

Rapport over laboratorieforsøg med svampen *Metarhizium anisopliae* testet mod gåsebillelarver (*Phyllopertha horticola*)

Formål:

Formålet var, at teste relevante isolater af den insektpatogene svamp *Metarhizium anisopliae* overfor gåsebillelarver (*Phyllopertha horticola*), samt teste forskellige koncentrationer af ét udvalgt isolat overfor gåsebillelarver.

Projektet startede den 1/11- 2002 og blev afsluttet den 20/12-2002.

Baggrund:

Gåsebillelarver kan forårsage store skader på golfbaner og græsarealer i øvrigt ved, at larverne æder græsrodderne. Svampen *Metarhizium anisopliae* inficerer jævnligt gåsebillelarver naturligt i Danmark og andre steder i Europa. Svampen er eksempelvis isoleret fra gåsebillelarver fra Hjørring Golfbane. Østrigske laboratorieforsøg har tillige vist, at virulente *M. anisopliae* isolater gav 100% dødelighed af larverne efter 6 uger ved behandling i 1×10^7 sporer/ml.

Materialer og Metoder:

Gåsebillelarver (*P. horticola*) blev gravet op og indsamlet i begyndelsen af oktober 2002 fra Give Golfbane. Der havde ikke været foretaget pesticidbehandling i det indsamlede område. Larverne blev herefter sat i karantæne enkeltvis i medicinbægre (30 ml) indeholdende vandmættet spagnum og et stykke gulerod. Bægeret blev lukket med et perforeret plastiklåg og larverne inkuberet ved $20 \pm 1^\circ\text{C}$ i mørke i 3 - 4 uger. Ugentlig blev larverne tilset og døde larver blev sorteret fra og gulerodstykkerne blev skiftet.

M. anisopliae isolaterne blev opbevaret ved -80°C . Fra dette blev inokulum udtaget og friske kulturer startet og dyrket på Sabouraud dextrose agar (SDA) ved 23°C . Svampen blev dyrket i 10-12 dage på Petriskåle, og høstet med en opløsning af 0,05% Triton X-100. Opløsningen med inokulum blev justeret med 0,05% Triton X-100 til den ønskede koncentration; 1×10^7 sporer/ml for screeningsforsøgene og til 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 og 10^9 sporer/ml for dosis-responsforsøget med isolatet KVL 99-114. Spireprocenten af sporerne blev undersøgt ved, at inokulere 0,1 ml af en opløsning på ca 10^6 sporer/ml på en SDA plade, og her blev antallet af spirede sporer talt efter henholdsvis 24 og 48 timer inkubation ved 23°C . Fem isolater blev testet se tabel 1.

Tabel 1. Oprindelse og spireprocent af *Metarhizium anisopliae* isolater

<i>M. anisopliae</i> isolater	Isoleret fra	Spireprocent efter 24/48 timer
KVL 99-114	Jord fra Finland	80/100
KVL 99-112	Æbleviklerlarve fra Østrig	100/ ikke talt
KVL 00-95	Gåsebillelarve/Hjørring golf bane	50/95
KVL 02-36	Jord fra Færøerne	99/ ikke talt
KVL 02-102	Næsehorns-billelarve fra DK	12/12

Gåsebillelarver (formentlig 3. stadie) blev inokuleret ved at dyppe dem i 10 ml af svampespor-opløsningen i 10 sek. Opløsningen og larver blev hældt over på et filterpapir i en Büchnertragt tilsluttet vakuum, hvor det overskydende vand blev suget bort. Larverne blev herefter flyttet enkeltvis over i et 30 ml medicinbæger indeholdende spagnum og et stykke gulerod. Bægrene blev lukket med et perforeret låg. Kontrollen blev kun behandlet med 0,05% Triton X-100. Larverne blev inkuberet ved $20 \pm 1^\circ\text{C}$ i mørke. Mortaliteten (dødeligheden) blev opgjort minimum 2 gange ugentlig

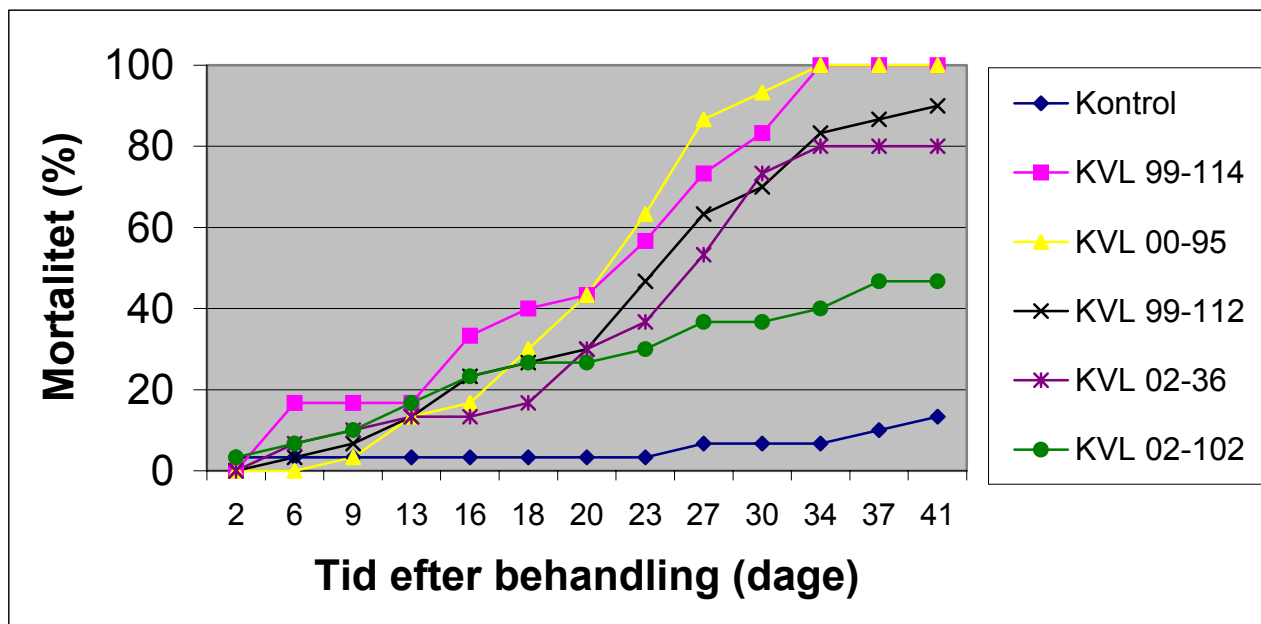
i op til 6 uger. Hvert assay bestod af 3 gentagelser med 10 larver. Larverne blev fodret efter behov med gulerodstykker.



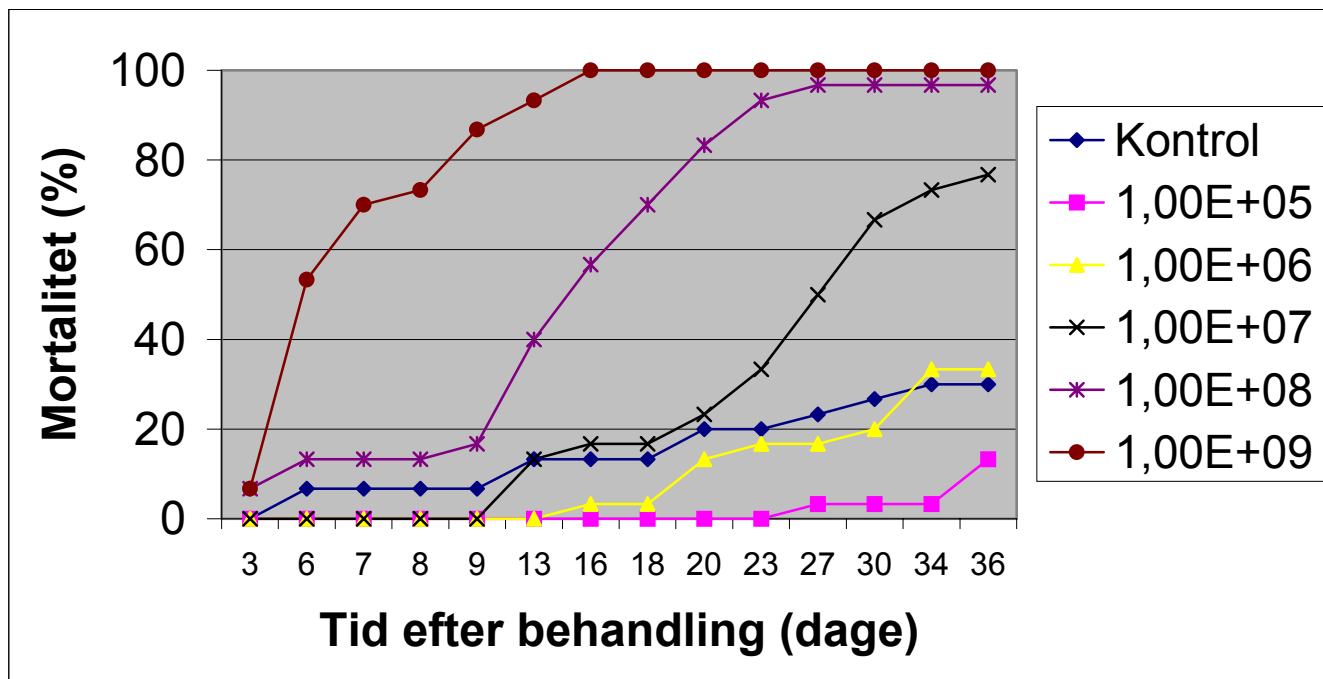
Figur 1. Bioassay opstilling med gåsebillelarver (uden låg).

Resultater:

Alle de testede isolater var virulente overfor gåsebillelarver, og en dødelighed på ca. 80% blev opnået med de fleste isolater efter 30 dage (Figur 2). De mest virulente isolater (KVL 99-114 og KVL 00-95) forårsagede en dødelighed på 100% efter 34 dage. Isolat KVL 02-102 gav lavest dødelighed, hvilket måske kan forklares med den lave spireprocent (Tabel 1). For isolatet KVL 99-114 hvor der blev lavet dosis-respons forsøg, blev beregnet en LC_{50} værdi og 95% konfidens interval på $5,0 \times 10^7$ ($2,6 - 8,6 \times 10^7$) sporer/ml efter 18 dage. Ved meget høje koncentrationer på 1×10^9 og 1×10^8 sporer/ml blev 100% dødelighed af larverne opnået efter henholdsvis 16 og 27 dage (Figur 3). Dødeligheden ved de lave koncentrationer på 1×10^5 og 1×10^6 sporer/ml adskilte sig ikke fra kontroldødeligheden. I dette forsøg var kontroldødeligheden dog højere end den burde være.



Figur 2. Mortaliteten (%) af gåsebillelarver efter inokulering med forskellige isolater af *Metarhizium anisopliae* (1×10^7 sporer/ml) og inkuberet i mørke ved 20°C.



Figur 3. Mortalitet (%) af gåsebillelarver efter inokulering med isolatet KVL 99-114 *Metarhizium anisopliae* i forskellige koncentrationer og inkuberet i mørke ved 20°C.



Figur 4. Død gåsebillelarve inficeret med *M. anisopliae* KVL 99-114.

Konklusion:

Flere af *M. anisopliae* isolaterne var højvirulente overfor gåsebillelarverne i laboratorieforsøgene. De to bedste isolater; KVL 99-114, der tidligere havde vist sig virulent i Østrigske forsøg og KVL 00-95, isoleret fra en gåsebillelarve fra Hjørring Golfbane, var begge i stand til at forårsage en dødelighed på 100%.

Svampen *M. anisopliae* har således klart et potentiale som bekæmpelsesmiddel af gåsebillelarver i golfbaner, og svampen kan eventuel bruges forbyggende på udsatte steder ved etablering af nyt græs. Et vigtigt punkt for en succesfuld bekæmpelse er, at få udbragt svampen under græslaget i mere eller mindre direkte kontakt med larverne. Det er ikke undersøgt, om de første larvestadier er lige så modtagelige overfor svampen som de sidste stadier, og hvis det ikke er tilfældet, er timingen af udbringning særlig vigtig.

Rapporten er udarbejdede af: Forskningslektor Susanne Vestergaard, Den Kgl. Veterinære og Landbohøjskole, Institut for Økologi, Sektion for Zoologi, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frb. C.

