

**J I H O Č E S K Á U N I V E R Z I T A**  
**V Č E S K Ý C H B U D Ě J O V I C Í C H**  
**Z e m ě d ě l s k á f a k u l t a**

**TÉMA DIPLOMOVÉ PRÁCE:**

**ZAVEDENÍ STANDARDNÍHO LABORATORNÍHO BIOTESTU ÚČINNOSTI  
ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY BEAVERIA BASSIANA NA DOSPĚLCE  
LÝKOŽROUTA SMRKOVÉHO IPS TYPOGRAPHUS L.  
(COLEOPTERA, SCOLYTIDAE)**

**Studijní obor: Všeobecné zemědělství**

**Specializace: Rostlinolékařství**

**Vedoucí práce: prof. ing. Zdeněk Landa, CSc.**

**Autor: Aleš Skalický**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Zemědělská fakulta  
Katedra rostlinné výroby  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Aleš SKALICKÝ**  
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství**

Název tématu: **Zavedení standardního laboratorního biotestu účinnosti entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na dospělé lýkožrouta smrkového *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae)**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem diplomové práce je zavedení standardního postupu umožňujícího objektivní porovnávání virulence kmenů entomopatogenních hub získaných při plošném monitoringu ve smrčích CHKO a NP Šumava na dospělé lýkožrouta smrkového.

1. Vitalita spor a virulence stanovená pomocí standardního laboratorního biotestu na dospělých lýkožrouta smrkového odchycených pomocí feromonových lapačů (cca 25 kmenů).
2. Testování účinnosti různě formulovaných biopreparátů na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* na dospělé *I. typographus*.
3. Vypracování metodiky standardního laboratorního postupu zaměřeného na porovnávání účinnosti kmenů houby *B. bassiana*.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran  
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Goettel M.S., Inglis G.D., Wraight S.P. 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.): Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, 255-282

Butt T.M., Goettel M.S. 2000: Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140

Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001: Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69

Publikace získané průběžnou rešerší z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB (abstrakty a plnotextové verze primárních zdrojů).

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.**  
Katedra rostlinné výroby  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.**  
Katedra rostlinné výroby

Datum zadání diplomové práce: **27. února 2009**  
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2009**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13 ④  
370 05 České Budějovice



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.  
děkan

L.S.

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.  
vedoucí katedry



V Českých Budějovicích dne 27. února 2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a použil jsem pouze pramenů, které cituji v příloženém seznamu literatury.

.....  
**Aleš Skalický**

Děkuji Prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za cenné rady, metodické a odborné vedení, které mi poskytl v průběhu zpracování diplomové práce.

Dále děkuji Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za všestrannou pomoc a technickou asistenci při zakládání pokusů a v neposlední řadě také pracovnícům Katedry rostlinné výroby, oddělení ochrany rostlin, Marii Nýdlové a Olze Divišové.

**Aleš Skalický**

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| <b>1. ÚVOD</b>  | 3  |
| <b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>   | 5  |
| 2.1. Lýkožrout smrkový ( <i>Ips typographus</i> /L./)   | 5  |
| 2.1.1. Vývoj  | 5  |
| 2.1.2. Letová aktivita  | 6  |
| 2.1.3. Hostitelská specializace   | 6  |
| 2.1.4. Příznaky poškození lýkožroutem na smrku a jeho příčiny   | 7  |
| 2.1.5. Přirození nepřátelé lýkožrouta smrkového   | 7  |
| 2.2. Entomopatogenní houby jako biopesticidy v ochraně rostlin  | 8  |
| 2.3. <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo. -Criv.) Vuillemin  | 10 |
| 2.3.1. Vývojový cyklus entomopatogenní houby <i>Beauveria bassiana</i>  | 11 |
| 2.3.2. Vliv patogena na necílové organismy  | 14 |
| 2.4. <i>Beauveria bassiana</i> v ochraně lesa proti lýkožroutu smrkovému  | 15 |
| 2.5. Stručná charakteristika významných mitosporických entomopatogenních hub  | 16 |
| 2.5.1. <i>Beauveria brongniartii</i> (Saccardo) Petch   | 16 |
| 2.5.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschikoff) Sorokin  | 17 |
| 2.5.3. <i>Isaria fumosorosea</i> (Wize)   | 17 |
| 2.5.4. <i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimmermann) Zare & W. Gams   | 18 |
| 2.6. Entomopatogenní houby v biotestech   | 18 |
| 2.6.1. Základní procedury v biotestu  | 19 |
| 2.6.2. <i>Beauveria bassiana</i> v biotestech proti kambioxylofágům   | 20 |
| 2.6.3. Kreuzův biotest vlivu patogena <i>Beauveria bassiana</i> na dospělce <i>Ips typographus</i> v laboratorních podmínkách | 21 |
| <b>3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE</b>   | 24 |
| <b>4. MATERIÁL A METODIKA</b>   | 25 |
| 4.1. Živočišný materiál používaný v pokusech  | 25 |
| 4.2. Rostlinný materiál používaný v pokusech  | 25 |
| 4.3. Biopreparáty   | 25 |
| 4.4. Izolace jednotlivých kmenů entomopatogenních hub   | 27 |
| 4.5. Příprava konidiové suspenze  | 27 |
| 4.6. In vivo testy  | 27 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 4.7. Ostatní metodické údaje  | 28 |
| <b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> | 29 |
| <b>6. DISKUSE A ZÁVĚR</b>     | 55 |
| <b>7. SEZNAM LITERATURY</b>   | 58 |
| <b>8. GRAFICKÉ LISTY</b>      |    |

# 1. ÚVOD

Lýkožrout smrkový *Ips typographus* (Linné) je přirozeným členem entomocenosu boreálních smrkových lesů. V těchto lesích má lýkožrout nezastupitelnou biologickou funkci, umožňuje totiž generační obměnu lesa (obměna boreálního smrkového lesa se opakuje v pravidelných generačních cyklech po 300-400 letech) tím, že v určité fázi vývoje rozvrátí toto lesní společenství. K tomu využívá strategii neustálé migrace.

Lýkožrout je sekundárním druhem, který primárně napadá stromy poškozené, vyvrácené či oslabené dlouhotrvajícím suchem. Pokácené neodkorněné dříví nabízí taktéž vhodné podmínky pro vývoj lýkožrouta. Příznivé klimatické podmínky a dostatek vhodného materiálu k jeho vývoji mohou vést k výraznému nárůstu početnosti a způsobit tak značné poškození lesních porostů. K tomu výrazně přispívá také existence bivoltinního a trivoltinního vývojového cyklu a jedné až několika sesterských generací lýkožrouta. Nenalezají-li brouci nové generace oslabené stromy vhodné pro svůj vývoj, napadají pak stromy zdravé a stávají se primárním škůdcem.

Cílem ochrany lesa proti lýkožroutu smrkovému je udržení jeho populací v takovém stavu, kdy jím působené škody nepřesahují hospodářsky únosnou míru – populace je udržována v tzv. základním stavu. K udržení tohoto stavu je nezbytné trvalé, včasné a důsledné provádění preventivních opatření, kterými bude bráněno nárůstu populací lýkožrouta, tím i jím působených poškození lesních porostů. V případě lýkožrouta smrkového jsou v lesnické praxi užívána tato preventivní opatření: včasné a důsledné odstraňování kůrovcem napadených stromů a dříví, odstranění veškerého materiálu vhodného k jeho vývoji a soustředění jeho náletu v době rojení do připravených odchyťových zařízení (feromonové lapače, otrávené lapáky a lapáky). V případech, kdy z různých příčin dochází nebo již došlo k nárůstu výskytu lýkožrouta a škod jím působených, je nutné okamžitě provést vhodná opatření, která povedou k opětovnému dosažení únosného stavu.

Jednou z možností jak eliminovat četnost populací lýkožrouta je využití jeho přirozených nepřátel. Například entomopatogenní houby mají nemalý vliv na úmrtnost jednotlivých vývojových stádií lýkožrouta, z nich především houby rodu *Beauveria*, zejména pak druh *Beauveria bassiana*. Využití endemických kmenů tohoto patogena, vhodných aplikačních metod a formulací biopreparátů, v neposlední řadě také vhodné



načasování termínů aplikace, by se v budoucnu mohlo stát jednou z významných metod ochrany lesa proti škodlivému působení lýkožrouta smrkového.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* /L./)

Lýkožrouta smrkového řadíme mezi zástupce čeledi nosatcovitých (Curculionidae) v řádu brouci (Coleoptera). Dospělec má válcovité tělo 4,2-5,5 mm dlouhé, lesklé, hnědočerné, na zadní části krovek ozubené čtyřmi hrbolky. Celé tělo imága je pokryto poměrně dlouhým, světle žlutým ochlupením.

#### 2.1.1. Vývoj

Sameček lýkožrouta, lákán primárními atraktanty, které vylučují fyziologicky oslabené stromy, na tyto stromy nalétává a po zavrtání hlodá snubní komůrku (2-4 dny). Poté přilétají samičky, lákány uvolňujícími se agregačními feromony z trusu samečků a počínají hlodat matečnou chodbu. Na jednoho samečka připadají obvykle 2-3 samičky. Samička lýkožrouta smrkového klade během svého života 20-100 vajíček (v průměru 60) do jednotlivých vrubů po obou stranách matečné chodby. Někdy samičky přerušují kladení a po prodělání krátkého úživného žíru počínají hlodat novou matečnou chodbu a zakládají tzv. sesterské pokolení. Stadium vajíčka trvá 6-18 dnů. Po této době se líhnou larvy, které hlodají v lýku kolmo na mateřskou chodbu. Při optimální teplotě 29°C trvá vývoj larev 7 dnů, při 14°C pak 50 dnů. Dospělé larvy se kuklí v komůrce na konci larvových chodeb, délka vývoje kukly trvá 6-17 dnů. Zpočátku bílá imága se postupně vybarvují přes žlutou až k hnědé barvě. Čerstvě vylíhlí brouci nejsou schopni okamžitého rozmnožování, musí prodělat tzv. zralostní žír (2-3 týdny), během něhož zbarvení imág tmavne.

Typický požerek se tak skládá ze snubní komůrky; 2 matečných chodeb, z nichž vybíhají chodby larvové; larvové chodby se postupně rozšiřují a jsou ukončeny kolébkou, kde se vyvíjí kukla. Na tyto chodby mohou navazovat nepravidelné chodby znalostního žíru čerstvě vylíhlých brouků. Vývoj 1 generace ve vegetačním období trvá při 29°C 6 týdnů, při 14°C pak týdnů 10. Lýkožrout může dosáhnout za optimálních podmínek až 3 generací ve vegetačním období, v zásadě však 3. generace již nebývá realizována.

Lýkožrout přezimuje nejčastěji v místě, kde prodělal vývoj, a to ve všech vývojových stádiích, kromě stadia vajíčka. Můžeme ho ale také nalézt v hrabance pod

stromy. Před jarním rojením opouštějí zimující brouci své úkryty a vyhledávají vhodné prostředí k dokončení zralostního žíru. Pokud jsou již pohlavně dozralí, vyhledávají vhodné prostředí k založení nové generace. Jarní rojení mívá hromadný charakter. Letní nálet (druhá generace) bývá rozptýlený a již méně výrazný, je závislý na ukončení vývinu jarního pokolení. Brouci se začínají rojit, jakmile teplota vzduchu dosáhne 20°C a lýko napadených stromů je prohráto na 27-30°C (Zumr 1985).

### **2.1.2. Letová aktivita**

Letová aktivita lýkožrouta může probíhat v rozmezí mezi 9-21hod., přičemž maxima dosahuje v poledních hodinách a časně po poledni. Z předešlého je pak zřejmé, že letová aktivita závisí na teplotě vzduchu, kdy minimální hodnoty pro let jsou 16,5°C a optimum se pohybuje v rozmezí 22-26°C (Funke, Petershagen 1994). Optimální tělesná teplota dospělců pro let by se měla pohybovat kolem 23°C (Zumr 1985).

### **2.1.3. Hostitelská specializace**

Lýkožrout smrkový se vyvíjí na mnoha druzích jehličnatých dřevin. Ve střední Evropě žije převážně na smrku ztepilém (*Picea abies*), na severu Evropy byl pozorován často i na borovici lesní (*Pinus silvestris*). První nálet lýkožrouta smrkového směřuje na starší, silnější část kmene, kde suché větve koruny přecházejí v zelené. Odtud obsazuje kmen směrem dolů, nahoru pak v menší míře (převážně u vyvrácených a poražených stromů). Při náletu letní generace na stojící smrky bývá nálet omezen pouze na horní část koruny, zatímco spodní část kmene zůstává neporušena. Optimální vývoj nabízí lýkožroutu smrkovému stromy ve stáří 60-100 let, které mají dostatečnou tloušťku lýka a hladkou kůru. Lýkožrout si vybírá hlavně smrky na okraji náhle otevřených porostních stěn, porosty s porušeným zápojem, hlavně tedy stromy, u nichž oslabení fyziologické činnosti bylo zaviněno činností člověka, působením klimatických činitelů nebo cizopasnými houbami. Napadá hlavně stejnověké a stejnorodé smrkové porosty (Zumr 1985).

Avšak stromy napadené václavkou obecnou (*Armillaria melta*) a kořenovníkem vrstevnatým (*Heterobasidion annosum*), nevyhovují k nalétnutí a rozvoji velkých druhů, k nimž se řadí i lýkožrout smrkový (václavkou je napadeno více než 30 % smrkových porostů). Houbami zasažený kořenový systém stojících stromů přispívá k porušení transportu vody a vyvolává fyziologický stres, který se projevuje ve změně kvality i kvantity kůry a lýka, chemickém složení volatilních látek v lýku. Tím se

vysvětluje snížená atraktivita těchto stromů pro lýkožrouta smrkového (Kula, Zabecki 1999)

Lýkožrout smrkový se dnes prakticky vyskytuje od pásma pahorkatin do hor, bez ohledu na nadmořskou výšku a lesní typ všude tam, kde roste smrk. Je zajímavé, že lýkožrout se nepřemnožuje ve značné míře v těch skupinách lesních typů, které jsou tvořeny lesním porostem, málo pozměněným člověkem. Ochrannou kontrolu lýkožrouta smrkového je třeba soustředit do lesních vegetačních stupňů buku a jedle; smrku a buku, v nichž má lýkožrout gradační možnosti (Zumr 1985).

#### **2.1.4. Příznaky poškození lýkožroutem na smrku a jeho příčiny**

Při jarním náletu se začnou projevovat zevní známky odumírání smrku po 2-3 týdnech od náletu. Jehličí začíná ztrácet výraznou zelenou barvu, šediví a pak rychle zčervená. Červenání začíná 3-5 týdnů od závrtu brouka. Nálet letní generace na stojící smrky se omezuje především na korunový úsek smrků, smrkům začíná jehličí červenat až na jaře následujícího roku. Lýkožrout smrkový při zakládání matečných chodeb a při žíru larev poškozuje rostlinná pletiva, což způsobuje odumírání stromu (Zumr 1985). S lýkožroutem jsou asociované některé druhy patogenních hub jako *Ophiostoma* a *Ceratocystis*. Stromy napadené tímto patogenem odumírají rychleji, než při napadení samotným lýkožroutem. Houby svým myceliem ucpávají rostlinná pletiva a způsobují jejich vysychání (Paine et al. 1997).

#### **2.1.5. Přirození nepřátelé lýkožrouta smrkového**

Infekce entomopoxvirem byla první virová nákaza zjištěná na lýkožroutu smrkovém. (Weiser, Wegensteiner 1994). Infekce se objevuje u dospělců, kterým ničí střevní epitel. Mezi další přirozené nepřátele patří bakterie. Bakteriální infekce se uplatňují zejména při vrcholu gradace kůrovce, kdy dochází k oslabení lýkožroutů nedostatkem potravy a vnitrodruhovým stresem. Při vysokých populačních hustotách brouka se infekce snadno šíří, způsobuje zlom a pokles početnosti kůrovce do běžného stavu. Fuchs (1915) zaznamenal a poprvé popsal onemocnění způsobené zástupci z říše *Protozoa* (*Telosporidium typographi* a *Gregarina typographi*).

V hrabance jsou přezimující brouci napadáni cizopasnými hlísticemi *Diplogaster bütscheli*, *Parasitophelenchus typographi*, *Tylenchus contortu typographi*, *T. dispar* var. *typographi*, *T. major* a *T. macrogaster*. Hlístice brouky nezahubí, pouze je oslabují (Zumr 1985).

S lýkožroutem smrkovým je asociováno několik druhů entomopatogenních hub, které jsou schopné usmrtit všechna jeho vývojová stádia. Mezi tyto druhy patří např. *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* (Landa et al. 2001) a *Beauveria caledonica* (Kirschner 2001). Výskyt entomopatogenních hub v populacích kůrovce je zcela běžný, za určitých okolností mohou některé kmeny spontánně indukovat epizootii v rozsahu blízkém lokální likvidaci populace tohoto škůdce (Landa et al. 2007).

Nejdůležitějším a nejhojnějším predátorem jsou mouchy rodu *Medetera* z čeledi Dolichopodidae. Dalšími důležitými predátory jsou brouci pestrokrovečník mravenčí (*Thanasimus formicarius*) a pestrokrovečník menší (*Thanasimus femoralis*) z čeledi pestrokrovečnicků (Cleridae) (Hulcr 2001). Ve všech případech jde o hmyz s podkorními larvami. Tyto larvy způsobují značnou mortalitu larev kůrovců v napadených stromech. V některých případech zkonzumují až 90 % larev lýkožrouta. Zvláště larvy much rodu *Medetera* někdy svou hustotou převyšují hustotu larev škůdce. Pestrokrovečníci se navíc živí lýkožrouty i v dospělosti, loví dospělé lýkožrouty, kteří přilétají na napadené stromy. Skutečně účinně však potlačují hmyzí predátory lýkožrouta jen v případě jeho latentního výskytu. V případě gradace se jejich reprodukční rychlost opožďuje za reprodukcí lýkožrouta, a nástup gradace tak nedokážou ovlivnit. Je také třeba znovu zdůraznit, že výše uvedené se týká predátorů v přirozeném lese. Z dosud málo známých důvodů se jim nedaří v kulturních smrčínách (Hulcr 2004).

## **2.2. Entomopatogenní houby jako biopesticidy v ochraně rostlin**

Entomopatogenní houby jsou již dlouhou dobu známy jako původci infekcí u hmyzu, způsobujícího škody na kulturních plodinách. Jsou potencionálně nejvíce všestranné agens v biologické ochraně, jelikož mají široké hostitelské spektrum, svého hostitele mohou infikovat v různém vývojovém stádiu a mohou vyvolávat přírodní epizootie. Zajímavým rysem entomopatogenních hub je schopnost iniciovat infekci kontaktem, aktivní penetrací kutikuly a nemusí být přijímány jako potrava, zatímco většina ostatních entomopatogenů, jako jsou bakterie, protozoa a viry musí být bezpodmínečně požřeny, aby byly schopny vyvolat infekci. Entomopatogenní houby představují heterogenní skupinu 750 druhů zastoupených ve 100 rodech, jež byly

zaznamenány na různých druzích hmyzu, z nichž mnohé představují velký potenciál v ochraně rostlin (Ambethgar 2002).

Použití entomopatogenních hub v masové inokulaci jako biopesticidů započalo roku 1888 Krassilstchikem. V té době panoval takový optimismus s využitím entomopatogenních hub, že Krassilstchik s jistotou předpovídal, „myšlenky, regulovat populace hmyzu uměle vyvolanými epidemiemi vyjádřené učenici přibližně před 20 lety, staly se prakticky proveditelnými a v budoucnu dovedeny k dokonalosti, široce využitelnými se stanou“. Naneštěstí vývoj byl mnohem pomalejší, než bylo předpovězeno. Objevení účinných chemických látek v letech 1930-1940 snížilo zájem používání biopesticidů. Až po prokázání zdravotních rizik a negativních dopadů na životní prostředí spojených s aplikací syntetických pesticidů v 60. letech 20.stol, se obnovil zájem o biopesticidy (Glare 2004).

Prvním registrovaným mykoinsekticidem byla *Hirsutella thompsonii* firmy Abbott Labs produkovaná pod obchodním názvem Mycar®. *H. thompsonii* byla známá již ve 20. letech 20.stol, jako patogen způsobující epizootie v populacích svilušek. Tento produkt byl zaregistrován v U. S. roku 1981. Dalšími biopesticidy na bázi houby *Lecanicillium lecani* byly produkty firmy Tate & Lyle registrované ve Velké Británii. Vertalec® používaný v ochraně proti mšicím a Mycotal® cílený pro kontrolu molice ve sklenících. Široce užívaným biopesticidem je také houba *Beauveria bassiana*. Kmen Bb-147, registrován v Evropě pod obchodním názvem Ostrinil®, se užívá v ochraně kukuřice před zavíječem kukuřičným (*Ostrinia nubilalis*). Naproti tomu kmen GHA, registrovaný v U. S., je používán ve sklenících v ochraně proti molícím, třásněnkám a mšicím (Mycotrol®). V 80. letech 20. stol. firma Bayer Corporation registrovala přípravek Bio 1020 původně proti lalokonosci rýhovanému (*Otiorynchus sulcatus*), později byl tento přípravek testován na mnoha jiných škůdcích. V neposlední řadě je důležité neopomenout přípravky na bázi entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*, např. PREFERAL v ochraně proti molícím, třásněnkám, mšicím a sviluškám (Glare 2004). Tento biopreparát je v současnosti jediným biopreparátem na bázi entomopatogenních hub registrovaným v EU, včetně uvedení na Annex I.

### 2.3. *Beauveria bassiana* (Balsamo. -Criv.) Vuillemin

*Beauveria bassiana* je kosmopolitně rozšířený druh půdní entomopatogenní houby, u něhož byla jako u jednoho z prvních druhů entomopatogenních hub popsána a objasněna nákaza tzv. „white muscardine“, což byla infekce, která devastovala v 18. a 19. století italské a francouzské chovy bource morušového (*Bombyx mori*). Toto zjištění iniciovalo počátky zájmů, zabývajících se otázkami hmyzí patologie. Na jejich prahu stál italský vědec Agostino Bassi (1773-1856), který se započal zabývat touto nákazou roku 1807, a jeho studie pokračovaly následujících 30 let. Choroba (v Itálii označovaná také jako *mal del sengo*, *calcinaccio* či *callcineto*; ve Francii jako *muscardine*) byla charakteristická rychlým usmrcením hostitele (housenky *Bombyx mori*), který byl v krátké době, za podmínek vysoké vzdušné vlhkosti, pokryt bílým, práškovitým povlakem. Stejným původcem onemocnění se zabýval také Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, profesor přírodní historie na universitě v Miláně. Toto onemocnění popsal v roce 1935 a pojmenoval na počest Agostina Bassiho, jeho objevitele *Botrytis bassiana* (Dirlbeková 1991). Na počátku 20. stol. se studiem patogena zabýval Beauverie, roku 1912 Vuillemin revidoval systematické zařazení a vytvořil nový rod, který pojmenoval na počest Beauverieho, *Beauveria* (Zimmermann 2007; Dirlbeková 1991).

*Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae) je široce polyfágním druhem, který byl izolován z více než 700 druhů hmyzu, především ze zástupců Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera a Orthoptera (Goettel et al. 1990). Infikuje všechna vývojová stadia včetně dospělců hmyzu. V rámci druhu se vyskytuje mnoho různých kmenů, které projevují značnou variabilitu v patogenitě, virulenci a hostitelském spektru. I přes tento fakt široké polyfágnosti patogena, jsou pouze v malém měřítku pozorovány epizootie v populacích přirozeně se vyskytujícího hmyzu (Feng et al. 1994). To by mohlo být vysvětleno skutečností, že *B. bassiana* je primárně organismem půdní mykoflóry, kde je schopna přežívat v podobě mycelia uvnitř těla uhynulého hostitele, nebo prostřednictvím konidií (Gillespie, Moorhouse 1988). Konidie si mohou uchovávat v půdě životnost až 2 roky. Benz (1987) zaznamenal, že konidie udržované v zatemnění a optimálních vlhkostních podmínkách při 8°C, si po roce uchovávali 99% životnost, po 2 letech pak 90% životnost. Půdní prostředí je pro zachování životaschopnosti konidií více příznivé než např. listová plocha. Pokusy, které prováděli

Gardner, Sutton a Noblet (1977), ukázaly, že konidie aplikované na listy sóji vykazovaly po 5-10 dnech od aplikace pouze 50% životnost oproti životnosti při aplikaci. Hlavním determinantem této rozdílnosti v životaschopnosti konidií je vliv UV záření. Proto také persistence konidií aplikovaných proti škůdcům, vyskytujících se v kulturách skleníkových plodin (kde sklo slouží jako efektivní UV filtr), je vyšší než v polních podmínkách (Gillespie, Moorhouse 1988).

I když je *B. bassiana* známa především jako půdní entomopatogenní houba, studie prováděné na rostlinách kukuřice (Lewis, Bing 1992), na rostlinách bramboru (Johnes 1994) a na rostlinách rajčete (Leckie 2002) prokázaly, že může docházet k endofytním symbiotickým vztahům s hostitelskou plodinou. Tohoto jevu je využíváno v biologické ochraně kukuřice proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*). Na povrchu listu dochází ke klíčení, přičemž prodlužující se klíček mění se v hyfu, proniká přes epidermis listu kukuřice. Takováto infekce se neprojevuje žádnými symptomy (Wagner, Lewis 2000). Tímto způsobem může být pak snadno infikován i škodlivý činitel (larvy zavíječe kukuřičného), vyskytující se uvnitř plodiny.

*Beauveria bassiana* se vyznačuje bílými, později nažloutlými nebo příležitostně načervenalými koloniemi. Na obrácené straně je bezbarvé, nažloutlé nebo narůžovělé barvy. Bazální část konidiogenních buněk je kulovitého až baňkovitého tvaru s 20 µm dlouhou apikální částí (rachis), často zubovitě (zig-zag) formovanou. Vzdušné konidie jsou hyalíní, kulovité až elipsoidní, zpravidla 2 - 3×2-2.5 µm velké, tvořící shluky vypadající jako bavlněné míčky (Zimmermann 2007).

Entomopatogenní houba *B. bassiana* má vysoký potenciál být využita jako biopesticid. Eilenberg et al. (2001) popisuje čtyři základní strategie: (1) **klasická biologická ochrana**, úmyslná introdukce cizokrajného kmenu pro dlouhodobou neřízenou ochranu; (2) **inokulativní biologická ochrana**, úmyslné vnesení endemického kmenu, pro dlouhodobou neřízenou ochranu endemických druhů škůdců; (3) **inundativní biologická ochrana**, užití entomopatogenní houby k eliminaci škůdce, kdy je ochranou dosaženo překrytí škůdce velkým množstvím bioagens; (4) **konzervativní biologická ochrana**, změnami v životním prostředí navýšit možnost přirozené nákazy.

### 2.3.1. Vývojový cyklus entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*

Stejně tak jako v případě ostatních entomopatogenních hub, tak i houby z rodu *Beauveria* napadají svého hostitele obecně přes kutikulu (Zimmermann 2007), i když



byly zaznamenány také infekce alimentárním traktem, např. u některých mravenců rodu *Solenopsis* (Broome et al. 1976). Infekční cyklus se skládá z následujících fází: (1) přichycení spor na kutikulu hostitel; (2) klíčení spor; (3) penetrace kutikuly; (4) překonání imunitních obraných reakcí hostitele; (5) proliferace uvnitř těla hostitele (parazitická fáze vývojového cyklu); (6) externí růst a konidiogeneze (saprofytická fáze vývojového cyklu) (Zimmermann 2007).

Uchycení, adheze konidií ke kutikule hostitele je zprostředkováváno silnými vazebnými silami a tento proces je procesem pasivním. Toto prvotní spojení je vytvářeno nespecifickými adhezními silami mezi hydrofobním povrchem konidií a epikutikulou hmyzu nebo prostřednictvím elektrostatických sil. Bylo také prokázáno, že látky jako hemaglutiny, glykoproteiny či N-acetylglucosamin, jenž byly zjištěny v povrchové vrstvě konidí a kutikule hostitele, se podílejí na adhezi konidií k povrchu těla hostitele (Boucias et al. 1988).

Je-li konidie uchycena k povrchu těla vnímavého hostitele, může dojít ke klíčení. Některé studie říkají (Smith, Grula 1981), že konidie *B. bassiana* potřebují ke svému klíčení zdroje uhlíku a dusíku, naproti tomu jiné studie ukazují, že klíčení není závislé na příjmu živin z externích zdrojů, jelikož konidie samotná má dostatečné zdroje zásobních látek (Boucias et al. 1988). Významnou roli při klíčení zaujímají environmentální faktory jako teplota a vlhkost, ale také některé látky přítomné v kutikule - kutikulární lipidy, krátké řetězce mastných kyselin, aldehydy, voskové estery, ketony a alkoholy, které mohou mít inhibiční účinky. (Zimmermann 2007). Optimální teplota pro klíčení se v závislosti k různým kmenům pohybuje v rozmezí 23-28°C (Müller-Kögler 1965), optimální vlhkost pak v rozmezí 92-100% (Hallsworth, Magan 1999). Jsou-li všechny podmínky příznivé, začíná klíčení asi po 10 hodinách od přilnutí konidie k povrchu hostitele a zhruba po 20-ti hodinách je dokončeno (Zimmermann 2007).

K penetraci kutikuly dochází převážně v místech spojení tělních segmentů, obecně pak v místech s menší sklerotizací kutikuly. Kmeny *B. bassiana* mohou penetrovat kutikulu přímo, některé kmeny však vytváří apresoria. Zároveň studie ukázaly, že různé kmeny *B. bassiana* produkují odlišné kutikulu-degradující enzymy, které mají souvislost s rozdílnou patogenitou různých kmenů. (Boucias, Pendland 1998). Penetrace kutikuly je tak procesem v němž se uplatňují mechanické prvky (tlak - penetrující hyfa) a zároveň prvky biochemické (kutikulu degradující enzymy – lipázy, protézy, chitinázy). Studie, kterou prováděl Smith a Grula (1981) ukázala, že pro

degradaci chitinu chitinázami, je zapotřebí nejprve proteázové aktivity. Toto pak naznačuje, že chitin je chráněn proteinovým obalem (Boucias, Pendland 1998).

Na počátku kolonizace hostitele, během penetrace a invaze do hemocelu, musí patogen překonat imunitní reakce hmyzu. Interakce mezi patogenem a imunitním systémem hostitele je složitým procesem, odehrávajícím se na molekulární a buněčné úrovni (Vilcinskas, Götz 1999). Během infekčního procesu produkuje patogen proteolytické enzymy a toxiny, zatímco imunitní odpověď hostitele se může skládat z komplexu humorálních a buněčných mechanismů. Tyto mechanismy se skládají z produkce antifungálních látek, inhibitorů proteáz a obraných proteinů, které odbourávají toxiny v těle hostitele (Zimmermann 2007). *B. bassiana*, jak se ukazuje, má mnohostranný potenciál obcházet a potlačovat buněčné obranné mechanismy hostitele (Hung, Boucias 1992).

Po úspěšné penetraci a průniku do hemocelu hostitele produkuje patogen pučením tenkostěnná tělíska podobná kvasinkám a blastosporám - endokonidie (velikost obvykle  $2 \times 7 \mu\text{m}$ ), která jsou patrná již 48 hodin od počátku infekce (Boucias, Pendland 1998). Tato tělíska jsou pak pasivně distribuována hemolymfou po těle hostitele do ostatních tělních orgánů. V této fázi infekčního cyklu využívá patogen ke svému růstu živiny obsažené v hemolymfě hostitele a zároveň produkuje množství toxinů zahrnujících beauvericin, bassianolide, bassiacridin, oosporein, beauveriolides, beauverolides a oxokyseliny (Zimmermann 2007). Parazitická fáze infekčního cyklu je zakončena smrtí hostitele, která nastává kombinací několika faktorů. Smrt hostitele bývá způsobena produkcí toxinů patogenem, vyčerpáním energetických rezerv (fyziologické vyhladovění) a invazí do tělních orgánů hostitele a jejich destrukce.

Uhnutím hostitele začíná saprofytická fáze infekčního cyklu. Patogen vytváří uvnitř uhynulého hostitele myceliální masu, dochází k takzvané mumifikaci hostitele. Za optimálních podmínek dochází ke sporulaci na povrchu těla mumifikovaného hostitele. Mycelium prorůstá vně a dochází ke konidiogenezi. Pokud však nejsou podmínky vhodné ke sporulaci, obzvláště pak nízká relativní vzdušná vlhkost, může patogen setrvat v perzistentní fázi uvnitř uhynulého hostitele, v podobě mycelia (Boucias, Pendland 1998). Patogen může vstupovat do antagonistických vztahů s jinými organismy, které také osidlují tělo uhynulého hostitele, prostřednictvím toxických látek, které produkuje. Například beauvericin má baktericidní účinky, oosporein je pak látkou s antivirální aktivitou, u něhož byly zaznamenány také antibakteriální účinky proti gram-positivním bakteriím, v menší míře pak účinky proti bakteriím gram-negativním

(Vey et al. 2001). Vývojový cyklus patogena, pokud je realizován za vhodných podmínek, může být dokončen za 2-7dnů (Goettel, Jaronsky 1997).

Gottwald a Tedders (1982) prokázali, že klesá-li hodnota RH v rozmezí 100-50%, jsou konidie uvolňovány do prostředí v zanedbatelném množství, naproti tomu klesne-li hodnota RH pod 50%, je uvolňování konidií z konidioforů stimulováno. Šíření konidií v prostředí a mechanismy, které zajišťují prvotní kontakt spory s hostitelem, jsou náhodné povahy a z větší části bývají zprostředkovány abiotickými faktory prostředí (Landa 1994). Nejčastěji to bývá větrnými proudy a vodou. Nezanedbatelný způsob rozšiřování spor patogena je také tzv. autodiseminace, kdy je patogen šířen v populaci hostitele kontaktem mezi jedinci zdravými a jedinci nesoucími nákazu (McCoy et al. 1988). Tohoto jevu bylo využito k vývoji zřízení pro introdukci *B.bassiana* do populací *Ips typographus* (Vaupel, Zimmermann 1996) a také do populací *Carpophilus lugubris* (Vega et al. 1995).

### 2.3.2. Vliv patogena na necílové organismy

Vliv biopreparátů na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* a biopreparátů obecně, v sobě nese nejen aspekt účinnosti vůči organismům, proti nimž je cíleně aplikován, ale také hledisko, jakým způsobem účinkuje na necílové organismy. *B. bassiana* je přirozeně se vyskytujícím druhem jak v půdním prostředí, tak prostředí vzdušném. Toto dlouhodobé evoluční soužití s jinými organismy vedlo ke vzniku mnoha forem interakcí (Zimmermann 2007). Z hlediska bezpečnosti užití mikroorganismů v biologické ochraně, se jako potencionální problém jeví: (1) konkurenční vytlačení necílových organismů; (2) alergenita; (3) toxigenita vůči necílovým organismům; (4) patogenita na necílové organismy a (5) fitness cílového hostitele (Gottel et al. 2001). Je však velmi nepravděpodobné, že by umělé zvýšení hustoty indigenního kmenu entomopatogenní houby vedlo k trvalým ekologickým škodám (Gottel 1995).

Neměli bychom však také zapomínat na fakt existence fyziologického a ekologického vymezení hostitele. Fyziologické vymezení hostitele udává rozsah druhů hmyzu, které mohou být infikovány v laboratorních podmínkách, zatímco ekologické vymezení hostitele, udává potenciální spektrum hostitelů v přírodě nebo v okolních podmínkách (Hajek, Butler 2000). I přes velkou škálu hostitelů entomopatogenní houby *B. bassiana* je hostitelské spektrum kmenovým rysem (Gottel 1995).

Broza et al. (2001) prokázal, že chvostoskok *Folsomia candida* není náchylný k infekci *B. bassiana*. Při potravním příjmu patogena, nedocházelo k usmrcení jedinců ani k jiným škodlivým účinkům. K podobným závěrům došel Visser et al. (1987), který zjistil vysokou četnost výskytu patogena *B. bassiana* na chvostoskoku *Onychiurus subtenuis*, aniž byl zaznamenán úhyn vlivem tohoto patogena. Tyto poznatky poukazují na neexistenci škodlivých účinků u výše popsaných druhů, které naopak mohou sehrávat důležitou roli při šíření patogena *B. bassiana* v půdním prostředí.

V polních pokusech, které prováděl Parker et al. (1997), účinku emulgovatelného koncentrátu *B. bassiana* na necílové lesní členovce, bylo nashromážděno (odchyceno do zemních pastí) 3615 bezobratlých a z tohoto množství se po aplikaci přípravku *B. bassiana* projevila infekce jen u 2,8% jedinců. *B. bassiana* v sobě nese velký potenciál k využití v lesním hospodářství k regulaci četnosti škůdců, aniž by měla nějak významný negativní dopad na půdní mikroflóru.

I přes obecnou platnost, že *B. bassiana* nemá toxické ani infekční účinky vůči obratlovcům, byla u některých druhů pozorována infekce tímto patogenem. Testy, zkoumající účinky *B. bassiana* na bažantu obecném (*Phasianus colchicus*), však neprokázaly žádné histopatologické změny u obou pohlaví mezi 17 – 25 dnem ani rozdíl ve hmotnosti, ve srovnání s kontrolní skupinou (Johnson et al. 2002). K obdobným závěrům došel také (Donovan-Peluso et al. 1980), při testech se skokanem levhartím (*Rana pipiens*).

Navzdory širokému hostitelskému spektru entomopatogenní houby *B. bassiana*, ji může být využito s minimálním dopadem na necílové organismy, zvláště pak vezmeme-li v potaz výběr izolátu a časoprostorové faktory (Vestergaard 2003).

## **2.4. Beauveria bassiana v ochraně lesa proti lýkožroutu smrkovému**

Využívání biopreparátů na bázi *B. bassiana* proti *I. typographus* je rozšířeno zejména v Německu, Švýcarsku a Rakousku, na experimentální úrovni je tato houba zkoušena i v dalších zemích (např. USA, Austrálie, Finsko, Polsko). Nejčastěji je *B. bassiana* aplikována formou vodních suspenzí spor na povrch napadených stromů nebo stromových lapáků. Výsledky laboratorních studií a provozních aplikací dokazují, že v porovnání s většinou ostatních druhů entomopatogenních hub vykazuje *B. bassiana* po aplikaci na dospělce *I. typographus* nejen nejvyšší virulenci, ale i zjevně

největší adaptaci na tohoto hostitele ve smyslu autodiseminace. Příkladem praktického využívání tohoto jevu je i unikátní forma aplikace *B. bassiana*, při které je práškový koncentrát spor patogena aplikován přímo do sběrné části feromonového lapače, který je upraven tak, aby byla zachována jeho atraktantní funkce, nicméně dospělci kůrovce nejsou natrvalo odchyceni sběrnou částí lapače. Cílem této aplikace je kontaminovat povrch těla dospělců vysokou dávkou spor a zajistit tak nejen usmrcení konkrétního jedince kontaminovaného při průchodu lapačem, ale zároveň podpořit i šíření nákazy v lokální populaci. Praktické výsledky prokázaly, že tato forma využití biopreparátů na bázi *B. bassiana* je velmi účelná zejména v situacích, kdy od aplikace není očekáván okamžitý účinek, ale perspektiva dlouhodobějšího potlačování populací škůdce (Landa et al. 2007).

## **2.5. Stručná charakteristika významných mitosporických entomopatogenních hub**

### **2.5.1. *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch**

*Beauveria brongniartii* (Hypocreales, Clavicipitaceae) ve srovnání s *B. bassiana* není tak častým druhem, i přesto je kosmopolitně rozšířena. Byla popsána na konci 19. stol. v souvislosti propuknutí epizootie u larev chrousta obecného (*Melolontha melolontha*). Hostitelské spektrum zahrnuje řády Coleoptera (Cerambycidae, Curculionidae, Ipidae, Lucanidae, Nitidulidae), Lepidoptera (Pyralidae), Homoptera (Cicadidae), Hymenoptera (Vespidae), Phasmatodea a Orthoptera (Vestergaard et al. 2003).

Pro houbu *B. brongniartii* je charakteristická tvorba z počátku bílých, později nažloutlých až narůžovělých, někdy i načervenalých kolonií. Elipsoidní konidie o velikosti 2,5-4,5 $\mu$ m, se shlukují, jsou uspořádané do malých skupinek či samostatně (Zimmermann 2007). Patogen roste a sporuluje při teplotách v rozpětí 2-33°C, přičemž optimum je 22-23°C (Müller-Kögler 1965). Při působení UV-C záření déle jak 5 min. jsou konidie inaktivovány, po 24 hodinách od aplikace na listy stromů ztratilo 96,5% konidií schopnost vyklíčit (Kopp 1988).

### 2.5.2. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin

Entomopatogenní houba *M. anisopliae* (Hypocreales, Nectriaceae) známá také jako „greene muscardine“ (infikovaný jedinec porůstá tmavým, zeleným myceliem), byla poprvé popsána Metschnikoffem na larvách vrubounovitých brouků. Patří mezi kosmopolitně rozšířené druhy hub běžné půdní mikroflory, schopných infikovat více jak 200 druhů hmyzu především z řádů Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hemiptera a Hymenoptera (Boucias, Pendland 1998). V současnosti jsou rozeznávány 4 poddruhy *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *majus*. (Driver et al. 2000).

Po infekci *M. anisopliae* umírá hostitel po 5-10 dnech, produkuje dva typy spor. Vzdušné konidie jsou vytvářeny v průběhu saprofytické fáze na sporogenních hyfách a jsou označovány jako asexuální spory. Blastospory, druhý typ spor, se vytváří v hemolymfě hostitelského hmyzu (Leland 2001).

Jednotlivé patogenní kmeny mají široké teplotní rozpětí pro růst. Některé kmeny rostou při teplotách pod 12°C, jiné při teplotách převyšující 35°C, nicméně optimální teploty pro růst se pohybují v rozpětí 25-30°C (Boucias, Pendland 1998).

### 2.5.3. *Isaria fumosorosea* (Wize)

*Isaria fumosorosea* (Eurotiales, Trichocomaceae), dříve *Peecilomyces fumosoroseus*, je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, jenž se vyznačuje širokou polyfágností. Na hostiteli, jenž je infikován houbou *I. fumosorosea*, se vytváří zpočátku bílé vatovité mycelium, které přechází do nafialovělé až šedofialové barvy při plné sporulaci a vatovitý charakter mycelia přechází v prašný. Vzpřímené, hyalinní konidiofory, které se tvoří na vzdušném myceliu, jsou na hyfách umístěny v přeslenech. Konidie cylindrického tvaru se vytvářejí na koncích phialid a postupně tak formují řetízkovité útvary, vždy 4-6 phialid se zformuje na koncích konidioforů. Jednotlivé řetízky se mohou skládat až z 50 konidií (Samson 1974).

I když je *I. fumosorosea* považován za entomopatogenní druh, který je nejčastěji izolován ze zástupců řádů Lepidoptera, Diptera a Coleoptera, sehrává významnou roli také jako půdní saprofytický mikroorganismus (Čurn et al. 1997).

Optimální teploty pro růst se pohybují v rozmezí 20-30°C, teploty v rozmezí 30-40°C jsou pro růst více limitující než teploty nižší (8-11°C) (Vidal et al. 1997).

#### **2.5.4. *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & W. Gams**

Tento druh entomopatogenní houby (Hypocreales, Cordycipitaceae) byl poprvé izolován z červce *Coccus viridis* koncem 18.stol na Jávě. Od té doby bylo zaznamenáno mnoho přirozených epizootií především v řádu Homoptera, méně pak v řádech Orthoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera a Hymenoptera. U těchto hostitelů napadá především larvy.

Sporulace je hlavním znakem sloužícím k determinaci patogena. Na vzdušném myceliu se v průběhu konidiogeneze vytvářejí typické lahvicovité buňky, na jejichž konci vznikají konidie elipsoidního tvaru. Na myceliu jsou konidiofory rozmístěny v přeslenech, ze stejné zóny vyrůstají vždy 2-4 konidiofory. Nová konidie odtlačuje již dříve vytvořenou do shluku, kde se nakonec pokrývají mucilagenní vrstvou, která drží kompaktní tvar (Hall 1985).

Pro optimální průběh nákazy tímto patogenem je nepostradatelná vysoká relativní vlhkost, zvláště v počáteční fázi infekce. Optimum pro vyklíčení spor je 97% RH, pro růst pak 85-90% RH, přičemž musí být udržována alespoň 10-12 hodin. Teplotní rozmezí 20-25°C (Samson, Romach 1985).

### **2.6. Entomopatogenní houby v biotestech**

Využití biotestů, k posouzení vlivů entomopatogenních hub vůči hmyzu, je v podstatě neomezené. Už toto samé, ale zároveň i fakt, že existuje velké množství druhů entomopatogenních hub s typickým spektrem hostitelů vlastním danému druhu (ať širším nebo užším) znamená, že neexistují žádné standardizované metody biotestů co se entomopatogenních hub jako celku týče. Z tohoto důvodu musí být biotest standardizován v rámci konkrétního hostitele a patogena, ale také cíle s jakým je vypracováván. Bioassay může být využit k determinaci a kvantifikaci vztahu mezi hostitelem a patogenem a zároveň k určení vlivu biotických a abiotických faktorů působících na tento vztah. Biotesty entomopatogenních hub v sobě nesou 5 důležitých aspektů (1) determinace virulence, (2) porovnání virulence jednotlivých izolátů, (3) determinace spektra hostitelů, (4) determinace epizootického potenciálu, (5) vliv biotických a abiotických faktorů (Butt, Goettel 2000).

Před tím, než vypracujeme protokol o jednotlivých krocích biotestu, tak jak bychom měli postupovat, musíme mít jasně definovaný cíl biotestu samotného. Postup

biotestu by měl být uskutečnitelný a účinný, musí být navrhnut tak, aby nám poskytoval objektivní a smysluplné výstupy. V neposlední řadě musíme pečlivě zvážit volbu a vývojové stadium hostitele, infekční propagule, inokulační metodu, formulaci inokula, podmínky inkubace, metodu hodnocení mortality a statistickou analýzu. Samostatným a neopomenutelným aspektem biotestu je hodnocení rizik, v souvislosti s vlivem daného patogena na necílové organismy. Všechna biologická testování, by měla v sobě zahrnovat také „neošetřenou“ kontrolu, jejímž cílem je monitoring přežívání hostitele v postinokulačních podmínkách inkubace ve srovnání s ošetřeným hostitelem. Tato kontrola je ošetřena pouze nosičem používaným k aplikaci inokula. Ať již provádíme testování na jednotlivých druzích hostitelského spektra nebo na necílových organismech, je nutné, aby hostitel u kterého je prokázána citlivost na testovaného patogena, byl paralelně ošetřen s necílovými organismy za účelem pozitivní kontroly. Jinak budeme obtížně interpretovat negativní výsledky, pokud nepředložíme důkazy o virulenci inokula na vnímavého hostitele za stejných podmínek biotestu (Butt, Goettel 2000).

Již standardizované biotesty byly využity např. při determinaci efektu věku specifické dávky na mortalitu zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) entomopatogenní houbou *B. bassiana* (Feng et al. 1985), Landa et al. (1994) vypracoval biotest na bázi entomopatogenních hub (*B. bassiana*, *I. fumosorosea* a *L. lecanii*) proti molícím, který je založen na rychlé charakterizaci tempa růstu a vývoje entomopatogenní houby na nymfách hostitele. Dalším příkladem by mohl být biotest s patogenem *Aschersonia aleyrodis* proti molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) (Fransen et al. 1987), který studoval vliv tohoto patogena na mortalitu jednotlivých vývojových stádií hostitele.

### **2.6.1. Základní procedury v biotestu**

#### **Inokulace**

Inokulační metoda je přímo závislá na formě inokula pro vlastní aplikaci a také na druhu hostitele, který má být inokulován. Inokulum je obvykle aplikováno na povrch kutikuly hostitele přímými metodami (práškováním, máčením a stříkáním) nebo pomocí metod nepřímých s využitím návnad.



## Inkubace

Průběh inkubace je silně ovlivněn podmínkami, kterým je hostitel po inokulaci patogenem vystaven. Těmito základními parametry jsou teplota, RH a záření. V laboratorních testech bylo zjištěno, že entomopatogenní houby jsou schopny vyvolávat infekci v širokém rozpětí teplot (10-30°C), optimální teplota pro vyvolání infekce je v rozmezí mezi 20-25°C. Inhibice růstu mnoha rodů entomopatogenních hub počíná okolo 30°C a růst obvykle ustává při 37°C. Dostupnost vody je kritickým faktorem ve všech vývojových stádiích životního cyklu entomopatogenních hub. Základní hodnotou pro většinu hub je hodnota vyšší než 96% RH, jak pro klíčení, tak i myceliální růst (Butt 2002). Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím persistenci propagulí je již zmíněné záření. Propagule entomopatogenních hub jsou velmi náchylné k poškození UVB zářením (280-320 nm), v menší míře pak UVA (320-400 nm). Byla však pozorována významná rozdílnost v citlivost k ozařování jak v rámci jednotlivých rodů, tak i kmenů (Fragues et al. 1996).

## Hodnocení mortality

Mortalitu vyhodnocujeme každý den, což nám umožňuje vypočítat střední dávku, ale také střední letální dobu. To pak můžeme snadno využít k porovnání rozdílnosti jednotlivých typů ošetření (Butt, Goettel 2000).

### **2.6.2. *Beauveria bassiana* v biotestech proti kambioxylofágům**

Entomopatogenní houba *B. bassiana* je kosmopolitně rozšířeným a všeobecně se vyskytujícím druhem, patřícím k přirozeným nepřátelům lýkožrouta smrkového. V laboratorních, ale i polních podmínkách byly podrobně zkoumány interakce tohoto patogenního mikroorganismu vůči lýkožroutu smrkovému a několika dalším podkorním a dřevokazným zástupcům.

Wegensteiner (1992, 1996) zkoumal účinnost různých izolátů *B. bassiana* vůči lýkožroutu smrkovému, dále se zabýval různými metodami aplikace biopreparátů. Obdobně se touto problematikou zabýval Kreutz (2002), který navíc zkoumal možnosti využití tohoto patogena v kombinaci s feromonovými lapači. Ve speciálně upravených lapačích docházelo k inokulaci dospělců sporami patogena, za účelem introdukce patogena do populace lýkožrouta smrkového.

Doberski (1981 a, b) se zabýval patogenitou *B. bassiana* vůči larvám a dospělcům bělokaze jilmového (*Scolytus scolytus*), dále studoval vliv teploty

a vlhkosti na průběh infekce patogena *B. bassiana* u bělokaze jilmového. Infektibilitu patogenní houby *B. bassiana* vůči dřevokazu čárkovanému (*Xyloterus lineatus*) v laboratorních podmínkách zkoumal Pražák (1997).

### **2.6.3 Kreutzův biotest vlivu patogena *Beauveria bassiana* na dospělce *Ips typographus* v laboratorních podmínkách**

Zvířata, použitá pro potřeby tohoto biotestu, pocházela z umělého chovu Institutu pro lesní zoologii při Univerzitě v Göttingenu. Chov brouků byl prováděn na 90 cm dlouhých smrkových polenech, kdy jedno poleno bylo obsazeno průměrně 150–300 jedinci. Teplota byla udržována v rozmezí 25–28°C při relativní vzdušné vlhkosti (RH) 40–50%. Pro vlastní biotest byla vybírána čerstvě vylíhlá imága. Jedinci neupotřebení v biotestu, se uchovávali v teplotě 4°C, ve ztuhlém stavu, kdy energetické ztráty organismu jsou sníženy na minimum.

Vlastní biotest se skládal z následujících kroků: (1) brouci z umělého chovu byly 3 dny drženy na umělé dietě (Kreutz 2002); (2) do Petriho misky o průměru 9 cm, do níž byl vložen filtrační papír, bylo umístěno vždy 10 ošetřených nebo kontrolních brouků. Takto se nechali inkubovat při 25°C a 70%RH bez přístupu světla; (3) inkubace probíhala po dobu 7 dnů, přičemž každý den byl kontrolován počet brouků, kteří uhynuli a počet brouků, kteří byli infikováni patogenem; (4) uhynulí brouci se odebírali a následně testovali na infekci patogenem, byli přendáni do vlhké komůrky do 25°C při 90% RH a po 2 týdny se sledovalo, jestli se projeví infekce; (5) vždy se provádělo 6 opakování v testu a test se 2x opakoval.

Umělá dieta byla zařazena do schématu biotestu za účelem zvýšení úrovně fitness brouků. Pokusy prokázaly (Kreutz 2002), že brouci pocházející z umělého masového chovu jsou ve větší míře náchylní k přirozené infekci houby *B. bassiana* než brouci, odchycení do feromonových pastí ve volné přírodě a podrobeni stejným testům. U brouků z masového chovu, jimž byla předložena umělá dieta DW (receptura popsána níže) jako živné médium, došlo k 100% mortalitě za 33 dnů a přirozená infekce *B. bassiana* se projevila na 25% jedincích, zatímco u brouků, kteří měli jako živný substrát sterilní smrkovou kůru došlo k 100% mortalitě již po 29. dni a přirozená infekce se projevila na 20% jedincích (Kreutz 2002). Jiné pokusy poukázaly na kladný korelační vztah mezi obsahem lýka v umělém živném médiu a infekcí dospělců patogenem *B. bassiana* (Mattanovich et al. 1999).

### Recept umělé diety (DW) dle Mattanoviche (1999)

(%)

|                             |                          |
|-----------------------------|--------------------------|
| Agar: 4                     | Sachroza: 2,6            |
| Celulosa: 4                 | Sojová mouka: 3          |
| Fruktoza: 1,86              | Streptomycinsulfat: 0,06 |
| Glukoza: 0,37               | Škrob: 5                 |
| Kyselina sorbová: 0,11      | Voda: 65,27              |
| Lýko: 10                    | Wesson's Salz: 0,28      |
| L-methionin: 0,002          |                          |
| Mleté pšeničné klíčky: 0,45 |                          |
| Pšeničné klíčky: 3          |                          |

\* do vody byla přidána směs vitamínů (Mattanovich et al. 1999)

Kreutz (2002) pozměnil dietu DW nahrazením lýka rozemletou smrkovou kůrou a mleté pšeničné klíčky zaměnil za mleté kukuřičné klíčky. Na 1kg živného média pak přidal 2g niparginu a kyseliny benzoové. Na této dietě (DKK) docházelo při pokusech na broucích z masového chovu k 100% mortalitě po 46 dnech a přirozená infekce *B. bassiana* se vyskytovala pouze u 4% jedinců. Z těchto důvodů byla v následném testování užívána jen tato dieta (DKK).

U obecného postupu biotestu, jenž byl výše popsán, došlo k takovým specifickým úpravám, tak aby odpovídaly nárokům testování, které následně z něho vycházelo.

#### 1. Vliv živného substrátu

V pokusech byl zjišťován vliv živného substrátu na citlivost *I. typographus* vůči komerčně vyráběnému přípravku Boverol®. Jako živné médium bylo užito smrkové kůry (5×5 cm), umělé diety DKK a filtračního papíru. Brouci byli ventrální stranou „ponoženi“ do konidiálního prachu přípravku a poté přendáni na příslušný živný substrát. Kontrolní brouci zůstali neošetřeni.

#### 2. Účinnost jednotlivých kmenů *B. bassiana* a vliv koncentrace konidií

Tyto pokusy byly prováděny s cílem prokázat vztah mezi koncentrací konidií daného patogenního kmene a jeho patogenitou vůči cílovému organismu. Brouci byli namáčení 3 vteřiny v suspenzi konidií o příslušné koncentraci ( $1,0 \times 10^6$ ;  $1,0 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^8$ ) a přendáni na smrkovou kůru (5×5 cm) umístěnou v Petriho misce. Inkubaci prodělávali v termostatu při 25°C a 70% RH. Obdobným způsobem se zjišťovala patogenita různých kmenů, s tím rozdílem, že brouci byli umístěni pouze na filtrační

papír v Petriho misce a brouci mající funkci kontroly, byli namáčení do destilované vody. K inkubaci docházelo opět v termostatu za výše popsanych podmínek.

### 3. Vliv teploty

Pro test závislosti patogenity na teplotě, byl znovu užit přípravek Boverol<sup>®</sup>. Brouci, ponořeni na 3s do suspenze příslušné koncentrace, byli umístěni na smrkovou kůru (5×5 cm) položenou na filtračním papíru v Petriho misce. Inkubace probíhala v termostatu při 70% RH a teplotách 15, 20, 25, 30 a 35°C. Test byl 4x zopakován (Kreutz 2002, Kreutz et al. 2004).

### 3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce je vypracování postupu standardního biotestu v laboratorních podmínkách, který by sloužil k objektivnímu porovnávání virulence jednotlivých nativních kmenů entomopatogenních hub, především druhu *Beauveria bassiana*, na dospělé líkožrouta smrkového (*Ips typographus*), odchycených pomocí feromonových lapačů.

Druhotným cílem je pak otestování vlivu jednotlivých metod aplikace biopreparátů na bázi entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na mortalitu dospělců líkožrouta smrkového.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. Živočišný materiál používaný v pokusech

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*),

Pro potřeby jednotlivých pokusů byla používána vitální imága lýkožrouta smrkového, která byla odchycena pomocí feromonových lapačů. Dospělí jedinci, jenž nebyli využiti v biotestech, byli uchováváni v teplotě 4°C (snížení energetických ztát organismu při zachování dostatečné vitality pro následné pokusy) pro další upotřebení. Před opětovným použitím byli takto zchlazení dospělci ponecháni cca. 1 hod. při pokojové teplotě, a poté následně pomocí jednoduchého fotoekletoru oddělení živí jedinci od uhynulých.

Potemník moučný (*Tenebrio molitor*)

Z důvodu nepravidelného letu lýkožrouta smrkového byly do jednoho pokusu (pokus č. 2) zařazeny larvy potemníka moučného (jistá podobnost v chitinizaci těla). Larvy pocházeli z chovu KRV.

### 4.2. Rostlinný materiál používaný v pokusech

V pokusech byla používána smrková kůra, která sloužila jako živný substrát dospělčům lýkožrouta smrkového. Neporušená kůra byla odebírána pouze ze zdravých stromů, které nebyly napadeny lýkožroutem smrkovým či jiným kambyloxylofágem. Kůra byla uchovávána při teplotě 4°C. Před vlastním použitím, byla kůra vysterilizována a nařezána na požadovaný rozměr.

### 4.3. Biopreparáty

V pokusech byly použity biopreparáty na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana*. V prvním typu biopreparátu byla jako nosič použita nutritivní složka, v druhém typu biopreparátu byla jako nosič použita směs nutritivní a inertní složky v poměru 1:9.

**Tab. 1.: Druhy a kmeny entomopatogenních hub, použitých v laboratorních biotestech**

| Kmen                          | Č. pokusu     | Zdroj izolace | Lokalita, měsíc/rok                |
|-------------------------------|---------------|---------------|------------------------------------|
| <i>Beauveria bassiana</i>     |               |               |                                    |
| I 101                         | 1; 2; 3; 4; 5 | Dospělec      | Prameny Vltavy, -/04               |
| NP 0001                       | 2; 5          | Dospělec      | Černá Hora, 6/08                   |
| NP 0002                       | 2; 5          | Dospělec      | Černá Hora, 6/08                   |
| NP 0003                       | 2; 5          | Dospělec      | Černá Hora, 6/08                   |
| NP 0004                       | 5             | Dospělec      | Styková lesní cesta, 6/08          |
| NP 0005                       | 5             | Dospělec      | Jelení cesta - U mlýna, 7/08       |
| NP 0006                       | 5             | Dospělec      | Borová Lada - Silniční slat', 7/08 |
| NP 0007                       | 5             | Dospělec      | I. zóna 19, odd.8, 6/08            |
| NP 0008                       | 5             | Dospělec      | Jelení skok (Oblík), 7/08          |
| NP 0009                       | 5             | Dospělec      | Březová cesta, 7/08                |
| NP 0010                       | 5             | Dospělec      | Poledník, 6/08                     |
| NP 0022                       | 5             | Dospělec      | Zlatý stoleček, 6/08               |
| NP0026                        | 5             | Dospělec      | Roklandský potok 7/08              |
| NP 0027                       | 5             | Dospělec      | Roklandský potok, 6/08             |
| NP 0028                       | 5             | Dospělec      | Smrčina, 7/08                      |
| NP 0029                       | 5             | Dospělec      | Křižovatka mezi Širokou, 7/08      |
| NP 0030                       | 5             | Dospělec      | Studená horizont, 7/08             |
| NP 0031                       | 5             | Dospělec      | Zlatý stoleček, 6/08               |
| <i>Beauveria brongniartii</i> |               |               |                                    |
| NP 0064                       | 5             | Dospělec      | V Kotli, 7/08                      |
| <i>Isaria fumosorosea</i>     |               |               |                                    |
| NP 0038                       | 5             | Dospělec      | Hraniční chodník, 6/08             |
| NP 0019                       | 5             | Dospělec      | Staré dráty, 6/08                  |
| <i>Lecanicillium lecanii</i>  |               |               |                                    |
| NP 0098                       | 5             | Dospělec      | Jelení skok (Oblík), 7/08          |
| NP 0066                       | 5             | Kůra          | Březová cesta, 7/08                |

#### 4.4. Izolace jednotlivých kmenů entomopatogenních hub

Přímá izolace z dospělce lýkožrouta smrkového

Z imág, u nichž došlo k proliferaci mycelia patogena na povrch kutikuly, byly spory přeneseny pomocí sterilního inokulačního očka na povrch agarizovaného živného média (PDA) s antibiotickou složkou (suprese bakteriální kontaminace). Přenos spor byl proveden formou separačních čar. V případě kontaminace byl přenos opakován až do získání čisté kultury daného kmene patogena.

Izolace pomocí živného média

Povrch selektivního živného média (PDA + a.i. dodine + antibiotická složka) byl inokulován heterogenní suspenzí, která byla získána vymytím částí kůry daného analyzovaného vzorku.

#### 4.5. Příprava konidiové suspenze

Povrch plně vysporulované kultury jednotlivých kmenů entomopatogenních hub byl přelit sterilním roztokem destilované vody s přídavkem detergentu 0,05% Tween 80. Koncentrace konidií v takto získané suspenzi byla spočítána v hematocytometru – počítací komůrce (Neubauerova vylepšená komůrka) a poté následně adjustována na standardní titr  $1,0 \times 10^7$  konidií v 1 ml suspenze.

#### 4.6. In vivo testy

Pro ověření vlivu nativních kmenů entomopatogenních hub (*Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii*) na mortalitu dospělců *Ips typographus*, účinnosti různých formulací biopreparátů těchto kmenů patogenů a účinnosti rozdílných metod aplikace biopreparátů, bylo vypracováno základní schéma biotestu, na němž byl založen postup všech pokusů. Toto schéma se skládalo z následujících dílčích kroků: (1) příprava vhodné vlhké komůrky - do vlhké komůrky byla následně položena vysterilizovaná smrková kůra; (2) ošetření dospělců *Ips typographus* či larev *Tenebrio molitor* - v tomto kroku byly jedinci vystaveni působení různých formulací biopreparátů na bázi entomopatogenních hub a pro ošetření bylo užito odlišných metod aplikace; (3) do každé vlhké komůrky bylo vždy umístěno 10 živých, ošetřených dospělců *Ips typographus* či larev *Tenebrio molitor* (pokus č. 2); (4) ke každému pokusu byla vždy připravena kontrolní varianta (5) inkubace - inkubace probíhala v podmínkách bez přístupu světla při teplotě 21°C; (6) vyhodnocení.



Toto základní schéma bylo pro postupy jednotlivých dílčích pokusů modifikováno, tyto modifikace jsou pak detailně popsány v zadání každého pokusu viz. Základní údaje pokusu.

Při vyhodnocování jednotlivých pokusů byl každý jedinec zařazen do příslušné skupiny. Pro potřeby vyhodnocení biotestů byly rozlišovány tři základní skupiny, zvlášť byla zaznamenávána imága živá, mrtvá a infikovaná. Stejným způsobem a stejnou stupnicí byly vyhodnocovány i larvy potměníka moučného v pokusu č. 2.

**Tab. 2.: Hodnotící stupnice**

|                        |  |
|------------------------|--|
| Živí jedinci (Ž)       | jedinec je vitální   |
| Mrtví jedinci (M)      | jedinec nejeví žádné známky vitality;<br>jedinec bez zjevné infekce ve formě mycelia na povrchu těla |
| Infikovaní jedinci (I) | jedinec nejeví žádné známky vitality;<br>patogen prolifерuje na povrch těla usmrceného jedince       |

#### **4.7. Ostatní metodické údaje**

Pro vyhodnocování pokusu byl použit binokulární mikroskop Zeiss. Obrázky byly zpracovány do formátu - .jpg a následně upravovány pomocí programů Adobe – PhotoShop a PaintShop Pro 5.0 a finálně upraveny v programu MS Word 2007, grafické listy byly zpracovány v programu MS Excel 2007.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### **Pokus č. 1.: Porovnání účinnosti práškového biopreparátu (nutritivní složka) a suspenze entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) na dospělé lýkožrouta smrkového**

Základní údaje pokusu:

#### a) První část pokusu

- připraveny vlhké komůrky - do Petriho misky umístěn filtrační papír, na nějž se přidalo 0,5ml destil. vody
- připravena suspenze Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml
- do každé vlhké komůrky bylo dáno 10 ošetřených živých brouků *Ips typographus*; varianta (2) bez ošetření brouků
- připraveny 4 varianty o 10 opakováních: (1) kontrola - brouci ponořeni v roztoku Tween 80 po 3 vteřiny; (2) superkontrola; (3) prášková formulace biopreparátu Bba I 101 - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /g a brouci po ní 30 vteřin lezli; (4) suspenze Bba I 101 - brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml
- pokus byl vyhodnocován 72, 120 a 168 h po založení

#### b) Druhá část pokusu

- připraveny vlhké komůrky - do Petriho misky umístěn filtrační papír, na nějž se přidalo 0,5ml destil. vody
- připravena suspenze Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml
- do každé vlhké komůrky vložena vysterilizovaná smrková kůra o rozměru 5×5cm
- do každé vlhké komůrky bylo dáno 10 ošetřených živých brouků *Ips typographus*
- byly připraveny 2 varianty o 5 opakováních; 1 varianta o 10 opakováních: (1) kontrola - brouci ponořeni v roztoku Tween 80 po 3 vteřiny (5 opakování); (2) prášková formulace biopreparátu Bba I 101 - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /g a brouci po ní 30

vteřin lezli (10 opakování); (3) suspenze Bba I 101 - brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml (5 opakování)

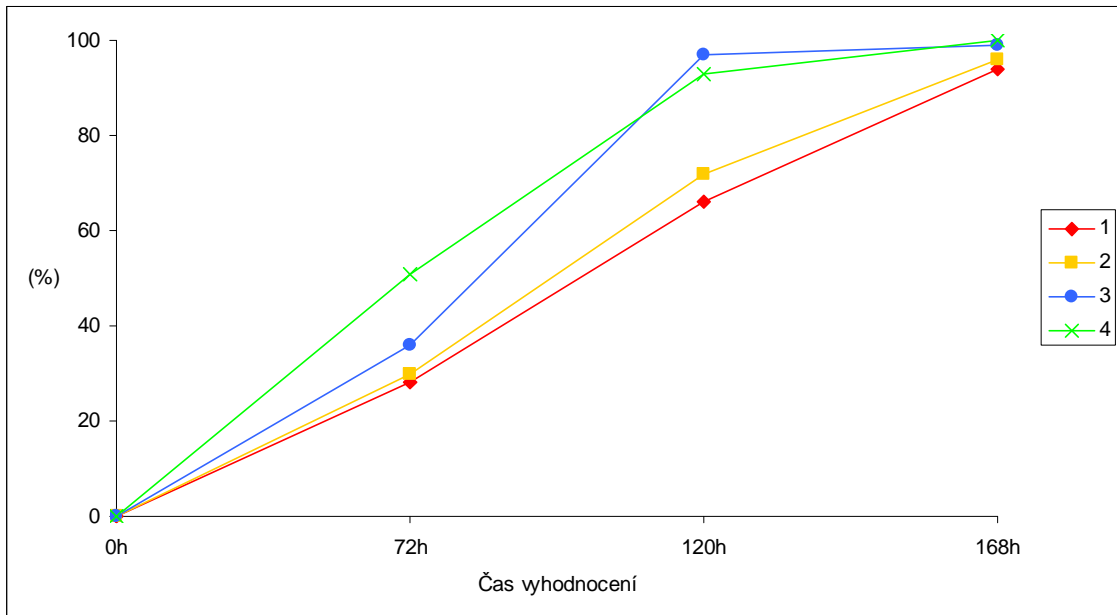
- pokus byl vyhodnocován 72, 120 a 168 h po založení - po 72 a 120 h byl biotest vyhodnocen aniž by byla kůra „rozebrána“; byli hodnoceni pouze viditelní brouci (brouci mimo kůru, nebo na jejím povrchu); při posledním vyhodnocení (168 h) byla již kůra „rozebrána“ za účelem nalezení zavrtných brouků

**Tab. 3.: Účinnost práškového biopreparátu (nutritivní složka) a suspenze entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) na dospělé lýkožrouta smrkového, varianta bez kůry ve vlhké komůrce**

| Způsob ošetření | Čas vyhodnocení (h) | Mrtví (%)  | Infikovaní (%) | Kumulovaná mortalita (%) |
|-----------------|---------------------|------------|----------------|--------------------------|
| <b>1*</b>       | <b>72</b>           | <b>28</b>  | <b>0</b>       | <b>28</b>                |
|                 | <b>120</b>          | <b>66</b>  | <b>0</b>       | <b>66</b>                |
|                 | <b>168</b>          | <b>94</b>  | <b>0</b>       | <b>94</b>                |
| <b>2*</b>       | <b>72</b>           | <b>30</b>  | <b>0</b>       | <b>30</b>                |
|                 | <b>120</b>          | <b>72</b>  | <b>0</b>       | <b>72</b>                |
|                 | <b>168</b>          | <b>93</b>  | <b>3</b>       | <b>96</b>                |
| <b>3*</b>       | <b>72</b>           | <b>36</b>  | <b>0</b>       | <b>36</b>                |
|                 | <b>120</b>          | <b>97</b>  | <b>0</b>       | <b>97</b>                |
|                 | <b>168</b>          | <b>99</b>  | <b>0</b>       | <b>99</b>                |
| <b>4*</b>       | <b>72</b>           | <b>51</b>  | <b>0</b>       | <b>51</b>                |
|                 | <b>120</b>          | <b>93</b>  | <b>0</b>       | <b>93</b>                |
|                 | <b>168</b>          | <b>100</b> | <b>0</b>       | <b>100</b>               |

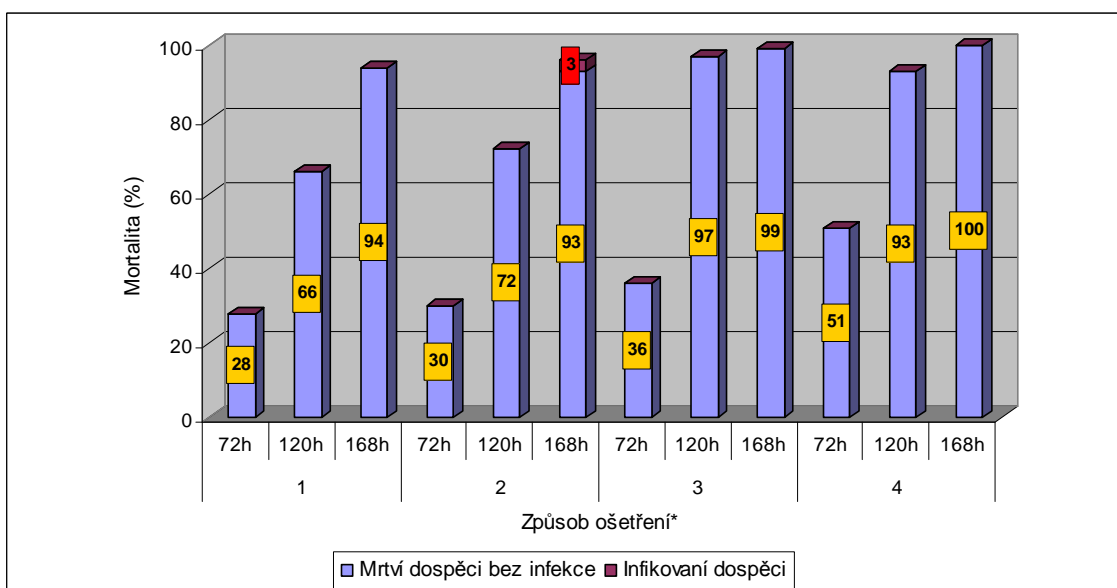
\* 1- kontrola; 2- superkontrola; 3- na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /g, po kterém brouci 30 vteřin lezli; 4- brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml

Graf 1.: Kumulovaná mortalita dospělců *Ips typographus* v aréně bez kůry po ošetření suspenzí Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml a práškovou formulací biopreparátu Bba I 101 (s nutritivní složkou) o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /g



1- kontrola; 2- superkontrola; 3- na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát, po kterém brouci 30 vteřin ležli; 4- brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi

Graf 2.: Mortalita dospělců *Ips typographus* v aréně bez kůry po ošetření suspenzí Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml a práškovou formulací biopreparátu Bba I 101 (s nutritivní složkou) o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /g



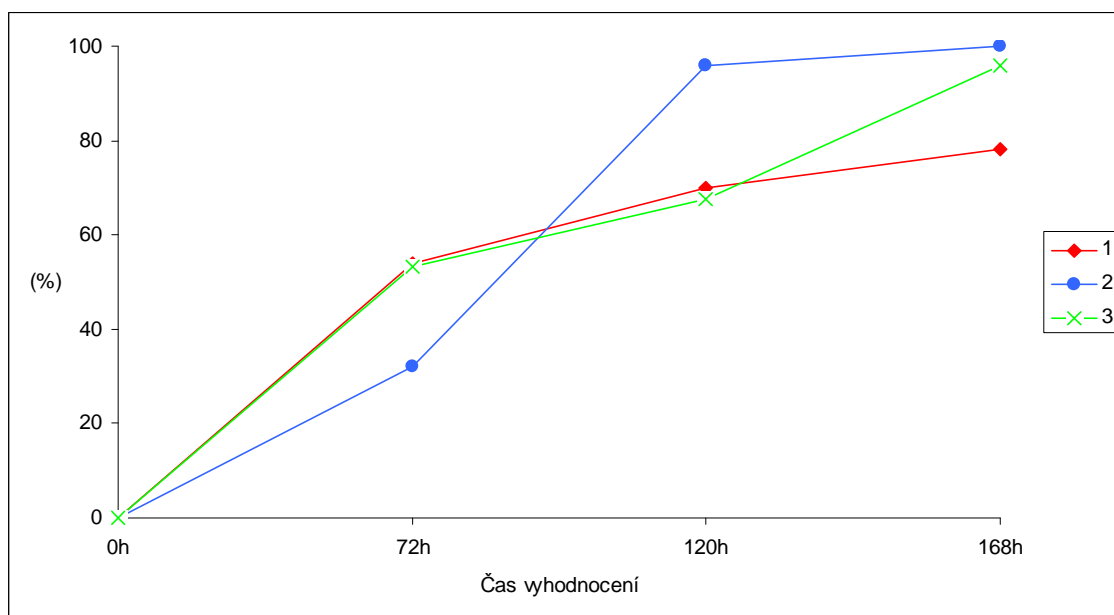
\* 1- kontrola; 2- superkontrola; 3- na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát, po kterém brouci 30 vteřin ležli; 4- brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi

**Tab. 4.: Účinnost práškového biopreparátu (nutritivní složka) a suspenze entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) na dospělé lýkožrouta smrkového, varianta s kůrou ve vlhké komůrce**

| Způsob ošetření | Čas vyhodnocení (h) | Mrtví (%)   | Infikovaní (%) | Kumulovaná mortalita (%) |
|-----------------|---------------------|-------------|----------------|--------------------------|
| 1*              | 72                  | 53,8** (39) | 0** (39)       | 53,8** (39)              |
|                 | 120                 | 70** (40)   | 0** (40)       | 70** (40)                |
|                 | 168                 | 74          | 4              | 78                       |
| 2*              | 72                  | 32,2** (90) | 0** (90)       | 32,2** (90)              |
|                 | 120                 | 92** (75)   | 4** (75)       | 96** (75)                |
|                 | 168                 | 24          | 76             | 100                      |
| 3*              | 72                  | 53,1** (32) | 0** (32)       | 53,1** (32)              |
|                 | 120                 | 67,5** (40) | 0** (40)       | 67,5** (40)              |
|                 | 168                 | 96          | 0              | 96                       |

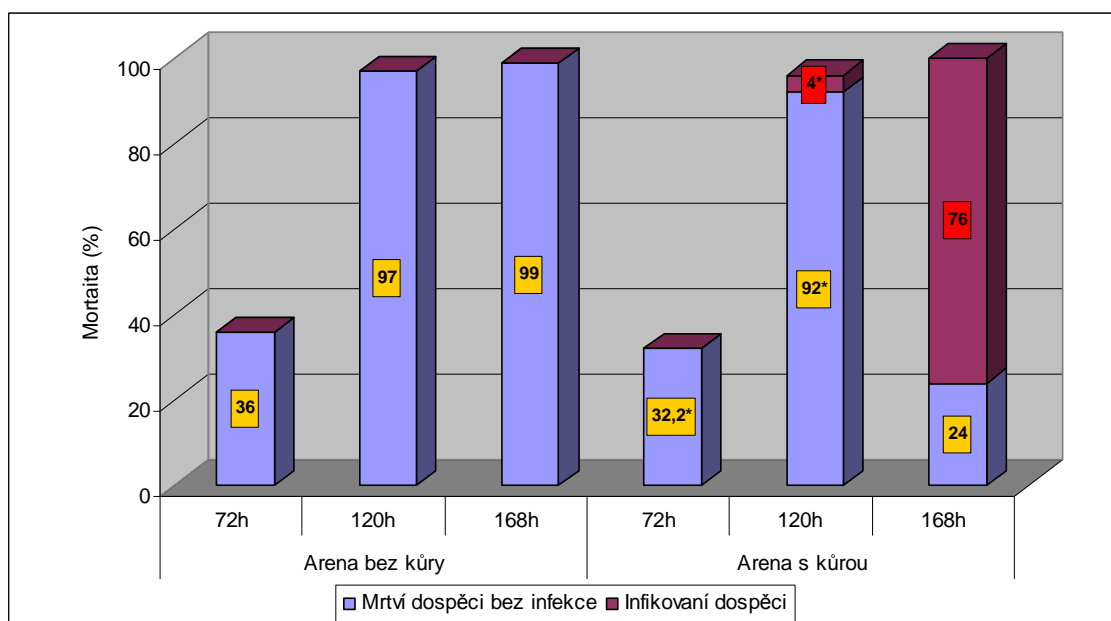
\* 1- kontrola; 2- na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/g$ , po kterém brouci 30 vteřin lezli; 3- brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$   
 \*\* % brouků, kteří byli nalezeni v aréně, aniž byla „rozebrána“ kůra (dospělci mimo kůru, nebo na jejím povrchu); číslo v závorce udává, z kolika nalezených jedinců je procentuální hodnota vypočítána

**Graf 3.: Kumulovaná mortalita dospělců *Ips typographus* v aréně s kůrou po ošetření suspenzí Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$  a práškovou formulací biopreparátu (s nutritivní složkou) Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/g$**



1- kontrola; 2- na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát, po kterém brouci 30 vteřin lezli; 3- brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi

Graf 4.: Mortalita dospělců *Ips typographus* po ošetření práškovou formulací biopreparátu (s nutritivní složkou) na bázi Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/g$



\* % brouků, kteří byli nalezeni v aréně, aniž byla „rozebrána“ kůra

#### Zhodnocení pokusu:

Při vyhodnocení části pokusu, kdy nebyla umístěna kůra do vlhké komůrky, byla po 72 h zjištěna 36% mortalita dospělců, kdy na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/g$ , po kterém dospělci 30 vteřin lezli (varianta 3) a 51% mortalita u dospělců, kteří byli ponořeni 3 vteřiny v suspenzi Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$  (varianta 4), u kontrolních dospělců dosáhla mortalita hodnoty 28%. Viditelně infikovaní jedinci nebyli zjištěni. Po 168 h dosáhla mortalita dospělců 99% ve variantě 3 a 100% ve variantě 4, v kontrole pak 94%. Infikovaní dospělci nebyli při vyhodnocování znovu zjištěni. V superkontrole (varianta 2) byla po 168 h zjištěna 3% viditelně infikovaných dospělců (přírodní kontaminace). V druhé části pokusu, kdy byla umístěna kůra do vlhké komůrky, dosahovala mortalita po 168 h 100% u dospělců, kdy na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/g$ , po kterém brouci 30 vteřin lezli (varianta 2) a 96% u dospělců, kteří byli ponořeni 3 vteřiny v suspenzi Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$  (varianta 3), u kontrolních dospělců pak 78%. Ve variantě 2 po 168 h byla zjištěna infekce u 76%, ve variantě 3 nebyli viditelně infikovaní jedinci zjištěni, v kontrole se objevila 4% viditelně infikovaných dospělců (přírodní kontaminace).

**Pokus č. 2.: Porovnání účinnosti vybraných kmenů *B. bassiana* s kmenem *B. bassiana* I 101 na larvy potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*)**

Základní údaje pokusu:

- připraveny vlhké komůrky - do Petriho misky umístěn filtrační papír, na nějž se přidalo 0,5ml destil. vody
- připraveny suspenze kmenů *B. bassiana* z Černé Hory (NP 0001, NP 0002, NP 0003) a suspenze Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml (larvy byly po 3 vteřiny ponořeny do suspenze)
- do každé vlhké komůrky bylo umístěno 10 ošetřených larev
- celkem připraveno 6 variant v 5 opakováních pro každou variantu: (1) kontrola (larvy ponořeny v roztoku Tween 80 po 3 vteřiny); (2) suspenze kmene NP 0001; (3) suspenze kmene NP 0002; (4) suspenze kmene NP 0003; (5) suspenze kmene I 101; (6) prášková formulace biopreparátu Bba I 101 - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát (nutritivní složka) o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /g a larvy po ní 30 vteřin lezly
- pokus byl vyhodnocován 24, 48, 72, 144, 168, 192, 216 a 240 h po založení

**Tab. 5.: Účinnost vybraných kmenů *B. bassiana* s kmenem *B. bassiana* I 101 na larvy potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*)**

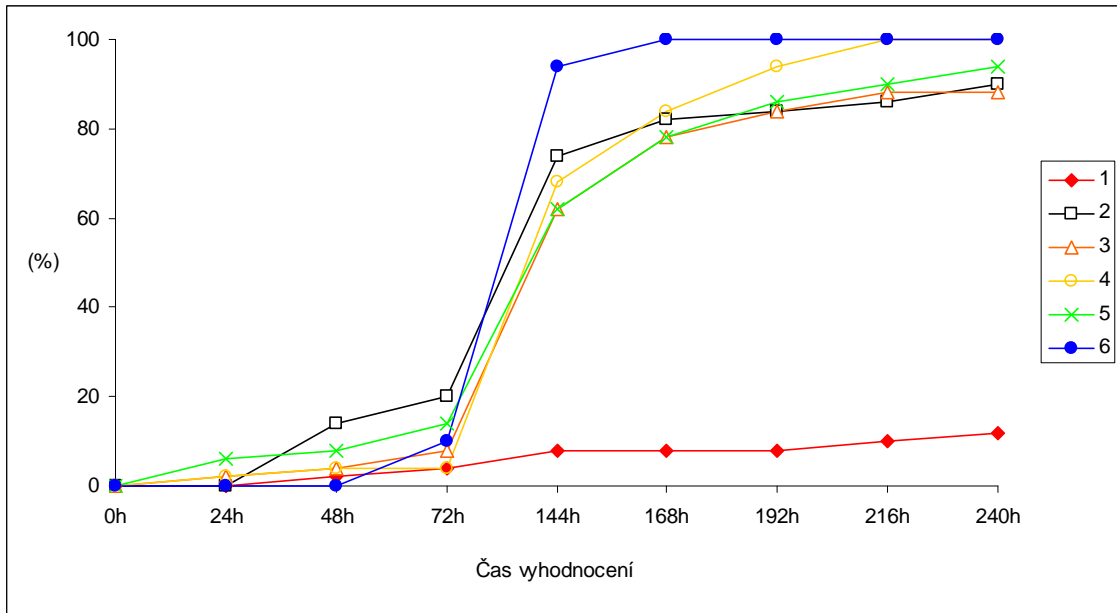
| Způsob ošetření | Čas<br>vyhodnocení (h) | Mrtví<br>(%) | Infikovaní<br>(%) | Kumulovaná<br>mortalita (%) |
|-----------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------------|
| <b>1*</b>       | <b>24</b>              | <b>0</b>     | <b>0</b>          | <b>0</b>                    |
|                 | <b>48</b>              | <b>2</b>     | <b>0</b>          | <b>2</b>                    |
|                 | <b>72</b>              | <b>4</b>     | <b>0</b>          | <b>4</b>                    |
|                 | <b>144</b>             | <b>8</b>     | <b>0</b>          | <b>8</b>                    |
|                 | <b>168</b>             | <b>8</b>     | <b>0</b>          | <b>8</b>                    |
|                 | <b>192</b>             | <b>8</b>     | <b>0</b>          | <b>8</b>                    |
|                 | <b>216</b>             | <b>10</b>    | <b>0</b>          | <b>10</b>                   |
|                 | <b>240</b>             | <b>12</b>    | <b>0</b>          | <b>12</b>                   |
| <b>2*</b>       | <b>24</b>              | <b>8</b>     | <b>0</b>          | <b>8</b>                    |
|                 | <b>48</b>              | <b>14</b>    | <b>0</b>          | <b>14</b>                   |
|                 | <b>72</b>              | <b>20</b>    | <b>0</b>          | <b>20</b>                   |
|                 | <b>144</b>             | <b>74</b>    | <b>0</b>          | <b>74</b>                   |

| Způsob ošetření | Čas<br>vyhodnocení (h) | Mrtví<br>(%) | Infikovaní<br>(%) | Kumulovaná<br>mortalita (%) |
|-----------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------------|
| <b>2*</b>       | <b>168</b>             | <b>60</b>    | <b>22</b>         | <b>82</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>44</b>    | <b>40</b>         | <b>84</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>26</b>    | <b>60</b>         | <b>86</b>                   |
|                 | <b>240</b>             | <b>30</b>    | <b>60</b>         | <b>90</b>                   |
| <b>3*</b>       | <b>24</b>              | <b>2</b>     | <b>0</b>          | <b>2</b>                    |
|                 | <b>48</b>              | <b>4</b>     | <b>0</b>          | <b>4</b>                    |
|                 | <b>72</b>              | <b>8</b>     | <b>0</b>          | <b>8</b>                    |
|                 | <b>144</b>             | <b>62</b>    | <b>0</b>          | <b>62</b>                   |
|                 | <b>168</b>             | <b>74</b>    | <b>4</b>          | <b>78</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>34</b>    | <b>50</b>         | <b>84</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>18</b>    | <b>70</b>         | <b>88</b>                   |
|                 | <b>240</b>             | <b>16</b>    | <b>72</b>         | <b>88</b>                   |
| <b>4*</b>       | <b>24</b>              | <b>2</b>     | <b>0</b>          | <b>2</b>                    |
|                 | <b>48</b>              | <b>4</b>     | <b>0</b>          | <b>4</b>                    |
|                 | <b>72</b>              | <b>4</b>     | <b>0</b>          | <b>4</b>                    |
|                 | <b>144</b>             | <b>68</b>    | <b>0</b>          | <b>68</b>                   |
|                 | <b>168</b>             | <b>22</b>    | <b>62</b>         | <b>84</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>20</b>    | <b>74</b>         | <b>94</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>16</b>    | <b>84</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>240</b>             | <b>6</b>     | <b>94</b>         | <b>100</b>                  |
| <b>5*</b>       | <b>24</b>              | <b>6</b>     | <b>0</b>          | <b>6</b>                    |
|                 | <b>48</b>              | <b>8</b>     | <b>0</b>          | <b>8</b>                    |
|                 | <b>72</b>              | <b>14</b>    | <b>0</b>          | <b>14</b>                   |
|                 | <b>144</b>             | <b>62</b>    | <b>0</b>          | <b>62</b>                   |
|                 | <b>168</b>             | <b>78</b>    | <b>0</b>          | <b>78</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>86</b>    | <b>0</b>          | <b>86</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>90</b>    | <b>0</b>          | <b>90</b>                   |
|                 | <b>240</b>             | <b>94</b>    | <b>0</b>          | <b>94</b>                   |
| <b>6*</b>       | <b>24</b>              | <b>0</b>     | <b>0</b>          | <b>0</b>                    |
|                 | <b>48</b>              | <b>0</b>     | <b>0</b>          | <b>0</b>                    |
|                 | <b>72</b>              | <b>10</b>    | <b>0</b>          | <b>10</b>                   |
|                 | <b>144</b>             | <b>18</b>    | <b>76</b>         | <b>94</b>                   |
|                 | <b>168</b>             | <b>4</b>     | <b>96</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>192</b>             | <b>2</b>     | <b>98</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>216</b>             | <b>0</b>     | <b>100</b>        | <b>100</b>                  |
|                 | <b>240</b>             | <b>0</b>     | <b>100</b>        | <b>100</b>                  |

\* 1- kontrola; 2- suspenze kmene NP 0001; 3- suspenze kmene NP 0002; 4- suspenze kmene NP 0003; 5- suspenze kmene I 101; 6- prášková formulace biopreparátu - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/g$ , po kterém larvy 30 vteřin lezly

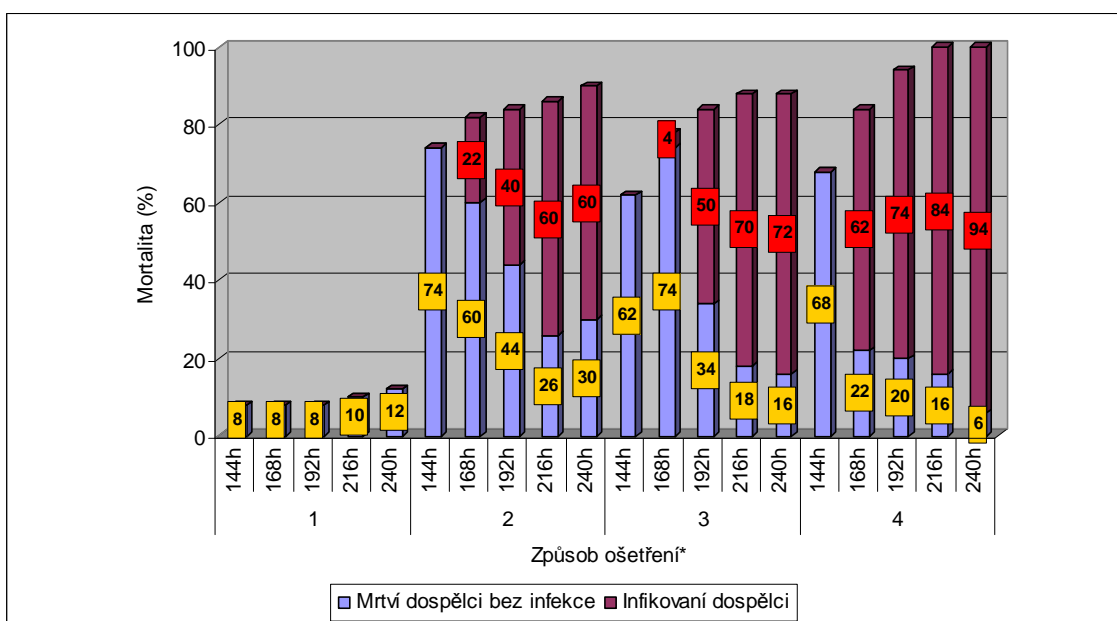


Graf 5.: Kumulovaná mortalita larev *Tenebrio molitor* po ošetření suspenzí vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml, suspenzí Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml a práškovou formulací biopreparátu Bba I 101 (s nutritivní složkou) o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /g



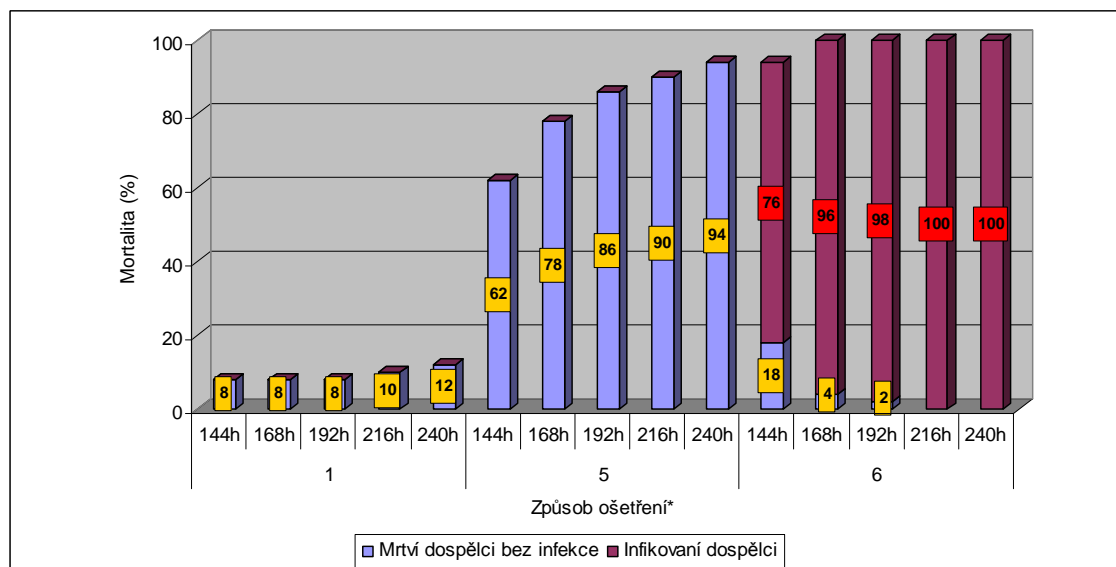
1- kontrola; 2- suspenze kmene NP 0001; 3- suspenze kmene NP 0002; 4- suspenze kmene NP 0003; 5- suspenze kmene I 101; 6- prášková formulace biopreparátu - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát, po kterém larvy 30 vteřin lezly

Graf 6.: Srovnání mortality larev *Tenebrio molitor* po jejich ošetření suspenzemi vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml



\* 1- kontrola; 2 – suspenze kmene NP 0001; 3 - suspenze kmene NP 0002; 4- suspenze kmene NP 0003

Graf 7.: Srovnání mortality larev *Tenebrio molitor* po ošetření suspenzí o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/\text{ml}$  a práškovou formulací biopreparátu (s nutritivní složkou) o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/\text{g}$  entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101)



\* 1- kontrola; 5- suspenze kmene I 101; 6- prášková formulace biopreparátu - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát, po kterém larvy 30 vteřin lezly

#### Zhodnocení pokusu:

V tomto pokusu, porovnání účinnosti vybraných kmenů *B. bassiana* s kmenem *B. bassiana* I 101 na larvy potměníka moučného (*Tenebrio molitor*), byla po 144 h od založení pokusu zjištěna mortalita larev 62% (ošetření suspenzí kmene NP 0002), 68% (ošetření kmenem NP 0003) a 74% (ošetření kmenem NP 0001) oproti 8% mortalitě v kontrole, při vyhodnocení nebyla zjištěna viditelná infekce u larev v žádné z variant. Po 168 h od založení pokusu bylo zjištěno 4% viditelně infikovaných larev po ošetření kmenem NP 0002, 22% viditelně infikovaných larev po ošetření kmenem NP 0001 a 62% viditelně infikovaných larev po ošetření kmenem NP 0003. Po 240 h dosahovala mortalita larev 88% (ošetření kmenem NP 0002), 90% (ošetření kmenem NP 0001) a 100% (ošetření kmenem NP 0003). Viditelná infekce larev dosahovala, 240 h od založení pokusu, hodnot 60% u kmenu NP 0001, 72% u kmenu NP 0002 a 94% u kmenu NP 0003.

Po ošetření suspenzí Bba I 101 (varianta 5) byla mortalita larev 144, 168 a 240 h od založení pokusu 62, 78 respektive 94%, viditelně infikované larvy nebyly zjištěny. Po ošetření práškovou formulací biopreparátu Bba I 101 s nutritivní složkou (varianta 6), 144 h od založení pokusu, byla zjištěna 94% mortalita larev a 76% larev

bylo viditelně infikováno. Po 168 h dosáhla mortalita 100% a viditelná infekce byla zjištěna u 96% larev, zatímco po 240 h bylo 100% larev viditelně infikováno.

### **Pokus č. 3.: Porovnání účinnosti odlišných metod aplikace biopreparátů entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) na dospělé lýkožrouta smrkového *Ips typographus***

Základní údaje pokusu:

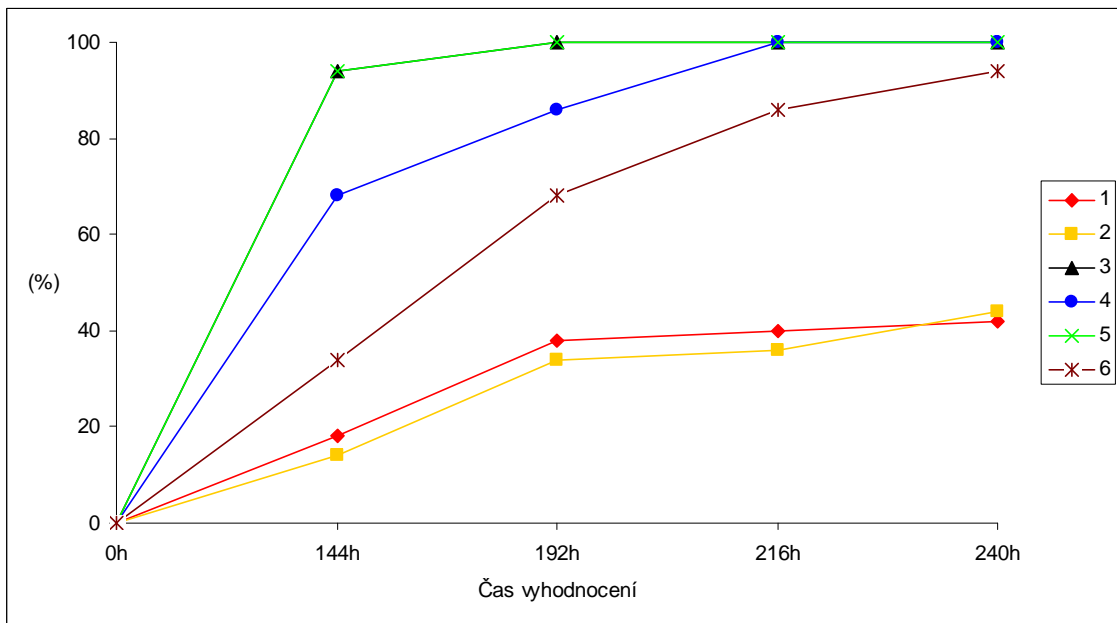
- připraveny vlhké komůrky - do plastového kontejneru (rozměr ... d - 9 cm; š - 6 cm; v - 5 cm) na dno dán filtrační papír a na něj přidáno 1ml destil. vody
- do každé vlhké komůrky vložena vysterilizovaná smrková kůra o rozměru 5×5cm
- připravena suspenze Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml
- do každé krabičky bylo umístěno 10 ošetřených brouků; 2 varianty bez přímého ošetření brouků: (2) a (6)
- celkem bylo připraveno 6 variant, v 5 opakováních pro každou variantu:  
(1) kontrola - brouci ponořeni v roztoku Tween 80 po 3 vteřiny;  
(2) superkontrola; (3) prášková formulace biopreparátu Bba I 101 - brouci dáni do falkonky, kde bylo 0,5g biopreparátu (nutritivní + inertní složka) o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g a protřepání; (4) prášková formulace biopreparátu Bba I 101 - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát (nutritivní + inertní složka) o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g a brouci po ní 30 vteřin lezli; (5) suspenze Bba I 101 - brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml; (6) suspenze Bba I 101 - na vrchní stranu kůry byla aplikována (nastříkáním) suspenze o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml (ošetření kůry bylo provedeno mimo vlhkou komůrku), na kůru byli umístěni neošetření brouci
- pokus byl vyhodnocován 144, 192, 216 a 240 h po založení pokusu – již při prvním vyhodnocení byla kůra „rozebrána“, brouci byli ponecháni v původní aréně ale již bez kůry

**Tab. 6.: Účinnost odlišných metod aplikace biopreparátů entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) na dospělé lýkožrouta smrkového *Ips typographus***

| Způsob ošetření | Čas<br>vyhodnocení (h) | Mrtví<br>(%) | Infikovaní<br>(%) | Kumulovaná<br>mortalita (%) |
|-----------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------------|
| <b>1*</b>       | <b>144</b>             | <b>18</b>    | <b>0</b>          | <b>18</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>38</b>    | <b>0</b>          | <b>38</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>40</b>    | <b>0</b>          | <b>40</b>                   |
|                 | <b>240</b>             | <b>42</b>    | <b>0</b>          | <b>42</b>                   |
| <b>2*</b>       | <b>144</b>             | <b>14</b>    | <b>0</b>          | <b>14</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>34</b>    | <b>0</b>          | <b>34</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>36</b>    | <b>0</b>          | <b>36</b>                   |
|                 | <b>240</b>             | <b>44</b>    | <b>0</b>          | <b>44</b>                   |
| <b>3*</b>       | <b>144</b>             | <b>54</b>    | <b>40</b>         | <b>94</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>18</b>    | <b>82</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>216</b>             | <b>6</b>     | <b>94</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>240</b>             | <b>0</b>     | <b>100</b>        | <b>100</b>                  |
| <b>4*</b>       | <b>144</b>             | <b>52</b>    | <b>16</b>         | <b>68</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>36</b>    | <b>50</b>         | <b>86</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>18</b>    | <b>82</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>240</b>             | <b>0</b>     | <b>100</b>        | <b>100</b>                  |
| <b>5*</b>       | <b>144</b>             | <b>56</b>    | <b>38</b>         | <b>94</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>10</b>    | <b>90</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>216</b>             | <b>4</b>     | <b>96</b>         | <b>100</b>                  |
|                 | <b>240</b>             | <b>0</b>     | <b>100</b>        | <b>100</b>                  |
| <b>6*</b>       | <b>144</b>             | <b>32</b>    | <b>2</b>          | <b>34</b>                   |
|                 | <b>192</b>             | <b>38</b>    | <b>30</b>         | <b>68</b>                   |
|                 | <b>216</b>             | <b>44</b>    | <b>42</b>         | <b>86</b>                   |
|                 | <b>240</b>             | <b>32</b>    | <b>62</b>         | <b>94</b>                   |

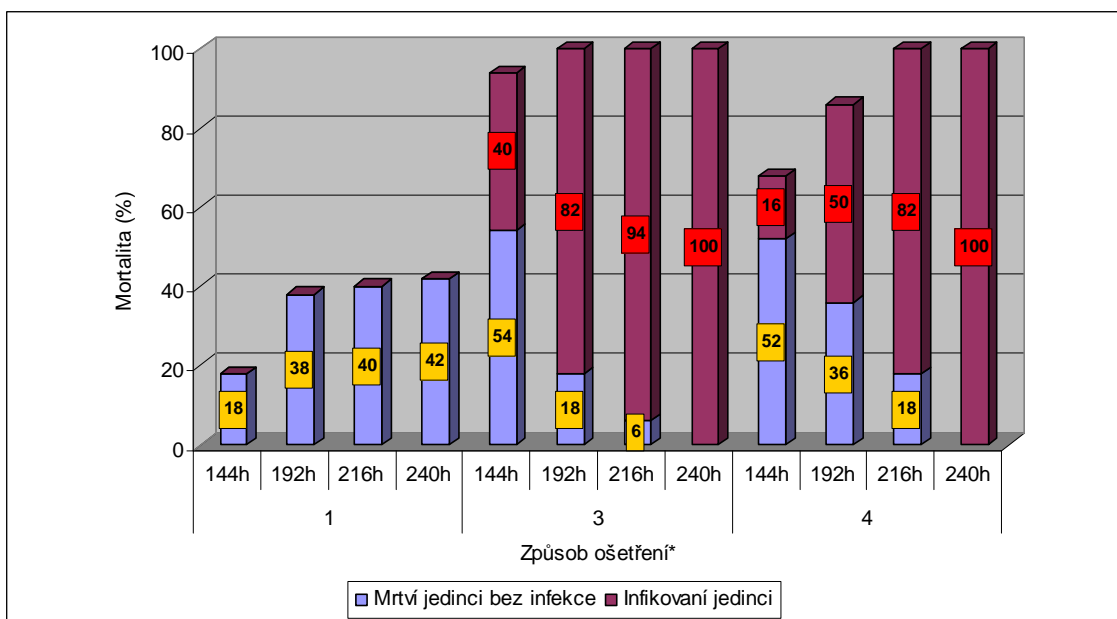
\* **1-** kontrola; **2-** superkontrola; **3-** brouci dáni do falkonky biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$  a protřepání; **4-** na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$ , po kterém brouci 30 vteřin leželi; **5-** brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$ ; **6-** suspenze o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$  aplikována (nastříkáním) na svrchní stranu kůry

Graf 8.: Kumulovaná mortalita dospělců *Ips typographus* při různých aplikacích biopreparátů na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101)



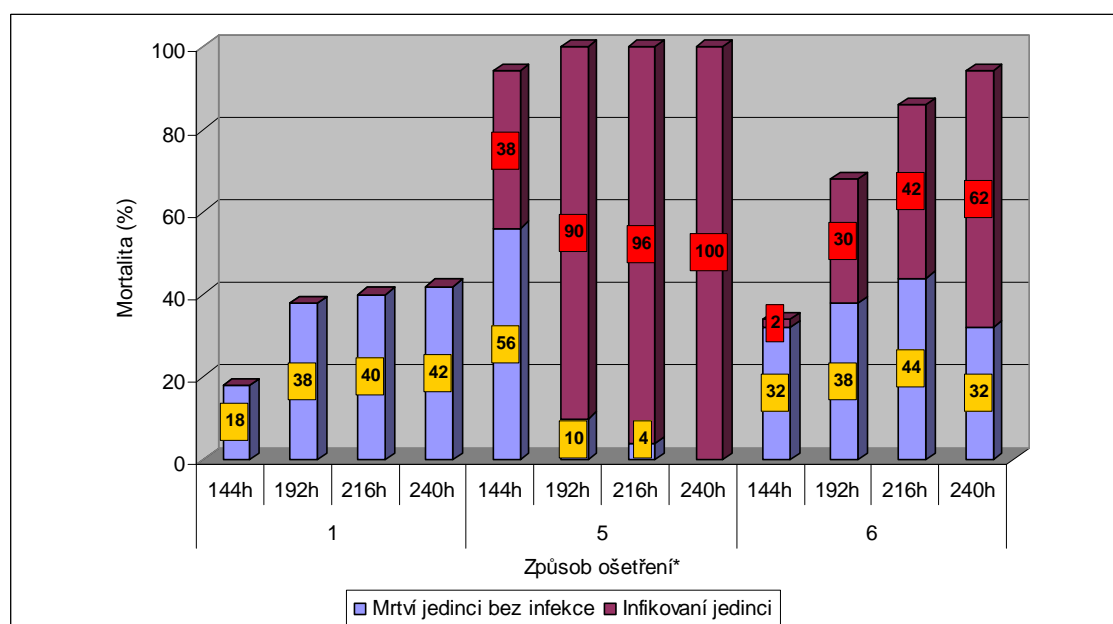
1- kontrola; 2- superkontrola; 3- brouci dáni do falkonky biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$  a protřepání; 4- na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$ , po kterém brouci 30 vteřin ležli; 5- brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$ ; 6- suspenze o koncentraci konidií  $1 \times 10^7/ml$  aplikována (nastříkáním) na svrchní stranu kůry

Graf 9.: Mortalita dospělců *Ips typographus* při odlišném ošetření práškovou formulací biopreparátu (nutritivní + inertní složka) na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$



\* 1- kontrola 3- brouci dáni do falkonky a protřepání; 4- na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát, po kterém brouci 30 vteřin ležli

Graf 10.: Porovnání mortality dospělců *Ips typographus* po ošetření dospělců a smrkové kůry suspenzí Bba I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml



\* 1- kontrola ; 5- brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi; 6- suspenze aplikována (nastříkáním) na svrchní stranu kůry

#### Zhodnocení pokusu:

Po 144 h od založení pokusu dosahovala mortalita dospělců u tří různých metod ošetření dospělců biopreparáty *B. bassiana* kmene I 101 hodnot 68% (varianta 4 - na Petriho misku byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g, po kterém brouci 30 vteřin lezli) respektive 94% (varianta 3 - brouci dáni do falkonky s biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g a protřepání a 5 - brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml), zatímco u kontrolních dospělců dosahovala mortalita 18%. Pouze u dospělců, kdy byla suspenze kmene I 101 o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml aplikována na povrch smrkové kůry (varianta 6), dosahovala mortalita dospělců 34%. Ve variantách 3 a 5, 144 h od založení pokusu, bylo pozorováno 40 a 38% viditelně infikovaných dospělců, ve variantě 4 hodnota viditelně infikovaných dospělců dosáhla 16%. Významně méně viditelně infikovaných dospělců, 144 h od založení pokusu, bylo pozorováno ve variantě 6, a to pouze 2%. Ve variantách 3, 4 a 5 dosahovala hodnota mortality i hodnota viditelně infikovaných jedinců, 240 h od založení pokusu, 100%. Ve variantě 6, 240 h od založení pokusu, byla 94% mortalita dospělců, z toho bylo 62% dospělců viditelně infikováno.

**Pokus č. 4.: Porovnání účinnosti práškové formulace biopreparátu na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* kmen I 101 (nutritivní + inertní složka) proti dospělcům *Ips typographus* při odlišných způsobech aplikace**

Základní údaje pokusu:

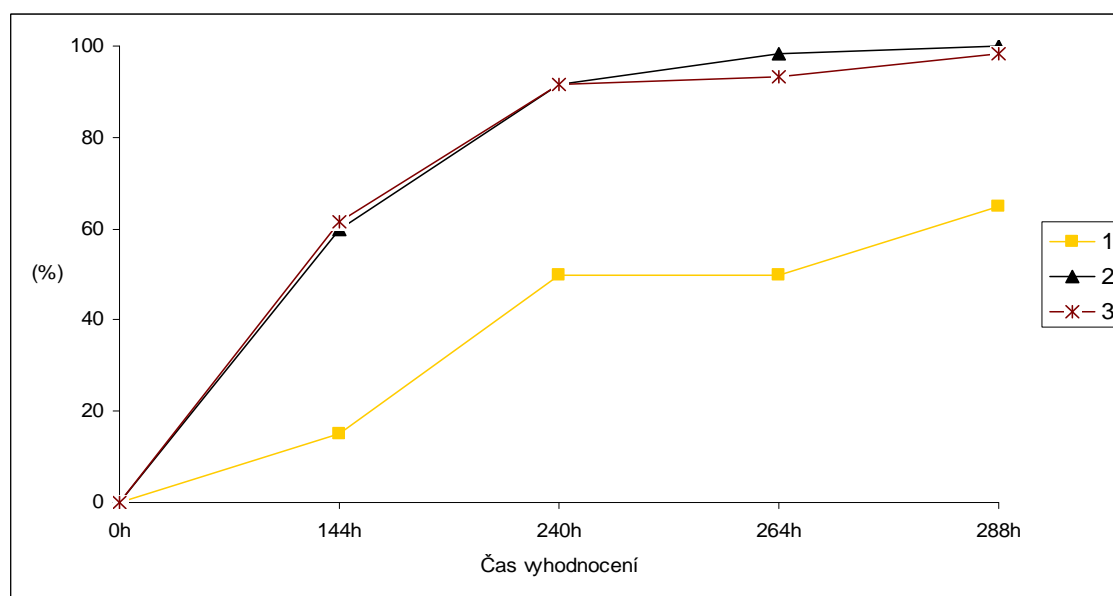
- připraveny vlhké komůrky - do plastového kontejneru (rozměr ... d - 17 cm; š - 11 cm; v - 6 cm) byla na dno dána buničitá vata a na ní přidáno 5ml destil. vody
- do krabičky byl na dno položen kus vysterilizované smrkové kůry o rozměru 15×5 cm
- do každé krabičky bylo umístěno 20 ošetřených brouků; varianta (1) bez ošetření brouků
- byly připraveny celkem 2 varianty ve 3 opakováních pro každou variantu a superkontrola v 1 opakování: (1) superkontrola; (2) prášková formulace biopreparátu Bba I 101 - brouci dáni do falkonky, kde byl 1g biopreparátu o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g a protřepání; (3) prášková formulace biopreparátu Bab I 101 - kůra rovnoměrně poprášena 1g biopreparátu o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g (ošetření kůry bylo provedeno mimo vlhkou komůrku)
- pokus byl vyhodnocován 144, 240, 264 a 288 h po založení pokusu – již při prvním vyhodnocení byla kůra „rozebrána“, brouci byli ponecháni v původní aréně ale již bez kůry

**Tab. 7.: Účinnost práškové formulace biopreparátu na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* kmen I 101 (nutritivní + inertní složka) proti dospělcům *Ips typographus* při odlišných způsobech aplikace**

| Způsob ošetření | Čas vyhodnocení (h) | Mrtví (%) | Infikovaní (%) | Kumulovaná mortalita (%) |
|-----------------|---------------------|-----------|----------------|--------------------------|
| 1*              | 144                 | 15        | 0              | 15                       |
|                 | 240                 | 50        | 0              | 50                       |
|                 | 264                 | 50        | 0              | 50                       |
|                 | 288                 | 65        | 0              | 65                       |
| 2*              | 144                 | 41,7      | 18,3           | 60                       |
|                 | 240                 | 38,3      | 53,3           | 91,6                     |
|                 | 264                 | 16,7      | 81,7           | 98,4                     |
|                 | 288                 | 6,7       | 93,3           | 100                      |
| 3*              | 144                 | 45        | 16,7           | 61,7                     |
|                 | 240                 | 46,7      | 45             | 91,7                     |
|                 | 264                 | 43,3      | 50             | 93,3                     |
|                 | 288                 | 28,3      | 70             | 98,3                     |

\* 1- superkontrola; 2- brouci dání do falkonky biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$  a protřepání; 3- kůra rovnoměrně poprášena biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$

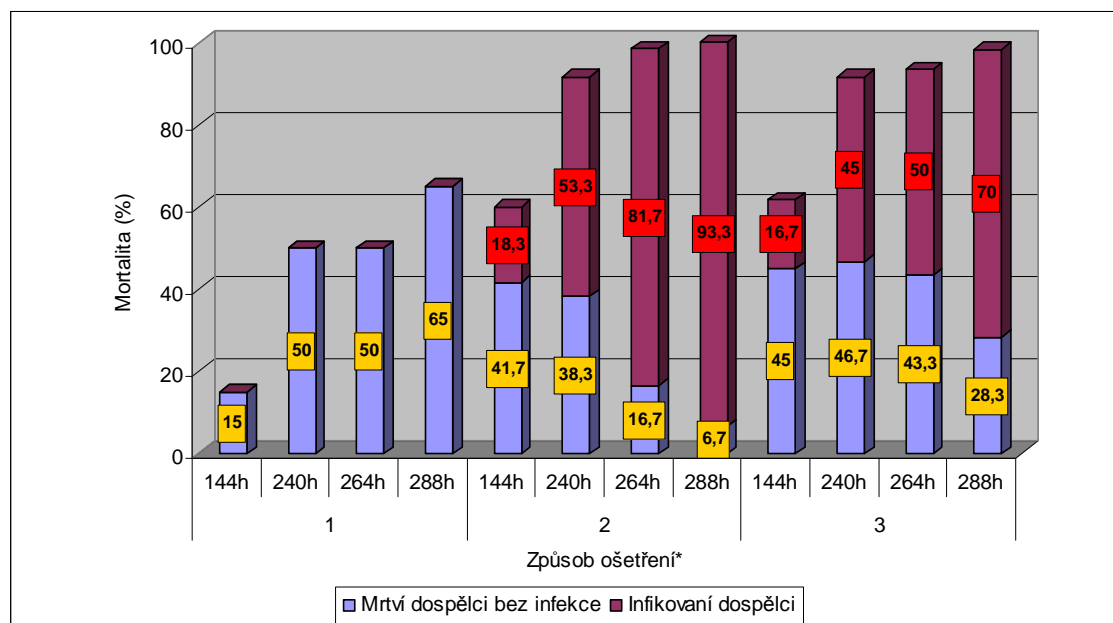
Graf 11.: Kumulovaná mortalita dospělců *Ips typographus* při odlišných způsobech aplikace práškové formulace biopreparátu na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene I 101 (nutritivní + inertní složka) o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$



1- superkontrola; 2- brouci dání do falkonky a protřepání; 3- kůra rovnoměrně poprášena biopreparátem



Graf 12.: Porovnání mortality dospělců *Ips typographus* při odlišných způsobech aplikace práškové formulace biopreparátu na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene I 101 (nutritivní + inertní složka) o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$



\* 1- superkontrola; 2- brouci dáni do falkonky a protřepání; 3- kůra rovnoměrně poprášena biopreparátem

#### Zhodnocení pokusu:

V pokusu, porovnání účinnosti práškové formulace biopreparátu na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene I 101 (nutritivní + inertní složka) proti dospělcům *Ips typographus* při odlišných způsobech aplikace, dosáhla mortalita dospělců 144 h od založení pokusu 60% ve variantě 2 (brouci dáni do falkonky s biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$  a protřepání) a 61,7% ve variantě 3 (kůra rovnoměrně poprášena biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9/g$ ), oproti 15% u dospělců v superkontrolě. Ve variantě 2 byla zjištěna infekce u 18,3% dospělců, ve variantě 3 pak bylo 16,7% viditelně infikováno. Mortalita dospělců po 288 h byla ve variantě 2 100%, ve variantě 3 98,3%. Významně se však lišila hodnota viditelně infikovaných dospělců, kdy ve variantě 2 bylo 93,3% dospělců viditelně infikováno, zatímco ve variantě 3 byla infekce zjištěna u 70% dospělců.

**Pokus č. 5.: Porovnání virulence vybraných kmenů endemických druhů *B. bassiana*, *L. lecanii* a *I. fumosorosea* na dospělých lýkožrouta smrkového**

Základní údaje pokusu:

a) První část pokusu

- do plastového kontejneru o rozměru ... d - 9 cm; š - 6 cm; v - 5 cm byl na dno dán filtrační papír a na něj přidáno 1 ml destil. vody
- do krabičky byl na dno položen kus vysterilizované smrkové kůry o rozměru 5×5 cm
- brouci byli dáni na plně vysporulované kultury jednotlivých nativních kmenů hub v Petriho miskách na PDA, kde byli exponováni 30 vteřin
- do každé krabičky bylo umístěno 10 živých ošetřených brouků, kontrola bez ošetření
- bylo připraveno celkem 16 variant, ve 2 opakováních pro každou variantu:  
Kontrola (1)  
Kmeny *B. bassiana* (2) NP 0004; (3) NP 0005; (4) NP 0006; (5) NP 0007; (6) NP 0008; (7) NP 0009; (8) NP 0010; (9) NP 0001; (10) NP 0002; (11) NP 0003; (12) I 101  
Kmeny *L. lecanii* (13) NP 0098; (14) NP 0066  
Kmeny *I. fumosorosea* (15) NP 0038; (16) NP 0019
- byla vytvořena 1 varianta (17) o 2 opakováních s kmenem *B. bassiana* I 101 podle výše popsaného postupu, odlišnost spočívala v tom, že na dno krabičky nebyla umístění kůra (5×5 cm) v celku, ale byla rozdrcena
- pokus byl vyhodnocován 144, 168, 192 a 216 h po založení – již při prvním vyhodnocení byla kůra „rozebrána“ a bylo zohledněno to, zda se brouci nacházejí v kůře či mimo kůru; brouci ponecháni nadále ve stejné aréně, ale již bez kůry

## b) Druhá část pokusu

- postup při zakládání pokusu byl stejný jako v první části
- bylo připraveno 10 variant ve 3 opakováních pro každou variantu:  
Kontrola (1)  
Kmeny *B. bassiana* (2) NP 0022; (3) NP 0026; (4) NP 0027; (5) NP 0028; (6) NP 0029; (7) NP 0030; (8) NP 0031; (9) I 101  
Kmen *B. brongniartii* (10) NP 0064
- pokus byl vyhodnocován 144 h po založení pokusu, při vyhodnocení byla kůra „rozebrána“ a bylo zohledněno to, zda se brouci nacházejí v kůře či mimo kůru; brouci ponecháni nadále ve stejné aréně, ale již bez kůry

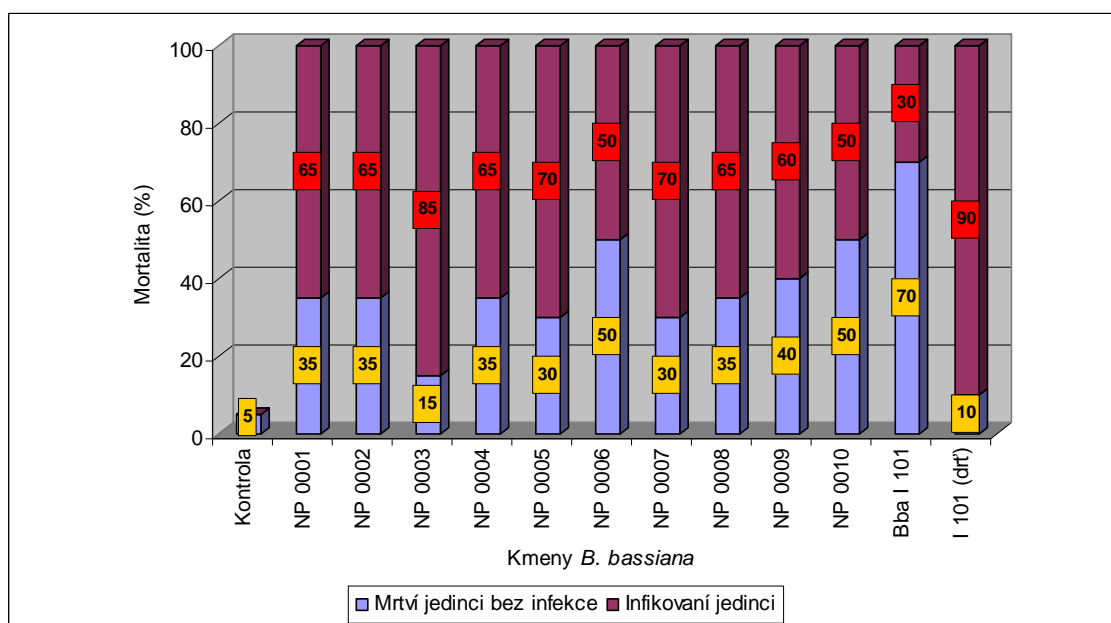
**Tab. 8.: Porovnání virulence vybraných kmenů endemických druhů *B. bassiana*, *L. lecanii* a *I. fumosorosea* na dospělých lýkožrouta smrkového, první část**

| Druh entomopatogenní houby/kmen | Čas vyhodnocení (h) | Mrtví (%) | Infikovaní (%) | Kumulovaná mortalita (%) |
|---------------------------------|---------------------|-----------|----------------|--------------------------|
| <b>Kontrola</b>                 | 144                 | 5         | 0              | 5                        |
|                                 | 168                 | 10        | 0              | 10                       |
|                                 | 192                 | 15        | 0              | 15                       |
|                                 | 216                 | 20        | 0              | 20                       |
| <b>Bba/NP0001</b>               | 144                 | 35        | 65             | 100                      |
|                                 | 168                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 192                 | 0         | 100            | 100                      |
|                                 | 216                 | 0         | 100            | 100                      |
| <b>Bba/NP0002</b>               | 144                 | 35        | 65             | 100                      |
|                                 | 168                 | 10        | 90             | 100                      |
|                                 | 192                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 216                 | 0         | 100            | 100                      |
| <b>Bba/NP0003</b>               | 144                 | 15        | 85             | 100                      |
|                                 | 168                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 192                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 216                 | 0         | 100            | 100                      |
| <b>Bba/NP0004</b>               | 144                 | 35        | 65             | 100                      |
|                                 | 168                 | 10        | 90             | 100                      |
|                                 | 192                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 216                 | 5         | 95             | 100                      |
| <b>Bba/NP0005</b>               | 144                 | 30        | 70             | 100                      |
|                                 | 168                 | 15        | 85             | 100                      |
|                                 | 192                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 216                 | 0         | 100            | 100                      |
| <b>Bba/NP0006</b>               | 144                 | 50        | 50             | 100                      |
|                                 | 168                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 192                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 216                 | 5         | 95             | 100                      |
| <b>Bba/NP0007</b>               | 144                 | 30        | 70             | 100                      |
|                                 | 168                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 192                 | 5         | 95             | 100                      |
|                                 | 216                 | 5         | 95             | 100                      |

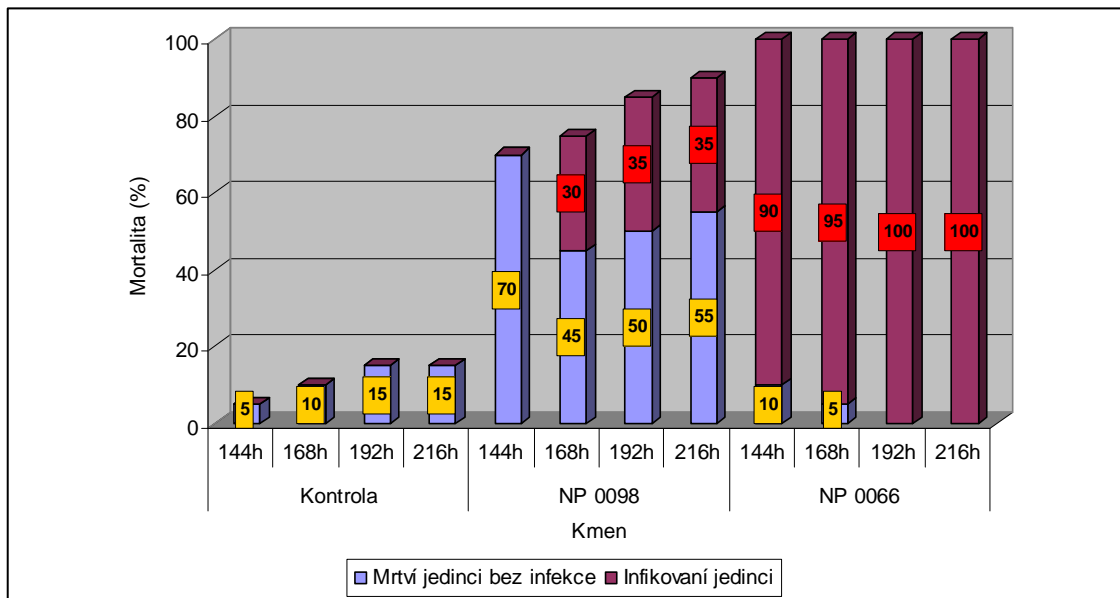
| Druh entomopatogenní houby/kmen | Čas vyhodnocení (h) | Mrtví (%) | Infikovaní (%) | Kumulovaná mortalita (%) |
|---------------------------------|---------------------|-----------|----------------|--------------------------|
| <b>Bba/NP0008</b>               | <b>144</b>          | <b>35</b> | <b>65</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>15</b> | <b>85</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>15</b> | <b>85</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
| <b>Bba/NP0009</b>               | <b>144</b>          | <b>40</b> | <b>60</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
| <b>Bba/NP0010</b>               | <b>144</b>          | <b>50</b> | <b>50</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>5</b>  | <b>95</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
| <b>Bba/ I 101</b>               | <b>144</b>          | <b>70</b> | <b>30</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>10</b> | <b>90</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
| <b>Lle/NP 0098</b>              | <b>144</b>          | <b>70</b> | <b>0</b>       | <b>70</b>                |
|                                 | <b>168</b>          | <b>45</b> | <b>30</b>      | <b>75</b>                |
|                                 | <b>192</b>          | <b>50</b> | <b>35</b>      | <b>85</b>                |
|                                 | <b>216</b>          | <b>55</b> | <b>35</b>      | <b>90</b>                |
| <b>Lle/NP 0066</b>              | <b>144</b>          | <b>10</b> | <b>90</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>5</b>  | <b>95</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
| <b>Ifr/NP 0038</b>              | <b>144</b>          | <b>35</b> | <b>65</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>5</b>  | <b>95</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>5</b>  | <b>95</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>5</b>  | <b>95</b>      | <b>100</b>               |
| <b>Ifr/NP 0019</b>              | <b>144</b>          | <b>15</b> | <b>85</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |

| Druh entomopatogenní houby/kmen | Čas vyhodnocení (h) | Mrtví (%) | Infikovaní (%) | Kumulovaná mortalita (%) |
|---------------------------------|---------------------|-----------|----------------|--------------------------|
| <b>Bba/ I 101 (drť)</b>         | <b>144</b>          | <b>10</b> | <b>90</b>      | <b>100</b>               |
|                                 | <b>168</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>192</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |
|                                 | <b>216</b>          | <b>0</b>  | <b>100</b>     | <b>100</b>               |

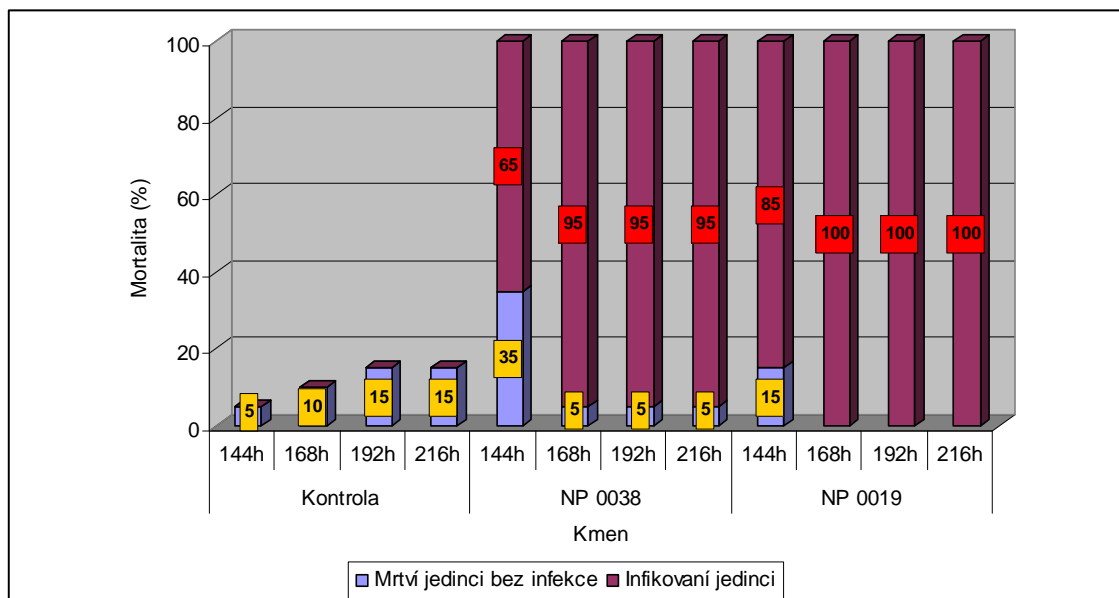
Graf 13.: Porovnání účinnosti jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na dospělé *Ips typographus* 144 h od založení pokusu



Graf 14.: Porovnání účinnosti entomopatogenní houby *L. lecanii* na dospělce *Ips typographus* 144 h od založení pokusu



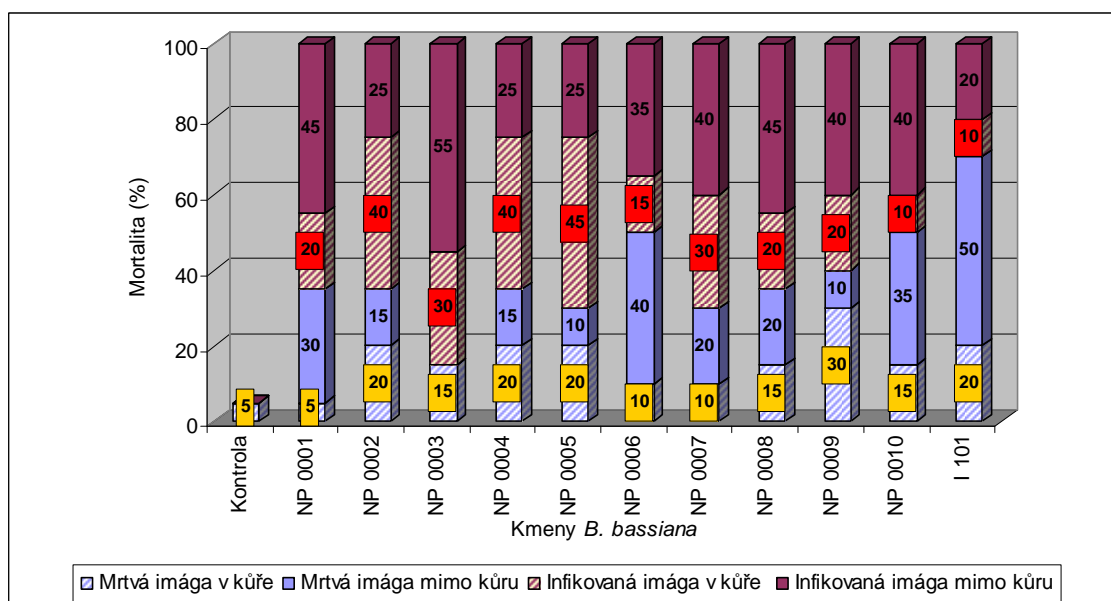
Graf 15.: Porovnání účinnosti entomopatogenní houby *I. fumosorosea* na dospělce *Ips typographus* 144 h od založení pokusu



**Tab. 9.: Porovnání virulence vybraných kmenů endemických druhů *B. bassiana*, *L. lecanii* a *I. fumosorosea* na dospělých lýkožrouta smrkového po 144 h, první část**

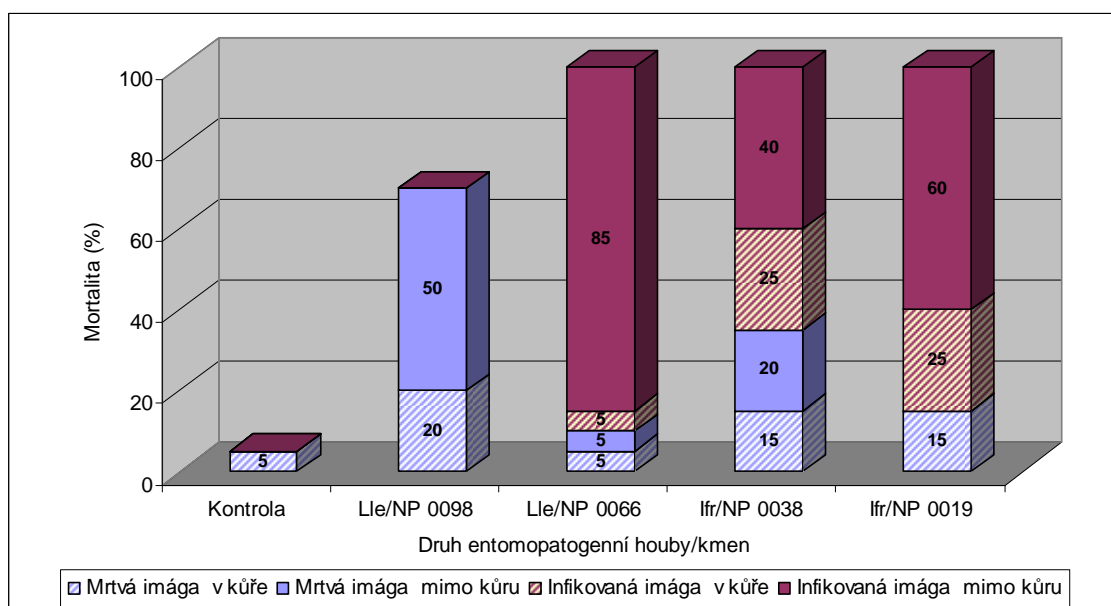
| Druh                  | Kmen    | Počet imág | Živá imága (%) |      | Mrtvá imága (%) |      | Infikovaná imága (%) |      | Mortalita (%) |      |
|-----------------------|---------|------------|----------------|------|-----------------|------|----------------------|------|---------------|------|
|                       |         |            | kůra           | mimo | kůra            | mimo | kůra                 | mimo | Celkem        | kůra |
| Kontrola              | -       | 20         | 30             | 65   | 5               | 0    | 0                    | 0    | 5             | 0    |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0001 | 20         | 0              | 0    | 5               | 30   | 20                   | 45   | 100           | 25   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0002 | 20         | 0              | 0    | 20              | 15   | 40                   | 25   | 100           | 60   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0003 | 20         | 0              | 0    | 15              | 0    | 30                   | 55   | 100           | 45   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0004 | 20         | 0              | 0    | 20              | 15   | 40                   | 25   | 100           | 60   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0005 | 20         | 0              | 0    | 20              | 10   | 45                   | 25   | 100           | 65   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0006 | 20         | 0              | 0    | 10              | 40   | 15                   | 35   | 100           | 25   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0007 | 20         | 0              | 0    | 10              | 20   | 30                   | 40   | 100           | 40   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0008 | 20         | 0              | 0    | 15              | 20   | 20                   | 45   | 100           | 35   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0009 | 20         | 0              | 0    | 30              | 10   | 20                   | 40   | 100           | 50   |
| <i>B. bassiana</i>    | NP 0010 | 20         | 0              | 0    | 15              | 35   | 10                   | 40   | 100           | 25   |
| <i>B. bassiana</i>    | I 101   | 20         | 0              | 0    | 20              | 50   | 10                   | 20   | 100           | 30   |
| <i>L. lecanii</i>     | NP 0098 | 20         | 25             | 5    | 20              | 50   | 0                    | 0    | 70            | 20   |
| <i>L. lecanii</i>     | NP 0066 | 20         | 0              | 0    | 5               | 5    | 5                    | 85   | 100           | 10   |
| <i>I. fumosorosea</i> | NP 0038 | 20         | 0              | 0    | 15              | 20   | 25                   | 40   | 100           | 40   |
| <i>I. fumosorosea</i> | NP 0019 | 20         | 0              | 0    | 15              | 0    | 25                   | 60   | 100           | 40   |

Graf 16.: Porovnání účinnosti jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na dospělé *Ips typographus* 144 h od založení pokusu (zvláště posuzována mortalita a infekce v kůře a mimo kůru)





Graf 17.: Porovnání účinnosti entomopatogenní houby *L. lecanii* a *I. fumosorosea* na dospělé *Ips typographus* 144 h od založení pokusu



Zhodnocení pokusu 1. část:

Po vystavení dospělců *Ips typographus* účinkům plně vysporulovaných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmeny NP 0001-NP 0010; I 101), byla 144 h od založení pokusu zjištěna 100% mortalita u všech variant (z toho 25-65% mortalita v kůře), oproti 5% mortalitě kontrolních dospělců. Viditelně infikovaných bylo 50-70% dospělců, kromě ošetření kmenem NP 0003 a I 101. Dospělci ošetření kmenem NP 0003 byli z 85% viditelně infikováni. Dospělci ošetření kmenem I 101, kdy kůra ve vlhké komůrce byla ponechána v celku, byli viditelně infikováni pouze z 30%, zatímco dospělci ošetření stejným kmenem patogene, ale do vlhké komůrky byla dána rozdrčená kůra, byli viditelně infikováni z 90%. Hodnota dospělců, kteří byli viditelně infikováni a nacházeli se v kůře, se pohybovala mezi 10 a 45%. Po 216 h od založení pokusu bylo zjištěno 85-100% viditelně infikovaných jedinců.

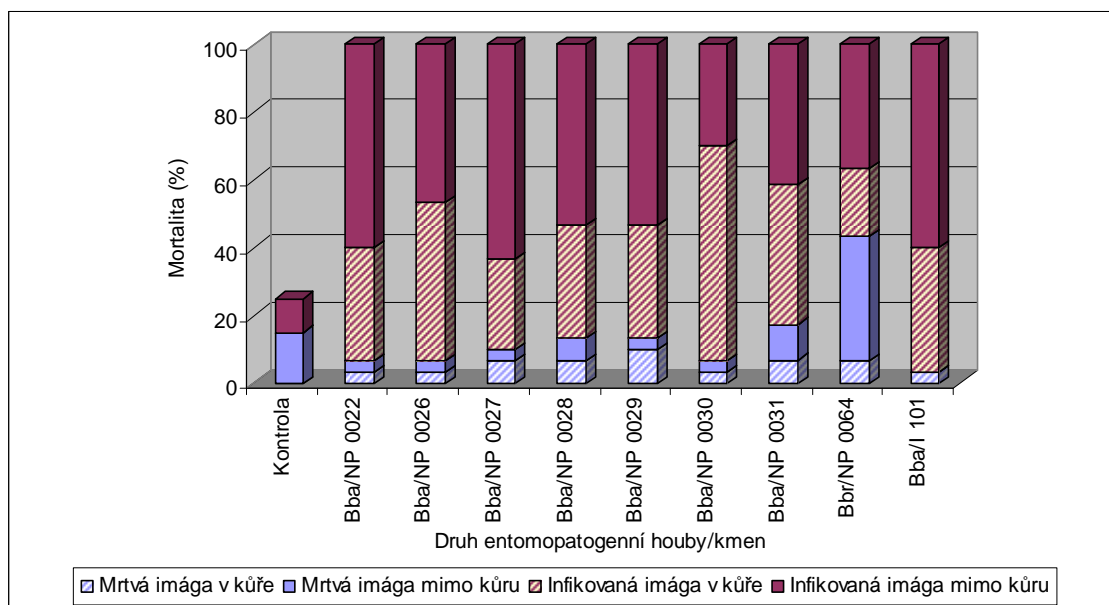
Dospělci, vystavení účinkům entomopatogenní houby *I. fumosorosea*, vykazovali 144 h od založení pokusu 100% mortalitu (z toho 40% mortalita v kůře). U kmene NP 0038 bylo viditelně infikováno 65% dospělců, zatímco u kmene NP 0019, bylo infikováno 85% dospělců, z toho bylo zjištěno 25% viditelně infikovaných dospělců v kůře u obou kmenů. Hodnota viditelně infikovaných dospělců, dosáhla 216 h po ošetření u kmene NP 0038 95%, u kmene NP 0018 pak 100%

U dospělců, kteří byli exponováni entomopatogenní houbou *L. lecanii*, byla 144 h po založení pokusu zjištěna 100% mortalita u kmene NP 0066 (z toho 5% mortalita v kůře), u kmene NP 0098 pak 70% mortalita (z toho 20% mortalita v kůře). Viditelně infikováno kmenem NP 0066 bylo 90% dospělců, z toho 5% viditelně infikovaných dospělců v kůře. U dospělců ošetřených kmenem NP 0098 nebyla zjištěna viditelná infekce. Po 216 h bylo viditelně infikováno 100% dospělců kmenem NP 0066, kmenem NP 0098 pak 35% dospělců.

**Tab. 10.: Porovnání virulence vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na dospělých lýkožrouta smrkového po 144 h, druhá část**

| Druh                   | Kmen    | Počet imág | Živá (%) |      | Mrtvá (%) |       | Infikovaná (%) |       |        | Mortalita (%) |            |
|------------------------|---------|------------|----------|------|-----------|-------|----------------|-------|--------|---------------|------------|
|                        |         |            | kůra     | mimo | kůra      | mimo  | kůra           | mimo  | celkem | kůra          | infikovaná |
| <i>Kontrola B.</i>     | -       | 20         | 75       | 0    | 0         | 15    | 0              | 10    | 25     | 0,0           | 10,00      |
| <i>bassiana B.</i>     | NP 0022 | 30         | 0        | 0    | 3,33      | 3,33  | 33,33          | 60    | 100    | 36,67         | 93,33      |
| <i>bassiana B.</i>     | NP 0026 | 30         | 0        | 0    | 3,33      | 3,33  | 46,67          | 46,67 | 100    | 50,0          | 93,33      |
| <i>bassiana B.</i>     | NP 0027 | 30         | 0        | 0    | 6,67      | 3,33  | 26,67          | 63,33 | 100    | 33,33         | 90,00      |
| <i>bassiana B.</i>     | NP 0028 | 30         | 0        | 0    | 6,67      | 6,67  | 33,33          | 53,33 | 100    | 40,0          | 86,67      |
| <i>bassiana B.</i>     | NP 0029 | 30         | 0        | 0    | 10        | 3,33  | 33,33          | 53,33 | 100    | 43,33         | 86,67      |
| <i>bassiana B.</i>     | NP 0030 | 30         | 0        | 0    | 3,33      | 3,33  | 63,33          | 30    | 100    | 66,67         | 93,33      |
| <i>bassiana B.</i>     | NP 0031 | 29         | 0        | 0    | 6,89      | 10,34 | 41,37          | 41,37 | 100    | 48,33         | 82,76      |
| <i>brongniartii B.</i> | NP 0064 | 30         | 0        | 0    | 6,67      | 36,67 | 20             | 36,67 | 100    | 26,67         | 56,67      |
| <i>bassiana</i>        | I 101   | 30         | 0        | 0    | 3,33      | 0     | 36,67          | 60    | 100    | 40,0          | 96,67      |

Graf 18.: Porovnání účinnosti jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *B. brongniartii* na dospělé *Ips typographus* 144 h od založení pokusu (zvláště posuzována mortalita a infekce v kůře a mimo kůru)



Hodnoty uvedeny v tabulce 10.

#### Zhodnocení pokusu 2. část:

Po vystavení dospělců *Ips typographus* účinkům plně vysporulovaných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmeny NP 0022; NP 0026 - NP 0031; I 101) a *B. brongniartii* (NP 0064) byla 144 h od založení pokusu zjištěna 100% mortalita u všech variant (z toho u *B. bassiana* 33,33-66,67% a u *B. brongniartii* 26,67% mortalita v kůře), oproti 25% mortalitě u kontrolních dospělců, u nichž se projevila přírodní kontaminace patogenem v 10%. Množství dospělců, kteří byli viditelně infikováni patogenem, se pohybovalo v rozmezí 82,76-96,67% u ošetření entomopatogenní houbou *B. bassiana*, po ošetření *B. brongniartii* kmenem NP 0064, byli viditelně infikováni jedinci zjištěni v 56,67%.

## 6. DISKUSE A ZÁVĚR

Studium vlivu entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* proti lýkožroutu smrkovému je doposud málo prozkoumanou problematikou, čemuž odpovídá zaměření literárního přehledu a možnost porovnání výsledků s dříve uvedenými pracemi jiných autorů.

Pokus č. 1 obsahoval dvě části. V první i druhé části šlo o ověření účinnosti práškového biopreparátu s nutritivní složkou (koncentrace konidií  $1 \times 10^7$ /g) a suspenze (koncentrace konidií  $1 \times 10^7$ /ml) entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) na dospělce lýkožrouta smrkového. Rozdíl spočíval v tom, že v první části byla jako aréna pro inkubaci použita vlhká komůrka (Petriho miska), do níž byl vložen pouze vlhký filtrační papír, kdežto pro druhou část byla ještě navíc do vlhké komůrky vložena vysterylizovaná smrková kůra. Po 168 h od založení pokusu dosáhla mortalita dospělců v první části pokusu 99 a 100%, u kontrolních dospělců pak 94%. Viditelně infikovaní jedinci nebyli po ošetření v této části pokusu zjištěni, pouze se projevila přírodní kontaminace ve variantě 2 (Superkontrola). Ve variantě 1 (Kontrola), tak i ve variantách, kdy byli dospělci ošetřeni, se ve velké míře na nejméně sklerotizovaných částech kutikuly dospělců, realizovaly kvasinky. Ve druhé části pokusu (do vlhké komůrky vložena smrková kůra) došlo po 168 h k 100% mortalitě ve variantě 2 (na Petriho miskou byl v tenké vrstvě nasypán biopreparát, po kterém brouci 30 vteřin lezli), ve variantě 3 (brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi) mortalita dosáhla 96%. U kontrolních dospělců byla zjištěna 78% mortalita. Viditelná infekce dospělců byla zjištěna u varianty 2 a to 76%, ale také se opět projevila přírodní kontaminace u kontrolních dospělců (4%). U kontrolních dospělců, tak i u dospělců ve variantě 3 se opět na nejméně sklerotizovaných částech kutikuly brouků realizovaly kvasinky. Tento pokus byl extrémně důležitý, pro další optimalizaci biotestu. Ukázalo se, že Petriho miska (průměr 9 cm) je nevhodnou inkubační arénou, jelikož dochází k významně velké realizaci kvasinek na místech nejmenší sklerotizace kutikuly dospělců (obsazení nevhodnějšího místa pro realizaci mycelia entomopatogenní houby). Proto byla zvolena pro další pokusy na dospělcích *Ips typographus* vlhká komůrka s větším objemem (plastové sterilní kontejnery). Dále bylo usouzeno, že vložení sterilní smrkové kůry do vlhké komůrky, by mohlo přispět k přirozenějšímu průběhu inkubace, jelikož kůra slouží jako přirozené živné médium. Posledním výstupem tohoto pokusu byla

potřeba stanovit optimální dobu pro počáteční vyhodnocení pokusu, aby i dospělci zavrtaní v kůře byli započítáni již při prvním vyhodnocení. Jako optimální doba byl stanoven 6. den (144 h) od založení pokusu.

Kreutz et al. (2004) došel k závěru, že ve vlhké komůrce, do které je vložen pouze vlhký filtrační papír, je významně vyšší mortalita dospělců, než ve vlhké komůrce, do níž je vložena smrková kůra (přirozené živné medium). Jeho pokusy ukázaly, že dospělci *Ips typographus* ošetření namočením do suspenze *B. bassiana* o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml po 3 vteřiny, žili průměrně 2,5 dne ve vlhké komůrce s filtračním papírem, zatímco ve vlhké komůrce, kam byla vložena smrková kůra, žili 3,6 dne. Viditelně infikovaní dospělci byli zjištěni 93% ve vlhké komůrce, kam byla vložena smrková kůra a v 91% ve vlhké komůrce, kde byl pouze filtrační papír.

Při porovnání účinnosti odlišných metod aplikace biopreparátů entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen I 101) na dospělé líkožrouta smrkového *Ips typographus*, v pokusu č. 3, se jako nejúčinnější aplikační metoda jevila varianta 3 (brouci dáni do falkonky s biopreparátem o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g - nutritivní + inertní složka; poté byli protřepáni) a varianta 5 (brouci ponořeni 3 vteřiny v suspenzi o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml), které vykazovaly 144 h od ošetření 94% mortalitu dospělců, z toho 40% dospělců viditelně infikovaných u varianty 3 a 38% dospělců viditelně infikovaných u varianty 5. I při dalších vyhodnoceních (192, 216 a 240 h) se hodnoty mortality a hodnoty viditelně infikovaných dospělců *Ips typographus* téměř shodovaly. I když se zprvu zdálo, že u varianty 3 byli dospělci obaleni příliš silnou vrstvou biopreparátu, který by mohl způsobit ucpaní trachejí. Brouci však značnou část biopreparátu uchyceného na povrchu kutikuly při následném vypuštění ztratí při závrtu do kůry. Kreutz et al (2004) se zabýval vlivem koncentrace konidií patogena *B. bassiana* na dospělé líkožrouta smrkového a došel k závěru, že brouci kteří byli vystaveni koncentraci  $1 \times 10^7$  (namočení v suspenzi) vykazovali po 7 dnech 100% mortalitu a mykóza se projevila z 99%. Dospělci vystavení koncentraci  $1 \times 10^6$  vykazovali 93% mortalitu a viditelně infikováno bylo 92%. *B. bassiana* může být za ideálních podmínek vysoce efektivním patogenem i při nižších koncentracích. K obdobným výsledkům došel také Doberski (1981a), který testoval vliv *B. bassiana* na *S. scolytus*, kdy použil koncentraci  $1 \times 10^2$  -  $1 \times 10^6$ . U varianty 6 (suspenze o koncentraci konidií  $1 \times 10^7$ /ml aplikována nastříkáním na svrchní stranu kůry) byla zjištěna mortalita po 144 h 34%, z tohoto množství byla pouze 2% dospělců viditelně infikována. Po 240 h od založení pokusu dosáhla mortalita dospělců hodnoty 94%, a z tohoto množství

bylo 62% dospělců viditelně infikovaných. Tato metoda se ukázala v laboratorních podmínkách jako nejméně efektivní, ať již co do mortality dospělců, ale také do počtu viditelné infekce dospělců *Ips typographus*.

V pokusu č. 4, kdy byly porovnávány odlišné aplikace práškového biopreparátu na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* o koncentraci konidií  $1 \times 10^9$ /g (nutritivní + inertní složka) proti dospělcům *Ips typographus*, nebyl zjištěn významný rozdíl mezi oběma aplikacemi (varianta 2 - brouci dáni do falkonky a protřepání, varianta 3 - kůra rovnoměrně poprášena biopreparátem). Po 144 h vykazovali dospělci mortalitu 60% ve variantě 2, ve variantě 3 pak 61,7%, oproti 15% u kontrolních jedinců. Infekce byla pozorována v 18,3%, respektive 16,7%.

Porovnání virulence vybraných kmenů endemických druhů *B. bassiana*, *L. lecanii* a *I. fumosorosea* na dospělých lýkožrouta smrkového (pokus č.5 první část) prokázalo, že virulence je specifickým rysem každého kmene. Po 144 h od založení pokusu vykazovaly všechny kmeny *B. bassiana* 100% mortalitu, viditelně infikovaní jedinci byli pozorováni z 30-85%. Je zajímavé, že kmen I 101 způsobil viditelnou infekci z 30% u dospělců, kdy byla do vlhké komůrky vložena kůra v celku, zatímco dospělci, kdy byla do vlhké komůrky dána rozdrcená kůra, byli viditelně infikováni z 90%.

#### Hlavním výsledkem této práce je postup standardního biotestu:

Základem biotestu je příprava vhodných vlhkých komůrek. Pro potřeby biotestu se jako nejvhodnější aréna jeví sterilní plastové kontejnery s vlhkou buničinou na dně. Dalším krokem je vložení standardního počtu imág na sterilní smrkovou kůru v kontejneru, která slouží jako přirozené živné médium po dobu inkubace. Průběh jednotlivých pokusů ukázal, že nejvhodnější termín počátečního vyhodnocení je 144 h od počátku pokusu, následující vyhodnocení je prováděno 168, 192 a 216 h.

## 7. SEZNAM LITERATURY

- Ambethgar, V., 2002:** Exploitation of entomogenous fungi in biological control of crop pests. In: Upadhyay, R. K.; Mukerji, K. G.; Chabla, B. P., editors. *Biocontrol Potential and Its Exploitation in Sustainable Agriculture*. Springer, 2: 39-56.
- Benz, G., 1987:** Environment. In: *Epizootiology of insect diseases*. Fuxa, J.R.; Tanada, Y., editors. Wiley-Interscience, s. 177-214.
- Boucias, D.G.; Pendland, J.C.; Latge, J.P., 1988:** Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Mikrobiology*, 54: 1795-1805.
- Boucias, D.G.; Pendland, J.C., 1998:** *Principles of insect pathology*. MA: Kluwer Academic Publishers, Boston, s. 321-359.
- Broome, J.R.; Sikorowsky, P.P.; Norment, B.R., 1976:** An mechanism of pathogenicity of *Beauveria bassiana* on larve of the imported fire ant *Solenopsis richteri*. *J. Invert. Patology*, 28: 87-91.
- Broza, M.; Perena, R.M.; Stimac, J.L., 2001:** The nonsusceptibility of soil Collembola to insect pathogens and their potential as scavengers of microbial pesticides. *Pedobiologia*, 45: 523-534.
- Butt, T.M., 2002:** Use of Entomogenous Fungi for the Control of Insect Pests. In: Kempken, F.; Esser, K; Bennett, J.W., editors. *Agricultural Applications: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Springer, s. 111-134.
- Butt, T.M.; Goettel, M.S., 2000:** Bioassays of entomogenous fungi. In: Navon, A.; Ascher, K.R.S., editors. *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB publishing, UK, s. 141–197.
- Čurn, V.; Stojanová, D.; Landa, Z., 1997:** Substrates induced production of amylolytic and celuloytic enzymes in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Sborník JU, Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích, řada fyto technická, 2, XIV: 63-65*.
- Dirlbeková, O., 1991:** Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin (I.Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.). ÚVTIZ, Praha, 52 s.
- Doberski, J.W., 1981a:** Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: pathogenicity of *Beauveria bassiana*,

- Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus* to larvae and adults of *S. scolytus*. J. Invert. Patholgy, 37: 188–194.
- Doberski, J.W., 1981b:** Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. J. Invert. Patholgy, 37: 195–200.
- Donovan-Peluso, M.; Wasti, S.S.; Hartmann, G.C., 1980:** Safety of entomogenous fungi to vertebrate hosts. Applied Entomology and Zoology, 15: 498-499.
- Driver, F.; Milner, R.J.; Trueman, J.W.H., 2000:** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of a DNA sequence data. Mycological Research, 104: 134–150.
- Eilenberg, J.; Hajek, A.; Lomer, C., 2001:** Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl, 46: 387-400.
- Eilenberg, J.; Meadow, R. 2002:** Fungal biological control of brassica root flies *Delia radicum* and *Delia floralis*. In: Upadhyay, R.K., editor. Advance in Microbial Control Insect Pests. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, s. 181-191.
- Fargues, J.; Goettel, M.S.; Smits, N.; Ouedraogo, A.; Vidal, C.; Lacey, L.A.; Lomer, C.J.; Rougier, M., 1996:** Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. Mycopathologia, 135: 171-181.
- Feng, M.G.; Poprawski, T.J.; Khachatourians, G.G., 1994:** Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect control: Current Status. Biocontrol Science and Technology, 4: 3-34
- Feng, Z.; Carruthers, R.I.; Roberts, D.W.; Robson, D.S., 1985:** Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* on the European spruce bark beetle, *Ostrinia nubilalis*. Journal of Invertebrate Pathology, 46: 259-264.
- Fransen, J.J., 1987:** *Aschersonia aleyrodis* as a microbial control agent of greenhouse whitefly. Ph.D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, Department of Entomology, 167 s.
- Fuchs, G., 1915:** Die Naturgeschichte der Nematoden und einiger anderer Parasiten 1. des *Ips typographus* L. 2. des *Hylobius abietis* L. Zool. Jb., Abt. Syst., 38: 109-222.



- Funke, W.; Petershagen, M., 1994:** Zur Flugaktivität von Borkenkäfern. Jahresber. Naturw. Ver. Wuppertal, 47: 5–10.
- Gardner, W.A.; Sutton, R.M.; Noblet, R., 1977:** Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi* and *Nosema necatrix* on soybean foliage. Environ. Entomology, 6: 616-618.
- Gilespe, A.T.; Moorhouse, E.R., 1988:** The use of fungi to control pest of agricultural and horticultural importance. In: Whipps, J.M.; Lumsden, R.D., editors. Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth. Cambridge University Press, s. 55-84.
- Glare, T.R., 2004:** Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. In: Arora, D.K., editor. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, Mycology Series, Marcel Dekker, NY, 21: 79–90.
- Goettel, M.S., 1995:** The utility of bioassays in the risk assessment of entomopathogenic fungi. Biotechnology Risk Assessment USEPA/USDA, Environment Canada, Agriculture and Agri-Food Canada Proceedings of the Biotechnology Risk Assessment Symposium, Pensacola, FL. University of Maryland Biotechnology Institute College Park, MD, s. 2-7.
- Goettel, M.S.; Poprawsky, T.Y.; Vandenberg, J.D.; Li, Z.; Roberts, D.W., 1990:** Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird, M.; Lacey, L.A.; Davidson, E.W., editors. Safety of Microbial Insecticides. CRC Press Boca Raton, FL, s. 209-232.
- Goettel, M.S.; Hajek, A.E.; Šířel, J.P.; Hans, H.C., 2001:** Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M.; Jackson, C.; Magan, N., editors. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Wallingford: CAB International, s. 347-376.
- Goettel, M.S.; Jaronski, S.T., 1997:** Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological Society Canada, 171: 83-99.
- Gottwald, T.R.; Tedders, W.L., 1982:** Studies on konidia repase by entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on pecan weevil larve (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. Environ. Entomology, 13: 557-560.
- Hajek, A.E.; Butler, L., 2000:** Predicting the host range of entomopathogenic fungi. In P.A. Follett, P.A.; Duan, J.J., editors. Non-target Effects of Biological Control. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, s. 263-276.

- Hall, R.A., 1985:** Whitefly control with fungi. In: Hussey, N.W., Scopes, N., editor. Biological pest control - the glasshouse experience. Cornell University Press, Ithaca, New York, s. 116-118.
- Hallsworth, J. E.; Magan, N., 1999:** Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, 74: 261-266.
- Hulcr, J., 2001:** Přirození regulátoři lýkožrouta smrkového (*Ips typographus* L.) na Šumavě; bakalářská dipl. práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.
- Hulcr, J., 2004:** Lýkožrout v lese z pohledu entomologa. Lesnická práce, časopis pro lesnickou vědu a praxi, (83), 4.
- Hung, S.Y.; Boucias, D. G., 1992:** Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm *Spodoptera exigua*. J. Invert. Pathology, 60: 152-158.
- Johnson, D.L.; Smits, J.E.; Jaronski, S.T.; Weaver, D.K., 2002:** Assessment of health and growth of ring-necked pheasants following consumption of infected insects or conidia of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* and *Beauveria bassiana*, from Madagascar and North America. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 65: 2145-2162.
- Jones, K.D., 1994:** Aspects of the biology and biological control of the European corn borer in North Carolina, PhD thesis, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
- Kirschner, R., 2001:** Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in central Europe. In: Misra, J.K.; Horn, B.W., editors. Trichomycetes and other fungal groups: Professor Robert W. Lichtwardt commemoration volume. Enfield, NewHampshire: Science Publishers Inc., s. 175-196.
- Kopp, U., 1988:** Analyse der Überlebensrate der Blastosporen von *Beauveria brongniarti* (Sacc.) Petch nach einer Waldrandbehandlung mizels Helikopter. Diplomarbeit ETHZ, 42 s.
- Kreutz, J., 2002:** Möglichkeiten einer biologischen Bekämpfung des Buchdruckers, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae), mit insektenpathogenen Pilzen in Kombination mit Pheromonfallen. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 189 s.

- Kreutz, J.; Vaupel, O.; Zimmerman, G., 2004:** Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L. in the laboratory under various conditions. *Journal of Applied Entomology*, 128: 384-389.
- Kula, E.; Zabecki, W., 1999:** Houboví patogeni ovlivňují výskyt kambioxylofágů na smrku. *Lesnická práce, časopis pro lesnickou vědu a praxi*, (78), 5.
- Landa Z.; Horňák P.; Osborne L. S.; Nováková A.; Bursová E., 2001:** Entomogenous fungi associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in the Bohemian Forest. *Silva Gabreta*, 6: 259-272.
- Landa, Z., 1994:** Entomopatogení houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JU, České Budějovice, s. 14-15.
- Landa, Z.; Křenová, Z.; Oldřich, V., 2007:** Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce, časopis pro lesnickou vědu a praxi*, (86), 10.
- Leckie, B.M., 2002:** Effect of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into tomato plants using PRC and ITS. MS thesis, The University of Tennessee, Knoxville, Tennessee.
- Leland, J.E., 2001:** Environmental-Stress Tolerant Formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African desert locust (*Schistocerca gregaria*). Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State, Virginia, 188 s.
- Lewis, L.C.; Bing, L.A., 1992:** Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology*, 2: 39-47.
- Mattanovich, J.; Ehrenhöfer, M.; Vavra, C.; Führer, E., 1999:** Zur Weiterentwicklung eines halbsynthetischen Nährmediums für *Ips typographus* L. *J. Pest. Science*, 72: 49-51.
- McCoy, C.W.; Samson, R.A.; Boucias, D.G., 1988:** Entomogenous fungi. In: Ignoffo, C.M., editor. *CRC Handbook of Natural Pesticides, Microbial Insecticides*, Part of Entomogenous Protozoa and fungi, 5: 151-236.
- Müller-Kögler, E., 1965:** Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. P. Parey Verlag., Berlin, 444 s.
- Nierhaus-Wunderwald, D., 1996:** Die natürlichen Gegenspieler der Borkenkäfer. *Sonderdruck Wald und Holz*, (74),1: 8-14.

- Paine, T.D.; Raffa, K.F.; Harrington, T.C., 1997:** Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Ann. Rev. Entomology*, 42: 179-206.
- Parker, B.L.; Skener, M.; Gouli, V.; Brownbridge, M., 1997:** Impact of soil applications of *Beauveria bassiana* and *Mariannaea sp.* on nontarget forest arthropods. *Biological Control*, 8: 203-206.
- Prazak, R.A., 1997:** Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Trypodendron lineatum* Oliv. (Coleoptera, Scolytidae). *J. Plant Dis. Prot.* 104: 459–465.
- Samson, R.A., 1974:** Paecilomyces and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6: 1-43.
- Samson, R.A.; Rombach, M.C., 1985:** Biology of the fungi *Verticillium* and *Aschersonia*. In: Hussey, N.W.; Scopes, N., editors. *Biological pest control – the glasshouse experience*. Cornell University Press, Ithaca, New York, s. 34-42.
- Smith, R.J.; Grula, E.A., 1981:** Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invert. Pathology*, 37: 222-230.
- Vaupel, O.; Zimmermann, G., 1996:** Orientierende Versuche zur Kombination von Pheromonfallen mit dem insektenpathogenen Pilz *B. bassiana* (Bals.) Vuill. gegen die Borkenkäferart *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae). *Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 69: 175–179.
- Vega, F.E.; Dowd, P.F.; Barter, R.J., 1995:** Dissemination of microbial agents using an autoinoculating device and several insect species as vector. *Biol. Control*, 5: 545-552.
- Vestergaard, S.; Cherry, A.; Keller, S.; Goettel, M., 2003:** Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen, H.M.T.; Hajek, A.E., editors. *Environmental impacts of microbial insecticides*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, s. 35-62.
- Vey, A.; Hoagland, R.; Butt, T.M., 2001:** Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M.; Jackson, C.W.; Magan, N., editors. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford: CAB International, s. 311-346.
- Vidal, C.; Fargues, J.; Lacey, L.A., 1997:** Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. *J. Invert. Pathology*, 70: 18-26.

- Vilcinskas, A.; Götz, P., 1999:** Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology*, 43: 267-313.
- Visser, S.; Parkinson, D.; Hassall, M., 1987:** Fungi associated with *Onychiurus subtenuis* (Collembola) in an aspen woodland. *Canadian Journal of Botany*, 65: 635-642.
- Wagner, B.L.; Lewis, L.C., 2000:** Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Environmental Mikrobiology*, 66: 3468-3473.
- Wegensteiner, R., 1992:** Untersuchungen zur Wirkung von *Beauveria*-Arten auf *Ips typographus* (Col., Scolytidae). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 8: 104–106.
- Wegensteiner, R., 1996:** Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera, Scolytidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, 19: 186–189.
- Zimmermann, G., 2007:** Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553-596.
- Zumr, V., 1985:** Biologie a ekologie lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a ochrana proti němu. *ACADEMIA, nakladatelství ČSAV, Praha*, 105 s.

## 8. GRAFICKÉ LISTY

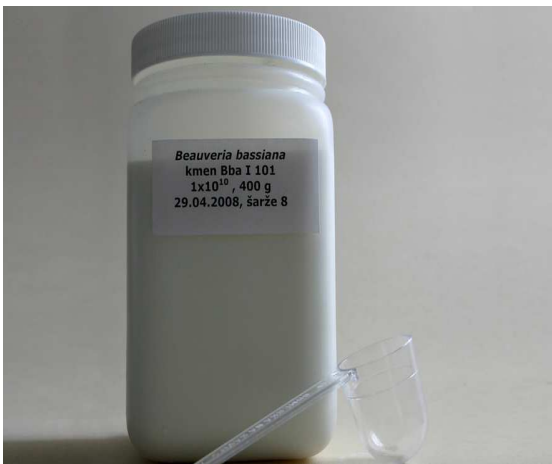
### Standardní laboratorní biotest



Kultura entomopatogenní houby *B. bassiana*



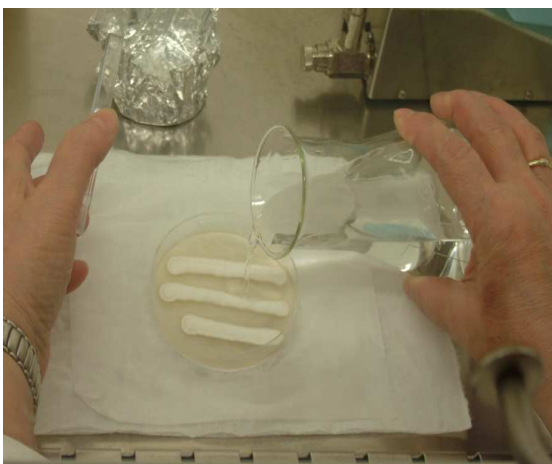
Standardní laboratorní biotest probíhá ve sterilních plastových kontejnerech s vlhkou buničinou na dně



Biopreparát na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* kmen I 101



Základem biotestu je vložení standardního počtu ošetřených imág na výřez smrkové kůry



Příprava inokula entomopatogenní houby *B. bassiana*



Dospělec v kůře, porostlý entomopatogenní houbou *B. bassiana*