  konídií  $\text{ml}^{-1}$ ;  $F_{(1,4)}=0,02, p=0,91$  pre  $1 \times 10^7$  konídií  $\text{ml}^{-1}$ ;  $F_{(1,4)}=0,08, p=0,80$  pre  $1 \times 10^8$  konídií  $\text{ml}^{-1}$ ). Úmrtnosť imág spôsobených *B. bassiana* v biologickom teste sa zvýšila s koncentráciou konídií a časom ošetrenia (obr. 32).



Obrázok 31. Priemerná denná poškodená plocha ( $\text{mm}^2$ ) kôry na vetvičkách imágami *Hylobius abietis* po ich naočkovaní rôznymi suspenziami konídií kmeňa *Beauveria bassiana* AMEP20

Úmrtnosť imág spôsobených *B. bassiana* v teste sa zvýšila s koncentráciou konídií a časom od infikovania (obr. 32). Jedenásť dní po ošetrení pri žiadnej koncentrácii konídií nebola zistená úmrtnosť spôsobená hubou *B. bassiana*. Na konci biologického testu (46 dní) sa priemerná kumulatívna úmrtnosť pohybovala od 38,9 % do 100 % v závislosti od koncentrácie konídií. Priemerná kumulatívna úmrtnosť v kontrole dosiahla 4,4 %, ale mycélium *B. bassiana* v kadáveroch sa nepotvrdila.



Obrázok 32. Mortalita imág a stupeň prerastenia pokus s rôznymi koncentraciami

### 5.5. Experiment V. Vonkajšie testovanie *Beauveria bassiana* na smrekových sadeniciach

Pri vonkajšom experimente usmrtil kmeň AMEP20 *B. bassiana* tvrdone, ktoré boli ošetrené suspenziami konídií (priame ošetrenie), alebo sa aplikovala suspenzia s koncentráciou  $1 \times 10^8$  konídií  $\text{ml}^{-1}$  na sadenice a následne sa k sadenicam pridávali neošetrené imága (nepriame ošetrenie) (tab. 13). Celková mortalita tvrdoňov po priamej aplikácii konídií dosiahla na 32. deň 85 % a 65 % imág prerastených mycéliom, na 46. deň bola mortalita 100 % a 85 % imág bolo prerastených mycéliom *B. bassiana*. Infekcia zaznamenaná v skupinách tvrdoňov s ošetrenými sadenicami konídiami *B. bassiana* sa pohybovala od 30,0 % do 76,5 % po 32 dňoch inkubácie a od 55,0 % do 88,2 % po 46 dňoch. Konídie aplikované na sadenice zostali aktívne najmenej šesť dní po liečbe, čo sa prejavilo vývojom mycélia v skupinách tvrdoňov. Najvyšší podiel imág prerastených mycéliom bol zaznamenaný v skupine tvrdoňov, ktoré boli pridané k ošetreným



stromčekom, ktoré boli konídiami postriekané dva dni pred pridaním imág. V tejto skupine tvrdoňov bol podiel jedincov prerastených mycéliom ešte vyšší (76,5 % alebo 88,2 % po 32 alebo 46 dňoch inkubácie) ako v skupine priamo ošetrenej suspenziou konídií (65,0 % alebo 85,0 % po 32 alebo 46 dňoch inkubačnej doby), ale rozdiel nebol významný ( $p > 0,05$ ). Na neošetrených kontrolných stromčekoch sa nezistili žiadne mŕtve imága prerastené mycéliom.

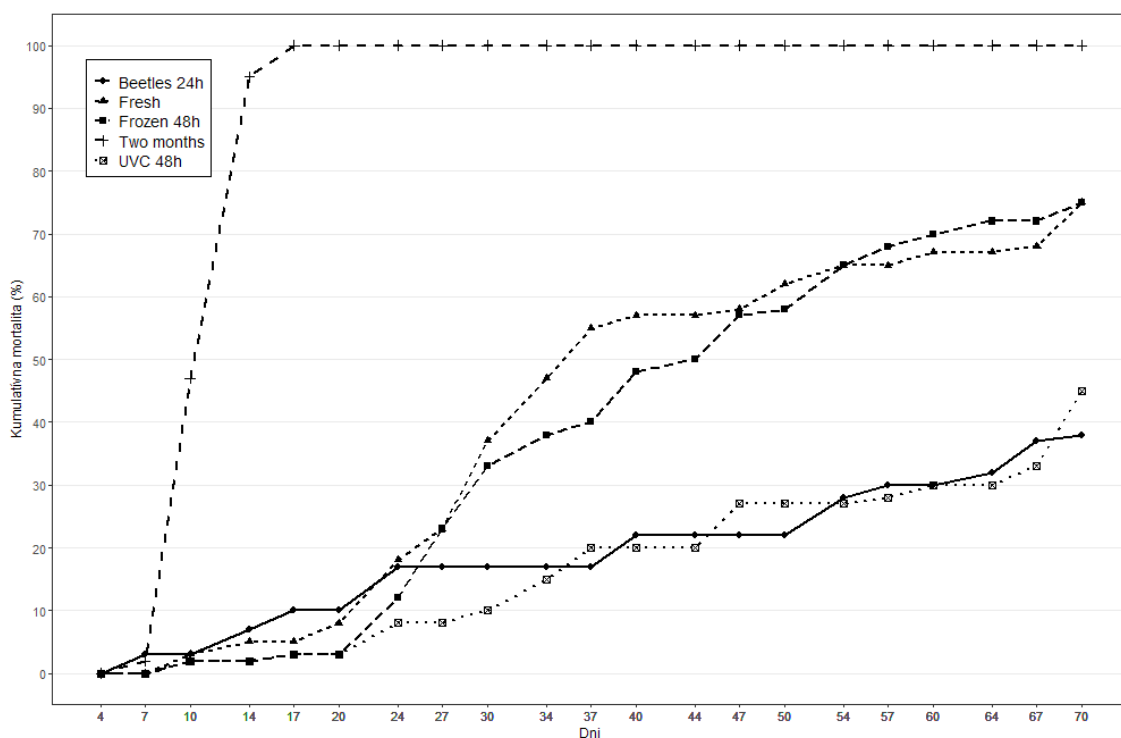
Tabuľka 13. Úmrtnosť imág *Hylobius abietis* po ich priamom a nepriamom ošetrení konídiami hubou *Beauveria bassiana* kmeň AMEP20 pri vonkajších pokusoch

Inkubačný čas		Kontrola	Priame ošetrenie	Nepriame ošetrenie - vystavenie imág ošetrením sadenicim počas dní 0 – 6 dní po ošetrení (dpo)						
				0 dpo	1 dpt	2 dpo	3 dpo	4 dpo	5 dpo	6 dpo
32 dní	Celková mortalita	0%	85.0 %	70.0 %	82.4%	88.2%	70.6 %	45.0 %	65.0 %	52.6%
	Mykoríza	0%	65.0 %	60.0 %	64.7%	76.5%	52.9 %	30.0 %	55.0 %	31.6%
	$\chi^2$ štatistika <sup>1</sup>			0.107	0.001	0.579	0.554	4.912	0.417	4.356
	p-hodnota			0.744	0.985	0.447	0.457	<b>0.027</b>	0.519	<b>0.037</b>
46 dní	Celková mortalita	0%	100.0 %	85.0 %	100.0 %	100.0 %	94.1 %	70.0 %	75.0 %	73.7%
	Mykoríza	0%	85.0 %	75.0 %	82.4%	88.2%	76.5 %	55.0 %	75.0 %	63.2%
	$\chi^2$ štatistika <sup>1</sup>			0.625	0.047	0.082	0.436	4.286	0.625	1.762
	p-hodnota			0.429	0.828	0.774	0.509	<b>0.038</b>	0.429	0.184

## 5.6. Experiment VI. Laboratórny experiment s nosičmi nainfikovanými *Beauveria bassiana*

### Experiment v roku 2016

V roku 2016 bolo celkovo použitých 360 imág *H. abietis*, 180 samčekov a 180 samičiek. Najrýchlejšie dokázal všetky imága usmrtiť nosič *two months* na 17. deň od umiestnenia imág k nosiču, ktorý bol vyrobený dva mesiace pred experimentom a do začatia experimentu bol umiestnený v chladničke. Ďalšie použité nosiče nedokázali usmrtiť všetky imága, ošetrenia *fresh* a *frozen 48 h* nedokázali usmrtiť všetky imága ale iba 75 %. Zvyšné dva nosiče *UVC 48 h* a *beetles 24 h*, nedosiahli mortalitu imág ani 50 %. Kontrolné imága bez nosiča prežili všetky bez mortality spôsobenej hubou *B. bassiana*.



Obrázok 33. Kumulatívna mortalita imág *Hylobius abietis* pri teplote  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  a rôznych typoch ošetrenia nosiča

Tabuľka 14. Odhadované parametre (údaje z roku 2016), ktorým sa hodnotili účinky nosičov na úmrtnosť na *Hylobius abietis* v laboratóriu

Ošetrenie	odds-ratios	2.5 %	97.5 %	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
<b>Fresh</b>	0.053	0.013	0.142	-2.944	0.592	-4.971	<0.001 ***
<b>UVC 48 h</b>	0.017	0.001	0.077	-4.078	1.008	-4.044	<0.001 ***
<b>Frozen 48 h</b>	0.017	0.001	0.077	-4.078	1.008	-4.044	<0.001 ***
<b>Beetles 24 h</b>	0.071	0.022	0.174	-2.639	0.518	-5.099	<0.001 ***
<b>Two months</b>	19	7.030	77.907	2.944	0.592	4.971	<0.001 ***

Signif. kody: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

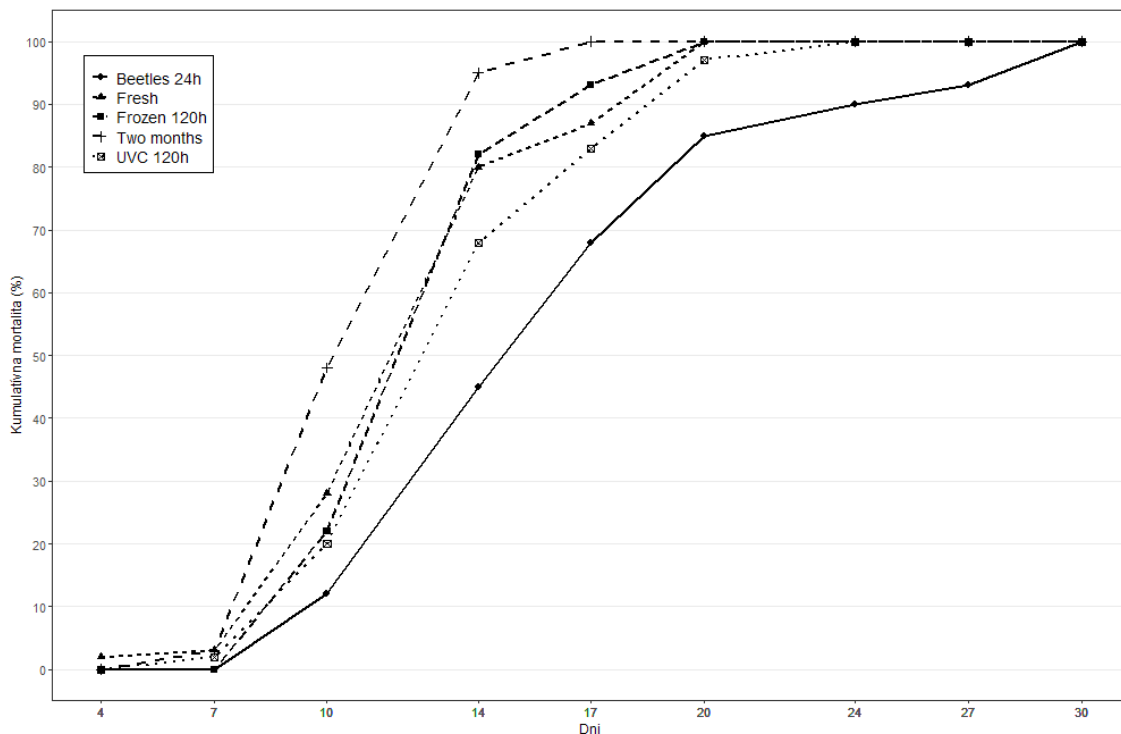
Po 14 dňoch bola úmrtnosť vo všetkých Petriho miskách s ošetrenými nosičmi 19 %. Úmrtnosť bola významne ovplyvnená použitým ošetrením ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2(4) = 218,8$ , AIC = 107,4). Najvyššia miera úmrtnosti (95 %) bola v Petriho miskách s nosičmi *two months* (obr. 33). Pravdepodobnosť, že chrobáky v miskách s ošetrením *two months* odumrú, je až 19 ku 1 (95 % CI: 7,030 - 77,907;  $p < 0,001$ ) (tab. 14). Miera úmrtnosti v Petriho miskách s inými ošetreniami *fresh*, *UVC 48 h*, *frozen 48 h*, *beetles 24 h* bola veľmi nízka (respektíve 5 %, 2 %, 2 %, 7 %) (obr.33). Výsledky párového porovnania odhalil signifikantné rozdiely medzi nosičmi *two months* a ostatnými nosičmi (tab. 15).

Tabuľka 15. Párové porovnanie ošetrení (údaje z roku 2016) pomocou Tukeyovej metódy mnohonásobného porovnania

contrast	odds.ratio	úroveň spoľahlivosti		p.value
		2.5 %	97.5 %	
<b>Fresh/UVC 48 h</b>	3.105	0.128	75.403	0.8692
<b>Fresh/Frozen 48 h</b>	3.105	0.128	75.403	0.8692
<b>Fresh/Beetles 24 h</b>	0.737	0.086	6.298	0.9952
<b>Fresh/Two months</b>	0.003	2.820E-04	0.027	<.0001
<b>UVC 48 h/Frozen 48 h</b>	1.000	0.021	48.882	1
<b>UVC 48 h/Beetles 24 h</b>	0.237	0.011	5.222	0.7102
<b>UVC 48 h/Two months</b>	0.001	3.670E-05	0.022	<.0001
<b>Frozen 48 h/Beetles 24 h</b>	0.237	0.011	5.222	0.7102
<b>Frozen 48 h/Two months</b>	0.001	3.670E-05	0.022	<.0001
<b>Beetles 24 h/Two months</b>	0.004	4.400E-04	0.032	<.0001

### Experimenty v roku 2018

V roku 2018 sme experiment s nosičmi zopakovali s rovnakým počtom imág (360 ks). Najrýchlejšie, 17 dní, od začiatku experimentu opäť usmrtilo imága ošetrovanie *two months*. Ako druhé najlepšie dopadli ošetrenia *fresh* a *frozen 120 h* ktoré usmrtili všetky imága na 20. deň od začatia experimentu. Na 24. deň usmrtili všetky imága ošetrovanie *UVC 120 h*. Ako posledné usmrtilo všetky imága ošetrovanie *beetles 24 h* na 30. deň od začiatku experimentu. Na kontrolných imágach nebola pozorovaná žiadna mortalita.



Obrázok 34. Kumulatívna mortalita imág *Hylobius abietis* pri teplote  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  a rôznych typoch ošetrovania nosiča

Po 14. dňoch bola celková úmrtnosť vo všetkých Petriho miskách s ošetrenými nosičmi 74 % (*fresh* -80 %, *UVC 120 h* – 68 %, *frozen 120 h* – 82 %, *beetles 24 h* – 45 %, *two months* – 95 %) (obr. 34). Použité ošetrenie významne ovplyvnila mortalitu ( $p < 0,001$ ,  $x^2(4) = 45,3$ ,  $AIC = 308,5$ ). Rozdiely v miere úmrtnosti (tab. 16) v Petriho miskách neboli také významné ako v experimente v roku 2016. Výsledky párového porovnania sú uvedené v (tab. 17).

Tabuľka 16. Odhadované parametre (údaje z roku 2018), ktorým sa hodnotili účinky nosičov na úmrtnosť na *Hylobius abietis* v laboratóriu

Ošetrenie	odds-ratio	2.5 %	97.5 %	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )	
<b>Fresh</b>	4.000	2.199	7.887	1.386	0.323	4.295	<0.001	***
<b>UVC 120 h</b>	2.158	1.271	3.799	0.769	0.278	2.771	0.006	**
<b>Frozen 120h</b>	4.455	2.408	9.026	1.494	0.334	4.478	<0.001	***
<b>Beetles 24 h</b>	0.818	0.489	1.358	-0.201	0.260	-0.773	0.439	
<b>Two months</b>	19.000	7.030	77.907	2.944	0.592	4.971	<0.001	***

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabuľka 17. Párové porovnanie ošetrení (údaje z roku 2018) pomocou Tukeyovej metódy mnohonásobného porovnania

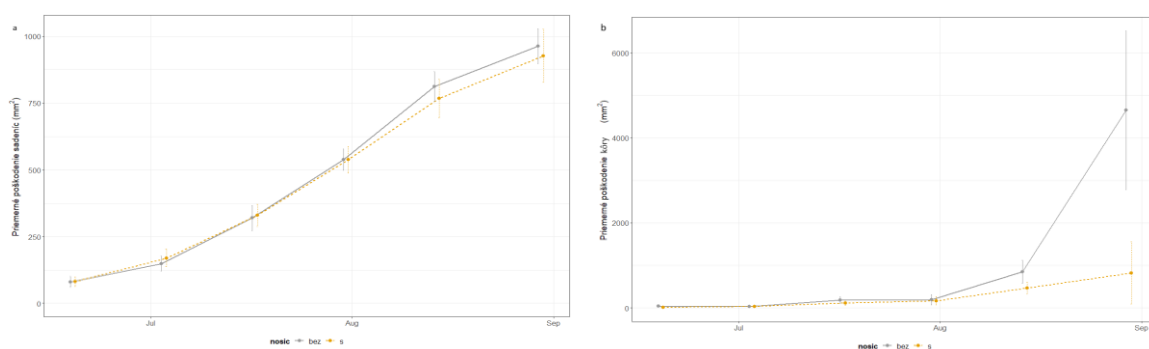
contrast	odds.ratio	úroveň spoľahlivosti		p.value
		2.5 %	97.5 %	
<b>Fresh/UVC 120 h</b>	1.854	0.580	5.920	0.595
<b>Fresh/Frozen 120 h</b>	0.898	0.253	3.185	0.999
<b>Fresh/Beetles 24 h</b>	4.889	1.580	15.129	0.001
<b>Fresh/Two months</b>	0.211	0.033	1.326	0.142
<b>UVC 120 h/Frozen 120 h</b>	0.484	0.148	1.583	0.453
<b>UVC 120h/Beetles 24 h</b>	2.637	0.936	7.435	0.079
<b>UVC 120 h/Two months</b>	0.114	0.019	0.676	0.008
<b>Frozen 120 h/Beetles 24 h</b>	5.444	1.719	17.246	0.001
<b>Frozen 120 h/Two months</b>	0.234	0.037	1.498	0.206
<b>Beetles 120 h/Two months</b>	0.043	0.007	0.251	<.0001

### 5.7. Experiment VII. Pokus s nosičom *Beauveria bassiana* v polo prírodných podmienkach

*Vplyv imág na poškodenie kôry na sadeniciach a lapacej kôry*

Z výsledkov je zrejmé, že prítomnosť nosiča neznižuje množstvo skonzumovanej kôry na sadeniciach, ale výrazne ovplyvňuje množstvo skonzumovanej kôry na lapacej kôre (obr. 35). Kôra s nosičom bola menej konzumovaná. Priemerná poškodená plocha

kôry na konci experimentu spôsobená *H. abietis* bola výraznejšie vyššia ( $t = -11.757$ ,  $p$ -value  $< 2.2e-16$ ) na lapacej kôre bez nosiča ( $4650 \text{ mm}^2$ ) v porovnaní s lapacou kôrou s nosičom ( $822 \text{ mm}^2$ ). Je pravdepodobné, že imága dokážu rozoznať prítomnosť huby *B. bassiana*. Priemerné poškodenie sadeníc bolo na konci experimentu po 84 dňoch u sadeníc s nosičom ( $927.25 \text{ mm}^2$ ) o niečo menšie ako v kliečkach bez nosiča ( $963.50 \text{ mm}^2$ ). Tieto rozdiely neboli štatisticky významné ( $t = -0.95239$ ,  $p$ -value = 0.3442). Prežívanie sadeníc však bolo lepšie. Na konci experimentu prežilo v kliečkach s nosičom 11 sadeníc zo 40, oproti tomu v kliečkach, kde sa nosič nenachádzal, prežili len 2 zo 40 sadeníc.



Obrázok 35. Priemerná zožraná plocha kôry. a) na sadeniciach, b) lapacích kôrach

#### *Mortalita tvrdoňov smrekových*

Logistický regresný model bol štatisticky významný  $\chi^2 (1) = 127.724$ ,  $AIC = 14.339$ ,  $BIC = 11.725$ ,  $p < 0.001$ , výsledné hodnoty naznačujú celkový účinok neprítomnosť/prítomnosť nosiča na mortalitu imág.

Tabuľka 18. Živý a mŕtvy *Hylobius abietis* v pokusoch s a bez nosičov *Beauveria bassiana*

nosič	živé	mŕtve	celkom	podiel úmrtnosti
s BB	20	164	184	0.89
bez BB	125	66	191	0.35

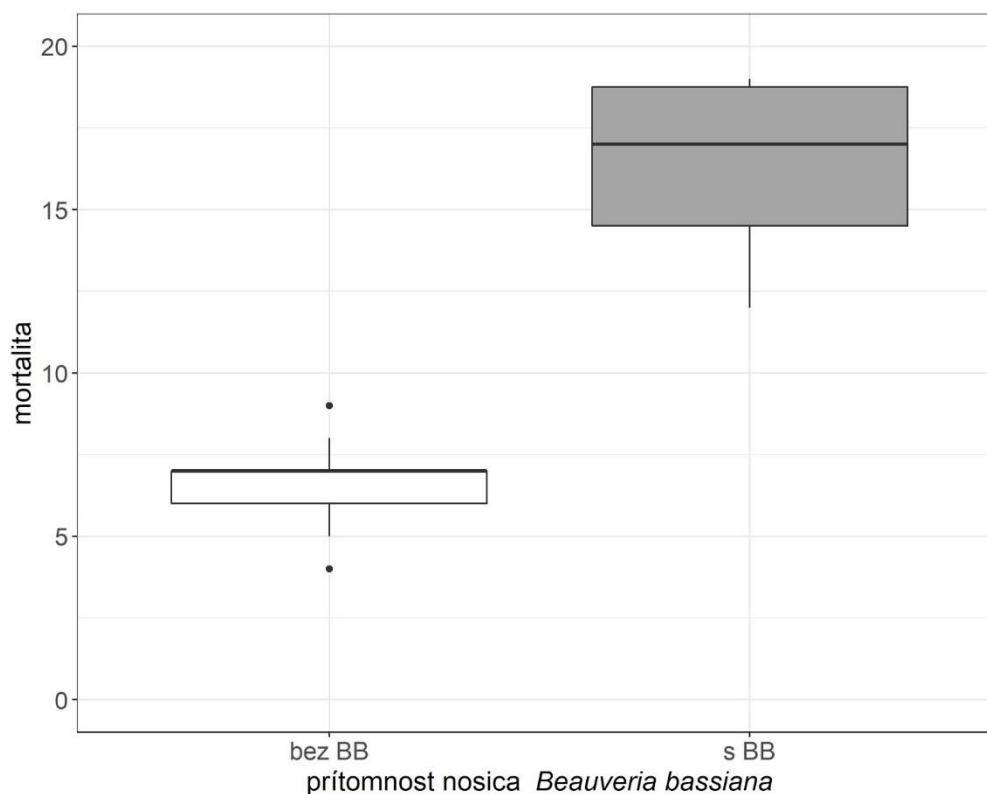
Z celkového počtu 200 imág, kde nebol umiestnený nosič, prežilo 125 imág a 66 imág bolo mŕtvych ale nepozorovali sme na nich známky prerastania hubou (9 imág sme nenašli). Z 200 imág, ktoré boli v kliečkach, kde bol umiestnený nosič s entomopatogénnou hubou, prežilo 20 imág, 164 imág bolo mŕtvych a boli prerastené mycéliom entomopatogénnej huby (16 imág sme nenašli) (tab. 18). V každej serií 10

kliekok bolo vysadených 40 sadeníc moratalita sadeníc sa kontrolovala v rovnaký čas ako poškodená plocha sadenic (tab. 19).

Tabuľka 19. Počet mŕtvych sadeníc (zo 40 celkových sadeníc) v kliečkach s nosičmi a bez nosičov

nosic	14 deň	28 deň	42 deň	56 deň	70 deň	84 deň
s BB	-	-	3	9	20	29
bez BB	-	-	2	7	30	38

Podiel mŕtvych chrobákov v skupine s nosičom obsahujúcim spóry *B. bassiana* bol významne vyšší (0,89) v porovnaní so skupinou bez nosiča (0,35) (obr. 36). Riziko infikovania imág v prostredí s nosičom a uhynutie, je 8,309 krát väčšie (CI: 5,348 - 13,670,  $p < 0,001$ ), ako riziko infikovania pre imága v prostredí bez nosiča (tab. 20).



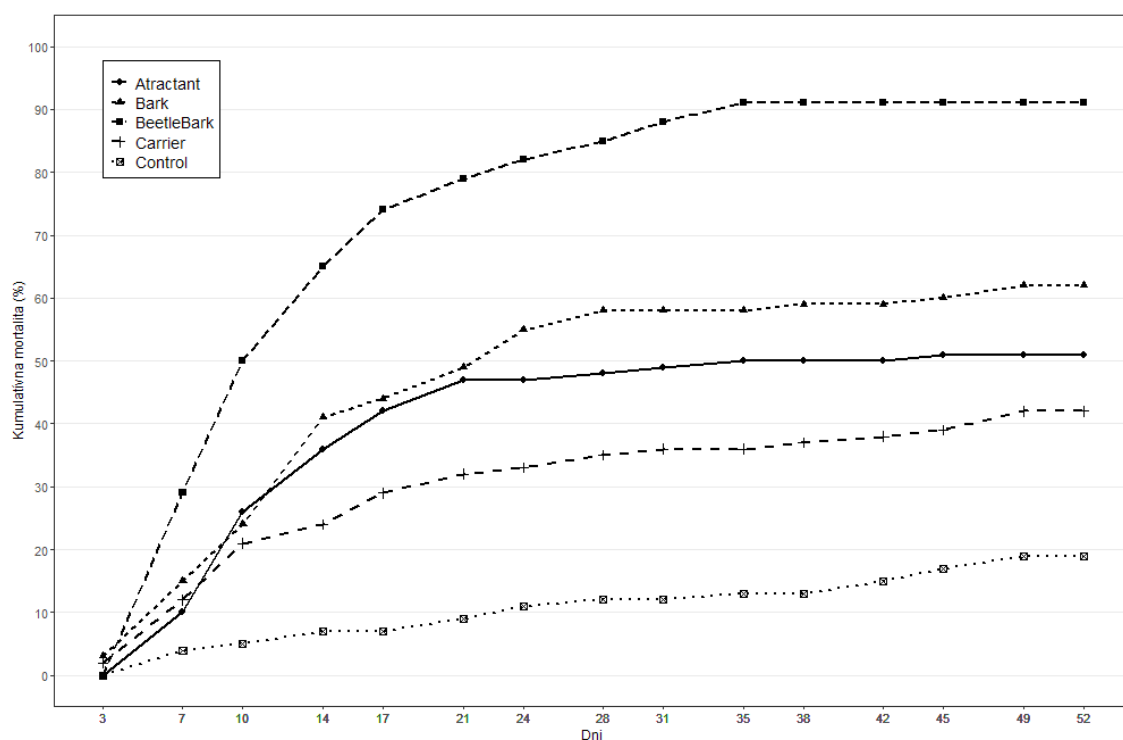
Obrázok 36. Priemerná mortalita imág na jednu klietku na konci experimentu

Tabuľka 20. Výsledky odhadu parametrov porovnania mortality imág v kliečkach s nosičom a bez nosiča

nosič	odds-ratios	2.5 %	97.5 %	std. err.	z val.	p
s BB (intercept)	8.309	5.348	13.670	0.238	8.893	<0.001
bez BB	0.064	0.036	0.109	0.283	-9.731	<0.001

## 5.8. Experiment VIII. Testovanie nosiča entomopatogénnej huby v prírodných podmienkach

V tomto experimente bolo hlavným cieľom porovnať mortalitu imág spôsobenú entomopatogénnou hubou *B. bassiana* v rôznych blokoch s rôznymi atraktantami pre imága tvrdoňa smrekového. Celkovo sa na 4 blokoch za sledované obdobie 23. – 26. júl 2019 podarilo odchytiť 564 imág tvrdoňa smrekového. Tieto imága boli umiestňované do Petriho misiek, v počte maximálne 3 kusy do jednej. Sledovali sme mortalitu imág a následné prerastanie mycéliom entomopatogénnej huby *B. bassiana*. Misky s imágami boli označené aby nedošlo k zámene vzoriek a ku skresleniu výsledkov. Kontrola prerastania imág trvala od 29. júla 2019 do 18. septembra 2019, celkovo bolo vykonaných 15 kontrol v intervale 3 – 4 dni (obr. 37). Na bloku *control* sa podarilo odchytiť celkom 107 imág. Na bloku *carrier*, sme odchytili 226 imág. Na bloku atractant sme do zemných pascí odchytili 86 imág. Na poslednom bloku *bark* sme odchytili 111 imág zo zemných pascí a 34 imág sme odobrali priamo z lapacích kôr (*beetlebark*).



Obrázok 37. Vývoj mortality imág po jednotlivých dňoch a ošetreniach počas celého experimentu

V polovici experimentu bola celková mortalita 40,2 % a na konci experimentu iba o niečo vyššia 45,7 %. Mortalita bola významne ovplyvnená použitým typom atraktantu na



plochách po prvej polovici experimentu ( $p < 0,001$ ,  $x^2(4) = 88,7$ ;  $AIC = 681,6$ ); a na konci experimentu ( $p < 0,001$ ,  $x^2(4) = 81,1$ ,  $AIC = 706,684$ ) (tab. 21).

Tabuľka 21. Odhadované parametre ošetrení, ktorými sa testovali účinky nosičov v 8. týždni trvania experimentu

ošetrenie	odds-ratios	2.5 %	97.5 %	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )	
<b>Control (Intercept)</b>	0.138	0.077	0.247	-1.978	0.3676	-6.686	<0.001	***
<b>Attractant</b>	6.588	3.213	13.507	1.885	0.4276	5.147	<0.001	***
<b>Carrier</b>	3.962	2.087	7.52	1.377	0.3958	4.211	<0.001	***
<b>Bark</b>	9.846	4.931	19.659	2.287	0.4143	6.483	<0.001	***
<b>BeetleBark</b>	41.938	13.79	127.544	3.736	0.535	6.584	<0.001	***

Najviac usmrtených imág v polovici experimentu bolo vo vzorkách imág *beetleBark*, ktoré boli v kontakte s nosičom a najmenej v kontrole. Menšia mortalita ako u imágach *beetlebark* bola u imág *bark*, menšia v bloku *attractant* a najmenšia v bloku *carrier*.

Najviac infikovaných a usmretných imág sme zaznamenali pri zozbieraných imágach *beetlebark*. Ich mortalita na konci experimentu bola 91,2 %. Pravdepodobnosť výskytu úmrtnosti v blokoch *bark* v polovici experimentu bola 41,9 ku 1 a bola štatisticky významná (tab. 22) (95 % CI: 13,79 - 127,54;  $p < 0,001$ ).

Tabuľka 22. Odhadované parametre ošetrení, ktorými sa testovali účinky nosičov v 15. týždni trvania experimentu

Treatment	odds-ratios	2.5 %	97.5 %	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )	
<b>Control (Intercept)</b>	0.23	0.141	0.374	-2.5157	0.3676	-5.929	<0.001	***
<b>Attractant</b>	4.557	2.393	8.679	2.1872	0.4276	4.614	<0.001	***
<b>Carrier</b>	3.098	1.781	5.387	1.6087	0.3958	4.005	<0.001	***
<b>Bark</b>	7.146	3.848	13.274	2.2804	0.4143	6.225	<0.001	***
<b>BeetleBark</b>	44.95	12.49	161.763	3.5373	0.535	5.824	<0.001	***

V prípade nosiča umiestneného v kôre (*bark*) mortalita odchytených imág do zemných pascí dosiahla 62,2 %. Pri kombinácii nosiča a atraktantu (*attractant*) dosiahla mortalita odchytených imág 51,2 %. Najmenšiu mortalitu spôsobenú hubou dosiahol samotný nosič bez atraktantu (*carrier*) pre imága, kde dosiahla mortalita na konci experimentu 41,6%. V kontrolnom bloku (*control*), kde nebol umiestnený nosič, bola mortalita imág spôsobená entomopatogénnou hubou 18,7%.

Tabuľka 23. Párové porovnanie mortality po 8 týždňoch trvania experimentu

contrast	odds.ratio	úroveň spoľahlivosti		p.value	
		2.5 %	97.5 %		
<b>Control/Atractant</b>	0.15179	0.089523	0.537875	<0.001	***
<b>Control/Carrier</b>	0.252394	0.14945	0.697296	<0.001	***
<b>Control/Bark</b>	0.101563	0.059111	0.331246	<0.001	***
<b>Control/BeetleBark</b>	0.023844	0.003743	0.132218	<0.001	***
<b>Atractant/Carrier</b>	1.662778	0.734851	2.945097	0.276	
<b>Atractant / Bark</b>	0.669097	0.288102	1.411434	0.634	
<b>Atractant / BeetleBark</b>	0.157088	0.017605	0.583851	0.004	**
<b>Carrier / Bark</b>	0.402397	0.226633	0.829058	0.001	**
<b>Carrier / BeetleBark</b>	0.094473	0.012723	0.373292	<0.001	***
<b>Bark / BeetleBark</b>	0.234776	0.028097	0.899622	0.043	*

Tabuľka 24. Párové porovnanie mortality po 15 týždňoch trvania experimentu

contrast	odds.ratio	úroveň spoľahlivosti		p.value	
		2.5 %	97.5 %		
<b>Control/Atractant</b>	0.219436	0.089523	0.537875	<0.001	***
<b>Control/Carrier</b>	0.322817	0.14945	0.697296	<0.001	***
<b>Control/Bark</b>	0.13993	0.059111	0.331246	<0.001	***
<b>Control/BeetleBark</b>	0.022247	0.003743	0.132218	<0.001	***
<b>Atractant/Carrier</b>	1.471125	0.734851	2.945097	0.551	
<b>Atractant/Bark</b>	0.637681	0.288102	1.411434	0.533	
<b>Atractant/BeetleBark</b>	0.101383	0.017605	0.583851	0.003	**
<b>Carrier/Bark</b>	0.433465	0.226633	0.829058	0.004	**
<b>Carrier/BeetleBark</b>	0.068915	0.012723	0.373292	<0.001	***
<b>Bark/BeetleBark</b>	0.158986	0.028097	0.899622	0.031	*

Signifikantné rozdiely  $p > 0.05$  neboli zistené medzi variantou *attractant* vs *bark* a *carrier*.

Medzi ostatnými blokmi boli signifikantné rozdiely  $p < 0,05$  (tab. 23, 24).

## 6. Diskusia

### 6.1. Ošetrovanie sadeníc rôznymi ochrannými metódami

V našich experimentoch všetky ošetrenia znižovali poškodenie kôry spôsobenej kŕmením imág *H. abietis*. Ošetrovanie insekticídmi bolo porovnateľne účinné ako ošetrovanie voskom, lepidlom alebo golierikmi. Aplikácia insekticídov však môže byť problematická z dôvodu environmentálnych a zdravotných rizík (Le Goff and Giraud, 2019).

Informácie poskytnuté výrobcom (BASF SE, Ludwigshafen, Nemecko) naznačujú, že obidva testované insekticídy sú účinné počas 28 dní. Na ochranu sadeníc počas celého vegetačného obdobia, kedy môžu byť sadenice poškodené *H. abietis*, by lesníci museli sadenice postrekovať dvakrát alebo trikrát ročne. V slovenskej a českej lesníckej praxi sa postrekovanie insekticídmi považuje za účinné po dobu 2 až 3 mesiacov. Ochrana insekticídmi proti *H. abietis* v našom laboratórnom experimente trvala 2 až 3 mesiace. Ošetrené sadenice však boli napadnuté, keď imága usmrtili neošetrené sadenice v klietkach (obr. 23a, b; obr. 26a, b).

V roku 2016 bolo porovnávané poškodenie sadeníc *H. abietis* ošetrených (insekticídmi alebo voskom) s neošetrenými sadenicami smreka obyčajného a duglasky tisolistej. Priemerná plocha kŕmnych jamiek po 16 týždňoch bola významne vyššia u kontrolných sadeníc smreka obyčajného ako u kontrolných sadeníc duglasky. Ošetrené sadenice smreka však boli významne menej poškodené ako ošetrené sadenice duglasky. Toto zistenie nie je v súlade s predchádzajúcou štúdiou (Wallertz et al., 2014), v ktorej sa zistilo, že plocha poškodená *H. abietis* bola na neošetrených smrekoch menšia ako na neošetrených sadenicách duglasky pri výberovom laboratórnom experimente. V tej istej štúdii bola poškodená oblasť väčšia na sadenicách duglasky ako na sadenicách väčšiny ostatných testovaných drevín. Toto sa dá vysvetliť chemickým zložením kôry študovaných rastlín. Niekoľko autorov študovalo chemické zloženie kôry smreka obyčajného a duglasky tisolistej (Jirovetz et al., 2000; Dawidowitz a Czapczyńska, 2011; Salem et al., 2015). Zistili významné rozdiely v počte chemikálií a ich koncentráciách. Ošetrovanie pravdepodobne zmení zloženie emitovaných prchavých látok, takže sa zníži príjem hostiteľskej rastliny *H. abietis*. Na potvrdenie tohto predpokladu bude potrebný ďalší výskum.

V ďalších dvoch experimentoch sme sa zamerali iba na sadenice smreka obyčajného. Na začiatku pokusu 2017 sme predpokladali, že plocha kôry spotrebovanej *H. abietis* sa zdvojnásobí, keď sa počet dospelých jedincov pridaných do klietky zdvojnásobí. Plocha

poškodenej kôry na neošetrených kontrolných sadenicach sa na konci experimentu (16. týždeň) veľmi nelíšila u 2 imágach na kletku (835 mm<sup>2</sup>) oproti 4 imágam na kletku (913 mm<sup>2</sup>). Všetky kontrolné sadenice pri 4 imágach na kletku uhynuli za 12 týždňov a v 15. týždni uhynuli všetky sadenice v kletkách, kde sa nachádzali 2 imága. Priemerná plocha kŕmnych jamiek na neošetrených sadenicach smreka bola podobná poškodenej ploche, ktorú uviedli Wallertz et al. (2014) (810 mm<sup>2</sup>). V pokuse 2017 bolo poškodenie ošetrených sadeníc v kletkách so 4 chrobákmi dvakrát vyššie ako v kletkách s 2 jedincami vo 8. týždni, ale tieto rozdiely sa na konci experimentu znížili. Zistili sme, že imága sa kŕmili mŕtvymi sadenicami 1 týždeň po smrti sadenice. Toto kŕmenie bolo tiež zahrnuté do celkovej poškodenej plochy sadeníc.

Aj keď rýchlosť prijímania potravy *H. abietis* v laboratórnych experimentoch bola štatisticky podobná pri ošetrovaní insekticídmi, lepidlom a voskom, pri ošetrovaní voskom bola pozorovaná najnižšia rýchlosť kŕmenia. Našli sme iba niekoľko štúdií, ktoré hodnotili použitie vosku KVAAE (Norsk Wax) na zníženie príjmu potravy dospelými jedincami *H. abietis*. Sibul and Ploomi (2016) zistili, že dospelí *H. abietis* dávali prednosť nevoskovanej potrave pred voskovanou potravou. Ďalšie štúdie uskutočnené vo Švédsku v prírodných podmienkach zistili, že priemerná úmrtnosť sadeníc ošetrených insekticídmi a sadenice ošetrenej voskom bola porovnateľná (tab. 25; Eriksson et al., 2017; Eriksson et al., 2018; Härlin and Eriksson 2016; Petersson et al., 2006).

Tabuľka 25. Mortalita sadeníc na konci experimentov pri použití rôznych typov ošetrenia

Citácie	Merit Forest WG	Kvae Wax	Type of Wax	Lep Bayer
Petersson et al. 2006	43,0	43,0	Bugwax 103	-
Härlin and Eriksson 2016	29,3	40,7	C	-
Eriksson et al. 2017	20,0	13,3 and 10,7	C and D	38,0
Eriksson et al. 2018	8,7	10,7	F	27,3

Vosková vrstva blokuje uvoľňovanie vonných látok z kôry, ktoré priťahujú tvrdone ku kmienkom sadeníc. Výsledkom je, že voskované sadenice sú menej napadnuté ako neošetrené sadenice. Toto ošetrovanie je účinné 1 až 2 roky (osobné pozorovanie), zatiaľ čo chemická ochrana je účinná iba 2 mesiace a musí sa opakovať. Po 1 až 2 rokoch sa voskový povlak začína lámať a odpadávať z dôvodu rastu sadenice a degradácie UV žiarením. V tom čase sa kmienky sadeníc stanú hrubšími a odolnejšími voči poškodeniu

kôry (<http://kvaee.com>). Vosk má podľa biologických testov OECD dobrú úroveň biologickej odbúrateľnosti. (<https://cordis.europa.eu>).

Terénny experiment s rôznymi ochrannými metódami proti *H. abietis* nadväzuje na laboratórne experimenty. Použitých bolo celkovo 5 ošetrení (500 sadeníc) a kontrola (100 sadeníc). Sadenice boli ošetrené voskom KVAAE typ C a typ F, lepidlom Vermifix, insekticídnom Vaztak Active a ochrannými goliermi typ Snap guard. Nie je vykonaných veľa prác, ktoré porovnávajú jednotlivé typy ošetrenia medzi sebou (Petersson et al., 2006; Härlin and Eriksson 2016; Eriksson et al., 2017; 2018). Vo všetkých prácach porovnávali medzi sebou viaceré ošetrení. Medzi nimi bol aj nami testovaný vosk, a to typ C a aj typ F. V našom pokuse vyšla mortalita na ošetrenie voskom typu C 3,2 %, Härlin and Eriksson (2016) uvádzajú mortalitu sadeníc po prvom roku 17,3 %, Eriksson et al. (2017) uvádzajú mortalitu sadeníc po prvom roku 1,3 %. Eriksson et al. (2018) použili vo svojich pokusoch vosk typ F a vychádzala im rovnaká mortalita sadeníc po prvom roku, a to žiadne mŕtve sadenice.

Medzi sadenicami ošetrenými insekticídmi bola plocha kŕmnych jamiek v pokuse 2017 oveľa väčšia ako v pokuse 2016. Najpravdepodobnejšie vysvetlenie je, že v kletke bolo v pokuse 2017 menej sadeníc ako v pokuse 2016. Ďalším možným vysvetlením je, že koncentrácia aktívnej zložky v insekticíde (alfa-cypermetrín) bola v pokuse 2016 dvakrát vyššia ako v pokuse 2017 (100 oproti 50 g/l). V pokuse 2017 sa použil insekticíd s nižšou koncentráciou účinnej látky, pretože tento insekticíd bol zaregistrovaný v roku 2017 (po vykonaní pokusu 2016, ale pred vykonaním pokusu 2017) a považuje sa za ekologickejší. To, že koncentrácia aktívnej zložky je vyššia, pomáha vysvetliť rozdiely v poškodení sadeníc ošetrenými insekticídmi. V pokuse 2016 oproti pokusu 2017 je to podporené úmrtnosťou chrobákov, ktorá bola 82 % v pokuse 2016, ale iba asi 56 % v pokuse 2017. Petersson et al. (2006), Härlin and Eriksson (2016), Eriksson et al. (2017; 2018) používali vo svojich pokusoch aj chemické ošetrenie insekticídmi, a to Merit Forest WG. Insekticíd používali opakovane rovnako ako my vo svojom terénnom experimente. Prvýkrát namáčali sadenice v insekticíde v škôlke pred vysadením a opakované ošetrenie už prebiehalo postrekom priamo v teréne. Tento insekticíd má však inú účinnú látku, imidakloprid, ktorej koncentrácia v postreku bola 1,4 %. My sme v našich pokusoch používali insekticíd Vaztak Actice, ktorý má účinnú látku alpha-cypermetrin, koncentrácia tejto látky v postreku bola 1 %. Značný rozdiel je však v rozdiely účinnej látky v jednom litri neriedeného insekticídu. Pri prípravku Vaztak Active sa v jednom

litri nachádza iba 50g/l účinnej látky ale pri prípravku Merit Forest WG je to až 700g/l. (<https://www.av.se>).

Výsledky pri použití prípravku Merit Forest WG po jednotlivých autoroch sú uvedené v tabuľke 25. V našom prípade vyšla mortalita sadeníc ošetrovaných insekticídmi v prvý rok testovania 16,7 %.

Použitie lepidla na ochranu sadeníc proti *H. abietis* sa hodnotilo iba v niekoľkých štúdiách. Eriksson et al. (2017; 2018) (tab. 26) zistili, že lepidlo (Bayer) bránilo dospelým v kŕmení na sadenicích. V našom experimente sme použili iný lep od firmy Papírna Moudrý s označením Vermifix. Ošetrovanie týmto druhom lepidla bolo prvýkrát použité v našich experimentoch. Tento lep ako aj insekticídny prípravok sme aplikovali v terénnom experimente opakovane každé dva mesiace. V pokuse 2017 dva ale aj štyri imága v klietke, lepidlo poskytovalo dobrú kontrolu po dobu asi 10 týždňov, kedy sme nezaznamenali žiadnu mortalitu sadeníc. Na konci laboratórneho pokusu 2017 ošetrovanie lepidlom znížilo poškodenie sadeníc asi o 50 % v porovnaní s neošetrovanou kontrolou a tiež dvakrát viac znížilo mortalitu sadenice (obr. 26c, d). Mortalita sadeníc pri laboratórnom experimente bola pri dvoch imágach v klietke 50 % a pri štyroch imágach 60 %. Pri terénnom experimente bola mortalita sadeníc po prvom roku používania 6,1 %. Eriksson et al. (2017; 2018) vyšla mortalita sadeníc na konci prvého roku 16,7 % a 12,7 %, čo môžeme porovnať s našim terénnym experimentom. Na konci experimentu po troch rokoch zistili títo autori mortalitu sadeníc na úrovni 38,0 % a 27,3 %. Lepidlo použité v tejto štúdii má podobné zloženie ako lepidlo používané v lepidlových pásoch Tree Tanglefoot® Pest Barrie (Tanglefoot Company Grand Rapids, Michigan USA) (prírodná guma živica 25 %, ricínový olej a karnabusový vosk 75 %), ktoré sa používajú na ochranu pred húsenicami motýľov. Tieto pásy znižujú pohyb lariev alebo nelietajúcich samíc z kmeňov do korún stromov (Webb et al., 1995; Berlinger et al., 1997; Mayo, 2003; Noukoun et al., 2014).

Ochranné goliere na ochranu sadeníc boli vyvinuté koncom 70. rokov 20. storočia, po ústupe insekticídneho prípravku DDT (Lindstöm et al., 1986). Na konci 80. a začiatkom 90. rokov sa vyvinulo a otestovalo množstvo ďalších kŕmnych bariér, napríklad „pančuchy“ (Eidmann and von Sydow, 1989), „BEMA“ obal z plastových vlákien (Hagner and Jonsson, 1995), ale aj mnoho ďalších, ktoré popísal vo svojej práci (Petersson et al., 2004). V našom experimente sme použili ochranný golier typ Snap guard. Tento golier je vyrobený z dvoch materiálov, a to z polypropylénu, ktorý sa dá opakovane použiť a biodegradovateľného plastu, ktorý sa rozloží po 4 rokoch

(www.grube.sk). Petersson et al. (2004), ktorí testovali viacero druhov ošetrovaní sadeníc proti žeru, uvádzajú mortalitu sadeníc pri použití ochranného goliera Snap guard 4,9 %. Mnoho ďalších autorov používa iné typy ochranných golierov, takže je náročné s nimi porovnávať výsledky (Petersson et al., 2006; Härlin and Eriksson 2016; Eriksson et al., 2017; 2018). V našom experimente bola výsledná mortalita sadeníc 14,5 % po prvom roku merania. Nevýhoda ochranných golierov je ich obstarávacia cena. Zámky na golieroch nie celkom dobre priliehajú, ich zatváranie v niektorých prípadoch je zložité. Ale najväčšia nevýhoda je tá, že ak tvrdoň prekoná ochranný golier a dostane sa ku kmienku sadenice, len ťažko sa vie stadiaľ dostať. V golieri má navyše ideálne podmienky, skrýšu a potravu, tak sa tam zdrží dlhšiu dobu a požiera kôru sadenice, čím dôjde k jej úhynu. Deklarovaná biodegradovateľnosť plastu, z ktorého je golier vyrobený tiež nie je dostatočne preskúmaná.

V našich experimentoch bolo poškodenie sadeníc významne znížené pri všetkých testovaných ošetreniach. V niektorých prípadoch boli medzi ošetreniami významné rozdiely a ochrana medzi všetkými ošetreniami bola najlepšia pri vosku. Lepidlo tiež významne znížilo poškodenie sadeníc *H. abietis*, ale bolo menej konzistentné ako vosk alebo insekticíd, čo naznačujú veľké odchýlky jeho účinkov. Pokiaľ ide o rozptyl, insekticíd bol najkonzistentnejšou liečbou pri laboratórnom experimente. Pri terénnom experimente najkonzistentnejšie vyšlo ošetrenie voskom typ F.

Nevýhodou experimentov v klietkach je to, že obmedzujú výber chrobákov. Po odumretí a dokončení kŕmenia chrobákov na neošetrených sadenicích sú k dispozícii iba ošetrené sadenice. Preto sme vykonali terénny experiment, ktorý potvrdil, že ošetrené sadenice sú poškodzované menej ako neošetrené sadenice.

Tabuľka 26. Mortalita sadeníc na konci prvého roku testovania pri použití rôznych typov ošetrenia

Citácie	Merit Forest WG	Kvae Wax	Type of Wax	Lep Bayer
Petersson et al. 2006	5,0	3,0	Bugwax 103	-
Härlin and Eriksson 2016	0,7	17,3	C	-
Eriksson et al. 2017	5,3	1.3 and 0.7	C and D	16,7
Eriksson et al. 2018	2,7	0	F	12,7

## 6.2. Použitie zemných pascí na odchyt *Hylobius* spp.

Počas vegetačnej sezóny 2018 sme zaznamenali odchyt *H. abietis* v zemných pasciach osadených v nedávno vyťažených smrekových porastoch v šiestich



stredoeurópských lokalitách, kde sa nadmorská výška pohybovala od 400 do 1220 m n. m. Experiment sa vykonal v dvoch krajinách (obr. 13). Vedrá s objemom 1,2 l sa použili ako zemné pasce so vstupnými otvormi s priemerom 10 mm (obr. 14). Tieto pasce sa ľahko zostrojili a osadili v teréne. Pasce proti odchytu iného hmyzu nie sú selektívne, a to ani pri použití vstupných otvorov. Môžu chytiť aj iné bezstavovce, ale odchyty tohto hmyzu sú nízke (Zumr and Starý 1992). Pasce by mali byť osadené iba na nevyhnutné obdobie a nemali by sa ponechať v lese (Wheater et al., 2011).

Všetky atraktanty v našom experimente preukázali určitú schopnosť prilákať *H. abietis* a *H. pinastri*. *Hylobius abietis* sa v strednej Európe vyskytuje veľmi bežne (Långstöm and Day, 2004), *H. pinastri* je tiež častý (Långstöm and Day, 2004; Örlander et al., 1997; Saalas, 1949; Ozols, 1985; Ehnström and Axelsson, 2002), ale je menej hojný ako *H. abietis* (Längström, 1982; Maavara et al. 1961; Luik and Voolma, 1989). Predpokladáme, že pasce s vetvičkami borovice priťahovalo menej imág *H. pinastri* ako *H. abietis*, pretože *H. pinastri* preferuje smrek (Viiri and Miettinen 2013), zatiaľ čo *H. abietis* preferuje borovicu (Leather et al., 1994).

Na každej lokalite bolo vždy najviac imág *H. abietis* odchytených do zemných pascí s borovicovou vetvičkou a etanolom. Denné výpary študovaných atraktantov sú porovnateľné s publikovanými (Nordlander, 1987; Nordlander, 1990; Olenici et al., 2016). Experimentálne odparníky majú porovnateľné odparovanie ako komerčne dostupný Hylodor. Nordlander (1987) vo svojej práci použil na odparovanie atraktantu fľaštičku s filtračným papierom. Táto metóda sa v praxi nepoužíva. Chceli sme otestovať metódy použiteľné v lesnej praxi a ľahko aplikovateľné. Pre lesníkov sú najlepšie a najjednoduchšie priemyselné odparníky. Preto sme použili Hylodor a ďalšie typy odparníkov pozostávajúce z polypropylénového tubusu vyrobeného spoločnosťou Fytofarm Ltd. Co. Použitý termoplastický materiál zaisťuje pravidelné odparovanie tak dlho, pokiaľ sa celý obsah nevyparí (Varkonda and Florian 2006).

Prírodné materiály (lapacie kôry) na prilákanie *H. abietis* sa začali používať v prvej polovici 19. storočia (Ratzeburg, 1839) a často sa využívali začiatkom 20. storočia (Escherich 1923). Nevýhodou lapacej kôry je potreba jej častej výmeny (raz za 2 týždne) a potreba odstraňovať prilákané imága *H. abietis* každých 2 až 5 dní. Ďalšou nevýhodou lapacej kôry je jej vysoká cena, ktorá na Slovensku predstavuje asi 3,5 € za jeden kus kôry (Galko et al., 2015). Na monitorovanie je potrebných asi 25 ks/ha lapacej kôry. Cena takéhoto monitoringu (bez nákladov na údržbu) by bola 175 €/ha mesačne. Na rozdiel od lapacej kôry si zemné pasce nevyžadujú pravidelné návštevy. Počas nášho experimentu

sme ich vyprázdňovali jedenkrát týždenne, ale ak by sa použili atraktanty v tubusoch, bola by potrebná kontrola jedenkrát mesačne. Atraktant alfa-pinén + etanol stojí 2,5 € za kus a môže trvať 6 až 8 týždňov a cena jedného vedra použitého pre pascu je 0,33 €. V tomto prípade sú náklady bez nákladov na údržbu 70,75 € s 25 nástrahami na hektár (Lalík et al., 2020).

Existujú ďalšie problémy s použitím lapacích kôr a iných prírodných materiálov ako atraktantov škodcov (Nordlander, 1987). Druhy prírodných materiálov používaných na prilákanie škodcov sa môžu líšiť v obsahu monoterpénov (Thorin and Nömmik, 1974; Yazdani and Nilsson, 1986). Ďalším problémom je, že drevené atraktanty sa vysušujú, čo postupne znižuje ich atraktivitu (Längström, 1982). Keď škodcovia napádajú prirodzené atraktanty, živia sa nimi a narušujú materiál. To zvyšuje uvoľňovanie monoterpénov, ktoré priťahujú *H. abietis* (Tilles et al., 1986), ale znižuje životnosť atraktantu. V dôsledku toho sme v našom experimente nahrádzali borovicové vetvičky každý týždeň. Zumr and Starý (1992), ktorý použil smrekovú vetvičku, ju taktiež nahradil každý týždeň. Aj keď vieme málo o hustote populácií v študijných oblastiach, v porovnaní s našimi výsledkami chytili 10-krát menej chrobákov (Zumr and Starý, 1992).

Druhým najúčinnnejším atraktantom v experimente bol alfa-pinén, ktorý je prítomný v ihličnatých drevinách a má zápach podobný živici. Táto zlúčenina je obvyklá v tom, že jej obsah v rámci druhu stromu je konštantný bez ohľadu na časť stromu (Nordlander, 1991). Pomer vonných látok v ihličnatých drevinách je do značnej miery riadený geneticky a nie je ovplyvnený inými faktormi (Squillace, 1976). V odparníku sa alfa-pinén zmiešal s etanolom, pretože takáto kombinácia je 6-krát atraktívnejšia pre *H. abietis* ako samotný alfa-pinén a 10-krát atraktívnejšia ako samotný etanol (Nordlander, 1987). Účinok kombinácie v teréne je navyše synergický (Tilles, 1986).

Tretím najúspešnejším atraktantom bol komerčne dostupný Hylodor. Tento atraktant, ktorý sa vyrába v Poľsku, je opísaný ako agregáčny feromón, ale jeho zloženie nie je známe. Kuźmiński and Bilon (2006) ukázali, že počet odchytených chrobákov bol pri Hylodore iba mierne vyšší ako pri guľatinách alebo drevených diskoch.

Štvrtý najvyšší počet odchytovej sa získal, keď sa terpentínový olej a 70 % etanol umiestnili do samostatných tubusov. Terpentínový olej sa extrahuje zo živice destiláciou a obsahuje najmä alfa-pinén a beta pinén (Moreira et al., 2008). Aj keď táto návnada má nízku cenu (Zumr and Starý 1992; Voolma and Sibul, 2006), v našom pokuse zachytila iba malé množstvo *Hylobius* spp. Posledným atraktantom, ktorý sa použil v tejto štúdii, bol terpentínový olej zmiešaný s etanolom v pomere 2 : 1. Tento atraktant tiež chytil iba nízky

počet imág *Hylobius* spp. Koncentrácia terpentínového oleja a etanolu použitá v našom experimente bola rovnaká ako koncentrácia, ktorú použili (Moreira et al., 2008). Máme podozrenie, že takáto silná koncentrácia mohla imága skôr odpudzovať ako priťahovať. Nižšia koncentrácia terpentínu by mohla odchytiť viac imág (Voolma and Sibul 2006). Negatívna kontrola (bez atraktantov) v našom experimente zachytila iba niekoľko jedincov, ktorí pravdepodobne neboli prilákaní, ale jednoducho do nich náhodne spadli. Malý počet chrobákov odchytených v týchto pasciach potvrdzuje, že zmes propylénglykol:voda použitá na usmrtenie a zachovanie odchytených chrobákov nepôsobila ako atraktant alebo ako repelent, a preto neovplyvnila odchyt *H. abietis* (Voolma and Sibul, 2006).

Celkovo sme na šiestich lokalitách odchytili 8266 imág *H. abietis* a 2040 imág *H. pinastri*. Saintonge and Malphettes (1991) uviedli, že pasca môže prilákať dospelých zo vzdialenosti 2,5 m vo všetkých smeroch. V tejto štúdii sme zistili, že bez ohľadu na použitú návnadu môže pasca priťahovať imága na vzdialenosť väčšiu ako 2,5 m. S pascou umiestnenou na okraji plôch sme odchytili v priemere  $290 \pm 203$  imág *H. abietis* a  $74 \pm 52$  imág *H. pinastri*. V pasciach nachádzajúcich sa v strede plochy sme v priemere odchytili  $250 \pm 156$  a  $59 \pm 41$  imág *H. abietis* a *H. pinastri* na jednu pascu. Ak predpokladáme, že každá pasca na ploche môže odchytiť chrobáky v okruhu 3 m, dostaneme plochu ochytenia *H. abietis* približne  $28,0 \times 34,5$  m ( $966 \text{ m}^2$ ). Keď sa prepočíta počet odchytených imág na hektár, zistili sme, že na jednom hektári sa môže nachádzať niekoľko tisíc až niekoľko desiatok tisíc imág *H. abietis* a tisíce imág *H. pinastri* na hektár v závislosti od lokality (tab. 10). Na väčšine lokalít sme odchytili viac ako 10 000 chrobákov na ha; t. j. hustota *H. abietis* sa zhodovala s hustotou uvedenou v Charitonova (1965) (10 000 – 18 000 imág/ha). Iní autori tiež uviedli počet *H. abietis* približne na 10 000/ha. (Olenici et al., 2016; Nordlander et al., 2003) a Eidmann (1974) zistil početnosť okolo 14 000 imág/ha, toto sa zhoduje aj s našimi výsledkami, kde sme túto hustotu na troch lokalitách na počet odchytených *H. abietis* prekročili. Preto predpokladáme, že sme chytili väčšinu miestnej populácie *H. abietis* a *H. pinastri*. Podporuje to aj skutočnosť, že v druhej polovici leta sme neodchytili žiadnych chrobákov, aj keď by sa mali chytiť imága novej generácie, ktoré sa roja na jeseň (Bejer-Petersen et al., 1962).

Obnova lesa ťažbou sa takmer vždy vykonáva na jeseň alebo v zime a ponechané pne sú obklopené staršími porastmi. Larvy sa vyvíjajú na koreňoch čerstvých borovicových alebo smrekových pňoch a výnimočne tiež na koreňoch jednoročných pňov (Nordlander, 1991). V stredných nadmorských výškach nie sú pne staršie ako 1 rok atraktívne (osobné

pozorovanie Holuša, Galko, Lalík) (Modlinger and Knížek, 2009). Aj z tohto dôvodu bol počet odchytených chrobákov najmenší v lokalite Mariánské Lázně (pôvodný les bol vyťažený v máji 2017). V Škandinávii môžu pne zostať atraktívne 3 roky (Nordenhem, 1989), toto tvrdenie bolo potvrdené na lokalite Vyšné Hágy, ktorá je 1216 – 1220 m n. m., kde boli pne staré 4 roky a imága boli stále na ploche v hojnom počte (osobné pozorovanie). Je zrejmé, že chrobáky uväznené v pasciach mohli pochádzať z okolitých oblastí. Imága *H. abietis* používajú na výber vhodných lokalít svoje čuchové senzory na spodnej časti tykadiel. Na dlhšie vzdialenosti sa imága orientujú podľa atraktantov produkovaných hosťiteľskými druhmi stromov (Selander et al., 1974; Nordenham, 1991). Na novovzniknutých holinách pravdepodobne imága rozlišujú tvar sadeníc a starších stromov počas letu (Björklund et al., 2005). Na krátke vzdialenosti reagujú na feromóny (Tilles and Eidmann, 1988). Samčie feromóny spôsobujú agregáciu imág a samičie feromóny priťahujú samcov (Selander, 1978). Samice môžu prechádzať alebo lietať na značné vzdialenosti, aby lokalizovali vhodné miesta na kladenie vajíčok (Mráček and Šrůtka, 1984). *H. abietis* môže naraz preletieť do 2 000 metrov a počas celého života môže preletieť viac ako 80 000 metrov (Solbreck and Gyldberg, 1979).

Počas celého experimentu sme odchytili 4389 samíc a 3877 samcov *H. abietis*. Na základe týchto odchytoch bol celkový pomer samíc a samcov 53 : 47, hoci samce boli na niektorých lokalitách hojnejšie ako samice. Tilles et al. (1986), ktorí použili zemné pasce s návnadou s tromi typmi atraktantov (alfa-pinén, etanol a kombinácia týchto dvoch), uviedli pomer pohlavia *H. abietis* podobný pomeru v našom experimente; počet samíc bol väčší ako počet samcov bez ohľadu na kombináciu návnad.

### **6.3. Experimenty s entomopatogénnou hubou *Beauveria bassiana***

Entomopatogénne huby (EPH) sú dôležitými prírodnými kontrolnými činiteľmi hmyzu a boli predmetom intenzívnej štúdie od konca 19. storočia. Odhaduje sa viac ako 700 druhov húb v 100 radoch (Augustyniuk-Kram and Kram, 2012). Veľká väčšina perspektívnych húb na hromadnú výrobu a použitie v biologickej kontrole škodcov sú z radu Hypocreales (Ascomycota) (Lacey et al., 2007). Doteraz bol výskyt EPH v populáciách *H. abietis* málo preskúmaný, aj keď ide o významného lesného škodcu. Z hubových patogénov *H. abietis* zistených v predchádzajúcich štúdiách sa najčastejšie vyskytovali najmä huby z rodu *Beauveria* (Wegensteiner et al. 2015; Gerdin 1977; Glare et al., 2008). Súčasný výskum EPH v prirodzených populáciách *H. abietis* na Slovensku ukázali, že infekcia hubami *Beauveria* spp. je prítomná, ale na nízkej úrovni (0 – 6 %).

To zodpovedá výsledkom iných štúdií. Napríklad v Írsku percento úhynov infikovaných *Beauveria* sp. sa pohybovalo v rozmedzí od 1,3 % do 3,5 % (Williams et al., 2013). V Európe boli doteraz v prirodzených populáciách *H. abietis* zaznamenané tri druhy *Beauveria*, a to *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch a *B. caledonica* Bissett a Widden. V našom výskume sme zaznamenali *B. bassiana*, ale nezistili sme *B. brongniartii* a *B. caledonica* na žiadnom testovanom jedincovi. Na druhej strane sme zistili prítomnosť *B. pseudobassiana*, čo je vôbec prvým záznamom tejto patogénnej huby na *H. abietis*. Celkovo sa z mŕtvych zvierat získalo šesť izolátov *B. pseudobassiana* na in vitro kultúrach, a preto ju nemôžeme považovať za vzácnu EPH v populácií *H. abietis*. Najnovšie analýzy vzoriek pôdy na Slovensku naznačujú, že *B. pseudobassiana* uprednostňovala lesné biotopy pred poľnými biotopmi alebo lúkami (Medo et al., 2016). Na druhej strane, tento druh nebol identifikovaný zo vzoriek lesnej pôdy v Poľsku (Popowska-Nowak et al., 2016). Pretože testy virulencie zaradili dva kmene *B. pseudobassiana* (AMEP43 a NREP84) medzi kmene, ktoré vykazujú vysokú účinnosť proti tvrdoňom a majú patogénny potenciál proti hmyzím škodcom, zaslúžia si ďalšiu pozornosť. *B. brongniartii* je dobre známy pôdny patogén napádajúci larvy Coleoptera, ale bol tiež identifikovaný na larvách *H. abietis* v Rakúsku (Wegensteiner et al., 2015). Jeho patogenita pre *H. abietis* sa preukázala aj v laboratórnych experimentoch (Wegensteiner, 1989). *B. caledonica* je druh pôvodne opísaný v rašeliniskovej pôde v Škótsku (Bissett and Widden, 1988) a zistil sa tiež ako prirodzene sa vyskytujúci patogén *H. abietis* a iných, z čeľadi Curculionidae v severnom Spojenom kráľovstve, Írsku, Poľsku, Rakúsku, Francúzsku, na Slovensku a na Novom Zélande (Williams et al., 2013; Wegensteiner et al., 2015; Glare et al., 2008; Reay et al., 2008; Barta et al., 2018). Výsledky laboratórnych testov naznačujú, že *B. caledonica* má potenciál stať sa biokontrolným činidlom Curculionidae. Biologické testy s kmeňmi *B. caledonica* zo Slovenska a Nového Zélandu preukázali svoju vysokú patogenitu u dospelých druhov *Ips typographus* (L.) (Curculionidae: Scolytinae) (Glare et al., 2008; Barta et al., 2018). Aj keď patogénnosť húb z iného rodu, *Metarhizium*, na *H. abietis* bola preukázaná v laboratórnych a poľných pokusoch (Ansari and Butt, 2012; Mc Namara et al., 2018; Markova, 2000), infikovanie *H. abietis* touto hubou nebolo potvrdené v prirodzených podmienkach (Williams et al., 2013; Wegensteiner et al., 2015).

Doteraz bolo v Európe dokumentovaných päť druhov EPH z rodu *Beauveria* (*B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. pseudobassiana* a *B. varroa* S.A. Rehner and R.A. Humber). Zatiaľ čo *B. bassiana*, *B. brongniartii* a *B. pseudobassiana* sú

globálne distribuované pôdne entomopatogény so širokým rozsahom hostiteľov vyskytujúcich sa na rôznych biotopoch, *B. varroae* je známy iba z ektoparazitických roztočov včiel medonosných vo Francúzsku, hoci môže infikovať aj iné druhy Coleoptera (Rehner et al., 2011). Pretože predchádzajúce štúdie o diverzite EPH v Európe, ktorá sa sústreďuje na *H. abietis* v Európe, boli založené na morfológických zásadách, niektoré druhy *Beauveria* mohli byť nesprávne identifikované alebo zostali neurčené.

Ako je uvedené v súčasných terénnych experimentoch, infekcia *Beauveria* spp. je jedným z prírodných faktorov úmrtnosti *H. abietis*. Aj keď pre tieto huby nie sú typické prírodné epizootie, laboratórne a terénne experimenty už preukázali svoju účinnosť proti tomuto lesnému škodcovi (Ansari and Butt, 2012; Markova, 2000; Mc Namara et al., 2018; Williams, 2013). Predchádzajúci výskum v oblasti testovania *Beauveria* spp. proti *H. abietis* priniesol optimistické výsledky, ale stále chýbajú účinné metódy biologickej kontroly využívajúce tieto huby. Všeobecne je známe, že výber vysoko virulentných kmeňov je predpokladom úspešnej implementácie EPH v biologickej kontrole hmyzích škodcov. Sériu našich laboratórnych biologických testov ukázala, že všetky testované kmene *Beauveria* mohli infikovať dospelých *H. abietis* a dokázali sporulovať na kadáveroch. Na náchylnosť na kmene EPH sa nezistil žiadny vplyv pohlavia testovaných *H. abietis*. Pokiaľ je nám známe, *B. pseudobassiana* ešte nebola testovaná na *H. abietis* a súčasné virulentné testy prinášajú optimistické výsledky. Na základe interšpecifickej variability v patogenite kmeňov nemôžeme dospieť k záveru, že žiadny z testovaných druhov *Beauveria* nepreukázal lepšie biologické vlastnosti ako iné druhy. Pri virulentných biotestoch sa identifikovali dva vysoko virulentné kmene *B. pseudobassiana* a jeden kmeň *B. bassiana*. *B. bassiana* kmeň AMEP20 bol vybraný pre ďalšie skúmanie vzhľadom k vyššej mortalite, a tým aj nižšie hodnoty LC 50, ako úmrtnosť získaná po aplikácii *B. pseudobassiana* kmeňov.

Všeobecne bol vývoj ochorenia v testovaných imágach relatívne pomalý. Najvirulentnejší kmeň (AMEP20) spôsobil 29,97 % kumulatívnu mortalitu v deň 12 a 83,25 % mortalitu v deň 21, keď sa testovala najvyššia koncentrácia konídií ( $1 \times 10^9$  konídií ml<sup>-1</sup>). V podobnej štúdiu Ansari and Butt (2012) uvádzajú, že *B. bassiana* spôsobil 53 % úmrtnosť *H. abietis* v deň 12, v prípade, že imága sa ošetrili ponorením do suspenzie konídií ( $1 \times 10^8$  konídií ml<sup>-1</sup>). V tejto štúdiu je mortalita spôsobená kmeňom AMEP20 pri koncentracii  $1 \times 10^8$  konídií ml<sup>-1</sup> bol 63,27 % v deň 21, ale mortalita v 12. deň bola iba 16,65 %. Ansari and Butt (2012) vysvetľujú predĺžený čas do smrti hostiteľa pomocou silnej a tvrdej kutikuly dospelých, ktorá môže tvoriť bariéru proti entomopatogénnym hubám. Táto

pomalá miera usmrčovania entomopatogénnymi hubami môže byť limitujúcim faktorom ich účinného použitia proti *H. abietis*.

Bolo zdokumentované, že traja dospelí jedinci dokážu úplne skonzumovať kôru sadenice smreka do šiestich dní (Girling et al., 2010). Na druhej strane dospelí *H. abietis* môžu žiť až štyri roky (Leather et al., 1999; Eidmann, 1979) a samice kladú vajcia každú sezónu (od mája do septembra) počas svojho života. Vzhľadom na túto skutočnosť sa zdá, že pomalý účinok húb nie je takým dôležitým faktorom. Akékoľvek opatrenie uplatňované na usmrtenie imág môže účinne prispieť ku kontrole populácie. Kvôli pomalému pôsobeniu *B. bassiana*, v priebehu virulentných biologických testov sme tiež testovali účinok liečby suspenziami konídií (vrátane subletálnych koncentrácií) na poškodenie potravy imágami *H. abietis*. Nainfikované jedince poškodili výrazne menšiu plochu kôry ako neošetrené jedince. Účinok sa pozoroval pre všetky testované koncentrácie konídií a bol výraznejší, keď postupovala nákaza. Výsledky jasne ukazujú, že hoci infikovaní jedinci žili pomerne dlho po naočkovaní, ich kŕmenie na vetvičkách bolo znížené, čo malo za následok menšie poškodenie v porovnaní s neošetrenými jedincami. Smrekové sú hlavnými hostiteľskými rastlinami *H. abietis* na Slovensku, ale na experiment poškodenia potravou sme použili vetvičky *P. sylvestris*, pretože túto potravu imága preferujú v porovnaní s *P. abies* (Leather et al., 1994). Vo viacerých štúdiách panuje všeobecná zhoda v tom, že optimálna teplota na kŕmenie imág tvrdoňov je 20°C (Christiansen a Bakke, 1968; Christiansen, 1971b; Leather et al., 1994). Pri tejto teplote jeden jedinec *H. abietis* spotrebuje v priemere 252,9 mm<sup>2</sup> kôry *P. sylvestris* v priebehu 7 dní (Leather et al., 1994). V našom teste neošetrené imága (kontrola) spotrebovali menej potravy (197,83 mm<sup>2</sup>) počas 11 dní a na konci testu konzumácia kôry mierne klesla. Nepoznáme príčiny nesúladu s predchádzajúcou štúdiou, ale môže to súvisieť s rôznou kvalitou poskytnutej potravy alebo rôznymi rozmermi imág. V prirodzených populáciách *H. abietis* sa vyskytuje značná variabilita veľkosti tela a veľkosti ústneho ústrojenstva, ktorá bola dôležitým faktorom ovplyvňujúcim rýchlosť kŕmenia (Wainhouse et al., 2004a).

Laboratórne biologické testy sa zvyčajne vykonávajú za optimálnych podmienok pre entomopatogénne huby, ktoré sa môžu veľmi líšiť od podmienok prostredia v teréne. Preto sa účinnosť vybraného kmeňa *B. bassiana* (AMEP20) testovala vo vonkajších podmienkach. Je dobre známe, že environmentálne faktory môžu pri aplikácii na povrch rastlín významne znížiť životaschopnosť inokula *B. bassiana*. Slnéčné svetlo patrí k najviac obmedzujúcim faktorom (Gardner et al., 1977; Huang and Feng, 2009; Posadas, 2012). Životaschopnosť konídií sa znížila na polovicu po dvojhodinovom ožarovaní

simulovaným slnečným žiarením v laboratóriu (Ignoffo et al., 1977; Fargues et al., 1996). Medzi jednotlivými kmeňmi *B. bassiana* existuje značná variabilita náchylnosti konídií na simulované slnečné svetlo (Morley-Davies, 1995). Životaschopnosť konídií sa môže tiež líšiť v závislosti od rastlín, na ktoré sa inokulum aplikovalo. Napríklad životaschopnosť konídií *B. bassiana* bola vysoká, až 26 dní na listoch hlávkového šalátu a zeleru (Kouassi, 2003), ale výrazne klesla na *Medicago sativa* L. a *Agropyron cristatum* (M. Bieb.) *Napoleonaea imperialis* po 16 dňoch od aplikácie (Inglis et al. 1993) a na rastlinách sóje po 10 dňoch (Wainhouse et al., 2004b). V tejto štúdii boli konídie *B. bassiana* aktívne na smrekových rastlinách 6 dní po aplikácii a spôsobili vysokú úmrtnosť *H. abietis*. Výsledky tiež potvrdzujú, že kontakt s rastlinami ošetrovanými suspenziou vedie k ich vysokej úmrtnosti. Podobná štúdia ukázala, že trvalý kontakt *H. abietis* so smrekovou kôrou ošetrovanou *B. bassiana* spôsobil vysokú mieru infekcie (Wegensteiner and Führer, 1988). Výsledky naznačujú, že uplatňovanie postriekaných konídií na sadenice by mohlo byť perspektívnym prístupom v biologickej kontrole *H. abietis*. Na základe predchádzajúcich zistení sme sa snažili vynájsť vhodnejší spôsob aplikácie entomopatogénnej húby *B. bassiana* ako je postrekovanie.

#### 6.4. Experimenty s nosičom entomopatogénnej huby.

Prvé pokusy aplikácie huby *B. bassiana* na *H. abietis* vykonal Wegensteiner and Führer (1988). V týchto pokusoch bola huba aplikovaná ako prípravok Boverol (WACKER-chemie), koncentrácia konídií v prípravku bola  $3,5 \times 10^{10}$  konídií/g. Zistili, že aplikácia zriedeného prášku *B. bassiana* spôsobila zreteľné zníženie miery úmrtnosti *H. abietis* a bola spojená s koncentráciou konídií. Spóry v dávke nižšej ako  $3 \times 10^4$  konídií mali menší účinok, a to aj po dobu 8 týždňov; pri koncentracii  $4 \times 10^7$  konídií na chrobáka bola 100 % mortalita počas 2 týždňov. Imága však boli ošetrované priamou aplikáciou, to znamená ponorením do suspenzie po dobu 10 sekúnd. Ako ďalší, ktorí skúšali infektivitu entomopatogénnych húb na *H. abietis* bol Ansari and Butt (2012). Títo autori skúmali vplyv entomopatogénnych húb na vývojové štádiá larva, kukla a imágo. Testované boli tri druhy húb, a to *Metarhizium robertsii* (tri kmene huby), *Metarhizium brunneum* (jeden kmeň) a *B. bassiana* (dva kmene). Táto štúdia ukázala, že všetky vývojové štádiá sú citlivé na entomopatogénne huby, a že niektoré kmene sú zjavne patogénnejšie ako iné. Výsledky tiež ukazujú, že larvy a kukly boli vysoko citlivé a uhynuli rýchlejšie ako imága na všetky druhy/izoláty *Metarhizia*, pravdepodobne preto, že ich mäkké telá predstavovali menšiu bariéru proti infekcii ako tvrdá sklerotinizovaná



kutikula. *B. bassiana* v tejto štúdií nedosiahla 100 % mortalitu ale len  $68,0 \pm 8,4$  % a  $67,0 \pm 2,7$  % pre dva použité kmene. Williams et al. (2013) testovali aplikáciu zálievky suspenzie entomopatogénnych háďatiek a entomopatogénnych húb priamo ku pňom v teréne a na jednej ploche bol použitý prípravok Novozymes Met 52, ktorý sa vyrába ako konidiospory na zrnách ryže a používa sa na kontrolu *Otiorhynchus sulcatus*. Z tohto prípravku bola urobená suspenzia. Na mortalitu lariev mali vyššiu účinnosť nematódy, ktoré boli zodpovedné za 50 % úmrtnosť lariev. Huby infikovali 20 % lariev a kukiel škodcu. Nezistili žiadnu synergiu medzi účinkom aplikovaných druhov nematód a húb. Odber vývojových štádií prebiehal deštruktívnou metódou, t. z. odobrala sa  $\frac{1}{4}$  s každého pňa, skadiaľ sa následne získavali *H. abietis* na ďalšie zisťovanie podľa metodiky Dillon et al. (2006). Podobnú prácu a použitie entomopatogénnych húb a háďatiek vykonali Namara et al. (2018). V pokusoch hodnotili účinnosť entomopatogénnych húb (EPH) samotných a v kombinácii s entomopatogénnymi nematódami (EPN) proti nezrelým štádiám. Použili komerčné kmene *Metarhizium brunneum* a *B. bassiana* a kmeň *Beauveria caledonica* izolovaný z biotopu škodcu. Ako EPN použili *Steinernema carpocapsae* (SC) a *Heterorhabditis downesi* Stock (HD). Zistili, že EPN dokážu znížiť početnosť lariev v pňoch o 72 % SC a 92 % HD. EPH dokázali infikovať a usmrtiť 23 % *H. abietis*.

Hľadanie nových a lepších spôsobov stimulácie sporulácie entomopatogénnych húb je nevyhnutné pre rozvoj hromadnej produkcie očkovacích látok na kontrolu niektorých hmyzích škodcov. Je dokázané, že entomopatogénne huby dokážu rásť na rôznych druhoch obilnín. Rodriguez-Gamez et al. (2017) testovali dva kmene *B. bassiana* na rôznych druhoch obilnín. Najvyššia produkcia sa dosiahla na ovse pri  $5 \times 10^8$  konídiách/g a najnižšia v prípade jačmeňa bola  $1,72 \times 10^8$  konídií/g. Produkcia ryže bola  $3,15 \times 10^8$ , ciroku a kukurice  $2,68$  a pšenice  $2,38 \times 10^8$  konídií/g, v danom poradí. V súčasnosti je dostupných na trhu niekoľko druhov prípravkov, ktoré obsahujú EPH *Beauveria* a *Metarhizium*, kde je hlavný hubový patogénny hmyz využívaný na biologickú kontrolu, najmä kvôli ich všadeprítomnej, kozmopolitnej distribúcii a ľahkej hromadnej produkcii pomocou umelých médií. Obidva druhy tvoria takmer 70 % všetkých komerčných mykozekticídov (Faria and Wraight, 2007).

Napríklad spoločnosť Koppert v Brazílii produkuje prípravok s *Beauveria* (Boveril® WP, kmeň ESALQ-PL63) za použitia pevnej fázy fermentácie na zvlhčenú ryžu. Tento produkt bol odporúčaný na ničenie *Tetranychus urticae*, *Bemisia tabaci*, *Gonipterus scutellatus* a *Hypothenemus hampei* (Mascarin and Jaronski, 2016). V USA, Európskej

únií, Japonsku a Mexiku *Beauveria* kmeň GHA, ako BotaniGard® a Mycotrol®. Tieto produkty sú široko používané (Faria and Wraight, 2001; 2007; Lacey et al., 2008). Zaujímavejšia je zmes *M. anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum* a *B. bassiana* s komerčným názvom MicosPlag®, ktorá sa predáva v Kolumbii. Mascarin and Jaronski (2016) uvádzajú vo svojej práci celkovo 59 prípravkov, ktoré obsahujú EPH, z toho väčšina výrobkov na báze *Beauveria* je zmáčateľný prášok, koncentrovateľná suspenzia alebo formulácia emulgovanej suspenzie.

Náš nosič, na ktorý sme podali Slovenskú patentovú prihlášku značky spisu PP 79-2019 s názvom „Biologický prípravok na ochranu rastlín, spôsob jeho prípravy a spôsob jeho použitia“ bola podaná 12. júla 2019 a 5. augusta 2020 aj medzinárodnú patentovú prihlášku PCT/SK2020/050007. Je to hotový výrobok, ktorý je okamžite pripravený na aplikáciu. V roku 2016 a 2018 sme vykonali prvé laboratórne experimenty s nosičom na *H. abietis*. V tomto nosiči je použitý nami získaný kmeň *B. bassiana* AMEP20, o ktorom sme zistili, že je najvirulentnejší (Barta et al., 2019). Na každý pokus bolo použitých 360 imág, ktoré boli rozdelené do 6 blokov. Jeden kontrolný blok (*control*) a 5 blokov s nosičmi. Blok *fresh* bol nosič nevystavený žiadnym nepriaznivým vplyvom, blok UVC 48 h nosič vystavený UVC žiareniu a suchu na 48 hodín, blok *frozen 48 h* vystavený mrazu -18 °C na 48 hodín, blok *beetles 24 h* imága boli pri nosičoch umiestnené na 24 hodín a blok *two months* dva mesiace staré nosiče, ktoré boli po nainfikovaní umiestnené do chladničky. Testovali sme rôzne druhy nepriaznivých vplyvov na prežívanie konídií húb (sucho a UVC žiarenie bolo v jednom ošetrení, mráz). Je známe, že UV-C žiarenie usmrcuje konídiá entomopatogénnych húb (Zimmerman, 2007). Počas roku 2017 sme vykonávali množstvo experimentov, ktorými sme docielili, že infektivita nosičov sa výrazne zlepšila. V roku 2018 sme tento pokus zopakovali ale nechali sme nepriaznivé vplyvy na nosiče pôsobiť dlhšiu dobu, namiesto 48 hodín pôsobili 120 hodín. V roku 2018 sme dosiahli lepšie výsledky ako v roku 2016 aj keď dĺžka nepriaznivých vplyvov bola dlhšia. Tento jav si vysvetľujeme tým, že v roku 2016 sme nevedeli „prinútiť“ hubu na nosiči dostatočne sporulovať, a preto nevyšli také dobré výsledky. Toto potvrdzuje aj to, že pri použití *two months* sme dosiahli mortalitu všetkých imág už v 17. deň od ošetrenia. Takúto istú mortalitu sme dosiahli aj v experimente v roku 2018. Ostatné typy nepriaznivých vplyvov sa v jednotlivých rokoch líšili. V roku 2016 nedosiahli ostatné ošetrenia mortalitu imág 100 %, zatiaľ čo v roku 2018 všetky nosiče dosiahli mortalitu 100 %. V 20. dni bola 100 % mortalita zaznamenaná pri nosičoch *fresh* a *frozen 120 h*, pri ďalšej kontrole, v 24. deň, bola 100 % mortalita v bloku *UVC 120 h*. V 30. deň sme

pokus ukončili, lebo sme zaznamenali 100 % mortalitu imág aj v bloku *beetles* 24 h. Podobné výsledky sa dosiahli pri priamej aplikácii konidií v koncentrácií  $1 \times 10^8$  na imága tvrdoňa smrekového Ansari and Butt (2012), kde všetky infikované imága boli usmrtené v 20. deň od aplikácie. V práci Barta et al. (2019), kde sme použili tento istý kmeň huby ako na nainfikovanie nosiča, vyšla 100 % mortalita v 33. deň od aplikácie suspenzie s koncentráciou konidií v ml  $1 \times 10^8$ .

V roku 2018 sme vykonali experiment s nosičmi, ktorý bol umiestnený v poloprirodných podmienkach. Cieľom experimentu bolo zistiť, či sa imága dokážu nakaziť aj keď nebudú v bezprostrednom kontakte s nosičom. Kliečky, v ktorých bol umiestnený experiment, boli o veľkosti  $50 \times 50$  cm a 70 cm výška. Nosiče boli umiestnené do lapacích kôr, ktoré sa v pravidelných dvoj týždňových intervaloch vymieňali a taktiež sme vkladali do kliečok aj nové imága. Vkladanie nových imág bolo z dôvodu, aby bol zachovaný tlak na sadenice. V kliečkach, kde nebol prítomný nosič, sme zaznamenali určitú mortalitu imág ale tá nebola spôsobená *B. bassiana*. Vieme to z toho dôvodu, že na konci experimentu všetky mŕtve imága boli ešte umiestnené samostatne do Petriho misky na navlhčenú buničinu, kde boli po dobu 5 dní sledované či sa na nich nezačne tvoriť mycélium. Na imágach, ktoré boli v kliečkach kde bol nosič, sa na neprerastených imágach do piatich dní začalo tvoriť mycélium. Z toho vieme povedať, že imága usmrtila EPH. Túto metodiku zisťovania úmrtnosti použil vo svojej práci Barta et al. (2019), ktorý umiestňoval mŕtve imága na buničinu na 72 hodín, v opisovanom prípade na 120 hodín. Predpokladali sme, že plocha kŕmnych jaziev na sadenicích sa v kliečkach zmenší. Do polovice experimentu sa tento predpoklad nenaplnil, dokonca pri prvých troch kontrolách bola plocha kŕmnych jaziev v priemere na jednu sadenicu väčšia ako v kliečkach kde nebol nosič. Toto platilo do štvrtej kontroly, kde sa plocha kŕmnych jaziev vyrovnala a pri posledných dvoch kontrolách bola plocha kŕmnych jaziev väčšia v kliečkach kde neboli umiestnené nosiče. Vplyv na mortalitu sadeníc sa začal prejavovať až v pri neskorších kontrolách. Do 4. kontroly (56. deň) bola mortalita sadeníc na rovnakých úrovniach alebo vyšších keď bol prítomný nosič. Pri kontrole (70. deň) sa to však otočilo a viac mŕtvych sadeníc bolo v kliečkach, kde nebol prítomný nosič.

Posledný pokus s nosičmi sme vykonali v čisto prírodných podmienkach. Tu bol cieľ zistiť, či sa dokážu imága *H. abietis* nakaziť aj pri krátkom kontakte s nosičom a otestovať rôzne druhy spôsobu nalákania imág k nosičom. Boli založené 4 bloky. Na troch bol umiestnený nosič, a z toho na dvoch plochách boli imága lákané cieľene (na jednej ploche chemický atraktant a na druhej plát smrekovej kôry). Po 6 dňoch od

začiatku experimentu sa na plochu osadili zemné pasce, do ktorých sa umiestnil atraktant (borovicová vetvička s etanol vo fľaštičke) (Lalík et al., 2019). Zber imág zo zemných pascí prebiehal 4 dni. Za toto obdobie sa nám podarilo odchytiť celkom 564 imág. V jednotlivých blokoch sa množstvo odchytených imág do zemných pascí odlišovalo. Toto mohlo byť spôsobené rozmiestnením pňov po ploche. Po prenesení imág do laboratória sa sledovala mortalita v pravidelných intervaloch, každý pondelok a štvrtok. Pri prvej kontrole bolo mortalita imág pri jednotlivých ošetreniach na nízkej úrovni, do 10 %. Pri ďalších kontrolách sa už jednotlivé bloky odlišovali. Najvyššia mortalita imág, 91,18 %, bola dosiahnutá pri imágach z bloku *beetlebark*. Takáto vysoká mortalita je spôsobená tým, že imága prišli do kontaktu s nosičmi. S predchádzajúcich experimentov v Petriho miskách s nosičmi sme zistili, že mortalita pri kontakte je na úrovni 100 %. Do zemných pascí sa mohli odchytiť aj imága, ktoré neprišli do kontaktu s nosičom, a preto v jednotlivých blokoch bola nižšia mortalita. Metóda použitia nosičov s entomopatogénnou hubou *Beaveria bassiana* sa ukazuje ako vhodná na zníženie početnosti *H. abietis*. Na našom kontrolnom bloku bola mortalita imág spôsobená EPH na úrovni 18,69 %, čo je v porovnaní so zisteniami Barta et al. (2019) trikrát viac. Toto môže byť spôsobené tým, že imága z blokov, kde boli umiestnené nosiče, odmigrovali a dostali sa do kontrolného bloku, kde sme ich následne odchytili do zemných pascí. Na blokoch, kde sa nachádzali nosiče, bola mortalita na konci experimentu 41,59 % na bloku *carrier*, na bloku *attractant* 51,16 % a na bloku *bark* 62,16 %.

## 7. Záver a odporúčania pre prax

Prvé dva experimenty prebehli v roku 2016 a 2017 v poloprirodných podmienkach. V roku 2016 sa testovali dva druhy ošetrovania (vosk, insekticíd) voči neošetrenej kontrole na dvoch druhoch ihličnatých sadeníc (s. obyčajný a d. tisolistá). Ako najlepšia ochrana sadeníc sa ukázal insekticíd voči vosku na obidvoch druhoch sadeníc aj keď rozdiely medzi poškodenou plochou sadeníc neboli až také veľké. Imága viac poškodzovali neošetrený smrek ako duglasku ale pri ošetrených sadeníc to bolo naopak a bola poškodzovaná viac duglaska. V roku 2017 sme tento pokus zopakovali ale iba so sadenicou smreka obyčajného s tromi rôznymi ošetreniami (vosk, insekticíd a lepidlo) voči neošetrenej kontrole. Porovnávali sme množstvo imág v klietkach (10 klietok s dvomi imágami 10 klietok so 4 imágami). Predpokladali sme, že s množstvom pridaných imág bude poškodená plocha kôry dvojnásobná. Tento predpoklad sa však nenaplnil. Poškodené plochy kôry pri kontrolných sadenicách kde boli 4 imágach v klietke boli väčšie o niekoľko desiatok mm<sup>2</sup> maximálne o 100 mm<sup>2</sup>. Pri kontrolných sadenicách to bolo o niečo viac ale taktiež to neboli dvojnásobné hodnoty. Z porovnania ošetrení najlepšie dokázal sadenice ochrániť v oboch prípadoch množstva imág vosk. Po ňom nasledovalo ošetrovanie insekticídny prípravkom a najslabšie ochránilo sadenice lepidlo. V roku 2018 sme založili podobný experiment s ochrannými metódami ale už vo vonkajších podmienkach. Bolo vysadených 600 sadeníc, ktoré boli ošetrené piatimi rôznymi typmi ochrany voči imágam tvrdňov a kontrola. Každý jeden variant obsahoval 100 sadeníc. Ako ochrany boli použité dva druhy vosku, insekticíd, lepidlo, ochranné golierie a porovnávali sme to voči neošetreným sadenicám. Na konci vegetačnej sezóny (10. októbra 2018) sme vykonali meranie poškodenej plochy kôry. Najlepšie dokázalo sadenice ochrániť ošetrovanie voskom KVA AE wax typ F, nasledovalo ošetrovanie KVA AE wax typ C, ako ďalšie ošetrovanie insekticíd Vaztak, potom ošetrovanie lepom Vermifix a najmenej dokázali ochrániť sadenice golieriky. Voči neošetrenej kontrole dokázalo najmenej účinné ošetrovanie golierikov znížiť poškodenie sadeníc v priemere na 1/5, čo je taktiež dobrý výsledok. Použitie fyzických bariér a chemického ošetrovania dokáže výrazne znížiť poškodenie sadeníc a je ho vhodné používať na miestach, kde očakávame poškodenie sadeníc.

Ďalším cieľom bolo otestovať možnosti hromadného odchytu tvrdňov do zemných pascí. Tu bol vykonaný jeden experiment na šiestich rôznych lokalitách v Česku a na Slovensku. Testovali sme 4 druhy synteticky vyrábaných rôznych typov atraktantov do

zemných pascí a jeden prirodzený atraktant (borovicová vetvička s etanolom). Najviac imág sa nám podarilo odchytiť na prirodzený atraktant, celkovo cez 4500 ks imág *H. abietis* a *H. pinastri*. Zo syntetických atraktantov najviac imág odchytil alfa-pinén s etanolom, necelých 2100 imág, nasleduje komerčne dostupný prípravok Hylodor s viac ako 1 800 imág. Ďalšie dva atraktanty, ktoré obsahovali terpentínový olej s etanolom, spolu alebo oddelene odchytili okolo 1000 imág. Metóda odchytu imág do zemných pascí je vhodná pre prax ma monitoring a pri použití dostatočného množstva pascí na hektár by mohla slúžiť ako kontrola.

Posledným cieľom práce bolo v laboratórnych podmienkach otestovať účinnosť entomopatogénnej huby *B. bassiana* na mortalitu imág tvrdoňa smrekového. Tu sa vykonala séria experimentov, kde sme identifikovali vhodný kmeň huby, ktorý dokáže úspešne usmrcovať imága tvrdoňa smrekového. Vyselektovali sme kmeň, ktorému bolo pridelené označenie *B. bassiana* AMEP20. Tento kmeň sme ďalej testovali v rôznych formách aplikácie namáčanie imág do suspenzie. Infikovali sme sadenice a následne pridávali imága po jednotlivých dňoch. Zistili sme, že huba dokáže na sadenicách prežiť 6 dní a počet usmrtených imág so zjavnými známami prerastenia mycéliom bolo 63,2 %. Súbežne so skúmaním vhodného kmeňa huby na tvrdoňa smrekového sme vyvíjali nosič, na ktorý sme podali Slovenskú patentovú prihlášku značky spisu PP 79-2019 s názvom „Biologický prípravok na ochranu rastlín, spôsob jeho prípravy a spôsob jeho použitia“ bola podaná 12. 7. 2019 a medzinárodnú patentovú prihlášku PCT/SK2020/050007. Na tento nosič bol úspešne naočkovaná huba *B. bassiana*, kmeň AMEP20. Sériou testov najskôr v laboratórnych podmienkach počas roku 2016 a 2018 sme zistili, že nosič s hubou dokážu nainfikovať a usmrtiť imága tvrdoňa smrekového. Nosiču neuškodí, keď je vystavený nepriaznivým vplyvom ako je sucho, UV-C žiarenie a mráz. V roku 2016 sme dosiahli horšie výsledky lebo testovanie len začínalo a nedokázali sme hubu dostatočne dobre sporulovať. Počas nasledujúcich dvoch rokov sme sporuláciu húb na nosiči vylepšili, čo dokazujú testy v roku 2018, kde sme vykonali dva testy. Jeden v laboratórnych podmienkach a druhý v poloprirodných. Mortalita imág v laboratórnom teste dosiahla pri všetkých typoch ošetrenia nosiča nepriaznivými vplyvmi 100 %. Poloprirodný experiment, kde imága neboli stále v prítomnosti nosiča, dosiahol uspokojivé výsledky s mortalitou imág tesne pod hranicou 90 %. V roku 2019 sme vykonali posledný experiment v terénnych podmienkach, kde sme testovali nosič s hubou. Experiment bol založený na štyroch blokoch. Jeden blok kontrolný (bez nosičov). Na zvyšných troch blokoch boli umiestnené nosiče. Odchyť imág z plôch

prebiehal do zemných pascí na ďalší týždeň, kedy sme zozbierali 530 imág zo zemných pascí a 34 imág bolo odobraných priamo z kôry od nosiča, na ktorých sme následne sledovali mortalitu spôsobenú hubou *B. bassiana*. Mortalita na konci sledovania bola najväčšia pri imágach *beetlebark* a to 91 %. Nasledovali imága odobrané zo zemných pascí z bloku *bark* mortalita 62,16 %. Ďalšie boli imága z bloku *attractant* mortalita 51,16 %, a na bloku *carrier* bola mortalita 41,59 % a na kontrolnom bloku *control* 18,69 %. Výsledky tohto experimentu sú veľmi sľubné, keďže nevieme zaručene povedať, že všetky imága, ktoré boli na ploche odchytené do zemných pascí, prišli do kontaktu s nosičom. Táto metóda obrany sa ukazuje ako perspektívna pre prax, je aj ekologická lebo kmeň huby pochádza priamo z prostredia Slovenska, čiže je pôvodná a materiál, na ktorom huba rastie je taktiež prírodný a rozložiteľný. Táto metóda ochrany si však vyžaduje ďalšie skúmanie.

## 8. Zoznam použitej literatúry

- Altum, B., 1889. Waldbeschädigungen durch Thiere und Gegenmittel, Berlin, Springer p. 228.
- Ansari, M.A., Butt, T.M., 2012. Susceptibility of different developmental stages of large pine weevil *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic fungi and effect of fungal infection to adult weevils by formulation and application methods. J. Invertebr. Pathol. 111, 33–40.
- Augustyniuk-Kram, A., Kram, K.J., 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In Forest Ecosystems—More than Just Trees; Blanco, J.A., Lo, Y.H., Eds.; InTech Press: Rijeka, Croatia, s. 265–294.
- Bakke, A., Lekander, B., 1965. Studies on *Hylobius abietis* L. II. The influence of exposure on the development and production of *Hylobius abietis*, illustrated through one Norwegian and one Swedish experiment. Meddeleser fra det Norske Skogsforsøksvesen 20, p. 117–135.
- Barta, M., Kautmanová, I., Čičková, H., Ferenčík, J., Florián, Š., Novotný, J., Kozánek, M., 2018. Hypocrealean fungi associated with populations of *Ips typographus* in West Carpathians and selection of local *Beauveria* strains for effective bark beetle control. Biologia. 73, 53–65.
- Barta, M., Lalík, M., Rell, S., Kunca, A., Horáková, M.K., Mudrončková, S., Galko, J., 2019. Hypocrealean fungi associated with *Hylobius abietis* in Slovakia, their virulence against weevil adults and effect on feeding damage in laboratory. Forests. 10, 634.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. J. Stat. Softw. 67, 1–48.
- Bayer Environmental Science. [cit. 2020-05-08]. <https://www.av.se/globalassets/filer/produktion-industri-och-logistik/bekampningsmedlet-merit-forest-wg-mot-skadeinsekter-pa-barrtradsplantor.pdf>.
- Bedding, R.A., Molyneux A.S., 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematologica. 28, 354–359.
- Bejer-Petersen, B., Juutinen, P., Kangas, E., Bakke, A., Butovitsch, V., Eidmann, H., Heqvist, K.J. & Lekander, B., 1962. Studies on *Hylobius abietis* L. I. Development and life cycles in the Nordic countries. Acta Entomologica Fennica 17, 1–107.



- Berlinger, M.J., Tamim, M., Tal, M., Miller, A.R., 1997. Resistance mechanisms of *Lycopersicon pennellii* accessions to *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera : noctuidae) J. Econ. Entomol, 90, 1690 – 1696.
- Bisset, J., Widden, P., 1988. A new species of *Beauveria* isolated from Scottish moorland soil. Can. J. Bot. 66, 361–362.
- Björklund, N., Nordlander, G., Bylund, H., 2005. Olfactory and visual stimuli used in orientation to conifer seedlings by the pine weevil, *Hylobius abietis*. Physiol. Entomol. 30, 225–231.
- Boemare, N.E., Akhurst, R.J., Mourant R.G., 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of EPNs, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 249–255.
- Blaxter M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature, 392, 71–75.
- Brixey, J.M., Moore, R., Milner, A.D., 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. For. Ecol. Manag. 226, 161–172.
- Burket, L., 1905. Nauka o Ochrane lesu. Písek, J. Burian, p. 259.
- Conniflex. [cit. 2020-01-19]. <http://www.bccab.com/wp-content/uploads/2018/02/Conniflex-english-webb.pdf>
- Dawidowicz, A., Czapczyńska, N., 2011. Sea Sand Disruption Method (SSDM) as a Valuable Tool for Isolating Essential Oil Components from Conifers. Chem. Biodivers. 8, 2045- 2056
- De Faria, M.R., Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control. 43, 237–256.
- Dempsey, C.M., Griffin, C.T., 2003. The infectivity and behaviour of exsheathed and unsheathed *Heterorhabditis megidis* infective juveniles. Nematology. 5, 49–53.
- Dillon, A.B., Ward, D., Downes, M.J., Griffin, C.T., 2006. Suppression of the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) in pine stumps by

- entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. *Biol. Control.* 38, 217–226.
- Dillon, A.B., Downes, M.J., Ward, D., Griffin, C.T., 2007. Optimizing application of entomopathogenic nematodes to manage large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) populations developing in pine stumps, *Pinus sylvestris*. *Biol. Control.* 40, 253–263.
- Dillon, A.B., Rolston, A.N., Meade, C.V., Downes, M.J., Griffin, C.T., 2008. Establishment, persistence, and introgression of entomopathogenic nematodes in a forest ecosystem. *Ecol. Appl.* 18, 735–747.
- Dix, I., Burnell, A.M., Griffin, C.T., Joyce, S.A., Nugent, J.M., 1992. The identification of biological species in the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) by cross-breeding second-generation amphimictic adults. *Parasitology.* 104, 509–518.
- Djeddour, D., 1996. An investigation into adult feeding preferences of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) with particular reference to the potential of broad leaf species mixtures to act as feeding depressants. MSc thesis, Imperial College, University of London.
- Dobrowolski M., 2000. The susceptibility of the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) to insecticides and the role of the oxidative metabolism in the developing of the pest resistance to DDT and pyrethroids. *Folia Forestalia Polonica, Series A*, 42, 83–94.
- Eidmann, H.H., 1963. Zur Diapause einiger Forstinsekten. *Z. Angew. Entomol.* 52, 362–367.
- Eidmann, H.H., 1968. Invasion of conifer plantations by radioactively labelled *Hylobius abietis*. s. 75–84 in: *Isotopes and radiation. Proceedings of a Symposium, Vienna, 4–8 December 1967 jointly organized by the IAEA and FAO, Vienna, IAEA.*
- Eidmann H.H., 1974. *Hylobius abietis* L., Großer Brauner Rüsselkäfer, Vol. 2. In: Schwenke W. (ed.). *Die Forstschädlinge Europas. [Forest pest insects in Europe].* Paul Parey, Hamburg and Berlin, Germany, p. 277–293.
- Eidmann, H.H., 1985. Silviculture and insect problems. *Z. Angew. Entomol.* 99, 105–112.
- Eidmann, H.H., Nordenhem, H., Weslien, J., 1996. Physical protection of conifer seedlings against pine weevil feeding. *Scand. J. For. Res.* 11, 68–75.
- Eidmann, H.H., 1979. Integrated management of pine weevil (*Hylobius abietis* L.) populations in Sweden. In: *Current Topics in Forest Entomology; Forest Service General Technical Report WO-8; USDA: Washington, DC, USA*, p. 103–109.

- Eidmann, H.H., von Sydow, F., 1989. Stockings for protection of containerised seedlings against pine weevil (*Hylobius abietis* L.) damage. *Scand. J. For. Res.* 4, 537–547.
- Ehnström, B.; Axelsson, R., 2002. Insekts Gnag I Bark Och Ved; SLU: Uppsala, Sweden.
- Elliott, M., 1977: Synthetic Pyrethroids. *In: Elliott M (ed) Synthetic pyrethroids. ACS Symposium series, no 42. American Chemical society, Washington, DC, 1–28.*
- Erbilgin, N., Szele, A., Klepzig, K.D., Raffa, K.F., 2001. Trap Type, Chirality of  $\alpha$ -Pinene, and geographic region affect sampling efficiency of root and lower stem insects in pine. *J. Econ. Entomol.* 94, 1113–1121.
- Eriksson, S., Karlsson, A., Härlin, C., 2017. Test av mekaniska plantskydd mot snytbaggar i omarkberedd och markberedd mark, anlagt våren 2013. Slutrapport Sveriges lantbruksuniversitet, Report: 15, 1-25.
- Eriksson S., Wallertz K., Karlsson A., 2018. Test av mekaniska plantskydd mot snytbaggar i omarkberedd och markberedd mark, anlagt våren 2015. Slutrapport. SLU, Enheten för skoglig fältforskning, Rapport: 16, 1-22.
- Escherich, K., 1923. Die Forstinsekten Mitteleuropas, 2nd ed.; Paul Parey: Berlin, Germany, p. 663.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L.A., Lomer, C.J., Rougier, M., 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia.* 135, 171-181.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Rougier, M., 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* 89, 383-392.
- Faria, M., Wraight, S.P., 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop. Prot.* 20, 767–778.
- Faria, M.R., Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control.* 43, 237–256.
- Fraser, N.R., 1952. Certain aspects of the morphology and bionomics of the pine weevil, *Hylobius abietis* L. Thesis for the Diploma of Imperial College.
- Frost, S., D. Clarke, D., 2002. Bacteria- nematode symbiosis. *In: R. Auger (Ed.) Entomopathogenic Nematology.* 57–77. CABI Publishing, Walling, U.K.
- Galko, J., Gubka, A., Vakula, J., 2012. Praktické skúsenosti s využitím lapacích kôr na zníženie škôd spôsobených tvrdoňom smrekovým na mladých výsadbách ihličnatých

- drevín. In: Kunca, A., Aktuálne problémy v ochrane lesa; Nový Smokovec, S., Kunca, A., Eds.; Národné Lesnícke Centrum: Zvolen, Slovakia, s. 60–64.
- Galko, J.; Kunca, A.; Ondruš, M.; Špilda, I.; Rell, S., 2015. Zhodnotenie a porovnanie nákladov na rôznu formu ošetrovania ihličnatých sadeníc proti tvrdoňovi smrekovému. In: Kunca, A., Aktuálne problémy v ochrane lesa; Nový Smokovec, S., Eds.; Národné Lesnícke Centrum: Zvolen, Slovakia, s. 101–105.
- Galko, J., Vakula, J., Kunca, A., Rell, S., Gubka, A., 2016: Ochrana lesa proti tvrdoňom a lykokazom na sadenicich. STN 48 2712. 8 p.
- Gardner, W.A., Sutton, R.M., Noblet, R., 1977. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosemavneatrix* on soybean foliage. *Environ. Entomol.* 6, 616-618.
- Gerdin, S., 1977. Observations on pathogens and parasites of *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) in Sweden. *J. Invertebr. Pathol.* 30, 263–264.
- Ghikas, D.V., Kouvelis, V.N., Typas, M.A., 2010. Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*. *BMC Microbiology.* 10, 174.
- Girling, R.D., Ennis, D., Dillon, A.B., Griffin, C.T., 2010 The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* 104, 195–202.
- Glare, T.R., Reay, S.D., Nelson, T.L., Moore, R., 2008. *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycol. Res.* 112, 352–360.
- Glovacka, B., Lech, A., Wilczynski, W., 1991. Application of deltamethrin for spraying or dipping to protect Scots pine seedlings against *Hylobius abietis* L. and logs against *Tomicus piniperda* L. *Ann. Sci. For.* 48, 113–117.
- Gradinariu, F., Bodescu, C., Mutu, M.E., Jaluba, I., 2012. The dynamics of the damage caused by *Hylobius abietis* (L.) in the first two years after the spruce plantations establishment in relation to the control measures applied. *J. Horticult. Forest. Biotechno.* 16, 1015.
- Griffin, C.T., Boemare, N.E., Lewis, E.E., 2005. Biology and behaviour. In: Grewal, P.S., Ehlers, R-U., Shapiro-Ilan D.I., (Eds) *Nematodes as Biocontrol Agents.* 47–64. CABI Publishing, Croydon, U.K.

- Griffin, C.T., O'Callaghan, K., Dix, I., 2001. A self-fertile species of *Steinernema* from Indonesia: further evidence of convergent evolution amongst entomopathogenic nematodes? *Parasitology*. 122, 181–186.
- Grube. [cit. 2019-12-11]. <https://www.grube.sk/katalog/hylopro-russelkaferschutzkragen-aus-bio-kunststoff-250-stuck/p-4030871.xhtml>
- Guslits, I.S., 1970. Vlijanie uslovij pitaniya plodovitost' I ziznedejetal'nost' zukov bol'sogo osnovogo dolgonosika – *Hylobius abietis* L. *Zoologicheskii. Zhurnal*. 49, 862–868.
- Hallsworth, J.E., Magan, N., 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* 74, 261-266.
- Hagner, M., Jonsson, C., 1995. Survival after planting without soil preparation for pine and spruce seedlings protected from *Hylobius abietis* by physical and chemical shelters. *Scand. J. For. Res.* 10, 225–234.
- Härlin, C., Eriksson, S., 2016. Test av mekaniska plantskydd mot snytbagg i omärkeredd och markeredd mark, anlagt våren 2012. Slutrapport. SLU, Enheten för skoglig fältforskning, Rapport: 12, 1-28.
- Harte, J., Holdren, C., Schneider, R., Shirley, C., 1991. *Toxics A to Z, a guide to everyday pollution hazards*. Oxford, England: University of California Press.
- Henry, C.J., 1995. The effect of a braconid ectoparasitoid, *Bracon hylobii* Ratz., on larval populations of the large pine weevil, *Hylobius abietis* L. PhD thesis, University of Ulster, Coleraine.
- Huang, B.F., Feng, M.G., 2009. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. *Mycopathologia*. 168, 145–152.
- Hywel-Jones, N.L., Gillespie, A.T., 1990. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* 94, 389-392.
- Charitonova, N.Z., 1965. Bolšoj Sosnovyj Dolgonosik I Borba s Nim; 1. Vyd; Lesnaja Promyšlennost Progress: Moskva, Russia, p. 88.
- Christiansen, E., 1971a. Developmental stages in ovaries of pine weevils, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae), present in reforestation areas during the first years after the final felling. *Meddeleser fra det Norske Skogforsøksvesen* 28, 393–415.

- Christiansen, E., 1971b. Laboratory study on factors influencing pre-imaginal development in *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). Norsk Entomol. Tidsskr. 18, 1–8.
- Christiansen, E., Bakke, A., 1968. Temperature preference in adults of *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) during feeding and oviposition. Z. Angew. Entomol. 62, 83–89.
- Ignoffo, C.M., Garcia, C., Hostetter, D.L., Pinnell, R.E., 1977. Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* through sand and loam soils. J.Econ. Entomol. 70, 163–164.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L., 1993. Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. Biol. Control. 3, 258–270.
- Informácie o lesoch Európy [cit. 2020-11-10]. <https://fra-platform.herokuapp.com/EU/fra2020/extentOfForest/>
- Inward, D.J.G., Wainhouse, D., Peace, A., 2012. The effect on temperature on the development and life cycle regulation of the pine weevil *Hylobius abietis* and potential impacts of climate change. Agr. Forest. Entomol. 14, 348–357.
- Jaronski, S.T., 2014. Mass production of entomopathogenic fungi: State of the art. In Mass Production of Beneficial Organisms; Morales-Ramos, J., Rojas, M.G., Shapiro-Ilan, D., Eds.; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, p. 357–413.
- Jirovetz, L., Puschmann, Ch., Stojanova, A., Metodiev, S., Buchbauer, G., 2000. Analysis of the essential oil volatiles of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) from Bulgaria. Flavour. Frag. J. 15, 434–437.
- Johnigk, S.A. Ehlers, R-U., 1999. Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). Nematology. 1, 251–260.
- Kapranas, A., Malone, B., Quinn, S., O’Tuama. P., Peters, A., Griffin, C.T., 2017. Optimizing the application method of entomopathogenic nematode suspension for biological control of large pine weevil *Hylobius abietis*. Biocontrol. 62, 659–667.
- Kaya, H.K., Stock, S.P., 1997. Techniques in insect nematology. In: L.A. Lacey (Ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. 281–324. Academic Press, San Diego, CA, U.S.A.
- Kingsolver, J.G., Huey, R.B., 2008. Size, temperature, and fitness: three rules. Evol. Ecol. Res. 10, 251–268.

- Khan, M. A., Ahmad, W., 2015. The management of Spodopteran pests using fungal pathogens. In: Sree, K.S., Varma, A., (Eds.), Biocontrol of lepidopteran pests (pp. 123–160).
- Komárek, J., 1924. Několik dat z biologie klikoroža (*Hylobius abietis*) na Slovensku. Lesnická Práce, 3: 370–373.
- Krieg, A., Gröner, A., Huber, J., Zimmermann, G., 1981. Inaktivierung von verschiedenen Insektenpathogenen durch ultraviolette Strahlen. J. Plant Dis. and Protect. 88, 38-48.
- Kouassi, M., Coderre, D., Todorova, S.I., 2003. Effect of plant type on the persistence of *Beauveria bassiana*. Biocontrol Sci. Techn. 13, 415–427.
- Kurz, W., Dymond, C.C., Stinson, G., Rampley, G. J., Neilson, E. T., Carroll, A. L., Ebata, T., Safranyik, L. 2008. Mountain pine beetle and forest carbon feedback to climate change. Nature, 452, 987–990.
- Kuźmiński, R., Bilon, A., 2009. Evaluation of effectiveness of selected types of traps used in capturing of large pine weevil—*Hylobius abietis* (L.). Acta Sci. Pol.—Silv. Colendarum R. Ind. Lig. 8, 19–26.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B., 2017. “lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models.” J. Stat. Softw. 82, 1-26.
- Kvaæ wax. [cit. 2019-10-12]. <http://kvaæ.no/why/>
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vails, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? Biol.Control. 21, 230–248.
- Lacey, L.A., Wright, S.P., Kirk, A.A., 2008. Entomopathogenic fungi for control of *Bemisia tabaci* biotype B: foreign exploration, research and implementation. In: Gould, J., Hoelmer, K., Goolsby, J., (eds) Classical biological control of *Bemisia tabaci* in the United States—a review of interagency research and implementation. Springer, Dordrecht, p. 33–69.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. J. Invertebr. Pathol. 132, 1–41.
- Lalík, M., Holuša, J., Galko, J., Resnerová, K., Kunca, A., Nikolov, C., Mudrončková, S., Surový, P., 2019. Simple is best: Pine twigs are better than artificial lures for trapping of pine weevils in pitfall traps. Forests. 10, 642.
- Lalík, M., Galko, J., Rell, S., Kunca, A., Holuša, J., 2020. Porovnanie odchytovej účinnosti lykokaza sadenicového a tvrdoňov do zemných pascí a lapacích kôr. APOL 1 (1): 96–99

- Långström, B., 1982. Abundance and seasonal activity of adult *Hylobius*-weevils in reforestation areas during the first years following final felling. *Commun. Lnst. For. Fenn.* 106, 1–23.
- Långström, B., Day, K.R., 2004. Damage, control and management of weevil pests, especially *Hylobius abietis*. In *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe: A Synthesis*; Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.-C., Evans, H.F., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, p. 415–444.
- Långström, B., 1982. Abundance and seasonal activity of adult *Hylobius*-weevils in reforestation areas during first years following final felling. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 106, 2–22.
- Leather, S.R., Ahmed, S.I., Hogan, L., 1994. Adult feeding preferences of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *Eur. J. Entomol.* 91, 385.
- Leather S.R., Day K.R., Salisbury A.N., 1999. The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): a problem of dispersal. *B. Entomol. Res.* 89, 3–16.
- Leather, S.R., 1987. Pine monoterpenes stimulate oviposition in the pine beauty moth, *Panolis flammea*. *Entomol. Exp. Appl.* 43, 295–297.
- Leather, S.R., 1988. Size, reproductive potential and fecundity in insects: things aren't as simple as they seem. *Oikos.* 51, 386–389.
- Leather, S.R., Walters, K.F.A., Bale, J.S., 1993. *The ecology of insect overwintering.* Cambridge, Cambridge University Press.
- Leather, S.R., Small, A.A., Bøgh, S., 1995. Seasonal variation in local abundance of adults of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Col., Curculionidae). *J. Appl. Entomol.* 119, 511–513.
- Le Goff, G., Giraudo, M., 2019. Effects of Pesticides on the Environment and Insecticide Resistance. *Olfactory Concepts of Insect Control - Alternative to Insecticides*, 51–78.
- Lekander, B., Eidmann, H.H., Bejer, B., Kangas, E. 1985. Time of oviposition and its influence on the development of *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). *J. Appl. Entomol.* 100, 417–421.
- Lempérière, G., Julien, J., 2003. Protection against the pine weevil - Efficiency of a carbosulfan-based systemic insecticide. *Rev. For. Fra.* 55, 129-140.



- Lindgren, B.S., Nordlander, G., Birgersson, G., 1996. Feeding deterrence of verbenone to the pine weevil, *Hylobius abietis* (L.) (Col., Curculionidae). J. Appl. Entomol. 120, 397–403.
- Lindström, A., Hellqvist, C., Gyldberg, B., Långström, B., Mattsson, A., 1986. Field performance of a protective collar against damage by *Hylobius abietis*. Scand. J. For. Res. 1, 3–15.
- Luik, A., Voolma, K., 1989. Some aspects of the occurrence, biology and cold-hardiness of *Hylobius* weevils. 28–33 in Alfaro, R.I., Glover, S.G., (Eds) Insects affecting reforestation: biology and damage. Victoria, Canada, Pacific and Yukon Region, Forestry Canada.
- Luoranen J., Viiri H., 2005. Insecticides sprayed on seedlings of *Picea abies* during active growth: Damage to plants and effect on large pine weevils in bioassay. Scand. J. Forest Res. 20, 47-53
- Maavara, V., Merihein, A., Parmas, H., Parmasto, E., 1961. Metsakaitse; Valgus: Tallinn, Estonia, p. 733.
- Manlove, J.D., Styles, J.S. & Leather, S.R., 1997. Feeding of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). Eur. J. Entomol. 94, 153-156.
- Mascarin M.G., Jarovski, S.T., 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbialinsecticide. World. J. Microbiol. Biotechnol. 32, 177.
- Mayo J.H., Straka T.J., Leonard D.S., 2003. The cost of slowing the spread of the gypsy moth (Lepidoptera : Lymantriidae) J.Econ. Entomol. 5, 1448 – 1454.
- Medo, J., Michalko, J., Medová, J., Cagáň, Ľ., 2016. Phylogenetic structure and habitat associations of *Beauveria* species isolated from soils in Slovakia. J. Invertebr. Pathol. 140, 46–50.
- Mc Namara, L., Kapranas, A., Williams, C.D., O’Tuama, P., Kavanagh, K., Griffin, C.T., 2018. Efficacy of entomopathogenic fungi against large pine weevil, *Hylobius abietis*, and their additive effects when combined with entomopathogenic nematodes. J. Pest. Sci. 91, 1407–1419.
- Modlinger, R., Knížek, M., 2009. Klikoroh borový *Hylobius abietis* (L.). Lesnická Pr. 88, 1–4.
- Moreira, X., Zas, R., Sampedro, L., 2013. Additive genetic variation in resistance traits of an exotic pine species: little evidence for constraints on evolution of resistance against native herbivores. Heredity. 110, 449-456.

- Moreira, X., Costas, R., Sampedro, L., Zas, R., 2008. A simple method for trapping *Hylobius abietis* (L.) alive in northern Spain. For. Syst. 17, 188–192.
- Morley-Davies, J., Moore, D., Prior, C.J., 1995. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. Mycol. Res. 100, 31-38.
- Mráček, Z., Šrůtka, P., 1984. Stav znalostí a možnostech obrany proti klikorhu borovému (*Hylobius abietis* L.) v zemích Evropy. Zprávy Lesnického Výzk. 29, 21–25.
- Müller-Kögler, E., 1965. Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. Berlin: P. Parey Verlag, p 444.
- Munro, J.W., 1928. The biology and control of *Hylobius abietis* L. Forestry. 2, 31–39.
- Nermuť J., Půža V., Mráček Z. 2012. Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice – neviditelní půdní zabijáci. Živa 10-13.
- Nilssen, A.C., 1984. Long-range aerial dispersal of bark beetles and bark weevils (Coleoptera, Scolytidae and (Curculionidae) in northern Finland. Ann. Entomol. Fenn. 50, 37–42.
- Nordenhem, H., 1989. Age, sexual development, and seasonal occurrence of the pine weevil *Hylobius abietis* (L.). J. Appl. Entomol. 108, 260–270.
- Nordenhem, H., Eidmann, H.H., 1991. Response of the pine weevil *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae) to host volatiles in different phases of its adult life cycle. J. Appl. Entomol. 112, 353–358.
- Nordenhem, H., Nordlander, G., 1994. Olfactory orientated migration through soil by root-living *Hylobius abietis* (L.) (Col., Curculionidae) larvae. J. Appl. Entomol. 117, 457–462.
- Nordlander, G., 1987. A method for trapping *Hylobius abietis* (L.) with a standardized bait and its potential for forecasting seedling damage. Scand. J. For. Res. 2, 199–213,
- Nordlander, G., 1990. Limonene inhibits attraction to  $\alpha$ -pinene in the weevils *Hylobius abietis* and *H. pinastri*. J. Chem. Ecol. 16, 1307–1320.
- Nordlander, G., 1991. Host finding in the pine weevil *Hylobius abietis*: effects of conifer volatiles and added limonene. Entomol. Exp. Appl. 59, 229–237.
- Nordlander, G., Bylund, H., Örlander, G., Wallertz K., 2003. Pine weevil population density and damage to coniferous seedlings in a regeneration area with and without shelterwood Scand. J. For. Res., 18, 438-448

- Nordlander, G., Hellqvist, C., Johansson, K., Nordenhem, H., 2011. Regeneration of European boreal forests: effectiveness of measures against seedling mortality caused by the pine weevil *Hylobius abietis* For. Ecol. Manage., 262, 2354-2363.
- Nordlander, G., Hellqvist, C., Hjelm K., 2017. Replanting conifer seedlings after pine weevil emigration in spring decreases feeding damage and seedling mortality Scand. J. For. Res., 32, 60-67.
- Noukoun Ch., Bryant G., Frank S. D., 2014. The effect of sticky bands on cankerworm abundance and defoliation in urban trees. Arboriculture & Urban Forestry. 40, 135–142.
- Novák, V., 1965: Klikoroh borový. Praha, SZN, 18, 90 s.
- Olenici, N., Duduman, M.L., Teodosiu, M., Olenici, V., 2016. Efficacy of artificial traps to prevent the damage of conifer seedlings by large pine weevil (*Hylobius abietis* L.)- a preliminary study. Bulletin of the Transilvania University of Brasov, Series II: Forestry, Wood Industry. Agricultural Food Engineering, 9, 9–20.
- Ondruš, M., Galko, J., Rak, J., 2014. Voskovanie – ekologická metóda ochrany sadeníc. In: Kunca, A., (Ed.), Aktuálne problémy v ochrane lesa 2014, Zborník referátov z 23. medzinárodnej konferencie konanej 23.-24.4.2014 v Kongresovom centre Kúpeľov Nový Smokovec, a.s., Národné lesnícke centrum, Zvolen, s. 95-97.
- Örlander, G., Nilsson, U. & Nordlander, G., 1997. Pine weevil abundance on clear-cuttings of different ages: a six-year study using pitfall traps. Scan. J. Forest. Res. 12, 225–240.
- Örlander, G., Nilsson, U., 1999. Effect of reforestation methods on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage and seedling survival Scand. J. For. Res. 14, 341-354.
- Örlander G., Nordlander G., Wallertz K., Nordenhem H., 2000. Feeding in the crowns of Scots pine trees by the pine weevil *Hylobius abietis*. Scan. J. Forest. Res. 15, 194–201.
- Örlander, G., Nordlander, G., 2003. Effects of field vegetation control on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to newly planted Norway spruce seedlings Ann. For. Sci. 60, 667-673.
- Ozols, G., 1985. Prides un Egles Dedrofagienu Kukaini Latvijas Mezos; (Dendrophagus insects of pine and spruce in Latvian forests); Zinātne: Riga, Latvia, s. 208.
- Peters, A., Ehlers, R.U., 1994. Susceptibility of leatherjackets (*Tipulapa ludosa* and *Tipula oleracea*; Tipulidae; Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. J. Invertebr. Pathol. 63, 163–171.

- Pettersen, J.M., 2016. [cit. 2020-03-08].  
<https://cordis.europa.eu/project/id/315404/reporting>
- Peterson, R.A., 2017. Estimating normalization transformations with bestNormalize URL [cit. 2020-02-15]. <https://github.com/petersonR/bestNormalize>
- Petersson M., Eriksson S., Zetterqvist F., 2006. Mekaniska plantskydd mot snytbaggeskador, anlagt 2003 – slutrapport. SLU, Asa försökspark, Rapport: 3, 1-19.
- Petersson, M., Örlander, G., 2003. Effectiveness of combinations of shelterwood, scarification, and feeding barriers to reduce pine weevil damage. *Can. J. For. Res.* 33, 64-73.
- Petersson, M., Örlander, G., Nilsson, U., 2004. Feeding barriers to reduce damage by pine weevil (*Hylobius abietis*). *Scan. J. Forest. Res.* 19, 48–59.
- Pfeffer, A., Horák, E., Kudela, M., Muller, J., Novakova, E., Stolina, M., 1961. Ochrana lesů. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, s. 838.
- Poinar, G.O., Thomas G.M., Haygood M., Neelson K.H., 1980. Growth and luminescence of the symbiotic bacteria associated with the terrestrial nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Soil Biol. Biochem.* 12, 5–10.
- Poinar G.O., Jr. 1983. *The Natural History of Nematodes*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, U.S.A.
- Poinar, G.O., Jr. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds) *Taxonomy and Biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae*. 23–74. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Popowska-Nowak, E., Skrzecz, I., Tumialis, D., Pezowicz, E., Samborska, I., Góral, K., 2016. Entomopathogenic fungi in the soils of forest plantations: towards the control of large pine weevil, *Hylobius abietis*. *Balt. For.* 22, 8–15.
- Posadas, J.B., Angulo, L.M., Mini, J.I., Lecuona, R.E., 2012. Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. *World. Appl. Sci. J.* 20, 1024–1030.
- Puentes, A., Högberg, K.A., Björklund, N., Nordlander, G., 2018. Novel avenues for plant protection: Plant propagation by somatic embryogenesis enhances resistance to insect feeding *Front. Plant Sci.* 9, p. 1553.
- Pye, A.E. Claesson, R. (1981) Oviposition of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae), in relation to the soil surface. *Ann. Entomol. Fenn.* 47, 21–24.

- Ramanujam, B., Rangeshwaran, R., Sivakmar, G., Mohan, M., Yandigeri, M.S. 2014. Management of insect pests by microorganisms. Proceedings of Indian National Science Academy, 80, 455–471.
- Ratzeburg, J.T.C., 1839. Die Forst- Insekten. Erster Teil–Die Käfer; 2 Auflage; Nicolai'sche Buchhandlung: Berlin, Germany, p. 247.
- Reay, S.D., Brownbridge, M., Cummings, N.J., Nelson, T.L., Souffre, B., Lignon, C., Glare, T.R., 2008. Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. Biol. Control. 46, 484–494.
- Reddy, K.R.K., Praveen Kumar, D., Reddy, K.R.N., 2013. Entomopathogenic fungi: A potential bioinsecticide. Kavaka 41, 23–32.
- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L., Humber, R.A., 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia. 103, 1055–1073.
- Rieske, L.K., Raffa, K.F., 1990. Dispersal patterns and mark-and-recapture estimates of two pine root weevil species, *Hylobius pales* and *Pachylobius picivorus* (Coleoptera: Curculionidae), in Christmas tree plantations. Environ. Entomol. 19, 1829–1836.
- Roberts, D.W., Campbell, A.S., 1977. Stability of entomopathogenic fungi. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America. 10, 19-76.
- Rodríguez-Gámez, A., Gandarilla-Pacheco, F. L., Maldonado-Blanco, M. G., Quintero-Zapata, I., Morales Ramos, L. H., Alfaro Alvarez, J. H., Elías-Santos, M., 2017. Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales:Cordicipitaceae) en cultivo bifásico Interciencia. 42, 739-743.
- Rose, D., Matthews, G. A., Leather S. R., 2005. Recognition and avoidance of insecticide-treated Scots Pine (*Pinus sylvestris*) by *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): implications for pest management strategies. Agr. Forest Entomol. 7, 187 – 191.
- Rose, D., Matthews, G. A., Leather S. R., 2006. Sub-lethal responses of the large pine weevil, *Hylobius abietis*, to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin Physiological Entomology 31, 316–327.
- Russell, L., 2020. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.7. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Saalas, U., 1949. Suomen Metsähyönteiset; Finnish Forest Insects; Wsoy: Porvoo, Finland, p. 719.

- Saintonge, F.X., Malphettes, C.B., 1991. Un piège pour surveiller les populations d'hylobes (*Hylobius abietis* L.) (Coleop.: Curc.)? Etudes de Cemagref. Sér. For. 6, 138–155.
- Salem M., Zeidler A., Böhm M., Mohamed A., Ali M., 2015. GC/MS analysis of oil extractives from wood and bark of *Pinus sylvestris*, *Abies alba*, *Picea abies*, and *Larix decidua*., BioResources. 10, 7725-7737.
- Salisbury, A.N., 1996. Predation and migration of *Hylobius abietis* (L.) (Col: Curculionidae) larvae. MSc thesis, Imperial College, University of London.
- Salisbury, A.N., Leather, S.R., 1998. Migration of larvae of the large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Col: Curculionidae): possible predation a lesser risk than death by starvation? J. Appl. Entomol. 122, 295-299.
- Samsinakova, A. Novák, V., 1967. Eine Methode zur integrierten Bekämpfung des Rüsselkäfers (*Hylobius abietis* L.). Anz. Schadlingsk. Pflanz. Umwelt. 40, 22–27.
- Seidl, R., Schelhaas, M., Rammer, W., & Verkerk, P. J., 2014. Increasing forest disturbances in Europe and their impact on carbon storage. Nat. Clim. Change. 4, 806–810.
- Schmidt W., 1934. Rüsselkefer-Bilanz. Wege zum Neuaufbau des Forstschutzes. Berlin, Verlag Steup u. Bernhard p. 172.
- Selander, J., 1978. Evidence of pheromone-mediated behaviour in the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae). Ann. Entomol. Fenn. 44, 105-112.
- Selander, J., Havukkala, I., Kalo, P., 1976. Olfactory behaviour of *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). II. Response to 3-carene and  $\alpha$ -pinene during three stages of its life cycle. Ann. Entomol. Fenn. 42, 63–66.
- Selander, J., Jansson, A., 1977. Sound production associated with mating behaviour of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae). Ann. Entomol. Fenn. 43, 66–75.
- Selander, J., Kangas, E., Perttunen, V., Oksanen, H., 1973. Olfactory responses of *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae) to substances naturally present in pine phloem, or their synthetic counterparts. Ann. Entomol. Fenn. 38, 40–45.
- Selander, J., Kalo, P., Kangas, E., Perttunen, V., 1974. Olfactory behaviour of *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). I. Response to several terpenoid fractions isolated from Scots pine phloem. Ann. Entomol. Fenn. 39, 40–45.
- Scott, T.M., King, C.J., 1974. The large pine weevil and black pine beetles. Forestry Commission Leaflet 58, 1-23. London, HMSO.

- Schlyter, F., Smitt, O., Sjödin, K., Högberg, H-E., Löfgvist, J., 2004. Carvone and less volatile analogues as repellent and deterrent antifeedants against the pine weevil, *Hylobius abietis*. J. Appl. Entomol. 128, 610-619.
- Simoës, N., 1998. Pathogenicity of the complex *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophilus*: molecular aspects related with the virulence. In: N. Simoës, N. Boemare & R-U. Ehlers (Eds) Pathogenicity of Entomopathogenic Nematode versus Insect Defense Mechanisms: Impacts on Selection of Virulent Strains. 73–83. European Commission, Brussels, Belgium.
- Skłodowski, J.J.W., Gadziński, J., 2001. Effectiveness of beetle catches in two types of traps for *Hylobius abietis* L. Sylwan. 6, 55–63.
- Skrzecz, I., 2003. Non-target insects in the pine weevil (*Hylobius abietis* L.) traps with Hydodor dispenser. Folia For. Polon. Ser. A For. 35, 27–35.
- Solbreck, C., 1980. Dispersal distances of migrating pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae). Entomol. Exp. Appl. 28, 123–131.
- Solbreck, C., Gyldberg, B., 1979) Temporal flight pattern of the large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae), with special reference to the influence of weather. Z. Angew. Entomol. 88, 532–536.
- Squillace, A.E. 1976. Analyses of monoterpenes of conifers by gas-liquid chromatography. In: Miksche, J.P., Ed., Modern Methods in Forest Genetics; Springer: New York, NY, USA, s. 139–157.
- Stoakley, J.T., Heritage, S.G., 1990. Application leaflet on the use of ‘Permit’ and ‘Permasect 25 EC’ for pre-planting treatment of young trees against *Hylobius abietis* and *Hylastes* spp. Research Information Note 177, Farnham, Forestry Commission Research Division
- Stocki, J.S., 2000. The Use of Pheromones and Pheromone Traps in Forest Protection in Poland in the Years 1980–1997; Practice oriented results on the use and production of Neem ingredients and pheromones VIII; Kleeberg, H., Zebitz, C.P.W., Eds.; Druck & Graphics: Giessen, Germany, p. 128–133.
- Swaine, G., 1951. Population studies on *Hylobius abietis* L. (Coleoptera, Curculionidae). Ann. Appl. Biol. 38, 606–614.
- Thorpe, K., Day, K., 2008. Reproductive maturation in the large pine weevil *Hylobius abietis*: the relative importance of larval and adult diet. Agr. Forest Entomol. 10, 53–59.

- Thorsén, Å., Mattsson, S., Weslien, J.O., 2001. Influence of stem diameter on the survival and growth of containerized Norway spruce seedlings attacked by pine weevils (*Hylobius* spp.) Scand. J. For. Res., 16, 21-29.
- Thorin, J., Nömmik, H., 1974. Monoterpene composition of cortical oleoresin from different clones of *Pinus sylvestris*. Phytochemistry. 13, 1879–1881.
- Tilles, D.A., Sjödin, K., Nordlander, G., Eidmann, H.H., 1986. Synergism between ethanol and conifer host volatiles as attractants for the pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 79, 970–973.
- Tilles, D.A., Eidmann, H.H. & Solbreck, B. 1988. Mating stimulant of the pine weevil *Hylobius abietis* (L.). J. Chem. Ecol. 14, 1495–1503.
- Torr, P..., Wilson, M.J., Heritage, S., 2005. Forestry applications. In: Grewal PS, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DJ (eds) Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing, Wallingford, pp 281–294.
- Trägårdh, I., 1913. On the chemotropism of insects and its significance for economic entomology. B. Entomol. Res. 4, 113–117.
- Unelius, C., Bohman, B., Nordlander, G., 2018. Comparison of phenylacetates with benzoates and phenylpropanoates as antifeedants for the pine weevil, *Hylobius abietis*. J. Agric. Food Chem. 66 (44), 11797–11805.
- UKSUP 2019. Zoznam autorizovaných prípravkov na ochranu rastlín a prípravkov na ochranu rastlín povolených na paralelný obchod. Bratislava, 332 s.
- Vakula J., Zúbrik M., Kunca A., Dubec M., Find’o S., Galko J., Gubka A., Kaštier P., Konôpka J., Konôpka B., Lalkovič M., Leontovyč R., Longauerová V., Maľová M., Nikolov Ch., Pavlendová H., Rell S., 2015. Nové metódy ochrany lesa. Zvolen, Národné lesnícke centrum, s. 295.
- Varinský J., 2011. Používanie prípravkov na ochranu rastlín v lesoch. NLC, 32s.
- Varkonda, Š., Florian, Š., 2006. Odparník na regulované uvoľňovanie prchavých látok; (Evaporator for controlled release of volatile substances) Utility model, SK 4570 U; Úrad Priemyselného Vlastníctva: Bratislava, Slovakia, s. 3.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-Ard, J.J., Blackwell, M., 2012. Chapter 6—Fungal Entomopathogens. In Insect Pathology; Vega, F.E., Kaya, H.K., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, p. 171–220.
- Voolma, K., Siida, I., Sibul, I., 2001. Forest insects attracted to ground traps baited with turpentine and ethanol on clear-cuttings. Nor. J. Entomol. 48, 103–110.



- Voolma, K.; Sibul, I., 2006. The effect of collecting fluid on the catch results of *Hylobius abietis* in pitfall traps. *Agron. Res.* 4, 457–460.
- Wainhouse, D., Ashburner, R., Boswell, R. 2001. Reproductive development and maternal effects in the pine weevil *Hylobius abietis*. *Ecol. Entomol.* 26, 655– 661.
- Wainhouse, D., Staley, J., Johnston, J., Boswell, R., 2004a. The effect of environmentally induced changes in the bark of young conifers on feeding behaviour and reproductive development of adult *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) *Bull. Entomol. Res.* 95, 151-159.
- Wainhouse, D., Boswell, R., Ashburner, R., 2004b. Maturation feeding and reproductive development in adult pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera Curculionidae). *Bull. Entomol. Res.* 94, 81–87.
- Wallertz, K., Hanssen, K.H., Hjelm, K., Fløistad, I.S., 2016. Effects of planting time on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to Norway spruce seedlings. *Scand. J. For. Res.* 31, 262-270.
- Wallertz K., Örlander G., Luoranen J., 2005. Damage by pine weevil *Hylobius abietis* to conifer seedlings after shelterwood removal. *Scand. J. For. Res.* 20, 412–420.
- Wallertz, K., Nordlander, G., Örlander, G., 2006. Feeding on roots in the humus layer by adult pine weevil, *Hylobius abietis*. *Agr. Forest Entomol.* 8, 273–279.
- Wallertz K., Nordenhem H., Nordlander G., 2014. Damage by the pine weevil *Hylobius abietis* to seedlings of two native and five introduced tree species in Sweden. *Silva Fenn.*, 48, 1 – 14.
- Wallertz, K., Holt Hanssen, K., Hjelm, K., Sundheim Fløistad, I. 2016. Effects of planting time on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to Norway spruce seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 31, 262–270.
- Waldenfels, J., 1975. Versuche zur Bekämpfung von *Hylobius abietis* L. (Coleopt., Curculionidae). *Anz. Schadlingsk. Pflanz. Umwelt.* 48, 21–25.
- Walstad, J.D., Anderson, R.F., Stambaugh, W.J., 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* ). *J. Invertebr. Pathol.* 16, 221-226.
- Webb, R.E., White, G.B., Thorpe, K.W. 1995. Response of gypsy-moth (Lepidoptera, Lymantridae) larvae to sticky barrier bands on simulated trees. *P. Entomol. Soc. Wash.* 97, 695-700.
- Wegensteiner, R., Führer, E., 1988. Zur Wirksamkeit von *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. gegen *Hylobius abietis* L. (Col.: Curculionidae). *Entomophaga.* 33, 339–348.

- Wegensteiner, R., 1989. The efficacy of *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* and *B. tenella* against *Hylobius abietis* (Col., Curcul.). In Proceedings of the International Conference on Biopesticides, Theory and Practice, České Budějovice, Czechoslovakia, 25–28 September 1989; Jegorov, A., Matha, V., Eds.; Czechoslovak Academy of Sciences: Čes. Budějovice, Czechoslovakia, s. 238–242.
- Wegensteiner, R., Tkaczuk, C., Bałazy, S., Griesser, S., Rouffaud, M.A., Stradner, A., Steinwender, B.M., Hager, H., Papierok, B., 2015. Occurrence of pathogens in populations of *Ips typographus*, *Ips sexdentatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) and *Hylobius* spp. (Coleoptera, Curculionidae, Curculioninae) from Austria, Poland and France. *Acta Protozool.* 3, 219–232.
- Wharton, D.A. Surrey, M.R., 1994. Cold tolerance mechanisms of the infective larvae of the insect parasitic nematode, *Heterorhabditis zealandica*, Poinar. *Cryo. Letters.* 15. 353-360.
- Wheater, C.P., Bell, J.R., Cook, P.A., 2011. *Practical Field Ecology: A Project Guide*; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, p. 388.
- Williams, C.D., Dillon, A.B., Harvey, C.D., Hennessy, R., Mc Namara, L., Griffin, C.T., 2013. Control of a major pest of forestry, *Hylobius abietis*, with entomopathogenic nematodes and fungi using eradicant and prophylactic strategies. *For. Ecol. Manag.* 305, 212–222.
- Wilson, W.L., Day, K.R., 1995. The comparative effectiveness of chemical traps, and fir, spruce and larch billets, for the estimation of pine weevil (*Hylobius abietis* L.) (Col., Curculionidae) density indices. *J. App.Entomol.* 119, 157–160.
- Willoughby, I.H., Moore, R., Moffat, A.J., Forster, J., Sayyed, I., Leslie, K., 2020. Are there viable chemical and non-chemical alternatives to the use of conventional insecticides for the protection of young trees from damage by the large pine weevil *Hylobius abietis* L. in UK forestry? *Forestry. International Journal of Forest Research*, 93:694–712.
- Yazdani, R., Nilsson, J.E., 1986. Cortical monoterpene variation in natural populations of *Pinus sylvestris* in Sweden. *Scand. J. For. Res.* 1, 85–93.
- Zahradník, P., Zahradníková, M., 2019. Seznam povolených přípravků a dalších prostředků na ochranu lesa 2019. Nakladatelství Lesnická práce s. 136.
- Zas, R., Sampedro, L., Prada, E., Lombardero, M.J., Fernández-López, J., 2006. Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *For. Ecol. Manage.*, 222 137-144

- Zas, R., Björklund, N., Nordlander, G., Cendán, C., Hellqvist, C., Sampedro, L., 2014. Exploiting jasmonate-induced responses for field protection of conifer seedlings against a major forest pest *Hylobius abietis* For. Ecol. Manage., 313, 212-223-
- Zas, R., Björklund, N., Sampedro, L., Hellqvist, C., Karlsson, B., Jansson, S., Nordlander, G., 2017. Genetic variation in resistance of Norway spruce seedlings to damage by the pine weevil *Hylobius abietis* Tree. Genet. Genomes. 13, 111.
- Zimmermann, G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol. Sci. Techn. 17, 553–596.
- Zubrik, M., Kunca, A., Csóka, G., 2013. Insects and Diseases damaging trees and shrubs of Europe. N.A.P.Edition, p. 535.
- Zumr, V., Sary, P., 1992. Field experiments with different attractants in baited pitfall traps for *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). J. Appl. Entomol. 113, 451–455.

## 9. Prílohy

### 9.1. Príloha č.1: Non-pesticide alternatives for reducing feeding damage caused by the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.)

Received: 19 October 2018 | Revised: 20 March 2020 | Accepted: 20 March 2020 | Published on: 5 May 2020  
DOI: 10.1111/aab.12594



#### RESEARCH ARTICLE

Annals of Applied Biology **aab** WILEY  
An International Journal of the QGD

## Non-pesticide alternatives for reducing feeding damage caused by the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.)

Michal Lalík<sup>1,2</sup> | Juraj Galko<sup>1</sup> | Christo Nikolov<sup>1</sup> | Slavomír Rell<sup>1</sup> |  
Andrej Kunca<sup>1</sup> | Roman Modlinger<sup>2</sup> | Jaroslav Holuša<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Forest Centre, Forest Research Institute Zvolen, Zvolen, Slovakia

<sup>2</sup>Faculty of Forestry and Wood Sciences, Department of Forest Protection and Entomology, Czech University of Life Sciences Prague, Prague 6, Czech Republic

#### Correspondence

Michal Lalík, National Forest Centre, Forest Research Institute Zvolen, T. G. Masaryka 22, 960 01 Zvolen, Slovakia.  
Email: michal.lalik@nlcsk.org

#### Funding information

Advanced research supporting the forestry and wood-processing sector's adaptation to global change and the 4th industrial revolution, Grant/Award Number: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000803; Agentúra na Podporu Výskumu a Vývoja, Grant/Award Numbers: APVV-16-0031, APVV-18-0086; Fakulta Lesnícká a Drevarská, Česká zemědělská univerzita v Praze, Grant/Award Number: IGA C\_01\_18; Ministry of defense of the Slovak republic, Grant/Award Number: VLMSR 0120; Research Agency, Grant/Award Number: 028/2019/1.1.3/OPVaI/DP

#### Abstract

The large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) is an important pest of young forest stands in Europe. Larvae develop under the bark of freshly cut pine and spruce stumps, but maturing weevils feed on the bark of coniferous seedlings. Such seedlings frequently die because of bark consumption near the root collar. We tested the effect of three treatments (the insecticide alpha cypermethrin, a wax coating and a glue coating) on the feeding damage caused by *H. abietis* on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Norway spruce (*Picea abies*) seedlings under semi-natural conditions. In two experiments (one in 2016 and another in 2017) seedlings in cages were subjected to pine weevil feeding for 16 weeks under shaded outdoor conditions. The experiment in 2016 compared insecticide and wax treatments and an untreated control on Douglas fir and Norway spruce, and the experiment in 2017 compared insecticide, wax and glue treatments and an untreated control on Norway spruce. In both experiments, all treatments significantly reduced *H. abietis* feeding damage at week 8 at the end of both experiments (week 16); the effect of treatments was significant only on spruce seedlings. The damages on Douglas fir seedlings was less on treated seedlings than on untreated control seedlings but differences were not significant. Coating stems with glue and especially with wax was generally effective at reducing weevil damage and in most cases provided control that was not significantly different from that provided by insecticide treatment. Our results suggest that a wax coating has the potential to replace the protection of seedlings provided by insecticides.

#### KEYWORDS

alpha cypermethrin, Douglas fir, glue, *Hylobius abietis*, integrated pest management, Norway spruce, wax

## 1 | INTRODUCTION

The large pine weevil (*Hylobius abietis* L.; Coleoptera: Curculionidae) is an important forest pest in Europe (Långström and Day, 2004; Moore et al., 2004). Larvae develop under the bark of roots and freshly cut stumps of conifer species and thus contribute to their gradual decomposition (Leather et al., 1999; Moore et al., 2004; Nordlander et al., 1997; von Sydow & Birgersson, 1997). Mature weevils, in

contrast, feed on the bark of coniferous seedlings; such seedlings frequently die after the bark near their root collar is consumed (Day et al., 2004). *H. abietis* usually damages coniferous seedlings when planting is carried out on 1- to 3-year-old clear cut sites (Nordenhem, 1989; Nordlander, 1987; Örlander et al., 1997, 2000). In spring, large numbers of adults move into forest areas that have been recently clear-cut (Solbreck & Gyldeberg, 1979) where they lay eggs in stumps or roots and feed on present seedlings throughout the spring

and summer (Nordlander et al., 1997). Under favourable conditions, the majority of a new generation of *H. abietis* adults appears at the end of summer, and feeds on seedlings in the clear-cut area before hibernating in the soil (Scott & King, 1974). In the next spring, the rest of the population emerge as adults, leave the soil and feed for several weeks on naturally present seedlings or transplanted seedlings in the same area before they move to fresh clear-cut areas to breed. The period between the two generations is usually 1 year in Central Europe (R. Modlinger and J. Holuša, unpublished) and 2 years in Scandinavia, but can be longer in shaded and colder areas (Bakke & Lekander, 1965; Bejer-Petersen et al., 1962; Lekander et al., 1985).

Because of climate change, however, the *H. abietis* life cycle has been shortened in many locations, and damage caused by maturation feeding of the second generation can occur as early as autumn (Inward et al., 2012; Wainhouse et al., 2014), as has recently been observed in Central Europe (J. Holuša, unpublished). Moreover, a recent study showed that pine weevil damage is strongly and positively correlated with the accumulation of degree days (Nordlander et al., 2017) and a warming climate could cause the bodies of *H. abietis* to become larger, because larval and adult mass is positively related to developmental temperature (Inward et al., 2012). *H. abietis* appears to be pre-adapted to "benefit" from predicted changes to the climate, which could have important implications for its management (Inward et al., 2012).

Integrated forest protection methods against *H. abietis* have been known for a long time (Eidmann, 1974; Långström and Day, 2004; Nordlander et al., 2011; Wallertz et al., 2014). Large-scale natural or artificial disturbances of pine and spruce forests produce many stumps that are suitable for *H. abietis* oviposition and development. At such sites, a simple control method is to postpone planting, that is, to leave the site fallow, after the disturbance by at least the period required for the development of *H. abietis* adults, because after 1 year stumps are no longer suitable for *H. abietis* oviposition in Central Europe. The emerging adults feed on other available food sources if planted seedlings are not present (Wallertz et al., 2006; Fedderwitz et al., 2018).

Removing stumps, which are the oviposition substrates, is considered a suitable method for controlling *H. abietis* populations (Rahman et al., 2015), however, some larvae will remain in the roots and emerge as adult weevils that will still cause damage. De-stumping may be helpful if practised for other reasons (e.g. preparation of a site for planting) but cannot be used on sites where it will reduce the nutrient status (Moffat et al., 2011). Naturally established stands suffer less damage than artificially established stands (Selander et al., 1990), partly because the number of seedlings per ha tends to be greater in naturally established stands such that the feeding damage is spread over a greater number of seedlings (Saniga, 2010).

Substantial damage to seedlings may occur if large areas are replanted within 1 year of disturbance. In such cases, physical or chemical protection of seedlings is required (STN 48 2712, 2016). Demand for use of these protective measures has recently increased in response to *H. abietis* populations rising because of more frequent

wind disturbance events (Kunca et al., 2016) creating more weevil breeding habitat (dead and dying trees; Nordlander, 1987).

Regarding physical and chemical protection, Petersson et al. (2004) found that plastic or paper collars that prevent weevils from climbing up and feeding on stems are as effective as chemical protection. The most frequently used insecticides for protecting seedlings against *H. abietis* are synthetic pyrethroids (Rose et al., 2005, 2006). The use of these insecticides, however, has been banned in the EU due to concerns about environmental impacts, although the EU allowance for permethrin has been extended to October 31, 2026 (<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=937>); insecticide use is also problematic because they can only protect seedlings for one growing season, therefore as many as 2–3 repeat sprays per year are required in some areas (Viiri, 2007). Regarding neonicotinoids, *H. abietis* is known to avoid food sources treated with the neonicotinoid imidacloprid (Rose et al., 2005).

Other environmentally safer methods for protecting seedlings against *H. abietis* feeding have been developed, and these include coating the seedling stems with either a sand-covered fixative (Conniflex) or with wax (KVAEE). In the sanding method, fine sand along with acrylate fixatives is applied to the stems of seedlings. The sand coating is flexible and is not dislodged by temperature change. The fine sand grains (~0.2 mm) can easily move between the mandibles of weevils and hinder chewing, therefore they avoid feeding on the sand coating (Nordlander et al., 2009).

In the wax method, a specially developed melted wax is applied to the stem of seedlings from the root collar to a height of 15 cm. The wax, which is significantly more elastic than normal wax, provides a physical barrier and reduces emission of plant volatile attractants and thereby greatly reduces the feeding of large pine weevils. The white colour of the wax is also advantageous, because it reflects solar radiation and thereby reduces heat damage to the seedlings (<http://kvaee.no/what/>; [http://kvaee.no/wp-content/themes/kvaee/assets/pdf/results\\_eng.pdf](http://kvaee.no/wp-content/themes/kvaee/assets/pdf/results_eng.pdf)). Wax has been used in Slovak forests since 2012, when wax-application machinery was first purchased (Galcko et al., 2013).

Several studies from Sweden compared wax and insecticide treatment against an untreated control on Norway spruce seedlings and

**TABLE 1** Seedlings mortality (%) of insecticide treated seedlings and wax treated seedlings in previous studies

References	Merit forest WG	Wax	Type of wax
Petersson et al., 2006	43.0	43.0	Bugwax 103
Härilin & Eriksson, 2016	29.3	40.7	KVAEE wax typ C
Eriksson et al., 2017	20.0	13.3 and 10.7	KVAEE wax typ C and D
Eriksson et al., 2018	8.7	10.7	KVAEE wax typ F



found seedling mortality was comparable between insecticide and wax (Table 1, Eriksson et al., 2017, 2018; Härlin & Eriksson 2013, 2014, 2016; Petersson et al., 2006).

Another possible method for controlling *H. abietis* is the application of entomological glues such as the Bayer glue coating that has been used in experiments in Sweden (Eriksson et al., 2017). Glue products, for example Vermifix, are also used to control other insect pests including ants, geometrid moths, louse, whiteflies, weevils and *Lecanium* scales (<http://www.moudry-cz.com/download/KatalogCZ.pdf>).

Most of the above-mentioned studies compared protective methods against the *H. abietis* only on Norway spruce seedlings. Pine weevil, however, damages a wide spectrum of woody plants, including Douglas fir, which is a commonly planted species in Europe. We therefore compared the feeding damage caused by *H. abietis* adults on both Norway spruce and Douglas fir seedlings. We conducted two Experiments (I, II). In Experiment I, which was conducted in 2016, we compared the effect of insecticide and wax treatments against an untreated control on Norway spruce and Douglas fir seedlings. In Experiment II, which was conducted in 2017, we compared insecticide, wax and glue treatments on Norway spruce seedlings. Both experiments were carried out in outdoor cages (i.e. under semi-natural conditions), so that we could control the number of adult weevils per cage and provide the same watering and light exposure for all seedlings.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Location, insects and seedlings

Experiments were performed in a shaded outdoor insectarium (semi-natural conditions) in Banská Štiavnica, Slovakia (48.464089°N, 18.904954°E; Figure 1a). The cages used in the experiments were 70 cm high, 50 cm wide and 50 cm deep (Figure 1b). The bottom and the frame of each cage were constructed from chipboard, the three sides were enclosed with an insect-proof net and the top and front doors were glass.

Throughout the study, *H. abietis* adults were collected as needed in bark traps deployed in the Low Tatras (49.005810°N, 20.041072°E). The collected weevils were kept at 4°C until they were used for experiments. To select weevils for experiments, specimens were placed in boxes with pine twigs at 18°C; after 10 h, healthy and undamaged adults with an average length of 12 mm were moved into cages. Every 2 weeks the *H. abietis* adults in cages were replaced with new adults to ensure continual pressure from weevil. The insecticide caused mortality of adults therefore, by replacing dead or dying beetles with new beetles, we imitated 'natural' field conditions. Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Norway spruce (*Picea abies*) seedlings were supplied by OZ Semenoles Liptovský Hrádok (Slovak State Forests). The seedlings were 1.5 years old and were growing in 90-cm<sup>3</sup> containers (one seedling per container). Before experiments were conducted, the seedlings were transplanted into pots (7 cm high, top width 40 cm, bottom width 32 cm; one seedling per pot) containing 10.08 L of KEKKILÄ PROFESSIONAL (Vantaa, Finland), which is a substrate for growing coniferous trees.



**FIGURE 1** (a) Outdoor insectarium, (b) seedlings in a cage, (c) a seedling treated with Vermifix glue and (d) a seedling treated with KVAEE wax

### 2.2 | Methods tested

We assessed *H. abietis* feeding damage on untreated seedlings and on seedlings treated with Vermifix glue, KVAEE wax Type C or the insecticide VAZTAK, which contains alpha-cypermethrin. Vermifix glue (white mineral oil, oligomers polyolefins, solvent, gas; Papermill Moudrý s.r.o., Židlochovice, Czech Republic; Figure 1c) was sprayed directly on the bark of the transplanted seedlings from 5 to 10 cm distance. The glue was applied so as to form an even, continuous and thin layer along the seedling stem from the substrate to a height of 15 cm.

KVAEE wax (hydrocarbon waxes [petroleum], microcrystalline, hydrotreated, rosin, hydrogenated, titanium dioxide; NORSK WAX, Stavern, Norway; Figure 1d) was applied to stems from the root neck to a height of 15 cm by dipping the seedlings into a container filled with melted (heated) wax before planting. Once applied, the wax hardens quickly. To avoid overheating, the treated seedlings were immediately cooled by placing them on a 7-m-long conveyor belt on which they were sprayed with water.

Seedlings were treated with the synthetic pyrethroid insecticide Vaztak 10 EC in Experiment I and with the synthetic pyrethroid

insecticide Vaztak Active in Experiment II (BASF SE, Ludwigshafen, Germany). These micro-emulsions are light-stable and are sprayed onto plants. Vaztak 10 EC alpha-cypermethrin, and Vaztak Active, respectively, contain 100 and 50 g L<sup>-1</sup> of the active ingredient alpha-cypermethrin. These insecticides were applied as a 1% spray from the root neck to a height of 15 cm immediately after seedlings were transplanted. Seedling stems were sprayed using a Solo 402 sprayer with an FE type nozzle, which sprays 300-µm-diameter droplets. According to the producer, both pesticides are effective for 28 days after application.

### 2.3 | Experiment I

Ten replicate cages were used in Experiment I. Each cage contained six pots (three with Norway spruce seedlings and three with Douglas fir seedlings). The average  $\pm$  SD height and diameter (at the root collar) of the Norway spruce seedlings was 30.5  $\pm$  6.8 cm and 6.8  $\pm$  1.2 mm, respectively. The average height and diameter of the Douglas fir seedlings was 34.32  $\pm$  6.86 cm and 6.57  $\pm$  1.19 mm, respectively. Seedlings were irrigated with 1 L of water immediately after planting and with 0.5 L of water at weekly intervals thereafter. In each cage, two seedlings (one Norway spruce and one Douglas fir) were treated with the KVAEE wax; two other seedlings (one Norway spruce and one Douglas fir) were treated with Vaztak 10 EC insecticide (1% concentration); and the remaining two seedlings (one Norway spruce and one Douglas fir) were untreated controls. The seedlings in each cage were randomly arranged in a hexagonal pattern with 10 cm between neighbours. The arrangement of the seedlings in each cage was randomly changed each week. At the beginning of the experiment, two *H. abietis* adults (undetermined sex) were placed in each cage, and these were replaced by new adults every 2 weeks because the insecticide caused adult mortality. The pine weevils were replaced early in the morning before they had burrowed into the soil.

Experiment I was conducted for 16 weeks (from May 3 to August 23, 2016). At weekly intervals, a transparent millimetre paper was placed on feeding scars to measure the area of damage on each seedling.

### 2.4 | Experiment II

Twenty cages were used for Experiment II. Each cage contained four Norway spruce seedlings. The average  $\pm$  SD height and diameter (at the root collar) of the seedlings at the beginning of the experiment was 31.6  $\pm$  5.1 cm and 6.9  $\pm$  1.5 mm, respectively. Seedlings were irrigated with 1 L of water immediately after planting and with 0.5 L of water at weekly intervals thereafter. In each cage, each spruce seedling was either untreated (the control) or was treated with either Vaztak Active 1%, KVAEE wax, or Vermifix glue. The seedlings in each cage were randomly arranged in a square pattern with 25 cm between neighbours. The arrangement of seedlings in each cage was randomly changed each week.

At the beginning of the experiment, two *H. abietis* adults (undetermined sex) were placed in each of 10 cages, and four *H. abietis* adults (undetermined sex) were placed in each of the other 10 cages. These were replaced by new adults every 2 weeks. The experiment was conducted for 16 weeks (from May 9 to August 29, 2017). Feeding scars were measured weekly with transparent millimetre paper as in Experiment I.

### 2.5 | Statistical analysis

In both experiments the effect of treatments on the area damaged by feeding were analysed using a linear mixed model in RStudio (Version 1.1.423–2009–2018 RStudio, Inc., package lme4, version 1.1–19; Bates et al., 2015). The feeding damage data from both experiments was transformed using the Yeo-Johnson transformation (R, package best Normalise; version 3.4.1; Peterson, 2017) to improve the homogeneity of the variance and the normality of the distribution. Effects of treatments were analysed for two time points in each experiment, that is, at 8 and 16 weeks.

Because the bark of the root collars was damaged over time, the diameters of most seedlings decreased during the experiments. In addition, the height of seedlings decreased due to beetle damage. These parameters were excluded from further analyses.

For the analysis of the damaged area in Experiment I, a linear mixed-effects model (LMEM) was used, including treatment and tree species (Norway spruce, Douglas fir) as fixed factors and cage as a random factor. The interaction terms between treatment and tree species were included for the damaged area, because both factors were significant ( $p < .05$ ). The log-likelihood ratio test comparing the full and the reduced model was also significant ( $p < .05$ ; ANOVA function in R).

In Experiment II, data was analysed separately for two and four *H. abietis* adults per cage. The LMEM was used with treatment as a fixed factor and cage as a random factor.

Pairwise differences of LS-means for selected factors in models for both years were computed using the lmerTest package (version 3.0–1; Kuznetsova et al., 2017).

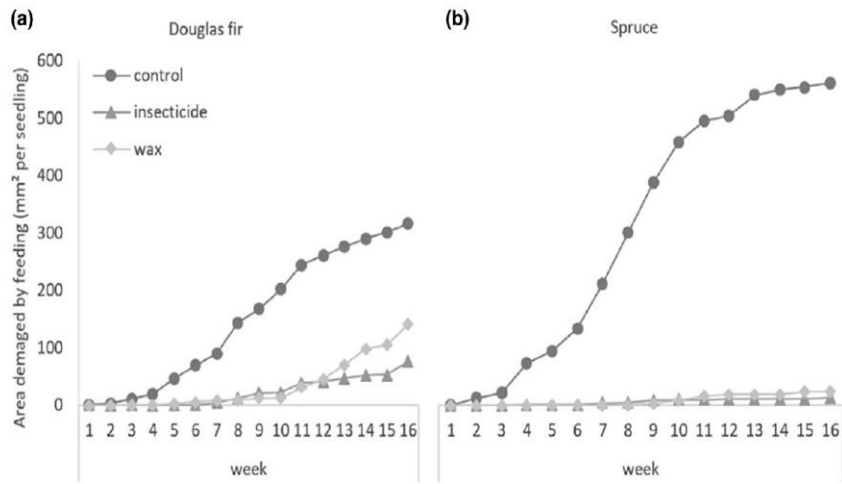
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Experiment I

#### 3.1.1 | 8 weeks

Both wax and insecticide treatments significantly reduced the area of *H. abietis* feeding damage at 8 weeks on Norway spruce seedling (average area of feeding scars: wax = 0.4 mm<sup>2</sup>, insecticide = 4.5 mm<sup>2</sup>; both  $p < .001$ ) and on Douglas fir seedlings (wax = 9.0 mm<sup>2</sup>,  $p < .001$ ; insecticide 12.8 mm<sup>2</sup>,  $p = .006$ ) compared to the control (Norway spruce = 301.2 mm<sup>2</sup>, Douglas fir = 144.5 mm<sup>2</sup>; Figure 3a,c). The average area of feeding scars was smaller on waxed seedlings than on insecticide-treated seedlings (Norway spruce:  $p = .074$ , Douglas fir:  $p < .001$ ).





**FIGURE 2** Weekly changes in the area of *Hylobius abietis* feeding damage on stems of untreated (control), KVAEE wax-treated, or Vaztak insecticide-treated (a) Douglas fir seedlings and (b) Norway spruce seedlings in Experiment I

### 3.1.2 | 16 weeks

At the end of the experiment (week 16), the effects of treatments on the area of feeding scars were significant only for Norway spruce seedlings (control = 562.2 mm<sup>2</sup>, wax = 24.0 mm<sup>2</sup>, insecticide = 13.6 mm<sup>2</sup>;  $p < .001$  for both treatments). The average area of feeding scars was lower on treated Douglas fir seedlings than on control seedlings, but the effects were not significantly different statistically (control = 317.0 mm<sup>2</sup>, wax = 141.5 mm<sup>2</sup>, insecticide = 76.7 mm<sup>2</sup>;  $p > .1$  for both treatments; Figure 3b,d).

The wax coating performed better than the insecticide on both plant species at 8 weeks, but at the end of experiment the feeding scars area was smaller on insecticide-treated than on wax-treated seedlings (Figures 2 and 3). The average area of feeding scars after 16 weeks was significantly greater on control Norway spruce seedlings than on control Douglas fir seedlings. In contrast, treated Norway spruce seedlings were significantly less damaged than treated Douglas fir seedlings. Two Norway spruce and one Douglas fir seedling (all untreated) died during the experiment.

During the beetle exchange, we found 131 dead beetles among the total of 160 beetles used in the experiment (mortality = 81.9%).

## 3.2 | Experiment II

### 3.2.1 | 8 weeks

In cages with both two and four pine weevils, feeding damage was significantly lower on treated Norway spruce seedlings (average area of feeding scars with two weevils: glue = 58.5 mm<sup>2</sup>,  $p < .001$ ; insecticide = 81.0 mm<sup>2</sup>,  $p = .028$ ; wax = 71.2 mm<sup>2</sup>,  $p < .001$ ; with four weevils: glue = 110.5 mm<sup>2</sup>,  $p = .017$ ; insecticide = 157.0 mm<sup>2</sup>,  $p = .049$ ; wax = 159.5 mm<sup>2</sup>,  $p < .001$ ) than on control seedlings (two

weevils = 594.0 mm<sup>2</sup>; four weevils = 737.0 mm<sup>2</sup>; Figure 4a,c). The area of feeding scars was smaller on glue- and wax-treated seedlings than on insecticide-treated seedlings.

### 3.2.2 | 16 weeks

In cages with both two and four pine weevils, feeding damage was significantly lower on all treated Norway spruce seedlings (two weevils: glue = 412.5 mm<sup>2</sup>,  $p = .038$ ; insecticide = 339.0 mm<sup>2</sup>,  $p = .174$ ; wax = 217.2 mm<sup>2</sup>,  $p < .001$ ; four weevils: glue = 533 mm<sup>2</sup>,  $p = .017$ ; insecticide = 477 mm<sup>2</sup>,  $p = .318$ ; wax = 394 mm<sup>2</sup>,  $p = .019$ ) than on control seedlings (two weevils = 835 mm<sup>2</sup>; four weevils = 913 mm<sup>2</sup>). The area of feeding scars was smaller on wax-treated seedlings (two weevils:  $p = .002$ ; four weevils:  $p = .028$ ) than on insecticide-treated seedlings.

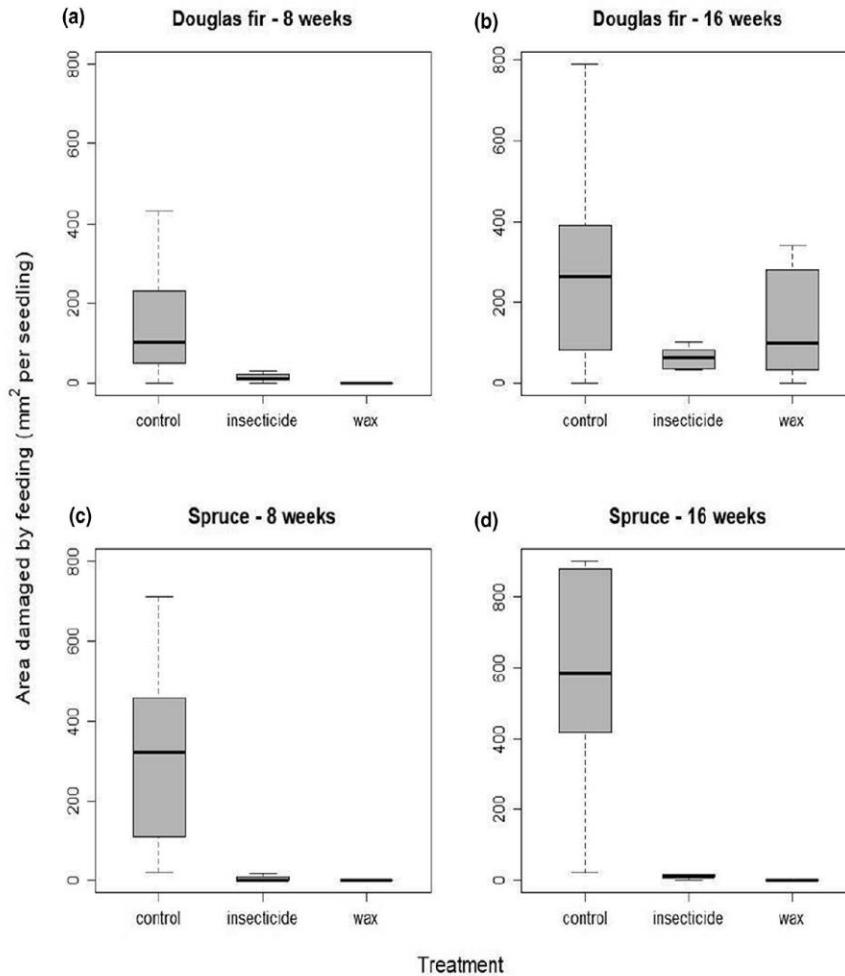
All (glue, insecticide, wax) treatments reduced the feeding damage on Norway spruce seedlings. In the control group, seedlings began to die early, and all were dead by the end of the experiment with both two and four adults per cage (Figure 5c,d). With two adults per cage, nearly half of the glue-treated seedlings had died by week 16, but only three died with wax treatment, and only two died with insecticide treatment (Figure 5c). By week 16 with four adults per cage, a high percentage of all the treated seedlings had died (Figure 5d).

During the beetle exchange, we found 88 dead beetles among the total of 160 beetles used in cages with two beetles (mortality = 55.0%); we found 184 dead beetles among the total of 320 beetles used in cages with four beetles (mortality = 57.5%).

## 4 | DISCUSSION

In our experiments, all of the treatments reduced the feeding damage of *H. abietis* on seedlings, and wax and glue treatments were as





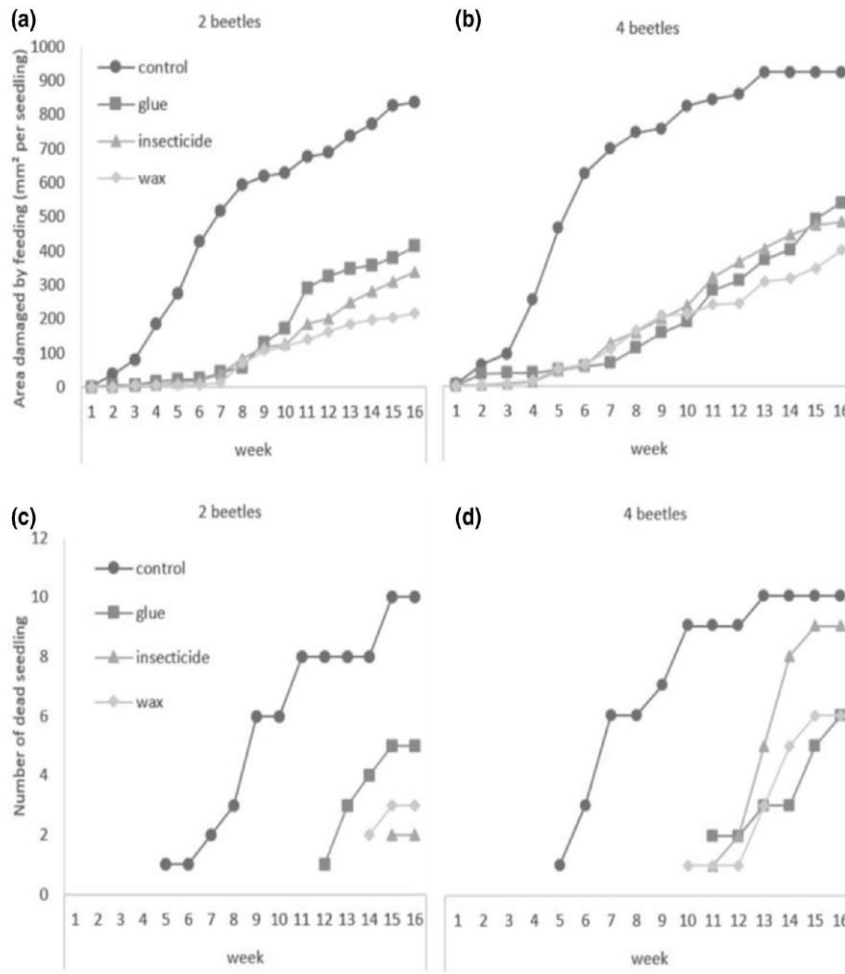
**FIGURE 3** Area of *Hylobius abietis* feeding damage on the stems of untreated (control), KVAAE wax-treated, Vaztak insecticide treated, (a,b) Douglas fir seedlings or (c,d) Norway spruce seedlings at 8 and 16 weeks in Experiment I (In the boxplot, the bold horizontal line in the middle of the box indicates the median value of the data. The box itself shows the first and third quartile of data. The bars outside the box indicate the minimum and maximum range of data.)

effective as insecticide sprays. However, the application of insecticides can be problematic because of environmental and health risks (Le Goff & Giraud, 2019).

Information provided by the producer (BASF SE, Ludwigshafen, Germany) indicates that both of the tested insecticides are guaranteed to be effective for 28 days suggesting that forest managers would need to spray seedlings two or three times per year to protect seedlings for the whole period when they can be damaged by *H. abietis*. In Slovak and Czech forestry practice, however one spray of insecticide has been considered effective for 2–3 months and our experiment also found insecticide protection against *H. abietis* lasted for 2–3 months. Treated seedlings were attacked, however, when beetles had killed, and therefore stopped feeding on, the untreated saplings in the cages (Figures 2a,b and 4a,b).

#### 4.1 | Experiment I

Experiment I compared *Hylobius* feeding damage on treated (insecticide or wax) and untreated Norway spruce and Douglas fir seedlings. After 16 weeks the average area of feeding scars was significantly greater on control Norway spruce seedlings than on control Douglas fir seedlings. Treated Norway spruce seedlings, however, were significantly less damaged than treated Douglas fir seedlings. The former finding is inconsistent with an earlier study (Wallertz et al., 2014), which found that the area damaged by *H. abietis* was smaller on untreated Norway spruce than on untreated Douglas fir seedlings in a non-choice laboratory experiment. In the same study, the damaged area was larger on Douglas fir seedlings than on the seedlings of most of the other tested tree species, which this may be explained by the chemical composition of the bark of the studied plants. Several



**FIGURE 4** Weekly changes in the area damaged by the feeding of *H. abietis* on stems of untreated (control), Vaztak insecticide-treated, Vermifix glue-treated, and KVAAE wax-treated Norway spruce seedlings in cages infested with two adults (a) or four adults (b), and changes in the numbers of seedlings that died in cages infested with two (c) or four adults (d) in experiment II

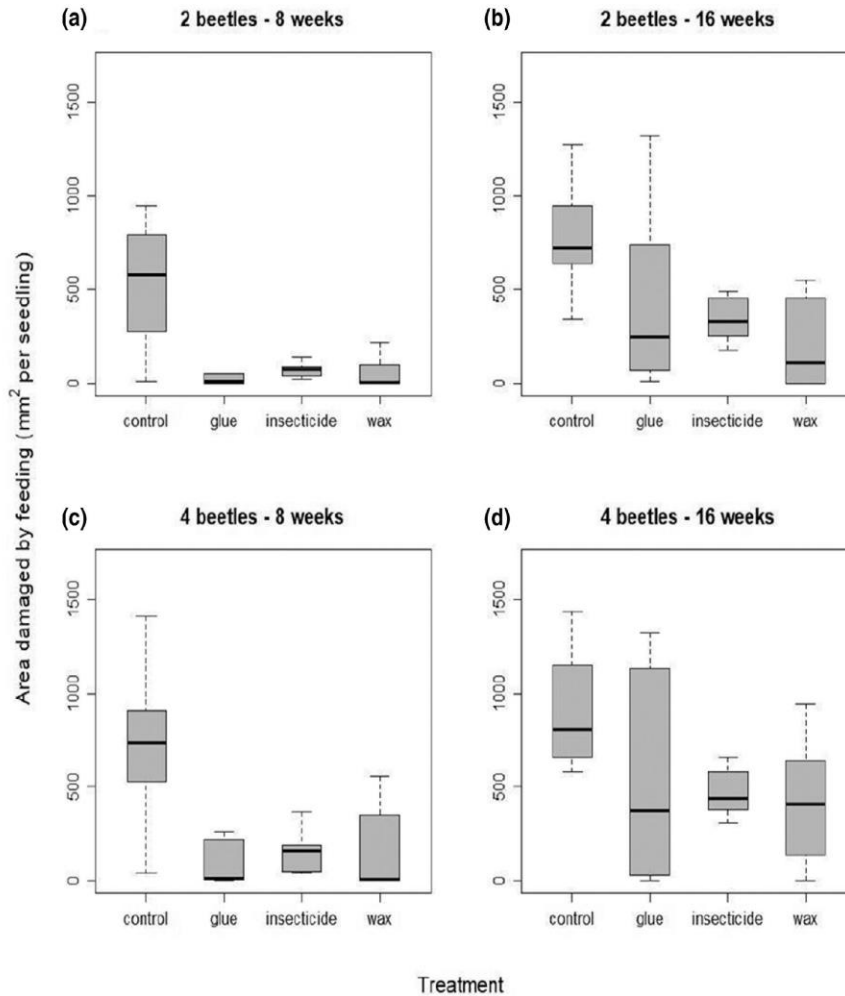
authors have studied the chemical present composition of the bark of Norway spruce and Douglas fir and found significant differences between tree species in both the number of chemicals present and their concentrations (Jirovetz et al., 2000; Dawidowitz & Czapczyńska 2011; Salem et al., 2015). The applied treatments (wax, glue and insecticide) in the current study may change the composition of emitted plant volatiles, reducing the acceptability of the host tree for *H. abietis*. Further research will be needed to validate this assumption.

#### 4.2 | Experiment II

At the outset of this study, we assumed that the area of bark consumed by *H. abietis* would double when the number of adults added per cage was doubled. Although the area damaged on untreated control seedlings at the end of the experiment (week 16) did not greatly

differ with two adults per cage (835 mm<sup>2</sup>) versus four adults per cage (913 mm<sup>2</sup>), all control seedlings had died by week 12 when four beetles were added per cage but not until week 16 when two adults were added per cage. This difference in the time required to kill all seedlings reflected the time required to damage the maximum area available, that is, more time was required with two adults than with four adults. The average area (835 and 913 mm<sup>2</sup>) of feeding scars on untreated Norway spruce seedlings was similar to the damaged area reported by Wallertz et al. (2014) (810 mm<sup>2</sup>). In Experiment II, damage on treated seedlings in cages with four beetles was two times higher than in cages with two individuals at week 8, but these differences had decreased by the end of the experiment. We observed that beetles were still feeding on dead seedling 1 week after seedling death, this feeding was also included in the total damaged area.

Among insecticide-treated seedlings, the area of feeding scars was much greater in Experiment II than in Experiment I. The most likely



**FIGURE 5** Area of *H. abietis* feeding damage on Norway spruce by 2 beetles (a and b) and 4 beetles (c and d) on the stems of untreated (control), Vaztak insecticide-treated, Vermifix glue-treated, and KVAAE wax-treated at 8 weeks (a and c) and 16 weeks (b and d) in experiment I (In the boxplot, the bold horizontal line in the middle of the box indicates the median value of the data. The box itself shows the first and third quartile of data. The bars outside the box indicate the minimum and maximum range of data.)

explanation is that there were fewer seedlings per cage in Experiment II (four seedlings) than in Experiment I (six seedlings). Another possible explanation is that the concentration of the active ingredient in the insecticide (alpha-cypermethrin) was two times higher in Experiment I than in Experiment II (100 vs. 50 g L<sup>-1</sup>). An insecticide with a lower concentration of active ingredient was used for Experiment II because that insecticide was registered in 2017 (after Experiment I was conducted but before Experiment II started) and is considered more environmentally safe. This also impacted beetle mortality, which was higher in Experiment I (82%) than in Experiment II (56%) which could also explain why herbivory was higher in the latter experiment.

The use of glue to protect seedlings against *H. abietis* has been evaluated in only a few other studies. Eriksson et al. (2017) found that a glue (Bayer) prevented adults from feeding on seedlings. When there were two adults per cage in Experiment II of the current study,

the glue provided good protection for about 10 weeks. At the end of Experiment II, the glue treatment reduced seedling damage and seedling mortality by about 50% relative to the untreated control (Figure 5c,d). The glue used in the current study is similar in composition to the glue used in sticky bands, Tree Tanglefoot Pest Barrier (The Tanglefoot Company Grand Rapids, Michigan; natural gum resins 25%, castor oil and carnauba wax 75%), which are used to protect trees against lepidopteran pests. These bands reduce the movement of larvae or non-flying adult females from trunks to tree crowns (Berlinger et al., 1997; Mayo et al. 2003; Noukoun et al., 2014; Webb et al., 1995).

Although the feeding rate by *H. abietis* adults in the current study was statistically similar in the insecticide, glue and wax treatments, the lowest feeding rate/area was observed in the wax treatments. We found only a few other studies that have assessed the use of wax



(Norsk Wax) to reduce feeding by *H. abietis* adults. Sibul & Ploimi (2016) found that *H. abietis* adults preferred un-waxed food over waxed food. Other studies conducted in Sweden in natural conditions found that average mortalities of insecticide treated seedlings and wax treated seedlings were comparable (Table 1; Eriksson et al., 2017, 2018; Härlin & Eriksson, 2016; Petersson et al., 2006).

A wax layer blocks the release of resin terpenes, which attract weevils, from the stems of seedlings. As a result, waxed seedlings are attacked less frequently than unwaxed seedlings. This treatment is effective for 1–2 years (pers. observ. from the Czech Republic and Slovakia), while chemical protection is effective for only 2 months and must be repeated. After 1–2 years, the wax coating begins to break and fall off because of seedling growth and degradation by UV light. By that time, the seedling stems have become thicker and more resistant to weevil damage (<http://kvaee.com/why/>). Wax has a good level of biodegradability compared to other physical protection methods according to OECD tests (<https://cordis.europa.eu/project/rcn/106266/reporting/en>).

In our experiments, damage to seedlings was significantly reduced by all of the tested treatments. In some cases, there were significant differences between treatments, but wax performed best among all treatments. Glue also significantly reduced *H. abietis* feeding damage, but it was less consistent than either wax or insecticide as indicated by the large variance in results. In terms of variance, the insecticide was the most consistent treatment.

A disadvantage of cage experiments is that they limit weevil choice, that is, after the weevils kill and finish feeding on untreated seedlings, only treated seedlings are available. We therefore suspect that the tested treatments may provide stronger protection against weevils under natural conditions in which they can generally find untreated food sources. If untreated food sources are unavailable, the protection provided by the treatments may be reduced, but this hypothesis needs to be verified by conducting field trials.

## 5 | CONCLUSION

For the protection of Norway spruce seedlings from feeding by *H. abietis* adults, the application of a wax or glue coating was as effective as the application of a chemical insecticide containing alpha cypermethrin. It follows that wax and glue applications may be useful alternatives to insecticides for the protection of conifer seedlings. Our results suggest that the use of waxed seedlings has the potential to replace chemical protection, particularly in national parks and other areas where insecticides cannot be applied.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency under contracts No. APVV-16-0031, APVV-18-0086, Research Agency No. 028/2019/1.1.3/OPVa/DP and by the Ministry of Defence of the Slovak Republic (No. VLMSR 0120). This study was also supported by the Česká zemědělská univerzita v Praze project No. IGA C\_01\_18, and by grant 'Advanced research supporting the forestry and wood-processing sector's adaptation to global change and the 4th

industrial revolution', No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000803 financed by OP RDE. The authors thank Dr. Bruce Jaffee (USA) for linguistic and editorial improvements.

## ORCID

Michal Lalík  <https://orcid.org/0000-0003-1794-5222>

## REFERENCES

- Bakke, A., & Lekander, B. (1965). Studies on *Hylobius abietis* L. II. The influence of exposure on the development and production of *Hylobius abietis*, illustrated through one Norwegian and one Swedish experiment. *Meddelelser fra Det norske Skogforsøksvesen*, 20, 117–135.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67, 1–48.
- Bejer-Petersen, B., Juutinen, P., Kangas, E., Bakke, A., Butovitsch, V., Eidmann, H., ... Lekander, B. (1962). Studies on *Hylobius abietis* L. I. Development and life cycles in the Nordic countries. *Acta Entomologica Fennica*, 17, 1–107.
- Berlinger, M. J., Tamim, M., Tal, M., & Miller, A. R. (1997). Resistance mechanisms of *Lycopersicon pennellii* accessions to *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 90, 1690–1696.
- Day, K. R., Nordlander, G., & Halldórsson, G. (2004). General biology and life cycles of bark weevils. Chap. 14. In F. Lieutier, K. R. Day, A. Battisti, J. C. Grégoire, & H. F. Evans (Eds.), *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis* (pp. 331–349). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Eidmann, H. H. (1974). *Hylobius* Schönh. In W. Schwenke (Ed.), *Die Forstschädlinge Europas: Ein Handbuch in fünf Bänden: Zweiter Band: Käfer. 1. vyd* (pp. 275–293). Hamburg, Berlin: Paul Parey.
- Eriksson, S., Karlsson, A., & Härlin, C. (2017). Test av mekaniska plantskydd mot snytbagg i omärkeredd och märkeredd mark, anlagt våren 2013. *Slutrapport Sveriges lantbruksuniversitet, Report*, 15, 1–25.
- Eriksson, S., Wallertz, K., & Karlsson, A. (2018). Test av mekaniska plantskydd mot snytbagg i omärkeredd och märkeredd mark, anlagt våren 2015. *Slutrapport. SLU, Enheten för skoglig fältforskning, Rapport*, 16, 1–22.
- Fedderwitz, F., Björklund, N., Ninkovic, V., & Nordlander, G. (2018). Does the pine weevil (*Hylobius abietis*) prefer conifer seedlings over other main food sources? *Silva Fennica*, 52, 9946 9 pp.
- Galko, J., Kunca, A., Gubka, A., & Vakula, J. (2013). Predstavenie nového spôsobu ošetrovania sadenic voskom ako účinnej ochrany pred tvrdom smrekovým. In A. Kunca (Ed.), *Aktuálne problémy v ochrane lesa 2013, Zborník referátov z 22. Medzinárodnej konferencie konanej 25.-26.4.2013 v Kongresovom centre Kúpeľov Nový Smokovec, a.s.* (Vol. 22, pp. 86–89). Zvolen: Národné lesnícke centrum.
- Härlin, C., & Eriksson, S. (2013). Test av mekaniska plantskydd och insekticider mot snytbagg, anlagt våren 2010. *Slutrapport. SLU, Enheten för skoglig fältforskning, Rapport*, 7, 1–18.
- Härlin, C., & Eriksson, S. (2014). Test av mekaniska plantskydd och insekticider mot snytbagg i omärkeredd och märkeredd mark, anlagt våren 2011. *Slutrapport. SLU, Enheten för skoglig fältforskning, Rapport*, 14, 1–25.
- Härlin, C., & Eriksson, S. (2016). Test av mekaniska plantskydd mot snytbagg i omärkeredd och märkeredd mark, anlagt våren 2012. *Slutrapport. SLU, Enheten för skoglig fältforskning, Rapport*, 12, 1–28.
- Inward, D. J. G., Wainhouse, D., & Peace, A. (2012). The effect on temperature on the development and life cycle regulation of the pine weevil *Hylobius abietis* and potential impacts of climate change. *Agricultural and Forest Entomology*, 14, 348–357.
- Jirovetz, L., Puschmann, C., Stojanova, A., Metodiev, S., & Buchbauer, G. (2000). Analysis of the essential oil volatiles of Douglas fir

- (*Pseudotsuga menziesii*) from Bulgaria. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 434–437.
- Kunca, A., Zúbrik, M., Vakula, J., Galko, J., Konôpka, B., Leontovyc, R., ... Nigrini, R. (2016). Výskyt škodlivých činiteľov v lesoch Slovenska v rokoch 1960–2014, v roku 2015 a prognóza ich vývoja (p. 139). Zvolen: Národné lesnícke centrum - Lesnícky výskumný ústav Zvolen.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest package: Tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software*, 82, 1–26.
- Långström, B., & Day, K. R. (2004). Damage, control and management of weevil pests, especially *Hylobius abietis*. In F. Lieutier, K. R. Day, A. Battisti, J.-C. Grégoire, & H. F. Evans (Eds.), *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis* (pp. 415–444). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Leather, S. R., Day, K. R., & Salisbury, A. N. (1999). The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): A problem of dispersal. *Bulletin of Entomological Research*, 89, 3–16.
- Le Goff, G., & Giraud, M. (2019). Effects of pesticides on the environment and insecticide resistance. In Picimbon J. F. (Ed.) *Olfactory concepts of insect control: Alternative to insecticides* (pp.51–78)
- Lekander, B., Eidmann, H. H., Bejer, B., & Kangas, E. (1985). Time of oviposition and its influence on the development of *Hylobius abietis* (L.) (Col., Curculionidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 100, 417–421.
- Mayo, J. H., Straka, T. J., & Leonard, D. S. (2003). The cost of slowing the spread of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Economic Entomology*, 5, 1448–1454.
- Moffat, A.J., Nisbet, T.R., & Nicoll, B. (2011). *Environmental effects of stumps and root harvesting*. Forestry Commission Information Note 61. Edinburgh: Forestry Commission.
- Moore, R., Brixey, J., & Milner, A. D. (2004). Effect of time of year on the development of immature stages of the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) in stumps of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Carr.) and influence of felling date on their growth, density and distribution. *Journal of Applied Entomology*, 128, 167–176.
- Nordenhem, H. (1989). Age, sexual development, and seasonal occurrence of the pine weevil *Hylobius abietis* (L.). *Journal of Applied Entomology*, 108, 206–270.
- Nordlander, G. (1987). A method for trapping *Hylobius abietis* (L.) with a standardized bait and its potential for forecasting seedling damage. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2, 199–213.
- Nordlander, G., Nordenhem, H., & Bylund, H. (1997). Oviposition patterns of the pine weevil *Hylobius abietis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 85, 1–9.
- Nordlander, G., Nordenhem, H., & Hellqvist, C. (2009). A flexible sand coating (Conniflex) for the protection of conifer seedlings against damage by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 11, 91–100.
- Nordlander, G., Hellqvist, C., Johansson, K., & Nordenhem, H. (2011). Regeneration of European boreal forests: Effectiveness of measures against seedling mortality caused by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Forest Ecology and Management*, 262, 2354–2363.
- Nordlander, G., Mason, G., Hjelm, K., Nordenhem, H., & Hellqvist, C. (2017). Influence of climate and forest management on damage risk by the pine weevil *Hylobius abietis* in northern Sweden. *Silva Fennica*, 51, 7751 20 pp.
- Noukoun, C., Bryant, G., & Frank, S. D. (2014). The effect of sticky bands on cankerworm abundance and defoliation in urban trees. *Arboriculture & Urban Forestry*, 40, 135–142.
- Örlander, G., Nilsson, U., & Nordlander, G. (1997). Pine weevil abundance on clearcuts of different ages: A 6-year study using pitfall traps. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 12, 225–240.
- Örlander, G., Nordlander, G., Wallertz, K., & Nordenhem, H. (2000). Feeding in the crowns of Scots Pine trees by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 15, 194–201.
- Peterson, R.A. (2017). Estimating normalization transformations with bestNormalize. Retrieved from <https://github.com/petersonR/bestNormalize>.
- Pettersson, M., Eriksson, S., & Zetterqvist, F. (2006). Mekaniska plantskydd mot snytbaggeskador, anlagt 2003. *Slutrapport SLU, Asa försökspark, Rapport*, 3, 1–19.
- Pettersson, M., Örlander, G., & Nilsson, U. (2004). Feeding barriers to reduce damage by pine weevil (*Hylobius abietis*). *Scandinavian Journal of Forest Research*, 19, 48–59.
- Rahman, A., Viiri, H., Pelkonen, P., & Khanam, T. (2015). Have stump piles any effect on the pine weevil (*Hylobius abietis* L.) incidence and seedling damage? *Global Ecology and Conservation*, 3, 424–432.
- Rose, D., Leather, S. R., & Matthews, G. A. (2005). Recognition and avoidance of insecticide-treated Scots pine (*Pinus sylvestris*) by *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): Implications for pest management strategies. *Agricultural and Forest Entomology*, 7, 187–191.
- Rose, D., Matthews, G. A., & Leather, S. R. (2006). Sub-lethal responses of the large pine weevil, *Hylobius abietis*, to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Physiological Entomology*, 31, 316–327.
- Salem, M., Zeidler, A., Böhm, M., Mohamed, A., & Ali, M. (2015). GC/MS analysis of oil extractives from wood and bark of *Pinus sylvestris*, *Abies alba*, *Picea abies* and *Larix decidua*. *BioResources*, 10, 7725–7737.
- Saniga, M. (2010). *Pestovanie lesa*. Zvolen: Technická univerzita vo Zvolene.
- Scott, T.M. & King, C.J. (1974). *The large pine weevil and black pine beetles*. Forestry Commission Leaflet 58. London: HMSO.
- Selander, J., Immonen, A., & Raukko, P. (1990). Resistance of naturally regenerated and nursery-raised Scots pine seedlings to the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae). *Folia Forestalia*, 766, 19.
- Sibul, I., & Ploomi, A. (2016). Kaitsevaha mõju harilikku männikärsaka (*Hylobius abietis*) (Coleoptera: Curculionidae) toitumiskäitumisele laboritingimustes. *Eesti taimekaitse*, 95, 19–24.
- Solbreck, C., & Gyldeberg, B. (1979). Temporal flight pattern of the large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera, Curculionidae), with special reference to the influence of weather. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 88, 532–536.
- STN 48 2712. (2016). *Ochrana lesa proti tvrdoňom a lykokazom na sadenicach*.
- Viiri, H., Tuomainen, A., & Tervo, L. (2007). Persistence of deltamethrin against *Hylobius abietis* on Norway spruce seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 22, 128–135.
- von Sydow, F., & Birgersson, G. (1997). Conifer stump condition and pine weevil (*Hylobius abietis*) reproduction. *Canadian Journal of Forest Research*, 27, 1254–1262.
- Wainhouse, D., Inward, G., & Morgan, G. (2014). Modelling geographical variation in voltinism of *Hylobius abietis* under climate change and implications for management. *Agricultural and Forest Entomology*, 16, 136–146.
- Wallertz, K., Nordenhem, H., & Nordlander, G. (2014). Damage by the pine weevil *Hylobius abietis* to seedlings of two native and five introduced tree species in Sweden. *Silva Fennica*, 48, 1–14.
- Wallertz, K., Nordlander, G., & Örlander, G. (2006). Feeding on roots in the humus layer by adult pine weevil, *Hylobius abietis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 8, 273–279.
- Webb, R. E., White, G. B., & Thorpe, K. W. (1995). Response of gypsy-moth (Lepidoptera, Lymantriidae) larvae to sticky barrier bands on simulated trees. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 97, 695–700.

<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail>

[http://kvaee.no/wp-content/themes/kvaee/assets/pdf/results\\_eng.pdf](http://kvaee.no/wp-content/themes/kvaee/assets/pdf/results_eng.pdf) [accessed 15 August 2018]

<http://kvaee.com/why/> [accessed 15 December 2018]

<http://www.moudry-cz.com/download/KatalogCZ.pdf> [accessed 5 Jul 2018]

**How to cite this article:** Lalík M, Galko J, Nikolov C, et al. Non-pesticide alternatives for reducing feeding damage caused by the large pine weevil (*Hyllobius abietis* L.). *Ann Appl Biol.* 2020;177:132–142. <https://doi.org/10.1111/aab.12594>



## 9.2. Príloha č.2: Simple is best: Pine twigs are better than artificial lures for trapping of pine weevils in pitfall traps




forests



Article

### Simple Is Best: Pine Twigs Are Better Than Artificial Lures for Trapping of Pine Weevils in Pitfall Traps

Michal Lalík <sup>1,2,\*</sup>, Jaroslav Holuša <sup>2</sup>, Juraj Galko <sup>1</sup>, Karolína Resnerová <sup>2</sup>, Andrej Kunca <sup>1</sup>, Christo Nikolov <sup>1</sup>, Silvia Mudrončeková <sup>3</sup> and Peter Surový <sup>2</sup> 

<sup>1</sup> National Forest Centre, Forest Research Institute Zvolen, T. G. Masaryka 22, 96001 Zvolen, Slovakia

<sup>2</sup> Department of Forest Protection and Entomology, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 1176, 16500 Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Research Station of State Forests of TANAP, 05960 Tatranská Lomnica, Slovakia

\* Correspondence: michal.lalik@nlcsk.org; Tel.: +42-19-0374-6426

Received: 26 June 2019; Accepted: 22 July 2019; Published: 29 July 2019



**Abstract:** The large pine weevil *Hylobius abietis* (Linnaeus 1758) is the main pest of coniferous seedlings in Europe and causes substantial damage in areas that have been clear-cut or otherwise disturbed. We compared the efficacy of different attractants for the capture of *H. abietis* adults in white pitfall traps. The field experiment was performed from mid-April to the end of August 2018 at six plots in Central Europe located in spruce stands that had been clear-cut. At each plot, we compared five attractants: one pine twig with ethanol, Hylodor, alpha-pinene + ethanol, turpentine oil and ethanol (separated), and turpentine oil + ethanol (not separated). Traps without attractant served as a control. Six traps for each attractant or control were distributed at each plot. Of the total number of *H. abietis* adults trapped, 43.3%, 20.5%, 17.9%, 9.8%, 8.5% and 0.5% were captured in traps with pine twigs with ethanol, alpha-pinene, Hylodor, turpentine, oil + ethanol (separated), turpentine oil + ethanol (combined), and no attractant, respectively. The bottom of each trap contained propylene glycol to kill and preserve beetles. The small number of beetles captured in the control traps confirms that the propylene glycol:water mixture did not influence the trapping of *H. abietis*. The use of pitfall traps with a suitable attractant (especially pine twigs and ethanol) should be useful for monitoring of *H. abietis*, because it is simple and cost-effective. The use of such pitfall traps to control *H. abietis* by mass trapping would require 50 to 100 traps per ha.

**Keywords:** Hylodor; alpha-pinene; turpentine oil; ethanol; propylene-glycol; Norway spruce

#### 1. Introduction

The large pine weevil *Hylobius abietis* (Linnaeus 1758) (Coleoptera: Curculionidae) is the main pest of coniferous seedlings in Europe and is especially damaging in areas where seedlings have been planted following clearcutting or other disturbances [1–3]. In such areas, the presence of fresh stumps maintains high numbers of *H. abietis*. Over the last 100 years, foresters have used various methods to protect seedlings from the damage caused by *H. abietis* feeding [1,3,4].

The basic protection method is to prevent *H. abietis* from feeding on seedlings. Feeding barriers have been commonly used in Germany since 1920 [1]. Plastic collars were developed at the end of the 1970s [5] and have been in use since that time. During the late 1980s and the beginning of the 1990s, researchers developed and tested several other shields, including stockings [6], plastic fibre wrappings (“BEMA”) [7], and coated barriers [8]. Feeding can also be prevented by applying various coatings to the seedling stem. The first coating used was latex, which prevented feeding on the bark [9]. Protection can also be provided by a sand coating, which involves an initial application of acrylate glue and a subsequent application of fine sand (grain size <0.2 mm). The treated seedlings can then be planted in

stands [10]. Another option is to coat seedlings up to a height of 15 cm with a special flexible wax, which can protect the seedlings for 2 years [11].

All of the methods mentioned in the previous paragraph protect seedlings but do not reduce the numbers of *H. abietis* in the environment. From the 1950s to 1970s, the development of barriers for the protection of seedlings slowed, because insecticides with dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) were used. Because DDT can harm humans [12] and other non-targets [13], pesticides containing DDT were gradually restricted and finally forbidden. After insecticides with DDT were banned, research concerning the development of other insecticides increased. Pyrethrins and synthetic pyrethroids are sold as commercial pesticides used to control pest insects in agriculture, homes, communities, restaurants, hospitals, schools, and as a topical head lice treatment [14]. Because of physiological effects of synthetic pyrethroids on *H. abietis* [15–18], synthetic pyrethroids are used in the field [19–21].

The mass trapping of *H. abietis* using attracting materials was practised before seedling protection. Mass trapping appears in the literature by 1839 [22]. The materials used to attract *H. abietis* included “trap barks”, “trap logs”, or fresh branches. In each case, the bark, logs, or branches (which were obtained from host species) were deployed in the field and then removed along with attracted beetles after some period of time. A disadvantage was that the attracted adults remained alive and had to be collected and killed. Trap barks were made more attractive by free placing pine twigs inside two pieces of spruce barks [23].

The labour needed to collect *H. abietis* from trap barks can be reduced by treating the bark with a synthetic pyrethroid or other insecticide such that the beetles are killed. In Europe, however, this method is currently only being used in a few countries [3,24,25]. The main reasons for the decreased use of this seedling protection method is the difficulty in preparing trap barks and the need for their frequent inspection and replacement.

Another method of catching *H. abietis* adults without the need to collect them is to use pitfall traps. Low numbers of traps are used (20–30 traps per ha), for monitoring [26]. The installation of pitfall traps is simple, and their efficacy is increased by addition of an attractant. Many kinds of attractants have been used, including wooden cylinders and discs [27–30], but the original lure from trap barks, i.e., pine twigs [23], has been forgotten. Only a single modern work uses twigs from Norway spruce in addition to bark [31].

Alpha-pinene combined with ethanol is highly attractive to *H. abietis*, which is understandable, because alpha-pinene is one of the compounds in the resin of coniferous [32]. Traps containing alpha-pinene with ethanol are more effective than traps that contain only alpha-pinene or only ethanol [33]. These attractants have usually involved the use of two “evaporators” (the containers holding the attractant and releasing its odours) per pitfall trap, i.e., alpha-pinene in one evaporator and 70% ethanol in a second evaporator [32,34–36]. These chemicals have also been applied to increase the attractiveness of bark and other natural materials [29].

Pitfall traps with attractants can be used both to monitor and control pest populations [27,30]. Such traps, along with chemical protection of seedlings, have been widely used in Poland [37]. Traps IBL-4 containing Hylodor, the aggregation pheromone of *H. abietis* [38], caught significantly more of *H. abietis* than natural (branches, discs) baits [30].

The pitfall traps used to trap *H. abietis* are usually simple containers or tubes [31–35,39]. The containers or tubes are buried in the soil, but their tops, which extend above the soil surface, have holes at the soil surface that enable beetles to enter. A recent trend is to create more complex constructions, such as a funnel with holes and a bottle [36], or other types of traps used in Poland [38].

The goal of this work was to evaluate the ability of simple pitfall traps (small buckets) to capture *H. abietis* adults. The traps contained a natural attractant (a pine twig), artificial attractants based on natural compounds (alpha-pinene, turpentine oil, and ethanol), or a commercially available aggregation pheromone (Hylodor).



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Localities

The experiment was conducted in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) forests at four localities in the Czech Republic and at two localities in Slovakia (Figure 1). Norway spruce represented at least 90% of the trees (Table 1).

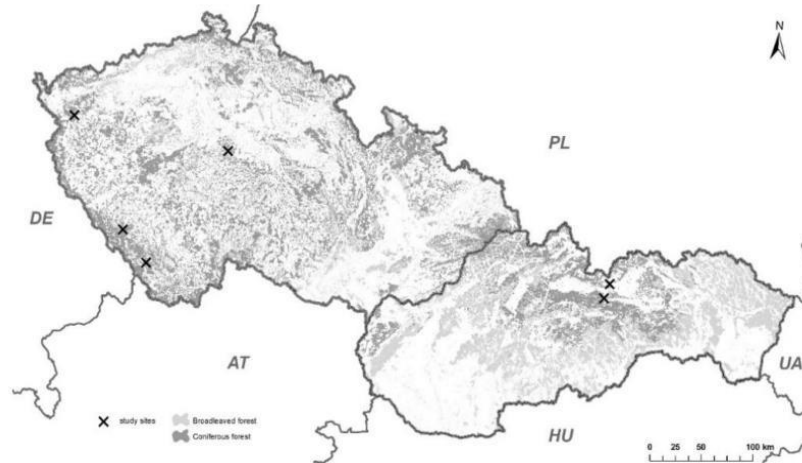


Figure 1. The six localities in the Czech Republic and Slovakia used in the current study.

Table 1. Description of study localities.

Country/Locality	Geographical Coordinates	Area (ha)	Altitude	Aspect	Establishment of Cleared Area	Spruce Share (%)
CZ/Arnoštov	48.8890528N 13.9529108E	0.74	944–946	Southeast	Felling September 2017	95
SK/Vyšné Hágy	49.120814N 20.102610E	21.5	1216–1220	South	Wind-throw May 2014	95
CZ/Kašperské Hory	49.1343394N 13.5876222E	0.81	780–785	Southwest	Felling October 2017	100
CZ/Kostelec n. Č. L.	49.9198067N 14.840943E	0.62	402–404	South	Felling December 2017	90
SK/Liptovská Teplička	48.995592N 20.038704E	10.4	1115–1127	North	Bark-beetle disturbance February 2018	100
CZ/Mariánske Lázně	50.0246936N 12.7173419E	0.45	819–820	Plane	Bark-beetle disturbance May 2017	100

The trees at the locality had been removed for felling (harvest) or because of wind damage or bark beetle outbreak (Table 1). After the trees were removed, there were about 400 stumps per ha.

### 2.2. Attractants and Evaporators

Pine twigs and four chemical attractants were tested. All twigs (50 mm long and  $12 \pm 2$  mm in diameter) were cut from a single 50-year-old *Pinus sylvestris* (L.) tree on 10 April 2018. The age of the twigs was 4–6 year. The twigs were stored in hermetically sealed polyethylene bags at  $-20$  °C. One thawed twig was placed per trap, and a 20-mL bottle containing ethyl alcohol was placed next to the twig. The lid of the bottle had six holes with a diameter of 2 mm and one hole with a diameter of 4 mm; a polypropylene string that was attached to the larger hole and to the trap rim was used to suspend the bottle in the trap.

Four kinds of evaporators were used to disperse the chemical attractants. One of these was the Hylodor (A) (Z.D. Chemipan), which is a commercially available evaporator plus attractant (a mixture of organic and inorganic substances) produced in Poland (Table 2). The other type of evaporator consisted of a polypropylene tube fabricated by the Fytofarm Ltd. Co. (Bratislava, Slovakia)

(Table 2). The polypropylene tubes were used for the other three kinds of attractants and the control. After the tubes were filled, they were head sealed, and the content was released only through the polypropylene walls.

**Table 2.** Descriptions of the attractants.

Attractant	Daily Vapour (g) **	Attractant Composition	Ratio of Components
A—Hyldor	0.012	mixture of organic and inorganic substances	-
B—alpha-pinene + ethanol *	0.070	mixture of alpha-pinene (1R)(+)-alpha-pinene (98%) CAS:7785-70-8, EINECS: 232087-8 + ethanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6	1:2 ***
C—Turpentine oil + ethanol separated *	1st tube: 0.023 2nd tube: 0.241	1st tube: ethanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6 2nd tube: turpentine, oil CAS: 7785-70-8, EINECS: 232087-8	100% 100%
D—Turpentine oil + ethanol *	0.093	mixture: turpentine, oil CAS: 7785-70-8, EINECS: 232087-8 + ethanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6	2:1 ****
PC—pine branch + ethanol in a bottle	0.402	ethanol CAS: 64-17-5, EINECS: 200-578-6	-

\* The evaporators for these attractants were polypropylene tubes (diameter = 23 mm, height = 49 mm, volume = 12.5 ml, weight without attractant = 3.5 to 4.0 g). Each tube contained 6 mL of attractant. \*\* Vapour in the laboratory condition at  $19.54 \pm 1.73$  °C,  $36.53 \pm 3.12\%$ ; \*\*\* Used according to [33]; \*\*\*\* Used according to [29].

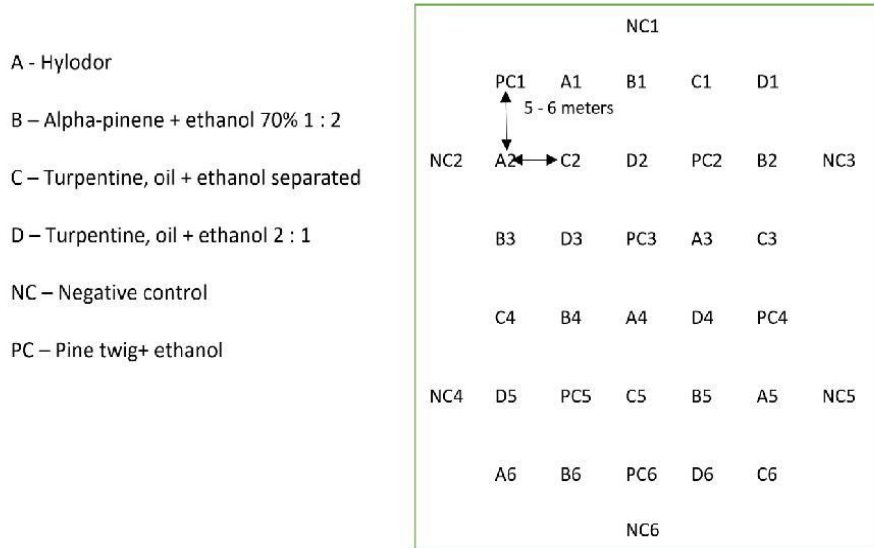
### 2.3. Pitfall Traps and Experimental Design

Pitfall traps consisted of 1.2-litre buckets with 10 holes (10 mm in diameter) in the upper part of the trap (Figure 2). The traps had lids and were buried in the ground so that the holes, through which beetles could pass, were at the soil surface. The bottom of each trap contained 200 mL of propylene glycol (CAS: 57-55-6, EINECS: 200-338-0) mixed with water (1:1 ratio) and Tween 80 wetting agent (Carl Roth, CAS 9005-65-6), which killed and preserved the beetles that fell into the trap. One evaporator, in which the attractant was placed, was also hung from the upper rim of each trap so that it rested along the inner wall of the trap and above the propylene glycol-water mixture.



**Figure 2.** Photographs of representative pitfall traps and different type lure (a–d).

A total of 36 pitfall traps were placed in one plot (22.0 m × 28.5 m) at each locality. The distance between the traps was 5–6 m depending on the obstacles in the field. Among the 36 traps in each plot, 24 contained chemical attractants, 6 contained one pine twig + ethanol in a bottle, and 6 were without any attractant and served as negative control. The traps were distributed in the plot so that a specific type of attractant was not located near the same attractant type (Figure 3).



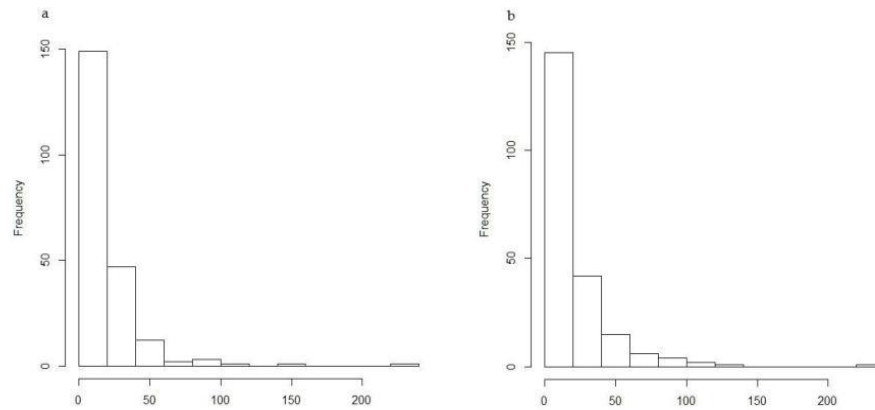
**Figure 3.** Locations of the pitfall traps in a plot (the attractant is indicated by the letters, and the trap replicate is indicated by the number).

The experiment began on 13 April 2018 and ended on 31 August 2018. Traps were checked every week at each plot on the same day of the week; all trapped beetles were removed and counted according to species and sex. For traps with twigs, twigs were replaced, and fresh ethanol was added to the bottles every week. For traps with synthetic attractants, the attractants were replaced during the 8th and 16th week of the experiment.

2.4. Statistical Analyses

The cumulative number of *H. abietis* adult males and adult females caught per trap across all trap types did not fit a normal distribution (Figure 4), and the data failed the test for homogeneity of variance concerning the effects of attractant and locality (Bartlett’s K-squared = 206.72, df = 5, *p*-value <0.001 =  $2.2 \times 10^{-16}$ ). As a consequence, the general linear model (GLM) rather than ANOVA was used. The complete model is presented in Appendix A.

The results of the GLM model were tested using ANOVA for detection of differences and their sizes among different treatments and localities. Statistical analyses were performed in R software (RStudio Version 1.1.423, © 2009–2018 RStudio, Inc., package lme4, version 1.1-19, Boston, MA, USA).



**Figure 4.** Frequency distribution of numbers of *H. abietis* adult males (a) and females (b) caught per trap across all attractant types.

### 3. Results

The main species captured in our pitfall traps were *H. abietis* and *H. pinastri*. In total, 8266 adults of *H. abietis* and 2040 adults of *H. pinastri* were caught in all pitfall traps at all localities. The number of *H. abietis* caught per locality and per attractant type was correlated with the number of *H. pinastri* caught per locality and per attractant type ( $y = 10.08 + 0.20x$ ;  $r = 0.90$ ;  $p = 0.0000$ ;  $r^2 = 0.81$ ). The number of trapped adults (total of both species) was highest with a pine twig + ethanol (Table 3). Among the chemical attractants, the number of trapped adults (total of both species) was highest with alpha-pinene + ethanol followed by turpentine oil and ethanol (separated); the number was lowest with turpentine oil + ethanol (combined) (Table 3).

**Table 3.** Numbers of *H. abietis*/*H. pinastri* trapped as affected by locality and attractant.

Locality	Attractant					
	Hylodor	Alpha-Pinene + Ethanol	Turpentine, Oil + Ethanol Separated	Turpentine, Oil + Ethanol Combined	Negative Control	Pine Twig + Ethanol
Arnoštov	269/38	405/74	137/9	102/2	8/0	681/144
Vyšné Hágy	150/72	265/96	130/48	59/9	1/0	449/185
Kašperské Hory	34,379	273/54	205/63	205/76	23/0	656/202
Kostelec n. Č.L.	228/72	286/65	200/51	139/37	0/0	367/95
Liptovská Teplička	456/88	416/80	103/18	137/35	9/0	1310/226
Mariánské Lázně	34/7	47/17	32/10	22/18	2/0	117/69
<b>Total</b>	1480/356	1692/387	807/199	664/177	43/0	3580/921

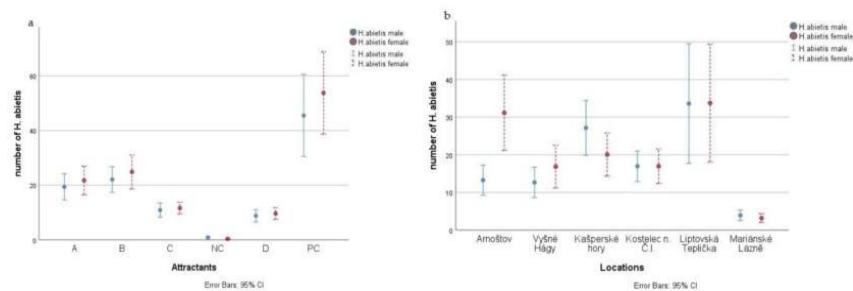
The *H. abietis* sex ratio differed among localities. Two localities had a 50:50 sex ratio, two had more males than females, and two had more females than males (Table 4). Across all localities, the average number of adults trapped per ha was >14,000 for *H. abietis* and >3000 for *H. pinastri* (Table 4). The number of *H. abietis* adults trapped per ha significantly differed among localities and was highest at Liptovská Teplička and lowest at Mariánské Lázně (Table 4).



**Table 4.** Numbers of *H. abietis* males and females and *H. pinastri* (both sexes) trapped at individual localities (\* average).

Locality	Number of <i>H. abietis</i> Males Trapped	Number of <i>H. abietis</i> Females Trapped	Sex Ratio of Trapped Males:Females	Total Number of <i>H. abietis</i> Trapped	Number of <i>H. abietis</i> Trapped/Ha	Number of <i>H. pinastri</i> Trapped	Number of <i>H. pinastri</i> Trapped/Ha
Arnoštov	480	1122	30:70	1602	16,584	267	2764
Vyšné Hágy	456	598	43:57	1054	10,910	411	4255
Kašperské Hory	979	726	57:43	1705	17,650	474	4907
Kostelec n. Č.L.	610	610	50:50	1220	12,630	320	3313
Liptovská Teplička	1212	1219	50:50	2431	25,165	447	4627
Mariánské Lázně	140	114	55:45	254	2630	121	1253
<b>Total or average</b>	<b>3877</b>	<b>4389</b>	<b>47:53 *</b>	<b>1378</b>	<b>14,261 *</b>	<b>340</b>	<b>3520 *</b>

The numbers of trapped individuals significantly differed among localities and attractants (Figures 5 and 6 and Appendix A). Trapping was highest with a pine twig ± ethanol. Trapping was generally similar with Hylodor and alpha-pinene + ethanol but was higher with Hylodor at some localities (Kašperské Hory, Liptovská Teplička) and was higher with alpha-pinene + ethanol at other localities (Arnoštov, Vyšné Hágy, Kostelec n. Č.L., Mariánské Lázně). Trapping was significantly lower with turpentine oil + ethanol (separated) and with turpentine oil + ethanol (combined) than with a pine twig ± ethanol, Hylodor, or alpha-pinene + ethanol.

**Figure 5.** Number (mean ± SE) of *H. abietis* trapped with individual attractants across all localities (a) and at individual localities across all attractant treatments including the control (b) (for attractant abbreviations, see Figure 1).

At all localities, trapping was highest at the beginning of May and then gradually decreased (Figure 6). At the end of the experiment, only a few individuals were trapped at each locality (Figure 6).

Pairwise comparisons were made of the efficacy of attractants in trapping *H. abietis* (based on the number of individuals by sex trapped across all localities) (Tables 5 and 6). Almost all pairs were statistically different. For both males and females, trapping was always highest with a pine twig with ethanol and was always lowest with the no attractant control. Trapping did not significantly differ between turpentine oil + ethanol (separated) vs. turpentine oil + ethanol (combined) for both males and females or between turpentine oil + ethanol (separated) vs. Hylodor for males.

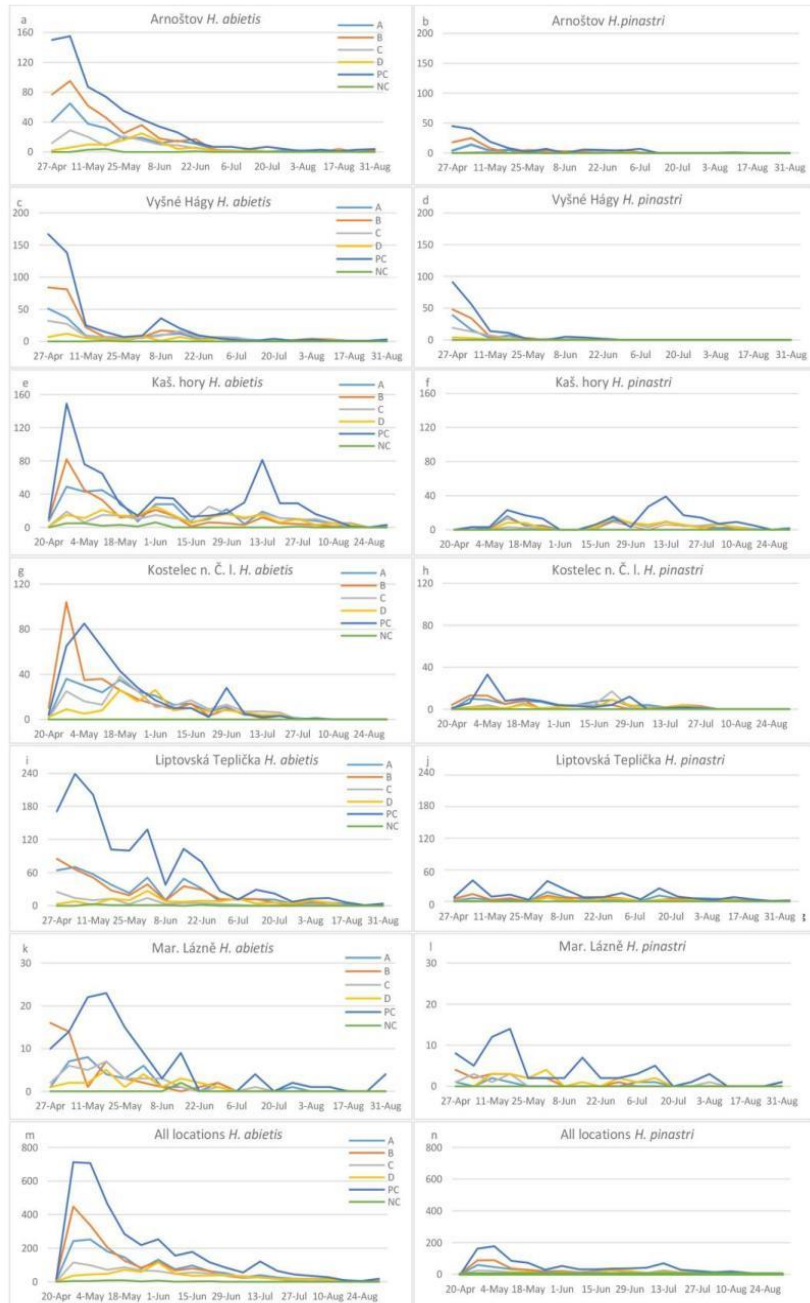


Figure 6. Mean numbers of *H. abietis* (a,c,e,g,i,k,m) and *H. pinastri* (b,d,h,j,l,n) adults trapped over time as affected by attractant and locality.

**Table 5.** Pairwise comparison of attractant efficacy in trapping male *H. abietis* (based on number of individuals trapped across all localities).

Attractant Pair	Absolute Difference	Standard Error	z-Value	p-Value
B-A	0.4400	0.1471	2.991	<0.02791 *
C-A	-0.4595	0.1844	-2.492	0.10974
NC-A	-2.5390	0.4241	-5.987	<0.001 ***
D-A	-0.7198	0.2005	-3.591	<0.00368 **
PC-A	0.9268	0.1355	6.838	<0.001 ***
C-B	-0.8995	0.1712	-5.254	<0.001 ***
NC-B	-2.9789	0.4185	-7.118	<0.001 ***
D-B	-1.1598	0.1884	-6.155	<0.001 ***
PC-B	0.4868	0.1170	4.162	<0.001 ***
NC-C	-2.0794	0.4330	-4.802	<0.001 ***
D-C	-0.2603	0.2188	-1.190	0.82316
PC-C	1.3863	0.1614	8.591	<0.001 ***
D-NC	1.8192	0.1614	4.133	<0.001 ***
PC-NC	3.4657	0.4146	8.360	<0.001 ***
PC-D	1.6466	0.1795	9.171	<0.001 ***

(Signif. codes: 0 '\*\*\*'; 0.001 '\*\*', 0.01 '\*').

**Table 6.** Pairwise comparison of attractant efficacy in trapping female *H. abietis* (based on number of individuals trapped across all localities).

Attractant Pair	Absolute Difference	Standard Error	z-Value	p-Value
B-A	0.39330	0.09315	4.222	<0.001 ***
C-A	-0.77405	0.12813	-6.041	<0.001 ***
NC-A	-4.56954	0.71076	-6.429	<0.001 ***
D-A	-1.08830	0.14341	-7.589	<0.001 ***
PC-A	0.92557	0.08506	10.882	<0.001 ***
C-B	-1.16736	0.12138	-9.618	<0.001 ***
NC-B	-4.96284	0.70957	-6.994	<0.001 ***
D-B	-1.48160	0.13741	-10.782	<0.001 ***
PC-B	0.53227	0.07450	7.145	<0.001 ***
NC-C	-3.79549	0.71501	-5.308	<0.001 ***
D-C	-0.31425	0.16316	-1.926	0.337
PC-C	1.69963	0.11528	14.744	<0.001 ***
D-NC	3.48124	0.71790	4.849	<0.001 ***
PC-NC	5.49512	0.70856	7.755	<0.001 ***
PC-D	2.01388	0.13205	15.251	<0.001 ***

(Signif. codes: 0 '\*\*\*'; 0.001 '\*\*', 0.01 '\*').

#### 4. Discussion

During the growing season of 2018, we recorded the capture of *H. abietis* in pitfall traps deployed in recently cleared spruce stands in six Central European localities where altitudes ranged from 400 to 1220 m a.s.l. The large-scale experiment (covering an area of 550 km × 200 km) was performed in two countries (Figure 1). Buckets of 1.2-litre were used as traps with 10-mm-diameter entrance holes (Figure 2). These pitfall traps were easy to construct and deploy. However, pitfall traps are not selective, even with use of entrance holes. They can also catch other invertebrates, but impact is weak [31]. They have to be exposed only for necessary period and have not be forgotten in forests [40].

All of the attractants in our experiment showed some ability to attract *H. abietis* and *H. pinastri*. *H. abietis* is very abundant in Central Europe [3]. *H. pinastri* is also common [4,41–44] but is less abundant than *H. abietis* [45–47]. We assume that fewer *H. pinastri* than *H. abietis* were attracted to pitfall traps with pine twigs because *H. pinastri* prefers spruce [48] while *H. abietis* prefers pine [49].

For *H. abietis*, trapping was always highest with a pine twig with ethanol. It should be recognized that daily vapours of studied attractants are low in comparison with published data [33,35,36]. Experimental evaporators have comparable vaporization as manufactured Hylodor. Ref. [33] had higher vapour, but used attractants that in the bottle and filter paper. This method is not used in practice. We wanted to test the methods usable for forest practice and easy to use. For foresters,



the industrially produced evaporators are the best. Therefore, we used Hylodor and other types of evaporator consisting of a polypropylene tube manufactured by Fytofarm Ltd. Co. The thermoplastic material used ensures regular evaporation for as long as possible [50].

Natural materials (trap barks) for attracting *H. abietis* began to be used in the first half of 19th century [22] and were frequently used by the beginning of the 20th century [1]. A disadvantage of trap barks is the need for their frequent replacement (once every 2 weeks), and the need to remove the attracted *H. abietis* adults every 2–5 days. Another disadvantage of trap barks is their high price, which in Slovakia is about 3.5 € for one piece of bark [51]. For monitoring, about 25 pieces of trap bark/ha are needed. The price of such monitoring (excluding the maintenance costs) would be 175 €/ha per month. In contrast to trap barks, pitfall traps do not require regular visits. During our experiment, we emptied them once per week, but only one inspection per month would be needed if attractants in tubes were used. The alpha-pinene + ethanol attractant costs 2.5 € per trap and can last for 6–8 weeks, and the cost of one bucket used for the pitfall trap is 0.33 €. In this case, the costs excluding maintenance costs are 70.75 € with 25 pitfall traps/ha.

There are additional problems with the use of trap barks and other natural materials as pest attractants [33]. The types of natural materials used to attract pests can differ in their monoterpene content [52,53]. Another problem is that wooden attractants dry, which gradually reduces their attractiveness [45]. When pests attack wooden attractants, they feed on them and disturb the material. This increases the release of compounds that attract *H. abietis* [32] but decreases the longevity of the attractant. As a consequence, we replaced the pine twigs in our experiment every week. [31], who used source spruce twig replaced it also each week. Although we do not know anything about population densities in their study areas, they caught 10x less beetles in comparison with our results [31].

The second most effective attractant in the current study was alpha-pinene, which is present in conifers and has a resin-like odour. This compound is usual in that its content within a tree species is constant regardless [54]. The ratio of fragrant compounds in coniferous species is largely genetically driven and is not affected by other factors [55]. In the evaporator, alpha-pinene was mixed with ethanol, because such a combination is six times more attractive to *H. abietis* than alpha-pinene alone, and 10 times more attractive than ethanol alone [33]. In addition, the effect of the combination in the field is synergistic [32].

The third most successful attractant was the commercially available Hylodor. This attractant, which is produced in Poland, is described as an aggregation pheromone, but its composition is unknown. Kuźmiński and Bilon [30] showed that the number of beetles trapped was only slightly higher with Hylodor than with logs or wooden discs.

The fourth highest number of catches was obtained when turpentine oil and 70% ethanol were placed in separate tubes. Turpentine oil is extracted from resin by distillation and contains mainly alpha-pinene and beta pinene [29]. Although this lure has a low price [31,56], it trapped only low numbers of *Hylobius* spp. adults in the current study. The last attractant that was used in this study was turpentine oil mixed with ethanol in a 2:1 ratio. This attractant also trapped only a low number of *Hylobius* spp. adults. The concentration of turpentine oil and ethanol used in our experiment was equal to that used by [29]. We suspect that such a strong concentration could repel rather than attract, and that a smaller proportion of turpentine might be more effective [56].

The negative control (without attractant) pitfall traps in the current study trapped only a few individuals, which probably were not attracted to the traps but simply entered them accidentally. The small number of beetles captured in these traps confirms that the propylene glycol:water mixture used to kill and preserve the trapped beetles did not function as an attractant or as a repellent, and did not therefore influence the trapping of *H. abietis* [56].

In total, we captured 8266 adults of *H. abietis* and 2040 adults of *H. pinastri* at six localities. Ref. [57] stated that a trap can attract adults from a distance of 2.5 m in all directions. In this study, we found that regardless of the lure used, a pitfall trap can attract adults at distances greater than 2.5 m. With a trap situated at the edge of the plot, we caught on average  $290 \pm 203$  adults of *H. abietis* and  $74 \pm 52$



adults of *H. pinastri*. In centrally located traps, we caught on average  $250 \pm 156$  and  $59 \pm 41$  adults of *H. abietis* and *H. pinastri* per trap, respectively. If we assume that each trap in a plot can capture beetles within a 3-m radius with baited traps (approximately  $600 \text{ m}^2$ ), we will get an “*H. abietis* trapping area” of approximately  $28.0 \times 34.5 \text{ m}$  ( $966 \text{ m}^2$ ). When we calculated the number of catches per ha, we found several thousand to several tens of thousands of *H. abietis* adults per ha and thousands of *H. pinastri* adults per ha depending on the locality (Table 4). In most localities, we found more than 10,000 beetles per ha; i.e., the density of *H. abietis* coincided with that stated by [58] (10,000–18,000 adults/ha). Other authors have also indicated that *H. abietis* numbered about 10,000/ha [36,59], and [4] found that *H. abietis* numbers exceeded 14,000/ha at three localities. We therefore assume that we caught the majority of the local population of *H. abietis* as well as of *H. pinastri*. This is also supported by the fact that in the second half of the summer, we did not catch any beetles, although the adults of new generation, which have a flight at the autumn, should be caught [60].

Clearcutting is almost always performed in autumn or winter, and the remaining stumps are surrounded by older stands. Larvae develop on the roots of fresh pine or spruce stumps and exceptionally also on the roots of 1-year-old stumps [54]. At mid-elevations in Central Europe, stumps older than 1 year are not attractive (personal observation Holuša, Galko, Lalík) [24]. This is also the reason why the number of beetles caught was the least at the locality Mariánské Lázně (the original forest was cut in May of previous year). In Scandinavia, stumps can remain attractive for 3 years [27], which was confirmed at the Vyšné Hágy locality, which is 1216–1220 m a.s.l., where the stumps were 4 years old, and the beetle was still abundant in the cleared area (personal observation). It is clear that beetles trapped in cleared areas could have originated from the surrounding areas. To select suitable localities, *H. abietis* adults use their olfactory sensors at the base of their antennae. At longer distances, adults orientate according to attractants produced by host tree species [61,62]. On clear cuttings, they probably distinguish shape of seedlings and older trees while flying [63]. At short distances, they react to pheromones [64]; male pheromones cause adults to aggregate, and female pheromones attract males [65]. The females can crawl or fly considerable distances to locate oviposition sites [66]. *H. abietis* can fly up to 2000 m in a single event, and can fly more than 80,000 m over their entire life [67].

Over the entire experiment, we caught 4389 females and 3877 males of *H. abietis*. Based on these values, the overall female:male sex ratio was 53:47, although males were more abundant than females at some plots. [32], who used pitfall traps baited with three types of attractants (alpha-pinene, ethanol, and a combination of these two) reported an *H. abietis* sex ratio similar to that in our study; the number of females was greater than the number of males irrespective of the combination of lures.

## 5. Conclusions

Forestry managers use monitoring data of *H. abietis* to plan methods for reducing the damage on plants. In the case of critical numbers exceeded the feeding barriers or insecticides are applied. The results show that pine weevil populations can be monitored using minimally modified buckets as pitfall traps. The cost of such traps is low, and the installation is simple. A natural material, namely a pine twig (+ ethanol), was the most successful attractant, which was consistent with previous reports. The pine twig + ethanol attractant is easy to prepare and is substantially cheaper than artificial attractants. Replacement of the twig after 1 week eliminates eventual shifts in the composition of volatile compounds, and the replacement of the twig every 2 weeks may be sufficient. During the replacement of twigs and the refilling of ethanol, trapped adults are removed from the trap to avoid attracting carrion beetles. When performed by a two-member team, the replacement required about 20 min per locality. On a per ha basis, the inspection of all traps installed (i.e., 300 traps/ha) would require about 3 h. From a practical point of view, the number of traps can be reduced, because traps at the edge caught more beetles, and the distance between the traps could probably be increased to 10–20 m, i.e., trap density could probably be reduced to 50–100 traps/ha. The results also suggest that pitfall traps with pine twigs + ethanol might be used for mass trapping. Such mass trapping would be very simple and based on our results all beetles could be trapped during period of April to June. This is

especially attractive because the use of chemical insecticides is increasingly restricted in the Europe. As noted earlier, the monitoring and mass trapping of *H. abietis* is substantially cheaper with pitfall traps than with trap barks.

**Author Contributions:** Data curation, M.L., K.R. and J.H.; Formal analysis, P.S.; Methodology, M.L., J.G., A.K., C.N., S.M.; Writing—original draft, M.L., J.G. and J.H.; Writing—review and editing, M.L. and J.H.

**Funding:** This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-16-0031, APVV-18-0086 and by the Ministry of Agriculture and Rural Development of the Slovak Republic based on the item No. 08V0301. This work was also supported by the Czech University of Life Sciences Prague project No. IGA C\_01\_18 and by the grant "Advanced research supporting the forestry and wood-processing sector's adaptation to global change and the 4th industrial revolution", No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000803 financed by OP RDE.

**Acknowledgments:** The authors thank Bruce Jaffee (USA) for editorial and linguistic improvement of manuscript, and Tomáš Holík, Jan Pešl, Tomáš Fiala, Nikola Bohatá, and Jana Kubov for support with field work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Appendix A**

glm (formula = hAbietisMale ~ atraktant \* lokalita, family = "poisson")

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-10.2299	-1.1360	-0.1412	0.8858	10.0012

Coefficients:

**Table A1.** Full GLM model of tested factors, locality and attractant, and their interactions.

	Estimate	Std.	Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	2.539 × 10 <sup>0</sup>	1.147 × 10 <sup>-1</sup>	2.2134 × 10 <sup>1</sup>	< 2 × 10 <sup>-16</sup>	
atraktantB	4.400 × 10 <sup>-1</sup>	1.471 × 10 <sup>-1</sup>	2.991 × 10 <sup>0</sup>	2.778 × 10 <sup>-3</sup>	
atraktantC	-4.595 × 10 <sup>-1</sup>	1.844 × 10 <sup>-1</sup>	-2.492 × 10 <sup>0</sup>	1.2685 × 10 <sup>-2</sup>	
atraktantCon.	-2.539 × 10 <sup>0</sup>	4.241 × 10 <sup>-1</sup>	-5.987 × 10 <sup>0</sup>	2.13 × 10 <sup>-9</sup>	
atraktantD	-7.198 × 10 <sup>-1</sup>	2.005 × 10 <sup>-1</sup>	-3.591 × 10 <sup>0</sup>	3.30 × 10 <sup>-4</sup>	
atraktantPC	9.268 × 10 <sup>-1</sup>	1.355 × 10 <sup>-1</sup>	6.838 × 10 <sup>0</sup>	8.00 × 10 <sup>-12</sup>	
lokalitaVysné Hágy	-2.532 × 10 <sup>-1</sup>	1.735 × 10 <sup>-1</sup>	-1.459 × 10 <sup>0</sup>	1.44503 × 10 <sup>-1</sup>	
lokalitaKašperské hory	9.775 × 10 <sup>-1</sup>	1.346 × 10 <sup>-1</sup>	7.264 × 10 <sup>0</sup>	3.75 × 10 <sup>-13</sup>	
lokalitaKostelec n.C.I.	5.213 × 10 <sup>-1</sup>	1.448 × 10 <sup>-1</sup>	3.600 × 10 <sup>0</sup>	3.18 × 10 <sup>-4</sup>	
lokalitaLiptovská Teplička	1.035 × 10 <sup>0</sup>	1.335 × 10 <sup>-1</sup>	7.753 × 10 <sup>0</sup>	8.99 × 10 <sup>-15</sup>	
lokalitaMarianske lázne	-1.386 × 10 <sup>0</sup>	2.565 × 10 <sup>-1</sup>	-5.405 × 10 <sup>0</sup>	6.49 × 10 <sup>-8</sup>	
atraktantB:lokalitaVysné Hágy	2.616 × 10 <sup>-1</sup>	2.168 × 10 <sup>-1</sup>	1.207 × 10 <sup>0</sup>	2.27423 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantC:lokalitaVysné Hágy	5.409 × 10 <sup>-1</sup>	2.580 × 10 <sup>-1</sup>	2.096 × 10 <sup>0</sup>	3.6046 × 10 <sup>-2</sup>	
atraktantCon.:lokalitaVysné Hágy	-1.539 × 10 <sup>0</sup>	1.094 × 10 <sup>0</sup>	-1.406 × 10 <sup>0</sup>	1.59605 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantD:lokalitaVysné Hágy	-6.189 × 10 <sup>-2</sup>	3.069 × 10 <sup>-1</sup>	-2.02 × 10 <sup>-1</sup>	8.40180 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantPC:lokalitaVysné Hágy	2.161 × 10 <sup>-1</sup>	2.018 × 10 <sup>-1</sup>	1.071 × 10 <sup>0</sup>	2.84314 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantB:lokalitaKašperské hory	-5.949 × 10 <sup>-1</sup>	1.799 × 10 <sup>-1</sup>	-3.307 × 10 <sup>0</sup>	9.43 × 10 <sup>-4</sup>	
atraktantC:lokalitaKašperské hory	-9.515 × 10 <sup>-2</sup>	2.181 × 10 <sup>-1</sup>	-4.36 × 10 <sup>-1</sup>	6.62641 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantCon.:lokalitaKašperské hory	-1.302 × 10 <sup>-1</sup>	5.062 × 10 <sup>-1</sup>	-2.57 × 10 <sup>-1</sup>	7.96947 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantD:lokalitaKašperské hory	1.300 × 10 <sup>-1</sup>	2.325 × 10 <sup>-1</sup>	5.59 × 10 <sup>-1</sup>	5.75957 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantPC:lokalitaKašperské hory	-3.462 × 10 <sup>-1</sup>	1.615 × 10 <sup>-1</sup>	-2.143 × 10 <sup>0</sup>	3.2100 × 10 <sup>-2</sup>	
atraktantB:lokalitaKostelec n.C.I.	-3.867 × 10 <sup>-1</sup>	1.920 × 10 <sup>-1</sup>	-2.014 × 10 <sup>0</sup>	4.3966 × 10 <sup>-2</sup>	
atraktantC:lokalitaKostelec n.C.I.	2.709 × 10 <sup>-1</sup>	2.264 × 10 <sup>-1</sup>	1.197 × 10 <sup>0</sup>	2.31322 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantCon.:lokalitaKostelec n.C.I.	-1.582 × 10 <sup>1</sup>	5.208 × 10 <sup>2</sup>	-3.0 × 10 <sup>-2</sup>	9.75762 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantD:lokalitaKostelec n.C.I.	2.667 × 10 <sup>-2</sup>	2.522 × 10 <sup>-1</sup>	1.06 × 10 <sup>-1</sup>	9.15798 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantPC:lokalitaKostelec n.C.I.	-6.026 × 10 <sup>-1</sup>	1.784 × 10 <sup>-1</sup>	-3.378 × 10 <sup>0</sup>	7.30 × 10 <sup>-4</sup>	
atraktantB:lokalitaLiptovská Teplička	-3.988 × 10 <sup>-1</sup>	1.755 × 10 <sup>-1</sup>	-2.273 × 10 <sup>0</sup>	2.3056 × 10 <sup>-2</sup>	
atraktantC:lokalitaLiptovská Teplička	-1.078 × 10 <sup>0</sup>	2.458 × 10 <sup>-1</sup>	-4.385 × 10 <sup>0</sup>	1.16 × 10 <sup>-5</sup>	
atraktantCon.:lokalitaLiptovská Teplička	-7.476 × 10 <sup>-1</sup>	5.563 × 10 <sup>-1</sup>	-1.344 × 10 <sup>0</sup>	1.79030 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantD:lokalitaLiptovská Teplička	-5.353 × 10 <sup>-1</sup>	2.475 × 10 <sup>-1</sup>	-2.163 × 10 <sup>0</sup>	3.0552 × 10 <sup>-2</sup>	
atraktantPC:lokalitaLiptovská Teplička	1.965 × 10 <sup>-1</sup>	1.567 × 10 <sup>-1</sup>	1.254 × 10 <sup>0</sup>	2.09960 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantB:lokalitaMarianske lázne	8.855 × 10 <sup>-2</sup>	3.336 × 10 <sup>-1</sup>	-2.65 × 10 <sup>-1</sup>	7.90676 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantC:lokalitaMarianske lázne	-9.352 × 10 <sup>-15</sup>	4.123 × 10 <sup>-1</sup>	0 × 10 <sup>0</sup>	1.000000 × 10 <sup>0</sup>	
atraktantCon.:lokalitaMarianske lázne	2.877 × 10 <sup>-1</sup>	8.558 × 10 <sup>-1</sup>	3.36 × 10 <sup>-1</sup>	7.36764 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantD:lokalitaMarianske lázne	5.480 × 10 <sup>-1</sup>	3.941 × 10 <sup>-1</sup>	1.390 × 10 <sup>0</sup>	1.64403 × 10 <sup>-1</sup>	
atraktantPC:lokalitaMarianske lázne	2.877 × 10 <sup>-1</sup>	2.943 × 10 <sup>-1</sup>	9.77 × 10 <sup>-1</sup>	3.28344 × 10 <sup>-1</sup>	

Table A2. Significant factors and their interaction.

(Intercept)	***
atraktantB	**
atraktantC	*
atraktantCon.	***
atraktantD	***
atraktantPC	***
lokalitaVyšné Hágy	-
lokalitaKašperské hory	***
lokalitaKostelec n. C.I.	***
lokalitaLiptovská Teplička	***
lokalitaMarianske lázne	***
atraktantB:lokalitaVyšné Hágy	-
atraktantC:lokalitaVyšné Hágy	*
atraktantCon.:lokalita Vyšné Hágy	-
atraktantD:lokalitaVyšné Hágy	-
atraktantPC:lokalitaVyšné Hágy	-
atraktantB:lokalitaKašperské hory	***
atraktantC:lokalitaKašperské hory	-
atraktantCon.:lokalitaKašperské hory	-
atraktantD:lokalitaKašperské hory	-
atraktantPC:lokalitaKašperské hory	*
atraktantB:lokalitaKostelec n. C.I.	*
atraktantC:lokalitaKostelec n. C.I.	-
atraktantCon.:lokalitaKostelec n. C.I.	-
atraktantD:lokalitaKostelec n. C.I.	-
atraktantPC:lokalitaKostelec n. C.I.	***
atraktantB:lokalitaLiptovská Teplička	*
atraktantC:lokalitaLiptovská Teplička	***
atraktantCon.:lokalitaLiptovská Teplička	-
atraktantD:lokalitaLiptovská Teplička	*
atraktantPC:lokalitaLiptovská Teplička	-
atraktantB:lokalitaMarianske lázne	-
atraktantC:lokalitaMarianske lázne	-
atraktantCon.:lokalitaMarianske lázne	-
atraktantD:lokalitaMarianske lázne	-
atraktantPC:lokalitaMarianske lázne	-

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' .

(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)

Null deviance: 4695.37 on 215 degrees of freedom

Residual deviance: 734.05 on 180 degrees of freedom

AIC: 1638.40

Number of Fisher Scoring iterations: 13

## References

1. Escherich, K. *Die Forstinsekten Mitteleuropas*, 2nd ed.; Paul Parey: Berlin, Germany, 1923; p. 663.
2. Day, K.R.; Leather, S.R. Threats to forestry by insect pests in Europe. In *Forests and Insects*; Watt, A.D., Stork, N.E., Hunter, M.D., Eds.; Chapman & Hall: London, UK, 1997; pp. 177–205.
3. Långström, B.; Day, K.R. Damage, control and management of weevil pests, especially *Hyllobius abietis*. In *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe: A Synthesis*; Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.-C., Evans, H.F., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2004; pp. 415–444.
4. Eidmann, H.H. *Hyllobius Schön.* In *Die Forstschädlinge Europas*, 2nd ed.; Schwenke, W.K., Ed.; Paul Parey: Hamburg/Berlin, Germany, 1974; pp. 275–293.
5. Lindström, A.; Hellqvist, C.; Gylberg, B.; Långström, B.; Mattsson, A. Field performance of a protective collar against damage by *Hyllobius abietis*. *Scand. J. For. Res.* **1986**, *1*, 3–15. [CrossRef]



6. Eidmann, H.H.; von Sydow, F. Stockings for protection of containerised seedlings against pine weevil (*Hylobius abietis* L.) damage. *Scand. J. For. Res.* **1989**, *4*, 537–547. [CrossRef]
7. Hagner, M.; Jonsson, C. Survival after planting without soil preparation for pine and spruce seedlings protected from *Hylobius abietis* by physical and chemical shelters. *Scand. J. For. Res.* **1995**, *10*, 225–234. [CrossRef]
8. Eidmann, H.H.; Nordenhem, H.; Weslien, J. Physical protection of conifer seedlings against pine weevil feeding. *Scand. J. For. Res.* **1996**, *11*, 68–75. [CrossRef]
9. Zumr, V.; Sary, P. LATEX paint as an antifeedent against *Hylobius abietis* (L.) (Col., Curculionidae) on conifer seedlings. *Anz. Schäd. Pflanzenschutz Umweltschutz* **1995**, *21*, 42–43. [CrossRef]
10. Nordlander, G.; Nordenhem, H.; Hellqvist, C. A flexible sand coating (Conniflex) for the protection of conifer seedlings against damage by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Agric. For. Entomol.* **2009**, *11*, 91–100. [CrossRef]
11. Kvaee.no. Available online: <http://kvaee.no/what/> (accessed on 15 May 2019).
12. Harte, J.; Holdren, C.; Schneider, R.; Shirley, C. *Toxics A to Z, a Guide to Everyday Pollution Hazards*; University of California: Oxford, UK, 1991; p. 478. ISBN 9780520072244.
13. Rattner, B.A. History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* **2007**, *18*, 773–783. [CrossRef]
14. Bradberry, S.M.; Cage, S.A.; Proudfoot, A.T.; Vale, J.A. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol. Rev.* **2005**, *24*, 93–106. [CrossRef]
15. Pszczolkowski, M.A.; Dobrowolski, M. Circadian dynamics of locomotor activity and deltamethrin susceptibility in the pine Weevil *Hylobius abietis*. *Phytoparasitica* **1999**, *27*, 19–25. [CrossRef]
16. Dobrowolski, M. The susceptibility of the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) to insecticides and the role of the oxidative metabolism in the developing of the pest resistance to DDT and pyrethroids. *Folia For. Polon.* **2000**, *42*, 83–94.
17. Lempérière, G.; Julien, J. Protection against the pine weevil-Efficiency of a carbosulfan-based systemic insecticide. *Rev. For. Fr.* **2003**, *55*, 129–140. [CrossRef]
18. Rose, D.; Matthews, G.A.; Leather, S.R. Sub-lethal responses of the large pine weevil, *Hylobius abietis*, to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Physiol. Entomol.* **2006**, *31*, 316–327. [CrossRef]
19. Glovacka, B.; Lech, A.; Wilczynski, W. Application of deltamethrin for spraying or dipping to protect Scots pine seedlings against *Hylobius abietis* L. and logs against *Tomicus piniperda* L. *Ann. Sci. For.* **1991**, *48*, 113–117. [CrossRef]
20. Torstensson, L.; Börjesson, E.; Arvidsson, B. Treatment of bare root spruce seedlings with permethrin against pine weevil before lifting. *Scand. J. For. Res.* **1999**, *14*, 408–415. [CrossRef]
21. Rose, D.; Matthews, G.A.; Leather, S.R. Recognition and avoidance of insecticide-treated Scots Pine (*Pinus sylvestris*) by *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): Implications for pest management strategies. *Agric. For. Entomol.* **2005**, *7*, 187–191. [CrossRef]
22. Ratzeburg, J.T.C. *Die Forst-Insekten. Erster Teil—Die Käfer*; 2 Auflage; Nicolai'sche Buchhandlung: Berlin, Germany, 1839; p. 247.
23. Pfeffer, A.; Horák, E.; Kudela, M.; Muller, J.; Novakova, E.; Stolina, M. *Ochrana Lesů; Státní Zemědělské Nakladatelství: Praha, Czech Republic, 1961*; p. 838.
24. Modlinger, R.; Knížek, M. Klikoroh borový *Hylobius abietis* (L.). *Lesnická Pr.* **2009**, *88*, 1–4.
25. Galko, J.; Gubka, A.; Vakula, J. Praktické Skúsenosti s Využitím Lapacích Kôr na Zníženie Škôd Spôsobených Tvrdoňom Smrekovým na Mladých Výsadbách Ihličnatých Drevín. In *Aktuálne Problémy v Ochrane Lesa*; Kunca, A., Nový Smokovec, S., Kunca, A., Eds.; Národné Lesnícke Centrum: Zvolen, Slovakia, 2012; pp. 60–64.
26. Galko, J.; Vakula, J.; Kunca, A.; Rell, S.; Gubka, A. *Ochrana Lesa; Ochrana lesa proti tvrdoňom a lykokazom na sadeniach; Úrad pre Normalizáciu, Meteorologiu a Skúšobníctvo: Bratislava, Slovakia, STN 48 2714; 2016*; p. 8.
27. Nordenhem, H. Age, sexual development, and seasonal occurrence of the pine weevil *Hylobius abietis*. *J. Appl. Entomol.* **1989**, *108*, 260–270. [CrossRef]
28. Skłodowski, J.J.W.; Gadziński, J. Effectiveness of beetle catches in two types of traps for *Hylobius abietis* L. *Sylvan* **2001**, *6*, 55–63.
29. Moreira, X.; Costas, R.; Sampedro, L.; Zas, R. A simple method for trapping *Hylobius abietis* (L.) alive in northern Spain. *For. Syst.* **2008**, *17*, 188–192. [CrossRef]

30. Kuźmiński, R.; Bilon, A. Evaluation of effectiveness of selected types of traps used in capturing of large pine weevil—*Hylobius abietis* (L.). *Acta Sci. Pol.—Silv. Colendarum R. Ind. Lig.* **2009**, *8*, 19–26.
31. Zumr, V.; Stary, P.P. Field experiments with different attractants in baited pitfall traps for *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). *J. Appl. Entomol.* **1992**, *113*, 451–455. [[CrossRef](#)]
32. Tilles, D.A.; Sjödin, K.; Nordlander, G.; Eidmen, H.H. Synergism between ethanol and conifer host volatiles as attractants for the pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* **1986**, *79*, 970–973. [[CrossRef](#)]
33. Nordlander, G. A method for trapping *hylobius abietis* (L.) with a standardized bait and its potential for forecasting seedling damage. *Scand. J. For. Res.* **1987**, *2*, 199–213. [[CrossRef](#)]
34. Erbilgin, N.; Szele, A.; Klepzig, K.D.; Raffa, K.F. Trap Type, Chirality of  $\alpha$ -Pinene, and Geographic Region Affect Sampling Efficiency of Root and Lower Stem Insects in Pine. *J. Econ. Entomol.* **2001**, *94*, 1113–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Nordlander, G. Limonene inhibit attraction to Alpha-pinene in the pine weevils *Hylobius abietis* and *H. pinastri*. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 1307–1320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Olenici, N.; Duduman, M.L.; Teodosiu, M.; Olenici, V. Efficacy of artificial traps to prevent the damage of conifer seedlings by large pine weevil (*Hylobius abietis* L.)—A preliminary study. *Bull. Transilv. Univ. Bras.* **2016**, *9*, 9–20.
37. Stocki, J.S. *The Use of Pheromones and Pheromone Traps in Forest Protection in Poland in the Years 1980–1997*; Practice oriented results on the use and production of Neem ingredients and pheromones VIII; Kleeberg, H., Zebitz, C.P.W., Eds.; Druck & Graphics: Giessen, Germany, 2000; pp. 128–133.
38. Skrzecz, I. Non-target insects in the pine weevil (*Hylobius abietis* L.) traps with Hylodor dispenser. *Folia For. Polon. Ser. A For.* **2003**, *35*, 27–35.
39. Voolma, K.; Siida, I.; Sibul, I. Forest insects attracted to ground traps baited with turpentine and ethanol on clear-cuttings. *Nor. J. Entomol.* **2001**, *48*, 103–110.
40. Wheeler, C.P.; Bell, J.R.; Cook, P.A. *Practical Field Ecology: A Project Guide*; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, 2011; p. 388.
41. Örlander, G.; Nilsson, U.; Nordlander, G. Pine weevil abundance on clear-cuttings of different ages: A 6-year study using pitfall traps. *Scand. J. For. Res.* **1997**, *12*, 225–240. [[CrossRef](#)]
42. Saalas, U. *Suomen Metsähyönteiset*; Finnish Forest Insects; Wsoy: Porvoo, Finland, 1949; p. 719.
43. Ozols, G. *Prides un Egles Dedrofagienu Kukaiņu Latvijās Mežos*; (Dendrophagus insects of pine and spruce in Latvian forests); Zinātne: Rīga, Latvia, 1985; p. 208.
44. Ehnström, B.; Axelsson, R. *Insekts Gnag I Bark Och Ved*; SLU: Uppsala, Sweden, 2002.
45. Långström, B. Abundance and seasonal activity of adult *Hylobius*-weevils in reforestation areas during the first years following final felling. *Commun. Lnst. For. Fenn.* **1982**, *106*, 1–23.
46. Maavara, V.; Merihein, A.; Parmas, H.; Parmasto, E. *Metsakaitse*; Valgus: Tallinn, Estonia, 1961; p. 733.
47. Luik, A.; Voolma, K. Some aspects of the occurrence, biology and cold-hardiness of *Hylobius* weevils. In *Insects Affecting Reforestation: Biology and Damage*; Alfaro, R.I., Glover, S.G., Eds.; Pacific and Yukon Region, Forestry Canada: Victoria, BC, Canada, 1989; pp. 28–33.
48. Viiri, H.; Miettinen, O. Feeding preferences of *Hylobius pinastri* Gyll. *Balt. For.* **2013**, *19*, 161–164.
49. Leather, S.R.; Ahmed, S.J.; Hogan, L. Adult feeding preferences of the pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *Eur. J. Entomol.* **1994**, *91*, 385–389.
50. Varkonda, Š.; Florian, Š. *Odparník na regulované uvoľňovanie prchavých látok*; (Evaporator for controlled release of volatile substances) Utility model, SK 4570 U; Úrad Priemyselného Vlastníctva: Bratislava, Slovakia, 2006; p. 3.
51. Galko, J.; Kunca, A.; Ondruš, M.; Špilda, I.; Rell, S. Zhodnotenie a porovnanie nákladov na rôznu formu ošetrovania ihličnatých sadenic proti tvrdoňovi smrekovému. In *Aktuálne Problémy v Ochrane Lesa*; Kunca, A., Nový Smokovec, S., Kunca, A., Eds.; Národné Lesnícke Centrum: Zvolen, Slovakia, 2015; pp. 101–105.
52. Thorin, J.; Nömmik, H. Monoterpene composition of cortical oleoresin from different clones of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1879–1881. [[CrossRef](#)]
53. Yazdani, R.; Nilsson, J.E. Cortical monoterpene variation in natural populations of *Pinus sylvestris* in Sweden. *Scand. J. For. Res.* **1986**, *1*, 85–93. [[CrossRef](#)]
54. Nordlander, G. Host finding in the pine weevil *Hylobius abietis*: Effects of conifer volatiles and added limonene. *Entomol. Exp. Appl.* **1991**, *59*, 229–237. [[CrossRef](#)]

55. Squillace, A.E. Analyses of monoterpenes of conifers by gas-liquid chromatography. In *Modern Methods in Forest Genetics*; Miksche, J.P., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 1976; pp. 139–157.
56. Voolma, K.; Sibul, I. The effect of collecting fluid on the catch results of *Hylobius abietis* in pitfall traps. *Agron. Res.* **2006**, *4*, 457–460.
57. Saintonge, F.X.; Malphettes, C.B. Un piège pour surveiller les populations d'hylobes (*Hylobius abietis* L.) (Coleop.: Curc.)? *Etudes de Cemagref. Sér. For.* **1991**, *6*, 138–155.
58. Charitonova, N.Z. *Bolšoj Sosnovyj Dolgonosik I Borba s Nim*; 1. Vyd; Lesnaja Promyšlennost Progress: Moskva, Russia, 1965; p. 88. ISBN 934-0-41-595-768-24.
59. Nordlander, G.; Örländer, G.; Langvall, O. Feeding by the pine weevil *Hylobius abietis* in relation to sun exposure and distance to forest edges. *Agric. For. Entomol.* **2003**, *5*, 191–198. [[CrossRef](#)]
60. Bejer-Petersen, B.; Juutinen, P.; Kangas, E.; Bakke, A.; Butovitsch, V.; Eidmann, H.; Heqvist, K.J.; Lekander, B. Studies on *Hylobius abietis* L. I. Development and life cycles in the Nordic countries. *Acta Entomol. Fenn.* **1962**, *17*, 1–107.
61. Selander, J.; Kalo, P.; Kangas, E.; Pertunnen, V. Olfactory behavior of *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). I. Response to several terpenoid fractions isolated from Scots pine phloem. *Ann. Entomol. Fenn.* **1974**, *39*, 40–45.
62. Nordenham, H.; Eidmann, H.H. Response of the pine weevil *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae) to host volatiles in different phases of its adult life cycle. *J. Appl. Entomol.* **1991**, *112*, 353–358. [[CrossRef](#)]
63. Björklund, N.; Nordlander, G.; Bylund, H. Olfactory and visual stimuli used in orientation to conifer seedlings by the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Physiol. Entomol.* **2005**, *30*, 225–231. [[CrossRef](#)]
64. Tilles, D.A.; Eidmann, H.H.; Solbreck, B. Mating stimulant of the pine weevil *Hylobius abietis* (L.). *J. Chem. Ecol.* **1988**, *14*, 1495–1503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Selander, J. Evidence of pheromone-mediated behaviour in the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae). *Ann. Ent. Fenn.* **1978**, *44*, 105–112.
66. Mráček, Z.; Šrůtka, P. Stav znalostí a možnostech obrany proti klikorhu borovému (*Hylobius abietis* L.) v zemích Evropy. *Zprávy Lesnického Výzk.* **1984**, *29*, 21–25.
67. Solbreck, C.; Gyldberg, B. Temporal flight pattern of the large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera, Curculionidae), with special reference to the influence of weather. *Z. Angew. Entomol.* **1979**, *88*, 532–536. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



### 9.3. Príloha č.3: Hypocrealean fungi associated with *Hylobius abietis* in Slovakia, their virulence against weevil adults and effect on feeding damage in laboratory



forests



Article

## Hypocrealean Fungi Associated with *Hylobius abietis* in Slovakia, Their Virulence against Weevil Adults and Effect on Feeding Damage in Laboratory

Marek Barta <sup>1,\*</sup>, Michal Lalík <sup>2,3</sup>, Slavomír Rell <sup>2</sup>, Andrej Kunca <sup>2</sup>, Miriam Kádasi Horáková <sup>1</sup>, Silvia Mudrončeková <sup>4</sup> and Juraj Galko <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Forest Ecology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, 949 01 Nitra, Slovak Republic

<sup>2</sup> National Forest Centre, Forest Research Institute Zvolen, T.G. Masaryka 22, 960 01 Zvolen, Slovak Republic

<sup>3</sup> Department of Forest Protection and Entomology, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 1176, 165 00 Prague 6, Czech Republic

<sup>4</sup> Research Station of State Forests of TANAP, 059 60 Tatranská Lomnica, Slovak Republic

\* Correspondence: marek.barta@savba.sk; Tel.: +421-376-943-354

Received: 4 July 2019; Accepted: 25 July 2019; Published: 27 July 2019



**Abstract:** In temperate regions of Europe, the large pine weevil, *Hylobius abietis*, is a major pest of coniferous forests mostly at sites where clear-felling is followed by planting of saplings. Control measures against this pest are based on silvicultural techniques, an application of physical barriers on stems of saplings and insecticide treatments. To avoid the use of insecticides, alternative measures such as biological control have been investigated. The goal of the present study was to obtain local strains of entomopathogenic fungi (Ascomycota, Hypocreales) from natural populations of *H. abietis*, and to investigate their efficacy against the weevil. A survey on entomopathogenic fungi was undertaken at clear-felled areas of spruce forests in northern Slovakia. Two *Beauveria* species, *B. bassiana* and *B. pseudobassiana*, were identified, and 22 in vitro strains were obtained. Mean prevalence of infected adults was low ( $2.10\% \pm 0.67\%$ ) and the mycosis was mostly recorded during May and June. Virulence of *Beauveria* strains against the weevil was tested in laboratory. *B. bassiana* strain AMEP20 was significantly most virulent ( $LC_{50}$  of  $0.65 \pm 0.10 \times 10^8$  conidia  $mL^{-1}$ ). Treatment with conidia of AMEP20 strain affected feeding damage by the weevil on bark of Scots pine twigs. Daily bark consumption by *B. bassiana*-treated weevils was lower than by untreated individuals and decreased with increasing conidia concentration used for the treatment. In the outdoor experiment, AMEP20 strain killed weevils that fed on spruce saplings treated with conidia suspensions. Mortality due to mycosis on weevils exposed to the conidia-treated saplings reached 30.0%–76.5% and 55.0%–88.2% after 32 and 46 days, respectively.

**Keywords:** biocontrol; entomopathogenic fungi; *Hylobius abietis*; Hypocreales; virulence

### 1. Introduction

The large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Curculionidae: Molytinae), is regarded as one of the most damaging pests of newly planted or naturally regenerating coniferous forests across Northern and Western Europe [1,2]. This Palearctic species is naturally distributed from the north-west of Europe to Siberia [3]. Larvae develop inside cambial tissues of underground parts of stumps of felled coniferous trees, and adults feed on bark of young saplings. Adult weevils may cause considerable economic loss by damaging the bark, what often leads to sapling mortality, or reduced growth with stem deformations. In some cases, a complete destruction of new plantations occurs, especially where clear-felling is immediately followed by planting of coniferous saplings [1,2,4–6]. A single weevil can damage several saplings [7]. Thus, a relatively low number of adults can have a significant impact on regeneration of

reforestation areas. Moreover, weevils can migrate more than 10 km and can therefore cause damage over a broad area [8]. In laboratory assays, a polyphagous habit of adults was demonstrated, although coniferous species were always preferred [9]. While a range of coniferous host tree species is wide [10], Scots pine (*Pinus sylvestris* (L.)) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst) are the main hosts [11].

Thousands of hectares of reforestation sites are annually threatened by *H. abietis* in Europe [12]. If the sites are left unprotected, economic losses to the forest industry can be severe. In Slovakia, *H. abietis* population density has been considerably increasing since 2010 and spruce saplings in reforestation areas have been significantly damaged [13–15]. Control measures against *H. abietis* are mostly based on a range of silvicultural techniques (e.g., removal of breeding material after felling, delayed planting, shelter-wood planting system, mixed planting, and timing of felling), and an application of physical barriers on stems of saplings before or at planting (e.g., latex paint, PVC (polyvinyl chloride) barriers, sand (Conniflex) and glue based stem coating, and wax coating) [2,16–25]. The curative insecticide application is usually not efficient due to a sheltered lifecycle of larval stage [26]. Therefore, the preventive use of insecticides on saplings before planting is the main control measure currently employed in most countries, which practice reforestation [2,27]. Because weevils are able to detect some insecticides (pyrethroids and nicotinoids) and to avoid treated saplings, insecticide treatments protect young saplings, but have little impact on local populations of the pest [18,26].

Although the pesticide use in forestry is small compared to agriculture and horticulture (on average 0.10%–1.10% of total volume used in Slovakia during 2000–2015 [28]), its minimization and reducing the risk of damage to the environment is an important task of an integrated approach for managing forest pests. To avoid the use of insecticides, alternative measures such as biological control and their suitability for the *H. abietis* control have been investigated. Several natural antagonists of pine weevils, including entomopathogenic nematodes, fungi and microsporidia, have been studied as potential biocontrol agents [29–35]. Over the last two decades, more attention was put to nematodes (families Steinernematidae and Heterorhabditidae) for inundative biocontrol targeted against pine weevil larvae, pupae, and callow adults [29,30,32,34]. Although nematodes can reduce numbers of emerging *H. abietis* adults, there is an increasing interest to apply entomopathogenic fungi (Ascomycota, Hypocreales) against larvae and pupae, since they possess several properties, which make them more suitable for weevil control. They infect all developmental stages, have a better shelf-life of inoculum, have a longer persistence in the field with a potential to be augmented by mycosed individuals, and finally a fungal inoculum application is technically less complicated than in the case of nematodes [36].

Entomopathogenic fungi (EPF) are natural antagonists of arthropods helping in control of host population and prevention of outbreaks formation [37]. There has been an extensive research on the use of fungal entomopathogens as perspective biocontrol agents of insect pests in agriculture and forestry [38], and some strains have been successfully licensed and commercialised [39,40]. These fungi are considered to be environmentally safe [41], can be mass-produced [42], and show a considerable potential to control various forest insect pests [43]. In Europe, several reports have focused on the occurrence of EPF in *H. abietis* populations, and species of *Beauveria* and *Metarhizium* genera have been reported from larvae and adults. Generally, the fungi are associated with *H. abietis* populations at a relatively low, though a constant prevalence level [32,35,44,45]. Results of earlier and recent attempts to use EPF against *H. abietis* in laboratory were either inconsistent or not very promising [32,36,46–50]. In spite of that, the fungi are believed to have a potential to be successfully implemented into an integrated system managing the problem of pine weevil damage. Feasibility and sustainability of their use as control agents of *H. abietis* in the field depend on the choice of fungal strains, inoculum formulations, and application techniques.

The present study aims to identify entomopathogenic fungi in natural populations of *H. abietis* in Slovakia, to obtain local strains of the fungi and to investigate their virulence against the weevil in laboratory and semi-field bioassays with testing their effect on feeding damage.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Collecting and Handling of Weevils

Pitfall traps [4,5,51,52] baited with 96% ethanol and 50 mm long pieces of Scots pine twigs were used for trapping *H. abietis* adults at several clear-felled areas of spruce forests in northern Slovakia. Most of trappings were conducted at the High Tatra Mountains in the Tatra National Park (49°10'0" N, 20°08'0" E) and at the Low Tatra Mountains (48°57'0" N, 19°30'0" E) during 2015–2018, where generally high damage by the weevils had been determined during our earlier investigations. During 2015–2017 the trapping was neither extensive nor systematic and traps were installed and checked irregularly. In 2018, the traps in the Tatra National Park were checked regularly once a week from the end of April to September to determine the prevalence of fungal infection in pest population. All trapped weevils were placed into rectangular plastic boxes (250 × 150 × 150 mm) in groups of 50 individuals per box and incubated (20 °C and 80% relative humidity (RH)) for 21 days to observe a natural prevalence of entomopathogenic fungi. Each dead weevil displaying typical macroscopic symptoms of fungal infection was placed in a 1.5 mL microtube and stored at 5 °C until used for obtaining fungal cultures. Dead adults displaying no external symptoms were incubated individually in Petri dishes (60 × 15 mm) on a piece of wet filter paper at 25 °C for 72 h to stimulate fungal growth. All cadavers with characteristic symptoms of mycosis were examined under a dissecting microscope (40×) to detect possible contaminants or death caused by other factors. Fungal cultures were obtained from the individuals with confirmed fungal infection.

For virulence bioassays, collected weevils were separated according to sex and kept in plastic boxes (150 × 10 × 80 mm) at 5–7 °C for a maximum of two months prior to their use. The weevils were provided with fresh food (Scots pine twigs) and kept at 20 °C and 60 ± 10% RH 48 h before the experiments.

For bioassays with a measurement of feeding damage, the weevils separated to males and females starved at 20 °C and 60 ± 10% RH for 48 h before the experiment to ensure the consistency in feeding damage between replicates.

### 2.2. In Vitro Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi

In vitro isolates of EPF were obtained from infected weevils using a selective culture medium (Sabouraud-dextrose agar (SDA) supplemented with 600 mg·L<sup>-1</sup> streptomycin sulphate, 50 mg·L<sup>-1</sup> tetracycline hydrochloride, 250 mg·L<sup>-1</sup> cyclohexamide, and 500 mg·L<sup>-1</sup> dodine (all chemicals from Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MI, USA)). Isolated colonies were sub-cultured on SDA without antibiotics and fungicides in culture glass tubes at 25 ± 1 °C in the dark for 10 days and sporulating cultures were stored at 5 °C. All obtained isolates were deposited in the fungal collection of the Institute of Forest Ecology of the Slovak Academy of Sciences (Nitra, Slovakia).

The in vitro cultures were microscopically (500×) identified to a genus level according to morphology of microstructures [53–55]. The morphological identification was supplemented by a sequencing study of internal transcribed region (ITS) of rDNA and a partial sequence of TEF1- $\alpha$  gene. DNA of fungi was isolated using EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Kit (Bio Basic Canada Inc., Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions. The ITS region was amplified with a primer pair ITS1-F/ITS4 [56,57] and the TEF-1 $\alpha$  gene with primers 983F and 2218R [54]. PCR products were purified by QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen n.v., Venlo, Netherlands) and sequenced using the primers ITS4 or 983F (Macrogen Europe Inc., Amsterdam, The Netherlands). Obtained sequences were subjected to Blast N [58] against GenBank Nucleotide Database for taxonomic classification. All sequences obtained from this study were deposited in GenBank (Table 1).

### 2.3. Fungal Strains

Fungal strains obtained from naturally killed *H. abietis* (Table 1) were cultivated on Sabouraud-dextrose agar (SDA) in polystyrene Petri dishes (94 × 16 mm) at 25 ± 1 °C in the dark for 5 days and

under the continuous light for the next 5 days. The 10-day-old sporulating cultures were stored at 4 °C prior to their use in bioassays, but not longer than two weeks. A percentage of viable conidia was determined prior to each bioassay by germination tests on agar plates [59]. Conidial viability of all isolates used for tests was >95% ( $\bar{x} = 96.63 \pm 0.20\%$ ) measured after 12 h incubation on an agar plate at 25 °C.

**Table 1.** List of *Beauveria* strains isolated from naturally infected adults of *Hyllobius abietis* in Slovakia during 2015–2018.

Strain	Fungal Species	GenBank Accession No. <sup>1</sup>	
		ITS	TEF-1 $\alpha$
AMEP020	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490859	MK504338
AMEP043	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	MK490860	MK504354
AMEP052	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490861	MK504339
AMEP053	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490862	MK504340
AMEP056	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490863	MK504341
AMEP067	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	MK490864	MK504355
AMEP072	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490865	MK504342
NREP083	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	MK490866	MK504356
NREP084	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	MK490867	MK504357
NREP087	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490868	MK504343
NREP088	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490869	MK504344
NREP090	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490870	MK504345
NREP091	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490871	MK504346
NREP094	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490872	MK504347
NREP095	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490873	MK504348
NREP096	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490874	MK504349
NREP097	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490875	MK504350
NREP098	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490876	MK504351
NREP099	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	MK490877	MK504358
NREP100	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490878	MK504352
NREP102	<i>Beauveria bassiana</i>	MK490879	MK504353
NREP103	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	MK490880	MK504359

<sup>1</sup> GenBank Accession numbers of DNA sequences for ITS and TEF-1 $\alpha$  regions submitted to GenBank database.

#### 2.4. Virulence Bioassays against *H. abietis* Adults

A stock suspension of conidia was prepared by suspending a mycelial mat in 250 mL of 0.01% (w/v) Tween<sup>®</sup>80 inside a 500 mL reagent flask. The flask was hand-shaken for 60 s and mycelial debris were removed from the suspension by filtration through a sterile 10  $\mu$ m nylon membrane (Spectra Mesh<sup>®</sup>, Spectrum Chemical Mfg. Corp., New Brunswick, NJ, USA). Concentration of conidia was determined using an improved Neubauer hemocytometer, and the required concentration of the stock suspension was obtained by dilution in 0.01% (w/v) Tween<sup>®</sup>80. The conidia suspensions were used immediately for virulence bioassays. A median lethal concentration of conidia (LC<sub>50</sub>) for *H. abietis* was estimated from cumulative mortality data at four different conidia concentrations ranging from  $1 \times 10^6$  to  $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup> in 0.01% (w/v) Tween<sup>®</sup>80. Groups of 15 males and females were treated by their submersion in the suspensions for 10 s, and additional 15 males and females were treated with sterile 0.01% Tween<sup>®</sup>80 as controls. Each group of treated and control weevils was incubated in Petri dishes (200  $\times$  35 mm) lined with wet filter paper at  $22 \pm 1$  °C, saturated humidity and 12/12 h (L/D) photoperiod for 21 days. Five sections of Scots pine twigs (100–150 mm) were provided as food to each Petri dish. The pine twigs were superficially disinfected by germicidal (UV-C) irradiation for 30 min under aseptic conditions of a laminar flow cabinet before their use as food. The weevils were monitored at 24 h intervals to record their daily mortality. All cadavers were incubated separately in sterile Petri dishes (60  $\times$  15 mm) on a piece of wet filter paper for 5 days to facilitate fungal development. Mortality caused by the fungi was confirmed by microscopic examination and only cadavers with confirmed



infection were used to estimate virulence. Three most virulent *Beauveria* strains were selected and used to repeat the bioassay under the same conditions five times.

### 2.5. Feeding Damage Bioassay

The most virulent *B. bassiana* strain (AMEP20) was used in a laboratory bioassay to measure an effect of the fungal treatment on feeding damage by the weevils. Adults (15 males and 15 females) were individually inoculated by conidia suspensions at four concentration levels (from  $1 \times 10^5$  to  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) as described above, and additional groups of 15 males and 15 females were treated with sterile 0.01% (w/v) Tween<sup>®</sup>80 as controls. The inoculated and control weevils were incubated individually in Petri dishes (200 × 35 mm) with wet filter paper on the bottom at  $22 \pm 2$  °C and natural photoperiod. A freshly cut twig of Scots pine (approximately 100-mm-long and 7-mm-thick) was put into each Petri dish. The weevils were monitored for 46 days. Mortality was recorded and pine twigs were replaced by fresh ones on the day 11, 22 and 33. The amount of feeding damage on the twigs was assessed with a modified method by Leather et al. [60]. A damage outline on the twigs was traced onto a piece of transparent graph paper twisted around the surface of twigs with a black pen. The number of millimetre squares occluded by the trace pattern was counted, and the damaged area was calculated for each twig. Dead weevils were processed as described in the virulence bioassay. The experiment was carried out in three repetitions.

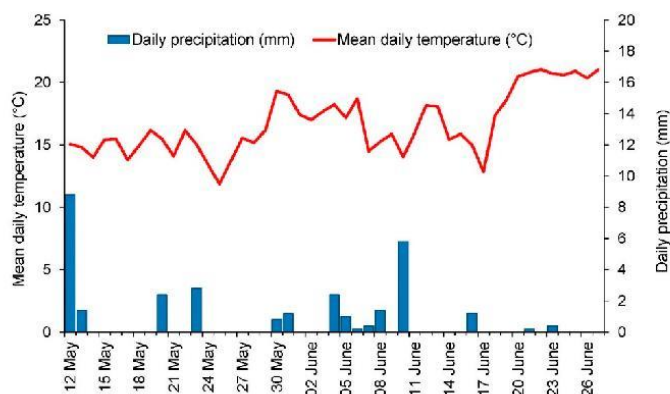
### 2.6. Outdoor Bioassay with *B. bassiana* Treatment

To simulate field conditions, an outdoor trial was set-up to evaluate the effect of *B. bassiana*-treatment on *H. abietis* adults. Two-year-old Norway spruce (*Picea abies*) saplings (25–30 cm high) were planted in pots (10 cm diam., 470 mL) and equally spaced in outdoor conditions. A group of 147 saplings was treated with conidia suspension ( $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) of AMEP20 strain using a hand atomizer. Each sapling was treated with 0.95 mL of the suspension. A group of 21 saplings was treated in the same way with sterile 0.01% (w/v) Tween<sup>®</sup>80 as controls. Another group of 21 saplings was also treated with sterile 0.01% (w/v) Tween<sup>®</sup>80 as mentioned above. This group was used for a direct treatment trial. Every treated plant was inserted into a sleeve made of white polyamide mesh (aperture of 0.5 mm) to prevent *H. abietis* adults from escaping. A single unsexed adult of *H. abietis* was released to each of 21 control saplings and 21 suspension-treated saplings on the day of treatment (day 0). During the following six days (days 1–6), further groups of 21 suspension-treated saplings were infested with *H. abietis* adults every day. Together, 147 suspension-treated and 21 control saplings were infested with a single *H. abietis*. The group of 21 Tween<sup>®</sup>80-treated saplings were infested on the day 0 with a single *H. abietis*, which had been inoculated with conidia suspensions ( $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) as described in the virulence bioassay (a direct treatment). Mortality of *H. abietis* was checked twice during the bioassay, 32 and 46 days after the saplings were infested with weevils. The bioassay started on 12 May and ended on 27 June 2018. Mean daily temperature varied from 11.9 to 21.0 °C ( $\bar{x} = 16.7$  °C) during the bioassay, and daily precipitation total ranged from 0 to 8.8 mm ( $\Sigma = 30.4$  mm). Daily temperature and precipitation data that were obtained from a local automatic meteorological station are displayed in Figure 1.

### 2.7. Data Analysis

Cumulative mortality data from the virulence tests were corrected for natural (control) mortality using Schneider–Orelli’s formula and subjected to probit analysis to estimate median lethal concentrations ( $\text{LC}_{50}$ ) with associated 95% confidence intervals. A  $\text{LC}_{50}$  ratio [61] was calculated for each fungal strain to determine whether LC for females significantly differed from LC for males. Lethal concentrations for the most virulent strains were subjected to ANOVA and the post-hoc Tukey’s HSD test was performed to separate and compare means if significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) were detected. Chi-square test was used for testing a hypothesis that there is no difference ( $\alpha = 0.05$ ) in the mortality occurrence between *H. abietis* adults directly treated with conidia suspension and adults exposed to

saplings treated with conidia in the outdoor bioassay. All the analyses were conducted using Minitab 17® (© 2013 Minitab Inc., State College, PA, USA).



**Figure 1.** Daily mean temperature (°C) and daily precipitation (mm) data measured during the outdoor experiment.

### 3. Results

#### 3.1. Occurrence of Entomopathogenic Fungi in Populations of *H. abietis*

During the four-year investigation on the occurrence of EPF in populations of *H. abietis*, weevils killed by *Beauveria* sp. were observed. As many as 53 cadavers were inspected and *Beauveria* sp. was identified in 42 of them. Altogether, 22 *in vitro* isolates of EPF (Table 1) were obtained from the inspected cadavers and two *Beauveria* species were identified, namely *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (16 isolates) and *B. pseudobassiana* S.A. Rehner and R.A. Humber (6 isolates). Prevalence of mycosis in host populations was only quantified at the locality of the Tatra National Park in 2018. During this year, out of 1188 trapped adults, 25 individuals (2.10%) displayed symptoms of *Beauveria* infection that was confirmed by microscopic and molecular techniques. Incidence of infected adults was low in population and varied between 0 and 5.97% depending on collecting date. Infected individuals were mostly found in May and June and prevalence of disease culminated in the second half of June. No mycosis was observed after July 7.

#### 3.2. Virulence of Fungal Strains against *H. abietis* Adults

Pathogenicity of the *Beauveria* strains against weevils was tested in a series of laboratory bioassays. Percentage cumulative mortality increased with conidia concentrations and varied among fungal strains. Depending on strains, cumulative mortality reached 0–26.67% ( $\bar{x} = 9.55\% \pm 0.90\%$ ) at the lowest conidia concentration ( $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>) and 46.67%–86.67% ( $\bar{x} = 63.94\% \pm 1.52\%$ ) at the highest concentration ( $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup>). Mean cumulative mortality in the control was  $1.21\% \pm 0.08\%$  for males and  $0.53\% \pm 0.05\%$  for females. Median lethal mortality (LC<sub>50</sub>) varied among the strains (Table 2) and ranged from  $0.52$  to  $13.28 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup>. Low variability in LC<sub>50</sub> values between males and females was detected but LC<sub>50</sub> ratio analysis showed no significant differences (Table 2). The most virulent strains of *B. bassiana* (AMEP20) and *B. pseudobassiana* (AMEP43 and NREP84) with estimated LC<sub>50</sub> around  $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> were selected to repeat the virulence bioassay five times. In this case, since sex of weevils had no effect on susceptibility to fungal infection ( $F_{(1,8)} = 0.34, p > 0.05$  for AMEP20;  $F_{(1,8)} = 0.74, p > 0.05$  for AMEP43;  $F_{(1,8)} = 0.25, p > 0.05$  for NREP84), mortality data for males and females were pooled before subjecting to probit analysis. Mean LC<sub>50</sub> values for the three most virulent strains are shown in Table 3. AMEP20 strain with LC<sub>50</sub> of  $0.65 \pm 0.10 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> was significantly ( $F_{(2,12)} = 31.01, p < 0.01$ ) more virulent than the other two strains.

**Table 2.** Summary of probit analysis parameters from the virulence bioassays performed with *Beauveria* spp. strains against males (M) and females (F) of *Hyllobius abietis* in laboratory.

Strain	Sex	LC <sub>50</sub> ± SE <sup>1</sup> × 10 <sup>8</sup>	95% Fiducial Confidence Interval <sup>1</sup>	Slope ± SE <sup>2</sup>	LC <sub>50</sub> Ratio <sup>3</sup>	95% Confidence Interval <sup>3</sup>
AMEP20	M	0.52 ± 0.03	0.07–1.71	0.36 ± 0.10	38.42	0.24–610
	F	0.78 ± 0.06	0.08–4.30	0.29 ± 0.09		
AMEP43	M	1.05 ± 0.12	0.22–3.17	0.42 ± 0.11	2.52	0.10–62.46
	F	1.07 ± 0.10	0.21–3.51	0.40 ± 0.11		
AMEP52	M	1.88 ± 0.11	0.04–8.56	0.39 ± 0.12	0.88	0.02–47.75
	F	2.23 ± 0.14	0.06–11.56	0.36 ± 0.10		
AMEP53	M	6.89 ± 0.40	0.18–107.91	0.56 ± 0.23	1.60	0.01–307
	F	5.51 ± 0.40	0.16–71.72	0.40 ± 0.12		
AMEP56	M	8.07 ± 0.89	0.13–904.89	0.31 ± 0.13	98.44	0.08–1059
	F	9.79 ± 0.13	0.14–736.54	0.25 ± 0.11		
AMEP67	M	4.21 ± 0.35	0.08–136.59	0.34 ± 0.13	2.17	0.01–1235
	F	4.29 ± 0.37	0.09–130.50	0.30 ± 0.10		
AMEP72	M	10.28 ± 0.70	0.27–316.51	0.58 ± 0.29	1.03	0.01–812
	F	8.12 ± 0.73	0.19–470.10	0.36 ± 0.12		
NREP83	M	3.15 ± 0.19	0.08–16.75	0.43 ± 0.14	14.10	0.01–425
	F	1.93 ± 0.13	0.05–11.16	0.34 ± 0.10		
NREP84	M	1.01 ± 0.19	0.09–8.46	0.27 ± 0.10	1.24	0.02–88.43
	F	0.76 ± 0.05	0.11–3.10	0.33 ± 0.10		
NREP87	M	4.97 ± 0.28	0.13–35.86	0.52 ± 0.20	4.16	0.03–676
	F	4.36 ± 0.34	0.11–69.33	0.34 ± 0.11		
NREP88	M	11.73 ± 0.14	0.20–306.56	0.34 ± 0.16	0.49	0.01–162
	F	13.28 ± 0.16	0.25–226.92	0.32 ± 0.12		
NREP90	M	10.28 ± 0.70	0.27–313.53	0.58 ± 0.29	1.63	0.02–129
	F	10.34 ± 0.88	0.27–451.33	0.41 ± 0.14		
NREP91	M	4.03 ± 0.22	0.11–18.29	0.51 ± 0.17	1.09	0.07–16.33
	F	2.04 ± 0.11	0.06–7.90	0.41 ± 0.11		
NREP94	M	2.66 ± 0.16	0.58–12.42	0.44 ± 0.15	1.43	0.06–36.95
	F	2.23 ± 0.14	0.06–11.56	0.36 ± 0.10		
NREP95	M	8.32 ± 0.50	0.26–83.23	0.59 ± 0.21	1.05	0.10–11.27
	F	6.45 ± 0.38	0.22–41.89	0.50 ± 0.15		
NREP96	M	2.17 ± 0.16	0.04–18.66	0.33 ± 0.11	0.62	0.01–35.02
	F	1.96 ± 0.13	0.05–11.76	0.33 ± 0.10		
NREP97	M	5.09 ± 0.43	0.10–303.90	0.35 ± 0.14	3.45	0.18–65.89
	F	6.53 ± 0.63	0.14–584.54	0.31 ± 0.11		
NREP98	M	3.00 ± 0.17	0.07–132.97	0.47 ± 0.15	38.98	0.01–208
	F	2.63 ± 0.18	0.07–190.81	0.36 ± 0.11		
NREP99	M	9.88 ± 0.59	0.29–117.43	0.65 ± 0.29	68.92	0.05–886
	F	5.75 ± 0.37	0.18–481.19	0.45 ± 0.14		
NREP100	M	3.14 ± 0.18	0.07–157.04	0.47 ± 0.16	1.69	0.01–523
	F	1.63 ± 0.11	0.04–8.54	0.33 ± 0.10		
NREP102	M	5.09 ± 0.43	0.10–303.92	0.35 ± 0.14	0.14	0.01–12.64
	F	3.33 ± 0.22	0.09–247.68	0.37 ± 0.11		
NREP103	M	2.97 ± 0.17	0.08–124.13	0.46 ± 0.14	4.14	0.06–279
	F	2.23 ± 0.14	0.06–115.63	0.36 ± 0.10		

<sup>1</sup> Median lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) and 95% fiducial confidence intervals from probit analysis are in conidia per milliliter of suspension; SE—Standard error of the mean; <sup>2</sup> Slope from the regression analysis with standard error (SE); <sup>3</sup> LC<sub>50</sub> ratios between males and females of *H. abietis* with 95% confidence intervals [61]; Mean control mortality in the bioassays reached 1.21% ± 0.08% for males and 0.53% ± 0.05% for females.

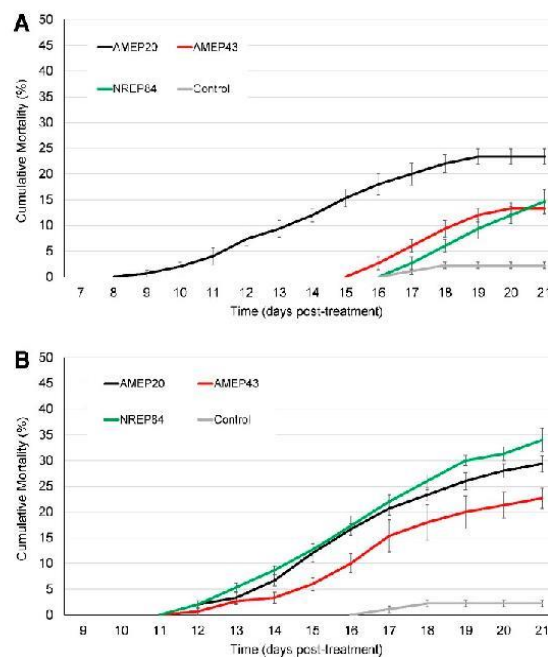


**Table 3.** Summary of probit analysis parameters from the virulence bioassays performed with the most pathogenic *Beauveria* strains against *Hylobius abietis* adults in laboratory.

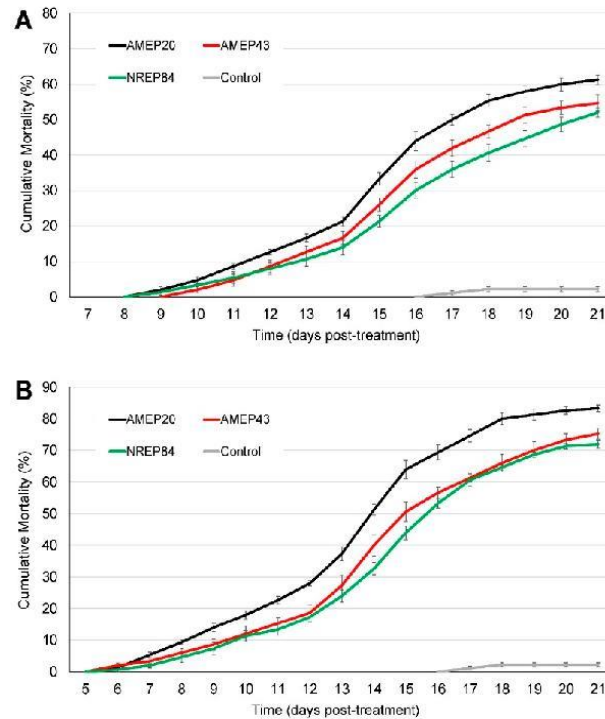
Strain	LC <sub>50</sub> ± SE <sup>1</sup>	95% Fiducial CI <sup>1</sup>	Slope ± SE	p <sup>2</sup>	χ <sup>2</sup> <sup>3</sup>
AMEP20	0.65 ± 0.10 × 10 <sup>8</sup> a	0.41 – 0.97 × 10 <sup>8</sup>	0.34 ± 0.03	<0.001	2.53
AMEP43	1.50 ± 0.29 × 10 <sup>8</sup> b	1.00 – 2.19 × 10 <sup>8</sup>	0.38 ± 0.03	<0.001	3.67
AMEP84	1.47 ± 0.34 × 10 <sup>8</sup> b	0.93 – 2.33 × 10 <sup>8</sup>	0.32 ± 0.10	<0.001	3.37

<sup>1</sup> Median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and fiducial confidence intervals (CI) are in conidia per milliliter of suspension; SE—standard error of the mean; LC<sub>50</sub> values sharing the same letter are not significantly different ( $\alpha = 0.05$ , Tukey's HSD test); <sup>2</sup> p-value for a slope from the regression analysis; <sup>3</sup> Pearson  $\chi^2$  goodness-of-fit test on the probit model ( $\alpha = 0.05$ , df = 2); Mean control mortality of adults was 2.15 ± 0.22% in the bioassays.

A general pattern of mycosis progress in treated groups of weevils is depicted by mean cumulative mortality in Figures 2 and 3. Dynamics of disease development in tested populations depended on conidia concentrations. The first mortality due to fungal infection occurred on 6 and 12 days post-treatment (dpt) when treated with the highest and lowest conidia concentrations, respectively. At the highest conidia concentration, the mean daily mortality during 13–18 dpt (1.81% ± 0.10%) was significantly higher ( $p < 0.01$ ) than for 1–12 dpt (0.34% ± 0.03%) or higher ( $p > 0.05$ ) than for 19–21 dpt (1.48% ± 0.17%) in the bioassay ( $F_{(2,63)} = 45.77$ ,  $p < 0.01$ ). Generally, mean daily mortality for all isolates increased until a culmination on 16–18 dpt and then gradually decreased to the end of the experiment. Development of mycosis induced by the three most pathogenic strains (AMEP20, AMEP43, and NREP84) had a similar trend, but mortality culminated two to three days earlier reaching its maximum on the 14–16 days post-treatment, which was followed by a gradual decrease in counts of killed weevils.

**Figure 2.** Mean cumulative mortality data (%) with standard errors of *Hylobius abietis* adults after their inoculation with conidia suspensions of *Beauveria* strains at concentrations of 1 × 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> (A) and 1 × 10<sup>7</sup> conidia mL<sup>-1</sup> (B).





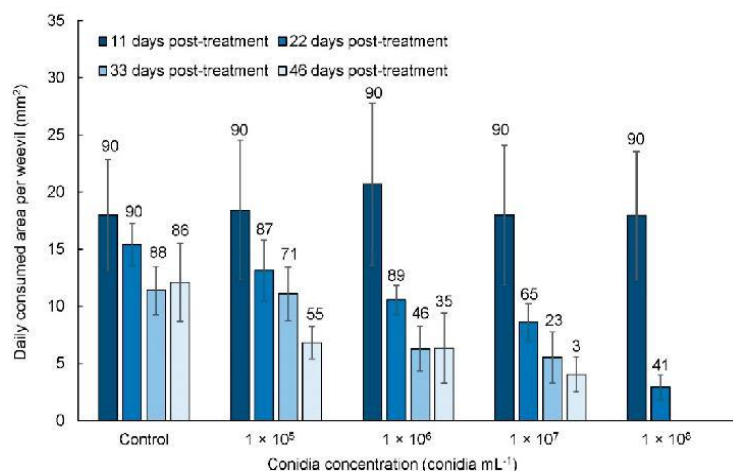
**Figure 3.** Mean cumulative mortality data (%) with standard errors of *Hylobius abietis* adults after their inoculation with conidia suspensions of *Beauveria* strains at concentrations of  $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> (A) and  $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup> (B).

Out of the strains included in the pathogenicity tests, AMEP20 *B. bassiana* strain demonstrated the greatest biological activity against *H. abietis* adults, and mycosis by the strain developed faster in the test populations. As many as  $64.00\% \pm 2.87\%$  weevils succumbed to infection by the strain at the highest conidia concentration ( $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup>) until day 15, when mortality culmination was observed. Total cumulative mortality ( $83.25\% \pm 3.17\%$ ) induced by this strain at conidia concentration of  $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup> was significantly higher than the mortality of the other two highly virulent strains ( $F_{(2,12)} = 17.62$ ,  $p < 0.01$ ), namely AMEP43 ( $75.33\% \pm 3.59\%$ ) and NREP84 ( $72.00\% \pm 4.12\%$ ). The same trend was documented for all tested conidia concentrations. Based on the above results, AMEP20 *B. bassiana* strain was selected for the feeding damage bioassay and the outdoor experiment.

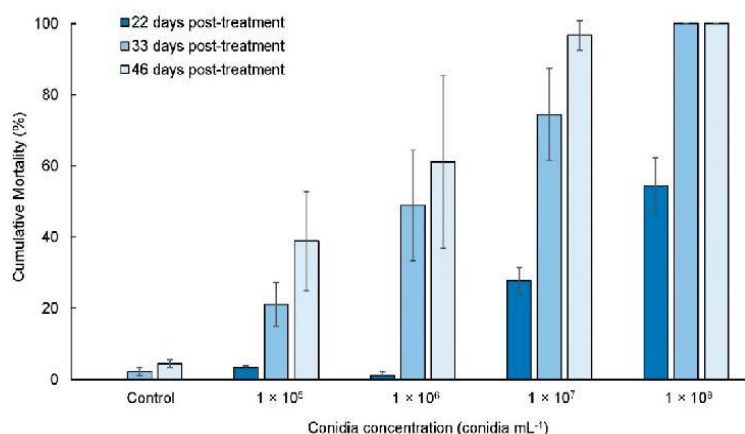
### 3.3. Feeding Damage Bioassay

Treatment of weevils with *B. bassiana* inoculum affected their feeding damage on the bark of Scots pine twigs. *B. bassiana*-treated weevils damaged smaller area of bark per day than untreated individuals and mean daily damaged area of bark decreased with increasing conidia concentrations used for weevils treatment (Figure 4). The effect of *B. bassiana* on damage increased with time and was more prominent, although not significant ( $p > 0.05$ ), at higher ( $\geq 1 \times 10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>) conidia concentrations. While total eaten area of bark per weevil was  $197.83$  mm<sup>2</sup> for untreated weevils and  $197.21$ – $227.44$  mm<sup>2</sup> for *B. bassiana*-treated weevils when evaluated 11 dpt, the consumed area per weevil for a period of 33–46 dpt dropped to  $157.25$  mm<sup>2</sup> in the untreated group and to  $0$ – $88.42$  mm<sup>2</sup> for *B. bassiana*-treated individuals. No significant difference in feeding damage was observed between males and females either in the untreated control ( $F_{(1,4)} = 0.05$ ,  $p = 0.84$ ) or after inoculating with conidia suspensions ( $F_{(1,4)} = 0.07$ ,  $p = 0.81$  for  $1 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>;  $F_{(1,4)} = 0.05$ ,  $p = 0.83$  for  $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>;

$F_{(1,4)} = 0.02, p = 0.91$  for  $1 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ;  $F_{(1,4)} = 0.08, p = 0.80$  for  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ). Mortality of weevils due to *B. bassiana* in the feeding damage bioassay increased with conidia concentration and time (Figure 5). No mortality was detected 11 days after treatment with any conidia concentrations. At the end of the bioassay (46 dpt), mean cumulative mortality varied from 38.89% to 100% depending on the concentration of conidia. Mean cumulative mortality in the control reached 4.44%, but mycosis by *B. bassiana* was not confirmed in the cadavers.



**Figure 4.** Mean daily damaged area ( $\text{mm}^2$ ) of bark on twigs by *Hylobius abietis* adults after their inoculation with different conidia suspensions of *Beauveria bassiana* strain AMEP20. Values above bars represent numbers of surviving *H. abietis* adults on specific days post-treatment.



**Figure 5.** Mean cumulative mortality data (%) with standard errors of *Hylobius abietis* adults from the feeding damage bioassay after their inoculation with conidia suspensions of *Beauveria bassiana* strain AMEP20.

### 3.4. Outdoor Bioassay with *B. bassiana* Treatment

In the outdoor experiment, AMEP20 *B. bassiana* strain killed weevils that had been either treated with conidia suspensions (a direct treatment) or had been allowed to feed on the saplings previously treated with the fungal inoculum (an indirect treatment) (Table 4). Total mortality of weevils after the direct conidia treatment reached 85% or 100% with confirmed *B. bassiana* mycosis of 65% or 85% when

evaluated 32 or 46 days post-treatment, respectively. *B. bassiana* infection recorded in groups of weevils exposed to the conidia-treated saplings varied from 30.0% to 76.5% after 32 days of incubation time and from 55.0% to 88.2% after 46 days. The conidia applied on the saplings remained active during at least six days post-treatment, what was demonstrated by a mycosis development in the exposed groups of weevils. The highest level of mycosis was recorded in the group of weevils exposed to those saplings that were treated with conidia two days before. In this group of weevils, the proportion of mycosed individuals was even higher (76.5% or 88.2% after 32 or 46 days of incubation time, respectively) than in the group directly treated with conidia suspension (65.0% or 85.0% after 32 or 46 days of incubation time, respectively), but the difference was not significant ( $p > 0.05$ ). No mycosed weevils were detected on the untreated control saplings.

**Table 4.** Mortality of *H. abietis* adults after their direct and indirect treatment with conidia of the most virulent *Beauveria bassiana* strain AMEP20 in outdoor experiment.

Incubation Time		Control	Direct Treatment	Indirect Treatment—Exposure of Adults to Spruce Saplings 0–6 Days Post-Treatment (dpt)						
				0 dpt	1 dpt	2 dpt	3 dpt	4 dpt	5 dpt	6 dpt
32 days	Total mortality	0%	85.0%	70.0%	82.4%	88.2%	70.6%	45.0%	65.0%	52.6%
	Mycosis	0%	65.0%	60.0%	64.7%	76.5%	52.9%	30.0%	55.0%	31.6%
	$\chi^2$ statistic <sup>1</sup>			0.107	0.001	0.579	0.554	4.912	0.417	4.356
	<i>p</i> -value			0.744	0.985	0.447	0.457	0.027	0.519	0.037
46 days	Total mortality	0%	100.0%	85.0%	100.0%	100.0%	94.1%	70.0%	75.0%	73.7%
	Mycosis	0%	85.0%	75.0%	82.4%	88.2%	76.5%	55.0%	75.0%	63.2%
	$\chi^2$ statistic <sup>1</sup>			0.625	0.047	0.082	0.436	4.286	0.625	1.762
	<i>p</i> -value			0.429	0.828	0.774	0.509	0.038	0.429	0.184

<sup>1</sup> Chi-square tests performed to determine whether there was a significant difference between the proportion of mycosed adults in direct and indirect treatments ( $\alpha = 0.05$ ).

#### 4. Discussion

EPF are important natural control agents of insects and have been a subject of an intense study since the end of the nineteenth century. More than 700 fungal species in 100 orders are estimated [43]. A great majority of perspective fungi for mass production and use in biocontrol are those from the Hypocreales (Ascomycota) order [38]. Until now, the occurrence of EPF in *H. abietis* populations has been poorly studied, in spite of the importance of this forest pest. From fungal pathogens of large pine weevil documented in previous studies, hypocrealean EPF, especially those of *Beauveria* genus, have been the most common [35,44,45]. Current investigations on the occurrence of EPF in field populations of *H. abietis* in Slovakia showed that *Beauveria* infection is consistently present but at a low prevalence level (0–5.97%). This corresponds with results of other studies. For example, in Ireland a percentage of weevils infected with *Beauveria* sp. ranged from 1.3% to 3.5% [32]. In Europe, three *Beauveria* species: *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch and *B. caledonica* Bissett and Widden, have been recorded from field populations of *H. abietis* to date. While *B. bassiana* was identified in this survey, we did not identify *B. brongniartii* and *B. caledonica* from any of collected individuals. On the other hand, we detected *B. pseudobassiana* that is the first record of this pathogenic fungus on *H. abietis*. Altogether, six in vitro isolates of this species were obtained from the cadavers and thus the fungus cannot be considered a rare EPF in large pine weevil populations. Recent analyses of soil samples in Slovakia indicated that *B. pseudobassiana* preferred forest habitats over field crops or meadows [62] assuming its better adaptation to forest ecosystems. On the other hand, this species was not identified from forest soil samples in Poland [63]. Since virulence tests ranked two strains of *B. pseudobassiana* (AMEP43 and NREP84) among strains possessing high efficacy against the weevils, the pathogenic potential of this fungus against forest insect pests deserves a further study. *B. brongniartii* is a well-known pathogen of soil inhabiting coleopteran larvae, but was also identified from larvae of *H. abietis* in Austria [35]. Its pathogenicity to *H. abietis* has also been demonstrated in laboratory experiments [49]. *B. caledonica* is a species originally described from moorland soil in Scotland [64] and was also found as



a naturally-occurring pathogen of *H. abietis* and other curculionids in the northern UK, Ireland, Poland, Austria, France, Slovakia, and New Zealand [32,35,45,65,66]. Results of laboratory assays suggest that *B. caledonica* has a potential to be a biocontrol agent of curculionids. Bioassays with *B. caledonica* strains from Slovakia and New Zealand demonstrated their high pathogenicity to adults of *Ips typographus* (L.) (Curculionidae: Scolytinae) and other scolytid beetles [45,66]. Although pathogenicity of fungi from another hypocrealean genus, *Metarhizium*, to *H. abietis* was demonstrated in laboratory and field experiments [36,50,67], this fungus was not found naturally infecting weevils in this survey or in other studies [32,35].

Now, it is generally accepted that a traditional morphotaxonomic determination of *Beauveria* species is not sufficient and an application of molecular methods is required. Most records on *B. bassiana* and *B. brongniartii* made before the comprehensive multigene phylogenetic analysis and taxonomic revision of *Beauveria* genus [54,55] must be judged with caution. Both taxa were complexes of species consisting of morphologically similar but cryptic lineages. Following the novel molecular approach in *Beauveria* taxonomy, several new species have been described [55,68–74]. Up until now, five species (*B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. pseudobassiana*, and *B. varroae* S.A. Rehner and Humber) have been documented in Europe. While *B. bassiana*, *B. brongniartii*, and *B. pseudobassiana* are globally distributed soilborne entomopathogens with a broad host-range occurring in a variety of habitats, *B. varroae* is known only from ectoparasitic mites of honeybee in France, although it can infect also coleopteran hosts [55]. Because the previous studies on EPF diversity in field-collected large pine weevil in Europe have been based on the morphotaxonomic principles, some *Beauveria* species might have been misidentified or remained undetermined.

As shown in the current field surveys, *Beauveria* infection is one of natural factors of *H. abietis* mortality. Although natural epizootics are not typical for these fungi, laboratory and field experiments have already shown their efficacy against this forest pest [32,36,50,67]. Previous research on testing *Beauveria* spp. against *H. abietis* produced optimistic outcomes, but effective biocontrol methods using these fungi are still lacking. It is generally known that a selection of highly virulent strains is a prerequisite for successful implementation of EPF in the biocontrol of insect pests. A series of our laboratory bioassays showed that all tested *Beauveria* strains could infect adults of *H. abietis* and sporulate on cadavers. No effect of sex of tested weevils was detected on the susceptibility against the fungal strains. To our knowledge, *B. pseudobassiana* has not been tested against *H. abietis* yet, and the current virulence tests bring optimistic results. Based on the interspecific variability in pathogenicity of the strains we cannot conclude that any of tested *Beauveria* species demonstrated better results in the biological properties than the other ones. Two highly virulent *B. pseudobassiana* strains and one *B. bassiana* strain were identified in the virulence bioassays. *B. bassiana* strain AMEP20 was selected for further investigation due to higher mortality, and thus lower values of  $LC_{50}$ , than mortality obtained after application of *B. pseudobassiana* strains.

Generally, disease development was relatively slow in tested weevils. The most virulent strain (AMEP20) caused 29.97% cumulative mortality on day 12 and 83.25% mortality on day 21, when the highest conidia concentration ( $1 \times 10^9$  conidia  $mL^{-1}$ ) was tested. In a similar study by Ansari and Butt [36], *B. bassiana* strains caused 53% mortality of *H. abietis* on day 12, if the weevils were treated by submersion into conidia suspension ( $1 \times 10^8$  conidia  $mL^{-1}$ ). In this study, the mortality caused by AMEP20 strain and a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia  $mL^{-1}$  was 63.27% on day 21, but it was only 16.65% on day 12. Ansari and Butt [36] explain the prolonged time to the host death by the thick and tough cuticle of adults that can form a barrier against the entomopathogenic fungi. This slow killing rate by entomopathogenic fungi might be a limitation factor for their effective use against adults of the large pine weevil. It was documented that three adults can completely strip the bark of a spruce sapling within six days [75]. On the other hand, *H. abietis* adults can live for up to four years [1,76] and females lay eggs each season (from May to September) during their lifetime. Considering this fact, the slow action of fungi does not seem to be such an important factor. Any measure applied to kill adults can effectively contribute to the control of weevil population. Due to the slow action of *B. bassiana* during the

virulence bioassays, we also tested an effect of treatment by conidia suspensions (including sublethal concentrations) on the feeding damage by adult weevils. Treated weevils damaged significantly smaller area of bark than untreated individuals. The effect was observed for all tested conidia concentrations and was more prominent when mycosis progressed. The results clearly demonstrate that although the infected individuals lived relatively long after inoculation, their feeding on twigs was reduced resulting in smaller damage in comparison with healthy weevils. Spruce trees are the main host plants of *H. abietis* in Slovakia, but we used *P. sylvestris* twigs for the feeding damage experiment because this food was preferred by adult weevils when compared to *P. abies* [60]. There is a general agreement in several studies that optimum temperature for feeding of adult weevils is 20 °C [60,77,78] (Christiansen and Bakke, 1968; Christiansen, 1971; Leather et al., 1994). At this temperature a weevil consumed on average 252.9 mm<sup>2</sup> of *P. sylvestris* bark during 7 days [60]. In the current bioassay, an untreated (control) weevil consumed less food (197.83 mm<sup>2</sup>) during 11 days, and the food consumption moderately decreased towards the end of the bioassay. We do not know the reasons for the discrepancy with the previous study, but it might be related to the different quality of provided food or a different body size of adults in the studies. There is a considerable variation in the body size within natural populations of *H. abietis* and the weevil size was shown an important factor affecting a feeding rate [79].

Laboratory bioassays are usually carried out under optimal conditions for pathogenesis, which can be very different from environmental conditions in the field. Therefore, efficacy of the selected *B. bassiana* strain (AMEP20) was tested in outdoor conditions. It is well known that environmental factors can significantly reduce viability of *B. bassiana* inoculum when applied to the plant surface. The sunlight belongs to the most limiting factors [80–82]. Viability of conidia decreased to a half after a two-hour irradiation by simulated sunlight in laboratory [83,84]. Significant variability in conidia susceptibility to simulated sunlight exists among *B. bassiana* strains [85]. The conidia viability may also vary depending on the plants, on which the inoculum had been applied. For example, viability of *B. bassiana* conidia was high up to 26 days on lettuce and celery leaves [86], but it significantly decreased on *Medicago sativa* L. and *Agropyron cristatum* (M. Bieb.) P. Beauv. plants after 16 days [87] and on soya plants after 10 days [79]. In the current study, the *B. bassiana* conidia were active on spruce plants 6 days after its application and caused high mortality of *H. abietis*. The results also confirm that a contact of weevils with plants treated with inoculum leads to their high mortality. A similar study showed that a sustained contact of weevils with *B. bassiana*-treated spruce bark caused high infection rates [48]. The outcomes indicate that the application of conidia suspension on saplings could be a perspective approach in the biocontrol of *H. abietis*.

## 5. Conclusions

The current study investigated natural prevalence of EPF in populations of *H. abietis* adults and pathogenicity of local *Beauveria* strains against *H. abietis* adults with the goal to identify those possessing a high potential for biocontrol of this pest preferably in vulnerable forest areas, e.g., national parks, nature reserves and other areas with restrictions applied in the conventional pest management. Two *Beauveria* species (*B. bassiana* and *B. pseudobassiana*) were active in natural populations of large pine weevil. The laboratory bioassays suggested that AMEP20 *B. bassiana* strain could provide an effective and an acceptable level of *H. abietis* control in laboratory and simulated field conditions. Additional studies under actual field conditions are currently being conducted to evaluate the performance of the strain in forests. In addition, horizontal transmission of infection in the host populations, inoculum formulation and its introduction into *H. abietis* populations are also studied.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.B., M.L., and J.G.; methodology, M.B., M.L., J.G., and M.K.H.; formal analysis M.B. and J.G.; investigation, M.B., M.L., J.G., S.R., A.K., S.M., and M.K.H.; data curation, M.B., M.L., and J.G.; writing—original draft preparation, M.B., M.L. and J.G.; writing—review and editing, M.B.; supervision, A.K.; project administration, J.G.; funding acquisition, J.G.

**Funding:** This research was funded by the Slovak Research and Development Agency, grant numbers APVV-16-0031 and APVV-15-0348, and by the Ministry of Agriculture and Rural Development of the Slovak Republic, grant number 08V0301.



**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Leather, S.R.; Day, K.R.; Salisbury, A.N. The biology and ecology of the large pine weevil, *Hyllobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): A problem of dispersal. *B Entomol. Res.* **1999**, *89*, 3–16. [[CrossRef](#)]
2. Långström, B.; Day, K.R. Damage, control and management of weevil pests, especially *Hyllobius abietis*. In *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A synthesis*; Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 415–444. [[CrossRef](#)]
3. Lempérière, G.; Mantilleri, A.; Conord, C. Taxonomy and systematics of bark weevils. In *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A synthesis*; Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C., Evans, H.F., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 317–330. [[CrossRef](#)]
4. Zumr, V.; Starý, P. Monitoring of seasonal occurrence of *Hyllobius abietis* (L.) (Col., Curculionidae) in different forest environments of a model area. *J. Appl. Entomol.* **1994**, *118*, 361–364. [[CrossRef](#)]
5. Zumr, V.; Starý, P.; Dostálková, I. Monitoring of *Hyllobius abietis* (L.) (Col., Curculionidae) populations by two types of baited pitfall traps. *Anz. Schadlingsk. Pflanz. Umwelt.* **1994**, *67*, 90–92. [[CrossRef](#)]
6. Day, K.R.; Leather, S.R. Threats to forestry by insect pests in Europe. In *Forests and Insects*; Watt, A.D., Stork, N.E., Hunter, M.D., Eds.; Chapman & Hall: London, UK, 1997; pp. 177–205.
7. Eidmann, H.H.; Lindelow, A. Estimates and measurements of pine weevil feeding on conifer seedlings: their relationships and application. *Can. J. For. Res.* **1997**, *27*, 1068–1073. [[CrossRef](#)]
8. Solbreck, C. Dispersal distances of migrating pine weevils, *Hyllobius abietis*, Coleoptera: Curculionidae. *Entomol. Exp. Appl.* **1980**, *28*, 123–131. [[CrossRef](#)]
9. Månsson, P.E.; Schlyter, F. *Hyllobius* pine weevils adult host selection and antifeedants: Feeding behaviour on host and non-host woody Scandinavian plants. *Agric. For. Entomol.* **2004**, *6*, 165–171. [[CrossRef](#)]
10. Wallertz, K.; Nordenhem, H.; Nordlander, G. Damage by the pine weevil *Hyllobius abietis* to seedlings of two native and five introduced tree species in Sweden. *Silva. Fenn.* **2014**, *48*, 1–14. [[CrossRef](#)]
11. Day, K.R.; Nordlander, G.; Kenis, M.; Halldorson, G. General biology and life cycles of bark weevils. In *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A synthesis*; Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Gregoire, J.C., Evans, H., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 331–349. [[CrossRef](#)]
12. Grégoire, J.C.; Evans, H.F. Damage and control of BAWBILT organisms an overview. In *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A synthesis*; Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Gregoire, J.C., Evans, H., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 19–37. [[CrossRef](#)]
13. Galko, J.; Gubka, A.; Vakula, J. Praktické skúsenosti s využitím lapacích kór na zníženie škôd spôsobených tvrdoňom smrekovým na mladých výsadbách ihličnatých drevín (Experience with pine weevils trapping by bark pieces to reduce damage on conifer saplings). In *Proceedings of the Aktuálne Problémy V Ochrane Lesa 2012, Nový Smokovec, Slovakia, 12–13 April 2012*; Kunca, A., Ed.; National Forest Centre: Zvolen, Slovakia, 2012; pp. 60–64. (In Slovak).
14. Galko, J.; Ondruš, J.; Rell, S.; Gubka, A.; Vakula, J. Využitie lapacích kór pri monitoringu populačnej hustoty tvrdoňa smrekového a lykokazov rodu *Hylastes* (The use of trapping bark pieces in monitoring of population density of pine weevil and *Hylastes* bark beetles). In *Proceedings of the Aktuálne Problémy V Ochrane Lesa 2013, Nový Smokovec, Slovakia, 25–26 April 2013*; Kunca, A., Ed.; National Forest Centre: Zvolen, Slovakia, 2013; pp. 142–145. (In Slovak).
15. Rell, S.; Galko, J.; Lalík, M. Mechanické spôsoby ochrany sadeníc proti škodám spôsobeným zrelostným žerom tvrdoňa smrekového (*Hyllobius abietis* L.) (Mechanical measures in saplings protection against damage by the large pine weevil (*Hyllobius abietis* L.)). In *Proceedings of the Aktuálne Problémy V Ochrane Lesa 2017, Nový Smokovec, Slovakia, 26–27 January 2017*; Kunca, A., Ed.; National Forest Centre: Zvolen, Slovakia, 2017; pp. 151–155. (In Slovak).
16. Zumr, V.; Starý, P. LATEX paint as an antifeedant against *Hyllobius abietis* (L.) (Col, Curculionidae) on conifer seedlings. *Anz. Schadlingsk. Pflanz. Umwelt.* **1995**, *68*, 42–43. [[CrossRef](#)]
17. Hagner, M.; Jonsson, C. Survival after planting without soil preparation for pine and spruce seedlings protected from *Hyllobius abietis* by physical and chemical shelters. *Scan. J. Forest Res.* **1995**, *10*, 225–234. [[CrossRef](#)]
18. Eidmann, H.H.; Nordenhem, H.; Weslien, J. Physical protection of conifer seedlings against pine weevil feeding. *Scan. J. For. Res.* **1996**, *11*, 68–75. [[CrossRef](#)]



19. Örländer, G.; Nilsson, U. Effects of reforestation methods on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage and seedling survival. *Scand. J. For. Res.* **1999**, *14*, 341–354. [[CrossRef](#)]
20. Örländer, G.; Nordlander, G. Effects of field vegetation control on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to newly planted Norway spruce seedlings. *Ann. For. Sci.* **2003**, *60*, 667–671. [[CrossRef](#)]
21. Nordlander, G.; Nordenhem, H.; Hellqvist, C. A flexible sand coating (Conniflex) for the protection of conifer seedlings against damage by the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Agric. For. Entomol.* **2009**, *11*, 91–100. [[CrossRef](#)]
22. Galko, J.; Rell, S.; Kunca, A. Testovanie odolnosti voskom ošetrovaných sadeníc pred zrelostným žerom tvrdoňa smrekového—Súčasný stav a výskum na LOS (Resistance of wax-treated seedlings to maturation feeding of large pine weevil - current status and research at FPSC). In Proceedings of the Aktuálne problémy v ochrane lesa 2016, Nový Smokovec, Slovakia, 21–22 January 2016; Kunca, A., Ed.; National Forest Centre: Zvolen, Slovakia, 2016; pp. 165–170. (In Slovak).
23. Willoughby, I.; Moore, R.; Nisbet, T. *Interim Guidance on the Integrated Management of Hylobius Abietis in UK Forestry*; The Research Agency of the Forestry Commission: Bristol, UK, 2017; p. 28.
24. Modlinger, R.; Lalík, M.; Galko, J.; Lubojacký, J. Ověření ochrany výsadby proti žíru klikoroha borového (*Hylobius abietis*) pomocí voskování v terénních podmínkách (Evaluation of seedlings protection against the bark beetle (*Hylobius abietis*) by waxing in field conditions). In *Aktuálne problémy v ochrane lesa 2018, Proceedings of papers, Nový Smokovec, Slovakia, 1–2 February 2018*; Kunca, A., Ed.; National Forest Centre: Zvolen, Slovakia, 2018; pp. 68–72. (In Czech)
25. Rell, S.; Galko, J.; Lalík, M. Porovnanie ošetrovania smrekových sadeníc lepom a Pellacolom proti škodám spôsobeným tvrdoňom smrekovým (*Hylobius abietis*) (Comparison of spruce seedlings treatment with adhesive and Pellacol against damage caused by spruce bark (*Hylobius abietis*)). In Proceedings of the Aktuálne problémy v ochrane lesa 2018, Nový Smrekovec, Slovakia, 1–2 February 2018; Kunca, A., Ed.; National Forest Centre: Zvolen, Slovakia, 2018; pp. 101–104. (In Slovak).
26. Rose, D. Control of the Large Pine Weevil, *Hylobius abietis*, L. Ph.D. Thesis, Imperial College at Silwood Park Ascot, Berkshire, UK, September 2002.
27. Olenici, N.; Bouriaud, O.; Manea, I.A. Efficient conifer seedling protection against pine weevil damage using neonicotinoids. *Balt. For.* **2018**, *24*, 201–209.
28. Gubka, A.; Kunca, A.; Vakula, J.; Galko, J.; Nikolov, Ch.; Rell, S.; Zúbrik, M.; Leontovych, R. Máme vysokú spotrebu pesticídov? (Do we have high pesticide usage?). In Proceedings of the Aktuálne problémy v ochrane lesa 2017, Nový Smrekovec, Slovakia, 26–27 January 2017; Kunca, A., Ed.; National Forest Centre: Zvolen, Slovakia, 2017; pp. 103–109.
29. Brixey, J.M.; Moore, R.; Milner, A.D. 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. *For. Ecol. Manag.* **2006**, *226*, 161–172. [[CrossRef](#)]
30. Dillon, A.B.; Ward, D.; Downes, M.J.; Griffin, C.T. Suppression of the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) in pine stumps by entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. *Biol. Control* **2006**, *38*, 217–226. [[CrossRef](#)]
31. Purrini, K. *Nosema hylobii* n. sp. (Nosematidae, Microsporidia), a new microsporidian parasite of *Hylobius abietis* L. (Curculionidae, Coleoptera). *Z. Angew. Entomol.* **2009**, *92*, 1–8. [[CrossRef](#)]
32. Williams, C.D.; Dillon, A.B.; Harvey, C.D.; Hennessy, R.; Mc Namara, L.; Griffin, C.T. Control of a major pest of forestry, *Hylobius abietis*, with entomopathogenic nematodes and fungi using eradicator and prophylactic strategies. *For. Ecol. Manag.* **2013**, *305*, 212–222. [[CrossRef](#)]
33. Harvey, C.D.; Griffin, C.T. Local host-dependent persistence of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* used to control the large pine weevil *Hylobius abietis*. *BioControl* **2016**, *61*, 185–193. [[CrossRef](#)]
34. Kapranas, A.; Malone, B.; Quinn, S.; Mc Namara, L.; Williams, C.D.; O'Tuama, P.; Peters, A.; Griffin, C.T. Efficacy of entomopathogenic nematodes for control of large pine weevil, *Hylobius abietis*: Effects of soil type, pest density and spatial distribution. *J. Pest. Sci.* **2017**, *90*, 495–505. [[CrossRef](#)]
35. Wegensteiner, R.; Tkaczuk, C.; Balazy, S.; Griesser, S.; Rouffaud, M.A.; Stradner, A.; Steinwender, B.M.; Hager, H.; Papierok, B. Occurrence of pathogens in populations of *Ips typographus*, *Ips sexdentatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) and *Hylobius* spp. (Coleoptera, Curculionidae, Curculioninae) from Austria, Poland and France. *Acta Protozool.* **2015**, *3*, 219–232. [[CrossRef](#)]

36. Ansari, M.A.; Butt, T.M. Susceptibility of different developmental stages of large pine weevil *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic fungi and effect of fungal infection to adult weevils by formulation and application methods. *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, *111*, 33–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Vega, F.E.; Meyling, N.V.; Luangsa-Ard, J.J.; Blackwell, M. Chapter 6—Fungal Entomopathogens. In *Insect Pathology*; Vega, F.E., Kaya, H.K., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2012; pp. 171–220. [[CrossRef](#)]
38. Lacey, L.A.; Grzywacz, D.; Shapiro-Ilan, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *132*, 1–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. De Faria, M.R.; Wraight, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* **2007**, *43*, 237–256. [[CrossRef](#)]
40. Reddy, K.R.K.; Praveen Kumar, D.; Reddy, K.R.N. Entomopathogenic fungi: A potential bioinsecticide. *Kavaka* **2013**, *41*, 23–32.
41. Zimmermann, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol. Sci. Techn.* **2007**, *17*, 553–596. [[CrossRef](#)]
42. Jaronski, S.T. Mass production of entomopathogenic fungi: State of the art. In *Mass Production of Beneficial Organisms*; Morales-Ramos, J., Rojas, M.G., Shapiro-Ilan, D., Eds.; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 357–413.
43. Augustyniuk-Kram, A.; Kram, K.J. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In *Forest Ecosystems—More than Just Trees*; Blanco, J.A., Lo, Y.H., Eds.; InTech Press: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 265–294.
44. Gerdin, S. Observations on pathogens and parasites of *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) in Sweden. *J. Invertebr. Pathol.* **1977**, *30*, 263–264. [[CrossRef](#)]
45. Glare, T.R.; Reay, S.D.; Nelson, T.L.; Moore, R. *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycol. Res.* **2008**, *112*, 352–360. [[CrossRef](#)]
46. Samsinakova, A.; Novák, V. Eine Methode zur integrierten Bekämpfung des Rüsselkäfers (*Hylobius abietis* L.). *Anz. Schadlingsk. Pflanz. Umwelt.* **1967**, *40*, 22–27.
47. Waldenfels, J. Versuche zur Bekämpfung von *Hylobius abietis* L. (Coleopt., Curculionidae). *Anz. Schadlingsk. Pflanz. Umwelt.* **1975**, *48*, 21–25. [[CrossRef](#)]
48. Wegensteiner, R.; Führer, E. Zur Wirksamkeit von *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. gegen *Hylobius abietis* L. (Col.: Curculionidae). *Entomophaga* **1988**, *33*, 339–348. [[CrossRef](#)]
49. Wegensteiner, R. The efficacy of *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* and *B. tenella* against *Hylobius abietis* (Col., Curcul.). In Proceedings of the International Conference on Biopesticides, Theory and Practice, České Budějovice, Czechoslovakia, 25–28 September 1989; Jegorov, A., Matha, V., Eds.; Czechoslovak Academy of Sciences: České Budějovice, Czechoslovakia, 1989; pp. 238–242.
50. Mc Namara, L.; Kapranas, A.; Williams, C.D.; O'Tuama, P.; Kavanagh, K.; Griffin, C.T. Efficacy of entomopathogenic fungi against large pine weevil, *Hylobius abietis*, and their additive effects when combined with entomopathogenic nematodes. *J. Pest. Sci.* **2018**, *91*, 1407–1419. [[CrossRef](#)]
51. Zúmr, V.; Stary, P. The occurrence of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (L.), in individual forest zones. *For. Ecol. Manag.* **1992**, *51*, 251–258. [[CrossRef](#)]
52. Voolma, K.; Sibul, I. The effect of collecting fluid on the catch results of *Hylobius abietis* in pitfall traps. *Agron. Res.* **2006**, *4*, 457–460.
53. Humber, R.A. Identification of entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*; Lacey, L.A., Ed.; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 151–187.
54. Rehner, S.A.; Buckley, E.P. A *Beauveria* phylogeny inferred from ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* **2005**, *97*, 84–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Rehner, S.A.; Minnis, A.M.; Sung, G.H.; Luangsa-ard, J.J.; Devotto, L.; Humber, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* **2011**, *103*, 1055–1073. [[CrossRef](#)]
56. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1990; pp. 315–322.
57. Gardes, M.; Bruns, T.D. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **1993**, *2*, 113–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



58. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; and Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402. [[CrossRef](#)]
59. Barta, M. Pathogenicity assessment of entomopathogenic fungi infecting *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae). *Czech. Mycol.* **2010**, *62*, 67–78. [[CrossRef](#)]
60. Leather, S.R.; Ahmed, S.I.; Hogan, L. Adult feeding preferences of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *Eur. J. Entomol.* **1994**, *91*, 385.
61. Robertson, J.L.; Jones, M.M.; Olguin, E.; Alberts, B. *Bioassays with Arthropods*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; p. 194.
62. Medo, J.; Michalko, J.; Medová, J.; Cagáň, L. Phylogenetic structure and habitat associations of *Beauveria* species isolated from soils in Slovakia. *J. Invertebr. Pathol.* **2016**, *140*, 46–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Popowska-Nowak, E.; Skrzecz, I.; Tumialis, D.; Pezowicz, E.; Samborska, I.; Góral, K. Entomopathogenic fungi in the soils of forest plantations: towards the control of large pine weevil, *Hylobius Abietis*. *Balt. For.* **2016**, *22*, 8–15.
64. Bisset, J.; Widden, P. A new species of *Beauveria* isolated from Scottish moorland soil. *Can. J. Bot.* **1988**, *66*, 361–362. [[CrossRef](#)]
65. Reay, S.D.; Brownbridge, M.; Cummings, N.J.; Nelson, T.L.; Souffre, B.; Lignon, C.; Glare, T.R. Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. *Biol. Control.* **2008**, *46*, 484–494. [[CrossRef](#)]
66. Barta, M.; Kautmanová, I.; Čičková, H.; Ferenčík, J.; Florián, Š.; Novotný, J.; Kozánek, M. Hypocrealean fungi associated with populations of *Ips typographus* in West Carpathians and selection of local *Beauveria* strains for effective bark beetle control. *Biologia* **2018**, *73*, 53–65. [[CrossRef](#)]
67. Markova, G. Pathogenicity of several entomogenous fungi to some of the most serious forest insect pest in Europe. *IOBC/WPRS Bull.* **2000**, *23*, 231–239.
68. Zhang, S.L.; He, L.M.; Chen, X.; Hueng, B. *Beauveria lii* sp. nov. isolated from *Henosepilachna vigintioctopunctata*. *Mycotaxon* **2012**, *121*, 199–206. [[CrossRef](#)]
69. Chen, M.J.; Huang, B.; Li, Z.; Spatafora, J.W. Morphological and genetic characterisation of *Beauveria sinensis* sp. nov. from China. *Mycotaxon* **2013**, *124*, 301–308. [[CrossRef](#)]
70. Chen, W.H.; Han, Y.F.; Liang, Z.Q.; Jin, D.C. A new araneogenous fungus in the genus *Beauveria* from Guizhou, China. *Phytotaxa* **2017**, *302*, 57–64. [[CrossRef](#)]
71. Agrawal, Y.; Mual, P.; Shenoy, B.D. Multi-gene genealogies reveal cryptic species *Beauveria rudraprayagi* sp. nov. from India. *Mycosphere* **2014**, *5*, 719–736. [[CrossRef](#)]
72. Ariyawansa, H.A.; Hyde, K.D.; Jayasiri, S.C.; Buyck, B.; Chethana, K.W.T. Fungal diversity notes 111–252—taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Divers.* **2015**, *75*, 27–274. [[CrossRef](#)]
73. Robène-Soustrade, I.; Jouen, E.; Pastou, D.; Payet-Hoarau, M.; Goble, T.; Linderme, D.; Lefeuvre, P.; Calmès, C.; Reynaud, B.; Nibouche, S.; et al. Description and phylogenetic placement of *Beauveria hoplocheli* sp. nov. used in the biological control of the sugarcane white grub, *Hoplochelus marginalis*, on Reunion Island. *Mycologia* **2015**, *107*, 1221–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Imoulan, A.; Wu, H.J.; Lu, W.L.; Li, Y.; Li, B.B.; Yang, R.H.; Wang, W.J.; Wang, X.L.; Kirk, P.M.; Yao, Y.J. *Beauveria medogensis* sp. nov., a new fungus of the entomopathogenic genus from China. *J. Invertebr. Pathol.* **2016**, *139*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Girling, R.D.; Ennis, D.; Dillon, A.B.; Griffin, C.T. The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *104*, 195–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Eidmann, H.H. Integrated management of pine weevil (*Hylobius abietis* L.) populations in Sweden. In *Current Topics in Forest Entomology*; Forest Service General Technical Report WO-8; USDA: Washington, DC, USA, 1979; pp. 103–109.
77. Christiansen, E. Laboratory study on factors influencing pre-imaginal development in *Hylobius abietis* L. (Col., Curculionidae). *Norsk Entomol. Tidsskr.* **1971**, *18*, 1–8.
78. Christiansen, E.; Bakke, A. Temperature preference in adults of *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) during feeding and oviposition. *Z. Angew. Entomol.* **1968**, *62*, 83–89. [[CrossRef](#)]
79. Wainhouse, D.; Boswell, R.; Ashburner, R. Maturation feeding and reproductive development in adult pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera Curculionidae). *B Entomol. Res.* **2004**, *94*, 81–87. [[CrossRef](#)]

80. Gardner, W.A.; Sutton, R.M.; Noblet, R. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on soybean foliage. *Environ. Entomol.* **1977**, *6*, 616–618. [[CrossRef](#)]
81. Huang, B.F.; Feng, M.G. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. *Mycopathologia* **2009**, *168*, 145–152. [[CrossRef](#)]
82. Posadas, J.B.; Angulo, L.M.; Mini, J.I.; Lecuona, R.E. Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. *World Appl. Sci. J.* **2012**, *20*, 1024–1030. [[CrossRef](#)]
83. Ignoffo, C.M.; Garcia, C.; Hostetter, D.L.; Pinnell, R.E. Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* through sand and loam soils. *J. Econ. Entomol.* **1977**, *70*, 163–164. [[CrossRef](#)]
84. Fargues, J.; Goettel, M.S.; Smits, N.; Ouedraogo, A.; Vidal, C.; Lacey, L.A.; Lomer, C.J.; Rougier, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* **1996**, *135*, 171–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Morley-Davies, J.; Moore, D.; Prior, C.J. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycol. Res.* **1995**, *100*, 31–38. [[CrossRef](#)]
86. Kouassi, M.; Coderre, D.; Todorova, S.I. Effect of plant type on the persistence of *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci. Techn.* **2003**, *13*, 415–427. [[CrossRef](#)]
87. Inglis, G.D.; Goettel, M.S.; Johnson, D.L. Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. *Biol. Control* **1993**, *3*, 258–270. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).