

Lesy České republiky, s.p., Hradec Králové

**VÝZKUMNÉ PROJEKTY
GRANTOVÉ SLUŽBY LČR**



Souhrn projektu

**STUDIUM VYUŽITELNOSTI
ENTOMOPATOGENNÍCH HUB
(*DEUTEROMYCETES*) V SYSTÉMU
INTEGROVANÉ OCHRANY SMRKOVÝCH
POROSTŮ PROTI PLOSKOHŘBETCE
SMRKOVÉ *CEPHALCIA ABIETIS* VE STÁDIU
VAJÍČEK A PRVÝCH INSTARŮ**

Řešitel

Ing. Eva Prenerová, CSc.

Laboratoř ochrany rostlin Olešná



V Olešné prosinec 2007

OBSAH

1.	ÚVOD	3
2.	VÝSLEDKY	5
2.1.	Cíle projektu a terminologický slovník	5
2.2.	Založení sbírky nativních kmenů entomopatogenních hub	7
2.3.	Vypracování standardizovaných biotestů	9
2.3.1.	Testování vitality testem klíčivosti	10
2.3.2.	Testování virulence biotestem „in vivo“	10
2.4.	Otestování získaných kmenů	12
2.4.1.	Volba druhu entomopatogenní houby	12
2.4.2.	Výběr kmene <i>I. farinosa</i> (na kuklách potěmníka <i>T. molitor</i>).....	13
2.4.3.	Výběr kmene <i>I. farinosa</i> (na housenicích <i>C. abietis</i>)	13
2.4.4.	Volba formy vybraného kmene entomopatogenní houby	14
2.4.5.	Celkové zhodnocení biotestů	14
2.5.	Zkvalitnění vybraného kmene pasážováním přes housenice ploskohřbetky ...	15
2.6.	Návrh technologie výroby prototypů nového bioagens (optimalizace kultivačních, finalizačních a skladovacích podmínek)	17
2.6.1.	Testování kvality prototypů bioagens na bázi <i>I. farinosa</i> skladovaných po dobu 6 měsíců	18
2.7.	Urychlení průběhu nákazy nakličováním spor	18
2.7.1.	Účinnost nenakličených a nakličených blastospor <i>I. farinosa</i>	19
2.8.	Laboratorní testování účinnosti prototypů bioagens na vajíčkách ploskohřbetky	20
2.8.1.	Přípravné práce pro testování vajíček ploskohřbetky	20
2.8.2.	Výsledky testování účinnosti na vajíčkách v laboratorních podmínkách	21
2.9.	Terénní testování účinnosti prototypů bioagens na vajíčkách ploskohřbetky	23
2.9.1.	Materiál a metodika	23
2.9.2.	Výsledky	25
2.9.3.	Diskuse a závěr	26
2.10.	Zdokumentování průběhu infekce vajíček a prvních instarů ploskohřbetky	27
2.11.	Doporučená metodika způsobu výroby a aplikace bioagens	34
3.	STRUČNÝ SOUHRN VÝSLEDKŮ	36
3.1.	Stručný souhrn výsledků a potvrzení hypotéz	36
3.2.	A short summary of the results and confirmation of the hypotheses	37
4.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
5.	PODĚKOVÁNÍ	42
6.	PREZENTACE VÝSLEDKŮ	42

1. ÚVOD

Úvod

Akutní ochrana rostlin před hmyzími škůdci a fytofágními roztoči se provádí převážně pomocí konvenčních chemických pesticidů. Jejich používání je však z hlediska ochrany životního prostředí a bezpečnosti práce problematické. Hmyz se na ně stává postupně stále více rezistentní, což vyvolává potřebu zvyšovat dávky nebo přecházet na jiné typy účinnějších pesticidů. Rovněž zpříšňující se legislativa omezuje tento způsob boje. Jedním z východisek je výzkum a vývoj nových ochranných prostředků na principech biologického boje, při nichž se využívají přirození nepřátelé škůdců, jako jsou predátoři, parazité nebo patogenní organismy. Biologické prostředky označované jako bioinsekticidy využívají přirozených antagonistických vztahů mezi organismy za účelem potlačení populací škůdce bez podstatného narušení přírodní rovnováhy a tím přispívají k udržení stability ekosystémů v antropogenně změněných podmínkách prostředí. Potvrdilo se, že tyto entomopatogenní mikroorganismy (houby, bakterie, viry) jsou pro necílové organismy včetně člověka neškodné a na rozdíl od klasických insekticidů nepředstavují žádnou ekologickou zátěž pro přírodní prostředí. Podstatně tak přispívají k ochraně druhové biodiverzity fyto - a zoocenóz v kulturní krajině. Proto se s nimi ve světovém měřítku stále více počítá jako s alternativními prostředky regulace hmyzích škůdců. Použití mykoinsekticidů v ochraně dřevin před hmyzími škůdci je jedním z potencionálních přístupů v moderní aplikované lesnické entomologii a v některých zemích dospěl jejich vývoj už do stadia výroby komerčních bioinsekticidů. Tento směr je proto třeba rozvíjet i u nás.

V roce 2002 zadala **Grantová služba LČR** pracovišti **Laboratoři ochrany rostlin v Olešné (LOR Olešná)** řešení projektu, jehož cílem bylo prozkoumat, zda lze v ochraně před ploskohřbetkou smrkovou využít entomopatogenní houby (tj. houby působící u hmyzu smrtelnou nákazu) tak, aby došlo k významné redukci populace tohoto škůdce. Výzkum byl prováděn za podpory a pomoci pracovníků lesních závodů LČR s.p., KRNAPU a Biologického centra AV ČR, v.v.i. v Českých Budějovicích.

Tento prezentovaný souhrn obsahuje jen výtah z odevzdané závěrečné zprávy (**Prenerová, 2008**) a neuvádí konkrétní výsledky získané v technologické části projektu, které budou sloužit jako podklad pro patentové řízení.

Ploskohřbetka smrková a ochrana proti tomuto škůdci



Ploskohřbetka smrková
(*Cephalcia abietis*)

Ploskohřbetka smrková (*Cephalcia abietis*, Hymenoptera), spolu se dvěma svými příbuznými - ploskohřbetkou severskou a ploskohřbetkou černou - patří k hlavním listožravým škůdcům smrku ztepilého. Gradační potenciál ploskohřbetky smrkové však významně převyšuje zmíněné dva druhy. V podmínkách střední Evropy se významně přemnožuje především v souvislých stejnověkových smrkových monokulturách v podhorských a horských oblastech v nadmořských výškách zhruba od 600 do 1000 m. V průběhu druhé poloviny minulého století jsme byli na našem území svědky několika silných gradací ploskohřbetky. Nejhorší kalamity byly zaznamenány v 80. letech, kdy bylo ploskohřbetkou napadeno téměř 50 tisíc ha porostů především v imisemi poškozených oblastech severních pohraničních horstev. Jelikož při přemnožení dochází opakovaným žírem

housenic k silným defoliacím, jež mohou vést až k úhynu napadených stromů, je ploskohřbetka smrková zařazena mezi kalamitní škůdce. Podrobný popis bionomie ploskohřbetky uvádí autoři **Liška a Holuša (2000)**.



Napadení smrku ploskohřbetkou smrkovou. Foto. P. Kapitola

Ochrana proti tomuto škůdci

Chemická ochrana

Podle **Seznamu povolených přípravků na ochranu lesa (2005)** se pro ploskohřbetky rodu *Cephalcia* doporučují tyto insekticidy:

- Dimilin 48 SC – ULV aplikace
- Mimic 240 LV – ULV aplikace
- Nomolt 15 SC – ULV aplikace

Biologická ochrana na bázi entomopatogenních hub

Problematické výzkumu biologických agens na bázi entomopatogenních hub v ochraně proti ploskohřbetce se věnovalo několik autorů. **Boas** již v roce **1934 publikoval** nález *Beauveria brongniartii* (*tenella*) na ploskohřbetce *C. arvensis*. **Donaubauer (1959)** pozoroval, že houba *Beauveria bassiana* působí enzoootii v populaci ploskohřbetky. **Kurir (1977)** v terénních pokusech, při kterých zapravil houby *Beauveria bassiana* a *Paecilomyces farinosus* do půdy (do hloubky 5 cm), zaznamenal během 4 měsíců až 40 % mortalitu housenic v půdě. Více se touto problematikou zabývala **Marková (1987)**. V rámci své disertační práce pozorovala, že v oblas-tech přemnožení ploskohřbetky jsou nejčastěji pozorovány mykózy způsobené houbou *Isaria farinosa*, vzácně houbou *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae*. V laboratorních pokusech byla vyšší mortalita u *I. farinosa* než *B. bassiana* a prorůstání mycelia při vlhkosti větší než 90 %. Ke stejnému závěru jsem došla i já. Během působení v Entomologickém ústavu AVČR jsem se problematikou výzkumu možnosti využití biologických agens intenzivně zabývala (**Prenerová, 1991**). V roce 1994 byly získány slibné výsledky při ověření účinnosti myko-insekticidního agens proti ploskohřbetce v terénu (**Vaněk, 1995**). Bohužel kontinuita výzkumu byla vzhledem k mému jinému pracovnímu zaměření přerušena. Díky tomuto projektu jsem v ní mohla v posledních pěti letech v LOR Olešná pokračovat.

Cílem projektu bylo prověřit možnost umělého rozšiřování houbové nákazy v populacích ploskohřbetky.

Konkrétním cílem zásahu jsou vajíčka a mladé housenice, a to z několika důvodů:

1. Vajíčka jsou nejzranitelnější stádium životního cyklu škůdce.
2. Vajíčka nemají přirozenou ochranu před houbovou nákazou, (za normálních okolností se s ní nesetkávají, na rozdíl od larválních nebo kuklových stadií v půdě).
3. Preparát lze na vajíčka aplikovat leteckým postřikem.
4. Zásah zabrání líhnutí housenic a výrazně omezí žír v roce silného rojení.
5. Klazení a líhnutí larev probíhá v rozmezí 2-4 týdnů, což je dosti dlouhé období na provedení dobře načasovaného zákroku.
6. Vylíhlé malé housenice se později soustřeďují v paždí větví a zhotovují si tam předivové vaky, v nichž už jsou těžce zasažitelné.

2. VÝSLEDKY

2.1. Cíle projektu a terminologický slovník

Úkoly zadané v rámci projektu byly rozděleny do dvou tématických okruhů. Problematika prvního okruhu řešená v letech 2003-2005 se zabývala vývojem nového bioagens. Na základě dřívějších zkušeností a provedených biotestů byla proti danému škůdci vybrána entomopatogenní houba *Isaria farinosa* (syn. *Paecilomyces farinosus*). Cílem bylo získat virulentní nativní kmeny této houby z lokalit výskytu ploskohřbetky smrkové v rámci celého území ČR, a to jednak izolací z půdních vzorků, jednak z cílového škůdce. Dále bylo provedeno testování kvality získaných kmenů ve standardizovaných biotestech a nalezen účinný způsob zkvalitnění vybraných kmenů. Biotesty bylo zjištěno, že blastospory jsou účinnější infekční formou než konidiospory, a proto byla další pozornost týkající se optimalizace kultivačních a finalizačních podmínek věnována právě této formě spor. Na konci roku 2005 tak byly získány nové prototypy bioagens – olejové blastosporové koncentráty a zmrazené blastosporové koncentráty na bázi *I. farinosa*. Mohlo se tak přistoupit k řešení druhého tématického okruhu.

V této druhé fázi řešení (v letech 2006-2007) byla pozornost zaměřena na optimalizaci podmínek skladování prototypů bioagens a na testování těchto prototypů přímo proti cílovému škůdci. V laboratorních biotestech se jednalo o stanovení optimálních podmínek průběhu infekce a jeho zdokumentování. Dále se hledaly možnosti, jak urychlit průběh nákazy s cílem zvýšit účinnost bioagens. V roce 2006 byly založeny terénní pokusy s cílem stanovit celkovou redukci populace ploskohřbetky (vajíček i housenic) po zásahu houbovým agens, které byly vyhodnoceny v červnu 2007.

Při řešení daného projektu bylo prioritně požadováno získat bioagens s vysokou účinností, které bude možno průmyslově vyrábět. Nezanedbatelné je též respektování požadavku aplikovatelnosti bioagens v lesnické ochrannářské praxi (přízpůsobení letecké aplikaci).

Téma bylo tedy řešeno komplexně – od objasnění teoretických základů, přes samotný vývoj bioagens a potažmo i jeho laboratorní a terénní testování.

Získané výsledky (včetně některých metodik) jsou prezentovány v těchto kapitolách:

kapitola	1. okruh otázek: Vývoj nového bioagens
2.2.	Založení sbírky nativních kmenů entomopatogenních hub.
2.3.	Vypracování standardizovaných biotestů.
2.4.	Otestování získaných kmenů.
2.5.	Zkvalitnění vybraného kmene pasážováním přes housenice ploskohřbetky.
2.6.	Návrh technologie výroby prototypů nového bioagens (optimalizace kultivačních, finalizačních a skladovacích podmínek).

Projekt Grantové služby LČR

Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycetes) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové Cephalcia abietis ve stádiu vajíček a prvních instarů

kapitola	2. okruh otázek: Testování účinnosti nového bioagens
2.7.	Urychlení průběhu nákazy nakličováním spor.
2.8.	Laboratorní testování účinnosti prototypů bioagens na vajíčkách ploskohřbetky.
2.9.	Terénní testování účinnosti prototypů bioagens na vajíčkách ploskohřbetky.
2.10.	Zdokumentování průběhu infekce vajíček a prvních instarů ploskohřbetky.
2.11.	Doporučená metodika aplikace bioagens.

Před vlastním uvedením metodik a výsledků pokládám za vhodné definovat obsah některých používaných termínů.

SA	Sabouraudův agar, IMUNA – složení na 1000 ml vody – 8 g pepton pro bakteriologii; 8 g glukóza; 18 g maltóza; agar 15 g; pH 5,5 – 6,3.
konidie	Spora hub vzniklá nepohlavně na hyfě nebo konidioforu (Petráčková, Kraus a kol., 2001).
Konidiospora (CS)	Nepohlavní výtrus, který se tvoří na konci konidioforu (Petráčková, Kraus a kol., 2001). V angličtině – „ <i>conidiospore</i> “ – proto je používána zkratka CS.
Blastospora (BS)	Nepohlavní výtrus tvořený pučením (Urban a Kalina, 1980). V angličtině „ <i>blastospore</i> “ – používána zkratka BS.
titr spor	Vyjadřuje počet spor v 1 ml suspenze; je stanovován pomocí Bürkerovy počítací komůrky podle návodu dodaného ke komůrce; titr je vypočítán jako průměrný počet spor z 10 políček.
klíčivost blastospor	Vyjadřuje % klíčících blastospor za určitou dobu a za specifických podmínek, stanovuje se testem klíčivosti; za klíčící sporu lze považovat takovou, jejíž klíček je větší nebo roven polovině šířky spory, ze které vyrůstá . Procento klíčících spor se bude počítat z celkového počtu 100 spor na jedno opakování. V každé variantě se provedou 3 opakování.
naklíčenost blastospor	Tento termín je zde zaveden za účelem hodnocení účinku nakličování provzdušněním v živném médiu. Vyjadřuje % naklíčených blastospor, přičemž naklíčená blastospora je taková blastospora, jejíž klíček je minimálně roven nebo je větší než polovina šířky blastospory . Procento naklíčených spor se počítá z celkového počtu 100 spor na jedno opakování. V každé variantě se provedou 3 opakování. Do grafu se vynáší průměr z oněch 3 opakování.
LT50, LT90, LT95	(<i>lethal time</i>) - letální doba, která je nutná k vyvolání 50 %, 90 %, 95 % mortality testované populace.
LD50, LD90, LD95	(<i>lethal dose</i>) - letální dávka, která je nutná k vyvolání 50 %, 90 %, 95 % mortality testované populace.
LC50, LC90, LC95	(<i>lethal concentration</i>) - letální koncentrace, která je nutná k vyvolání 50 %, 90 %, 95 % mortality testované populace.

Projekt Grantové služby LČR

Studium využitelnosti entomopatogenních hub (*Deuteromycetes*) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvých instarů

mortalita	Vyjadřuje % mrtvých jedinců z celkového souboru určité testované varianty.
CFU – (colony forming units)	Počet jednotek tvořících kolonie - specifický údaj kvalitativní povahy udávající, z kolika jednotek patogena přítomných v 1 g biopreparátu se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie.
virulence patogenita	Na virulenci lze hledět jako na schopnost kmene uplatnit patogenitu charakteristickou pro druh. Virulenci může kmen ztratit a někdy opět získat. Virulence se vždy týká konkrétního kmene, patogenita konkrétního druhu. Obecně se uvádí, že virulence je kvantitativním vyjádřením míry patogenity.

2.2. Založení sbírky nativních kmenů entomopatogenních hub

Nalezení možností, jak získat virulentní izoláty entomopatogenních hub, bylo prvotním předpokladem při řešení využitelnosti entomopatogenních hub (*Deuteromycetes*). Obecně se uvádí, že čerstvé nativní izoláty entomopatogenních hub mají vyšší virulentní aktivitu než sbírkové kmeny uchovávané kontinuálním pasážováním na umělé půdě. Proto bylo nutné v první fázi projektu zaměřit se právě na získání čerstvých nativních kmenů, které budou dostatečně patogenní pro ploskohřbetku.

Kmeny byly získávány třemi způsoby:

a) Izolací z cílového škůdce *Cephalcia* spp.



Pro získání kmenů izolací z přirozeného hostitele bylo nutné vybrat vhodné lokality ke sběru vzorků housenic. Celkem bylo vybráno 43 porostů na území: 15 OJ LČR, s.p., KRNPu, firmy Statky Bartoň, Nové Město nad Metují, s.r.o. a firmy Lesy Dr. Kinský, kde byl zaznamenán silný výskyt škůdce.

Čištění kmenů probíhalo přes umělá živná média – Sabouraudův agar (SA), IMUNA – složení na 1000 ml vody – 8 g pepton pro bakteriologii; 18 g glukóza; 18 g maltóza; agar 15 g; pH 5,5 – 6,3.



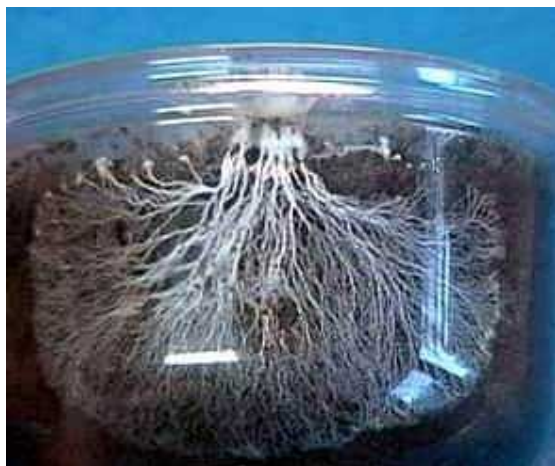
Po vyčištění kolonií jsme podle morfologických znaků (tvar a velikost konidiospor, struktura konidioforu) provedli identifikaci druhu houby pomocí mykologických klíčů (Samson a kol., 1988; Lacey, 1997; Weiser, 1966). Izoláty, které byly určeny jako saprofytické druhy hub, byly z dalšího čištění vyřazeny. Dále jsme pracovali pouze s kmeny entomopatogenními, které byly zaevidovány do sbírky entomopatogenních hub (SEH) LOR v Olešné pod zkratkou SEH . číslo kmene . zkratka druhového jména.

Podařilo se získat asi 40 infikovaných housenic. Po vytvoření fruktifikačních orgánů bylo z těchto vzorků v roce 2003 izolováno a identifikováno 8 kmenů entomopatogenních hub. V roce 2005 bylo tímto způsobem izolováno dalších 5 kmenů. Celkem bylo získáno 13 kmenů, viz. tab. 1.

b) Izolací entomopatogenních hub ze vzorků lesní půdy z míst výskytu ploskohřbetky

Izolace entomopatogenních hub ze vzorků lesní půdy (sběr vzorků půdy byl proveden na stejných lokalitách, kde byly sbírány vzorky s housenicemi) probíhala pomocí tzv. „metody živých pastí“ (*bait method*). „Živou pastí“ mohou být larvy různých druhů hmyzu: např. zavíječů *Galleria mellonella*, *Plodia interpunctella*, obaleče *Cydia pomonella* nebo potěmníka *Tenebrio molitor*. Tato metoda byla původně určena pro detekci entomoparazitických hlístic v půdě (Bedding a Akhurst, 1975) a poté byla úspěšně použita i pro detekci entomopatogenních hub (Zimmermann, 1986; Mietkiewski a kol., 1992; 1997; 1998; Vanninen, 1996; Vanninen a kol., 1989; Kleespies a kol., 1989; Landa a kol., 2002; Keller a kol., 2003). Já jsem použila larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), které jsem vystavila po určitou dobu testovanému vzorku půdy – (vzorek z vrstvy: 1. hrabankové, 2. humusové, 3. minerální) a následně jsem izolovala entomopatogenní houby vyrostlé na povrchu těla infikovaných larev. Čištění kmenů probíhalo stejným způsobem jako při izolacích z ploskohřbetky.

V roce 2003 bylo z půdních vzorků odizolováno a identifikováno 47 kmenů entomopatogenních hub. V roce 2005 byly tímto způsobem izolovány další 3 kmeny. Celkem tedy bylo tímto způsobem získáno 50 kmenů entomopatogenních hub (viz. tab.1.). Z provedených rozborů lze konstatovat, že incidence entomopatogenních hub je ve všech třech testovaných vrstvách stejná.



c) Získáním kmenů entomopatogenních hub nákupem z mykologických sbírek

Za tímto účelem jsem kontaktovala pouze Českou sbírku mikroorganismů - CCM (Czech Collection of Microorganisms) při Masarykově universitě v Brně; 8 kmenů bylo zakoupeno ve formě lyofilizátů.

Lyofilizáty byly převedeny do plotnových kultur pěstovaných na SA. Tyto kultury sloužily jako:

- 1) srovnávací materiál při identifikaci nových kmenů;
- 2) byly zařazeny do testování účinnosti.

Výsledek: Souhrn získaných kmenů Deuteromycet

Celkem bylo k dispozici 71 kmenů entomopatogenních hub:

- 13 kmenů bylo získáno izolací z ploskohřbetky
- 50 kmenů bylo získáno izolací z půdních vzorků
- 8 kmenů nákupem z CCM

Tab.1. Souhrnná tabulka získaných kmenů

druh	z housenic ploskohřbetky	z půdních vzorků	nákupem z CCM	celkem
<i>Isaria farinosa</i> (syn. <i>Paecilomyces farinosus</i>)	12 kmenů	48 kmenů	1 kmen	61 kmenů
<i>Beauveria bassiana</i>	1 kmen	2 kmeny	2 kmeny	5 kmenů
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0	0	2 kmeny	2 kmeny
<i>Metarhizium flavoviride</i>	0	0	2 kmeny	2 kmeny
<i>Lecanicillium spp.</i> (syn. <i>Verticillium lecanii</i>)	0	0	1 kmen	1 kmen
celkem	13 kmenů	50 kmenů	8 kmenů	71 kmenů

Z housenic ploskohřbetky nebo z půdních vzorků byly izolovány pouze dva druhy entomopatogenních hub, a to: *Isaria farinosa* (syn. *Paecilomyces farinosus*) a *Beauveria bassiana*. Celkem se během trvání projektu podařilo odizolovat 63 kmenů těchto druhů hub. Naše výsledky se shodují se závěry **Markové (1987)**, která konstatovala, že v oblastech přemnožení ploskohřbetky jsou nejčastěji pozorovány mykózy způsobené houbou *I. farinosa*, vzácně houbou *B. bassiana* a *Metarhizium anisopliae*.

Kvalita všech 71 získaných kmenů byla otestována standardizovanými biotesty, které jsou specifikovány v následující kapitole.

2.3. Vypracování standardizovaných biotestů

Zvláštní pozornost byla věnována správnému nastavení metody hodnocení kvality kmenů entomopatogenů. Jelikož konečným produktem je biopreparát, vycházela jsem z metodických postupů, kterými jsou obecně biopreparáty hodnoceny.

Účinnou složku většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří konidie nebo blastospor. Standardní biopreparáty na bázi entomopatogenních hub musejí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií a podléhají kompletnímu registračnímu procesu.

- *Mezi klíčové kvalitativní parametry patří:*
 - **garance druhu a kmene patogena;**
 - **specifikace podílu aktivní a doplňkové složky v biopreparátu;**

- **maximální přípustná kontaminace** (zastoupení cizorodých biotických příměsí, např. bakterií v 1 g přípravku).
- *Mezi hlavní kvantitativní parametry houbových biopreparátů patří:*
- **počet infekčních jednotek** - tzv. titr konidií (konidiospor, blastospor) v 1 g nebo 1ml. Titr infekčních jednotek se zpravidla pohybuje v rozmezí od $1,0 \times 10^9$ do $1,0 \times 10^{10}$ konidií v 1g biopreparátu;
- **klíčivost konidií** - garantovaná vitalita konidií nebo blastospor udávaná v %; je kvantitativním vyjádřením vitality;
- **počet jednotek tvořících kolonie (CFU - colony forming units)** - údaj vyjadřující, z kolika jednotek patogena přítomných v 1 g biopreparátu se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie;
- **virulence infekčních jednotek** – je kvantitativním vyjádřením míry patogenity a hodnotí se parametry:
 - letální doba (*lethal time*) **LT50, LT90, LT95**;
 - letální dávka (*lethal dose*) **LD50, LD90, LD95**;
 - letální koncentrace (*lethal concentration*) **LC50, LC90, LC95 (Lacey, 1997)**.

2.3.1. Testování vitality testem klíčivosti

Klíčivost spor – vyjadřuje % klíčících blastospor za určitou dobu a za specifických podmínek, stanovuje se testem klíčivosti;

Standardizovaný test klíčivosti

- 4 kapky homogenní suspenze spor z plotnové kultury určitého stáří (6×10^7 spor v 1 ml) testovaného kmenu se rovnoměrně rozetrou po povrchu SA vrstvy;
- inkubace spor probíhá v termostatu temperovaném na 23 ± 1 °C;
- klíčivost spor na tenké vrstvě SA v Petriho miskách je hodnocena po 15 hodinách;
- (doba testu klíčivosti je zkrácena na 15 hodin, jelikož blastospor klíčí rychleji než konidie, doba testu klíčivosti u běžně používaného standardního testu klíčivosti konidií je 24 hodin);
- za klíčící sporu lze považovat takovou, jejíž klíček je větší nebo roven polovině šířky spory, ze které vyrůstá;
- procento klíčících spor se počítá z celkového počtu 100 spor na jedno opakování; v každé variantě se provedou 3 opakování.

2.3.2. Testování virulence biotestem „in vivo“

Volba a způsob chovu testovaného hmyzu

Pro testování virulence byly v první fázi použity kukly potměníka moučného a ve druhé fázi při užším výběru housenice ploskohřbetky.

a) testování na kuklách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Tento druh hmyzu umožňuje maximální standardizaci podmínek biotestu:

1. snadno lze vybrat stejné stádium pro testování - 1-2 denní kukly;
2. je to nežeroucí stádium (odpadají problémy s krmením a kontaminací potravy);
3. snadná manipulace;
4. jednoznačná a snadná identifikace mrtvých jedinců.

Standardizovaný test virulence na kuklách potemníka moučného

- zdravé 1-2 denní kukly potemníka moučného;
- 100 kukel na 1 opakování, 3 - 4 opakování (tj. ošetřeno 300 – 400 kukel na 1 variantu);
- z plně vysporulované plotnové kultury (určitého stáří) konkrétního kmene se připraví suspenze o titru cca $5-6 \times 10^7$ spor v 1 ml (pro lepší smáčivost a přilnavost konidiospor doporučuji použít 0,03 % Tween, (Lacey a Kaya, 2000). Suspenze musí být dokonale homogenní, aby se nevytvářely shluky spor. Toho dosáhneme použitím homogenizéru.
- V případě blastospor (jsou dobře smáčivé) není potřeba přidávat Tween;
- „dip test“ – infekce ponořením kukly (každé zvlášť) na 1 sekundu do testované suspenze spor příslušného kmene o titru cca $5-6 \times 10^7$ spor v 1 ml nebo v případě kontroly – ponořením do destilované vody nebo v případě konidií do roztoku 0,03 % Tweenu;
- přebytečnou suspenzi odsát z ošetřených kukel na filtračním papíru a poté je umístit do vlhké komůrky tak, aby se vzájemně nedotýkaly;
- infikovaný hmyz inkubovat v termoboxu ve tmě při stálé teplotě 23 ± 1 °C nebo při kolísající teplotě 23 ± 1 °C (15 hod.) a 15 ± 1 °C (9 hod.) – termoperioda vychází z teplot panujících v období kladení vajíček ploskohřbetky;
- virulenci hodnotit % mortality a parametrem $LT_{95} \pm SD$; u jednotlivých testovaných variant průběžně odečítat mortalitu (%) a stanovit hodnotu LT_{95} ;
- mrtvé kukly nereagují na dotyk a v mnoha případech začínají porůstat myceliem houby.



b) testování na housenicích ploskohřbetky smrkové (*Cephalcia abietis*)

Standardizovaný test virulence na housenicích ploskohřbetky smrkové

- K testu použít diapauzní housenice ploskohřbetky smrkové *C. abietis*; bezprostředně po sběru anebo po krátkodobém skladování (5 ± 1 °C). Takto skladované jsou pohotově k dispozici pro jednotlivé biotesty;
- 30 larev na 1 opakování, 3 - 4 opakování (tj. ošetřeno 90-120 jedinců v 1 variantě);
- provedení „dip testu“ (viz výše);
- ošetřené housenice se položí na filtrační papír (odsaje přebytečnou suspenzi) a poté umístí do vlhké komůrky;
- infikovaný hmyz inkubovat v termoboxu ve tmě při stálé teplotě 23 ± 1 °C nebo při kolísající teplotě 23 ± 1 °C (15 hod.) a 15 ± 1 °C (9 hod.);
- virulence se hodnotí parametrem $LT_{95} \pm SD$; mrtvé housenice jsou ty, které nereagují na dotyk a v mnoha případech jsou již porostlé myceliem houby.

Způsob výpočtu

a) Stanovení mortality

Po 24 hodinách byly kontinuálně z testovaného souboru odebírány mrtvé kukly a vylíhlí dospělci, nebo v případě ploskohřbetky mrtvé housenice. Test trval do té doby, než byla dosažena konečná mortalita. Tedy každých 24 hodin byly v každé variantě získány 3 hodnoty mortality v procentech (3 opakování).

b) Korekce mortality dle Abbottovy rovnice

Vypočítaná procenta mortality jsem upravila pomocí Abbottovy rovnice (Abbott, 1925; Lacey, 1997; Lacey a Kaya, 2000), která je:

$M\% = 100 \times (T\% - C\%) / (100 - C\%)$, kde

M% je upravená mortalita

T% je procento mrtvých jedinců získaných v testu

C% je procento mrtvých jedinců získaných v kontrole

c) Probitová analýza

Získané hodnoty přepočtené mortality byly dále analyzovány procedurou PROC PROBIT v programu SAS/STAT (SAS Inst., 2000). Pro každou časovou řadu, tj. konkrétní kmen a opakování, byla stanovena hodnota LT95. V každé variantě (kmen) byly získány 3, případně 4 hodnoty LT95.

d) Výpočet průměru a směrodatné odchylky

Ze tří, případně čtyř získaných hodnot LT95 (pro každý kmen) byly vypočítány počítačovým programem MS-Excel průměr a směrodatná odchylka ($\pm$ SD).

e) test ANOVA

Účinnost kmenů byla porovnána pomocí analýzy variance (ANOVA) a následného testu mnohonásobného porovnání (Tukey test). Výpočty byly provedeny programem SAS/STAT (PROC ANOVA).

2.4. Otestování získaných kmenů

Během trvání celého projektu bylo provedeno několik desítek testů za účelem výběru vhodného druhu, kmene a formy entomopatogenní houby.

V této kapitole uvádím pouze výsledky těchto biotestů:

- volba druhu entomopatogenní houby;
- výběr kmene *I. farinosa* (na kuklách *T. molitor*);
- výběr kmene *I. farinosa* (na housenicích *C. abietis*);
- volba formy vybraného kmene entomopatogenní houby.

2.4.1. Volba druhu entomopatogenní houby

Porovnání účinnosti vybraného kmene *I. farinosa* s ostatními druhy entomopatogenních hub patřících do Deuteromycet

Podmínky testu:

- forma houby - konidiospory; testovány druhy *Lecanicillium* spp., *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *Isaria farinosa*;
- ostatní podmínky testování - standardizovaný test virulence na housenicích ploskohřbetky smrkové (*C. abietis*);
- výsledky biotestů byly podrobeny statistické analýze dat (ANOVA a Tukey test).

Potvrdila se správnost volby druhu. Houba *Isaria farinosa* (kmen SEH.56.If) byla ve srovnání s dalšími čtyřmi druhy hub proti housenicím ploskohřbetky signifikantně účinnější. **Marková (1987)** ve své disertační práci došla ke stejnému závěru při srovnání druhů *I. farinosa* a *B. bassiana*. I já jsem v předešlých pokusech získala stejný poznatek. Druh *I. farinosa* byl signifikantně účinnější než *L. lecanii*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* (**Prenerová, 1991**).

2.4.2. Výběr kmene *I. farinosa* (na kuklách potměníka *T. molitor*)

Všech 61 kmenů *I. farinosa* (forma blastospor) bylo testováno (a) při stále teplotě ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) (b) při kolísavé teplotě $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ (15 hod.)/ $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ (9 hod.); ostatní podmínky testování – standardizovaný test virulence na kuklách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*). Získané výsledky biotestů byly podrobeny statistické analýze dat (ANOVA a Tukey test).

a) Testování účinnosti na kuklách *Tenebrio molitor* při stálé teplotě

Zhodnocení:

Analýza variance prokázala statisticky vysoce průkazný vliv faktoru „kmen“ na hodnotu LT95 u larev *Tenebrio molitor* při konstantní teplotě $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ (one-way ANOVA, $F_{32}=82,59$; $P<0,0001$). Model vysvětlil 97,6 % variabilitu v datech. **Nejvyšší účinnost byla zjištěna u kmene SEH.56.If, kde průměrná hodnota LT95 činila 5,50 dne.** Tento kmen byl na hladině významnosti $\alpha=0,05$ statisticky odlišný od ostatních kmenů (Tukey test). Mezi dalšími kmeny byly rovněž zjištěny statisticky významné rozdíly v hodnotách LT95. Nejpomalejší účinek měl kmen SEH.44.If s LT95=10,73 dne.

b) Testování účinnosti na kuklách *Tenebrio molitor* při kolísavé teplotě

Zhodnocení:

U experimentů s larvami *Tenebrio molitor* při kolísavé teplotě byl vliv faktoru „kmen“ rovněž statisticky průkazný (one-way ANOVA, $F_{17}=50,29$; $P<0,0001$). Model vysvětlil 96 % variabilitu v datech. **Nejvyšší účinnost byla zjištěna také u kmene SEH.56.If s průměrnou hodnotou LT95=11,03 dní,** nejnižší u kmene SEH.43.If s LT95=14,60 dne. Hodnota kmene SEH.56.If se statisticky významně lišila od hodnot ostatních kmenů (Tukey test).

2.4.3. Výběr kmene *I. farinosa* (na housenicích *C. abietis*)

Na základě výsledků testů s kuklami potměníků bylo do užšího výběru vybráno 18 kmenů *I. farinosa* (forma blastospor), jejichž účinnost byla testována na diapauzujících housenicích ploskohřbetky smrkové *C. abietis*:

(a) při stále teplotě ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$);

(b) při kolísavé teplotě $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ (15 hod.) / $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ (9 hod.);

ostatní podmínky testování - standardizovaný test virulence na housenicích ploskohřbetky smrkové (*C. abietis*).

Získané výsledky biotestů byly podrobeny statistické analýze dat (ANOVA a Tukey test).

a) Testování účinnosti na housenicích *C. abietis* při stálé teplotě

Zhodnocení:

Experimenty s larvami ploskohřbetky daly obdobné výsledky jako testování na kuklách potměníka, tj. statisticky vysoce průkazné rozdíly mezi účinností testovaných kmenů (one-way ANOVA, $F_9=84,58$; $P<0,0001$). Model vysvětlil 97,4 % variability v datech. **I v těchto**

experimentech byla nejvyšší účinnost zjištěna u kmene SEH.56.If s průměrnou hodnotou $LT_{95}=11,17$ dne, která byl statisticky významně odlišná od hodnot ostatních kmenů (Tukey test). Nejnižší účinnost byla zjištěna u kmene SEH.14.If s $LT_{95}=16,70$ dne a kmene SEH.55.If s $LT_{95}=16,27$, což jsou kmeny izolované z půdních vzorků.

b) Testování účinnosti na housenicích *C. abietis* při kolísající teplotě

Zhodnocení:

Z 18 kmenů pouze 4 kmeny dosáhly 95 % mortality. Je třeba zdůraznit, že všechny tyto 4 kmeny byly získány izolací z cílového škůdce – tj. ploskohřbetky.

Analýza rozptylu ukázala statisticky průkazný vliv kmenu na biologickou účinnost (one-way ANOVA, $F_{3,11} = 15,59$; $P = 0,0011$). Statistický model vysvětlil 85,4 % variability v datech. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi kmeny SEH.5.If, SEH.57.If a SEH.58.If (Tukey test). **Nejrychleji a statisticky odlišně od předchozích kmenů působil kmen SEH.56.If.**

2.4.4. Volba formy vybraného kmene entomopatogenní houby

Podmínky testu:

- standardizovaný biotest na housenicích *C. abietis* (4 opakování na testovanou variantu, tj. $4 \times 30 = 120$ housenic na testovanou variantu);
- *I. farinosa* kmen SEH.56.If, 0. pasáž;
- testováno při kolísavé teplotě $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (15 hod.) / $15 \pm 1^\circ\text{C}$ (9 hod.).

Varianty:

- 1) **blastospory** – získané po pětidenní kultivaci submerzní kultivací za optimalizovaných podmínek;
- 2) **konidiospory** – získané po čtrnáctidenní kultivaci na Sabouraudově agaru.

Mortalita housenic byla vyjádřena v procentech (každý den). Poté byly stanoveny hodnoty LT_{95} a vypočítán průměr ze 4 opakování včetně směrodatné odchylky. Data byla podrobena nepárovému *t*-testu.

Zhodnocení:

Blastospory *I. farinosa* byly účinnější (průměrná hodnota $LT_{95} = 18,53$ dne, $SD \pm 0,43$) než **konidiospory** (průměrná hodnota $LT_{95} = 20,00$ dne, $SD \pm 0,55$). Rozdíl byl statisticky vysoce významný (nepárový *t*-test, $t = 4,2112$, $df = 6$, $P = 0,0056$). Ke stejnému závěru dospěli i Behle a kol., (2006) a Lacey a kol., (1999) u houby *I. fumosorosea*.

2.4.5. Celkové zhodnocení biotestů a výběr kmene *I. farinosa*.

Kmen SEH.56.If (izolací z diapauzující housenice *C. abietis*) vykazoval ve všech provedených biotestech signifikantně nejlepší výsledky, proto byl vybrán pro další pokusy (pasáže, výroba zkušebních vzorků, testování účinnosti, dokumentace průběhu houbové nákazy a další).



2.5. Zkvalitnění vybraného kmene pasážováním přes housenice ploskohřbetky.

Cílem této studie bylo posílit virulentní aktivitu vybraného kmene entomopatogenní houby *I. farinosa*. Vycházela jsem ze zkušeností jiných autorů, kteří k tomuto používali metodu kontinuálního pasážování přes cílového škůdce, označovanou také jako pasážování *in vivo*.

Otázkou vlivu složení kultivačního média, samotné kultivace i počtu opakovaných kultivací (tj. **pasáží *in vitro***) na virulenci entomopatogenních hub se zabývala řada autorů. Evidentní oslabení virulence opakovaným kultivováním na umělých půdách bylo pozorováno u houby *Verticillium lecanii* (Nagaich, 1973), u *B. bassiana* (Kawakami, 1960; Schaerffenberg, 1964), u *Entomophthora aphidis* (Rockwood, 1950), u *Nomurea rileyi* (Morrow a kol., 1989) a u *I. farinosa* (Kerner, 1958; Kawakami, 1960).

K „oživení“ virulence nebo k jejímu udržení, případně ke zvýšení virulence entomopatogenních hub se proto používá metoda kontinuálního pasážování kmene přes cílového hmyzího škůdce, proti kterému je mykoinsekticid určen. Již Schaerffenberg (1964) doporučoval pasážovat houbu druhu *B. bassiana* přes hostitele vždy po 15-16 kultivacích na umělých půdách. Evidentní zvýšení virulence u pasážovaných kmenů hub zaznamenali Kawakami 1960; Schaerffenberg (1964), Wasti a Hartmann (1975; 1982) a Kmitova (1982) u houby *B. bassiana*, Fargues a Robert (1978, 1983) a Daoust a Robert (1982) u houby *Metarhizium anisopliae*, Kernerová (1958), Kmitowa (1982), Kawakami (1960) a Prenerová (1994b) u druhu *P. farinosus*. Zajímavé jsou práce s houbou *M. anisopliae* (Fargues a Robert, 1978, 1983; Daoust a Roberts, 1982), kde k výraznému zvýšení virulence došlo již po první pasáži.

Novější práce tyto výsledky potvrdily a přinesly i řadu zajímavých srovnání metod *in vitro* a *in vivo*, (Steinkraus a kol., 1991; Hayden a kol., 1992; Peng a kol., 2002).

Materiál a metodika

Pasážování přes cílového hostitele probíhalo infekcí housenic ošetřených suspenzí spor.

Na základě doposud provedených biotestů byl vybrán k pasážování nejvirulentnější kmen *I. farinosa* - SEH.56.If.

Pasáže probíhaly od května 2006 do konce roku 2007, 1 cyklus trval asi 1 měsíc a celkem bylo provedeno 15 pasáží.

0. pasáž:

- čerstvé blastosporry houby byly získány submerzní kultivací (označeno **SK 0. pasáž**) za optimalizovaných podmínek
- zároveň byla otestována kvalita získaných blastospor (vitalita, virulence) standardizovanými biotesty, (**biotesty 0. pasáž**), výsledky byla podrobeny statistické analýze.

1. pasáž:

- blastosporry z SK 0. pasáže byly použity jako infekční agens pro 1. pasáž;
- suspenze byla naředěna na koncentraci řádově 5×10^8 spor/ml;
- naředěnou suspenzí bylo infikováno v aseptických podmínkách flowboxu 10 zdravých housenic ploskohřbetky smrkové čerstvě nakopaných nebo dlouhodobě skladovaných;
- po ponoření do připravené suspenze (na 5 sekund) byly housenice umístěny do vlhké komůrky a uloženy do termoboxu, temperovaného na 23 ± 1 °C ;

- po nárůstu mycelia s fruktifikačními orgány na povrchu housenic byl kmen přeočkován na pevnou agarovou půdu;
- aby se zabránilo nežádoucímu vlivu umělé půdy na kmen, čištění přes umělou kultivační půdu bylo prováděno 1×, v některých případech maximálně 2×;
- spory z vyčištěné kultury sloužily jako inokulum pro následnou submerzní kultivaci (označeno **SK 1. pasáž**);
- takto navržený způsob pasážování maximálně eliminoval vliv umělé půdy.

Následující pasáže:

- probíhaly stejným způsobem jako 1. pasáž, celkem bylo uděláno 15 pasáží.



Biotesty

Virulence byla otestována standardizovaným testem virulence na housenicích ploskohřbetky smrkové;

- k testu byly použity blastospory z příslušné submerzní kultivace;
- vzhledem k nedostatku housenic testy byly provedeny před pasážováním a pak po každé 5. pasáži (tj. po 0., 5., 10. a 15. pasáži);
- testy byly označeny jako biotest + příslušná kultivace (např. **biotest SK 5.pasáž**).
- bylo použito 30 larev na 1 opakování, 4 opakování (tj. ošetřeno 120 jedinců v 1 variantě);
- o titru cca 6×10^8 blastospor v 1 ml, nebo v případě kontroly - ponořením do destilované vody

Výsledky biotestů – (hodnoty LT95)) provedené na housenicích při kolísající teplotě 23 ± 1 °C (15 hod.) a 15 ± 1 °C (9 hod.) jsou uvedeny v tab. 2. Výsledky byly podrobeny statistické analýze (ANOVA) a post-testu (vícenásobné porovnání pomocí Bonferroniho testu)

Tab. 2. Hodnoty LT95 (dny) získané po 0, 5, 10 a 15 pasáži.

	1. opak.	2. opak.	3. opak.	4. opak.	průměr ± SD
biotest SK 0 pasáž	18,6	19,1	18,2	18,3	18,55± 0,40
biotest SK 5 pasáž	18,2	17,4	17,9	18,1	17,90± 0,36
biotest SK 10 pasáž	17,0	17,2	16,8	16,6	16,90± 0,26
biotest SK 15 pasáž	16,5	16,1	16,6	16,5	16,43± 0,22

Zhodnocení:

- 1) Statistická analýza potvrdila vysoce průkazný vliv pasážování na hodnotu LT95 (ANOVA, $F = 36.34$; $df = 3, 12$; $P < 0.0001$).
- 2) Vícenásobné porovnání průměrů odhalilo statisticky průkazné snížení LT u pasáží 10 a 15 oproti stavu před pasážováním (pasáž 0), nebyl však průkazný rozdíl mezi pasáží 5 a 0. Pasáže 10 a 15 byly průkazně odlišné od pasáže 5. Rozdíl mezi pasáží 10 a 15 nebyl průkazný.
- 3) Hodnota LT 95 kmene SEH.56.If. se po sérii 15 pasáží *in vivo* snížila z $18,6 \pm 0,4$ dní na $16,4 \pm 0,2$ dní (tj. asi o 2 dny).

2.6. Návrh technologie výroby prototypů nového bioagens (optimalizace kultivačních, finalizačních a skladovacích podmínek)

Možnost využití entomopatogenních hub, tedy i houby *I. farinosa*, ve formě biopreparátu - mykoinsekticidu závisí na schopnosti levně produkovat dostatečné množství vysoce virulentního konidiosporového nebo blastosporového materiálu, který by bylo možné s co nejmenšími náklady finalizovat, skladovat a aplikovat.

V předešlých pokusech (kap. 2.4.) jsem zjistila, že blastospory *I. farinosa* mají rychlejší účinek než konidiospory. Proto doporučuji, aby jako infekční agens byla používána právě tato reprodukční forma houby. Blastospory lze získat hloubkovou submerzní kultivací, která probíhá na třepačkách nebo ve fermentorech.

Optimalizace podmínek kultivace, tj. získání blastospor *I. farinosa* a jejich finalizace je nezbytným předpokladem pro vypracování technologického výrobního postupu přípravy biopreparátu.

V rámci optimalizace podmínek pro submerzní kultivaci blastospor *I. farinosa* a jejich finalizaci byly řešeny tyto okruhy otázek:

- Stanovení optimálního složení živného média.
- Stanovení optimálních fyzikálních podmínek.
- Kontinuální sledování produkce blastospor.
- Stanovení vhodné doby pro ukončení submerzní kultivace na třepačce.
- Srovnání dvou základních typů kultivací (tj. kultivace povrchové a submerzní) s ohledem na produkci spor.

Dále byla provedena:

- Optimalizace finalizace blastosporového koncentráту. Blastosporový koncentrát byl finalitován do několika variant - zmrazený nebo jako olejová suspenze určená pro ULV aplikaci.
- Optimalizace podmínek během dlouhodobého skladování bioagens.

Na závěr bylo provedeno testování kvality:

- Testování kvality (vitality a virulence) nakultivovaného materiálu finalizovaného několika prototypů bioagens. Kultivační optimalizační pokusy byly doplněny i kvalitativními hodnotícími kritérii (vitalita - testem klíčivosti a virulence - biotesty na housenicích *C. abietis*). (Výsledky tohoto testování jsou uvedeny v následující kapitole).

Získané výsledky týkající se vlastní technologie výroby nejsou v předloženém dokumentu prezentovány, protože budou složité jako podklad pro případné patentové řízení.

2.6.1. Testování kvality prototypů bioagens na bázi *I. farinosa* skladovaných po dobu 6 měsíců

Byly navrženy dvě možnosti finalizace blastosporového koncentrátu: (1) smísení s olejovým nosičem – (oleje povolené pro ochranu lesa: Istroekol, Dedal 90EC, Ikar 95 EC, Alimo), nebo (2) bez nosiče - samotný koncentrát pouze zamražený v mrazícím boxu.

Tab. 3. Zkušební vzorky

	zkratka prototypu	popis prototypu	podmínky skladování
1	OSBK (Istroekol)	olejový suspenzní blastosporový koncentrát (přidán přípravek Istroekol)	5 °C ± 1 °C
2	OSBK (Dedal)	olejový suspenzní blastosporový koncentrát (přidán přípravek Dedal)	5 °C ± 1 °C
3	OSBK (Ikar)	olejový suspenzní blastosporový koncentrát (přidán přípravek Ikar)	5 °C ± 1 °C
4	OSBK (Alimo)	olejový suspenzní blastosporový koncentrát (přidán přípravek Alimo)	5 °C ± 1 °C
5	ZBKIf	zmražený suspenzní blastosporový koncentrát získaný po kultivaci ve fermentoru	-15 až -20°C

Podmínky pokusu:

Prototypy a jejich skladování (všechny vzorky vyprodukovány na třepačce), kmen SEH.56.If , Kvalita (vitalita, virulence) byla hodnocena:

(A) testy klíčivosti blastospor;

(B) biotesty (na housenicích *C. abietis* při kolísavé teplotě 23±1°C (15 hod.)/ 15±1°C (9 hod.); 3. opakování (celkem 90 housenic)

Zhodnocení:

U olejových suspenzních blastosporových koncentrátů **OSBK(Istroekol)** , **OSBK(Dedal)**, **OSBK(Ikar)** a **OSBK(Alimo)** i zmraženého blastosporového koncentrátu (**ZBKIf**) byla testována účinnost v laboratorních podmínkách s těmito výsledky: ZBKIf zmražený blastosporový koncentrát (skladovaný při -15 až -20°C) si ponechal po celou dobu skladování (6 měsíců) stejně vysokou kvalitu. Protože tato formulace vykazovala i dobré výsledky v biotestech s vajíčky ploskohřbetky (kap. 2.8.), je možné ji jednoznačně doporučit v této fázi výzkumu pro dané účely jako nevhodnější. Ke zhoršení kvality došlo po 6 měsících skladování u všech olejových prototypů. U preparátů OSBK Dedal, OSBK Ikar zhoršení nastalo již po 3 měsících skladování. U preparátu OSBK Istroekol až po 4 měsících skladování. Pouze prototyp OSBK Alimo vykazoval dobrou kvalitu až do 4. měsíce skladování, po 5 měsících byla jeho kvalita již neuspokojivá.

2.7. Urychlení průběhu nákazy nakličováním spor

Na základě vlastních zkušeností a údajů získaných z literatury byly stanoveny tyto kritické faktory průběhu houbové infekce: 1) koncentrace spor, 2) doba působení bioagens na vajíčka, 3) abiotické podmínky (teplota, vlhkost, UV záření).

Z těchto faktorů lze v praxi reálně ovlivnit pouze první dva faktory:

- 1) koncentraci spor
- 2) dobu působení bioagens na vajíčka – tj. dobu průběhu infekce.

Zaměřila jsem se na zkrácení doby průběhu infekce. To se podařilo aktivací a synchronizací klíčení blastospor, a to vlastní originální metodou „provzdušnění blastospor v živném médiu“. Ze stejných důvodů jako u předchozí kapitoly (patentové řízení) není zde uvedena vlastní metodika. Uvádím pouze výsledky testování účinnosti této metody v laboratorních biotestech na housenicích ploskohřbetky

2.7.1. Účinnost nenaklíčených a naklíčených blastospor *I. farinosa*

Podmínky testu:

- standardizovaný biotest na housenicích *C. abietis* (4 opakování na testovanou variantu , tj. $4 \times 30 = 120$ housenic na testovanou variantu);
- *I. farinosa* kmen SEH.56. If, 1. pasáž, prototyp: ZBKIf – skladovaný 1 měsíc;
- data byla podrobena nepárovému *t*-testu;
- a) testováno při stálé teplotě $23 \pm 1^\circ\text{C}$
- b) testováno při kolísavé teplotě $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (15 hod.)/ $15 \pm 1^\circ\text{C}$ (9 hod.);

	testovaná varianta	naklíčenost	titr
1.	nenaklíčená suspenze	0	6×10^8 blastospor/1 ml
2.	naklíčená suspenze	80 %	6×10^8 blastospor/1 ml
3.	kontrola: ošetřeno v 0,025% Glanaponu		

Zhodnocení:

a) testováno při stálé teplotě $23 \pm 1^\circ\text{C}$

Statisticky významně rychlejší účinek na housenice ploskohřbetky (nepárový *t*-test, $t = 4,512$, $df = 6$, $P = 0,0041$) byl zjištěn u naklíčené suspenze (průměrná hodnota $LT_{95} = 10,30$ dne, $SD \pm 0,32$) oproti nenaklíčené suspenzi (průměrná hodnota $LT_{95} = 11,35$ dne, $SD \pm 0,34$). Potvrdilo se tak urychlení průběhu nákazy u housenic *C. abietis* (po naklíčení blastospor) asi o 1 den.

b) testováno při kolísavé teplotě $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (15 hod.)/ $15 \pm 1^\circ\text{C}$ (9 hod.);

Statisticky významně rychlejší účinek na housenice ploskohřbetky (nepárový *t*-test, $t = 3,1701$, $df = 6$, $P = 0,0193$) byl zjištěn u naklíčené suspenze (průměrná hodnota $LT_{95} = 17,58$ dne, $SD \pm 0,46$) oproti nenaklíčené suspenzi (průměrná hodnota $LT_{95} = 18,60$ dne, $SD \pm 0,45$). Urychlení průběhu nákazy u housenic *C. abietis* (po naklíčení blastospor) bylo stejně jako v případě testování při stálé teplotě asi o 1 den.

Výsledky z laboratorní infekce housenic *C. abietis* ukázaly, že navrhovaný originální způsob aktivace blastospor *I. farinosa* označený jako "nakličování blastospor provzdušněním média" splňuje požadavky (je levný, prakticky dostupný, jednoduchý, technicky nenáročný a účinný). Hodnota LT_{95} se snížila asi o 1 den. Domnívám se, že v případě infekce vajíček ploskohřbetky by to mohlo mít zásadní význam.

2.8. Laboratorní testování účinnosti prototypů bioagens na vajíčkách ploskohřbetky

2.8.1. Přípravné práce pro testování na vajíčkách ploskohřbetky



K tomu, aby mohlo být přistoupeno k testování na vajíčkách ploskohřbetky, byly provedeny následující přípravné práce:

- 1) příprava testovacího zařízení;
- 2) hledání způsobu získání dostatečného množství vajíček ploskohřbetky.

1) Příprava testovacího zařízení

Laboratoř ochrany rostlin v Olešné byla dovybavena zařízením pro testování:

Z Entomologického ústavu AVČR byla zapůjčena **Potterova postřikovací věž**, byl k ní zakoupen vhodný kompresor a byla provedena kalibrace hustoty (dávkování) postřiku.

2) Hledání způsobu, jak získat dostatečné množství vajíček ploskohřbetky

Dospělci ploskohřbetky *C. abietis* byli chytáni:

- 1) entomologickými sítěmi;
- 2) ručním sběrem do lékovek;
- 3) pomocí síťoviny.

Chycené samičky byly vypouštěny do izolátorů, kde vykladly vajíčka. Izolátory byly postaveny přímo na lokalitě, kde byl prováděn odchyt samiček.

Během května (15.5.-18.5. 2006) v předstihu společně s pracovníky LZ Kladská, LS Františkovy Lázně a KI Karlovy Vary (LČR s.p.) jsme vybrali vhodné lokality se smrkovými porosty pro umístění 3 dřevěných konstrukcí, které byly začátkem června potažené síťovinou proti hmyzu;

- izolátor č. 1 (rozměry: 4,8 × 4,8 × 2m)

lokalita: LS Františkovy Lázně, revír Mohelno, porost 432C11a; dřevěná konstrukce byla potažena umělohmotným pletivem;

- izolátor č. 2 (rozměry: 3,6 × 4,4 × 1,8m).

Dřevěná konstrukce byly potaženy pláštěm z monofilu; lokalita: LZ Kladská, lesní úsek Mokřiny, porost 335C11/1P, 840 m.n.m.



Vzhledem k příznivému průběhu počasí rojení

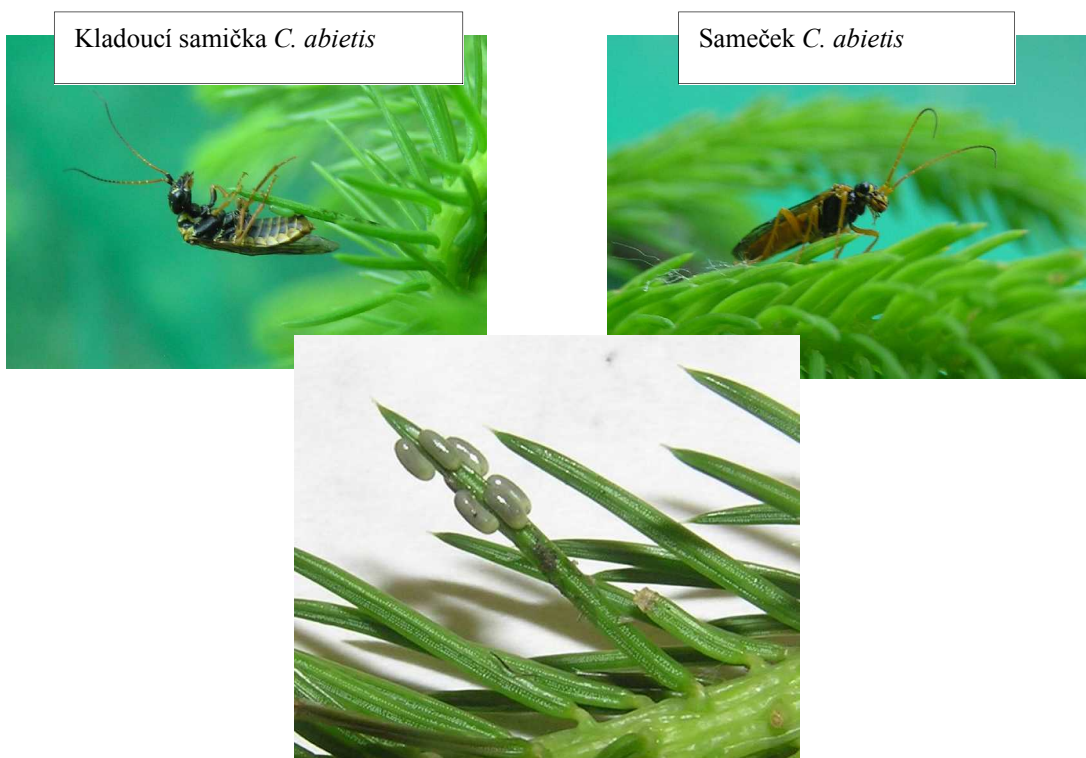
Izolátor č.2.

ploskohřbetky probíhalo v jedné vlně přibližně od 8.6. do 21.6.2006. Podařilo se odchytit asi 1000 samiček a velké množství (cca 5000 ks) samečků.

Samičky byly jednotlivě uzavřeny do lékovek a bezprostředně přeneseny do izolátoru, kde byly vypuštěny. Samečkové byli nasmykáni do entomologické sítě a též ihned vypuštěni do izolátoru, kde docházelo k páření a kladení vajíček. Ukázalo se, že v izolátoru z monofilu samičky přežívaly lépe, což se odrazilo i v počtu nalezených vajíček. Dále se tímto způsobem podařilo omezit přístup vaječných parazitů *Trichogramma* spp. k vajíčkům, což umožnilo získat jejich zdravé snůšky.

Za pomoci pracovníků LČR s.p. jsme 19., 26. a 27.6. 2006 vystříhali větvičky s nakladenými vajíčky, které jsem použila po převozu (v chladicí tašce při +10 °C) do laboratoře v Olešné pro laboratorní testy.

K laboratornímu testování byla též použita vajíčka ploskohřbetky, jejichž sběr provedli 29. a 30.6. 2006 na území Krkonoš pracovníci KRNaPu.



2.8.2. Výsledky testování účinnosti na vajíčkách v laboratorních podmínkách

- Testování účinnosti na vajíčkách ploskohřbetky probíhalo v laboratorních podmínkách za standardizovaných podmínek [při kolísající teplotě 23 ± 1 °C (15 hod.) a 15 ± 1 °C (9 hod.)].
- Suspenze spor příslušného bioagens byla aplikována pomocí Potterovy postřikovací věže.
- Po ošetření byla větvička (resp. jehlice s vajíčky) umístěna na filtrační papír (odsaje přebytečnou suspenzi) a uložena do vlhké komůrky.
- Jako kontrola byla použita destilovaná voda.
- Po 24 hodinách byla z testované varianty pravidelně odebrána usmrcená vajíčka, popř. vylíhlé malé housenice, a byla vypočtena mortalita. Test trval tak dlouho, než byla dosažena konečná mortalita.

Účinnost 5 prototypů bioagens při různých dávkách

Podmínky pokusu:

- 100 % RH, - při kolísající teplotě 23 ± 1 °C (15 hod.) a 15 ± 1 °C (9 hod.), kmen SEH.56.If

Varianty: (po 1. měsíci skladování)

- OSBK (Istroekol)
- OSBK (Dedal)
- OSBK (Ikar)
- OSBK (Alimo)
- ZBKIf

při různých dávkách:

- 5×10^9 spor/m²
- 5×10^{10} spor/m²

V každé testované variantě byla provedena 4 opakování (50 vajíček na 1 opakování).



Tab. 4. Testování účinnosti zkušebních vzorků na vajíčkách ploskohřbetky

prototyp dávka	ZBKIf	OSBK (Dedal)	OSBK (Ikar)	OSBK (Alimo)	OSBK (Istroekol)
5×10^9 spor/m ²	9,60 ± 0,39	95 % mortalita nebyla dosažena	95 % mortalita nebyla dosažena	11,36 ± 0,54	95 % mortalita nebyla dosažena
5×10^{10} spor/m ²	7,58 ± 0,30	8,45 ± 0,48	8,40 ± 0,54	8,00 ± 0,33	8,38 ± 0,35

Zhodnocení:

1) Dvoucestná analýza variance (two-way ANOVA) potvrdila statisticky významný vliv dávky ($F=1199,78$; $P=0,0005$) i prototypu ($F=6458,40$; $P=0,0005$) na průměrnou hodnotu LT95. **Při aplikaci prototypů v dávce 5×10^{10} spor/m² byla dosahována statisticky vyšší účinnost.** Např. u prototypu ZBKIf byl rozdíl při použití různých dávek asi 2 dny, což je v případě vývoje vajíček ploskohřbetky podstatné.

2) **výsledky u dávky 5×10^9 spor/m²: Prototyp ZBKIf byl statisticky vysoce významně účinnější** (nepárový t-test, $t = 6,0951$, $df = 6$, $P = 0,00009$) **než ostatní prototypy. Z olejových přípravků byla dosažena 95 % mortalita pouze u prototypu OSBK Alimo.** (Pokus je potřeba zopakovat a ověřit výsledky v terénu).

3) **výsledky u dávky 5×10^{10} spor/m²:** Vliv prototypu na účinnost byl statisticky průkazný (ANOVA; $F = 3.2726$, $df = 4, 19$; $P=0,0407$). Průměrná hodnota LT95 byla statisticky významně nižší u prototypu ZBKIf oproti prototypu Dedal OSBK. **Rozdíly mezi ostatními prototypy (ZBKIf, OSBK Ikar, OSBK Alimo, OSBK Istroekol) nebyly na hladině 0,05 statisticky významné (Tukey test).** Ovšem pokud by se měla v praxi používat tato dávka tj. 5×10^{10} spor/m², pak by se na 1 ha muselo aplikovat 25 kg blastosporového koncentráту BK, (2×10^{10} spor/1 g BK). To je v případě olejových preparátů při ULV aplikacích (ultranízkoobjemová aplikace) technicky nemožné, protože doporučený objem je u nich od 0,5 do 5 l/ha.

4) **Proto lze pro praktické použití jednoznačně doporučit pouze prototyp ZBKIf.**

Tento závěr podporují i následující zjištění:

- Účinnost ZBKIf v dávce 5×10^{10} spor / m² byla testována i v terénu (viz. kap. 2.9.). Ošetření tímto biopreparátem snížilo populaci housenic ploskohřbetky asi o dvě třetiny.
- ZBKIf vykazoval i nejlepší parametry po dlouhodobém skladování. Jeho kvalita se nezměnila ani po 6 měsících skladování (-15 až -20°C) na rozdíl od olejových prototypů (5°C $\pm$ 1°C).

Poznámka : Pro jednoznačné potvrzení tohoto závěru by bylo vhodné pokusy ještě zopakovat. Měli jsme v úmyslu provést to v roce 2007. Bohužel k významnějšímu rojení ploskohřbetky v tomto roce nedošlo. Dojde-li proto v některém z příštích let k silnějšímu rojení, bylo by účelné pokus ještě zopakovat a otestovat pro srovnání v terénu i variantu ZBKIf a OSBK Alimo v dávce 5×10^9 spor/m².

Vliv relativní vzdušné vlhkosti na účinnost bioagens

Podmínky pokusu:

- prototyp ZBKIf (1. měsíc skladovaný),
- při kolísající teplotě 23 ± 1 °C (15 hod.) a 15 ± 1 °C (9 hod.), kmen SEH.56.If
- 5×10^{10} spor/m²

testované varianty :

- 60 % RH, - 70 % RH, - 80 % RH, - 90 % RH, - 100 % RH

Zhodnocení:

Vliv vlhkosti na účinnost byl statisticky vysoce průkazný (ANOVA, $F = 25.3869$, $df = 2, 11$; $P=0,0002$). Průměrná hodnota LT95 byla statisticky významně nižší při vlhkosti 90 a 100 % oproti vlhkosti 80 %. Rozdíly mezi 90 a 100 % vlhkosti nebyly na hladině 0,05 statisticky významné (Tukey test). Při vyšších hodnotách relativní vzdušné vlhkosti - cca 90 až 100 % - docházelo na povrchu vajíček k bohatému nárůstu mycelia. Při 60 a 70 % vlhkosti nebyla 95 % mortalita dosažena.

2.9. Terénní testování účinnosti prototypů bioagens na vajíčkách ploskohřbetky

Terénními pokusy byla stanovena účinnost preparátu ZBKIf:

1. Po 6 měsících po aplikaci, a to nepřímo porovnáním hmotnosti předivových vaků z jednotlivých stromků ošetřené a neošetřené varianty.
2. Po jednom roce bylo provedeno další hodnocení rozbořem zeminy a stanoven počet diapauzních housenic.

Kromě toho nás zajímalo, zda nákaza způsobená preparátem ZBKIf nepropukne později až u housenic přezimujících v půdě, kde jsou vhodné podmínky pro rozvoj mykózy. Proto byly při rozboru nalezených housenic vyčleněni jedinci napadení houbou.

2.9.1. Materiál a metodika

Přípravné práce pro zajištění pokusu

K pokusu byl použit izolátor č.3. (rozměry: $5,3 \times 10,3 \times 1,8$ m), který byl umístěn nad mladý porost smrků (celkem 18 stromků) na lokalitě: LZ Kladská, lesní úsek Mokřiny, porost 328D1, 820 m.n.m.



Projekt Grantové služby LČR

Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycetes) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové Cephalcia abietis ve stádiu vajíček a prvých instarů

Dřevěnou konstrukci pracovníci LČR s.p. začátkem června 2006 potáhli umělohmotnou síťovinou proti hmyzu.

Ručně nasbírané samičky (cca 500 ks) byly jednotlivě uzavřeny do lékovek a bezprostředně vypuštěny do izolátoru. Samečkové byli ve velkém množství nasmykáni do entomologické sítě a z ní ihned vypuštěni do izolátoru. Tam došlo k páření a vyladení vajíček.



Zajímalo nás, zda nákaza nepropukne později u housenic, které unikly nákaze na stromě a budou přezimovat v půdě, kde jsou vhodné podmínky pro rozvoj mykózy. Proto kolem každého smrčku v izolátoru byl odstraněn travní porost a zemina. Na odhalené kořeny byla pak položena umělohmotná síťovina, na níž byl umístěn dřevěný rám o velikosti 1×1m. Rám byl vyplněn nejdříve minerální zeminou a poté překryt humózním substrátem.



Metodika aplikace

Aplikace spor byla provedena 26.6.2006. Porovnávali jsme vývoj vajíček ploskohřbetky na desetiletých stromcích smrku ošetřených po jejich naklazení prototypem ZBKIf (kmen SEH.56.If) s vývojem vajíček na neošetřených (kontrolních) stromcích.

Na 9 smrčků byl ručním postřikovačem aplikován postřik blastospor *I. farinosa* v dávce 5×10^{10} spor na m^2 . Blastospory byly před aplikací cca 4 měsíce skladovány při -15 až $-20^\circ C$. Při aplikaci byl ošetřovaný stromek izolován igelitovou fólií od okolních stromků. Jako kontrola bylo použito zbývajících devět neošetřených smrčků.



2.9.2. Výsledky

a) 1. hodnocení (září 2006)

Dne 7.9.2006 bylo provedeno 1. hodnocení biotestu. Zvolila jsem nepřímou metodu hodnocení účinnosti. Z každého stromku byly vypreparovány předivové vaky (trus + zbytky jehličí) ploskohřbetky a byla stanovena jejich hmotnost (výsledky jsou uvedeny v tab.5.). Při hodnocení byla porovnána hmotnost předivových vaků z jednotlivých stromků (opakování) ošetřené a neošetřené varianty.

Tab.5. Výsledky hodnocení č.1.

testovaná varianta	hmotnost předivových vaků (g)	
	zmražené blastospory <i>I. farinosa</i> v dávce 5×10^{10} spor/m ²	kontrola – neošetřeno
průměr ± SD	4,18 ± 1,42	11,12 ± 1,59
celková hmotnost předivových vaků	37,66	100,1

Zhodnocení:

V ošetřené variantě byla průměrná hmotnost předivových vaků na 1 stromek 4,18 g (SD±1,42) zatímco v kontrole 11,12 g (SD ± 1,59). Rozdíl mezi zásahem a kontrolou byl statisticky vysoce průkazný (nepárový *t*-test, *t* = 9,7706 df = 16, *P*<0,0001). Na základě těchto dat lze usuzovat, že ošetření biopreparátem snížilo populaci housenic asi o dvě třetiny (62,4 %).

b) 2. hodnocení (červen 2007)

Ve dnech 11.-13.6. 2007 bylo provedeno další hodnocení:

- 1) stanovení počtu živých diapauzních housenic v zemině uvnitř truhlíků;
- 2) stanovení počtu houbou nakažených diapauzních housenic v zemině uvnitř truhlíků.

Tab.6. Výsledky hodnocení č.2.

testovaná varianta	zmražené blastospory <i>I. farinosa</i> v dávce 5×10^{10} spor na m ²		kontrola – neošetřeno	
	zdravé housenice	housenice infikované mykózou	zdravé housenice	housenice infikované mykózou
průměr	7,1±3,5	0,6±0,7	20,4±6,8	0
celkový počet housenic	64	5	184	0

Zhodnocení:

1) V ošetřené variantě bylo celkem nalezeno jen 64 zdravých diapauzních housenic (v každém truhlíku v průměru 7,1 ± 3,5), v kontrole to bylo pod stejným počtem smrků 184 zdravých housenic (tj. 20,4 ± 6,8 housenice na truhlík). Rozdíl mezi zásahem a kontrolou byl statisticky vysoce průkazný (nepárový *t*-test, *t* = 5,2567 df = 16, *P*<0,0001).

Lze tedy vyvodit, že ošetření biopreparátem snížilo populaci housenic o **65,2 %**, což zhruba odpovídá i výsledkům získaným při nepřímém hodnocení pomocí váhy předivokých vaků (62,4 %).

2) V ošetřené variantě byly zaznamenány smrtelné mykózy vyvolané houbou *I. farinosa* u 5 diapauzních housenic (žádný další druh houby nebyl zjištěn). Z celkového počtu 69 nalezených jedinců je to 7 %. Dá se předpokládat, že se jedná o stejný kmen SEH.56.If, který byl použit jako infekční agens při pokusu. Po zavedení příslušných metodik plánují odizolované kmeny podrobit genetické analýze k potvrzení této domněnky. V kontrole nebylo u nalezených housenic zaznamenáno žádné houbové onemocnění. Rozdíl mezi zásahem a kontrolou byl statisticky vysoce průkazný (nepárový *t*-test, $t = 2,4333$, $df = 16$, $P = 0,0271$).



Zemina truhlíku byla pečlivě prohlédnuta.



U některých diapauzních housenic byla zaznamenána silně vyvinutá mykóza vyvolaná houbou *I. farinosa*.

2.9.3. Diskuse a závěr

Na základě výsledků našeho výzkumu v terénu (redukce populace ploskohřbetky asi o dvě třetiny) můžeme konstatovat, že v laboratoři vyvinutý biopreparát ZBKIf v dávce 5×10^{10} blastospor na m^2 účinně infikuje vajíčka a mladé housenice ploskohřbetky smrkové, a může se pravděpodobně podílet i na snížení populační hustoty přemnožených diapauzních larev škůdce. Odborníci v oboru aplikované entomologie se obecně shodují, že dvoutřetinové snížení početnosti škůdce houbovým biopreparátem je možno považovat za úspěch. Vzhledem k tomu, že testování proběhlo na omezeném počtu housenic, tento výsledek by bylo třeba ještě ověřit rozsáhlejším velkoplošným pokusem, pokud by se mělo bioagens připravovat k použití na komerční bázi.

Výsledky získané v terénních pokusech na lokalitě Kladská odpovídají výsledkům získaným v roce 1994 v pokusech v Krkonoších. Tam byla velkoplošně na 4 ha aplikována suspenze připravená ze zmrazeného blastosporového koncentrátu *I. farinosa* (postřikem z vrtulníku) a na 80 ha byl aplikován insekticid Dimilin®. Po vyhodnocení byla zaznamenána 64,6 % morta-lita populace ploskohřbetky po aplikaci houby *P. farinosus*, 78,4 % mortalita u insekticidu Dimilinu a 13,5 % mortalita v kontrole (**Prenerová, 1994a**). Podrobně o tom referuje dr. **Vaněk (1995)** z NP Krkonoše.

Domnívám se, že je nutné v diskusi o účinnosti bioagens v terénu zmínit ještě další fenomén. Vzhledem k tomu, že se s každou aplikací houbového agens zvyšuje jeho zásoba v ekosystému, dá se předpokládat, že se houba bude v tomto prostředí postupně přirozeně etablovat. Proto předpokládám, že se může účinek biopreparátu, na rozdíl od rychle degradujících toxických pesticidů, projevit i v následujících generacích škůdce. Jsem přesvědčena o tom, že tato strategie „dlouhodobějšího (protrahovaného) působení introdukovaného bioagens v populacích škůdce“ si zaslouží pozornost, a proto bych se jí chtěla věnovat i v dalším výzkumu. Předpokládám, že ze stejných hypotéz vychází i prof. Z. Landa (JČU, Č. Budějovice), který letos zahájil sérii pokusných aplikací houbového preparátu na bázi *Beauveria bassiana* na lokalitách napadených lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) na území NP Šumava. V rozhovoru pro deník MF Dnes (ze 17.8.2007) uvádí: „S šedesáti až sedmdesáti procenty úmrtnosti brouků bych byl spokojen, ale je to běh na delší trať, protože výsledky se samozřejmě dostaví až později, až se houba začne v přírodě sama množit“. Kromě toho klade **Landa a kol. (2007)** důraz na respektování původu kmenů, které jsou pro indukci nákaz v lokálních populacích lýkožrouta používány. Jeho cílem je dosáhnout stavu, kdy na určitou lokalitu bude reintrodukován pouze kmen, který z dané lokality pochází, a zamezit tak vnesení „exotických kmenů“, což je typický důsledek používání komerčních biopreparátů. Stejný názor zastáváme i my, proto jsme značné úsilí v první fázi projektu věnovali izolaci nativních kmenů z lokalit výskytu ploskohřbetky.

Při diskusi o výhledu praktického použití by měl být zmíněn i názor jednoho z oponentů, doc. L. Jankovského (MZLU, Brno): „Stejně jako v předchozích letech však pochybuji o širší aplikovatelnosti *P. farinosus* v biologickém boji proti ploskohřbetkám. V souvislosti se současnými problémy lesnictví, resp. pěstování jde o okrajové téma, ploskohřbetky však mohou být jedním z biotických agens, které budou citlivě reagovat na klimatické extrémy a zvýšenou stresovou zátěž smrku. Za této situace lze předpokládat, že jakákoli metoda snížení populační hustoty tzv. škůdce řízením negativní zpětné vazby bude významná. Jde rovněž o téma, které je prioritou ES, resp. jedním z požadavků je racionalizace používání ochranných a obranných postupů. Z výsledků vyplývá řada dílčích závěrů, které je možno aplikovat v příbuzných oblastech. Významným momentem je aplikace proti vajíčkům ploskohřbetek, které by bylo možné do jisté míry použít i u příbuzných druhů hmyzu.“ Zejména s druhou částí úvahy se ztotožňuji, a proto plánuji, že ve výzkumu alternativního použití nově vyvinutého bioagens budu ve spolupráci s LČR s.p. pokračovat i v dalších letech.

2.10. Zdokumentování průběhu infekce vajíček a prvních instarů ploskohřbetky

Jelikož laboratorní i terénní pokusy s infekcí vajíček ploskohřbetky smrkové (*C. abietis*) byly velice slibné, nabízela se otázka, zda je proces prorůstání a namnožení houby procesem patogenním, nebo zda houba roste pouze saprofytický na organickém substrátu obalu hmyzího vajíčka? A jak vlastně tento proces probíhá?

Na tyto otázky jsme se snažili odpovědět za pomoci elektronové mikroskopie, konkrétně rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Pro netradiční zobrazení pronikání hub z vnějšího prostředí do vnitřní dutiny těla byly vyzkoušeny i kryometody.

Metodika sběru a infekce vajíček

Ke studiu průběhu nákazy způsobené houbou *I. farinosa* byla použita čistá populace vajíček ploskohřbetky smrkové *C. abietis*. Vajíčka byla získána na území LZ Kladská v červnu 2006, kde jsme je nechali vyklást rojivci umístěnými do velkých venkovních izolátorů (viz. kap.2.8.) Vajíčka byla poté převezena v chladicím boxu (10 °C) do laboratoře v Olešné.

Infekce vajíček ploskohřbetky probíhala v laboratoři za standardizovaných podmínek [při kolísající teplotě 23 ± 1 °C (15 hod.) a 15 ± 1 °C (9 hod.)]. Suspenze spor zmrazeného blastosporového koncentráту *I. farinosa* – kmen SEH.56.If (ZBKIf) o dávce 5×10^{10} spor/m² byla aplikována pomocí Potterovy postřikovací věže. Blastosporový koncentrát byl získán submersní kultivací, skladován po dobu jednoho měsíce (-15 až -20°C). Po ošetření byla větvička (resp. jehlice s vajíčky) umístěna na filtrační papír (ten odsál přebytečnou suspenzi) a uložena do vlhké adaptované komůrky.

Vzorky, tj. jednotlivé jehlice s vajíčky či prvými instary, byly odebírány k fixaci:

- 1) před ošetřením (neinfikovaná vajíčka);
- 2) bezprostředně po ošetření (0 hodin);
- 3) po 24, 48, 72, 96, 120 hodinách
- 4) po 15 dnech inkubace.

Metodika zpracování vzorků

Zpracování vzorků provedli běžnými postupy pracovníci Laboratoře digitálního zobrazování v biologii Entomologického ústavu a Laboratoře elektronové mikroskopie, Biologického centra AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Vzorky byly zpracovány pro:

- 1) optickou mikroskopii (OM);
- 2) rastrovací (skanovací) elektronovou mikroskopii (SEM);
- 3) prozařovací (transmisní) elektronovou mikroskopii (TEM).

Výsledky

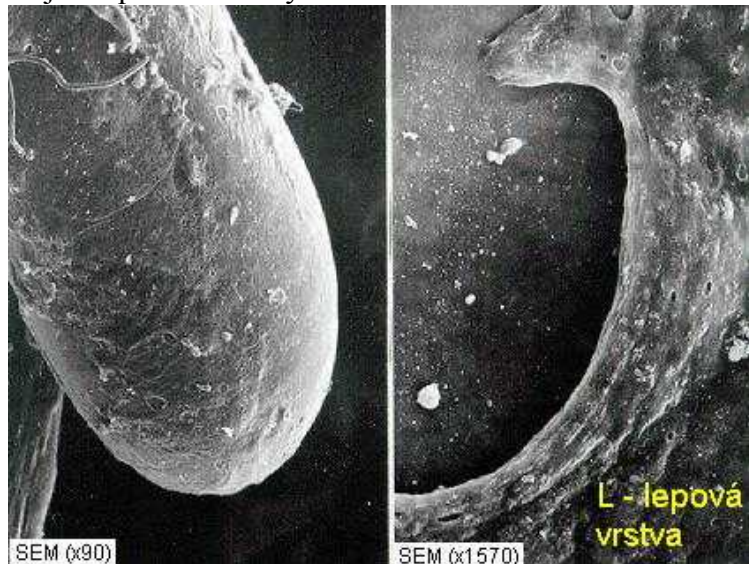
V úvodu této kapitoly je třeba připomenout tři hlavní fáze generalizovaného vývojového cyklu entomopatogenních hub (**Landa, 1998**):

1. *Přichycení a klíčení konidií (konidiospor, blastospor) na povrchu kutikuly hostitele.*
2. *Pronikání patogena do tělní dutiny (parazitická fáze vývojového cyklu).* Po proniknutí patogena do tělní dutiny dochází zpravidla k rychlé kolonizaci jednotlivých tělních tkání a orgánů. Pro tuto fázi vývojového cyklu je typický přechod vláknitých forem hub na rychle se dělící a pomnožující tělíska - tzv. *hyfová*, resp. *kvasničná tělíska, blastospory*. Tato tělíska se rychle namnožují (dělení pučením, exponenciální růst titru v hemolymfě) a ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele, který je v této fázi vývoje mykózy již usmrčen. Mumifikací hostitele končí druhá, parazitická fáze vývojového cyklu a nastupuje finální fáze.
3. *Externí sporulace a tvorba konidiospor nové generace (saprofytická fáze vývojového cyklu).*
Pro tuto fázi vývoje jsou opět typické vláknité struktury. Patogen prorůstá na povrch usmrčeného hostitele a postupně vytváří hustou myceliální síť, která porůstá celý povrch těla. Na vzdušném myceliu se postupně vytváří konidiofory, na kterých se ve finální fázi vývojového cyklu formují nové konidiospory.

Infikace vajíček ploskohřbetky smrkové

Neinfikované vajíčko:

Vajíčko ploskohřbetky se skládá z několika vrstev:

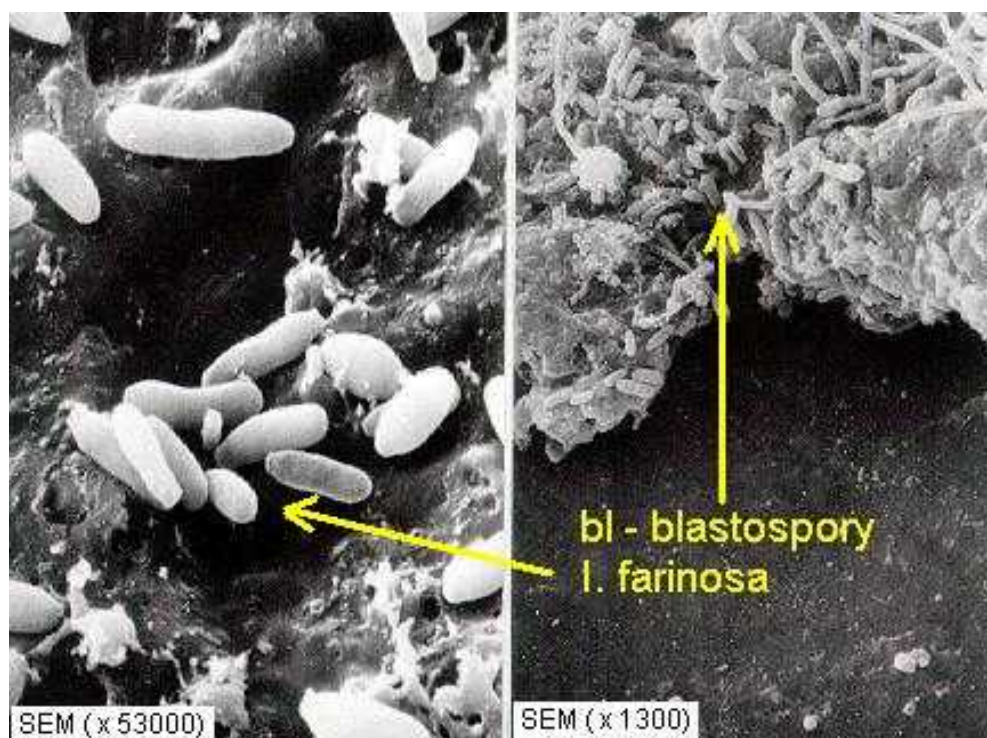


- 1) lepové vrstvy
- 2) voskové vrstvy
- 3) chorionu A
- 4) chorionu B
- 5) embrya.

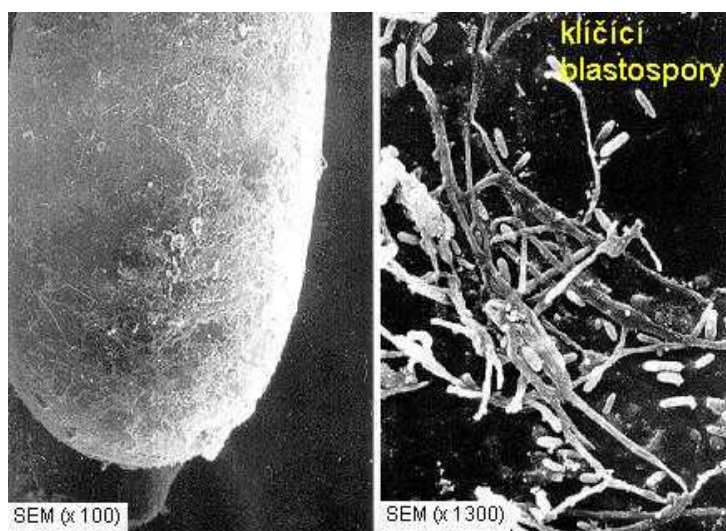
Na snímku je patrná lepová vrstva vajíčka, kterou je vajíčko přichyceno ke svému podkladu, tj. k jehlici.

O hodin po ošetření:

Blastospory ulpívají na vrchní lepové vrstvě vajíčka, která je díky svému složení (obsahuje mukoproteiny) vhodným živným substrátem pro jejich klíčení a růst hyf.

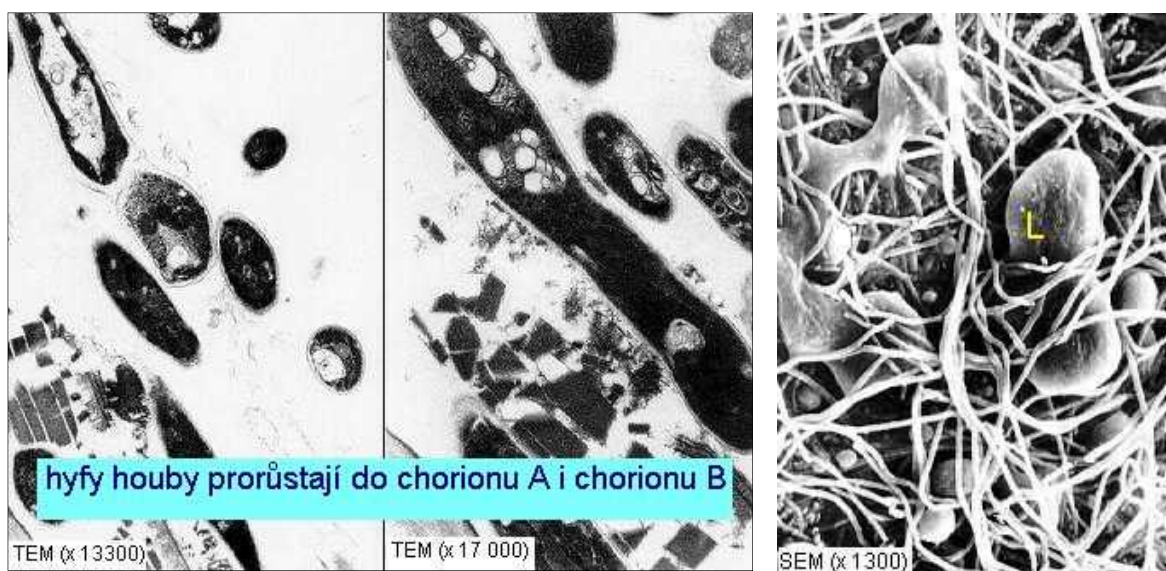


24 hodin po ošetření:



Blastospory *I. farinosa* uchycené v lepové vrstvě jsou již z velké části naklíčené a pronikají do ní svými hyfami. Klíčky blastospor i prorůstající hyfy často kopírují před vlastním průnikem do voskové vrstvy její povrch. I tato vrstva je již v dané fázi perforována prorůstajícími hyfami. Embryo není ještě v této fázi zasaženo.

48 hodin po ošetření:



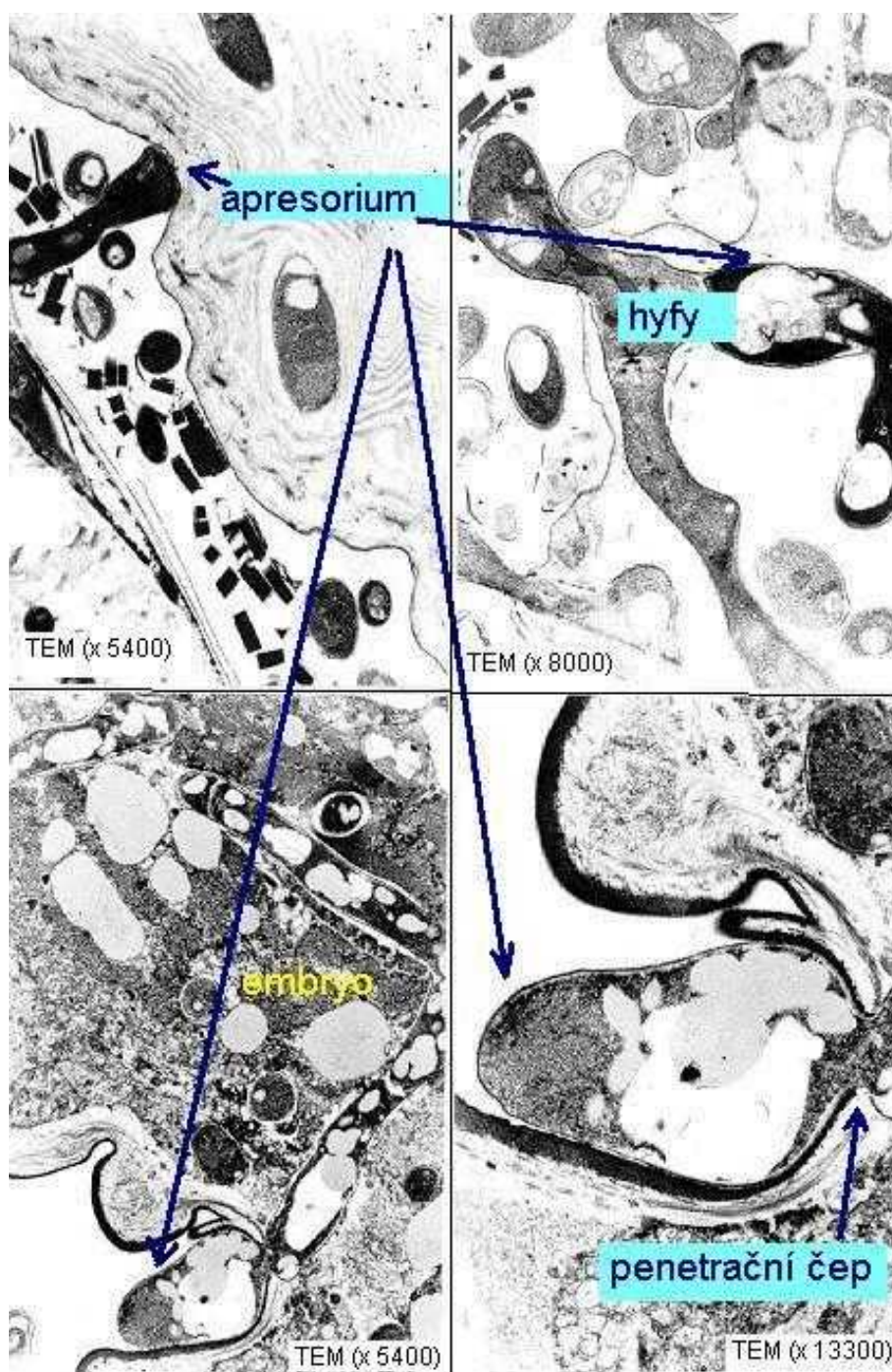
Prorůstající hyfy zasahují už do chorionu A i chorionu B. Primární formy prorůstajících hyf jsou tmavé od velkého množství elektron pozitivních ribozomů. Se stárnutím se hyfy postupně vakuolizují. Po 48 hodinách infekce je lepová vrstva již značně narušená.

72 hodin po ošetření:

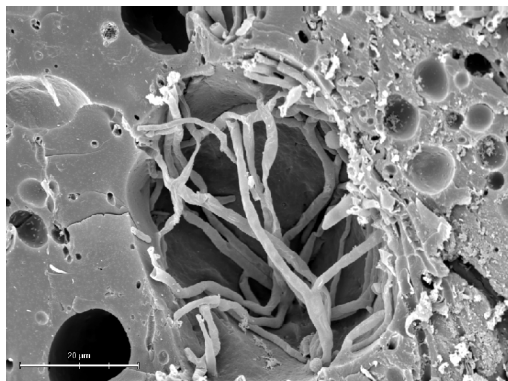
V této fázi dochází již k průniku do embryonální tkáně. Jak při průniku do chorionu A, tak do embryonální tkáně **dochází k tvorbě terčku (apresoria)**. Ten by se mohl nejlépe

charakterizovat jako ztlustění vytvořená před místem průniku, kde dochází k tvorbě penetračního čepu (penetration peg). Po průniku se penetrační čep opět rozšíří a vytvoří tzv. průnikovou hyfu (penetration hypha).

Apresoria představují aktivní agresi houby vůči hostiteli.



96 hodin po ošetření:

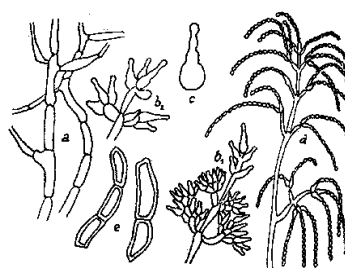
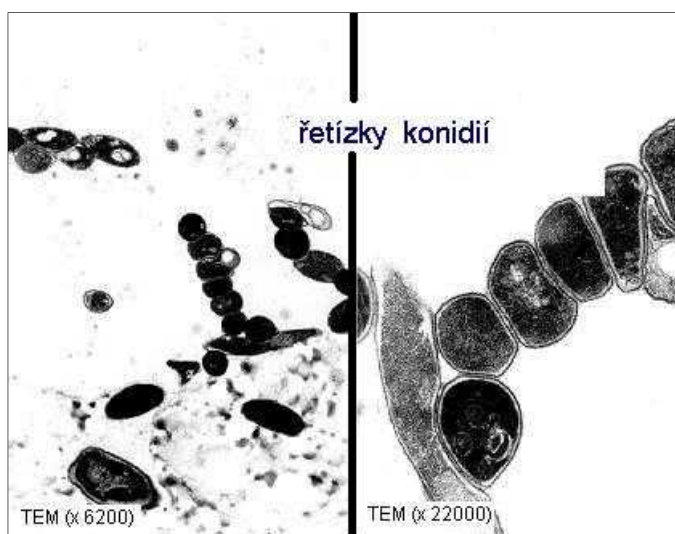


Hyfy směřují a prorůstají do dýchacích orgánů embrya – tracheí.

120 hodin po ošetření:

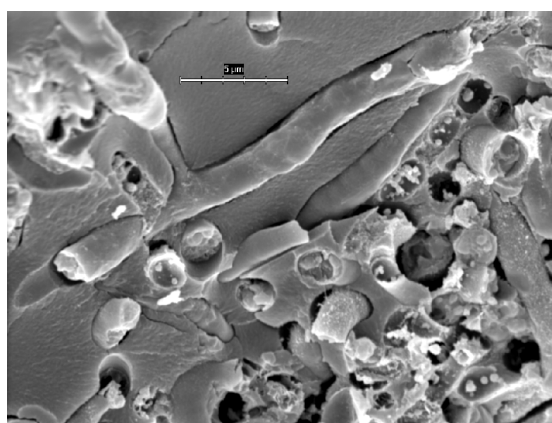
Na povrchu vajíčka dochází k tvorbě konidií *I. farinosa*, jež se tvoří na povrchu vajíčka v typických řetízcích.

Průřez řetízkem konidií je vidět na snímku.



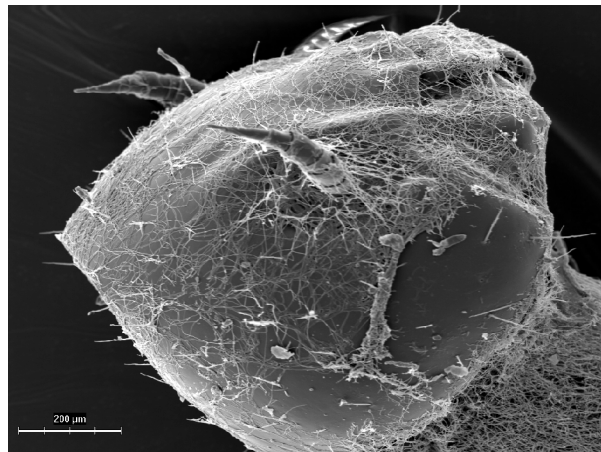
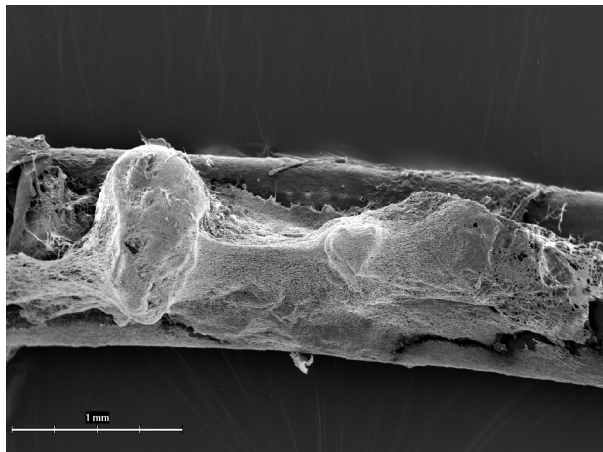
Po 15 dnech:

Vajíčko je zcela vyplněno rozrůstajícím se myceliem houby



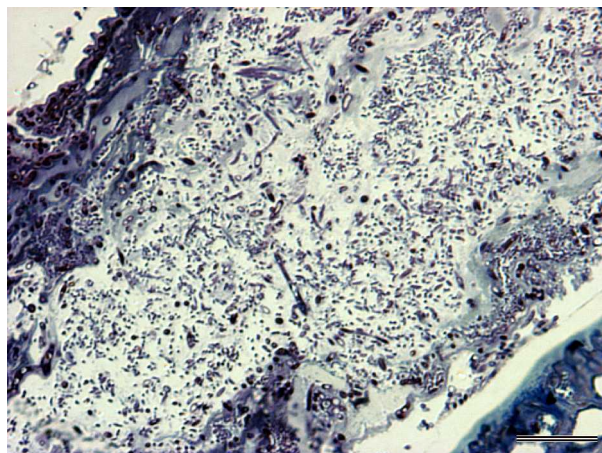
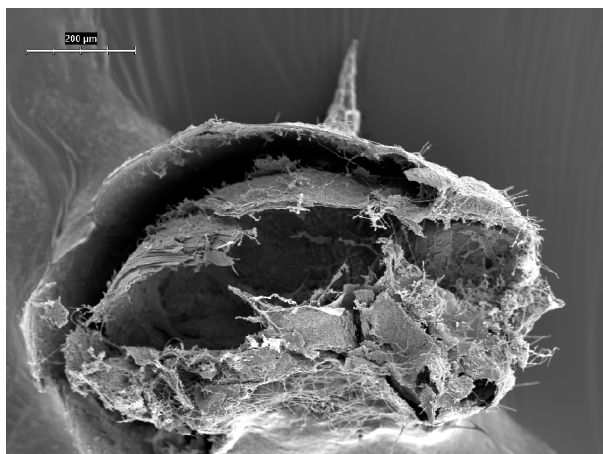
Infikace housenic 1. instaru ploskohřbetky smrkové

Vzorky byly hodnoceny po 15 dnech infikace houbou *I. farinosa*.



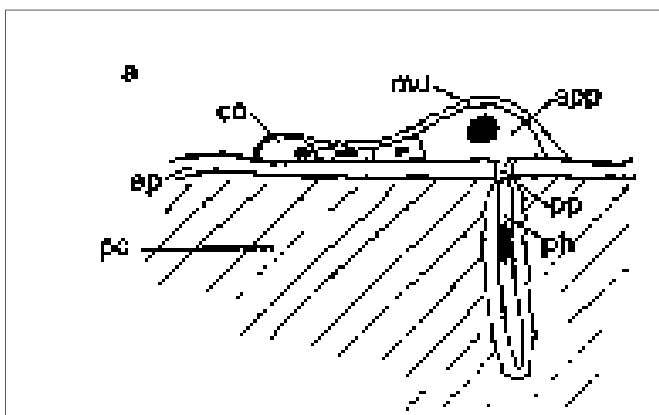
Hyfy houby aktivně pronikají do tělní dutiny mladé housenice. Obsah dutin pak postupně stravují, rozrůstají se v mycelium a vytváří další spory.

Rozlomená hlava houseničky je vyplněná myceliem houby, které postupně stravuje hmyzí tkáň. Stejně tak i ostatní části těla jsou napadeny - na obrázku řez hrudí.



Diskuse a závěr

Studie patogeneze houbové infekce *I. farinosa* na vajíčkách ploskohřbetky smrkové přinesla řadu originálních výsledků. Byl podrobně popsán celý průběh patogeneze po 0, 24, 48, 72 a 96 hodinách infikace. Za pozornost stojí i zjištění, že při průniku do chorionu A a do embryonální tkáň vytváří tato houba apresoria. Dá se obrazně říci, že apresoria představují aktivní agresi houby vůči hostiteli.



Apresoria u *Metarhizium anisopliae*:

app – appressorium
pp – penetrační čep
ph – penetrační hyfa
co – konidie
ep – epikutikula

Podle St. Leger a kol. (1989).

Apresorium se dá nejlépe popsat jako ztlustění vytvořená před místem průniku, kde dochází k tvorbě **penetračního čepu** (*penetration peg* - pp). Po průniku se penetrační čep opět rozšíří a vytvoří tzv. **průnikovou hyfu** (*penetration hypha* - ph). Tvorba stejných nebo podobných apresorií je také popsána v histologických studiích u entomopatogenních hub *M. anisopliae* (Zacharuk, 1970; St. Leger a kol., 1989; 1991; Butt a kol., 1995; Arruda a kol., 2005.) *Zoophthora radicans* (Magalhaes a kol., 1990), *I. farinosa* (Robinson, 1966; Madelin a kol., 1967), *B. bassiana* (Vey a Fargues, 1977; Bidochka a kol., 1997).) a u houby *Tolypocladium cylindrosporum* (Goettel, 1988). Jmenovaní autoři sledovali tvorbu apresorií jednak přímo na kutikule hmyzu a nebo v *in vitro* kulturách rostoucích proti sklíčku.

Tvorbu apresorií houby *I. farinosa* na hmyzích vajíčkách doposud nikdo nepopsal. Můžeme tedy tento poznatek získaný předkládanou studií na ploskohřbetce považovat za originální zjištění.

Z naší dokumentace celkového průběhu infekce vajíček ploskohřbetky smrkové houbou *I. farinosa* jednoznačně vyplývá, že **tento děj obsahuje všechny tři fáze vývojového cyklu entomopatogenních hub**, které byly popsány na začátku kapitoly. Houba svými orgány již během 72 hodin aktivně napadá a ničí embryo. Dokonce během 120 hodin vytváří i fruktifikační orgány včetně konidií, které se tak mohou stát zdrojem infekce dalších vajíček nebo již vylíhlých housenic.

2.11. Doporučená metodika způsobu uložení kmene, výroby a aplikace bioagens

Doporučení č.1:

Vybraný kmen SEH.56.If je možné uložit v některé z mykologických sbírek. Sbírký (v roce 1998 bylo registrováno 21 sbírek) jsou sdružené ve Federaci československých sbírek mikroorganismů (FCCM), Katedra botaniky PřFUK, Benátská 2, 128 01 Praha 2. Na webových stránkách www.natur.cuni.cz je uveden seznam kmenů všech druhů hub uchovávaných v těchto sbírkách.

Doporučuji kmen uložit například ve sbírce:

CCF

Culture Collection of Fungi

Sbírka kultur hub katedry botaniky PřF UK

WWW: botany.natur.cuni.cz/cz/struktura/houby.php

Doporučení č.2:

Alternativně by bylo možné nabídnout převzetí kmene vhodné odborné instituci, která bude zárukou jeho využití v lesním hospodářství, např. VÚLHM ve Zbraslavi. LOR Olešná je ochotna participovat na dalším výzkumu v této problematice. Je možné být v rámci smluvního vztahu i nadále garantem kmene a pečovat o jeho kvalitu.

Doporučení č. 3.:

Houbu *I. farinosa* doporučuji kultivovat submerzní kultivací za daných optimalizovaných podmínek. Submerzní kultivace má tyto výhody:

- umožňuje vysokou produkci uniformních infekčních jednotek (2×10^9 blastospor/1ml kultivačního média); za 15 dní lze submerzní kultivací teoreticky získat třináctinásobné množství spor než povrchovou kultivací;
- vytváří minimální množství hlušiny – myceliální biomasy a zbytků kultivačního substrátu;
- umožňuje snadnější zpracovatelnost při finalizaci;
- poskytuje biologický materiál o vysoké kvalitě.

Jsou dvě možnosti finalizace blastosporového koncentrátu:

- 1) *smísení s olejovým nosičem* – (oleje povolené pro ochranu lesa: Istroekol, Dedal 90EC, Ikar 95EC, Alimo) v poměru 1:1. Vzniknou tak čtyři formulace označené jako **OSBK(Istroekol)**;
OSBK(Dedal);
OSBK(Ikar);
OSBK(Alimo).
- 2) **ZBKIf** - *samotný blastosporový koncentrát pouze zamražený v mrazicím boxu při teplotě -15 až -20°C.*

Pro skladování lze doporučit tyto podmínky:

- 1) ZBKIf - skladovat v mrazicím boxu při teplotách (-15 až -20°C). Jeho kvalita se nezměnila ani po 6 měsících skladování;
- 2) olejové formulace OSBK(Istroekol), OSBK(Dedal), OSBK(Ikar) a OSBK(Alimo) udržovat v chladnici při + 5° C.

Doporučení č. 4.:

Na základě získaných výsledků lze pro zásah proti ploskohřbetce smrkové doporučit v této fázi výzkumu zmražený blastosporový koncentrát (ZBKIf) aplikovaný „klasickým“ leteckým postřikem;

- v 1 g ZBKIf je 2×10^{10} blastospor;
- dávka 5×10^{10} blastospor/m²;
- potřeba na 1 m² je 2,5 g ZBKIf;
- potřeba na 1 ha je 25 kg ZBKIf (100 – 500 l vody).

Účinnost ZBKIf v dávce 5×10^{10} spor/m² byla otestována i v terénu. Ošetření tímto biopreparátem snížilo populaci housenic ploskohřbetky asi o dvě třetiny.

Dávka 5×10^9 blastospor/m² byla účinná v laboratorních podmínkách u ZBKIf a OSBKAlimo (určeno pro ULV aplikaci). Zbývá ověřit účinnost i v terénních podmínkách - předmět dalšího výzkumu(?)

3. STRUČNÝ SOUHRN VÝSLEDKŮ

3.1. Stručný souhrn výsledků a potvrzení hypotéz

- 1) **Lze získat čerstvé izoláty kmenů entomopatogenních hub izolací z infikovaného hmyzu a ze vzorků půdy.**
Celkem bylo získáno izolací z ploskohřbetky 13 kmenů a izolací z půdních vzorků metodou živých pastí 50 kmenů. Izolované kmeny patřily pouze do dvou druhů entomopatogenních hub – a to *Isaria farinosa* (syn. *Paecilomyces farinosus*) - 60 kmenů a *Beauveria bassiana* – 3 kmeny.
- 2) **Nejvíce virulentní proti danému cílovému škůdci jsou právě ty kmeny, které byly z tohoto škůdce izolovány.**
Bylo otestováno celkem 71 kmenů 5 druhů entomopatogenních hub (*Isaria farinosa*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, *Lecanicilium lecanii*). Nejvíce virulentní kmen SEH.56.If, který byl izolován z housenice ploskohřbetky.
- 3) **Čerstvé izoláty entomopatogenních hub mají vyšší virulentní aktivitu než sbírkové kmeny uchovávané kontinuálním pasážováním na umělé půdě.**
To bylo dokázáno ve standardizovaných biotestech na kuklách *T. molitor* a na housenicích *C. abietis*. Bylo porovnáno 8 sbírkových kmenů a 63 nativních kmenů.
- 4) **Blastospory jsou vzhledem ke svému rychlejšímu účinku vhodnější infekční formou pro aplikaci proti vajíčkům a prvním instarům ploskohřbetky smrkové než konidie.**
Blastospory *I. farinosa* v biotestu na housenicích ploskohřbetky byly účinnější (průměrná hodnota LT95 = 18,53 dne, SD ± 0,43) než konidiospory (průměrná hodnota LT95 = 20,00 dne, SD ± 0,55).
- 5) **Kontinuálním pasážováním přes cílového hostitele se zvýší virulence daného kmene entomopatogenní houby.**
V biotestu s housenicemi ploskohřbetky bylo zjištěno, že hodnota LT 95 kmene SEH.56.If. se po sérii 15 pasáží *in vivo* snížila z 18,6 ± 0,4 dní na 16,4 ± 0,2 dní (tj. asi o 2 dny).
- 6) **Existuje reálná možnost využít entomopatogenní houby proti vajíčkům a prvním instarům ploskohřbetky.**
Byla vypracována metodika způsobu výroby a aplikace bioagens ZBKIf na bázi blastospor entomopatogenní houby *I. farinosa*.
- 7) **Získané bioagens je možné dlouhodobě skladovat.**
Zmražený blastosporový koncentrát ZBKIf (skladovaný při -15 až -20°C) si udržel původní vysokou kvalitu po 6 měsících skladování.

- 8) **Vajíčka a první instary ploskohřbetky jsou vnímavé k nákaze vyvolané nově vyvinutým bioagens.**
V laboratorních podmínkách byla stanovena vysoká účinnost preparátu ZBKIf. Při dávce 5×10^{10} blastospor /m² byla hodnota LT95 = 7,58 ± 0,30 dní a při dávce 5×10^9 spor /m² byla hodnota LT95= 9,60 ± 0,39 dní.
- 9) **Nové bioagens bude účinné proti ploskohřbetce smrkové ve stádiu vajíček a prvních instarů i v terénních podmínkách.**
Na základě výsledků našeho výzkumu v terénu (redukce populace ploskohřbetky asi o dvě třetiny) můžeme konstatovat, že vyvinutý biopreparát ZBKIf v dávce 5×10^{10} blastospor na m² účinně infikuje vajíčka a mladé housenice ploskohřbetky smrkové a je vysoce pravděpodobné, že se podílí i na snížení populační hustoty přemnožených diapauzních larev škůdce.
- 10) **Je možné popsat a zdokumentovat průběh houbové nákazy použitím moderních mikroskopických technik.**
Bylo zdokumentováno, že proces prorůstání a množení houby *I. farinosa* je v případě infekce vajíček a prvních instarů ploskohřbetky procesem patogenním.
- 11) **Je možné eliminovat kritické faktory ovlivňující průběh nákazy.**
Z faktorů, které lze v praxi reálně ovlivnit, to jsou: (1) koncentrace spor a (2) doba působení bioagens na vajíčka – tj. doba průběhu infekce. Podařilo se zkrátit dobu průběhu infekce aktivací a synchronizací klíčení blastospor, a to vlastní originální metodou „provzdušnění blastospor“.

3.2. A short summary of the results and confirmation of the hypotheses

- 1) **Fresh isolates of strains of entomopathogenic fungi can be acquired from infected insects or soil samples.**
Thirteen strains were isolated from the *C. abietis* larvae and 50 strains from soil samples using the live bait method. The isolated strains belong to only 2 species - *Isaria farinosa* (syn. *Paecilomyces farinosus*) – 60 strains and *Beauveria bassiana* - 3 strains.
- 2) **The most virulent strains for the given pest species are the strains isolated just from the target species.**
Seventy one strains belonging to 5 species of entomopathogenic fungi were tested (*Isaria farinosa*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, *Lecanicilium lecanii*). The most virulent strain SEH.56.If was isolated from a larva of the *C. abietis*.
- 3) **Fresh isolates of entomopathogenic fungi are more virulent than strains from collections maintained by passages on artificial medium.**
This was proven using a standardized bioassay on pupae of *T. molitor* and larvae of *C. abietis*; 8 collection strains and 63 native strains were compared.
- 4) **Blastospores are more suitable for application against the eggs and first instars of the *C. abietis* than conidiospores.**

The blastospores were more efficient in the bioassay on larvae of *C. abietis* (mean LT95 = 18.53 days, SD $\pm$ 0.43) than conidiospores (LT95 = 20.00 days, SD $\pm$ 0.55).

5) Continual passages performed on target species can increase virulence of a particular strain of the entomopathogenic fungus.

A bioassay performed on *C. abietis* larvae revealed that LT95 of the strain SEH.56.If. decreased from 18.6 ± 0.4 days to 16.4 ± 0.2 days (i.e. approx. by 2 days) after a series of 15 *in vivo* passages.

6) Entomopathogenic fungi can be used as bioinsecticide against the eggs and first instars of the false spruce webworm *C. abietis*.

A method of production and technique of application of the bioagents ZBKIf based on blastospores of entomopathogenic fungus *I. farinosa* was elaborated.

7) The bioagent can be stored for a prolonged period.

A frozen concentrate of blastospores ZBKIf (stored at -15 to -20°C) retained its original high quality for 6 months of storage.

8) Eggs and first instars of the *C. abietis* are sensitive to the infection of the new developed bioagent.

A high effectiveness of the ZBKIf preparation was shown in the laboratory. At the dose of 5×10^{10} spores/m² the LT95 = 7.58 ± 0.30 days, and at a dose of 5×10^9 spores/m² LT95 = 9.60 ± 0.39 days.

9) The new bioagent is effective against the eggs and first instars of the *C. abietis* also in the field.

Based on our results in the field (reduction of the larval population by two thirds) we can claim that the preparation ZBKIf at the dose of 5×10^{10} blastospores/m² can efficiently infect the eggs and young larvae of the pest and very likely also cause decrease of population density of diapausing larvae.

10) The course of fungal infection can be described and documented using modern microscopic techniques.

It was documented that the process of penetration and reproduction of the fungus *I. farinosa* into the eggs and first instars of the false spruce webworm *Cephalcia abietis* is a true pathogenic process.

11) It is possible to eliminate some of the critical factors that affect the course of infection.

Only two factors can be controlled, namely (1) concentration of the spores and (2) the period during which the spores can efficiently affect the eggs. We succeeded in shortening the course of infection by activation and synchronization of germination of the blastospores using our original method of „aeration of the blastospores“.

4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, W. S., 1925:** A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265-267.
- Arruda W., Lubeck I., Schrank A., Vainstein M.H., 2005:** Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. Experimental and applied acarology, 37 (3-4): 231-244.
- Bedding R.A., Akhurst R.J., 1975:** A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21, 109-116.
- Behle R.W., Garcia-Gutierrez C., Tamez-Guerra P., McGuire M.R., Jackson M.A., 2006:** Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Pulsant. Southwestern entomologist, 31 (4), 289-295.
- Bidochka M.J., St Leger R.J., Roberts D.W., 1997:** Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: An overview. Memoirs of the entomological society of Canada, 171, 213-224.
- Boas J.E.V., 1934:** Ein ernster Angriff von *Lyda arvensis* Panz. Zeitschr. f. ang. Entomol., 20 (5): 268 – 280.
- Butt T.M., Ibrahim L., Clark S.J., Beckett A., 1995:** The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. Mycological research, 99, 8, 945-950.
- Daoust R.A., Roberts D.W., 1982:** Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., 40, 107-117.
- Donaubauer E., 1959:** Über eine Mykose der Latenzlarven von *Cephalcia abietis* L. Ann. Mycol, Ser. II, vol. 13, 183-222.
- Fargues J., Robert P.H., 1978:** Adaptabilité de deux pathotypes de *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) sor. (Fungi imperfecti Hyphomycetes) par culture sur milieu artificiel et par passage sur insecte-hôte d'origine. C. R. Acad. Sc. Paris D, 287, 165-167.
- Fargues J., Robert P.H., 1983:** Effects of passaging through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. 29 (5), 576-583.
- Goettel M.S., 1988:** Pathogenesis of the hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in the mosquito *Aedes aegypti*. J. Invertebr. Path., 51: 259-274.
- Hayden T. P., Bidochka, M. J., Khachatourians G. G., 1992:** Entomopathogenicity of several fungi toward the English grain aphid (Homoptera, Aphididae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. J. Econ. Entomol. 85(1), 58-64.
- Kawakami K., 1960:** On the change of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. Bull. Seric. Exp. Stn. Tokyo, 16, 83-99.
- Keller S., Kessler P., Schweizer Ch., 2003:** Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. BioControl, 48(3), 307-319.
- Kerner G., 1958:** Eine Mykose bei *Dasychira pudibunda* L., und ihre Verwendung zur biologischen Bekämpfung von anderen Forstinsekten. Trans. Ist. Int. Conf. Insect Pathol. Praha: 169-176.
- Kleespies R., Bathon H., Zimmermann G., 1989:** Investigations on the natural occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in different soils in the surroundings of Darmstadt. Gesunde-Pflanzen 41, 10, 350-355.
- Kmitova K., 1982:** Preliminary studies on the effect of passaging through the host on pathogenicity of entomopathogenic fungi. Pol. Ekol. Stud. 8(3-4), 433-441.
- Kurir A., 1977:** Über die Antagonisten der Fichtenspinstblattwespe (*Cephalcia abietis*) im Bodenquartier mit besonderer Berücksichtigung der Virulenz pathogener Pilze. Zeitschr. ang. Entomol., 4, 388-396.

Projekt Grantové služby LČR

Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycetes) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové Cephalcia abietis ve stádiu vajíček a prvních instarů

- Lacey L.A., 1997:** Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, 409 pp.
- Lacey L.A., Kaya H.K., 2000:** Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Kluwer Academic Publisher, 911 pp.
- Lacey L.A., Kirk A.A., Millar L., Mercadier G., Vidal C., 1999:** Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera : Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Biocotrol science and technology*, 9 (1), 9-18.
- Landa Z., 1998:** Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *AGRO-ochrana*, 10: 7-12.
- Landa Z., Horňák P., Charvátová H., Osborne L.S., 2002:** Distribution, occurrence and potential use of entomopathogenic fungi in arable soils in Czech Republic. *ISTRO – Conference Brno 2002 - Session II.*, 195- 201.
- Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O., 2007:** Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému, *Lesnická práce*, 10, 14-15.
- Liška J., Holuša J., 2000:** Ploskohřbetka smrková *Cephalcia abietis* (L.), *Lesnická práce* 11, příloha LOS VÚLHM, 139-142.
- Madelin M.F., Robinson R.K., Williams R.J., 1967:** Appressorium-like structures in insect-parasitizing *Deuteromycetes*. *J. Invertebr. Path.*, 9: 404-412.
- Magalhaes B.T., Butt T.M., Humper R.A., Shiels E.J., Roberts D.W., 1990:** Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophtora radicans* (Zygomycetes: *Entomophthorales*). *J. Invertebr. Path.*, 55: 284-288.
- Markova G.R.Chr., 1987:** Studie entomopatogenních Deuteromycet použitelných v boji s lesními škůdci. Disertační kandidátská práce, EntÚ ČSAV, Č. Budějovice, 156 stran.
- Mietkiewski R., Dziegielewska M., Janowicz K., 1998:** Entomopathogenic fungi isolated in the vicinity of Szczecin. *Acta-Mycologica*, 33 (1), 123-130.
- Meitkiewski R., Pell J.K., Clark S. J., 1997:** Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soil in the UK field and laboratory comparison. *Biocontrol Science and Technology*, 7, 4: 565 – 575.
- Mietkiewski R., Tkaczuk C., Zasada L., 1992:** Occurrence of entomopathogenic fungi in arable soil and meadow soil. *Acta-Mycologica*, 27(2), 197-203.
- Morrow B.J, Boucias D.G., Heath M.A., 1989:** Loss of virulence in an isolate of an entomo-pathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, after serials in vitro passage. *J. Econ. Ent.*, 82(2), 404-407.
- Nagaich B.B., 1973:** *Verticillium lecanii* species pathogenic on aphids. *Indian Phytopathol.*, 26: 163 – 165.
- Peng C.Y.S., Zhou X.S., Kaya H.K., 2002:** Virulence and site of infection of the fungus, *Hirsutella thompsonii*, to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.*, 81(3), 185-195.
- Petráčková V., Kraus J. a kol., 2001:** Akademický slovník cizích slov, Academia Praha, 834 pp.
- Prenerová E., 1991:** Studium využitelnosti entomopatogenní houby *Paecilomyces farinosus* pro biologický boj s ploskohřbetkou smrkovou *Cephalcia abietis*. Kandidátská disertační práce, EntÚ AVČR v Českých Budějovicích, 187 stran.
- Prenerová E., 1994a:** Entomopathogenic fungi against some spruce pests, *Cephalcia abietis* and *Otiorhynchus ovatus*. *VITH International Colloquium on invertebrate pathology and microbial control*, 1994, Montpellier, France, p. 326
- Prenerová E., 1994b:** Pathogenicity of *Paecilomyces farinosus* toward *Cephalcia abietis* eonymphs (Insecta, Hymenoptera): Enhancement of bioactivity by in vivo passaging. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 62-64.
- Prenerová E., 2008:** Závěrečná zpráva projektu GS LČR: Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycetes) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvních instarů, v Olešné, prosinec 2007, 150 stránek.

Projekt Grantové služby LČR

Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycetes) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové Cephalaria abietis ve stádiu vajíček a prvních instarů

- Robinson R.K., 1966:** Studies on the penetration of insect integument by fungi. Pest Articles and News Summaries, Sect.B, 12: 131-142.
- Rockwood L.P., 1950:** Entomogenous fungi of the family Entomophthoraceae in the Pacific Northwest. J. Econ. Entomol., 43, 704-707.
- Samson R.A., Evans H. C., Lathé J.P., 1988:** Atlas of Entomopathogenic Fungi, 187 pp.
- SAS Inst. (2000):** The SAS System for Linux, release 8.2. SAS OnlineDoc, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schaerffenberg B., 1964:** Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. J. Invert. Pathol., 6 : 8-20.
- Steinkraus D.C., Geden C.J., Rutz D.A., 1991:** Susceptibility of leader mealworm (Coleoptera, Tenebrionidae) to *Beauveria-bassiana* (Moniliales, Moniliaceae) – effects of host stage, substrate, formulation, and host passage. J. Med. Entomol. 28(3), 314-321.
- St. Leger R.J., Butt T.M., Roberts D.W., Staples R.C., 1989:** Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Exp. mycol., 13: 274-288.
- St. Leger R.J., Butt T.M., Roberts D.W., Staples R.C., 1991:** A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr.Path., 57: 299-310.
- Urban Z., Kalina T., 1980:** Systém a evoluce nižších rostlin, SPN, Praha, pp 398-406.
- Vaněk J., 1995:** Houbou na ploskohřbetku. Krkonoše, 2, 12-13.
- Vanninen I., 1996:** Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. Mycological Research 100 (1), 93-101.
- Vanninen I., Husberg G.B., Hokkanen M.T., 1989:** The occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. Acta Entomologica Fennica, 53, 65-71.
- Vey A., Fargues J., 1977:** Histological and ultrastructural studies of (B.B.) infection in *L. decemlineata* larvae during ecdysis. J. Invertebr. Path. 30: 207-215.
- Wasti S.S., Hartmann G.C., 1975:** Experimental parasitism of larvae of the gypsy moth *Porthetria dispar* (L.) with the entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. Parasitol., 70, 125-346.
- Wasti S.S., Hartmann G.C., 1982:** Susceptibility of gypsy moth larvae to several species of entomogenous fungi. New York Ent. Soc., XC(2), 125-128.
- Weiser J., 1966:** Nemoci hmyzu. Academia , Praha, 554 pp.
- Zacharuk R.Y., 1970:** Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* (Coleoptera) II. Conidial Germ Tubes and Appressoria. J. Invertebr. Path. 15:81-91.
- Zimmermann G., 1986:** The „Galleria bait method“ for detection of entomopathogenic fungi in soil. J. App. Entomol., 102, 213-215.

5. PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat za pomoc a spolupráci, kterou mi poskytli pracovníci LZ Kladská, LS Františkovy Lázně a KI Karlovy Vary (LČR s.p.), KRNAPu, SRS, Laboratoře elektronové mikroskopie a Entomologického ústavu (Biologické centrum AV ČR, v.v.i.),

Za cenné rady děkuji prof. RNDr. J. Weiserovi, DrSc., a prof. RNDr. J. Žďárkovi, DrSc.

6. PREZENTACE VÝSLEDKŮ

1) prezentováno:

Prenerová E., 2006: Studium využitelnosti entomopatogenní houby *Isaria farinosa* (Deuteromycota) proti vajíčkům a prvním instarům ploskohřbetky smrkové *Cephalcia abietis* (Insecta, Hymenoptera); současný stav řešení projektu. XVII. České a slovenské konferenci o ochraně rostlin 12. až 14. 9. 2006, ČZU Praha, str. 325- 327.

Prezentováno jako poster.

Prenerová E., 2006: The study of applicability of entomopathogenic fungus *Isaria farinosa* (Deuteromycota) against the eggs and first instars of the false spruce webworm *Cephalcia abietis* (Insecta, Hymenoptera); the current state of project progress. XVII. České a slovenské konferenci o ochraně rostlin 12. až 14. 9. 2006, ČZU Praha.

Prezentováno jako poster.

Prenerová E., 2007: Studium využitelnosti entomopatogenní houby *Isaria farinosa* (Deuteromycota) proti vajíčkům a prvním instarům ploskohřbetky smrkové *Cephalcia abietis* (Insecta, Hymenoptera), MICROMYCO 2007 (1. pracovní setkání mikromycetologů), 4.-5. září 2007, ÚPB, Biologické centrum AV ČR, v.v.i. v Českých Budějovicích, str. 133-139. Prezentováno jako poster.

Prenerová E., 2008: Vývoj bioinsekticidu proti ploskohřbetce, Lesu zdar 1/08, 12-13.

2) v přípravě:

Prenerová E., 2008: Houbou proti ploskohřbetce, Lesnická práce.

3) popularizace projektu v denním tisku:

- spolupráce na článku: **Houbou proti nebezpečnému škůdci** (Ve Slavkovském lese probíhá originální vědecký výzkum), autor **F. Kšajt**, *Právo*, 25.června 2005.

Kontakt na autorku:

	Ing. Eva Prenerová, CSc.
	Laboratoř ochrany rostlin Olešná
Olešná 87 398 43 Bernartice u Milevska eva.prenerova@seznam.cz tel.: 382 587 146; 724 102 351	