

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

# DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Tomáš Tonka

2013

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

MORFOLOGIE A VÝVOJ STŘEVNÍCH  
PATOGENŮ LÝKOŽROUTA SMRKOVÉHO

Doktorská disertační práce

Mgr. Tomáš Tonka

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, CSc.  
Doktorský studijní program: P 4102V Fytotechnika  
Studijní obor: 4102V008 Speciální produkce rostlinná

České Budějovice 2013

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji disertační práci na téma: "Morfologie a vývoj střevních patogenů lýkožrouta smrkového" vypracoval samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Předložená disertační práce byla zpracována na katedře rostlinné výroby ZF JČU v Českých Budějovicích s podporou výzkumného projektu MSM 6007665806 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Prohlašuji, že v souladu §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích.

V Českých Budějovicích, 13.9.2013

Tomáš Tonka

## **Poděkování**

V první řadě bych rád bych poděkoval školiteli prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za vedení na začátku doktorského studia a za metodické návody při přípravě disertační práce a odborné rady. Rád bych také poděkoval prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, CSc. za pomoc a odborné připomínky ke zpracování disertační práce. Dále děkuji zaměstnancům katedry speciální zootechniky, a jmenovitě panu prof. Ing. Janu Frelichovi, CSc. za podporu a cenné rady.

RNDr. Jaroslavu Weiserovi, DrSc. děkuji za uvedení do problematiky hmyzí patologie, za několikaleté předávání cenných zkušeností a poznatků k problematice nemocí hmyzu.

## Obsah

1. Úvod .....	8
2. Literární přehled .....	11
2. 1. Lýkožrout smrkový .....	11
2. 1. 1. Přirození nepřátelé lýkožrouta smrkového .....	14
2. 2. Poxviry .....	19
2. 3. <i>Entomopoxvirinae</i> .....	20
2. 4. <i>Ips typographus</i> Entomopoxvirus - ITEV .....	22
2. 5. Mikrosporidie .....	27
2. 6. <i>Chytridiopsis typographi</i> .....	31
3. Cíle práce .....	34
4. Materiál a metodika .....	36
4. 1. Vyšetření hostitelských organizmů .....	36
4. 2. Barvení .....	37
4. 3. Měření granulí a spor .....	38
4. 4. Elektronový mikroskop .....	38
4. 5. Virus .....	39
4. 6. Hostitel .....	41
4. 7. Mikrosporidie .....	41
5. Výsledky .....	43
5.1. Vývoj a morfogeneze <i>Ips typographus</i> EV .....	43
5. 1. 1. Lokalizace virové replikace .....	45
5. 1. 2. Mezistádium .....	46
5. 1. 3. Viroplazma - virogenní stróma .....	46
5. 1. 4. Replikace DNA .....	47
5. 1. 5. Srpkovitá membrána (crescent - shape) .....	47
5. 1. 6. Tvorba virionu .....	48
5. 1. 7. Nukleoid a obal nukleoidu (core, core sac) .....	48

5. 1. 8. Nezralý virion (IV) .....	49
5. 1. 9. Sféroid - okluzní tělísko .....	49
5. 1. 10. Vřetena (microspindles) .....	50
5. 2. Mezistádium .....	51
5. 3. Vývoj a morfogeneze mikrosporidie <i>Chytridiopsis typographi</i> .....	53
5. 3. 1. Vegetativní stádia .....	53
5. 3. 2. Tlustostěnná sporogonie .....	54
5. 3. 3. Tlustostěnné spory .....	55
5. 3. 4. Tenkostěnná sporogonie .....	55
5. 3. 5. Tenkostěnné spory .....	57
6. Diskuze .....	59
6. 1. <i>Ips typographus entomopoxvirus</i> .....	59
6. 1. 1. Napadená tkáň .....	60
6. 1. 2. Konstrukce a morfogeneze virionu .....	64
6. 1. 3. Replikační zóny .....	67
6. 1. 4. Sféroidy - okluzní tělíška (OB) .....	70
6. 1. 5. Mikrovřetena .....	73
6. 2. Mezistádium .....	75
6. 3. Použití EV pro biologickou ochranu .....	80
6. 4. <i>Chytridiopsis typographi</i> .....	82
7. Závěry .....	85
8. Obrazová příloha .....	89
9. Seznam literatury .....	132
10. Abstract .....	159
11. Přílohy .....	162

## Zkratky

AMEV	<i>Amsacta moorei Entomopoxvirus</i>
BIS	buffered insect saline
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> nuclear polyhedrosis virus
BV	čeled' <i>Baculoviridae</i>
CEV	cell - associated enveloped virion
CV	podčeled' <i>Chordopoxvirinae</i>
dsDNA	dvouvláknová DNA (double stranded DNA)
EEV	extracellular enveloped virion
EF	elongační faktor (elongation factor)
ER	endoplazmatické reticulum (endoplasmic reticulum)
ENV	enveloped virion
EV	podčeled' <i>Entomopoxvirinae</i>
FB	tukové těleso (fat body)
G	gonády (gonads)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
ITEV	<i>Ips typographus Entomopoxvirus</i>
M	střevo (midgut)
MMEV	<i>Melolontha melolontha Entomopoxvirus</i>
MSEV	<i>Melanoplus sanguinipes Entomopoxvirus</i>
MS	mikrovřeteno (microspindles)
MT	Malpighické žlázy (Malpighian tubules)
MV	zralý virion (mature virion)
O	ovária (ovary)
OB	sféroid (okluzní tělísko, occlusion body)
ODV	occlusion derived virus
IMV	intracellular mature virion
IV	nezralý virion (imature virion)
SGPV	salmon gill poxvirus
TEM	transmission electron microscopy
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
VARV	<i>Variola virus</i>
VS	viroplazma (virogenní stroma, virogennic stroma)
WV	wrapped virion

## 1. Úvod

S rozvojem kůrovcové kalamity na Šumavě šel ruku v ruce i výzkum biologie, bionomie a ekologie lýkožrouta smrkového, jeho patogenů, parazitů a predátorů. Výzkum patogeních agens, vyskytujících se u kůrovce sice započal již v polovině minulého století, kdy dr. Weiser popsal několik entomopatogenů, kteří napadají kůrovce na našem území, monitoring a podrobnější výzkum entomopatogenní fauny kůrovcovitých brouků se detailněji rozběhl až na přelomu 20. a 21. století.

Výzkum entomopatogenů se zaměřil především na tři skupiny: viry, mikrospori-die a entomopatogenní houby. Po počátečním monitoringu, a zjištění výskytu výše uvedených skupin, bylo přistoupeno k izolaci jednotlivých druhů patogenů, popř. kmenů entomopatogenních agens. Většina těchto organizmů byla již známa z dřívějších popisů, nicméně nebylo známo nic o jejich vývoji v hostiteli, jejich přenosu mezi jedinci v přírodních populacích, nic o patogenitě a virulenci, ani o ultrastruktuře a morfogenezi vývojových stádií. Výzkum se také zaměřil na využití entomopatogenních organizmů v biologické ochraně smrčín s výskytem lýkožrouta smrkového.

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky a poznatky studia morfogeneze a vývoje entomopatogeního viru, *Ips typographus Entomopoxvirus* (ITEV), jejichž poznání je nezbytné pro další pochopení infekčního procesu ve střevě hostitele. Tyto poznatky o ultrastruktuře a předpokládaný životní cyklus viru je srovnán s údaji, shrnutými v literatuře k tomuto tématu, které byly publikovány během posledních let nejenom u bezobratlých, resp. hmyzích hostitelů, ale i u teplotokrevných hostitelů poxvirů.

Virus ITEV napadá hospodářsky významného škůdce smrkových monokultur, lýkožrouta smrkového, *Ips typographus*. Přesto, že doposud nevíme, jak je pro kůrovce virus virulentní - a některé naše práce přispěly do diskuze na toto téma - jedná se o důležité poznatky z hlediska studia skupiny virů celé čeledi *Poxviridae*.



Výsledky přinášejí nové poznatky o ultrastruktuře a morfogenezi některých stádií životního cyklu těchto intracelulárních parazitů, a současně přispívají novými údaji ke studiu biologie a taxonomie této skupiny velkých virů.

Tato práce je ale také příspěvkem k diskuzi o využití entomopoxvirů, a zvláště ITEV, v biologické ochraně proti hmyzím škůdcům. Důležitou otázkou je efektivní produkce patogenních agens, která musí být ekonomicky výhodná a zajímavá pro potenciální investory.

V neposlední řadě se během výzkumu ITEV podařilo objevit několik nových druhů mikrosporidií, které napadají střevo lýkožroutů, a popsat nové struktury ve vývoji již dříve popsané mikrosporidie *Chytridiopsis typographi*. U této mikrosporidie se v současné době připravuje její molekulární profil tak, aby bylo možno tuto mikrosporidii zařadit do taxonomického systému. U některých lýkožroutů se také našly paraziti z řádu Neogregarinida a výzkum těchto prvoků bude v budoucnosti pokračovat.

Výsledky, publikované v předkládané práci, mohou být podkladem pro aplikovaný výzkum využití patogenů v biologické ochraně smrčín proti lýkožroutu smrkovému (popř. i dalším kůrovcům), sloužící ke sladění potřeb hospodářského využití lesů a ochrany krajiny s ohledem na zachování její biodiverzity. Zároveň může být podkladem pro první praktické využití entomopoxviru v biologické ochraně smrkových porostů. Výsledky mohou rozšířit zájem vědecké veřejnosti o studium a praktické využití virů podčeledi *Entomopoxvirinae*, soustředěný doposud převážně na entomopatogenní viry čeledi *Baculoviridae*, entomopatogenní bakterie a entomopatogenní houby. Stjeně tak může zvýšit zájem o biologickou ochranu proti škodlivým broukům, soustředěnou spíše na motýly, dvoukřídly a rovnokřídly hmyz nebo roztoče. ITEV může být použitý k dalším nezbytným potřebám výzkumu (izolace genomu, testování účinku na necílové organizmy, výzkum na úrovni buněčné biologie, atd.),

---

stejně jako studijní materiál při výzkumu interakcí mezi intracelulárním parazitem a hostitelskou buňkou.

V případě mikrosporidie *Chytridiopsis typographi* se mohou získané poznatky aplikovat na otázky parazitologie jako celku. Mikrosporidie jako vnitrobuněční paraziti jsou ideálním studijním materiálem při výzkumu interakcí mezi vnitrobuněčnými parazity a buňkami hostitele. Z hlediska molekulární biologie a fylogenetiky jsou mikrosporidie jediná eukaryota, která mají ribozomy prokaryotního typu a jako taková jsou ideálním organizmem při studiu evoluce eukaryotních organizmů.

## 2. Literární přehled

První část literárního přehledu poskytuje základní informace o lýkožroutu smrkovém, bionomii, taxonomii a vlivu na lesní hospodářství. Tato úvodní část také shrnuje informace o patogenech lýkožrouta smrkového, zejména o mikrosporidiích, které byly doposud u kůrovců popsány. Dále pojednává o virech čeledi *Poxviridae*, o entomopatogenních zástupcích této čeledi, infikující brouky a o viru *Ips typographus Entomopoxvirus* (ITEV). Část literární rešerše podrobněji pojednává o mikrosporidii *Chytridiopsis typographi*.

### 2. 1. Lýkožrout smrkový

Lýkožrout smrkový, *Ips typographus* L., 1758 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), je jedním ze 6 zástupců rodu *Ips*, kteří se vyskytují na našem území. Společně s dalšími druhy rodu *Ips* (*I. amitinus*, *I. duplicatus*), a některými dalšími zástupci podčeledi *Scolytinae*, škodí ve smrkových porostech. Lýkožrout smrkový - kůrovec - je nejvýznamnějším škůdcem starších smrkových monokultur. Je sekundárním fyziologickým škůdcem, kdy primárně napadá dřevo čerstvě pokácené, popř. polomové nebo jinak oslabené stromy (sucho, imise, houby) a až v případě přemnožení, kdy není schopen najít vhodné dřevo k založení potomstva, napadá i stojící zdravé stromy (Weslien et al., 1989). Je přirozenou součástí druhově diverzifikovaných lesních společenstev palearktické oblasti. Areál rozšíření l. smrkového sahá od Japonska přes Čínu a Sibiř až do Evropy, ve které se, s výjimkou britských ostrovů, vyskytuje všude. Původně je to druh horských smrčín odkud se rozšířil do nížinných monokultur smrku ztepilého. V některých případech se může vyvíjet i na jiných druzích smrku, popř. na modřínu a borovici. Ve smrkových monokulturách nížinných porostů a v lidskou činností pozměněných horských smrčínách se může stát vážným

---

škůdcem, který svými gradacemi způsobuje významné hospodářské a ekologické škody s dlouhotrvajícími důsledky (Austara et al., 1984; Skuhřavý, 2002; Zahradník, 1997).

Životní cyklus I. smrkového začíná náletem samce, který se provrtá skrz kůru a pod ní vyhlodá snubní komůrku. L. smrkový je polygamní druh, může oplodnit více samic, většinou 1 - 3. Po spáření ve snubní komůrce začíná samice hlodat matečnou chodbu jedním směrem, druhá samice směrem opačným. Po stranách matečné chodby klade samice jednotlivě vajíčka. Z malého, bílého a oválného vajíčka se líhne apodní bělavá larva se silně sklerotizovanou hlavou. Larva prochází třemi instary, které jsou zakončeny bílou volnou kuklou. Po vylíhnutí jsou imága světle hnědá, postupně tmavnou, dospělý brouk je válcovitý, černohnědý, lesklý. Požerek I. smrkového je v základním stavu tříramenný, při kalamitním přemnožení převládají jednoramenné požerky.

Po vykladení může samice přeletět na jiný strom, kde pokračuje v kladení, ze kterého vzniká tzv. sesterská generace. Ta se pozná např. tak, že matečná chodba nemá snubní komůrku. Po vylíhnutí hlodají larvy chodby kolmo na matečnou chodbu. Na konci larválního vývoje se kuklí. Po vylíhnutí prodělávají brouci zralostní žír, zpravidla v místě líhnutí. Poté, co pohlavně dozrají, vyhledávají hostitele, kde vyhlodají snubní komůrku, a cyklus se opakuje.

Celý vývoj trvá průměrně 6 - 10 týdnů, ale podle meteorologických podmínek může být zkrácen, nebo prodloužen. V našich podmínkách má I. smrkový v nižších nadmořských výškách dvě generace, ve vyšších polohách generaci jednu. Ale během dlouhých a suchých letních měsíců se v horských smrčínách mohou vyvinout generace dvě a v nížinách až tři generace. Jarní rojení nastává v nižších polohách většinou v dubnu až květnu, druhé rojení v červnu až srpnu, případné třetí rojení v srpnu až září. Přezimují všechna stádia, larva, kukla a imágo.

Jak bylo uvedeno výše, I. smrkový je nejdůležitějším škodlivým činitelem v lesním hospodářství ve smrkových monokulturách. Nadměrné přemnožení kůrovců způsobuje veliké ekonomické škody v lesním hospodářství. Kalamity, způsobené přemnožením lýkožroutů, nejsou v historii lesního hospodářství ničím výjimečným a poznatky o škodách, způsobených tímto broukem většinou na našem území, zpracoval ve své monografii Skuhravý (2000).

V minulém století se ke zvládnutí kůrovcových kalamit soustředila pozornost zejména na bionomii, etologii, autekologii, demekologii a chemickou etologii lýkožroutů (Adlung et al., 1986; Anderbrant, 1990; Bakke, 1992; Birgersson et al., 1988; Byers & Lofqvist, 1989; Byers, 2000; Duelli et al., 1986; Eriksson et al., 2008; Faccoli & Stergulc, 2006; Faccoli, 2009; Fahse & Heurich, 2011; Forster et al., 2003; Grodzki et al., 2004; Hedgren & Schroeder, 2004; Němec et al., 1993; Okland & Bjornstad, 2003; Schwenke, 1996; Vite & Baader, 1990; Weslien, 1992a; Weslien & Schroeder, 1999; Wermelinger, 2004; Zumr, 1982; Zumr & Starý, 1992; Zumr, 1995). Pokusy připravit recept na semisyntetickou dietu, která by umožnila kontinuální chov lýkožroutů v pro účely laboratorních experimentů, nebyly v minulosti úspěšné (Mattanovich et al., 1999; osobní sdělení RNDr. Pultar).

Výše uvedené a mnoho dalších podobných studií bylo využito s různým úspěchem k ochraně v celém areálu rozšíření lýkožrouta v komplexu přímých i nepřímých metod a koncepcí. Mezi nepřímé metody patří např. náhrada současných věkově homogenních smrkových monokultur za druhově a věkově diverzifikované porosty, snížení imisního zatížení prostředí (což je dlouhodobá metoda s realizací řádově v desítkách let), včasná likvidace primárních ohnisek kalamit, tj. polomů, vývratů a náletových stěn nucenou těžbou, odkorňování poškozených stromů v kalamitních lokalitách a štěpkování nebo pálení zbytků po těžbě dřeva, což je neúčinnější a nejužívanější z nepřímých metod. Z přímých metod se k ochraně proti lýkožroutům používá odvoz a sanace napadeného dřeva, vytěžení napadených stromů, chemické ošetření dřeva pesticidy, atraktivních pro kůrovce, masový odchyt imág do

feromonových lapačů nebo do stromových a pesticidy ošetřených lapáků (Byers, 1993; Švestka et al., 1998; Weslien, 1992b). Ani tyto přístupy nemohou zcela zabránit kalamitnímu vývoji škůdce, jak ukázaly zkušenosti z minulosti, kdy negativní antropogenní zatížení ekosystémů nedosahovalo současných proporcí. Zvládnutí kalamit je víceletým úsilím, provázeným větším či menším narušením biocenóz i těžebních plánů. V posledních letech je navíc zvládnutí kalamitního výskytu lýkožroutů provázené otevřenými střety mezi zástupci lesních hospodářských pracovníků, zástupci správy chráněných území a odbornou i laickou veřejností.

### **2. 1. 1. Přirození nepřátelé lýkožrouta smrkového**

K ochraně lesa před kůrovci a jejich rozšířením se používají nejčastěji feromonové lapače, stromové lapáky, pesticidem ošetřené a stojící lapáky (Wermelinger, 2004). Jejich využití, a zejména následná likvidace napadených stromových lapáků závisí zejména na míře ovlivnění ekosystému, zejména ekosystémů s vysokým stupněm ochrany přírody (Juha et al., 2012). Je zřejmé, že některé zásahy prováděné v asanaci kůrovcového dřeva mají vliv i na necílové organizmy, ať již se jedná o strojové loupání kůry, a zejména o použití neselektivních insekticidů, které hubí veškerý hmyz a tudíž i predátory a parazitoidy kůrovcových brouků (Bombosch & Dedek, 1994; Švestka et al., 1998). Tyto insekticidy jsou proto v oblastech s vysokým stupněm ochrany přírody - chráněná území a národní parky - nepřípustné, či přímo zakázané.

Z výše uvedených důvodů je v některých lesních ekosystémech žádoucí omezení dosavadních metod chemické ochrany, zvláště přihlídneme-li k tomu, že lesní porosty patří svojí strukturou k nejstabilnějším a nejdiverzifikovanějším biocenózám. Doplnění, resp. nahrazení dosavadních metod metodami biologické ochrany, jejichž význam pro prostředí dokazuje řada prací (Gebhart et al., 1997; Mills, 1985), by bylo v některých případech žádoucí. Efektivita biologických přístupů v praktické aplikaci

je ale zatím nízká a významnějších výsledků je dosahováno pouze v laboratorních podmínkách (Lukášová & Holuša, 2012; Tonka & Weiser, 2009).

Intenzivnější výzkum I. smrkového vedl k identifikaci řady biologických agens regulujících populace lýkožroutů (Eck, 1990; Krueger & Mills, 1990; Moser & Bogenschutz, 1984; Pettersen, 1978; Wermelinger et al., 2012), a zejména k poznání řady patogenů, zastoupených v populacích *I. typographus* úplně stejně, jako v populacích jiných gradujících škůdců (Händel et al., 2003; Holuša et al., 2009; Holuša et al., 2013; Kereselidze et al., 2010; Kreutz et al., 2004a; Landa et al., 2001; Lieutier, 1978; Lukášová & Holuša, 2012; Purrini & Weiser, 1985; Takov & Pilarska, 2009; Takov et al., 2010; Takov et al., 2011; Tonka et al., 2010; Wegensteiner & Weiser, 1996; Wegensteiner & Weiser, 2004; Wegensteiner et al., 2010; Weiser et al., 1997; Weiser et al., 1998; Yaman & Baki, 2011; Žižka et al., 2001). Přirozené nepřátele, redukující populace I. smrkového, resp. kůrovcovitých brouků, můžeme rozdělit do několika skupin. Za prvé se jedná o predátory, kteří aktivně vyhledávají kůrovce a likvidují stádia brouků přímo v místě výskytu. Druhou skupinou organismů, podílejících se na redukci populací kůrovců jsou parazitoidi, kteří napadají zejména larvální stádia ve vývoji brouků. Třetí skupinou jsou patogeni, kteří redukují populace lýkožroutů zejména během gradačních fází.

Díky aktuálnímu stavu poznání se postupně mění názor o bezvýznamném příspěvku přirozeně se vyskytujících predátorů, parazitoidů a patogenů I. smrkového během jeho gradačního cyklu (Zumr, 1995). Studium patogenů v době kůrovcové kalamity na Šumavě vede k závěru, že přirozený výskyt infekcí může ochránit před škůdcem lokální ostrůvky živých stromů, při plošném napadení ale nejsou infekce schopny zabránit plošné destrukci stejnověkých smrkových monokultur. Je zřejmé, že v rozsáhlých lesních celcích nelze ponechat populace I. smrkového autoregulačním mechanismům bez rizika rozsáhlých škod. Vycházíme - li z hypotézy, že cíleným

zásahem do přirozeného vývoje lýkožrouta introdukcí klíčových patogenů do populace zejména ve fázi pregradace lze gradaci zpomalit a přerušit, vyvstává otázka, máme - li dostatek informací pro její ověření.

### **Predátoři**

Antagonisti kůrovců následují své hostitele ve vývoji. Objevují se ve větším množství až po namnožení kůrovcovitých brouků. Nejvýznamnějším a nejznámějším predátorem kůrovcovitých brouků je pestrokrovečník mravenčí (*Thanasimus formicarius* L.) z čeledi pestrokrovečnickovití (*Cleridae*). Larva pestrokrovečníka je během svého vývoje schopna pozřít přibližně 50 larev kůrovců (Dippel et al., 1997), dospělý brouk spořádá až 100 larev. V kalamitních oblastech je poměr výskytu pestrokrovečník:kůrovec až 10x větší, než v oblastech výskytu lýkožroutů v základním stavu (Weslien, 1994). Společně s p. mravenčím se může vyskytovat i další zástupce tohoto rodu, *T. femoralis*. Mezi další významné predátory patří drabčící (*Nudobia lentus*), larvy některých dlouhošíjek (čel. *Raphidiidae*), larvy kůrovců mohou požírat i vosy nebo střevlíci. Z dvojkřídých (Diptera) jsou nejznámějšími predátory larvy z čeledi lupicovití (*Dolichopodidae*), zejména larvy *Medetera signaticornis*, které zkonsumují přibližně 5 - 10 larev kůrovců, ale protože se vyskytují ve větším množství, jejich příspěvek k redukci kůrovců je nemalý (Dippel et al., 1997). Dalším zástupcem dvojkřídých jsou larvy mouchy *Lonchaea sitneri* (*Lonchaeidae*), které napadají všechna vývojová stádia kůrovců. Velmi zásadní je i přínos datlíka tříprstého, *Picoides tridactylus*, v jehož trusu byly nalezeny zbytky stádií lýkožrouta (Pechacek, 1994).

### **Parazitoidi**

Z blanokřídleho hmyzu můžeme jmenovat např. některé zástupce čeledi *Bracoridae*, např. lumčíka *Coleoides bostrichorum*, nebo zástupce čeledi *Pteromalidae*,



jako je kovověnka kůrovcová, *Rhopalicus tutela* a někteří zástupci čeledi *Ichneumonidae*.

### Patogenní agens

Do současnosti bylo popsáno okolo 20 druhů patogenů, vyskytujících se u zástupců podčeledi *Scolytinae*. Nejlépe byla do současné doby prozkoumána entomopatogenní fauna u l. smrkového (Lukášová & Holuša, 2012), u ostatních zástupců rodu *Ips* nejsou údaje o patogenních agens tak podrobné (Lukášová et al., 2013; Wegensteiner, 2007).

Mezi popsané patogeny, vyskytující se u l. smrkového, patří viry - *Ips typographus Entomopoxvirus*, prvoci - gregaríny *Gregarina typographi* (řád Eugregarinida), *Menzbieria chalcographi* a *Mattesia schwenkeii* (řád Neogregarinida), a améba *Malamoeba scolyti*, entomopatogenní houby - *Beauveria bassiana*, *B. brognartii*, *Verticillium lecanii*, kvasinka *Pichia* sp., *Metschnikowia typographi* a mikrosporidie *Chytridiopsis typographi*, *Nosema typographi* a *Unikaryon montanum*, a nematodi r. *Contortylenchus* a *Parasitaphelenchus* (Wegensteiner, 2007).

Na první popisy patogenů (Rühm, 1956; Wegensteiner & Weiser, 1995; Weiser, 1954; Weiser, 1955; Weiser & Wegensteiner, 1994) navazuje řada prací, věnovaná jejich ultrastruktuře, lokalizaci jednotlivých patogenů v orgánech či tkáních hostitelů, přenosu mezi jedinci v populaci, patogenezí a sezónní dynamice infekcí (Kreutz et al., 2004a; Lieutier, 1978; Purrini & Weiser, 1985; Takov & Pilarska, 2009; Tonka et al., 2010; Wegensteiner & Weiser, 1996; Wegensteiner & Weiser, 2004; Wegensteiner et al., 2010; Weiser et al., 1997; Weiser et al., 1998; Žižka et al., 2001). Epizootologii a rozšíření patogenů byla věnována pozornost později, stejně jako aplikacím patogenů v místech jejich přirozeného výskytu, které jsou důležitým krokem v aplikovaném výzkumu (Kreutz et al., 1999; Kreutz et al., 2004b; Landa et al.,

---

2007; Pultar & Weiser, 1999; Weiser et al., 1997; Weiser et al., 1999; Weiser et al., 2000; Weiser & Pultar, 2002).

Studium infekcí populace *I. typographus* v aktivních a inaktivních ohniscích kůrovcové kalamity na Šumavě v posledních několika letech ukázalo, že promořenost patogeny je ve fázi latence a progradace poměrně nízká (0 - 4%, jiné prameny udávají 0 - 12%), ale během gradace se může lokálně zvýšit až na 30 - 50% (výjimečně až na 80 - 100%) (Weiser et al., 2000). Jedná se o superinfekce, které se přirozeně vyvíjejí do tzv. "konečného stádia" tří typů, podle převažujícího patogena. A - typ charakterizuje 30 - 50% infekce virem *Ips typographus Entomopoxvirus*, B - typ charakterizuje 40 - 50% infekce, vyvolaná mikrosporidií *C. typographi* a C - typ infekce je charakterizován více než 50% infekcí gregarínou *M. chalcographi* (Weiser & Pultar, 2002). Přesto, že se u lýkožroutů vyskytují i jiná patogenní agens, pouze spektrum těchto tří (+ entomopatogenní houby) je klíčové pro biologickou ochranu a výzkum - např. hojnému výskytu infekcí nematody se nepřisuzuje valný význam vzhledem k nízké patogenitě nematodů, infikujících kůrovce (Thong & Webster, 1975).

Použitelné informace o virulenci popsaných patogenů, které jsou použitelné pro aplikovaný výzkum, zaměřený na využití patogenů k ochraně proti I. smrkovému, podává jen málo studií z poslední doby (Tonka & Weiser, 2009; Wegensteiner & Weiser, 1996). U klíčových patogenů chybí údaje o přenosu a vývoji a vlivu na hostitele. Tento nedostatek v databázi informací je příčinou toho, že pokusy o aplikaci patogenů jsou jen sporadické, avšak perspektivní. Např. se podařilo v polních podmínkách dosáhnout 43% infekce brouků virem ITEV a kontaminace přibližně 20% brouků pomocí stromových lapáků s feromonem (Pultar & Weiser, 1999). Stejně slibné jsou i pokusy s aplikací entomopatogenních hub (Landa et al., 2007).

Z těchto skutečností vyplynulo, že z hlediska využití patogenů napadajících kůrovce, jsou v současnosti v biologické ochraně nejperspektivnější výše uvedení tři patogeni. Pro potřeby využití jakéhokoliv bioagens v biologické ochraně je podstatná,

kromě jiného, i důkladné znalosti vývojového cyklu patogena, struktury jeho životních stádií a rozvoje v cílové tkáni hostitele. Protože se nepodařilo laboratorně množit gregarinu *M. chalcographi*, ale v laboratoři se rutinně podařilo množení mikrosporidie *Ch. typographi* a viru ITEV, ultrastruktury vývojových stádií a morfogeneze byla studována na těchto zástupcích entomopatogenní fauny I. smrkového.

## 2. 2. Poxviry

*Ips typographus* Entomopoxvirus (ITEV) patří do skupiny virů obecně nazývaných poxviry. Jsou to zástupci čeledi *Poxviridae*, která se dělí na dvě podčeledi podle hostitelkého organismu, který infikují. Jedna podčeď, *Entomopoxvirinae* (EV) infikuje bezobratlé, do druhé podčeledi, *Chordopoxvirinae* (CV) jsou zařazeny poxviry infikující obratlovce (King et al., 2012).

Nejznámějším poxvirem je virus varioly (small pox - VARV), který způsobuje pravé neštovice. Morfogeneze poxvirů v cytoplazmě a jejich vstup do buňky (komplex několika proteinů, sloužících ke spojení virionů s hostitelskou buňkou) jsou unikátními znaky této čeledi. Poxviry byly izolovány z ryb, plazů, ptáků, vačnatců a savců, a také z hmyzu. Nemoci, vyvolané poxviry, kolísají od mírných infekcí ke zničujícím epidemiím, jako byly neštovice u člověka, ectromelie u myší nebo myxomatóza u králíků.

Poxviry jsou jedny z největších virů a vyznačují se komplexní morfologií (nejsou ikosahedricky symetrické). Nemoci, způsobené poxviry savců a ptáků, jsou známy stovky let. Poxviry u bezobratlých - entomopoxviry - jsou často okludovány v okluzních tělíčkách - sféroidech (OB).

Viry čeledi *Poxviridae* jsou velké komplexní dvojitě vláknové DNA viry (dsDNA) s velkým genomem, tvořeným jednou lineární molekulou DNA, dlouhou 130 - 370 kbp. Viry se vyvíjejí v cytoplazmě hostitelských buněk. Viriony poxvirů jsou pleomorfní,

většinou cihlovité, nebo vejčité, obalené lipoproteinovou membránou, na povrchu s tubulárními/globulárními nebo filamentózními strukturami, spirálně obtáčeující virion (např. r. *Suipoxvirus*). Povrchová membrána uzavírá cylindrický nukleoid obsahující genom a proteiny. Po stranách mezi nukleoidem a stěnou jsou jedno nebo dvě laterální tělíška, jejichž funkce není přesně známá (Becker & Moyer, 2008). Během vývoje poxvirů, zejména chordopoxvirů, se objevuje několik forem virionů, které se odlišují počtem a tvarem povrchových membrán (King et al., 2012; Schramm & Krijnse-Locker, 2005). Proteiny tvoří podstatnou část virové částice. Okolo 100 různých proteinů je přítomno v částici, genom kóduje dalších 150 - 300 proteinů podle druhu viru. Viriony obsahují množství enzymů, nutných např. k transkripci DNA. Detailnější seznámení s poxviry přinášejí některé publikace z posledních let (King et al., 2012; Mercer et al., 2007; Moss, 2001; Traktman, 1996).

Do podčeledi *Chordopoxvirinae* patří podle poslední zprávy ICTV 9 rodů a několik virů dosud nezařazených (King et al., 2012). Mezi viry této čeledi patří virus neštovic (variola virus), v současné době se nevyskytující v populaci, virus vakcínie (vaccinia virus VACV - virus používaný k očkování proti neštovicím) nebo např. virus myxomatózy králíků.

### **2. 3. *Entomopoxvirinae***

Tato podčeleď je v současné době tvořena třemi rody: rod *Alphaentomopoxvirus*, do kterého patří entomopoxviry infikující zástupce řádu Coleoptera, rod *Betaentomopoxvirus*, kterého zástupci infikují řády Lepidoptera a Orthoptera a rod *Gammaentomopoxvirus*, který se vykytuje u dvojkřídlých - komárů a pakomárů. V současné době existuje i několik vědecky popsanych, avšak do systému nezařazených, entomopoxvirů, včetně ITEV (King et al., 2012).

První entomopoxvirus byl popsán z larev chrousta *Melolontha melolontha* (MMEV) (Vago, 1963). Nejprostudovanějšími entomopoxviry jsou viry z rodu *Betaentomopoxvirus*, zejména virus infikující housenky *Amsacta moorei* (AMEV). Některé entomopoxviry r. *Betaentomopoxvirus* z motýlů jsou schopné kultivace v tkáňových kulturách (Granados & Lawler, 1981; Hukuhara et al., 1990; Marlow et al., 1993). Pouze u dvou entomopoxvirů byl sekvenován genom (u AMEV a *Melanoplus sanguinipes* Entomopoxvirus MSEV) (Afonso et al., 1999; Bawden et al., 2000). Přesto, že se jedná o viry dříve společně zařazené do rodu *Betaentomopoxvirus*, data z molekulární analýzy ukazují, že jsou si oba viry dost nepodobné, tedy, že entomopoxviry jsou velmi diverzifikovaná skupina virů (Becker & Moyer, 2007).

Entomopoxviry (EV) infikují bezobratlé, a jejich hlavní strukturální odlišností od chordopoxvirů (CV) je tvorba proteinových okluzí - sféroidů, které okludují jednotlivé viriony. Sféroidy chrání viry ve vnějším prostředí před vyschnutím, UV zářením apod. a jsou strukturálně podobné okluzím u virů čeledi *Baculoviridae*. Sféroidy jsou tvořeny protienem sféroidinem, syntetizovaným *sph* genem. Sféroidin je analogický polyedrinu a granulinu bakulovirů (BV), ale není s nimi homologní (Arif, 1995). Tento gen není nezbytný pro vývoj a infekčnost viru, jak ukázala práce, kdy byl odstraněn z genomu (Palmer et al., 1995). Viriony jsou různého tvaru, s typickou morušovitou projekcí na povrchu membrány. Mají jedno nebo dvě laterální tělíska. Rozdělení do jednotlivých rodů je podle hostitele, morfologie viru a u několika izolátů i podle velikosti genomu (King et al., 2012).

Celá řada entomopoxvirů syntetizuje kromě sféroidinu i protein fusolin, který je hlavní stavební součástí tzv. vřeten - spindles. Jsou to struktury, které neobsahují viriony. Fusolin je kódován virem, je homologický s proteinem gp37 bakulovirů. U některých vřeten chybí (např. u AMEV, všichni zástupci rodu *Gammaentomopoxvirus*), u některých nebyla vřeten popsána. Vřeten se dají rozdělit na makrovřeten (macrospindles), která jsou viditelná v infikované tkáni vedle sféroidů, a mikrovřeten (microspindles), která jsou okludována společně s viriony ve sféroidu u viru

*Choristoneura biennis*, *C. fumiferana* a *Heliiothis armigera* (Arif, 1995; Bird, 1974). Úloha vřeten není zcela jasná, někteří autoři se domnívají, že hrají roli v zesílení účinků virionů na začátku infekce. Fusolin rozpouští a narušuje integritu peritrofické membrány u hostitele, a tím usnadňuje vstup virionů do střeva (Mitsubishi et al., 2000; Mitsuihashi, 2002; Mitsuihashi & Miyamoto, 2003; Mitsuihashi et al., 2007).

Entomopoxviry se vyvíjejí v tukovém tělese a hemocytech u larev, pouze v případě ITEV se virus vyskytuje ve střevě u dospělých brouků. Infekce začíná pozřením sféroиду s viriony, který se ve střevě působením alkalického prostředí rozpouští a uvolněné viriony vstupují do buněk střevního epitelu. Zda se zde vyvíjejí není jasné, střevní infekce byla pozorována pouze u *A. moorei* a *C. biennis*, ale hlavním místem infekce u těchto druhů je tukové těleso (Granados, 1981). Zdá se, že roznos v těle hostitele zajišťují hemocyty, které sedí na povrchu střeva a vychytávají viriony a roznášejí je do tukového tělesa, popř. do dalších tkání (Arif, 1995).

V poslední době byla publikována celá řada článků a monografií, shrnující všechny aspekty biologie entomopoxvirů, včetně popisu vývoje, morfogeneze, syntézy proteinů, analýzy genomu apod. (Arif, 1995; Becker & Moyer, 2007; Granados, 1981; Perera et al., 2010), kde se zájemce může dočíst detaily o entomopoxvirech, které přesahují rámec této práce.

#### **2. 4. *Ips typographus* Entomopoxvirus - ITEV**

V současném systematickém zařazení podčeledi *Entomopoxvirinae* je oficiálně uznáváno pouze 7 zástupců rodu *Alphaentomopoxvirus* (King et al., 2012). Jejich seznam a přehled všech doposud popsaných entomopoxvirů u brouků, s jejich charakteristikou je v tabulce 1. Většina EV z brouků infikuje tukové těleso larev vrubounovitých brouků. Jedinou výjimkou je ITEV.

Tab. 1. Poxviry, popsané z řádu Coleoptera

Hostitel	Tkáň	Virion (nm)	Sféroid - OB ( $\mu\text{m}$ )	Vřetena	Lokalita	Zdroj
Scarabaeidae						
<i>Anomala cuprea</i>	FB	440-250	5x8	+	Japonsko	Katagiri et al., 1975
<i>Aphodius tasmaniae</i>	FB	380-430x250-300	5-12	+	Austrálie	Goodwin & Filshie, 1975
<i>Demodema boranensis</i>	FB	420-230	8-11	+	Argentina	Vago et al., 1968a
<i>Dermolepida albohirtum</i>	FB	420-450x220-240	3-5	-	Austrálie	Goodwin & Roberts, 1975; Goodwin & Filshie, 1975
<i>Othonius batesi</i>	FB	470x265	5-10	+	Austrálie	Goodwin & Filshie, 1969; Goodwin & Roberts, 1975
<i>Geotrupes sylvaticus</i>	FB	306-416x255-286	3.5-11	+	Polsko	Lipa & Bartkowski, 1972
<i>Melolontha melolontha</i>	FB	450x250	10-24	+	Francie	Bergoin et al., 1968a; Hurpin & Vago, 1963; Hurpin & Robert, 1967
<i>Melolontha melolontha</i>	FB	450x250	5.7 x 11.4	+	Turecko	Sezen & Demirbag, 2006
<i>Phyllopertha horticola</i>	FB	400x240	6-25	+	Francie	Vago et al., 1969
<i>Anoplognathus hirsutus</i>	FB					ERMA New Zealand, 2000
<i>Anoplognathus porosus</i>	FB			+	Austrálie, NZ	Moore & Milner, 1973
<i>Dasygnathus sp.</i>	FB			+	Austrálie, NZ	Moore & Milner, 1973
Lucanidae						
<i>Figulus subleavis</i>	FB	330x290	1-5	+	Madagaskar	Vago et al., 1968b
Scolytidae						
<i>Dendroctonus armandi</i>	FB	187-208x104-129	7.88	+	Čína	Fan et al., 1987
<i>Ips typographus</i>	M	150-200x300-350	4-10x5-11	MS	Evropa	Wegensteiner & Weiser, 1995
<i>Ips typographus</i>	M	250-280x310-375	4-10x5-15		Turecko	Yaman & Baki, 2011
<i>Ips amitinus</i>	M		3-14x5-14		Rakousko	Händel et al., 2003

FB .... tukové těleso  
tučně oficiálně uznané druhy

M ... střevo,

NZ ... Nový Zéland

MS ... mikrovřetena

Kromě ITEV byly všechny EV z rodu *Alphaentomopoxvirus* popsány z infikovaných larev. Pro druh je charakteristická dlouhá doba infekce, v některých případech několik měsíců (Goodwin & Roberts, 1975; Milner & Lutton, 1975). Dalším charakteristickým rysem těchto virů je přítomnost vřeten a pomalá rychlost infekce (Hurpin & Robert, 1968). Většina publikovaných prací se soustředila pouze na popis infekce virem, někteří autoři se zaměřili na infekční proces ( $LD_{50}$ ,  $LT_{50}$ , atd.), ale od původních popisů a nových nálezů dříve popsaných virů (MMEV z Turecka - viz tab. 1.) se nepodařilo popsat nové EV z rodu *Alphaentomopoxvirus* (Goodwin & Roberts, 1975; Hurpin & Robert, 1972; Milner & Lutton, 1975; Robert, 1968). Málo poznatků je o morfogenezi virů uvnitř hostitele, nebo o infekčním procesu, zejména ale chybí detailní informace o molekulárních a genetických charakteristikách EV infikujících brouky. Příčinou může být zejména to, že se nepodařilo ani jeden izolovaný EV z brouků přenést a namnožit v tkáňové kultuře. Není ani dosud známo, zda se dá nějaký dříve popsaný EV z brouků přenášet a pasážovat na svém hostiteli v laboratorních podmínkách, přesto, že některé pokusy s laboratorními infekcemi proběhly (Goodwin & Roberts, 1975). Jedinou výjimkou je ITEV, který se daří v laboratorních podmínkách pasážovat již několik let (Tonka & Weiser, 2009).

Problémem popisu infekcí entomopoxvirů u brouků je to, že většina larev, u kterých byla infekce EV popsána, žije skrytým způsobem života a vývoj např. chroustů není jednoduchý a získat proto dostatek materiálu k infekcím je složité. Dalším problémem je délka trvání infekce, kdy první příznaky u larev se objeví až po několika týdnech, na rozdíl u infekcí EV u motýlů nebo sarančat, kde infekce probíhá rychleji (Sutter, 1972; Woods et al., 1992). Nemalou komplikací je skrytá forma infekce - virem infikovaná housenka je snadno rozeznatelná, ale infikovaný dospělec brouka není na první pohled rozeznatelný od zdravých brouků, a pokud není uhynulý a nezaměříme se přímo na pitvu mrtvých brouků, tak většinou infekci u dospělých brouků nezachytíme. Pokud infekce trvá přes larvální stádia, kuklu až do imága,



kde se projevuje buď indiferentně, nebo pomalu, nebo je přítomna pouze v latentní formě, tak se infekce EV nemusí vůbec projevit.

ITEV byl popsán v Rakousku a zároveň byl revidován starý materiál infekcí I. smrkového z ČR (Wegensteiner & Weiser, 1995; Weiser & Wegensteiner, 1994). Vyskytoval se výhradně u dospělých brouků *I. typographus*, nebyl nalezen ani u larev, ani u kukel, ani u jiných druhů z podčeledi *Scolytinae*. V Rakousku byl ale zaznamenán výskyt sféroidů ITEV i ve střevě *I. amitinus* (Händel et al., 2003). ITEV napadá výhradně střevní epitel, v jiné tkáni nebyl lokalizován. Vřetena jsou typu mikrovřeten (microspindles), okludována uvnitř sféroиду. V následujících letech po detailnějším popisu byl ITEV identifikován při výzkumu lýkožroutů v různých částech Evropy, ale např. i v Gruzii nebo Turecku (Burjanadze & Goginashvili, 2009; Takov & Pilarska, 2009; Takov et al., 2010; Takov et al., 2011; Yaman & Radek, 2012).

Nakažení brouci se viditelně od nenakažených neliší. Infekce se dá rozpoznat až po pitvě dospělého brouka. Popis ITEV byl publikován v roce 1995, kdy byl virus nalezen u 7 brouků na dvou místech v Dolním Rakousku, a na základě materiálu z těchto dvou lokalit byl ITEV popsán (Wegensteiner & Weiser, 1995). Další popis byl v souvislosti s rakouským materiálem publikován paradoxně o rok dříve, kdy se opět, v souvislosti s nálezem viru v Rakousku, zkoumal starý materiál z oblasti přemnožení I. smrkového v jihozápadních Čechách na začátku 50. let minulého století, a i zde byl identifikován ITEV (Weiser & Wegensteiner, 1994).

Přenos viru mezi brouky v populaci probíhá mezi jedinci v chodbách pod kůrou napadených stromů během úživného žíru nebo během páření (Weiser & Wegensteiner, 1994). Sféroidy viru opouští hostitele s výkaly, popř. jsou ve zbytcích kadeverů v larválních chodbách (Wegensteiner & Weiser, 1995; Wegensteiner & Weiser, 2004; Weiser et al., 2000). ITEV nepůsobí viditelnou infekci ani nápadnou mortalitu jednotlivých lýkožroutů před migrací brouka na další hostitelské stromy, ale jeho vliv možná ovlivňuje délku života, pohyblivost apod. (Weiser & Wegensteiner, 1994). Při

popisu byla snaha zařadit ITEV do podskupiny entomopoxvirů z brouků, protože se od zástupců rodu *Alphaentomopoxvirus* odlišoval tvarem sféroidů, lokalizací v hostiteli a tvorbou mikrovřeten, nicméně tato snaha nebyla přijata (Weiser & Wegensteiner, 1994; Žižka et al., 2001).

Infekce virem ITEV uvnitř střeva I. smrkového postupuje směrem od přední části střeva do zadní části, kde jsou na konci infekce sféroidy ve stěně střevního epitelu (Wegensteiner & Weiser, 1995). Zatímco sféroidy ITEV jsou v případě popisu rakouského a českého izolátu viru tvarově podobné, většinou čtvercovité, polokulovité, polštářkovité nebo oválné, jejich velikost se liší. V případě ITEV z Dolního Rakouska byly sféroidy různé velikosti, od 4 - 5  $\mu\text{m}$  do 10 - 12  $\mu\text{m}$ , v případě viru ze starého materiálu z jihozápadních Čech byly kulovité sféroidy velké 2 - 8  $\mu\text{m}$  v průměru, polštářkovité inkluze měřily v průměru 1.5 - 4 x 3 - 7  $\mu\text{m}$  (Wegensteiner & Weiser, 1995; Weiser & Wegensteiner, 1994). Naproti tomu velikosti vironů se u obou izolátů ITEV nelišily, měřily od 150 - 250 x 300 - 350 nm.

V České republice byl ITEV identifikován mikroskopicky pouze u I. smrkového na Šumavě a v Krkonoších (osobní sdělení dr. Weisera). Na žádné jiné lokalitě nebyl ITEV zachycen. Jak bylo uvedeno výše, výskyt ITEV a dalších patogenů byl podrobněji monitorován během kůrovcové kalamity v Šumavském národním parku (Weiser et al., 1999; Weiser et al., 2000). V souvislosti s potenciálním použitím ITEV v biologické ochraně smrčín byly učiněny některé praktické aplikace viru, ale s nejasnými výsledky (Holuša et al., 2004; Pultar & Weiser, 1999). Ve druhém případě bylo dosaženo přibližně o 20% vyšší nákazy virem u brouků nalétaných na poleno ošetřené entomopoxvirem ve srovnání s kontrolním polenem. Ale infekce, způsobující mortalitu, byla v laboratorních pokusech dokázána (Tonka & Weiser, 2009).

## 2. 5. Mikrosporidie

Mikrosporidie, se vyskytují u všech skupin organismů. Můžeme je charakterizovat jako:

- organizmy, vyskytující se téměř u všech živočišných skupin od prvoků až po člověka;
- jednobuněčné obligátní intracelulární parazity všech tkání živočichů;
- parazity s jediným extracelulárním stádiem, kterým je rezistentní jednobuněčná spora se speciálními organelami, sloužícími k přenosu parazita do buněk hostitele, které jsou charakteristické pro mikrosporidie.

Výzkum mikrosporidií začíná před přibližně 150 lety, kdy při výzkumu parazitů bource morušového byla popsána mikrosporidie *Nosema bombycis* (Nägeli, 1857). Od tohoto objevu se mikrosporidie staly objektem zájmu mnoha vědců, včetně českých, kteří přispěli ke znalostem mikrosporidií mnoha popisy rodů a druhů těchto prvoků.

Během několika let od popisu první mikrosporidie byly publikovány popisy několika dalších mikrosporidií napadajících různé bezobratlé živočichy, a proto byly v letech 1885 a 1899 publikovány první taxonomické práce, pokoušející se systematicky zařadit nové druhy mikrosporidií (Balbiani, 1882; Labbé, 1899). První ucelenou publikací o životních cyklech mikrosporidií byla monografie, která se zabývala i systematickou těchto parazitů (Kudo, 1924). V současnosti existují tři velké monografie, podávající detailní přehled poznatků o mikrosporidiích (Bulla jr. & Cheng, 1976; Canning & Lom, 1986; Wittner & Weiss, 1999).

V současné době jsou mikrosporidie studovány především v souvislosti s výskytem těchto organismů u HIV pozitivních pacientů, ze kterých bylo izolováno několik druhů mikrosporidií. Většina mikrosporidií, izolovaných z člověka je udržována v

tkáňových kulturách, a tím je k dispozici materiál, který je dostupný pro všechny požadované výzkumy, a jehož množství a kvalita se nedá srovnávat s přírodními nákazami u bezobratlých živočichů. Ukazuje se, že i mimo případy snížené imunity se řada mikrosporidií vyskytuje krátkodobě v tkáních člověka a jiných teplokrevných obratlovců, a že nákaza u těchto hostitelů probíhá bez příznaků. Z tohoto hlediska je získávání poznatků o vývoji a strukturách mikrosporidií důležité pro srovnávací výzkum nálezů pro člověka významných. V přírodě mikrosporidie jednak napadají ekonomicky významné populace hospodářsky chovaného hmyzu (včely, bourci), jednak ovlivňují hustoty populací ekonomicky významných škůdců (např. mandelinky) a významným je výzkum mikrosporidií i u zdravotnický důležitých členovců, kde poznatky o životních cyklech mikrosporidií lze využívat v biologickém boji s těmito živočichy.

Významný je přínos české vědy pro výzkum mikrosporidií. Na přelomu dvacátých a třicátých let se studiem mikrosporidií zabývali např. V. Janda nebo A. Mrázek, na které navázal svými výzkumy O. Jírovec. V poválečných letech se mikrosporidii zabývali především dr. J. Weiser a prof. J. Vávra, kteří přispěli svými výzkumy k tomu, že z území bývalého Československa bylo popsáno mnoho nových druhů mikrosporidií.

Mikrosporidie, jako jediná eukaryota mají ribozómy prokaryontního typu (Cury et al., 1980; Vávra, 1986), což svědčí o starobylosti těchto organismů. V posledních letech však některé molekulárně biologické výzkumy zařazení mikrosporidií upřesňují a jak se ukazuje, poznatky z posledních let dokládají úzkou příbuznost mikrosporidií k říši hub, jak bylo doloženo studiem tubulinových genů (Edlind et al., 1996) a studiem HSP (heat shock proteins), které jsou příbuzné mitochondriálním HSP kvasinek (Germot et al., 1997). Fylogenetické studie ribozomálních RNA ukazují, že mikrosporidie jsou velmi starobylou skupinou, která se velmi brzy v evoluci oddělila od ostatních eukaryot (Vossbrinck et al., 1987; Weiss et al., 1994). Studie aminokyselinových sekvencí translačních elongačních faktorů (EF - 1 $\alpha$ ) dokonce

ukazují, že mikrosporidie jsou první skupinou organismů oddělených během evoluce od ostatních eukaryot (Hasegawa & Hashimoto, 1999; Hashimoto et al., 1997).

Doposud bylo popsáno přes 1300 druhů mikrosporidií. Zařazení mikrosporidií do systému prodělalo během několika uplynulých let zásadní změny. V posledních taxonomických přehledech jsou mikrosporidie řazeny do říše hub (Fungi) na základě analýzy tubulinových genů (Corradi & Keeling, 2009), nicméně přesné zařazení mikrosporidií do systému ještě není stále dokončeno, někde jsou mikrosporidie zařazeny jako samostatný kmen do podříše Eomycota (Cavalier-Smith, 2001). V této souvislosti je zajímavé, že první popsaná mikrosporidie *N. bombycis* byla před 150 lety popsána jako kvasinková houba, což je z dnešního hlediska velmi blízko zařazení mikrosporidií na základě molekulárně biologických analýz.

Stejně, jako v případě ITEV, podrobný popis a charakteristika mikrosporidií přesahuje rámec této práce. V posledních letech vyšlo několik monografií o mikrosporidiích, kde je možné najít jejich podrobnější charakteristiku, jejich ultrastruktury, vývoj apod. (Bulla jr. & Cheng, 1976; Canning & Lom, 1986; Solter et al., 2012; Tanada & Kaya, 1993; Vávra, 1986; Wittner & Weiss, 1999). Nadále se práce zabývá pouze objektem zájmu této dizertace, mikrosporidií *C. typographi*, případné podrobnosti, týkající se některých funkcí, struktur a cyklů mikrosporidií budou zmíněny v diskuzi.

**Tab. 2.** Mikrosporidie z kůrovcovitých brouků

Druh	Hostitel	Host. tkáň	Zdroj
<i>Chytridiopsis typographi</i>	<i>Ips typographus</i> , <i>Dendroctonus pseudotsugae</i> , <i>Hylastes cunicularius</i> , <i>Ips laricis</i> , <i>Hylurgops glabratus</i> , <i>Pityophthorus pityographus</i> , <i>Pityogenes chalcographus</i> , <i>Ips amitinus</i>	M	Haidler, 1998; Händel, 2001; Purrini & Weiser, 1984; Purrini & Weiser, 1985; Wegensteiner, 1994; Wegensteiner & Weiser, 1996; Weiser, 1954; Weiser, 1955; Weiser, 1970
<i>Nosema typographi</i>	<i>I. typographus</i> , <i>Hylurgops palliatus</i>	FB	Purrini, 1978; Weiser, 1955; Weiser et al., 1997
<i>Unikaryon montanum</i>	<i>I. typographus</i>	FB, MT, O	Weiser et al., 1998
<i>Nosema dendroctoni</i>	<i>D. pseudotsugae</i>	FB, MT	Weiser, 1970
<i>Nosema curvidentis</i>	<i>Pityokteines curvidens</i> , <i>Scolytus scolytus</i>	FB	Weiser, 1961; Weiser, 1968
<i>Stempellia scolyti</i>	<i>S. scolytus</i> , <i>S. multistriatus</i> , <i>S. pygmacus</i> , <i>S. ensifer</i>	M	Purrini, 1975; Weiser, 1966
<i>Nosema scolyti</i>	<i>S. scolytus</i> , <i>S. multistriatus</i> , <i>S. pygmacus</i> , <i>S. ensifer</i>	M, MT	Lipa, 1968
<i>Plistophora scolyti</i>	<i>S. scolytus</i>	M	Weiser, 1968
<i>Unikaryon minutum</i>	<i>Dendroctonus frontalis</i>	M	Bridges, 1987; Knell & Allen, 1978
<i>Pleistophora xyloteri</i>	<i>Trypodendron domesticum</i>	M	Purrini & Ormieres, 1981
<i>Nosema dryocoetesi</i>	<i>Dryocoetes autographus</i>	FB	Purrini & Ormieres, 1981
<i>Nosema calcarati</i>	<i>Pityogenes calcaratus</i>	G	Purrini & Halperin, 1982
<i>Canningia spinidentis</i>	<i>Pityokteines spinidens</i>	FB, MT, M	Weiser et al., 1995
<i>Canningia tomici</i>	<i>Tomicus piniperda</i>	M, FB, G	Kohlmayr et al., 2003
<i>Unikaryon polygraphi</i>	<i>Polygraphus poligraphus</i>	M, MT	Weiser et al., 2002
<i>Larssoniella duplicati</i>	<i>Ips duplicatus</i>	M, MT	Holuša et al., 2006

FB ... tukové těleso

G ... gonády

O ... ovária

MT ... Malpighické žlázy

M ... střevo

## 2. 6. *Chytridiopsis typographi*

U kůrovcovitých brouků bylo popsáno několik mikrosporidií, viz tab. 2. Kromě druhů uvedených v této tabulce, bylo popsáno ještě několik mikrosporidií, které byly zařazeny pouze do rodu, např. *Microsporidium*, *Nosema* a *Unikaryon* sp. (Haidler, 1998; Händel, 2001). Mikrosporidie, infikující kůrovcovité brouky jsou vývojově a taxonomicky velmi různorodou skupinou, ale u l. smrkového byly popsány pouze tři druhy mikrosporidií, a to *Nosema typographi*, *Unikaryon montanum* a *C. typographi* (Purrini & Weiser, 1984; Weiser, 1955; Weiser et al., 1997; Weiser et al., 1998).

Z tabulky (viz str. 28) plyne, že mikrosporidie *C. typographi* je nejhojnějším zástupcem mikrosporidií u těchto brouků, a proto se práce týká pouze této mikrosporidie. V posledním systematickém přehledu je *Ch. typographi* zařazena do samostané čeledi *Chytridiopsidae* (Vossbrinck & Debrunner-Vossbrinck, 2005). Do současné doby byly, kromě *C. typographi*, popsány ještě dva druhy r. *Chytridiopsis* infikující hmyz, a to *Ch. socius* z potemníkovitého brouka *Blaps lethifera* Marsh. 1802 (Coleoptera: Tenebrionidae) (Manier & Ormières, 1968) a *Ch. trichopterae* z larev chrostíka *Polycentropus flavomaculatus* Pictet, 1834 (Trichoptera: Polycentropodiidae) (Larsson, 1993).

Mikrosporidie *C. typographi* byla původně popsána jako *Haplosporidium typographi* u l. smrkového (Weiser, 1954; Weiser, 1955) a z amerického lýkohuba *Dendroctones pseudotsugae* Hopkins (Weiser, 1970). Ultrastruktury vývojových stádií tohoto druhu mikrosporidie byly prvně identifikovány u lýkohuba drvaře, *Hylastes cunicularius* Erichs (Purrini & Weiser, 1984). Další popis ultrastruktury a částečného vývojového cyklu následoval už z materiálu, zachyceného u l. smrkového (Purrini & Weiser, 1985). Z vyšetření nemocí kůrovců se zdá, že se vyskytuje ve stejném areálu rozšíření, jako kůrovcovití brouci. Do současné doby byla identifikována v ČR, Rakousku, Německu, Gruzii, Bulharsku, Litvě apod. (Burjanadze & Goginashvili,

2009; Takov & Pilarska, 2009; Takov et al., 2010; Takov et al., 2011; Wegensteiner & Weiser, 1996; Wegensteiner & Weiser, 2004; Wegensteiner et al., 1996). Mikrosporidie infikuje nejenom l. smrkového, ale širší spektrum kůrovcovitých brouků, např. *I. duplicatus*, *I. acuminatus*, *I. cembrae*, *Orthotomicus proximus* a *Cryphalus saltuarius* (viz tab. 2.) (Haidler, 1998; Händel, 2001; Holuša et al., 2007; Holuša et al., 2009; Holuša et al., 2013; Lukášová et al., 2013; Takov et al., 2007; Zitterer, 2002). Všechny uvedené práce se ale zabývají pouze mapováním entomopatogenní fauny těchto brouků a zachycují *C. typographi* v různém stupni prevalence. Ta je samozřejmě velmi variabilní, nejenom u mikrosporidií, a kromě variability v populacích je vysoká i sezónní variabilita této mikrosporidie (Wegensteiner & Weiser, 1996; Wegensteiner & Weiser, 2004).

Mikrosporidie *C. typographi* parazituje ve střevě hostitele, a to pouze u dospělých brouků. Jediný popis této mikrosporidie, infikující larvy, pochází z larev *D. pseudotsugae* (Weiser, 1970). Nicméně následující pozorování toto nepotvrdila a všechny záznamy o infekcích mikrosporidií *C. typographi* pocházejí z dospělých brouků.

Infekce mikrosporidií, stejně jako ostatními patogeny, není na první pohled na dospělých lýkožroutů patrná. Jediným příznakem rozvinuté infekce je menší aktivita ve srovnání s nenakaženými jedinci a nepřijímání potravy nakaženými brouky (Purrini & Weiser, 1984). Viditelná infekce se projeví až po vypitvání nakažených jedinců, kdy jsou ve střevě v mikroskopu vidět světlolomné tlustostěnné cysty - sporoforní měchýřky s několika spórami, jejichž počet je velmi variabilní, kolísá od 4 do 30. Při silné infekci dochází k destrukci střeva s následnou septikémií, které nemůže plnit svou funkci, pokud je celé vyplněno měchýřkami a spórami. Přenos mikrosporidie se děje výkaly, kdy s trusem odcházejí ze střeva cysty (sporoforní měchýřky), které jsou velmi odolné ve vnějším prostředí a tlustá stěna měchýřku dokonale chrání spory uvnitř před vysušením, popř. UV zářením.



---

Mikrosporidie *Ch. typographi* je charakteristická dvěma typy sporogonie a tvorbou dvou druhů spor. Jeden typ spor, tzv. tenkostěnné spory, slouží k rozvoji nákazy uvnitř hostitele, tak jak je to obvyklé u některých mikrosporidií (Hyliš, 1999; Iwano & Ishihara, 1991; Maddox et al., 1999). Druhý typ spor, spory s tlustou endosporou, slouží k přenosu mezi hostiteli. U *Ch. typographi* jsou tyto tlustostěnné spory ještě uzavřeny ve sporoforním měchýřku - cystě, která je, jak bylo uvedeno výše, chrání ve vnějším prostředí.

### 3. Cíle práce

Cíle práce vycházely z hypotézy, že patogenní organizmy ovlivňují fyziologický stav hostitele, mají vliv na životní pochody infikovaných jedinců a následně ovlivňují disperzi hostitelů na další hostitelské stromy a za určitých podmínek mohou způsobit smrt hostitele.

Prvním cílem práce bylo zajistit kontinuální množení patogenních agens, v našem případě ITEV a mikrosporidie *Chytridiopsis typographi*, v laboratorních podmínkách jako zdroj materiálu pro další výzkumy a hodnocení vývoje a morfogeneze těchto patogenů.

Druhým cílem bylo zjistit podrobnosti o vývoji viru v hostitelském organismu. Jak se vyvíjí ve střevě hostitele, jak dochází k přenosu a vliv viru na hostitele. Jak probíhá morfogeneze viru uvnitř hostitelské tkáně, jaké jsou odchylky od příbuzných organismů a celkový vývoj viru v infikované buňce střevního epitelu a tím doplnit pouze kusé informace z prvních a zároveň posledních detailnějších popisů, které byly publikovány v 90. letech minulého století.

Třetím cílem bylo objasnit vztahy mezi ITEV a dalšími zástupci rodu *Alphaentomopoxvirus*, kteří infikují larvy řádu Coleoptera, popř. srovnat odchylky od vývoje v celé čeledi *Poxviridae*.

Čtvrtým cílem bylo podrobnější zkoumání vývoje mikrosporidie *C. typographi*, která se od jiných mikrosporidií liší ve svém životním cyklu, popsání nových stádií ve vývoji a doplnění morfogeneze a ultrastruktury některých, již dříve popsaných stádií ve vývoji této mikrosporidie a, stejně jako v případě ITEV, doplnit kusé informace o ultrastruktuře a vývoji v původním popisu této mikrosporidie.

---

Cílem, který vyplynul ze studia patogenních mikroorganismů u lýkožroutů, bylo vyhledání a identifikace nových, doposud neznámých patogenních agens, vyskytujících se v populacích lýkožrouta smrkového.

## 4. Materiál a metodika

Použité metodiky jsou standardní metodiky, které se používají při studiu ultrastruktur a životních cyklů mikroorganismů. Metodické postupy byly v zásadě stejné pro oba studované mikroorganismy, jak infekce dospělců I. smrkového, pitva nakažených brouků i následné zpracování infikované tkáně.

### 4. 1. Vyšetření hostitelských organizmů

Přesto, že prvotním záměrem práce byl podrobnější výzkum ITEV a mikrosporidie *Chytridiopsis typographi* a jejich vliv na I. smrkového, ve vyšetřovaném materiálu byly zachyceny i jiné patogenní organizmy, infikující kůrovce, především některé další mikrosporidie, gregariny a nematodi

K identifikaci patogenů v napadených hostitelích byly použity postupy, které jsou výsledkem rutinně popisovaných metodik při identifikaci těchto organizmů (Vávra, 1976; Lacey, 1997). Především při prvotním vyšetření napadených hostitelů jsou ale používané postupy výsledkem dlouholetých zkušeností při identifikaci patogenů. Na rozdíl např. od housenek motýlů nebo larev vodních bezobratlých se patogeny napadení brouci většinou neliší od neinfikovaných hostitelů, i když např. u brouků infikovaných nematody byla pozorována horší pohyblivost nakažených jedinců. Ve většině případů se infekce pozná až po pitvě jednotlivých brouků a nákaza se identifikuje až pod mikroskopem.

Následující postup byl použit při vyšetření dospělých brouků. Na podložní sklíčko do kapky fyziologického BIS roztoku (Lacey, 1997) byl položen vyšetřovaný brouk. Hlava byla oddělena skalpelem od zbytku těla a za poslední zadečkový článek bylo celé střevo vytaženo z tělní dutiny brouka (Wegensteiner & Weiser, 1996). Střevo bylo odděleno od posledního zadečkového článku a přikryto opatrně krycím

sklíčkem tak, aby se střevo co nejméně porušilo. V prvním pozorování bylo zjišťováno, zda jsou ve střevě brouka známky patogenní infekce. Po identifikaci patogenů ve střevě bylo sejmuto krycí sklíčko preparační jehlou, a napadené střevo rozděleno na několik částí, které se dále zpracovávaly.

Pokud nebyla nákaza lokalizována ve střevě, a v okolí střeva se pod sklíčkem vyskytovali známky patogenů, hledal se napadený orgán - prohlížely se podrobněji Malpighické trubice a hemolymfa. Tímto postupem se jednoduše určila lokalizaci nákazy v hostiteli.

#### **4. 2. Barvení**

Na obarvených roztěrech podle Giemsy - Romanovského se sledovala variabilita granulí viru, jejich celkové rozložení ve tkáni (jednotlivé granule), morfologii, resp tvar a velikost okluzních tělísek. V případě mikrosporidií se metodou Giemsa - Romanovski barvené roztěry používaly k identifikaci vývojových stádií.

Základní barvicí technikou pro světelný mikroskop, která byla použita, bylo barvení Giemsou - Romanovskim. Část napadeného střeva se roztáhla jehlou na podložním sklíčku tak, aby roztěr byl na jednom místě hustší. Tento postup se osvědčil při pozorování rozložení okluzí viru a vývojových stádií mikrosporidie v napadené tkáni. Roztěr se nechal zaschnout a po 5 min. fixace metanolem a po opětovném usušení se roztěr barvil roztokem Giemsa - Romanovski (1 : 20) 20 min. Po opláchnutí vodou a usušení se preparát prohlížel ve světelném mikroskopu. Pro zhotovení trvalých preparátů se roztěr montoval do zalévacího média (Histoclad, Clay Adams, USA). V některých případech se pro zhotovení roztěru používalo i sklíčko, na kterém byl brouk pitván.

### 4. 3. Měření granulí a spor

Vzhledem k velikostem granulí není nezbytně nutné potlačit pohyb materiálu v nativních preparátech, ale pro přesné měření granulí viru a spor mikrosporidií byla použita metoda, vyvinutá k přesnému měření spor mikrosporidií (Vávra, 1976). Na podložní sklíčko se nalil 2%ní roztok agaru a ihned se agar roztáhl po povrchu sklíčka. Po zatuhnutí tak vznikla tenká vrstva, na kterou se přiloží krycí sklíčko se suspenzí viru. Výhoda této metody spočívá v tom, že okluze leží ve vrstvě agaru, nepohybují se a hustota okluzí dává prostor pro co nejpřesnější měření jejich velikosti. Pro měření se používal okulár s měřítkem, kalibrovaným pro různé velikosti objektivů a přepočítávala se výsledná naměřená hodnota.

### 4. 4. Elektronový mikroskop

V transmisním elektronovém mikroskopu (dále jen TEM) se pozorovaly především ultrastruktury jednotlivých stádií vývojových cyklů, které slouží jednak k poznání struktur jednotlivých stádií parazitů, jednak poskytují údaje, na jejichž základě jsou odvozeny životní cykly. Pitva a fixace infikovaného materiálu byla připravována samostatně, vzorky pro TEM připravovali pracovníci LEM PARÚ, stejně jako vzorky pro pozorování v SEM.

Následující postupy jsou pro oba mikroskopy stejné. Část infikované tkáně se po rozdělení materiálu fixovala přes noc při 4° C v 2.5% glutaraldehydu. Po promytí v 0.1M PBS pufru (se 4% glukózou) se vzorky postfixovaly v pufrovaném 2%ním OsO<sub>4</sub> dvě hodiny, opět při 4° C. Po dalším promytí se vzorky převedly v zestupnou acetonovou řadou do pryskyřice (EPON). Po zalití se zhotovily polotenské řezy, které se barvily toluidinovou modří, ultratenké řezy se kontrastovaly citrátem

olova a octanem uranylu. Ultratenké řezy se prohlížely na mikroskopu JEOL JEM-1010 při urychlovacím napětí 80 kV.

Vzorky na SEM se fixují, promývají a dehydrují stejně, jako vzorky pro TEM. Ze 100% acetonu se vzorky suší metodou kritického bodu pomocí CO<sub>2</sub>. Po vysušení se vzorky lepí na kovové terčičky a pokrývají se zlatem (pozlacují se). Vzorky se prohlížely na skenovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-7401F.

Při studiu patogenů se používal 2.5%ní glutaraldehyd (v 0.1M kakodylátovém pufru), který je dostačující pro ITEV. V případě fixace mikrosporidií je nutné fixáž a přípravu vzorku lehce modifikovat. Mikrosporidii nakažená střeva se fixovala buď v 2.5% glutaraldehydu v 0.1M pufru s 1% sacharózou pro zvýšení osmolarity fixačního roztoku. Druhý postup fixace byl složitější. Infikovaná tkáň se fixovala ve směsi 1% glutaraldehyd a 1% kyselina osmičelá v 1M kakodylátovém pufru s 2% sacharózou na ledu po dobu 1 - 1.5 hodiny, následně se promyla puftrem 2 x 10 min, a přes vzestupnou etanolovou řadu (25, 50, 70, 70 s uranylacetátem 80, 96 a 100%) a bezvodý aceton se zalila do pryskyřice. V každé koncentraci se tkáň promývala 2 x 10 minut, pouze v 70% etanolu s uranylacetátem byl vzorek přes noc.

#### **4. 5. Virus**

Virus byl získán z míst přirozeného výskytu v populaci I. smrkového. Mrtví infikovaní brouci byli odebráni v místě ohniska infekce ITEV na kůrovcovou kalami-tou zasažené Šumavě. Lýkožrouti, infikovaní virem se sbírali v místech s vysokým procentem nakažení, tak jak byli lýkožrouti během předešlých výzkumů vyšetřováni (Pultar & Weiser, 1999; Weiser et al., 2000). Brouci byli primárně získáváni z feromonových lapačů, v menší míře z napadených stromových lapáků. Po převezení do laboratoře byli celí brouci, živí i mrtví, zamrazeni do doby použití.

Při studiu nákazy v hostiteli se používal virus, který byl identifikován jako *Ips typographus Entomopoxvirus* (ITEV), nalezený na Šumavě v infikovaných broucích v červenci 2001 na lokalitě Černá hora - Pramen Vltavy (v laboratoři od roku 2006) během sběrů brouků pro rutinní kontroly rozšíření patogenů v populacích kůrovců v NP Šumava. ITEV, který byl použit pro infekční pokusy a ke studiu morfogeneze a vývojového cyklu, je identifikovaný jako kmen Biola2001.

Virem nakažení rozmrazení brouci se vyndali z mrazícího boxu a nechali rozmraznout. Celí brouci byli zhomogenizováni v BIS ve sklěněném homogenizátoru a homogenát přefiltrován přes jemné síto, kde se oddělily zbytky brouků od supernatantu s okluzemi ITEV. Supernatant se promyl opakovanou centrifugací (2000 ot. 5 minut) v BIS a výsledná suspenze okluzních tělísek ITEV byla resuspendována v čistém BIS a uchovávána při  $-18^{\circ}\text{C}$  do doby použití.

Pro biologické experimenty se purifikovaná suspenze viru naředila na výslednou koncentraci  $10^4$  IB/ml BIS počítáním okluzních tělísek viru v Bürkerově komůrce. Do takto připravené suspenze se namáčely kousky kůry (Lacey, 1997) o velikosti 0.5 x 0.5 cm, které se podávaly broukům. Brouci byli chováni ve skleněných epruvetách po 10, kontrolním broukům se podával kousek kůry namáčené pouze v BIS. Brouci byli drženi při teplotě  $25^{\circ}\text{C}$  při světelném režimu 16:8h. Kousky kůry byly broukům poskytovány každé dva dny *ad libitum*.

Infikovaní brouci byli pitváni 5., 10., 15., 20., 25. a 30. den. Pitvali se i všichni brouci, uhynulí během pokusu, stejně jako uhynulí brouci v kontrole, aby se vyloučila možnost infekce kontrolních brouků virem. Pitva infikovaných brouků probíhala výše uvedeným způsobem. Infikovaná střeva se fixovala pro potřeby morfologických a vývojových studií, nebo se střeva použila jako zásobárna viru pro další infekční pokusy. Virem infikovaná střeva, vypitvaná z nakažených brouků, se uchovávala v mikrocentrifugační zkumavce (Eppendorf) v roztoku BIS při  $-18^{\circ}\text{C}$  až do doby dalšího použití. Virus je udržován na lýkožroutech v laboratoři od roku 2006 a do



současné doby je infekční bez jakýchkoliv problémů, souvisejících s dlouhou dobou skladování.

#### 4. 6. Hostitel

Všechny pokusy s virovou infekcí probíhaly na dospělých broucích *Ips typographus*. Brouci byli použiti ve stádiu žlutých, hnědých i černých brouků, sbíraných na místech, kde nebyl zaznamenán výskyt entomopoxviru. Žlutí brouci byli sbíráni hned po vylíhnutí z kukel z pod kůry napadených stromů, stejně jako hnědí a černí brouci. Černí brouci byli navíc vybíráni z feromonových lapačů, které byly umístěné v lese. Brouci, sbíraní v době letu a rojení, byli použiti ihned na pokusy. Žlutí brouci, sbíraní na podzim, byli vybráni z pod kůry a s hrabankou a šupinami kůry dáni do chladničky, odkud byli vybíráni k infekčním pokusům.

#### 4. 7. Mikrosporidie

Morfologii a vývoj se také sledoval u laboratorně přenosné mikrosporidie *C. typographi*. Infekční materiál byl získán z přírodně nakažených brouků. Postup získání čistého materiálu byl stejný jako v případě purifikovaného vzorku viru. Materiál pro infekční pokusy se ředil na výslednou koncentraci  $10^3$  cyst/ml roztoku BIS. Kousky kůry o velikosti 0.5 x 0.5 cm se ponořovaly do suspenze cyst a dávaly broukům. Infekční pokusy probíhaly stejně, jako pokusy s virem. Pitvy, fixace, zpracování infekčních střev a uchovávání probíhalo stejným způsobem jako v případě infekce ITEV. Brouci byli krmeni a uchovávaní během pokusu za stejných podmínek, jako v případě viru.

Během studia se podařilo zachytit dvě nové mikrosporidie, které infikovaly střevo lýkožroutů. Jedna mikrosporidie byla zachycena u lýkožroutů z okolí Rychnova nad

---

Maší, druhá z oblasti Velkého Boru u Netolic. Tyto mikrosporidie nebyli k infekčním pokusům použity, pouze se infekční materiál zpracoval rutinními postupy, uvedenými výše, pro potřeby světelného a elektronového mikroskopu.

## 5. Výsledky

Součástí výsledků je obrazová příloha, která se nachází na konci práce v kap. 8. Výsledky jsou členěny do logických a souvisejících bloků, které postupně popisují pozorování, která byla učiněna při studiu ITEV během laboratorních infekcí I. smrkového a vývojového cyklu a ultrastruktur mikrosporidie *Ch. typographyi*.

### 5.1. Vývoj a morfogeneze *Ips typographyus* EV

Entomopoxvirus z I. smrkového byl obecně popsán Wegensteinerem a Weiserem (1995), kdy bylo zjištěno, že popsáný virus sice patří do skupiny poxvirů, ale v některých případech se liší od typového materiálu entomopoxviru z larev chroustů. Protože se ITEV vyvíjí pouze ve střevě po pozření infekčních sféroidů, detailní popis viru závisí na získání materiálu ze živých infikovaných brouků.

Schématický vývoj ITEV je vyobrazen na obr. 1. Infekce začíná po pozření sféroidů s infekčními viriony (obr. 2.), které se rozpouštějí v alkalickém prostředí střeva a uvolněné virové částice vstupují do epitelu přední části střeva hostitele. Infikované epiteliální buňky (obr. 3) se objevují ve skupinách v předním střevě, tvoří se v nich nové sféroidy a poničené střevní buňky uvolňují okluze do střevní dutiny a společně s trusem a obsahem střeva odcházejí okluze ven z těla hostitele (obr. 27, 28). S následující regenerací buněk se hustota infekce mění. Okluzní tělíska z mrtvých buněk jsou uvolňována a zůstávají v prostoru mezi epitelem a peritrofickou membránou vrchní části střeva. S peristaltickými pohyby střeva a pasáží potravy jsou okluzní tělíska posunována střevem dolů. Přesto, že jsou virové částice okludovány ve sféroidu, některé viriony vyčnívají z okluze a během pohybu střevního obsahu dolů střevem jsou virové částice uvolňovány a jsou tlačeny k povrchu epiteliálních buněk.

Ne každá buňka na cestě sféroиду mezi peritrofickou membránou a stěnou střeva je infikována (obr. 3, 4). Tato sporadická infekce epiteliálních buněk je dána faktem, že část virových částic, uvolňovaných ze sféroidu, nemusí být infekční. Pro úspěšnou infekci jsou kvalifikovány pouze virové částice, které vyčnívají ze sféroidu nebo, pokud je okluzní tělísko rozpuštěné, viriony skryté v hlubších částech uvnitř okluze.

Rozvoj infekce, postupující dolů střevem lýkožroutů, je ovlivňován zejména čerstvými viriony v nově formovaných sféroidech v tom samém hostiteli. Z polotenkých řezů je zřejmé, že rozvoj infekce dolů střevem v hostiteli je způsoben hlavně viriony vlastní populace a ne novými viriony pozřeny později. Na řezech střední části intestiny (obr. 2d, e) je viditelné, že jsou infikované buňky ve skupinách. Produkce sféroidů je v různém stádiu vývoje a z pozorování infikované tkáně nevyplývá, že existuje část střevního epitelu, kde je infekce koncentrována (obr. 3, 4).

Regenerační noduly střevního epitelu nejsou infikovány. Masivně napadená střeva v laboratorně infikovaných broucích se objevují v první půlce střeva, před delší coekou, okluzní tělíška jsou v centrální a distální části střeva v dlouhých a krátkých coekách.

Jak je vidět z řezů pro TEM, tvořící se okluzní tělíška jsou velmi specifického tvaru, který se liší od široce oválného sféroidu a včetně typového druhu MMEV, a od tvaru okluzních tělísek dalších členů podčeledi *Entomopoxvirinae*. Okluzní tělíška ITEV jsou dvou hlavních typů: plochý, polštářkovitý sféroid a polokulovitá ("čepicovitá") okluze (obr. 3, 4, 19). Podlouhlý, široký, čtyřúhelníkovitý, polštářkovitý sféroid měří v průměru 8 - 12 x 3 - 7 x 5  $\mu\text{m}$ , polokulovitý sféroid s jednou rovnu bází měří 8 - 10 x 3 - 5  $\mu\text{m}$ . Sféroidy - okluzní tělíška - ITEV se tvarově diferencují již při první syntéze sféroidinu v infikovaných buňkách (obr. 4, 8). Sféroidin, hlavní protein tvořící okluzní tělíška, produkuje okluze buď jednoho, nebo druhého tvaru do

jednotné velikosti. Sféroidy nemají žádnou povrchovou membránu nebo podobnou strukturu, jsou v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky (např. obr. 5, 13).

### 5. 1. 1. Lokalizace virové replikace

Na řezech z TEM byl sledován vývoj ITEV v mnoha epitelálních buňkách střeva v různé fázi vývoje. Virus se vyvíjí v cytoplazmě infikovaných buněk bez kontaktu s jádrem. Ale v některých buňkách není jádro vidět (obr. 3, 4, 8). Při malém zvětšení jsou ve střevním epitelu vidět buňky, které "ztratily" své jádro a pouze u některých buněk můžeme sledovat vliv viru na hostitelskou buňku (obr. 3, 16). V buňkách se zbytky jádra nejsou vidět znaky žádných reakcí infikovaných buněk na vývoj individuálních virionů. V některých případech je evidentní fragmentace jaderné membrány, která se rozpadá in situ do krátkých segmentů, které nerespektují jaderné póry, a časem mizí do formy nerovnoměrné řady elektron - denzních granulí a prázdných globulů. Jiným případem dezintegrace jaderné membrány je jádro s neporušnou membránou, které má ale vnější vrstvu membrány široce oddělenou od membrány vnitřní (obr. 6).

V některých buňkách je zřejmé, že prostor, kde se tvoří a postupně roste sféroid, je bývalá oblast jádra a že tedy může být vývoj viru lokalizován v místě jádra (obr. 8, 16). Pokud je jádro zachováno, koncentruje se uvnitř chromatin ve formě nepravidelných elektron - denzních vrstev (obr. 6, 10). Oblast reprodukce viru je pak v okolí jádra, kde jsou lokalizována centra vývoje viru (obr. 6).

V každém dokončeném sféroidu je obvykle 200 - 500 virových částic. Z toho plyne, že každý proces produkce virionu musí být opakován v každé buňce nejméně 200x. Počet jednotlivých individuálních stádií ve vývoji virových částic závisí na času vývoje jednotlivého stádia. Jedno stádium trvá krátkou dobu, vyskytuje se v buňce s menší četností, než stádium, kterého vývoj trvá během morfogeneze déle. Např.

viriony fagocytované hostitelskou membránou, nebo stádium rozbalování virionu byly ve zkoumaném materiálu vzácné.

Výzkum replikace viru by měl zahrnovat individuální fáze životního cyklu ITEV podle pozorování, která jsou častá a opakovaná a která je možné považovat za obvyklý krok životního cyklu viru. Prvním takovým krokem, který je výchozím stádiem životního cyklu ITEV, je struktura, která je zde popisována jako mezistádium.

### **5. 1. 2. Mezistádium**

V infikovaných buňkách lýkožrouta jsou tato stadia vývoje distribuována bez jakéhokoliv řádu (obr. 5, 7, 15). Přesto se ale zdá, že se jedná o začínající stádium cyklu vývoje ITEV. U vyšetřovaného materiálu je tato struktura přítomna a provizorně je pojmenována jako mezistádium (obr. 31) (viz kap. 5. 2.).

Jedná se o kulovité tělísko, přibližně 500 nm v průměru obalené jemnou měkkou membránou, 20 nm tlustou. Uvnitř tělíska je různý počet globulárních částic, 150 - 200 nm v průměru. Jejich počet kolísá od jedné globule, s postupujícím vývojem mezistádia dochází ke zvyšování počtu těchto globulů. Globuly mají tenkou membránu, uvnitř je elektron - denzní granulovaný materiál, identický s materiálem volných globulů, který byl pozorován v další fázi vývoje (viz další kapitoly) (např. obr. 5, 15). Celé mezistádium je vyplněno těmito globuly a zdá se, že po fragmentaci membrány mezistádia jsou uvolňovány do cytoplazmy hostitelské buňky (obr. 15).

### **5. 1. 3. Viroplazma - virogenní stróma**

Viroplazma (virogenní stróma -VS) je charakteristická pro BV a poxviry (jako viroplazma) a je charakterizována jako "cytoplazmatická oblast elektron - denzní amorfni hmoty popř. roztroušené shluky granulárního materiálu s kulovitými váčky" (Granados, 1973b). V pozorovaném materiálu ITEV ve střevním epitelu má VS formu

klastrů elektron - denzního materiálu, který se nachází v různých částech buňky, podle fáze vývoje viru (obr. 8, 10, 12, 16). V některých případech je možné VS najít v cytoplazmě infikované buňky, jinde je několik VS na různých koncích buňky, někde je VS v blízkosti tvořícího se sféroиду (obr. 10). VS, vyskytující se u ITEV, je evidentně odlišné od materiálu, tvořícího okluzní tělísko, a je analogické VS bakulovirů. Je tvořeno fibrilárním a granulárním materiálem, který se účastní tvorby virionů. Tento materiál tvoří centrální houbovitou masu různé velikosti. V některých případech je VS tvořeno z jemného vláknitého materiálu společně s drobnými elektron - denzními částicemi. Tyto částice jsou později inkorporovány do membrány budoucích virionů. Detaily struktury VS jsou dobře patrné na obr. 12.

#### **5. 1. 4. Replikace DNA**

V cytoplazmě hostitelské buňky se odděleně od VS vyskytovaly skupiny drobných elektron - denzních částic. Jsou uspořádané v nerovnoměrné mase a každá částice je později během dalšího vývoje uzavřena v membráně a tvoří globule (obr. 6, 7). Uvnitř globule je nerovnoměrně zrnitý elektron - denzní materiál, zřejmě DNA (obr. 7, 12). Tyto globule tvoří ohniska v cytoplazmě, kde dochází k replikaci DNA - tzv. replikační zóny (obr. 10, 16), tvořené větším množstvím těchto globulů, v některých případech jich může být až 500 a více. Tyto replikační zóny jsou v určitém stádiu vývoje ITEV ve všech buňkách. Prekurzorem těchto globulů jsou ploché membránové struktury bez adherovaných globulí. Počet globulů v replikačních zónách klesá s postupující tvorbou nezralých virionů (IV), které se objevují v cytoplazmě infikované buňky s postupující infekcí (obr. 11, 18).

#### **5. 1. 5. Srpkovitá membrána (crescent - shape)**

Mezi viriony v různém stupni maturace jsou v cytoplazmě srpkovité (měsíčkovitě) membrány s adherovaným elektron - denzním materiálem (obr. 6, 11, 17). Zdá

se, že je identický s hmotou, tvořící VS. Srpkovitá membrána je tvořena jemnou polokruhovitou vnější membránou, na kterou zevnitř nasedají jemná vlákna VS (obr. 12). Vnější membrána roste a srpkovitá membrána se zakulacuje, až vzniká kulovitá struktura s membránou po celém povrchu (obr. 12, 21). Vnitřní stěna je tvořena tlustou vrstvou materiálu VS s jemným povrchem. V tomto stádiu dochází k vyplňování srpkovité membrány globulárními strukturami, které se dostávají dovnitř neuzavřené části membrány (obr. 12, 17, 18). Po uzavření membrány vzniká kulovitý IV.

### **5. 1. 6. Tvorba virionu**

Během dalšího vývoje viru dochází k transformaci IV (obr. 11, 13, 17). Stěna IV se rozpouští do měkké vlnité membrány. V některých případech se stěna srpkovité membrány dělí do tří vrstev, s jednou dělicí mezivrstvou a jemným povrchem na vnější vrstvě (obr. 21). Uvnitř se začíná tvořit kulovitý prostor s jemným povrchem a denzním materiálem, který vzniká rozpadem globulárního materiálu (obr. 12, 21). Postupně se dokončuje vývoj kulovitého tělíška s tenkou vnější membránou a jemným granulárním materiálem uvnitř (obr. 12). Uprostřed se tvoří oválná, elektron - denzní struktura se ztlustlou membránou, budoucí nukleoid zralého viru (MV) (obr. 22).

### **5. 1. 7. Nukleoid a obal nukleoidu (core, core sac)**

Nově utvořený denzní nukleoid má oválný tvar, v průměru 450 - 500 x 300 - 350 nm, a je uzavřený ve vaku (core sac) s 20 - 30 nm tlustou stěnou, tvořenou jemným uniformním granulárním materiálem (obr. 12). Vak se na dlouhé ose svými konci dotýká membrány virionu. Nukleoid obsahuje elektron - denzní DNA, vzniklou kondenzací nerovnoměrných globulí, která později během zrání virionu tvoří jedno dlouhé vlákno DNA, které tvoří v prostoru uvnitř nukleoidu jedno dlouhé smotané vlákno DNA (obr. 22). Nukleoid se tvoří spojováním jednotlivých DNA fragmentů,



kteřé vznikají v jednotlivých individuálních globulárních obalech v cytoplazmě hostitelské buňky.

#### **5. 1. 8. Nezralý virion (IV)**

Vnější membrána IV je 20 - 30 nm tlustá a na jejím povrchu je tenká zvlněná vnější vrstva do 5 nm tlustá. Vnější obal je transformovaný materiál ze srpkovitých membrán. Vnější elektron - lucentní obal poskytuje ochranu virionu v matrix sféroidinu okluzního tělíska. Laterální tělísko, které je u ITEV mezi nukleoidem a povrchovým obalem virionu, nemá v této fázi vývoje žádný ohraničený tvar a je odlišitelné pouze jako granulární masa ve virionu (obr. 13, 17).

Detaily struktury poxviru jsou obvykle měřeny a popisovány na základě fixovaného nebo vysušeného materiálu. Za těchto podmínek se tvorba nukleoidu a vnějších membrán mění a přitomno je různé množství membrán a povrchových obalů. Během okluze živého viru ve sféroidech jsou virové částice měkké a široce oválné a v tomto stavu jsou schopny přežívat. V tomto stádiu jsou viriony uchovávány ve formě měkké membrány jako sférická tělíska, uzavřená ve vlnité vnější membráně. Jejich struktura, jejich "tvrdost" se mění po kontaktu sféroidu nebo volného virionu se vzduchem nebo novým typem prostředí (obr. 24, 25, 26).

#### **5. 1. 9. Sféroid - okluzní tělísko**

Okluzní tělísko (sféroid, OB) obsahuje viriony. Má čepicovitý (polokulovitý) nebo polštářkovitý tvar (obr. 19). Konečná velikost a tvar okluzního tělíska je pro ITEV konstatní. Jeho aktuální velikost je výsledkem produkce viru. Protein tvořící okluzi - sféroidin - není uložen a syntetizován v žádné oddělené struktuře nebo organele. Zdá se, že se syntetizuje v buňce z jednoho centra (obr. 9). Viriony jsou začleněny do masy proteinu která je tvořena bez jakéhokoliv vrstevnatého uspořádání nebo orientace. Viriony na hranici sféroidu jsou orientovány radiálně, na povrchu jsou

mladší viriony, směrem do středu sféroиду postupně dozrávají a uvnitř jsou už plně dozrálé viriony (obr. 20, 24). Sféroíd nemá žádnou povrchovou membránu, vrstvu nebo strukturální odlišnost.

Sféroidy s virovými částicemi jsou jednotlivě v infikovaných buňkách, tvoří se uprostřed buňky ale neexistuje žádné prostorové uspořádání mezi tvořícími se viriony a produkovanou masou sféroídu. Hustota okludovaných virionů se případ od případu mění. V některých sféroidech jednotná populace virionů vyplňuje celé tělísko, v jiném je to směs vřeten a virionů v různém poměru (obr. 14, 24). Začleněné inkluze jsou zralé částice, které jsou blízko sebe v povrchové části, prodloužené a organizovanější hlouběji ve sféroídu (obr. 26). Viriony jsou v masě proteinu inkluze oddělené tenkým elektron - lucentním prostorem.

Sféroid ITEV má na styku s cytoplazmou hostitelské buňky hladký povrch. Kromě virionů jsou okludovány a vnořeny i vřetena (microspindles) (obr. 25). Povrch vřetena zůstává elektron - lucentní tenkou vrstvou oddělen od masy sféroídu, stejně jako je tomu v případě virionů. Mikrovřetena jsou uvolňována na povrchu okluzního tělíška stejným způsobem (obr. 17, 22), jako viriony.

Na řezových preparátech je složité najít dobře orientované řezy, ale čepicovitý tvar okluzního tělíška je dobře identifikovatelný. Distribuce virionů a vřeten na řezech u tohoto typu okluzního tělíška je stejná jako u polštářkovitého typu tělíška. Hustota virionů v obou typech okluzních tělíšek je podobná a to samé platí o velikosti u obou typů.

### **5. 1. 10. Vřetena (microspindles)**

Mikrovřetena ITEV se liší od vřeten jiných poxvirů včetně vřeten, produkovaných během vývoje MMEV. V infikovaných buňkách se objevují společně s tvořícími se viry (obr. 5, 7, 8). Jejich morfologie je poměrně rozmanitá. Jsou to malé (40 - 250 nm), elektron - denzní trojúhelníkové nebo čtvercové (bipyramidálního nebo

krychlového tvaru) částice, které zůstávají částečně volně, začleněné ne zcela celé do okluzního tělíska (obr. 13, 14). Jsou tvořeny nezávisle na tvorbě sféroиду. Mikrovřetena jsou uzavřena v membráně, pocházející z membrán endoplazmatického retikula, na jejímž povrchu jsou adherovány ribozomy (obr. 5, 13). Mikrovřetena se tvoří po celou dobu vývoje viru, první známky syntézy sféroidinu jsou vidět při tvorbě srpkovitých membrán, v době kompletace nových virionů v cytoplazmě infikované buňky. Syntéza mikrovřeten pokračuje do konce tvorby sféroidu, kdy jsou v buňkách vidět sféroidy s okludovanými mikrovřeteny a viriony, a některá nasyntetizovaná mikrovřetena jsou volná v okolní cytoplazmě. Jestli jsou okludována do kompletního sféroidu, nebo zůstávají neokludované, není jasné (obr. 29, 30).

## 5. 2. Mezistádium

Každý nový virion, který vstupuje do buňky je uzavřen v membráně. O původu této membrány je možné spekulovat (viz diskuze), ale ve studovaném materiálu infekce ITEV ve střevě l. smrkového byla zaznamenána několikrát přítomnost kulovitých útvarů, obalených membránou, uvnitř kterých byly známky probíhajícího vývoje (obr. 31). Začátkem této fáze vývojového cyklu je kulovitý virion obalený membránou typu měkké plazmalemy. Virion má na svém povrchu dvojité částice v oddělené membráně. Uvnitř nukleoidu (core) virionu je kompletní dlouhé vlákno, smotané v dřevěném vaku (core sac). Elektron - denzní dvojité částice je spojena s nukleoidem v místě laterálního tělíska.

Během dalšího vývoje se virová částice rozpouští, není vidět žádný zbytek nukleoidu s vláknem DNA, žádný zbytek dřevěného vaku. Vnější membrána je v této fázi vývoje 15 - 20 nm silná. Membrána je stejného typu, jako v předchozím případě, a celý obsah 400 x 500 nm velkého tělíska je změněn v elektron - denzní granulární masu se stopami budoucího uspořádání částic.

Další struktura představuje stejný typ struktury s dvěma kulovitými objekty, uzavřenými v oddělených membránách. Jeden má strukturu pozůstalou z virionu (obr. 31), a jeho membrána je uzavřená a dotýká se vnější stěny plazmatické membrány. Druhá vnitřní struktura je kulovitý objekt, uzavřený v tenké membráně, která je spojená s vnější membránou částice "mostem", který je zbytkem kanálu, spojujícího objekt s vnějším prostředím. Zbytek kulovité struktury je vyplněn malými, elektron - denzními granulemi, uzavřenými v měkkém, nepravidelném obalu. Nová struktura je jemná, pravidelná oválná vakuola, která přisedá k vnější membráně, uvnitř s jemnými granulacemi.

Následující struktura je široké, 500 x 600 nm velké, kulaté stádium v pevné plazmatické membráně. Na řezu je celý vnitřek vyplněn globulárními tělísky (cca 30) s elektron - denzním materiálem uprostřed. V jedné části je vnější membrána rozpuštěná a globuly mají otevřenou cestu ven do cytoplazmy hostitelské buňky. Stejná struktura byla pozorována na některých dalších řezech. Kulaté struktury obalené membránou jsou vyplněny větším množstvím globulů různé elektronové hustoty. Uvnitř tělíska mohou být tyto globuly jednotlivě, někdy je obsah dělen nepravidelnými vnitřními membránami. Ve vnější membráně stádia je otvor, kterým se globuly dostávají ven z mezistádia. Membrána stádia může být rozpuštěna na více místech a globuly mohou vnikat do cytoplazmy na více místech. Počet globulů v mezistádiu, které bylo možné spočítat, kolísal mezi 30 - 40 a více globuly.

Detaily této fáze vývoje ITEV, tak jak byly pozorovány, mohou být interpretovány mnoha způsoby, ale v zásadě potvrzují hlavní myšlenku, že obsah virionu se mění ve fázi mezistádia na jednotlivé globuly, které se vyskytují v replikačních zónách v cytoplazmě hostitelské buňky a které následně vstupují do srpkovitých membrán budoucích virionů.

Studie materiálu, který byl k dispozici, nenabídl zatím perfektní detaily této fáze replikace ITEV a identifikace RNA a DNA struktur ve vývoji ITEV zůstává prozatím

otevřená. Globuly, které jsou nepravidelného tvaru a velikostí, jsou na preparátech pro TEM dobře zachovalé. Je nutné další studium entomo- a chordopoxvirů v raných fázích replikace, aby bylo možné identifikovat podobné analogické procesy ve vývoji a cytoplazmatické organizaci, společné pro obě skupiny poxvirů.

### **5. 3. Vývoj a morfogeneze mikrosporidie *Chytridiopsis typographi***

Během výzkumu vývoje mikrosporidie *Ch. typographi* (obr. 32, 33) v laboratorně infikovaných broucích se ukázaly nové poznatky o vývoji *Ch. typographi* a byl získán doplňující materiál k popisu vývoje, publikovaného před 30 lety. Ukázalo se, že *Ch. typographi* používá ve svém vývoji proces odštěpování vegetativních stádií, a tento proces byl podrobně popsán a publikován (Tonka et al., 2010) (viz příloha). Poznatky, získané o morfogenezi a sporogoniálním vývoji jsou také nové, a nebyly dříve nikdy publikované. V současné době se připravuje molekulární analýza *Ch. typographi* tak, aby bylo možné zařadit tuto mikrosporidii do systému nejenom na základě vývoje a ultrastruktur, ale i na základě analýzy genomu.

Vývoj, resp. ultrastruktury jednotlivých vývojových stádií mikrosporidie *Ch. typographi* jsou schematicky znázorněny na obr. 33. Ve vývoji této mikrosporidie vznikají dva typy spor dvěma různými vývojovými procesy, které jsou následně podrobněji popsány.

#### **5. 3. 1. Vegetativní stádia**

Vegetativní stádia u mikrosporidií vznikají v procesu, který se nazývá merogonie, a stádia merontí. Hlavním cílem této fáze vývoje je namnožit co největší množství infekčních stádií v cytoplazmě hostitelské buňky. Ve vývoji mikrosporidií r. *Chytridiopsis* nebyla merogonie popsána, stejně jako stádium merontu. Proto je v

dizertaci termín meront používán pouze provizorně, pro popis stádií předcházejících sporogonii.

Stádia, považována za meronty, jsou v infikovaném střevě velmi častá (obr. 34). Mají oválný tvar s méně denzní cytoplazmou, než je cytoplazma hostitelské buňky. Vyvíjí se do mnohojaderného oválného stádia s tenkou plazmalemou, 20 - 25  $\mu\text{m}$  v průměru (obr. 35). V poslední fázi tohoto (merogoniálního) vývoje se jednotliví meronti odštěpují a produkují sesterské meronty (obr. 36). Oba meronti rostou a přecházejí do sporogonie. Vývoj merontů končí tvorbou dvou typů sporontů, tenkostěnného a tlustostěnného. Tlustostěnný sporont je uzavřen v cystě podobném sporoforním měchýřku.

První kroky sporogonie jsou, zdá se, identické pro oba typy vývojového cyklu. Všechna stádia se vyvíjejí v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky, s jádrem a mitochondriemi hostitele. Jsou uzavřena v parazitoformní vakuole, která je později během sporulace lemována oddělenou membránou.

### 5. 3. 2. Tlustostěnná sporogonie

Prvním stádiem tlustostěnné sporogonie je mnohojaderné plazmódium. Jádra se dělí a jsou soustředěna v centrální části buňky, později jsou shromážděna v jedné části široce oválného stádia sporonta. Jádra mají dvojitou membránu s póry (obr. 35). Uvnitř jader jsou elektron - denzní jaderné plaky (obr. 35, 38, 39). Jsou uloženy v jaderné stěně a během mitózy lehce vyčnívají z povrchu jádra. Mikrotubuly spojené s jaderným plakem jsou vzácné. Během dalšího vývoje se jaderná membrána rozpouští a pouze jaderný plak akumulací elektron - denzního materiálu naznačuje pozici jádra. Jaderné plaky jsou velmi časté ve všech stádiích sporogonie.

Během dalšího vývoje a zrání se ve vývoji *Ch. tygraphi* vyskytují struktury, které nejsou u jiných mikrosporidií obvyklé: jedná se o systém vakuol pod plazmatickou membránou (obr. 35), vakuoly s vnitřním granulárním materiálem (obr. 38, 40) a

systém dvojité membrány, mezi kterými jsou sekreční granulace (obr. 38, 40). Tato struktura připomíná Golgiho systém u jiných mikrosporidií.

Později během vývoje se plazmatická membrána ztlušťuje a vyvíjí se jemný sporoforní měchýřek (obr. 40). Granulární cytoplazma plazmódia s mnoha volnými ribozomy kondenzuje a ztlušťující se stěna měchýřku se volně ohýbá do parazitoforní vakuoly.

Po depozici materiálu do stěny sporoforního měchýřku se uprostřed plazmódia tvoří vakuola, ve které se objevují prstovité sporoblasty. Zbytek plazmódia adhezuje ke stěně (obr. 40). Golgiho aparátu podobný systém je seskupen do kompaktní sítě a dvojitá membrána uzavírá tvořící skupinu sporoblastů. Granulární sekrece zůstávají ve výstelce plazmódia.

Zbytky plazmódia poté tvoří vrstvu adhezí ke ztlustlé stěně sporoforního měchýřku a centrální vakuola je volná pro vyčnívající sporoblasty (obr. 41). Jednotlivé sporoblasty jsou uvolňovány dovnitř vakuoly a tam nalézají svá pólová vlákna, která jsou ve vakuole produkována separátně, každé ve svém pólovém vaku. Později jsou všechny zakomponovány do jednotlivých sporoblastů a vrstva cytoplazmy u stěny je redukována a mění se v systém cytoplazmatických spojení, fixující individuální sporoblasty. Granulární materiál zůstává vně sporoforního měchýřku (obr. 41).

V dalším procesu zrání je sporoforní měchýřek vyplněn sporoblasty (obr. 42, 43) se smotaným pólovým vláknem. Primitivní kotvící disk je tvořen jako denzní struktura (cap) na konci pólového vlákna (obr. 42). Na některých řezech se v centrální vakuole nacházejí "montážní" centra, podporovaná strukturami Golgiho aparátu, která jsou aktivní v morfogenezi individuálních částí spory (obr. 43). Plazmatická vrstva, vystylající stěnu plazmatické membrány, je rozpuštěna do masy granulí, která se později redukuje po dozrání spory do jednotlivých povrchových membrán (obr. 46).

### 5. 3. 3. Tlustostěnné spory

Zralé tlustostěnné spory byly studovány v TEM již během původních popisů této mikrosporidie, ale zde studovaný materiál přináší detailnější popis těchto stádií. Zadní vakuola spory se nachází na opačném pólu spory, než jádro (obr. 44). Izofilární (o stejném průměru) pólové vlákno je smotáno do 3 závitů, uzavřených pólovým vakem. Pólový vak je podlouhle smotaná trubice. Vlákno je fixováno vrstvou malých dutých kulovitých struktur, 40 - 50 nm v průměru, natlačených k sobě a tvořících plástvovitou strukturu. Tyto struktury jsou tvořeny systémem Golgiho membrán v zadní vakuole.

Kotvicí disk adhezuje ke stěně spory (obr. 45). Je oddělený od pólového vaku a s vláknem je spojen plochou částí. Pólové vlákno je jemné, tenké, stěna vlákna je v průměru 16 nm silná, trubice vlákna je vyplněna jemnými sekrecemi. Cytoplazma spory je denzní, vyplněná množstvím ribozomů. Stěna sporoforního měchýřku je dvojitá, elektron - denzní vnější vrstvou a méně denzní vnitřní, tvořenou jemnými membránovými vlákny (obr.46).

Stěna jednotlivých spor má stejnou strukturu jako stěna sporoforního měchýřku s elektron - denzní tenkou exosporou a méně denzní endosporou. Rozdělení stěny spory na exo- a endosporu probíhá během zrání spory a endospora je tvořena jako vnitřní kompaktní struktura. V každém tlustostěnném sporoforním měchýřku je 16 až 30 spor. Spory, stejně jako sporoforní měchýřek, po obarvení Calcofluorem v UV mikroskopu neemitoval žádné záření.

### 5. 3. 4. Tenkostěnná sporogonie

Vývoj tenkostěnných spor je u laboratorně přenosné *Ch. typographi* odlišný od tlustostěnné sporogonie. Na začátku vývoje musí vzniknout větší množství zárodků, uvolněných z tenkostěnných spor (obr. 34). Stádia merogoniální fáze cyklu se liší



od primárních zárodků, uvolněných ze spóry. Tato stádia mají denzní kulaté jádro a denzní cytoplazmu. První meronti mají méně elektron - denzní cytoplazmu s jádrem s tmavými elektron - denzními granulemi, tvořícími jaderné plaky v jaderné membráně.

Sporonti mají tenkou plazmatickou membránu a vrstvu zploštělých vakuol pod membránou, tvořících síť držící sporont uprostřed (obr. 47). Plazmatická membrána sporontu je nalepena ke stěně parazitoforní vakuoly a na řezech není vidět membrána oddělující centrální část. Plazmódium netvoří vrstvu pod plazmatickou membránou a velkou centrální vakuolu. Je zde ale zachycena nová struktura, vakuola s elektron - denzními vlákny membrán, které vymizí v době odštěpování individuálních sporoblastů (obr. 47).

Tvorba sporoblastů začíná synchronizovaným odštěpováním individuálních sporoblastů okolo jednotlivých jader. Jednotlivé sporoblasty leží v centrální části volně, jsou od sebe odděleny pouze plazmatickými zbytky (obr. 48). Každý sporoblast je oddělen plazmalemou, která je podepřena multimembránovými strukturami. Uvnitř cytoplazmy sporoblastů je mnoho membrán endoplazmatického retikula. Jádra jsou kulovitá s dobře vyvinutou jadernou membránou a elektron - denzními místy jaderných plaků.

### **5. 3. 5. Tenkostěnné spory**

Proces tvorby tenkostěnných spor pokračuje simultánním odštěpením 30 a více sporoblastů z plazmódia uvnitř sporoforního měchýřku (obr. 48, 51, 52). Pólové vlákno je tvořeno uvnitř sporoblastu, ne ve volném pólovém vaku jako v případě tlustostěnné sporogonie. Sporoblasty mají měkkou plazmatickou membránu nerovnoměrné šířky s jemnými záhyby, které se dále ve vývoji vyhlazují. Pólové vlákno je smotáno v 1 - 2 záhybech okolo jádra (obr. 49). Stěna spory je tenká. Sporoforní měchýřek je rozpuštěn a zůstává pouze v některých místech v omezeném rozsahu. Ve zralé spore je nápadná vakuola se zčásti ztlustlou stěnou (obr. 50). Vakuola s funkcí

---

posterozomu je v na konci pólového vaku. Ten je prázdný, bez známek plástvovitých struktur jako je tomu v případě tlustostěnné spory.

Exospora spor se vyhlazuje díky ukládání elektron - denzního materiálu, bez vyztužení stěny ve formě elektron - lucentní vrstvy. Stavba pólového vlákna je identická se stavbou pólového vlákna spory tlustostěnné, polový vak je tenký, nesložený, kulovité struktury uzavírající vlákno jsou méně početné (obr. 50). Pólové vlákno je o stejném průměru po celém svém povrchu, kotvící disk je malý, kulovitý.

## 6. Diskuze

V diskuzi jsou diskutována dvě hlavní témata. Jedno se věnuje problematice ITEV, druhé problematice mikrosporidie *Ch. typographi* a jejímu vývojovému cyklu. Diskuze o ITEV je rozdělena na několik částí. Získaný materiál z laboratorních infekcí je natolik bohatý, že každá část vývoje a morfogeneze by se dala dlouze diskutovat. V této části se ale bude diskuze zabývat replikací viru v tkáni hostitele, morfogenezí některých stádií ve vývoji ITEV a nově popsáním stádiem ve vývoji viru. Část diskuze se věnuje problematice použití ITEV v biologické ochraně smrčín proti I. smrkovému. V části, týkající se mikrosporidie *Ch. typographi*, se diskutuje její vývoj. Další nové poznatky o této mikrosporidii, získané během výzkumu, jsou publikovány jako přílohy (kap. 11), kde jsou i získané výsledky diskutovány.

### 6. 1. *Ips typographus Entomopoxvirus*

ITEV je poměrně specifický druh mezi všemi entomopoxviry: infikuje a vyvíjí se pouze ve tkáni střeva u dospělých brouků (Wegensteiner & Weiser, 1995; Weiser & Wegensteiner, 1994). Vývoj ITEV se dá rozdělit do několika kroků - reprodukce virionu, tvorba sféroиду (okluzního tělíska) a produkce mikrovřeten, které dohromady způsobují úhynutí infikovaného jedince. Výzkum detailů vývoje ITEV v hostiteli nabízí příležitost prezentovat ultrastruktury tohoto procesu ve srovnání s ostatními EV. Z výsledků ultrastruktur je evidentní, že morfologie cytoplazmatické organizace vývoje ITEV přináší bohatou sérii poznatků, které nebyly v jiných popisech objeveny.

Viry podčeledi *Entomopoxvirinae* byly zařazeny do čeledi *Poxviridae* na základě morfologie a ultrastruktury virionu (Matthews, 1979). Typovým virem pro rod *Alpharentomopoxvirus* je *Melolontha melolontha Entomopoxvirus* (MMEV), prvně

izolovaný z chroustů (Hurpin & Vago, 1963), a popsáný jako nový virus *Vagoia melon-thae* (Weiser, 1965). Tento nový virus byl zařazen do systému virů (Weiser & Vago, 1966), nicméně toto uspořádání bylo ICTV odmítnuto a v současné době je podčeleď *Entomopoxvirinae* složená ze tří rodů, jedním z nichž je *Alphaentomopoxvirus*, který infikuje brouky (King et al., 2012).

S rozvojem výzkumu virů, které se dají kultivovat v tkáňových kulturách, jako je např. AMEV, práce, zabývající se vývojem a morfogenezí virů z brouků zůstaly ve fázi prvních popisů ultrastruktury (Bergoin et al., 1971; Goodwin & Roberts, 1975; Goodwin & Filshie, 1975). Pozdější studie morfogeneze byly udělány s viry podčeledi *Entomopoxvirinae* infikující motýly, dvoukřídly a rovnokřídly hmyz (Federici et al., 1974; Henry et al., 1969; Huger et al., 1970; Roberts & Granados, 1968; Sutter, 1972; Weiser & Vago, 1966). Většina zástupců EV, včetně virů, napadajících brouky, jsou typičtí patogeni tukového tělesa larválních stádií. Všechny EV infikují hostitele potravou a musí existovat způsob, kterým proniknou stěnou střeva a dostanou se do cílové tkáně. Je možné, že u těchto EV dochází už k částečnému vývoji ve tkáni střeva (Granados, 1981) a že během tohoto pronikání produkují stádia, analogická stádiím ITEV, který zůstává ve střevě a infikuje pouze tuto tkáň hostitele.

### **6. 1. 1. Napadená tkáň**

ITEV se rozvíjí jen v jedné tkáni, střevním epitelu, a primární napadení nastává v žlázaté části hned za kardií. Tam dochází k soustředění rozvoje v povrchové části dlaždicového epitelu, bez příznaku zonace a vytváření souvislých napadených buněk epitelu (Wegensteiner & Weiser, 1995). Nákaza neproniká do regeneračních uzlů střeva a objevuje se v buňkách až když se v tkáni střeva plně rozvinula. Někde jsou ale nakažené buňky s inkluzí časté ve skupině odloučených a regenerovaných buněk. A tady se projevuje charakteristika přenosu infekce ITEV: odloučené buňky s virovými inkluzemi se otírají o dlaždicový epitel střední části střeva v místech s

krátkými coeky a infikují buňky virovými částicemi v tomtéž hostiteli, kde vznikly. Tento princip se liší od zásad jiných infekcí, např. mikrosporidií, kde platí, že spory (spory druhého typu, sloužící k přenosu mezi hostiteli) (Iwano & Ishihara, 1991) se neotvírají dříve, než v novém hostiteli poté, co prošly expozicí na vzduchu. Je zajímavé, že tento princip platí i pro poxviry, které vznikají v tukovém tělese larev a housenek motýlů, rovnokřídlých a dvoukřídlých, stejně jako i u MMEV z ponrav chroustů (Becker & Moyer, 2007).

Ve střevě postupuje infekce ITEV vertikálně z lumenu střeva. U primární infekce dochází k procesu, kdy se rozpustí jednotlivé sféroidy a uvolňující se velké skupiny volných virionů musí překonat peritrofickou membránu a najít cestu k epiteliálním střevním buňkám, a vstoupit do hostitelské buňky (Granados, 1973b). Předpokládá se, že k narušení a zesílení infekce u EV slouží druhý typ sekrečních útvarů, produkováných virem během vývoje, které se nazývají vřetena (spindles - viz dále) (Furuta et al., 2001; Hukuhara & Wijonarko, 2001; Mitsuhashi & Miyamoto, 2003; Mitsuhashi et al., 2007; Wijonarko & Hukuhara, 1998). Poměr virionů a mikrovřeten ve sféroidech u ITEV je různý, nicméně v každém sféroidu je určitá zásobárna mikrovřeten, která, pokud přijmeme tezi o narušení peritrofické membrány, je schopná dezintegrací peritrofické membrány I. smrkového usnadnit kontakt virionů s epiteliálními buňkami střeva.

Z výše uvedeného popisu tohoto procesu ale není jasné, jestli volné viriony vstupují do buňky splynutím obalů přichycených virionů s membránou mikrovili (Granados, 1973a), nebo zda se jedná o viropexii, nebo fagocytozu. Z pozorovaného vývoje u ITEV se zdá, že je situace odlišná. Virus přichází z buněk, které byly infikovány během primární infekce v přední části střeva, a které lyzovaly a vyprodukovaly sféroidy s viriony a mikrovřeteny. Lyzované buňky jsou uvolňovány a nahrazovány novými buňkami z regeneračních uzlů (Hakim et al., 2010). Okluzní těliska - sféroidy jsou volné v lumenu střeva a pohybují se dolů střevem v důsledku peristaltických pohybů střevní svaloviny pod peritrofickou membránou a jsou tlačeny k povrchu

epiteliálních buněk střevním obsahem. Viriony, vyčnívající z povrchu sféroиду jsou tedy adherovány střevním obsahem k povrchu mikrovili a tím dochází k penetraci nových buněk viriony ITEV. Zda dochází ke splývání membrán virionu a buněk epitelu střeva, jako je tomu v případě ODV (occlusion derived virus) fenotypu u čeledi *Baculoviridae* (Blissard, 1996), není jasné. Za předpokladu, že fagocytoza a další procesy, vedoucí ke vstupu viru do buňky (Blissard, 1996; Mercer et al., 2010), probíhají rutinně a opakovaně, dá se očekávat, že stopy tohoto děje musí zůstat v každé, nebo alespoň ve většině infikovaných buněk. Žádné podobné stopy po vstupu virionů nebyly pozorovány (s výjimkou mezistádia, viz kap. 5. 2.). Hostitelská buňka zůstává aktivní během tvorby okluzního tělíska a tvorby reprodukčních zón pro individuální vývoj stádií virionů v různé části cytoplazmy buňky, a nedochází k její degeneraci, popř. apoptóze a dalším mechanismům, kterými se brání střevní buňky proti infekci (Hakim et al., 2010).

Infekce, způsobené EV, probíhají velmi pomalu, často 30 - 40 týdnů, zejména u rodu *Alphaentomopoxvirus* (Goodwin & Roberts, 1975; Hurpin & Robert, 1968; Milner & Lutton, 1975). Infekce střevního epitelu ITEV probíhá přibližně 4 týdny, první sféroidy ve střevě a trusu se dají zachytit po 2 týdnech infekce (Tonka & Weiser, 2009), stejně jako je tomu v případě housenek motýlů nebo sarančat kdy doba infekce, končící uhynutím nakaženého hostitele, trvá kratší dobu, než je tomu u infekcí viry u larev brouků (Bird et al., 1971; Mitchell & Smith, 1985; Sutter, 1972; Woods et al., 1992).

V laboratorních pokusech byla pronikání ze střeva věnována jen malá pozornost (Granados, 1973b). Chybí podrobné sledování předání viru po rozpadu hemocytu na povrchu tukového tělesa. Přesto je jasné, že při perorálním podávání se nevyskytovala lokální ohniska infekce ve střevě (Granados, 1981). Z pozorování některých dříve popsaných infekcí EV plyne, že vývoj viru ve stěně střeva je spíše náhodným jevem, než pravidlem (Bird et al., 1971; Granados, 1973a).

O rozvoji primární infekce ve střevě u hostitelů, kde je sídlo infekce v tukovém tělese, je jen málo údajů (Granados, 1973b; Granados, 1973a). Vzhledem k tomu, že přenos všech EV se děje perorální cestou, musí existovat způsob, kterým se infekční viriony dostávají ze sféroidu ve střevě do susceptibilní tkáně. A je velmi pravděpodobné, že určitá fáze vývoje probíhá ve střevním epitelu. U přástevníka *Amsacta moorei* dochází k mírné infekci střevního epitelu a virus se následně objevuje v hemocytech a v tukovém tělese. Do tukové tkáně pronikají viriony již po 5 - 9 dnech po infekci potravou. Do 14 dnů nakažené buňky lyzují a jejich obsah s virem se vylévá do hemolymfy, popř jsou viriony vychytávány hemocyty (Arif, 1995; Granados, 1981). Po zkušenostech s roznosem spor mikrosporidií v těle hostitele je evidentní (David & Weiser, 1994), že na přechodu primární infekce do tukového tělesa se podílí hemocyty. Tento způsob byl doplněn pozorováním AMEV-*gfp* viru v těle housenky bekyně *Lymantria dispar*, kde hemocyty byly primárním místem výskytu upraveného EV. Následně se virus objevoval v dalších tkáních (Perera et al., 2010).

V materiálu ITEV se funkce hemocytů jako dopravního prostředku pro nákazu v řezech střevní stěnou a regeneračními uzly neuplatňuje. Případ na obr. 10 ilustruje pouze fakt, že hemocyt je schopen přijmout nákazu a přenášet ji po mezerách ve střevní stěně. Ale bazální membrána střeva, kudy prochází hemocyty schopné fagocytozy a roznosu nákazy, není místem zřetelného výskytu infikovaných buněk. Hemocyty s virovou infekcí se do tělní dutiny nevrací a odcházejí spolu s odloučenými buňkami střevního epitelu. Jak bylo již vzpomenuto, viriony vyčnívající z hmoty sféroidinu hrají úlohu při přímé autoinfekci v dolní části střeva. Virus počítá s tím, že tyto viriony při dalším transportu inkluzí zaschnou a ztratí infekčnost. Hmota sféroidinu je schopna uchovat dostatečnou klíčivost uzavřených virionů i několik let, v mrazícím boxu více jak 5 let (Robert, 1968; Tonka nepublikováno).

V pozorovaném hemocytu, ve kterém se vyvíjí infekce ITEV a který proniká do stěny středního střeva, je pozoruhodné nápadné množství různých stádií ve vývoji viru. Tato stádia, která vyplňují celou buňku, musí zákonitě poškodit putující

hemocyt a po jeho lýze jsou pro infekci k dispozici všechna stádia vývoje viru na dotyku se střevním epitelem. Otázka, zda se průběh cyklu uvnitř hemocytu a uvnitř střevních buněk shoduje, zůstává otevřená. Podobná infekce hemocytu, ve kterých převažovala stádia replikace virionů, byla pozorována u MMEV, kde se téměř nevyskytovaly sféroidy (OB), na rozdíl od infekce buněk tukového tělesa, kde byl poměr sféroidů ku virionům vyšší (Devauchelle et al., 1971). Na rozdíl od námi pozorované infekce hemocytů, která je u ITEV synchronní s infekcí ve střevních buňkách, v hemocytech larev chrousta se infekce objevila několik týdnů před infekcí tukového tělesa, a podle autorů slouží k roznosu infekce uvnitř hostitele (viz výše).

### **6. 1. 2. Konstrukce a morfogeneze virionu**

Mezi prvními charakteristikami v popisech EV se hovoří o jejich neobvyklé morfologii, velkém genomu a cytoplazmatickém místě replikace (Granados, 1981), popř. o cytoplazmatické lokalizaci rozmnožování EV v cytoplazmě infikovaných buněk (Pérrera et al., 2010). U virů, infikujících obratlovce, je jejich místem replikace DNA také cytoplazma, jak bylo popsáno na příkladu viru vakcínie, kde virus používá jaderné membrány a cytoskelet infikované buňky ke koordinaci raných kroků svého životního cyklu (Schramm & Krijnse-Locker, 2005). V případě ITEV se zdá, že role cytoskeletu a jaderných membrán je méně významná. Intracelulární zralý virus a další formy virionů, známé z vývoje viru vakcínie, jsou v případě ITEV nahrazeny zralými virovými částicemi v cytoplazmě infikovaných buněk a viriony jsou obaleny sféroidinem v okluzním tělísku - sféroidu, který žádnou další membránu, jako je to v případě vakcínie, nově vzniklému virionu nepřidává. U CV, zejména u savčích virů se zralý virion transformuje do několika forem (King et al., 2012; Moss, 2001). První je zralý virus (mature virion MV, někdy intracellular mature virion IMV), který je analogický zralému virionu ITEV. Má diferencovaný nukleoid s DNA a proteinovým komplexem, laterální tělísko a povrchový lipoproteinový obal. Další formy virionu (wrapped virion WV, enveloped virion ENV, cell - associated enveloped virion CEV, extracellular enveloped



virion EEV), známé z vývoje u CV (King et al., 2012; Schramm & Krijnse-Locker, 2005), nebyly v případě ITEV pozorovány.

Tvar a morfologie postupně se tvořících vývojových stádií virionů závisí na druhu viru a okolnostech jeho vývoje. Důležitým faktorem zrání virů jsou abiotické vlivy, které působí na konečné stádium vývoje viru - sféroid, uvolňované na konci infekce. Uvnitř hostitele zůstává okludovaný virion ve sféroidu v kulovitém tvaru bez jakýchkoliv viditelných změn nukleoidu, popř. bez tvarové diferenciacce vaku nukleoidu (core sac), která je charakteristická pro jednotlivé druhy podčeledi *Entomopoxvirinae* (Granados, 1981). U některých EV bylo popsáno, že viriony dozrávají v hlubších částech sféroidu, směrem do středu okluzy (Milner & Lutton, 1975). V případě infekce ITEV jsou v buňkách v dokončených sféroidech viriony i uprostřed okluzy stále kulovité. Pokud to srovnáme se sféroidem a viriony uvnitř, který byl získán z mrtvého I. smrkového, tak zde již k deformaci nukleoidu do konkávní formy došlo. Z tohoto pohledu je zřejmé, že sféroid musí projít fází ve vnějším prostředí, aby došlo k úplnému dozrání virionu.

U ITEV jsou virová tělíška zalitá sféroidinem značně plastická a teprve s usycháním tělíšek dochází k formování vnitřní struktury nukleoidu, vaku nukleoidu, laterálního tělíška a povrchových obalů virionů, stejně jako u dříve popsaných EV (Bergoin et al., 1971; Milner & Lutton, 1975; Perera et al., 2010). Dalo by se předpokládat, že viriony na středu inkluzy jsou nedokončené. Ale řezy inkluzí ukazují stadia několika stupňů dozrávání, než se virion ponoří do hmoty sféroidinu.

Tvar virionů EV je většinou vejčitý až cihlovitý (Becker & Moyer, 2007; King et al., 2012; Moss, 2001). Tvar ITEV je široce vejčitý až kulovitý, rozměry 150 - 200 x 300 - 350 nm zapadá do velikosti dříve popsaných EV (viz tab. 1). Viriony dříve popsaných EV z brouků mají lipoproteinový obal s tubulárními nebo globulárními proteinovými strukturami na povrchu. Uvnitř obalu je jedno laterální tělíško a vydutý nukleoid s genomem (Becker & Moyer, 2007; Granados, 1981). U ITEV je na povrchu virionů

---

hladká zóna, která pokrývá lipoproteinový obal, vybíhající do malých bradavičnatých struktur.

Typickým stádiem maturace a zralým virionem ITEV je měkký (soft) virion, sférická částice ve vnější membráně s oválným nukleoidem v obalu (core sac), ležícím v suspenzi jemného granulování. Pouze s vyschnutím OB je jednostranně nukleoid stlačený laterálně a tvoří obdélníkovitý nukleoid (core) se samostatným unilaterálním tělískem, jako v případě jiných EV (Granados, 1981). Vnější membrána je jemná, ale uzavřená v tenké membráně, profilující se do morušovitého obrysu (Bergoin & Dales, 1971). Volné virové částice v cytoplazmě infikované buňky mají během pobytu v originálním živém hostiteli tvar sférického měkkého tělíska.

Obal nukleoidu (core sac) je u jiných EV tvořen vnitřní jednotkovou membránou a vnější vrstvou, složenou z podjednotek (Granados, 1973b; Stoltz & Summers, 1972). Při tvorbě vnitřní membrány se bočně stlačuje a v místě konkávy vzniká elektron - denzní laterální tělísko a vnější obal virionu se profiluje do morulovité (morušovité) projekce. Obal nukleotidu (core sac) je u ITEV lehce odlišný, tvořený jedním materiálem bez vnitřní jednotkové membrány a vnější vrstvy podjednotek, jak bylo popsáno dříve (Stoltz & Summers, 1972; Granados, 1973b).

Podle obecně přijímaného názoru se mladá stádia viru tvoří ve dvou typech viroplazmy (virogenního stromatu) (Goodwin et al., 1990; Hukuhara et al., 1990). U prvního typu se jedná o amorfní elektron - denzní masu s volně nahromaděnou granulární hmotou, zatímco typ II tvoří volně ložená masa granulí (Radek & Fabel, 2000). Na okraji viroplazmy I vznikají denzní kulovité částice mladých virionů. U typu II se tvoří kulovité částice zpočátku s řídkým obsahem, který se postupnou kondenzací uvnitř membrány mladého virionu zahušťuje.

### 6. 1. 3. Replikační zóny

Vznik replikačních zón v cytoplazmě pro odělené ukládání nově nasyntetizovaného materiálu, nutného k morfogenezi virionů, byl pozorován v oddělených ohniscích cytoplazmy ITEV infikovaných buněk. Ve zkoumaném materiálu byly zaznamenány dva typy ohnisek replikace. Jedno, shluk elektron - denzní granulované hmoty, ležící v přímém kontaktu s cytoplazmou, od které není odděleno žádnou membránou, na rozdíl od viru vakcínie (Schramm & Krijnse-Locker, 2005). Na okraji této hmoty byly na některých řezech pozorovány srpkovité membrány, které byly plněny denzním granulátem, jak bylo popsáno již dříve (Bergoin & Dales, 1971). Otázka názvu této struktury je otevřená. Podobná struktura, která má podobu amorfní elektron - denzní hmoty, na jejímž okraji vznikají nové viriony, byla popsána u infekcí jaderných polyédrií jako virogenní stroma (Williams & Faulkner, 1997). Definice virogenního stromatu u EV byla podána ve studiích autorů, kteří studovali replikace viru MMEV (Devauchelle et al., 1971; Kurstak & Garzon, 1977).

Přestože analogická zóna reprodukčního okrsku denzní hmoty v cytoplazmě byla zaznamenána u viru vakcínie (Cairns, 1960), v současné době se o tomto typu ohniska hovoří jako o viroplazmě typu I. U entomopoxvirů existují dva typy viroplazmy - typ I a typ II (Granados, 1981). Typ I je dobře definovaná oblast elektron - denzního materiálu v cytoplazmě, z jejíhož okraje se materiálem z viroplazmy plní srpkovité části membrán a nové viriony se odštěpují z okraje viroplazmy (Bergoin & Dales, 1971), tak jak bylo prezentováno i v materiálu ITEV.

Viroplazma typu II je charakterizována tvorbou kulovitých měchýřků (globulů) v cytoplazmě (Goodwin et al., 1991; Kurstak & Garzon, 1977). Např. u entomopoxviru ze švába *Blatella germanica* byl typ I charakterizován jako granulární, elektron - denzní cytoplazmatická oblast, kde se tvořily virové částice různé velikosti a tvaru a

náhodně i vřetena. Viroplazma druhého typu byla v cytoplazmě ve formě málo agregovaného materiálu s množstvím membránových struktur (Radek & Fabel, 2000).

U některých EV se vyskytuje jen jeden typ, u některých virů byly pozorovány oba typy. Viroplazma typu I byla popsána u *O. batesi* a *M. sanguinipes*, oba typy byly popsány u *M. melolontha*, *E. auxiliaris*, *C. fumiferana*, *O. alboguttata*, *A. moorei* infikující buňky *E. acrea*, typ II byl pouze u *Ch. attenuatus*. Za hlavní zdroj replikace je typ I považován u *A. moorei*, zatímco u *M. melolontha* nebo *O. alboguttata* je za hlavní zdroj replikace považována viroplazma typu II (Granados, 1981).

Replikace virionů začíná v cytoplazmě hostitelské buňky v blízkosti jádra v krátkých vyklenutých jednotkových membránách (srpkovité membrány), které se dorůstáním zakulacují do kulovitého pouzdra, které uzavírá počáteční stádium vývoje viru (Bergoin et al., 1968b; Granados & Roberts, 1970). Tyto struktury u viru housenek přástevníka *E. acrea* tvoří "kuličky"; stejné, které jsou popsány u MMEV jako micely (micelles) (Bergoin et al., 1969; Granados & Roberts, 1970). U podobných útvarů byly na povrchu jednotkové membrány popsány ještě povrchové krátké bodlinky (Kurstak & Garzon, 1977; Stoltz & Summers, 1972).

Z popisů je možné pouze nedokonale dedukovat o jaké struktury se jedná. Na některých publikovaných snímcích jsou fagocytované viriony obklopeny hustou sraženinou, a viroplazma a nezralé viry odštěpující se z této viroplazmy nemají podobu micel (Bergoin & Dales, 1971). Naopak, u infekce virem ITEV se v cytoplazmě nakažených buněk tvoří rozsáhlé skupiny globulů (měchýřků) s elektron - denzní středovou částicí, která může být částí DNA. Středová denzní částice je centrálně fixována nepravidelnými výstuhami. Tyto globule (měchýřky) se tvoří z hoblinovitých prekurzorů. Na nepravidelně zprohýbaném povrchu globulů nejsou žádné bodlinky, ani jiné sekrece nebo vystouplé struktury (Stoltz & Summers, 1972). Některé měchýřky se spojují s jinými měchýřky. Amorfní elektron - denzní masa, popsána u

jiných EV (Granados, 1981), neodpovídá globulární zóně ITEV, ale jedná se o část viroplazmy prvního typu.

V materiálu ITEV se tvoří viroplazma typu I (nukleoidální, virogenní materiál) v nakažených buňkách jako kompaktní středně elektron - denzní shluky z krátkých vláken a drobné granulace (Bergoin & Dales, 1971). Spleť vláken je poměrně hustá a neprůhledná. V některých případech bylo u ITEV pozorováno stroma, složené z větších zrn s vyšší elektronovou hustotou, která sousedí se skupinami měchýřků a je evidentní, že dochází ke spojení s globulemi a vzniká další morfologická jednotka ve vývoji viru, srpkovitá membrána ("virové kalíšky").

Autoři dělí viroplazmu u EV u brouků na I a II typ jsou přesvědčení, že u těchto infekcí jsou přítomny oba typy stromat (Bergoin et al., 1969; Granados, 1981), což odpovídá i pozorování infekce ITEV u I. smrkového. Vývoj virionů probíhá podle autorů tvorbou nukleoidů v uzavřených kulovitých virových obalech. Za první zřetelné virové struktury na začátku morfogenze považují, stejně jako např. Stoltz & Summers (1972), srpkovité (měsíčkovité) útvary, oddělující se z fibrilárního materiálu viroplazmy, ve kterém leží velké množství malých měchýřků, které hrají roli při tvorbě obalů mladých virionů, postupně celý virion uzavírají a vytvářejí dřeň virionu.

U ITEV se ve zkoumaném materiálu objevují srpkovité části membrán ("virové kalíšky"), které se tvoří jednotlivě na okraji virogenního stromatu, stejně jako u typového druhu MMEV (Bergoin & Dales, 1971; Granados, 1981). Kalíšky mají pevnou vnější membránu a paralelně ležící vnitřní membránu (Tolonen et al., 2001). Jednotlivé srpkovité membrány ITEV se postupně uzavírají a při tom se na vnějším povrchu odděluje tenká dvojitá membrána. Do kalíšku se postupně aktivně nahrnují jednotlivé měchýřky (globuly). Membrány se postupně uzavírají a mění se na útvar kulovitého tvaru (Schramm & Krijnse-Locker, 2005). Uvnitř se nahromadí malé množství měchýřků. V dalším vývoji ITEV se tyto měchýřky uvnitř rozpustí a vzniká stádium se zrnitým, promíchaným obsahem, kde se hmota z membrána měchýřků

usazuje pod vnitřní membránou virionu a později vytváří stěnu obalu nukleoidu (core sac). Nukleoid se rozestupuje a na středu uvolňuje prostor pro svinutí vláknů DNA. Ze sledu změn v nitru virionu lze předpokládat, že jednotlivé měchýřky obsahují části ITEV genomu, které se k sobě navazují po rozpuštění obalu měchýřků a dá se předpokládat, že konce jednotlivých částí genomu jsou uspořádány tak, že na sebe navazují v předem určeném pořadí. Je zajímavé, že se toto pořadí nevytváří zřetelně již při vstupu měchýřků do otevřených srpkovitých membrán. Označené pořadí mají zřejmě až části DNA po rozpuštění měchýřků. Konečným uspořádáním této etapy vývoje virionu je mladá virová částice.

Granados (1981) popisuje membrány viru, které zvětšují svůj povrch obalením nezralých virových částic. Tento obal nesouvisí s žádnou membránou, vzniklou z organel hostitelské buňky. Tyto srpkovité membrány v jeho práci nejsou vyplňovány globulárním materiálem, jako je tomu v případě ITEV. V rámci popisu viru jsou na některých obrázcích v jeho práci vidět struktury, připomínající globule u ITEV, ale tyto nejsou v autorově popisu výsledku zahrnuty.

U viru vakcínie (Schramm & Krijnse-Locker, 2005) splývají cisterny endoplazmatického retikula a tvoří těsný obal okolo místa replikační zóny v cytoplazmě hostitelské buňky. Membrány ER uzavřou tato místa a po vzniku srpkovitých membrán, které vznikají z ER (Tolonen et al., 2001), se obalující membrány kolem replikační zóny opět uvolní. Tato struktura není v prezentovaném materiálu infekce ITEV vidět, replikační zóny leží volně v cytoplazmě. Ohniska, kde se syntetizuje materiál pro tvorbu nových virionů, byla popsána u několika dalších skupin virů, nejenom DNA virů (Huang et al., 2006; Netherton et al., 2007; Novoa et al., 2005).

#### **6. 1. 4. Sféroidy - okluzní tělíska (OB)**

Morfologické znaky začátku produkce sféroidinu jako stavebního proteinu sféroidu (OB) nebyly v TEM pozorovány. Sféroidy EV se tvoří nezávisle na tvorbě volných

mikrovřeten v cytoplazmě (Becker & Moyer, 2007). U ITEV jsou mikrovřetena menší velikosti, tvořená proteinem fusolinem, který se syntetizuje uvnitř membrán ER s adheřovanou vrstvou ribozomů na povrchu, stejně jako u jiných EV (Becker & Moyer, 2007). Sféroidin okluzního tělíska se syntetizuje volně v cytoplazmě, není uzavřen v žádné membráně ER a ani ribozomy k jeho povrchu neadherují. Nikde v cytoplazmě během replikace a morfogenze viru nebyla pozorována žádná zóna syntézy okluzního proteinu a jeho syntéza probíhá evidentně v celé otevřené cytoplazmě hostitelské buňky.

Ze srovnání ITEV se systémem inkluzí jiného EV ze švába vyplývá, že i u některých jiných EV se vyskytují viriony se stejnou vnitřní organizací a jedním laterálním tělískem, vyčnívající z masy sféroidinu okluzního tělíska (Radek & Fabel, 2000). Jeden z publikovaných sféroidů ze švába má na svém povrchu dvouvrstevný membránový obal, který není přítomen u jiných okluzí z infikovaného švába a autoři se domnívají, že je výsledkem obranné imunitní reakce švába na infekci (Radek & Fabel, 2000). Tato struktura, ani jiné morfologické znaky obranné reakce hostitele na infekci ITEV, nebyly ve zkoumaném materiálu zachyceny. Matrix sféroidinu okluzního tělíska ITEV je tvořena kontinuálně s replikací virionů během vývoje infekce. Produkce sféroidinu, jako část produkčního cyklu viru, je základní charakteristikou druhu ITEV a všech dalších EV (Arif, 1995; Becker & Moyer, 2007; Perera et al., 2010).

Případ virové infekce žaber lososů SGPV nabízí případ kombinace struktury CV a EV (Nylund et al., 2008). Případ je dobře dokumentován na obrázcích kde se dá najít většina stádií mladého viru. Virové částice jsou tvořeny ve skupinách po 40 a více virionech v denzních skupinách. Tyto skupiny jsou vytlačovány (odštěpovány) do pupenu (bud) na jedné straně infikované buňky. Viriony jsou v membráně vyplněné serózní tekutinou a částice sedimentují na spodu transportního vaku. Vak je analogií okluzního tělíska EV, kde okludující materiál není typem sféroidinu, ale tekutého

roztoku. Plazmatická membrána vaku drží viriony pohromadě a chrání je, stejně jako sféroidy ITEV (Nylund et al., 2008).

U ITEV tvar virionu zůstává po uzavření virionu a diferenciaci obalu nukleoidu (core sac) v plastickém kulovitém tvaru, ve kterém se morfologicky nemění zrnitá struktura nukleoidu kolem vlákna DNA a i prostor mezi nukleoidem a povrchovou membránou zůstává beze změny. Nevytváří se pevně formované laterální tělísko a vnější obal virionu přiléhá přímo k hladkému povrchu. V této podobě leží viriony v cytoplazmě infikované buňky a čekají na tvorbu sféroidu (OB). Morfogeneze sféroidu začíná vyloučením sféroidinu kolem jednoho virionu a postupným seskupováním měkkých virionů do narůstající hmoty sféroidu. Jednotlivé viriony ITEV jsou od sebe vzdáleny a mezery mezi nimi jsou pravidelné. Orientace virionů není uvnitř okluze jednotná, jako u většiny infekcí EV, na rozdíl od MMEV a EV infikujícího larvy *O. batesi* (Bergoin et al., 1971; Goodwin & Filshie, 1969). Tvorba sféroidu ITEV pokračuje až do obecně jednotné velikosti a tvaru dvou typů - kulovité a čepicovité inkluze.

U jiných EV je tvar sféroidů kulovitý (Goodwin & Roberts, 1975) nebo vřetenitý, či široce vejčitý (Weiser & Vago, 1966). Pokud tvar a velikost závisí na hustotě a jiných vlastnostech sféroidinu, který je syntetizován virem, u ITEV je omezení tvorby inkluze dáno jak konečnou velikostí (průměrem), tak jejím tvarem. Při tom je charakteristické, že generuje dvě rovné plochy u každé inkluze (základny inkluze). Tato vlastnost se nedá vysvětlit vlastnostmi sféroidinu, jeho hustotou nebo pevností cytoplazmatické membrány. To znamená, že sféroidy mají genomem viru předepsané směrové a tvarové ohraničení.

Tvorba obou typů inkluzí, sféroidů a mikrovřeten je u ITEV poněkud odlišná od jiných EV. Společným znakem většiny EV z rodu *Alpha-*, *Beta-* a *Gammaentomopoxvirus* je to, že se nákaza rozvíjí ve specifickém prostředí mimo místo prvního průniku, v tukovém tělese a tato odlišnost platí i pro typový druh rodu *Alphaentomopoxvirus*,



MMEV. To znamená, že u všech těchto skupin je přenos, uvolnění viru do volného prostředí a proniknutí potravou do nového hostitele zajištěno až uhynutím hostitele a rozpadem kadaverů. Pro tento typ přenosu je ochrana virionů před vyschnutím a dalšími abiotickými faktory od uhynutí prvního hostitele velmi významná a je zajištěna uzavřením virionů do tuhé matrix proteinu sféroidinu, kde jsou nové viriony schopny se uvolnit až působením silných trávicích šťáv nového hostitele. Sféroidy některých EV mají periferní část - tzv. kortikální - bez virionů a svůj povrch mají ještě vyztužen tzv. episféroidní vrstvou (Goodwin & Filshie, 1975; Kurstak & Garzon, 1977; Radek & Fabel, 2000) nebo fibrilami (Alaoui-Ismaili & Richardson, 1998). Tato struktura nebyla ve sféroidech ITEV pozorována.

#### **6. 1. 5. Mikrovřetena**

U ITEV jsou mikrovřetena malá. Mikrovřetena ITEV mají tvar jehlanu nebo vřetena, velikostí velmi blízká virionům. Jejich počet je nižší, než je počet virionů ve sféroidu, v každém virionu je nestejný poměr virionů a mikrovřeten. Tvar těchto struktur v TEM ve střevě lýkožrouta je čtvercovitý nebo trojúhelníkovitý, to je ale způsobeno rovinou řezu tkáně. Mikrovřetena ITEV jsou svým tvarem shodná makrovřetenům, popsaným u jiných EV (Bergoin et al., 1976; Hurpin & Vago, 1963; Weiser, 1965; Weiser & Vago, 1966). Makrovřetena různé velikosti a tvaru byla popsána u většiny EV, infikujících brouky (viz tab. 1). Pouze u *Dermolepida albohirtum* nebyla vřetena popsána (Goodwin & Filshie, 1975). Mikrovřetena ITEV jsou tedy jediným případem těchto struktur u EV, infikující brouky, přesto, že mikrovřetena okludovaná ve sféroidu byla popsána zejména z housenek některých obalečů (*Choristoneura* spp.) (Bird, 1974; Cunningham et al., 1973; Katagiri, 1973).

Funkce vřeten zůstává nejasná. Jsou tvořena jedním proteinem - fusolinem, který není homologický se sféroidinem, tvořícím sféroidy (OB) (Dall et al., 1993). Rozdíly v denzitě a struktuře sféroidu a mikrovřetene u ITEV jsou na řezech TEM

zřetelné. Zdá se, že obě struktury nejsou identické. V minulých letech bylo prokázáno, že přidání makrovřeten k suspenzi viru *Bombyx mori* multiple nuclear polyhedrosis virus (BmMNPV) z čeledi *Baculoviridae*, zesílí účinek infekce tímto virem; k zesílení infekce ale stačí pouze samotný fusolin, který rozpouští nebo dezintegruje peritrofickou membránu a viriony mají usnadněný přístup ke střevním buňkám. Následně dochází ke kontaktu virionu s buňkami střeva s vyšší efektivitou (Hukuhara et al., 2003; Mitsuhashi & Miyamoto, 2003; Xu & Hukuhara, 1992). Fusolin obsahuje N-terminální oblast, která je schopná vázat chitin, který je součástí peritrofické membrány, a tím může docházet k jejímu rozpadu (Takemoto et al., 2008). Na druhou stranu jsou některé EV - např. AMEV (nemá ani gen pro fusolin) nebo u EV z larev pakomárů, které vřetena, makro- ani mikrovřetena, netvoří. Přesto u nich dochází k úspěšné infekci (Bergoin & Dales, 1971; Becker & Moyer, 2007; Federici et al., 1974; Roberts & Granados, 1968; Stoltz & Summers, 1972; Weiser, 1969). Vystává také otázka, jaká je stabilita makrovřeten v přírodních nákazách a jestli v přírodních populacích jsou hostitelé schopni se nakazit jak sféroidy, tak vřetena. Pokud je ve sféroidu menší počet mikrovřeten a předpokládáme, že se okluze rozpouští postupně, tak by mikrovřetena musela být na povrchu sféroidu, aby byla schopna rozpustit peritrofickou membránu u *I. typographus*. To ale z pozorovaných preparátů neplyne, mikrovřetena, a je jich menší množství než virionů, nejsou v povrchové vrstvě přítomné.

Mikrovřetena, která se objevují u ITEV současně se sféroidy, zůstávají v cytoplazmě napadených buněk. Velikostí jsou srovnatelné s viriony. Jde obecně o sterilní trojúhelníkovité nebo čtvercovité útvary bez zřetelného utváření jako jehlany nebo vřetena. Jsou složena z husté masy vláken, jejichž konce vyčnívají ze siluety a vytvářejí volnou zónu, na které leží souvislá vrstva ribozomů. Při produkci sféroidinu jsou do inkluze okludována i mikrovřetena. Uvnitř sféroidu není kolem nich zachována volná zóna a membrána ER, ve které se syntetizují a do sféroidu se nepřenáší. Počet vřetýnek je variabilní, u některých sféroidů byl poměr virionů a mikrovřeten půl na

půl. Poměr vřeten a virionů je různý podle druhů EV. Např. u EV z *A. tasmaniae* byl popsána poměr vřeten a sféroidů 3 : 1 (Goodwin & Roberts, 1975). U housenek *C. fumiferana*, infikovaných EV, se mikrovřetena okludují do sféroиду v poměru 1 vřeteno ku 14 virionu, ale vyskytují se u nich i sféroidy, kde jsou okludována pouze mikrovřetena (Bird, 1974). Tento případ u ITEV nebyl pozorován, stejně tak i poměr mezi počtem okludovaných virionů a vřeten byl větší.

## 6. 2. Mezistádium

Otázka vstupu poxvirů do buňky hostitele není stále jasně a podrobně prozkoumána. Virová částice po vstupu do buňky uvolní svůj genom do cytoplazmy. To je obecně přijímaná teorie, a platí jak pro CV, tak i pro EV (Schramm & Krijnse-Locker, 2005; Granados, 1981). Granados (1973b) pozoroval fúzi obalových vrstev virionů s membránou řasinek epitelu. Po fúzi membrán se uvolňoval nukleoid a laterální tělíška do cytoplazmy buněk. Pokud je EV injikován do hemocoelu hostitele, vstup do buněk probíhal pomocí fagocytozy (Devauchelle et al., 1971). Po zachycení virionu se uvnitř fagocytární vakuoly dostane virion do cytoplazmy hostitelské buňky. Autoři se domnívají, že obal nukleoidu uvnitř vakuoly praskne a genom se uvolní do cytoplazmy, kde začíná replikace viru. Fagocytované viriony, které byly publikovány Granadosem (1981a), nebyly v materiálu ITEV pozorovány. Mohou patrně vznikat pouze v laboratorně vyvolané infekci AMEV v larvách *E. acrea* (rod *Betaentomopoxvirus*) a zřejmě zde hraje roli i to, že pozorované fagocytované viriony byly v hemocytech.

Ve zkoumaném materiálu ITEV nebyla identifikována žádná z popsaných cest vstupu virionu do buňky hostitele (Granados, 1981; Perera et al., 2010). Pozorované viriony, uložené v plazmatické membráně napadené buňky, jsou spíš náhodným jevem, než pravidlem, a nebyly ve zkoumaném materiálu nikde jinde zachyceny. První známkou virové replikace EV jsou samostatná cytoplazmatická replikační ohniska

(foci) - viroplazmy (Bergoin & Dales, 1971). V těchto ohniscích dochází k virové replikaci a syntéze materiálu, potřebného k replikaci genomu a syntéze strukturálních proteinů (Netherton et al., 2007). V mnoha případech ale byla v ITEV infikovaných buňkách pozorována tělíska, provizorně nazvaná mezistádium, kde jsou struktury zralého virionu transformovány do podoby enástrojů pro replikaci viru: globuly s elektron - denzním středovým tělískem, materiál vnější membrány jednotlivých globulů pro produkci virogenního stromatu a skupinu globulů s elektron - denzní středovou granulí obsahující DNA genom. S uvolněním tohoto obsahu do cytoplazmy infikované buňky začíná replikace pracovat: produkce materiálu obalu nukleoidu (core sac), viroplazmy (virogenní stroma) a kopírování genomu v globulech.

U ITEV zřejmě virus proniká do cytoplazmy hostitelské buňky ve formě virionu, který se během rané fáze vývoje v hostitelské buňce mění na mezistádium, připravující dva typy struktur, nezbytných pro replikaci viru: DNA, dělící se na jednotlivé úseky ve formě globulů, a viroplazmu (virogenní stroma - VS). Mezistádium nebylo nikde jinde dříve u virů z čeledi *Poxviridae* pozorováno. Obecně se předpokládá, že poxvirus po splynutí s membránou hostitelské buňky rozpustí svojí membránu a uvolní nukleoproteinový komplex (core) do cytoplazmy hostitele. Virový genom je pak transportován v cytoplazmě pomocí mikrotubulů na místo replikace a tvorby nových virionů (Moss, 2001; Traktman, 1996). Tento případ nebyl ve studovaném materiálu pozorován, a je možné, že mezistádium slouží právě k transportu virového genomu na místo jeho replikace (viz kapitola 5. 2.).

Genom poxvirů je tvořen lineární molekulou dsDNA s kovalentně ukončenými konci. Replikace viru probíhá uvnitř cytoplazmy. Vstup do buněk u viru vakcinie (VACV) se liší podle typu virionu - IMV nebo EEV. Po adsorpci virionu k membráně buňky, IMV vstupuje do buňky pravděpodobně fúzí s plazmatickou membránou, po které uvolňuje genom do cytoplazmy. EEV musí fúzovat s endozomální membránou, aby došlo k uvolnění nukleoidu do cytoplazmy hostitelské buňky (Schramm & Krijnse-Locker, 2005).

Pro hypotézu, že mezistádium není stádiem ve vývoji ITEV, ale jedná se o mechanismus vstupu do buňky endozomalní cestou, hovoří i novější poznatky o mechanismech vstupu virů do buňky (Lozach et al., 2011; Matilainen et al., 2005; Mercer et al., 2010). U viru vakcínie byl popsán vstup do buňky makropinocytozou (Mercer & Helenius, 2009; Schmidt et al., 2011). Výhoda makropinocytozy při vstupu poxvirů do buňky je v tom, že velikost virionů je příliš velká, aby byl umožněn vstup jiným mechanismem přes plazmatickou membránu. Dalším důvodem je, že uvnitř pinozomu je kyselé prostředí, a virionům poxvirů se při nižším pH začíná rozvolňovat nukleoid a začíná proces vývoje virionu uvnitř hostitelské buňky (Mercer et al., 2010). Dalším důvodem může být, že pinocytární vakuola proniká hlouběji do cytoplazmy infikované buňky, než jiné endozomy, a tím uniká obranným a jiným reakcím hostitele. To je případ ITEV, kdy tato tzv. mezistádia byla pozorována hlouběji v cytoplazmě. Podobné vakuoly byly popsány i u rodu *Phlebovirus* z čeledi *Bunyaviridae*, kde byl virus po vstupu do buňky pozorován v multivezikulárním endozomu (Lozach et al., 2010).

Je otázka, do jaké míry se u ITEV může jednat o pinocytozom. Makropinocytoza byla popsána u viru vakcínie, resp. formy EEV, která má oproti virionu, který se do buňky dostává splynutím s plazmatickou membránou hostitele, o jednu membránu navíc a nemůže tedy splynout s plazmatickou membránou a uvolnit do cytoplazmy genom. Právě makropinocytoza je mechanismem, jak se tato forma VACV dostává do buňky. Ve vzniklé pinocytární vakuole navíc dochází ke snižování pH a rozpouštění extra povrchové membrány. Membrána virionu potom splývá s membránou endozomu a uvolňuje genom virionu do cytoplazmy (Schmidt et al., 2012). U ITEV nebyly viriony s extra membránou pozorovány, a je otázka, jestli se jedná o makropinocytární vakuolu. U ITEV uvnitř endozomu nebylo pozorováno splývání membrán virionu a endozomu. Zřejmě dochází k rozpouštění membrány virionu a uvolňování genomu virionu po částech v globulárních měchýřkách, kdy se rozvolní membrána endozomu a globuly vyputují do cytoplazmy.

U ITEV je vstup do buněk střevního epitelu primárně zprostředkován mechanickým vstupem virionů, vyčnívajících z proteinové masy sféroиду. Vyčnívající virion je přitlačen na plazmatickou membránu epitelu (viz výše). Další krok - vstup virionu do buňky přes plazmatickou membránu (Perera et al., 2010; Schramm & Krijnse-Locker, 2005) - nebyl u ITEV pozorován. Mezistádium, pozorované v cytoplazmě některých ITEV infikovaných buněk, je zřejmě endozom, popř. jiný typ měchýřku (Mercer et al., 2010; Pelkmans & Helenius, 2003; Tokarev et al., 2009), ve kterém se vstupující virion mění a DNA genomu je rozdělena na jednotlivé úseky a zabalena do měchýřkovitých globulů, uzavřených do membrán, zřejmě vzniklých z obalu nukleoidu (core sac). Toto stádium ve vývoji se otevírá nepravidelným otvorem a jednotlivé globuly s částmi genomu jsou uvolňovány do cytoplazmy. Z nich se pak vyvíjí RNA/DNA replikační skupiny genomů. Ve stejném čase se obaly nukleoidu množí do stejného množství, jako je globulů a ty obalí DNA sekvence a tvoří genom globulů. Globuly ITEV tak mohou být ochrana částí DNA před degradačními procesy v cytoplazmě hostitelské buňky (Schramm & Krijnse-Locker, 2005). Masa stromatu je tvořena odděleně a produkuje srpkovité membrány (měsíčky). Soupravy DNA globulů plní tyto srpkovité části membrán (kalíšky) a ty jsou potom uzavřeny a tvoří pre-virová stadia ITEV.

U viru vakcínie primární mRNA transkripty reprezentují asi 50 % genomu, a jsou původně syntetizovány z obou vláken DNA enzymy, které jsou přítomné v nukleoidu, včetně virem kódované RNA polymerázy. Transkripty jsou uvolněny z nukleoidu pro translaci na hostitelských ribozomech. Během syntézy raných proteinů je syntéza hostitelských makromolekul inhibována. V genomu virionu je kódováno přibližně 100 mRNA, které jsou syntetizovány virem kodující ranou transkripční mašinerii, která je součástí nukleoidu při vstupu virionu do buňky. Raná mRNA, vytvořená uvnitř genom obsahujícím nukleoidu, je potom uvolněná do cytoplazmy pro translaci (Schramm & Krijnse-Locker, 2005).

V pozorovaném materiálu ITEV při morfogenezi viru nebyly objeveny struktury ani lokalizována stádia tvorby nového viru, odpovídající expresi jednotlivých genů - raných, středních a pozdních genů. V lokalizovaných replikačních zónách, zejména globulárních, je třeba nasyntetizovat velké množství genomu, potřebného k tvorbě přibližně 200 virionů a několika desítek mikrovřeten na jeden sféroid. K tomu je potřeba v rané fázi vývoje velmi aktivní biochemický aparát. U AMEV bylo determinováno asi 35 strukturálních proteinů, u MSEV okolo 40 strukturálních proteinů (Langridge & Roberts, 1982; Langridge, 1983b; Langridge et al., 1983; Langridge, 1983a).

U čeledi *Picornaviridae* (RNA viry) dochází k replikaci RNA v cytoplazmě a následné enkapsidaci nareplikované RNA a z takto vzniklých nukleokapsid se následně tvoří viriony (Richards & Jackson, 2013). U ITEV byla pozorována, kromě globulů uvolňovaných z endozomu, i globulární zóna replikace, která je ale jiného typu, než dříve popsáné případy (Radek & Fabel, 2000). V měchýřcích může docházet k obalování nareplikovaných částí genomu ITEV, které se následně spojují uvnitř nezralého virionu. Během zrání virové částice se nareplikované úseky genomu spojují a tvoří kompletní dsDNA genom komplexní ITEV virové částice. V případě globulů, vyplňujících srpkovité membrány, se ale nejedná o nukleokapsidy, ale až uvnitř membrány virionu vznikají dvojité membrány obalu nukleoidu a samotný nukleoid s genomem ITEV.

Rané geny jsou exprimovány z částečně rozbalených virionů před transkripcí DNA (Schramm & Krijnse-Locker, 2005). Kódují nestrukturální proteiny, enzymy zapojené v replikaci genomu a modifikacích DNA, RNA a proteiny pro neutralizaci hostitelské imunitní odpovědi. U ITEV nebyly pozorovány hostitelské imunitní reakce na infekci, ale neznamená to, že neexistují. U hmyzu bylo popsáno několik strategií, jak se napadené buňky hostitele brání virové infekci (Beckage, 1996), žádný ale nebyl u ITEV infekce pozorován.

### 6. 3. Použití EV pro biologickou ochranu

Entomopatogenní viry jsou v některých případech vhodným prostředkem biologického boje se škůdci v zemědělství a lesnictví. Jedná se zejména o viry čeledi *Baculoviridae*, z nichž přibližně 24 je registrovaných k použití proti jednotlivým škůdcům (Lapointe et al., 2012).

Entomopatogenní poxviry nejsou z hlediska biologické ochrany vhodným bioagens. Jejich použití bylo zprvu limitováno podobností s CV a obavou z přenosu EV na savčí, resp. obratlovčí hostitele. Prvně byl testován EV z housenek obaleče *Choristoneura fumiferana* a jeho přenos na malé savce a ptáky (Buckner & Cunningham, 1972). Pokusy s MMEV a jeho použitím v biologické ochraně proti ponravám chroustů ukázaly, že se virus dá úspěšně introdukovat do populací chroustů a virus zůstává infekční v půdě (Hurpin & Robert, 1972).

Stejně jako v případě bakulovirů již schválených a používaných, je použití virů v biologické ochraně závislé na kvantitě a ekonomické rentabilitě produkce viru, na spektru hostitelů, které je virus schopen zabít a na době infekce od nakažení po úhyn hostitele. Všechny tyto aspekty hrají v případě použití EV v biologické ochraně velmi zásadní roli. U EV je doba infekce, zejména u larev brouků, velmi dlouhá. Doba od nakažení po uhynutí může trvat podle teploty až 40 týdnů - viz výše (Goodwin & Roberts, 1975; Hurpin & Robert, 1968; Milner & Lutton, 1975). Během této doby je larva schopná normálně, alespoň v začátku infekce, škodit téměř stejně, jako nenakažená larva. Tím se efekt ochrany vytrácí.

Lepší situace je u EV z motýlů a sarančat. U těchto skupin probíhá infekce rychleji, v závislosti na teplotě přibližně 4 týdny. Existují ale EV, které naopak prodlužují vývoj housenek. U *C. fumiferana* infekce EV zabraňovala metamorfóze a housenky zůstávaly v jednom stádiu a přijímaly potravu. U infikovaných larev byla zjištěna vyšší hladina juvenilního hormonu a nižší hladina ekdysonu (Palli et al., 2000).



Použití ITEV v biologické ochraně smrkových porostů proti I. smrkovému je limitováno výše uvedenými skutečnostmi. Přesto, že infekce u I. smrkového, trvá výrazně kratší dobu, než je tomu u infekcí u jiných brouků, je doba 4 týdnů, kdy trvá infekce velmi dlouhá. Alespoň během prvních dnů infekce může brouk létat, hlodat v lýku, i se zřejmě pářit bez jakýchkoliv problémů, protože nakažení brouci se nacházeli ve feromonových lapačích (osobní sdělení dr. Weiser). Až v pokročilé fázi infekce, kdy je celé střevo vyplněné sféroidy ITEV, jsou brouci v laboratoři viditelně méně aktivní (Tonka & Weiser, 2009). Ve střevě dochází také k syntéze feromonů, a je otázka, zda dochází k inhibici této syntézy a zejména kdy, pokud je u lýkožroutů vyvolána masivní infekce střevní tkáně.

Pokud budeme předpokládat, že se dá virus použít v ochraně smrčín, a některé pokusy v terénu nasvědčují tomu, že lze indukovat zvýšenou infekci ITEV v přírodní populaci (Weiser et al., 2000), tak je otázka, jak virus do populace introdukovat. Brouci se v přírodních populacích nakazí především v době úživného žíru, kdy v silně napadených stromech dochází k masivnímu přenosu nákaz. Pokud je napadení smrku v základním stavu, brouci se během úživného žíru vyhýbají chodbám dříve vyhlodaným. V případě silné nákazy hlodají i přes larvální a mateřské chodby a trusem si předávají nejen virus, ale i jiné patogenní agens. Tomu by nasvědčovalo poznání, že ITEV byl u nás nalezen pouze na Šumavě a v Krkonoších, kde probíhaly velké kůrocové kalamity.

Vypouštění nakažených jedinců je jedním ze způsobů, jak introdukovat ITEV do přírodních populací. Lýkožrouti ihned po infekci by se vypustili ve smrkovém porostu a sami by přenášeli virus v populaci. Podobné pokusy s introdukcí viru do populací kontaktními lapáky byly použity v případě bakulovirů u bekyně nebo obaleče jablečného (Stara2002; Švestka & Pultar, 2006).

#### 6. 4. *Chytridiopsis typographi*

Výsledky, získané z laboratorní (umělé) infekce *Ch. typographi* ukazují některé odlišnosti, které nebyly v prvních popisech této mikrosporidie pozorovány (Purrini & Weiser, 1984; Purrini & Weiser, 1985). Během rané fáze vývoje patogena se v epiteliální vrstvě střeva I. smrkového tvoří mnoho vegetativních stádií. Klasifikace a terminologie těchto stádií vyžaduje více komparativních analýz, ale v získaných pozorováních se tato stádia provizorně nazývají "meronti".

Ve studovaném materiálu mají meronti specifickou část vývoje, nazývanou štěpení (budding), která předchází stádia vstupující do sporogoniální části vývoje. Každý meront tvoří odštěpením sesterský meront. Sesterské meronty se vyvíjejí odděleně a nezávisle. Slouží ke zvýšení (namnožení) počtu vegetativních stádií mikrosporidie a tento proces, který nebyl nikde dříve u mikrosporidií popsán, nahrazuje merogoniální dělení u ostatních mikrosporidií.

Tento proces štěpení nebyl pozorován u *Chytridiopsis trichopterae* ani u *C. socius*, a nebyl popsán ani v předchozích popisech *Ch. typographi* (Larsson, 1993; Marnier & Ormières, 1968; Purrini & Weiser, 1984; Purrini & Weiser, 1985). Podobné struktury s podobnou funkcí byly popsány u mikrosporidii *Buxtehudea scaniae* a u *Nolleria pulicis* z blechy *Ctenocephalides felis* (Larsson, 1980; Beard et al., 1990). V obou případech se tvoří ze sporogoniálních plazmodií tenkostěnné spory. Začátek sporogonie a konec merogoniální fáze životního cyklu je u těchto dvou mikrosporidií složité odhadnout. Netvoří se u nich tlustostěnný sporoforní měchýřek.

Během presporogoniální fáze stejně jako u obou typů sporogonie (tenko- a tlustostěnné) u mikrosporidie *Ch. typographi* se na jaderné membráně přichycuje dříve akumulovaný elektron - denzní granulární materiál. V předešlých popisech *Ch. typographi* nebyly tyto struktury pozorovány, což může být způsobeno jiným postupem fixace a zpracováním vzorků pro TEM. U mikrosporidie *C. socius* byl podobný

denzní materiál popsán, stejně jako u mikrosporidie *C. trichopterae*, kde ale nebyl elektron - denzní materiál spojen s jadernou membránou (Larsson, 1993; Manier & Ormières, 1968). U mikrosporidie *B. scaniae* je tento materiál u jader pouze některých vývojových stádiích, u *N. pulicis* je tento typ materiálu přítomen u jader všech stádií (Larsson, 1980; Beard et al., 1990).

Funkce těchto struktur není jasná. U mikrosporidie *Ch. typographi* má téměř každé jádro tyto granulace od stádia raného meronta (téměř začátek vývoje) až do stádia pozdního sporoblastu (pak se tvoří spora, jako konečné stádium celého cyklu). Zdá se, že tyto skvrny nemají žádnou specifickou strukturu nebo orientaci, ale jsou v místech jaderné membrány a v některých případech mají typickou strukturu jaderného plaku (Vávra, 1986) s membránou uspořádanou do dvou vrstev a s mikrotubuly namířenými do centra jádra. V některých fázích vývoje, tak jak byl pozorován, je jádro dezorganizováno a tyto elektron - denzní skvrny indikují umístění jádra.

V průběhu tlustostěnné sporogonie se štěpící sporoblasty jako prstovité výběžky objevují v centrální vakuole uvnitř sporogoniálního plazmodia. Zbytek plazmodia mimo centrální vakuolu vyplňuje stěnu sporoforního měchýřku a tvorba sporoblastů a spor je asynchronní proces. Tento proces byl popsán u mikrosporidie *Ch. typographi* již dříve (Purrini & Weiser, 1984). U tenkostěnné sporogonie se štěpení sporoblastů děje najednou a tento proces je velmi přesný a synchronizovaný.

Tvorba krátkého pólového vlákna je charakteristickým znakem všem doposud popsaným druhům čeledi *Chytridiopsidae* (Larsson, 1993; Manier & Ormières, 1968). Běžný systém polaroplastu a vlákna, který je vlastní všem "vyšším" mikrosporidiím, je u zástupců rodu *Chytridiopsis* silně modifikován a redukován na krátké vlákno v pólovém vaku. Vlákno je fixováno systémem elektron - denzních kulovitých sekrecí, tvořících plástvovitou strukturu, která tvaruje vlákno mikrosporidie.

Pólový vak tlustostěnných spor je podélně složená struktura, vyplněná prázdnými kulovitými strukturami držícími vlákno. Tyto globuly jsou volné s jemnou membránou. Podobné volné globuly byly popsány v pólovém vaku u *C. socius* (Manier & Ormières, 1968). U *C. trichopterae* systém miniaturních vakuol tvoří plástvovitou strukturu, kde jsou jednotlivé vakuoly uspořádané do sítě denzního materiálu a nejsou odděleny jemnou membránou (Larsson, 1993). Stejné uspořádání pólového vaku bylo popsáno u mikrosporidie *Steinhausia brachynema* (Richards & Sheffield, 1970). U mikrosporidie *N. pulicis* jsou kulovité globuly, vyplňující vak uspořádány jednotlivě (Beard et al., 1990), u *B. scaniae* je vlákno spor jedné ze sporogoniálních sekvencí uzavřeno ve spirálně stočeném vaku, kde se tvoří sekreční vlákna (Larsson, 1980). Tlustostěnná spora s chitinem vyztuženou endosporou má vlákno stočené způsobem, typickým pro vyšší mikrosporidie. Pouze sporám chybí polaroplast.

## 7. Závěry

Výsledky, získané během výzkumu dvou patogenů *I. typographus*, se dají rozdělit na část virologickou a část mikrosporidiální. V obou případech se podařilo jak ITEV, tak mikrosporidii *Chytridiopsis typographi* s úspěchem přenést do laboratoře a indukovat laboratorní infekci dospělých brouků I. smrkového. V současné době, i během řešení tématu, je infekční přenos těchto dvou patogenů na imága lýkožrouta rutinním procesem s velkým procentem úspěšnosti.

V části virologické se podařilo vyprodukovat dostatečné množství materiálu pro infekční pokusy. Podařilo se zachytit infekci ITEV ve střevě I. smrkového. Během studia vývoje viru byly získány nové poznatky o morfogenezi viru, které nebyly publikovány v původních popisech ITEV.

- Dva typy replikačních zón - viroplazma typu I (virogení stroma) a replikační zóna s množstvím malých globulí (měchýřků). Je možné se domnívat, že tyto měchýřky obsahují část nově nasyntetizovaného genomu viru a po vstupu do srpkovitých membrán se rozpouští a genom se v přesném pořadí spojuje a vzniká kompletní genom viru.
- Nebyl zachycen vstup virionů do buněk střevního epitelu ani průchod virionů plazmatickou membránou. Nebyly pozorovány formy extracelulárního virionu, kterým se šíří infekce uvnitř hostitele. Byly naopak pozorovány viriony volně vyčnívající z povrchu sféroиду. Během peristaltických pohybů střeva, kde jsou sféroidy vylučovány lyzovanými epiteliálními buňkami, dochází k přitlačování těchto vyčnívajících virionů ke stěně střeva a tyto viriony pronikají do buněk.
- Poprvé bylo u EV pozorováno tzv. "mezistádium", což je zřejmě forma endozomu, která slouží k transportu virionu do cytoplazmy hostitelské

buňky. Uvnitř zřejmě probíhají první kroky vedoucí k replikaci viru, dochází zde vlivem nízkého pH k rozpouštění virionu, uvolnění genomu ve formě jednotlivých globulů a po rozpuštění endozomalní membrány k uvolnění těchto partikulí do cytoplazmy, kde začíná první část vývoje nového viru.

- Na rozdíl od prvních popisů byl zaznamenán průběh syntézy a vzniku mikrovřeten. Byly také poprvé u ITEV pozorovány první kroky okluze virionů do sféroidu, včetně okluze mikrovřeten. Bylo prvně popsáno rozložení sféroidů ve střevní tkáni a rozložení cytoplazmatických ohnisek reprodukce uvnitř hostitelské buňky.
- Infekce ITEV probíhá, na rozdíl od všech ostatních EV infekcí u larev brouků, rychleji. První sféroidy se dají ve střevě zachytit již po dvou týdnech infekce. Na rozdíl od typového viru, MMEV, a dalších EV, se ITEV vyskytuje ve střevě dospělých brouků.
- Infekce se v hostiteli nešíří hemocyty, jak bylo popsáno v některých případech u EV nebo mikrosporidií. Infekce hemocytu, která je reprodukována ve výsledcích, není infekcí, která by byla roznášena po jednotlivých tkáních, ale zřejmě se jedná o nákazu hemocytu jako takovou.
- Získané výsledky jsou prezentovány ve formě publikace o funkci a struktuře "mezistádia". Práce bude zaslána do Journal of Invertebrate Pathology a manuskript je přílohou dizertační práce.
- Další získané výsledky budou prezentovány ve formě publikací o syntéze a morfogenezi mikrovřeten, a o celém vývoji a morfogenezi ITEV s tím, aby se dal ITEV zařadit jako oficiální druh do taxonomie virů, kde je prozatím umístěn pouze provizorně. Do budoucna lze vzhledem k získanému materiálu počítat s molekulární analýzou genomu tohoto viru, která by se tak stala první molekulární analýzou genomu EV z brouků. Otázkou ale je, zda by i nadále patřil tento druh do rodu *Alphaentomopoxvirus*.

- Otázka použití ITEV v biologické ochraně není v současném stavu poznání aktuální. Nejprve je třeba vyřešit otázku introdukce ITEV do přírodních populací, až teprve po nalezení strategie introdukce viru do populace se může diskutovat a sledovat otázka použití ITEV jako bioinsekticidu.

Stejně jako v případě ITEV, se v případě mikrosporidie *Ch. typographi* podařila úspěšná laboratorní infekce a přenos mikrosporidie na dospělé brouky. Infekce je v současné době stejně rutinní, jako v případě nákazy ITEV. Stejně jako v případě viru se podařilo najít několik nových poznatků, které nebyly publikovány v původních popisech a které byly poprvé zachyceny až na materiálu laboratorní infekce.

- Výsledky, které byly získány při studiu laboratorní infekce mikrosporidií *Ch. typographi*, doplňují, a v některých případech revidují znalosti vývojového cyklu, získané dřívějším studiem této mikrosporidie a nabízejí možnost srovnávacích pozorování s pracemi dřívějších autorů. Možnost získat v laboratoři infikovaného hostitele mikrosporidií *Ch. typographi* je dobrou příležitostí jak lépe prozkoumat vývojový cyklus této mikrosporidie. Tento patogen tvoří během svého cyklu zde popsané struktury a stádia s různou intenzitou a v různém množství, ale není pochyb o tom, že popsaná vegetativní stádia a štěpící se meronti se mohou vyskytovat ve vývoji mikrosporidie *Ch. typographi*, popř. ve vývoji všech ostatních zástupců rodu *Chytridiopsis*.
- Poprvé byl u mikrosporidií popsán proces odštěpování vegetativních stádií během vývoje. Tento proces je u mikrosporidií unikátní a nebyl nikde dříve pozorován. Výsledky a popis tohoto jevu byly publikovány v *Journal of Invertebrate Pathology* a práce je součástí přílohy této dizertace.
- Byly popsány útvary, podobné mitozomum, organel dříve popsáných u některých mikrosporidií a prvoků. Tyto výsledky jsou součástí publikace,

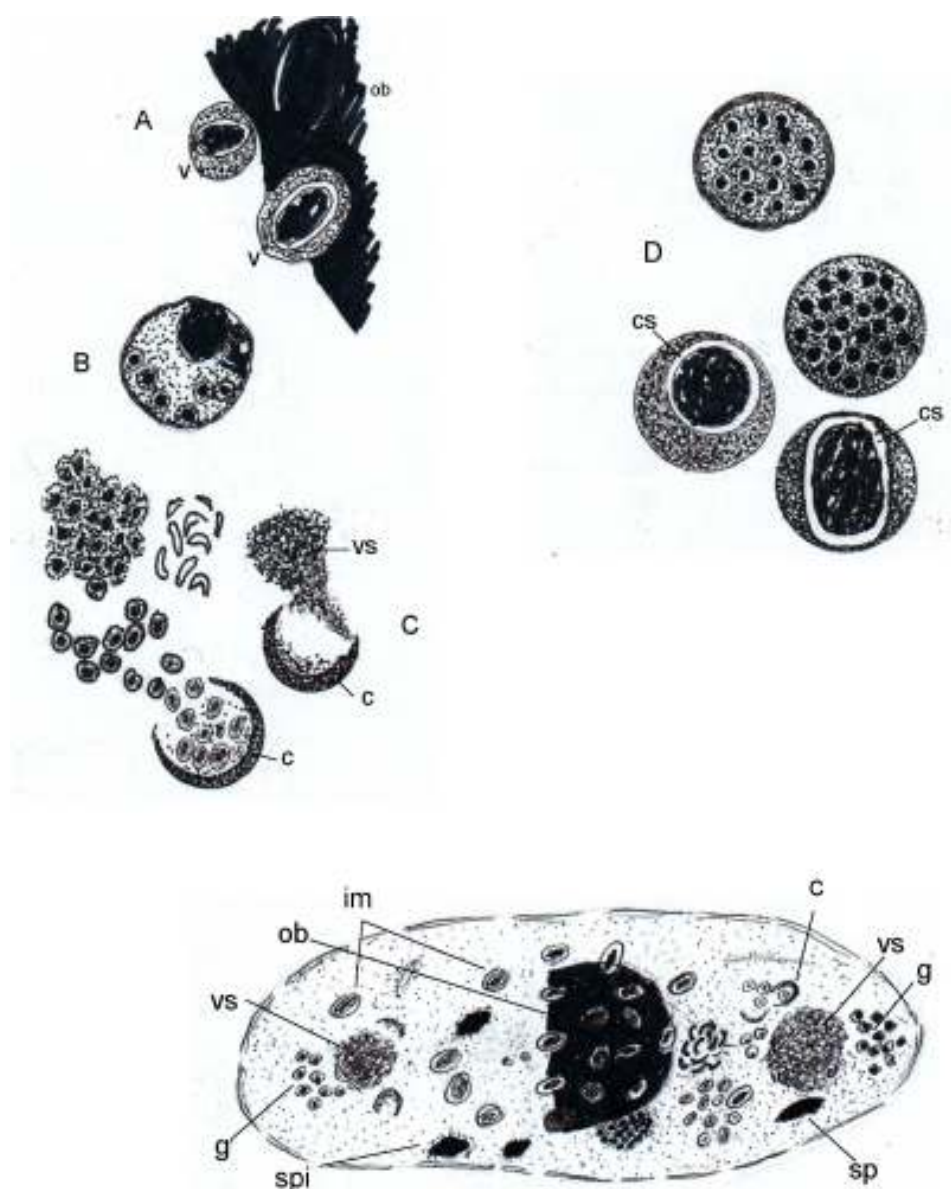
---

která je připravená ve formě manuskriptu. Manuskript je ve formě přílohy v kap. 11.

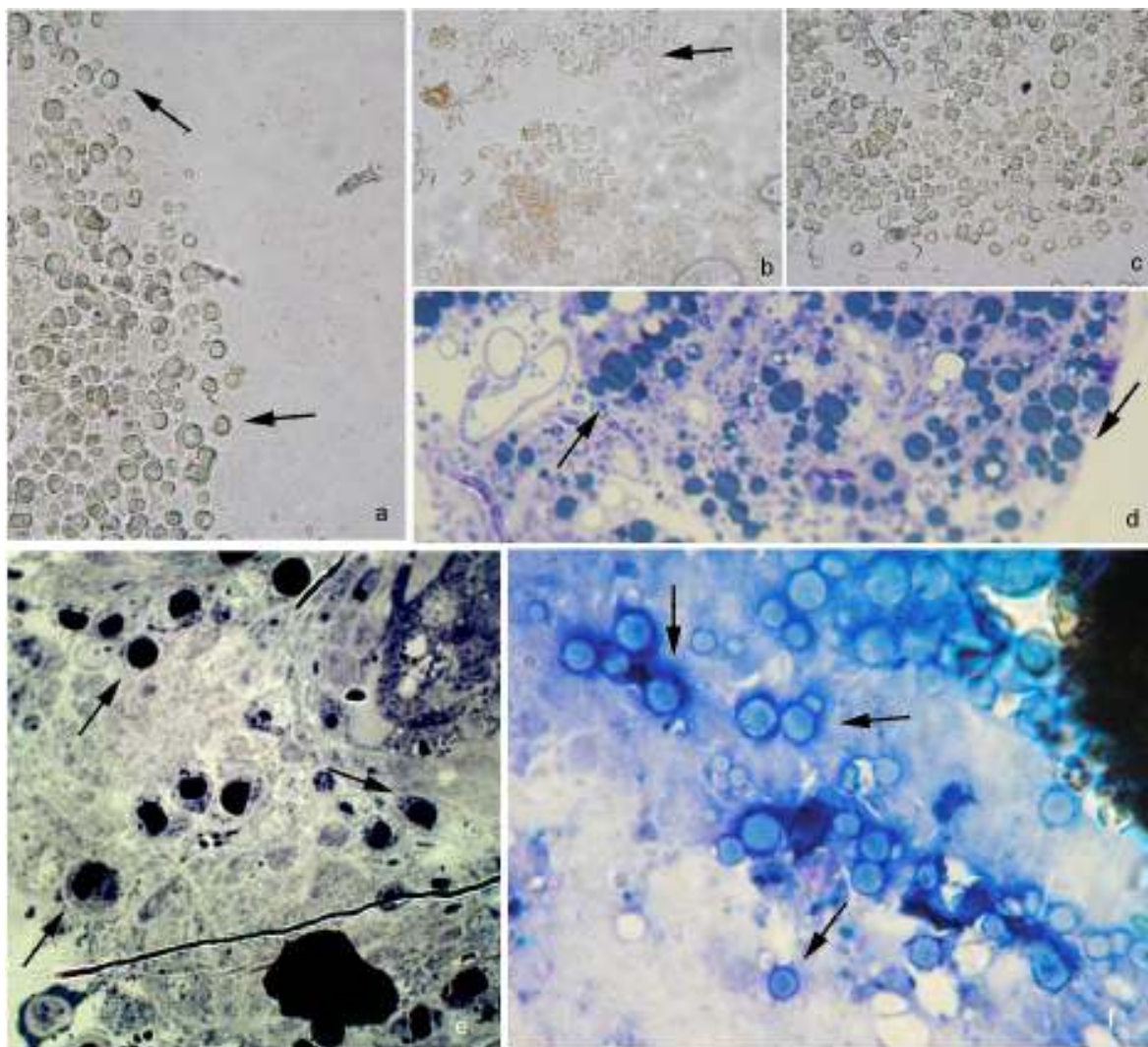
- Je připravena publikace o ultrastruktuře a vývoji mikrosporidie *Ch. ty-pographi*, která je také součástí příloh této práce. V současné době se zpracovává molekulární analýza genomu této mikrosporidie, která bude součástí připravované publikace.



## 8. Obrazová příloha



**Obr. 1.** Schematický vývoj ITEV. **A.** Volný a vyčnívající virion (v) z okluzního tělíska - sféroidu (ob). **B.** Mezistádium. **C.** Replikační fáze vývojového cyklu viru. Virogenní stróma (vs), granule a tvorba srpkovitých obalů (c - crescent shape). **D.** Zrání virionu, kdy se z nezralého viru stává zralý virion s obalem nukleoidu (cs - core sac). **Dole:** Schéma lokalizace virové replikace v buňce. Okluzní tělísko (ob), nezralý virion (im), virogenní stróma (vs), globule (g) mikrovřetena (microspindles - spi), srpkovité obaly (c).

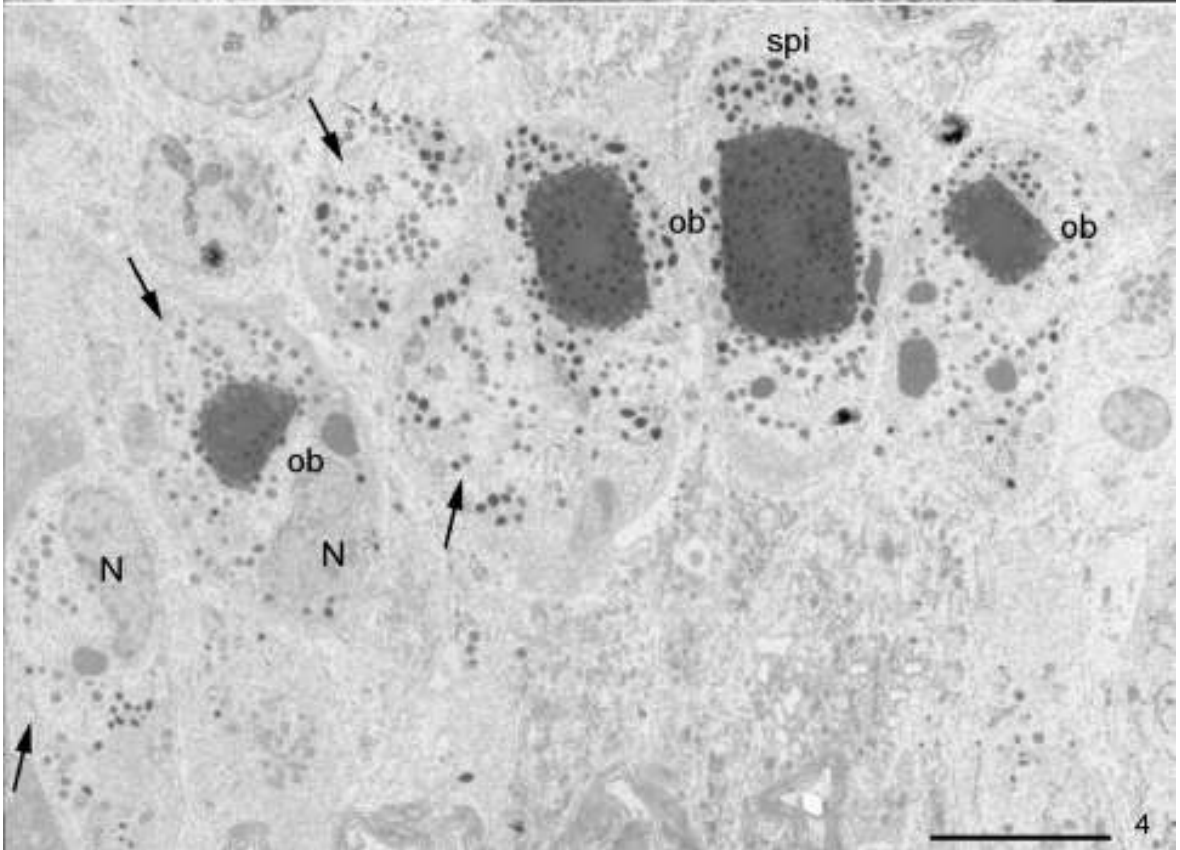
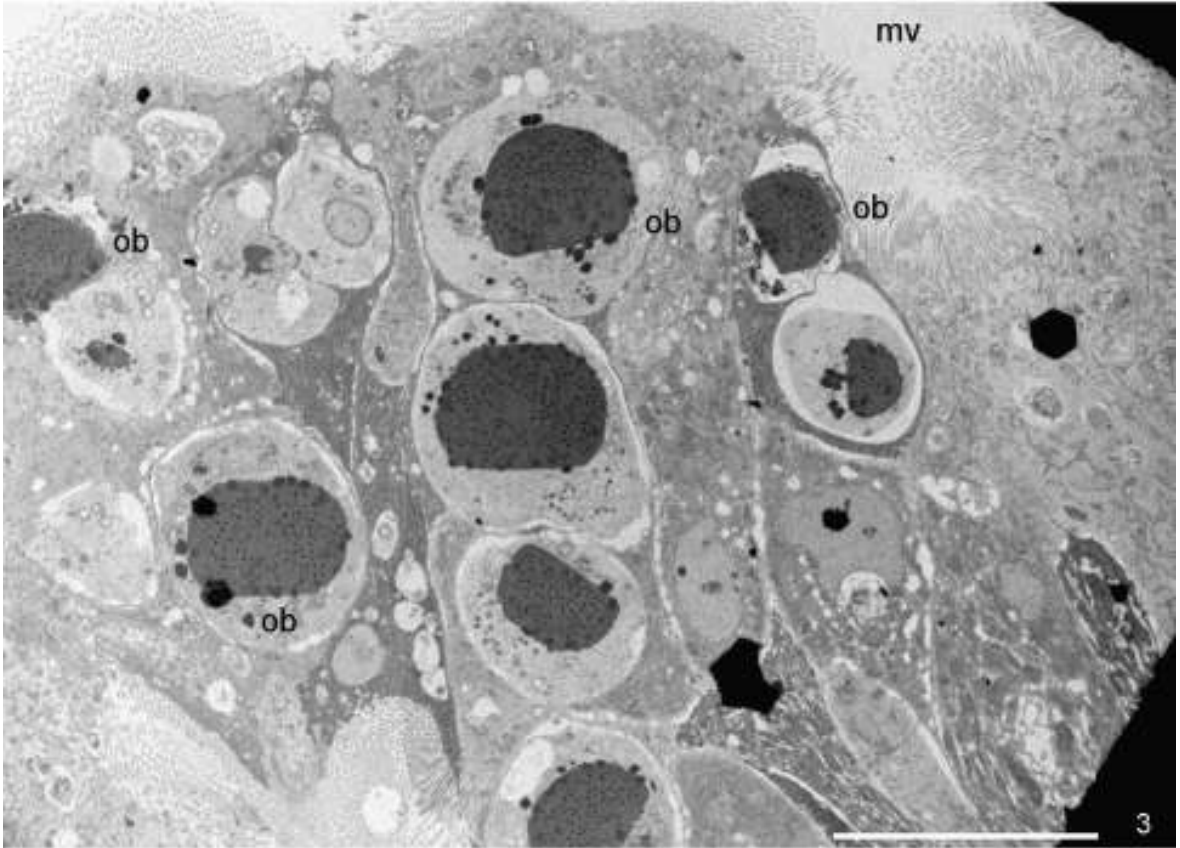


**Obr. 2.** ITAV ve světelném mikroskopu. **a, b, c** Suspenze viru v BIS - sféroidy (šipky). **d, e** Řez infikovaným střevem s granulemi jednotlivě ležícími v tkáni (šipky). Barveno toluidinovou modří. **F.** Roztěr infikovaného střeva barvený metodou Giemsa - Romanovský. Sféroidy jednotlivě na roztěru (šipky).

---

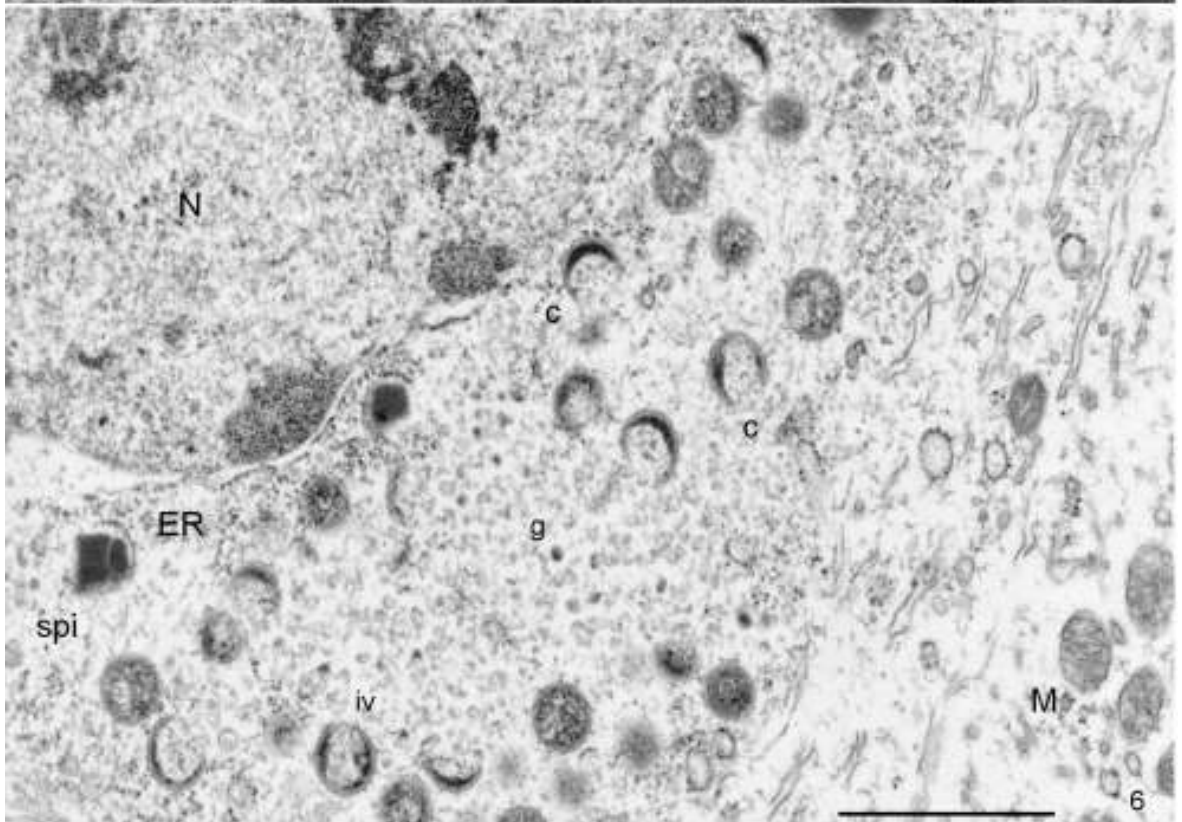
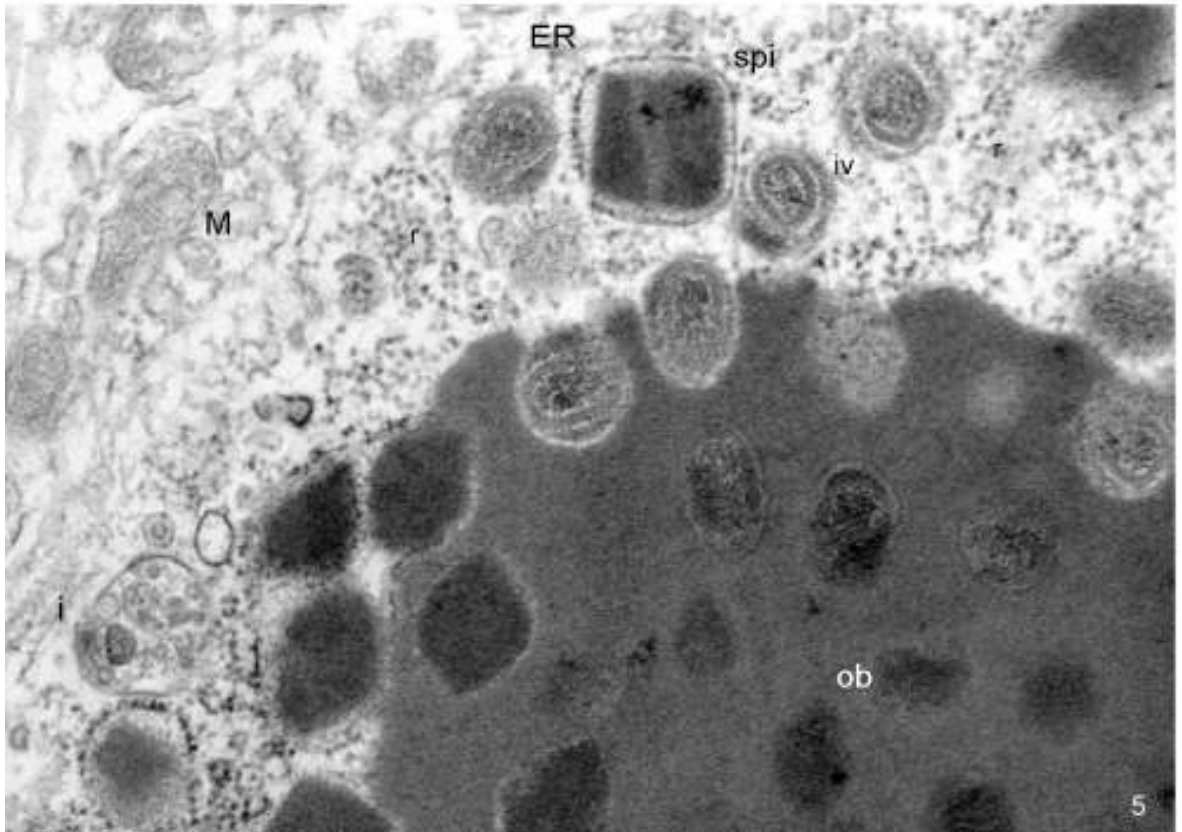
**Obr. 3.** Celkový pohled na střevo I. smrkového infikovaného virem ITEV. Jednotlivé sféroidy (ob) po jednom v každé buňce střeva, některé sféroidy možná v procesu uvolňování do střevního lumenu. Mikrovili (mv). Bar = 10  $\mu\text{m}$  .

**Obr. 4.** Jednotlivé sféroidy (ob) v buňkách střeva. Jádra hostitelských buněk (N). V některých buňkách střeva dochází k rané tvorbě virionů, zatím neokludovaných do sféroidu (šipky). Bar = 5  $\mu\text{m}$ .



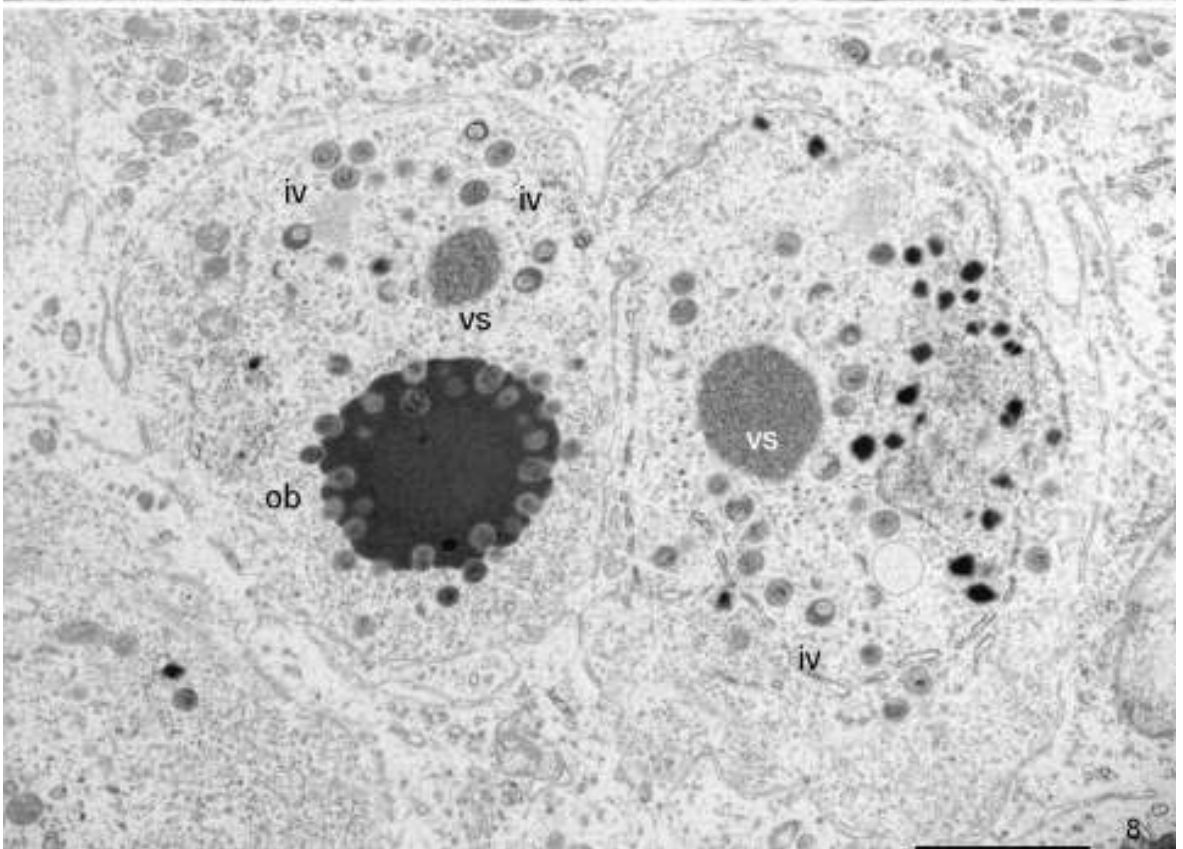
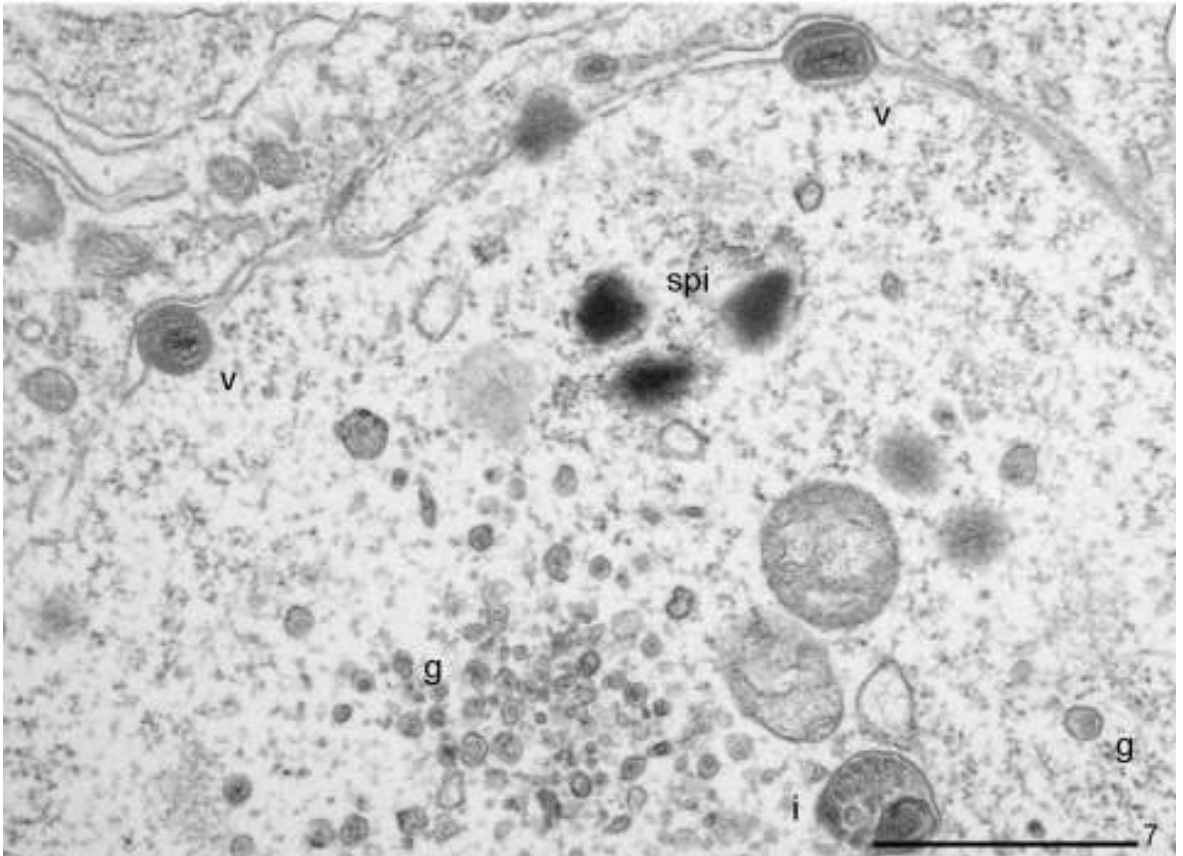
**Obr. 5.** Okraj sféroidu (ob) s okludovanými mikrovřeteny a viriony. Viriony na okraji sféroidu ve fázi okluze. Mezistádium (i) oválného tvaru, zřejmě ve fázi uvolňování svého obsahu (rozvolněný povrchový obal). Mitochondrie (M) a ribozómy (r) v cytoplazmě hostitelské buňky, stejně jako volné nezralé viriony (iv). Jedno čtvercovité mikrovřeteno (spi), uzavřené v tenké vnější membráně endoplazmatického retikula (ER).

**Obr. 6.** Replikační zóna v cytoplazmě hostitelské buňky. Otevřené polokulovité kalíšky membrán (crescent - c), plnicí se globulárním materiálem (g) ze zóny replikace, některé membrány se uzavírají a vytvářejí první stádium nezralého virionu (iv). V blízkosti hostitelského jádra (N) se v membráně endoplazmatického retikula (ER) tvoří mikrovřeteno (spi). Mitochondrie (M) hostitelské buňky a membrány endoplazmatického retikula. Bar = 1  $\mu$ m.



**Obr. 7.** Replikační zóna s globulemi (g) v blízkosti mitochondrií hostitelské buňky. Mezistádium (i). V cytoplazmě hostitelské buňky se tvoří mikrovřetena (spi). Na dotyku s plazmatickou membránou dva viriony ITEV (v). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 8.** Dvě buňky střevního epitelu *I. typographus*, nakažené virem se zřetelnými replikačními zónami viru (šipky). Zóna s globulemi a zásoba virogenního strómatu (vs) leží v cytoplazmě spolu se stádií virionů v různé fázi zralosti (iv). V jedné buňce se tvoří už sféroid (ob). V pravé buňce zřetelné membrány endoplazmatického retikula (ER). Ani v jedné buňce není vidět jádro, sféroid v levé buňce se může tvořit v místě jádra hostitelské buňky. Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

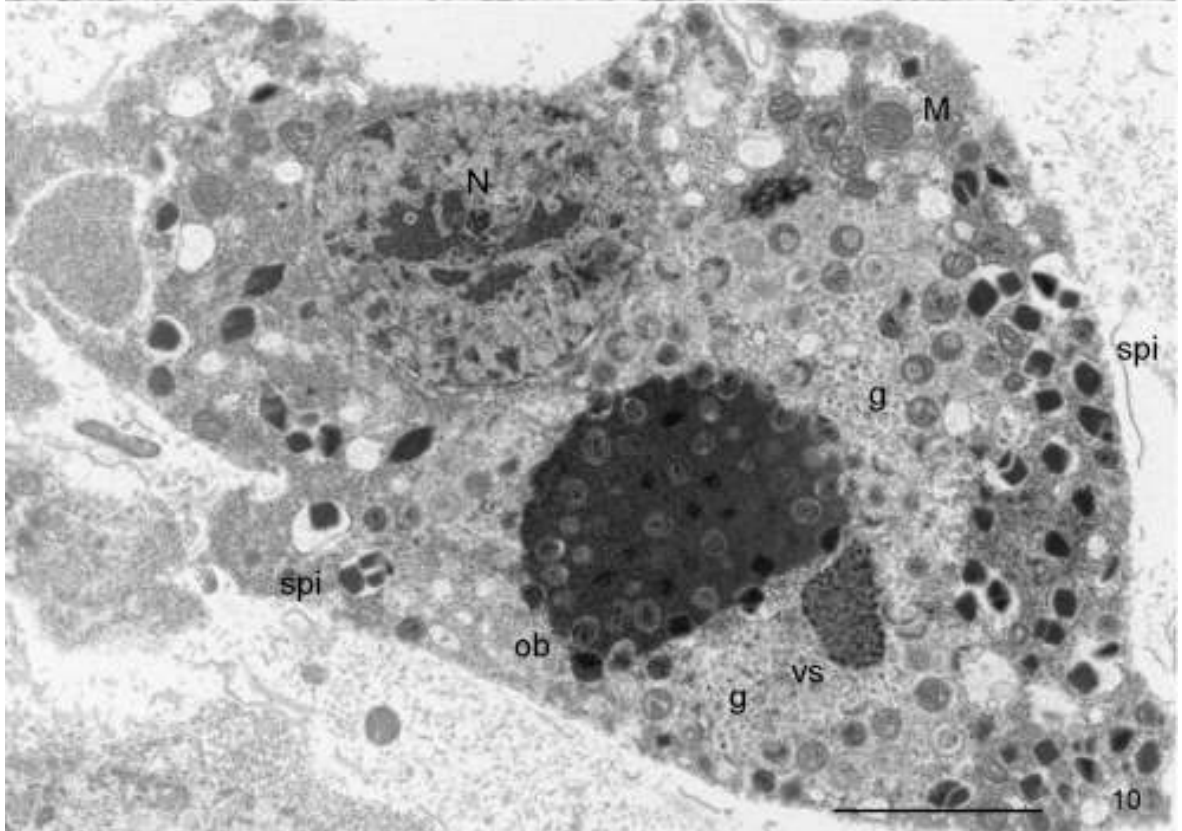
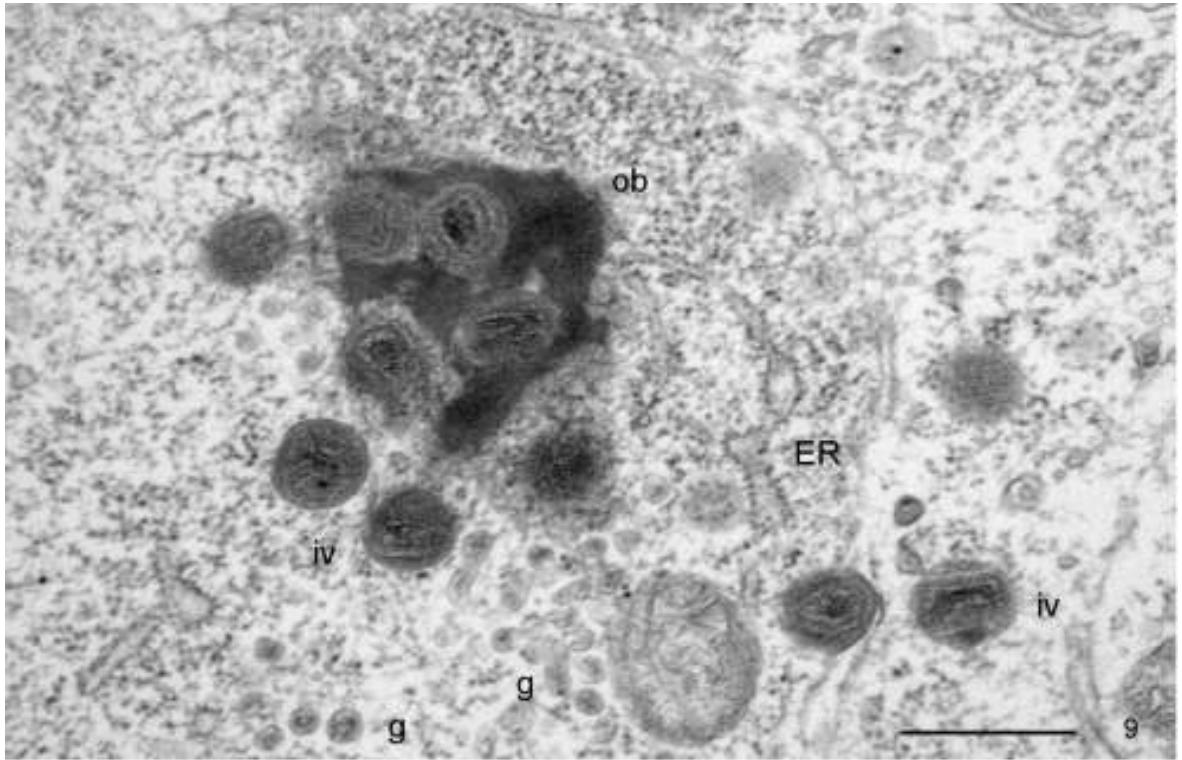




---

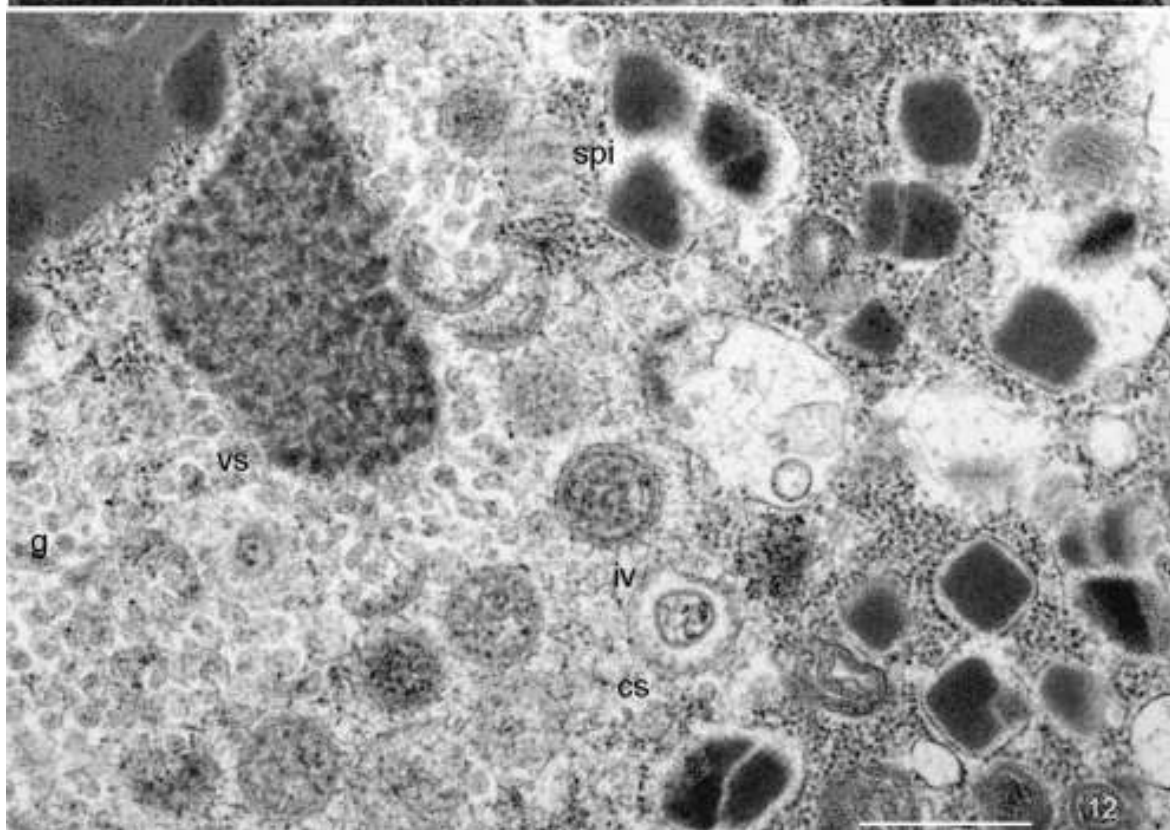
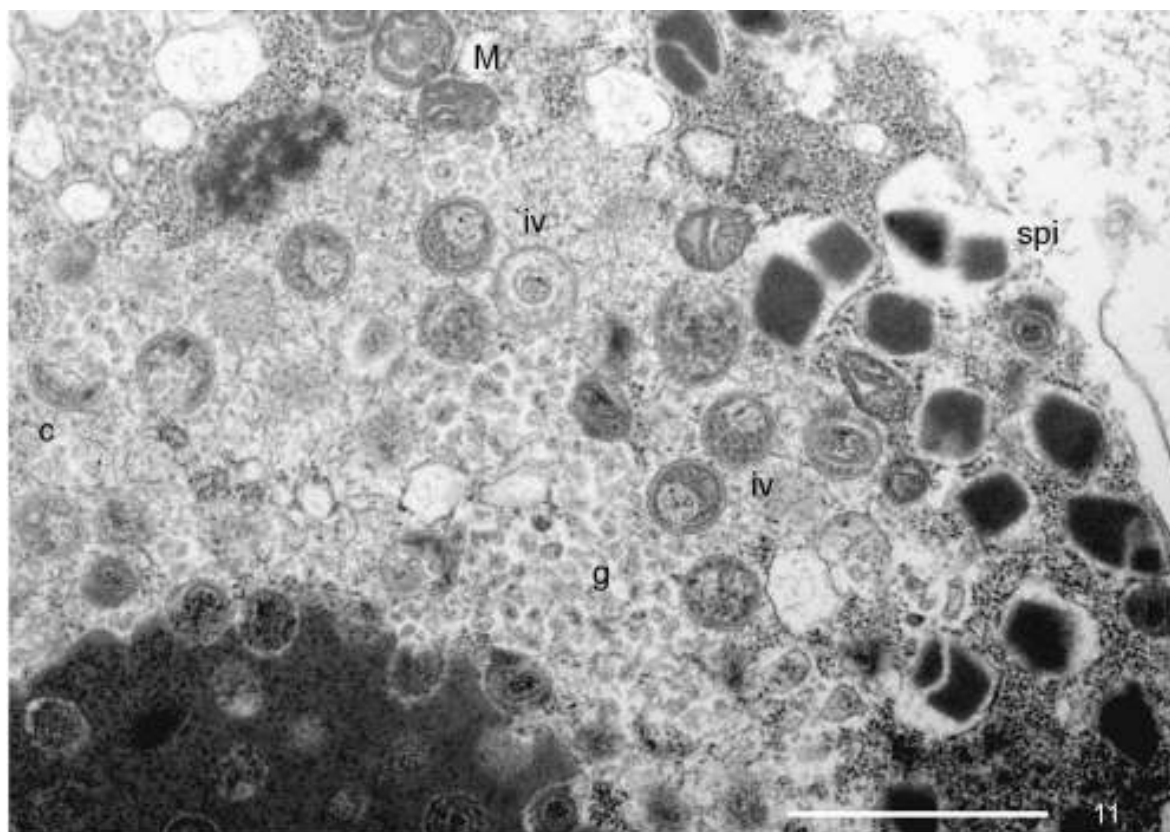
**Obr. 9.** Začátek tvorby sféroиду. Protein sféroиду (ob) začíná okludovat maturující viriony (iv). V blízkosti sekrece proteinu v cytoplazmě hostitelské buňky cisterny endoplazmatického retikula (ER). V blízkosti hostitelské mitochondrie globulární replikační zóna (g). Bar = 500 nm.

**Obr. 10.** Hemocyt lýkožrouta, vyplněný vývojovými stádii viru. V okolí sféroиду (ob) jsou globulární replikační zóny (g), na okraji hemocytů se tvoří mikrovřetena (spi). V blízkosti sféroиду je zbytek virogenního stromatu (vs). Dobře fixované jádro hemocytu (N) a mitochondrie (M). Bar = 2  $\mu$ m.



**Obr. 11.** Detail infikovaného hemocytu z předchozího obrázku. V blízkosti sféro-  
idu je globulární replikační zóna (g). Polokulovitá srpkovitá membrána (c) budoucího  
virionu se plní globulemi z cytoplazmy. V blízkosti replikační zóny několik různě  
zralých virionů (iv). Na okraji buňky se tvoří mikrovřetena, některá jednotlivě v mem-  
bránách endoplazmatického retikula, některá po dvojicích uzavřená v membráně  
(spi). Mitochondrie (M) hostitelské buňky. Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

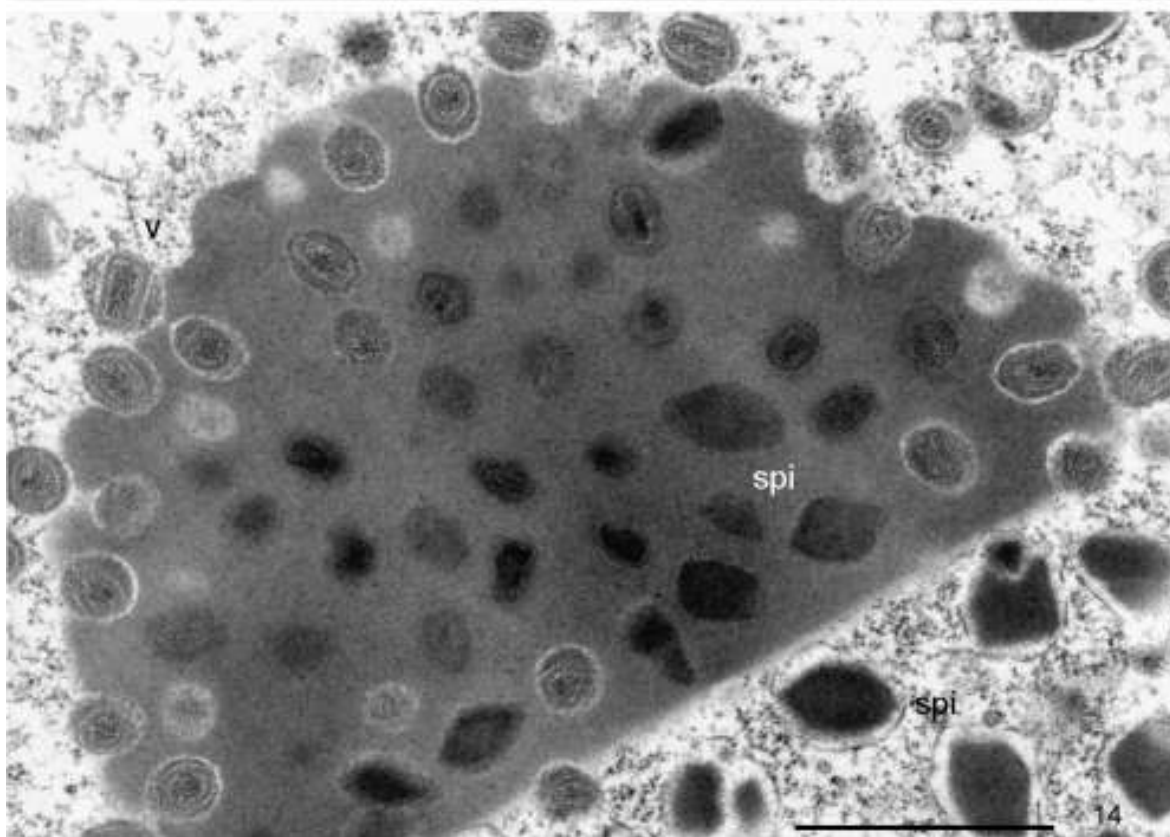
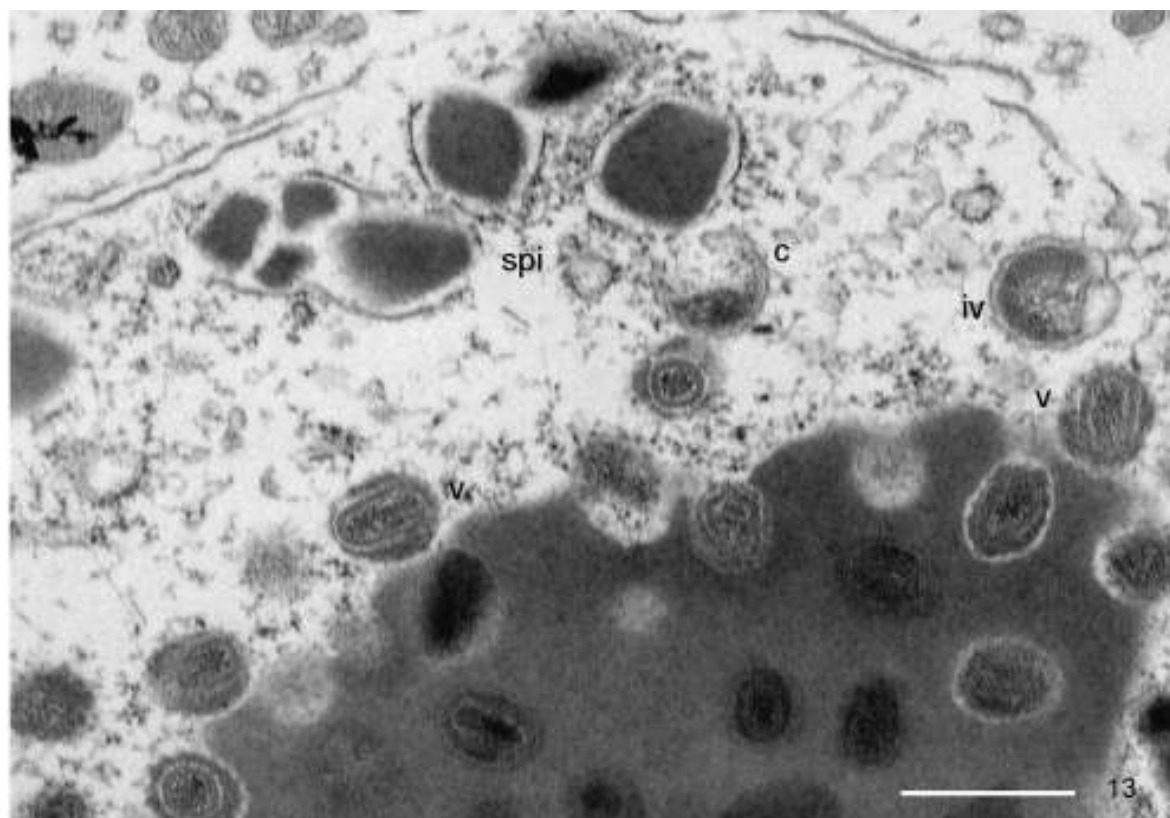
**Obr. 12.** Další detail cytoplazmy hemocytu. V blízkosti virogenního strómatu (vs)  
je vidět globulární zóna (g), srpkovité membrány (c). Nezralý virion (iv) s počínající  
tvorbou obalu nukleoidu (cs). Mikrovřetena v různé fázi syntézy (spi), obklopené  
množstvím ribozómů. Bar = 500 nm.



---

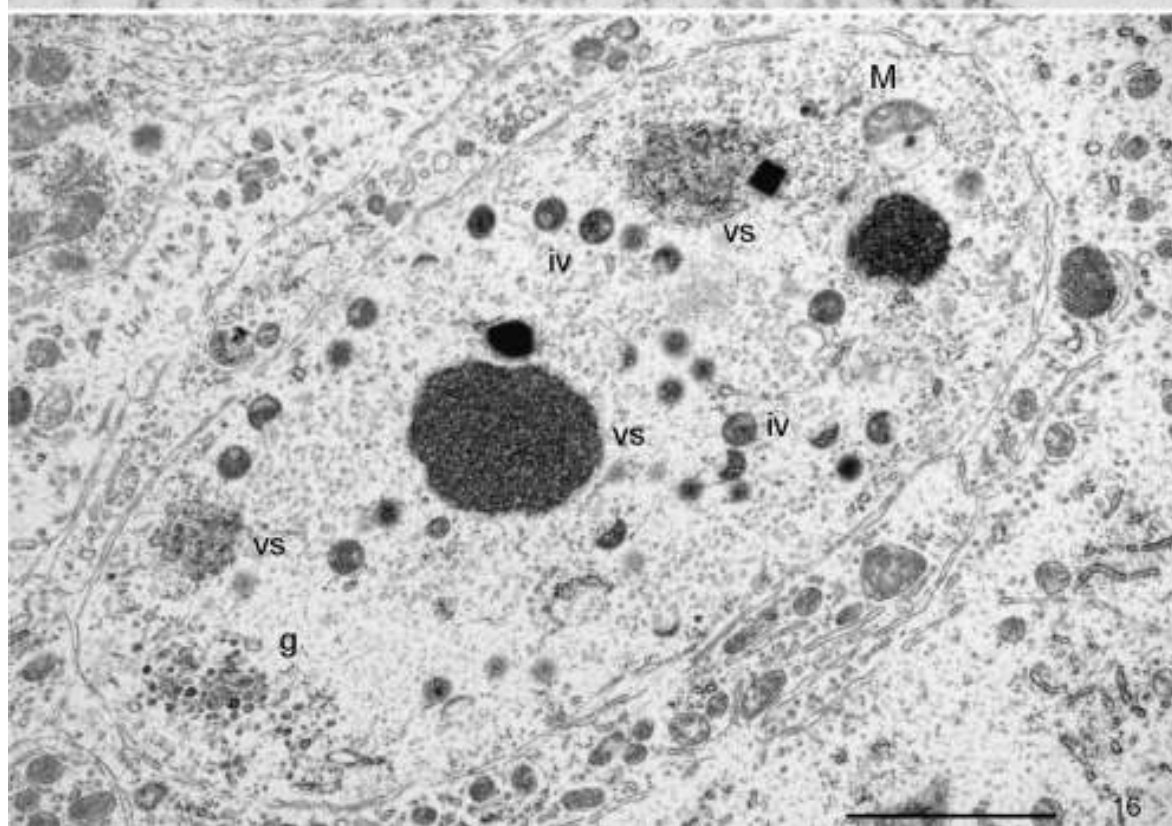
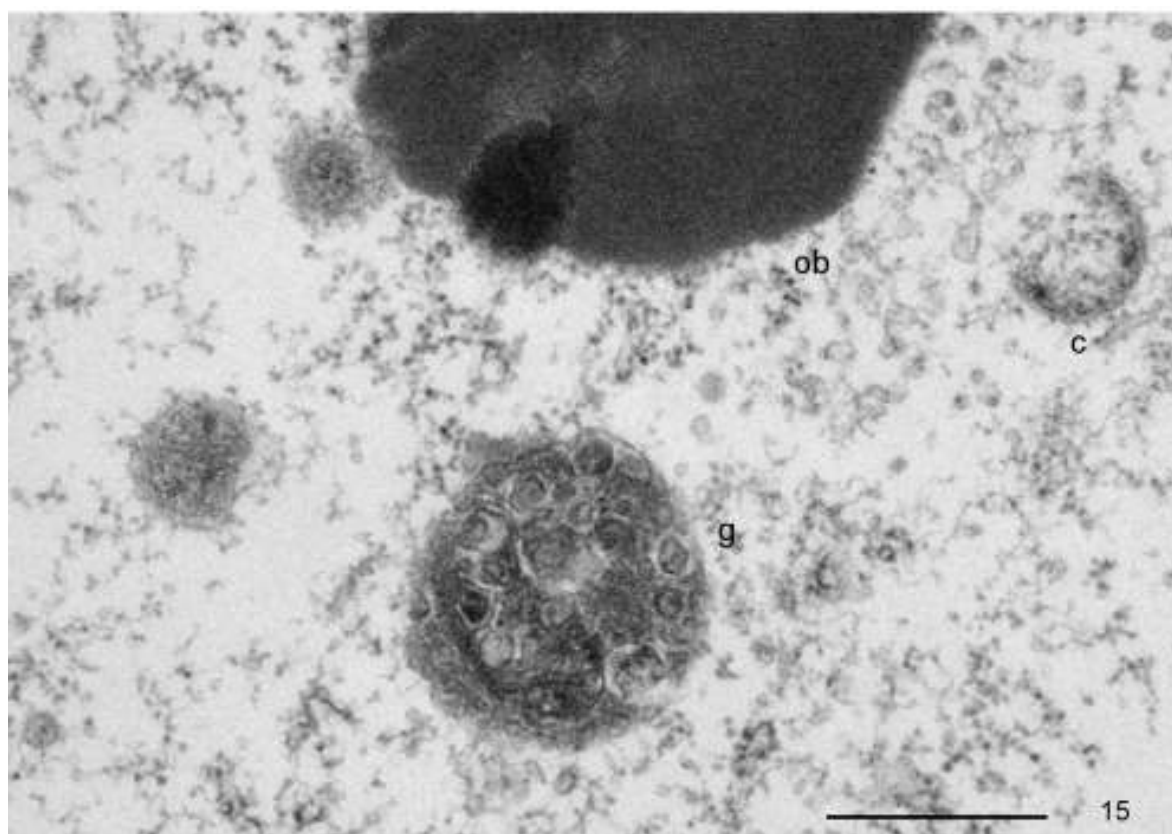
**Obr. 13.** Okraj sféroidu s vyčnivajícími viriony (v). Okolo okludovaných virionů ve sféroidu zřetelný elektron - lucentní oblast (halo). V některých virionech je uvnitř nukleoidu vidět vlákno. V cytoplazmě v blízkosti vyvíjejících se mikrovřeten (spi) je vidět srpkovitá membrána (c) budoucího virionu. Bar = 500 nm.

**Obr. 14.** Čepicovitý sféroid ITEV. Uvnitř mikrovřetena (spi) a viriony se zřetelnou vnitřní strukturou. Některé viriony (v) ve fázi okluze. Uvnitř virionů zřetelně viditelný nukleoid s vnitřní vláknitou strukturou. Mikrovřetena vně sféroidu v membránách endoplazmatického retikula v cytoplazmě. Fusolin, vytvářející mikrovřetena (spi) a sféroidin okluzních tělísek se liší hustotou, jak ukazuje rozdíl v elektron - denzitě. Bar = 1  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 15.** Mezistádium s globulemi (g), které budou uvolněny do cytoplazmy během dalšího vývoje uvnitř stádia. Část sféroidu (ob), v jeho blízkosti srpkovitá membrána (c) budoucího virionu. Bar = 500 nm.

**Obr. 16.** Lokalizace replikace viru v cytoplazmě hostitelské buňky. V buňce je několik virogenních stromat (vs). Replikační globulární zóna (g), v okolí replikačních míst se tvoří nezralé viriony (iv), v cytoplazmě srpkovité membrány (c) budoucích virionů, plněné materiálem z replikačních zón. Mitochondrie (M). Bar = 2  $\mu$ m.

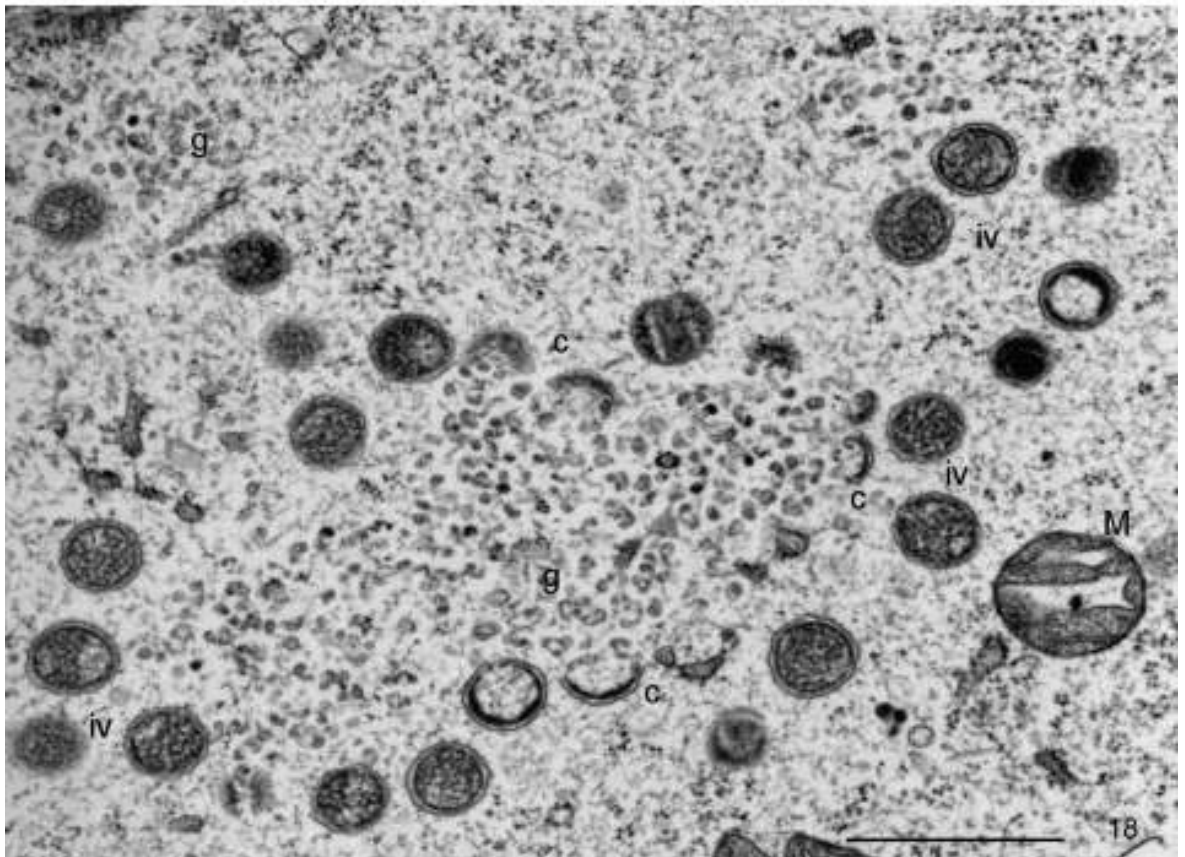
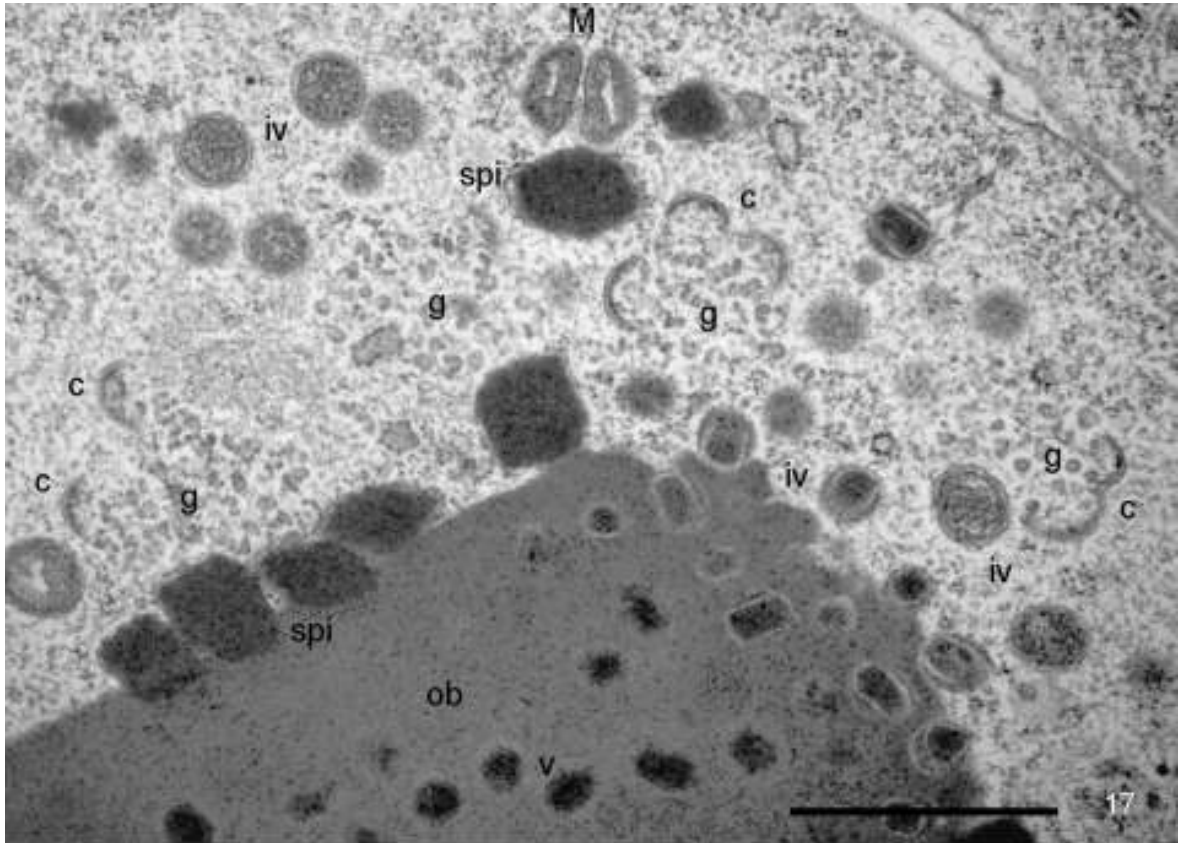




---

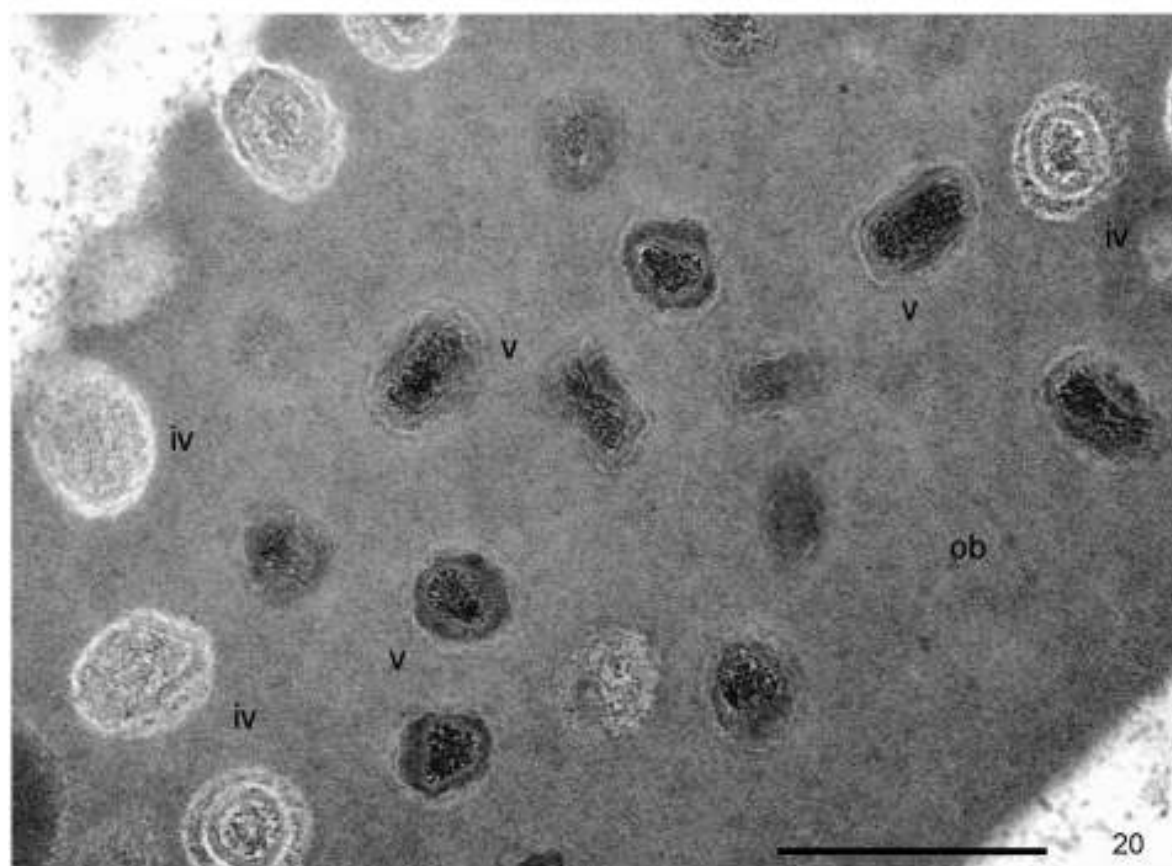
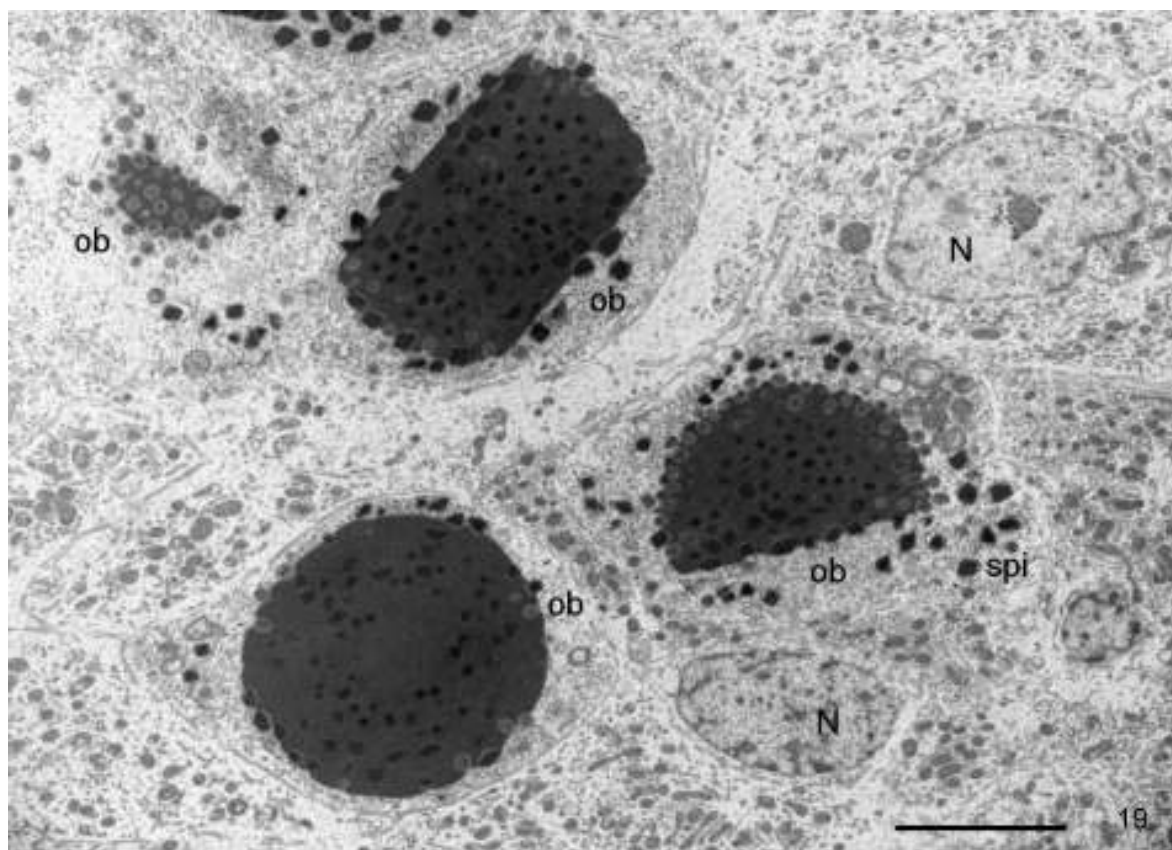
**Obr. 17.** Uvnitř sféroidu (ob) okludované viriony (v). Na okraji okluzního tělíska mikrovřetena (spi). V cytoplazmě hostitelské buňky 4 globulární replikační zóny (g), ze kterých se plní srpkovité membrány (c) budoucích virionů. V blízkosti hostitelské mitochondrie (M) mikrovřeteno (spi) a nezralé viriony (iv). Bar = 500 nm.

**Obr. 18.** Detail globulární replikační zóny (g). V jejím okolí se plní srpkovité membrány (c) budoucích virionů a vyvíjejí se nezralé viriony (iv). Mitochondrie hostitelské buňky (M). Bar = 1  $\mu$ m.



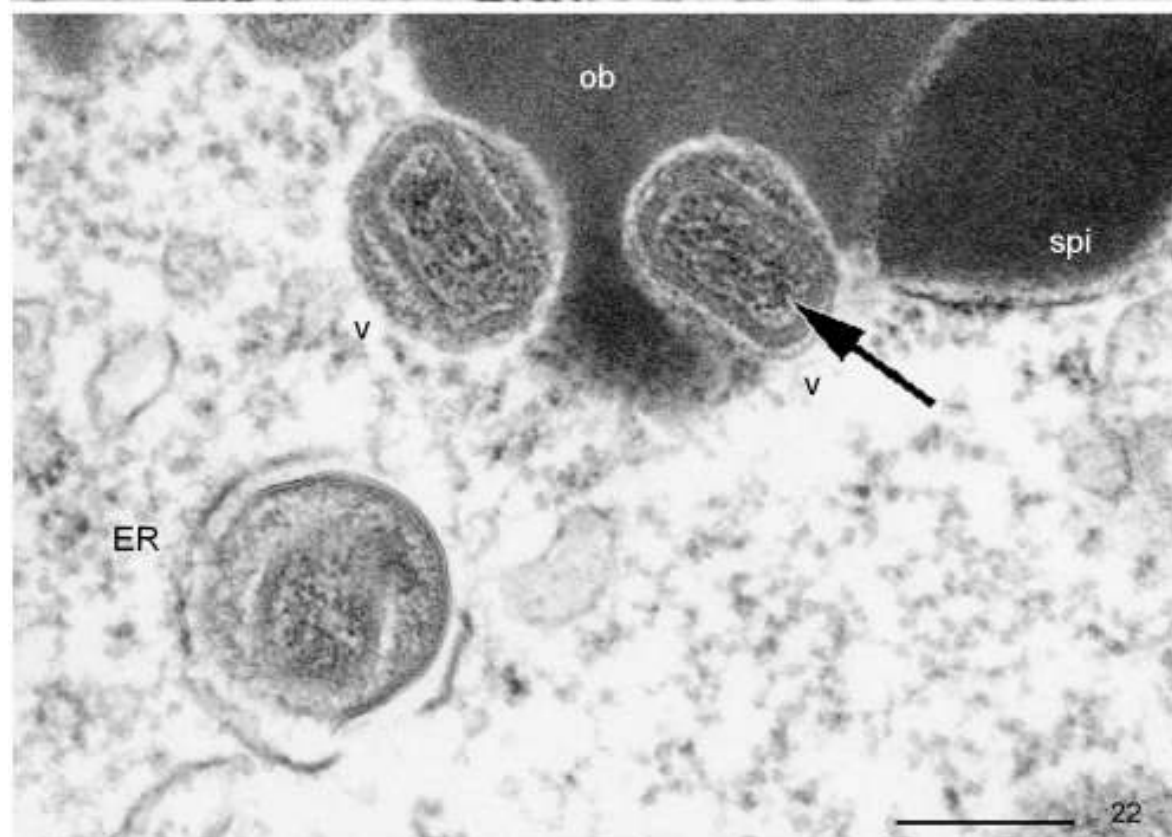
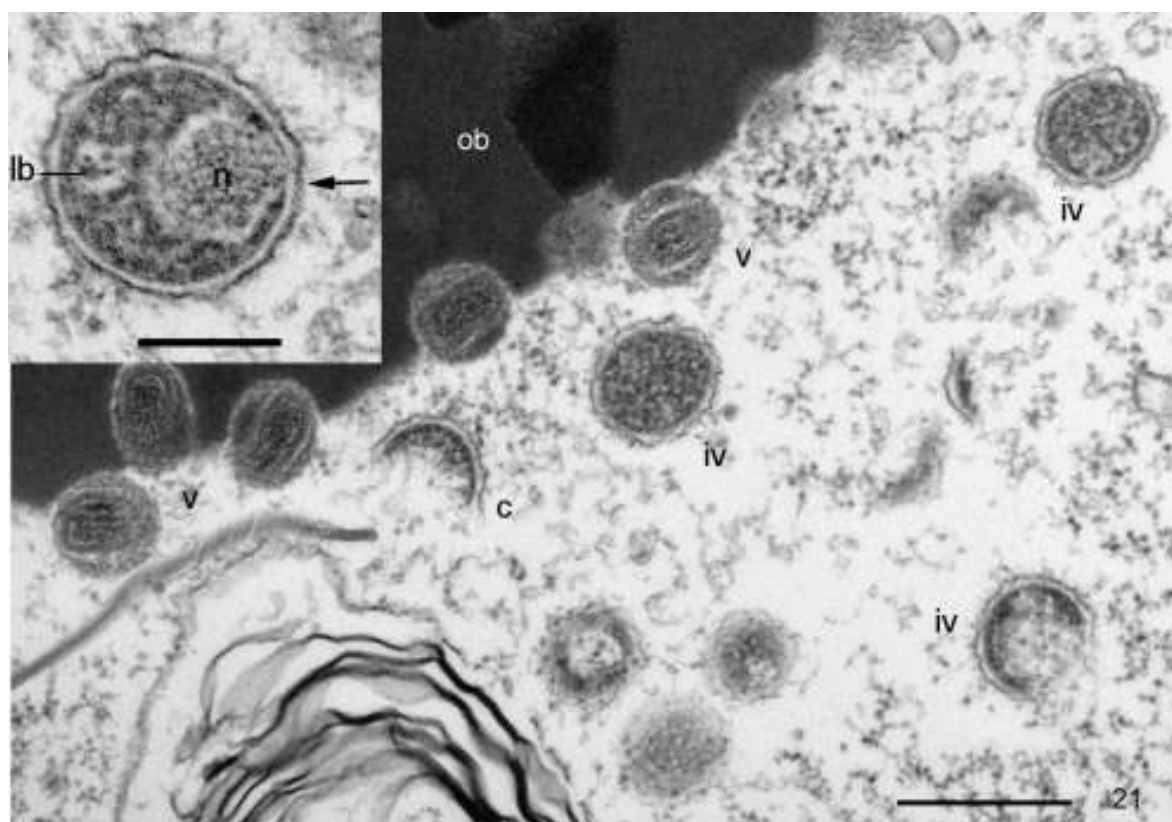
**Obr. 19.** Nejčastější typy sféroidů - čepicovitý a kulovitý (ob). Každý sféroid je ve své buňce. V okolí sféroidů je v cytoplazmě ještě malé množství mikrovřeten (spi). Jádro hostitelské buňky (N). Bar = 10  $\mu$ m.

**Obr. 20.** Vnitřek sféroidu (ob) s okludovanými viriony zralými (v) uvnitř okluzního tělíska, na okraji jsou nezralé viriony (iv). Okolo nezralých virionů je elektron - lucentní halo, které u zralých virionů uvnitř okluze není patrné. Bar = 500 nm.



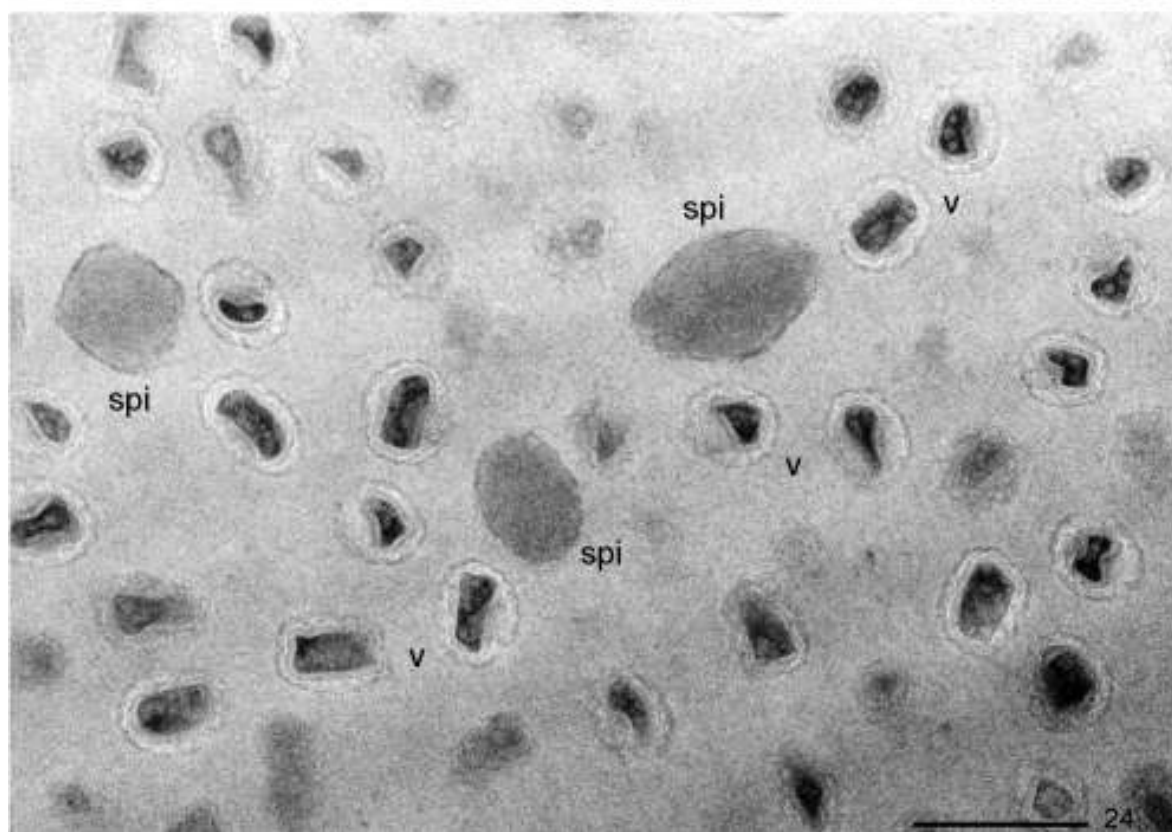
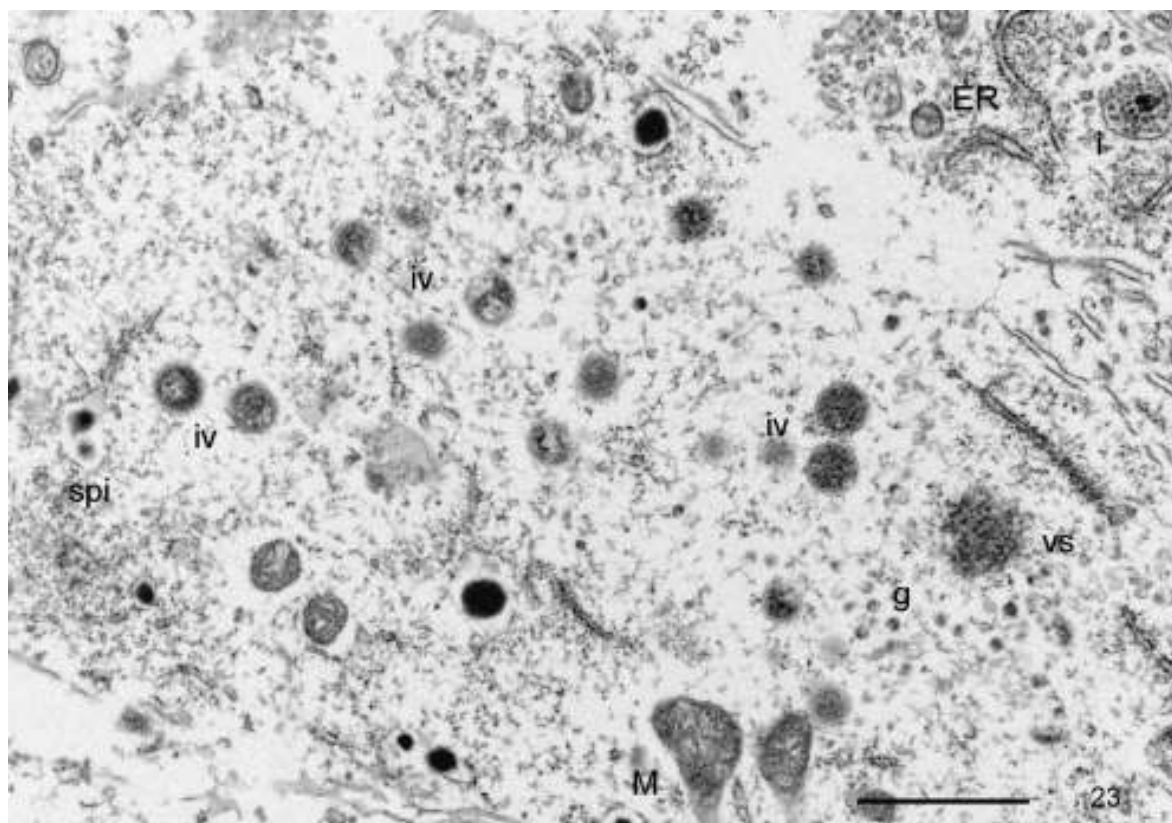
**Obr. 21.** Okraj sféroidu (ob) s dozrávajícími viriony (v). V cytoplazmě několik nezralých virionů (iv) a srpkovité dvojvrstevné membrány (c). Bar = 500 nm. Na vloženém obrázku je zrající virion s tvořícím se nukleoidem (n) a laterálním tělískem (lb), uzavřený v dvojvrstevné membráně (šipka). Bar = 200 nm.

**Obr. 22.** Tři dozrávající viriony (v) s cihlovitým dřevným vakem. Uvnitř se tvoří vlákno DNA (šipka). Uvnitř sféroidu (ob) mikrovřeteno (spi). Jeden virion v membráně endoplazmatického retikula (ER). Bar = 200 nm.



**Obr. 23.** Cytoplazma infikované buňky, kde se tvoří mladé viriony (iv). Vpravo nahoře mezistádium (i), kde dochází k tvorbě globulů, v jeho blízkosti membrány endoplazmatického retikula (ER). Uvnitř membrán endoplazmatického retikula se tvoří i mikrovřetena (spi). Vedle mitochondrií (M) je globulární replikační zóna (g). Bar = 1  $\mu$ m.

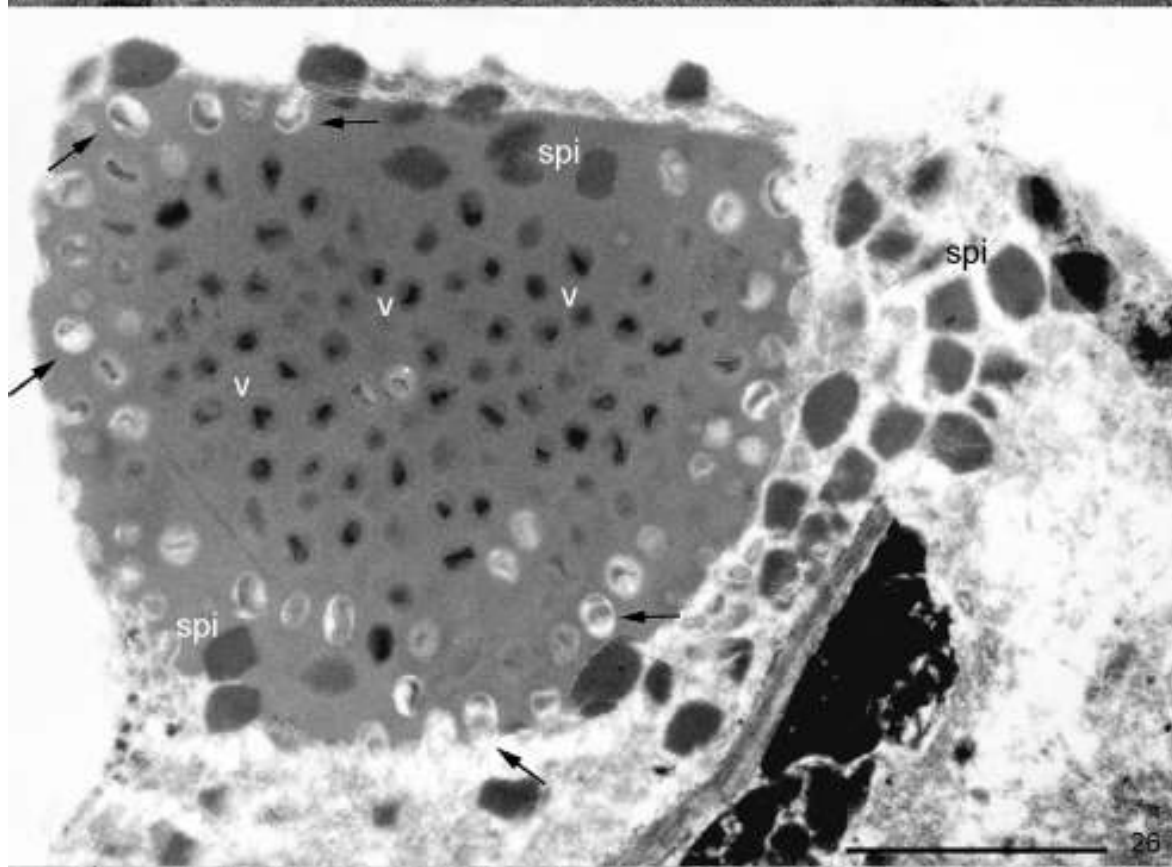
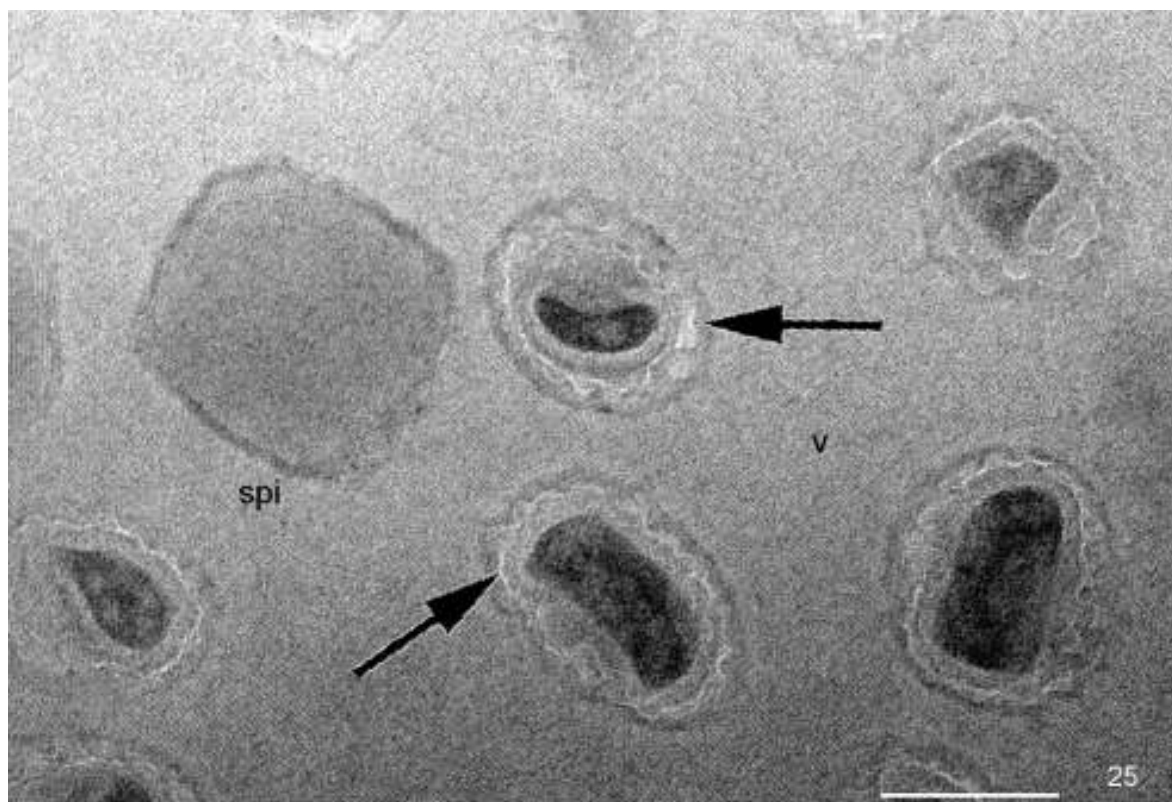
**Obr. 24.** Zralé virové částice (v) uvnitř sféroиду. Jedná se o konečné stádium maturace virionu, ke kterému dochází uvnitř v hlubších vrstvách sféroidu. Mezi viriony mikrovřetena (spi). Zvlněná elektron - lucentní vnější membrána. Bar = 500 nm.





**Obr. 25.** Detail virionu uvnitř sféroиду. V mase sféroïdinu leží viriony (v) s elektron - lucentní membránou (šipky) a vnější povrchvou vrstvou, která dává virionu morušovity, popř. zvlněný vzhled, typický pro komplexně strukturované viriony poxvirů. Mikrovřeteno (spi). Bar = 200 nm.

**Obr. 26.** Sféroïd ve tkáni delší dobu mrtvého brouka. Tkáň střeva je dezintegrována, v ní leží mikrovřetena (spi). Uvnitř sféroïdu jsou uprostřed vidět zralé viriony (v), zcela strukturálně zachovalé a schopně infekce. V okrajových částech jsou nezralé viriony, které "vypadly" ze sféroïdu, a nepřežily uhynutí hostitele. Uvnitř sféroïdu také mikrovřetena (spi). Bar = 2  $\mu$ m.

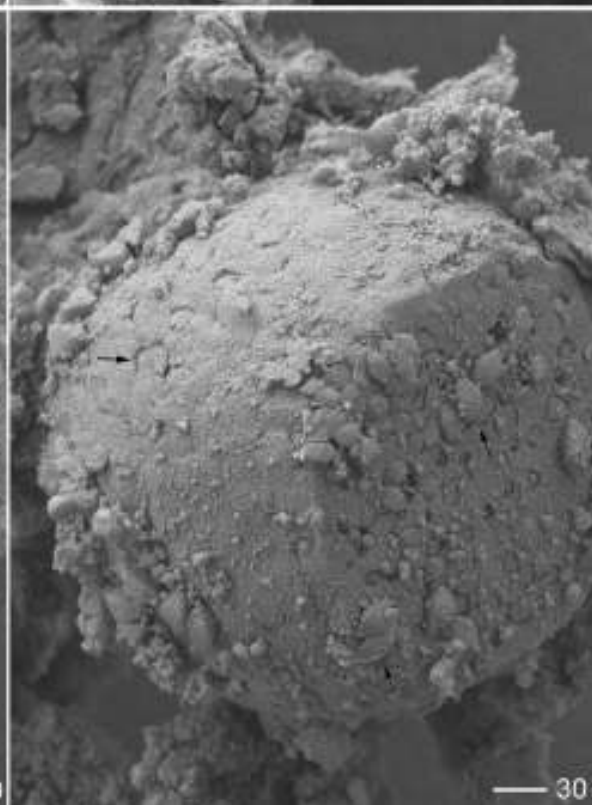
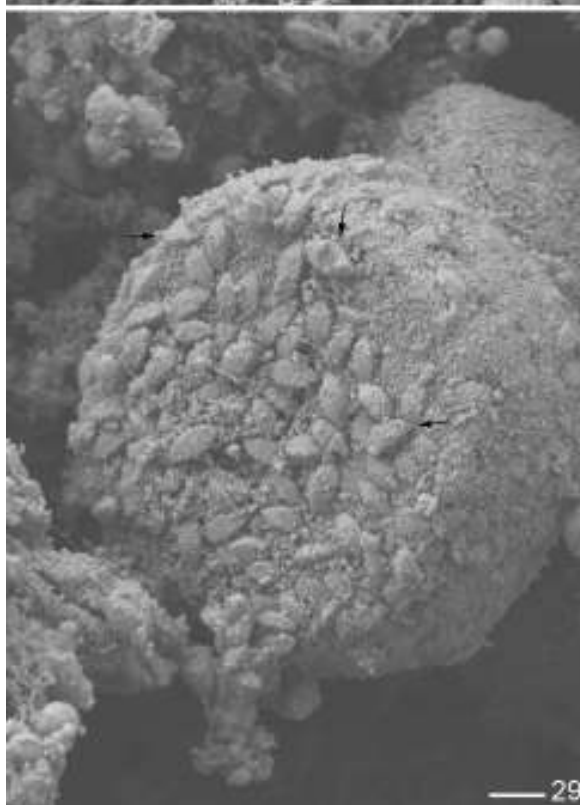
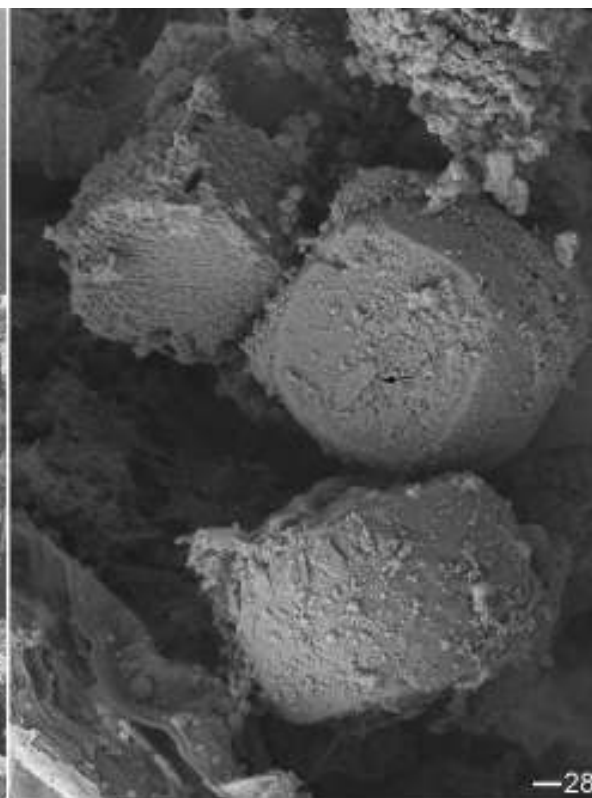
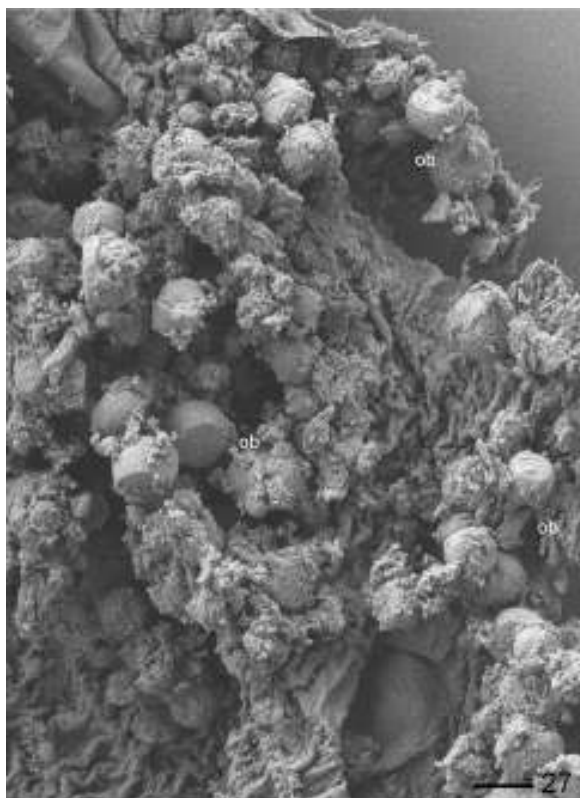


**Obr. 27.** Vnitřek střeva I. smrkového ve SEM. Mezi střevním debrísem jsou vidět uvolněné, nově vzniklé sféroidy ITEV (ob). Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

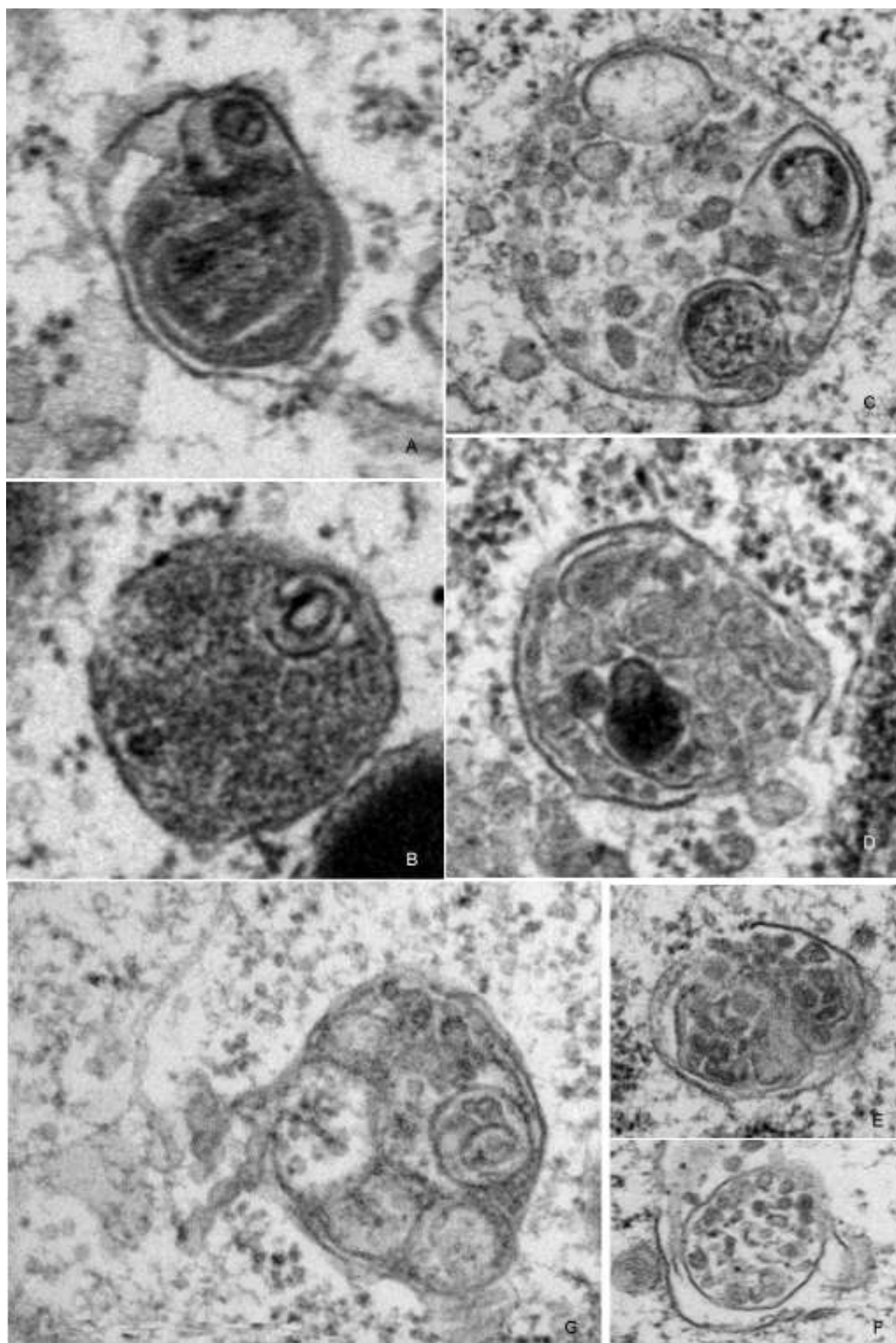
**Obr. 28.** Tři sféroidy ITEV oválného tvaru ve střevě lýkožrouta. Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

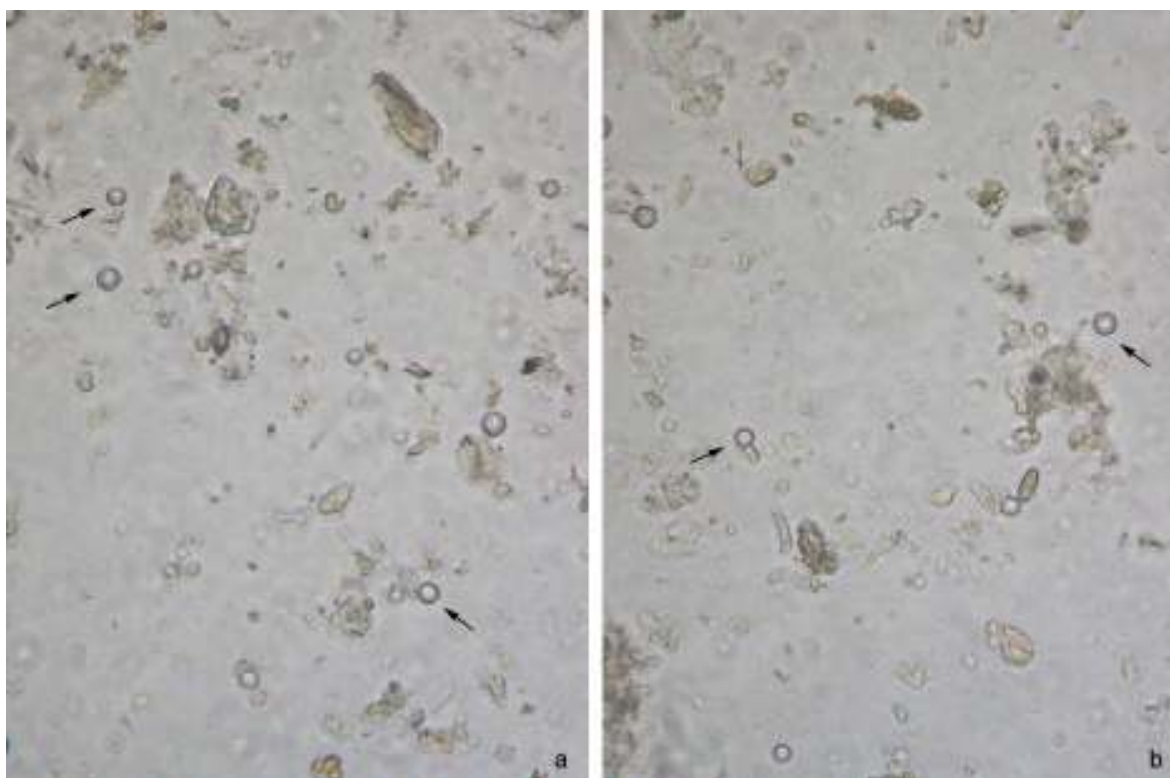
**Obr. 29.** Detail sféroidu ve střevní dutině lýkožrouta. Na povrchu sféroidu jsou vidět mikrovřetena, která jsou na jeho povrchu (šipky). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 30.** Další detail sféroidu, kde jsou mikrovřetena částečně zalita uvnitř sféroidu, některá vřetena jsou na povrchu okluzního tělíska (šipky). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 31.** Mezistádium. **A.** Virion s perfektně strukturovaným obalem nukleoidu uzavřen v membráně (šipka). **B.** V membráně se všechny struktury - obal nukleoidu, lipoproteinový obal a nukleoid - uvnitř rozpustily do masy jemných elektron - denzních částíček. Membrána stádia není nikde otevřená. **C.** Další vývoj uvnitř stádia. Vnitřek se diferencoval na globule a měchýřky různého tvaru, velikosti a organizace. **D.** Membrána mezistádia se otevírá, aby uvolnila jednotlivé globuly. Vnitřek stádia je tvořen neorganizovanou masou membrán, měchýřků a globulí různého tvaru. **E.** Struktura stejného typu, jako v předchozím obrázku. Je vyplněna více než 40 globuly. Obsah stádia je rozdělen nerovnoměrně membránami. Vnější membrána je na jednom místě přerušena a globuly se tím směrem uvolňují do cytoplazmy hostitelské buňky. **F.** Stejně je membrána přerušena i v tomto stádiu, ve kterém je uvnitř více jak 30 globulí oddělených od sebe membránami. **G.** Detail stádia, kde vnitřní diference globulů a měchýřků předchází tvorbu globulů a otevření povrchové membrány stádia.

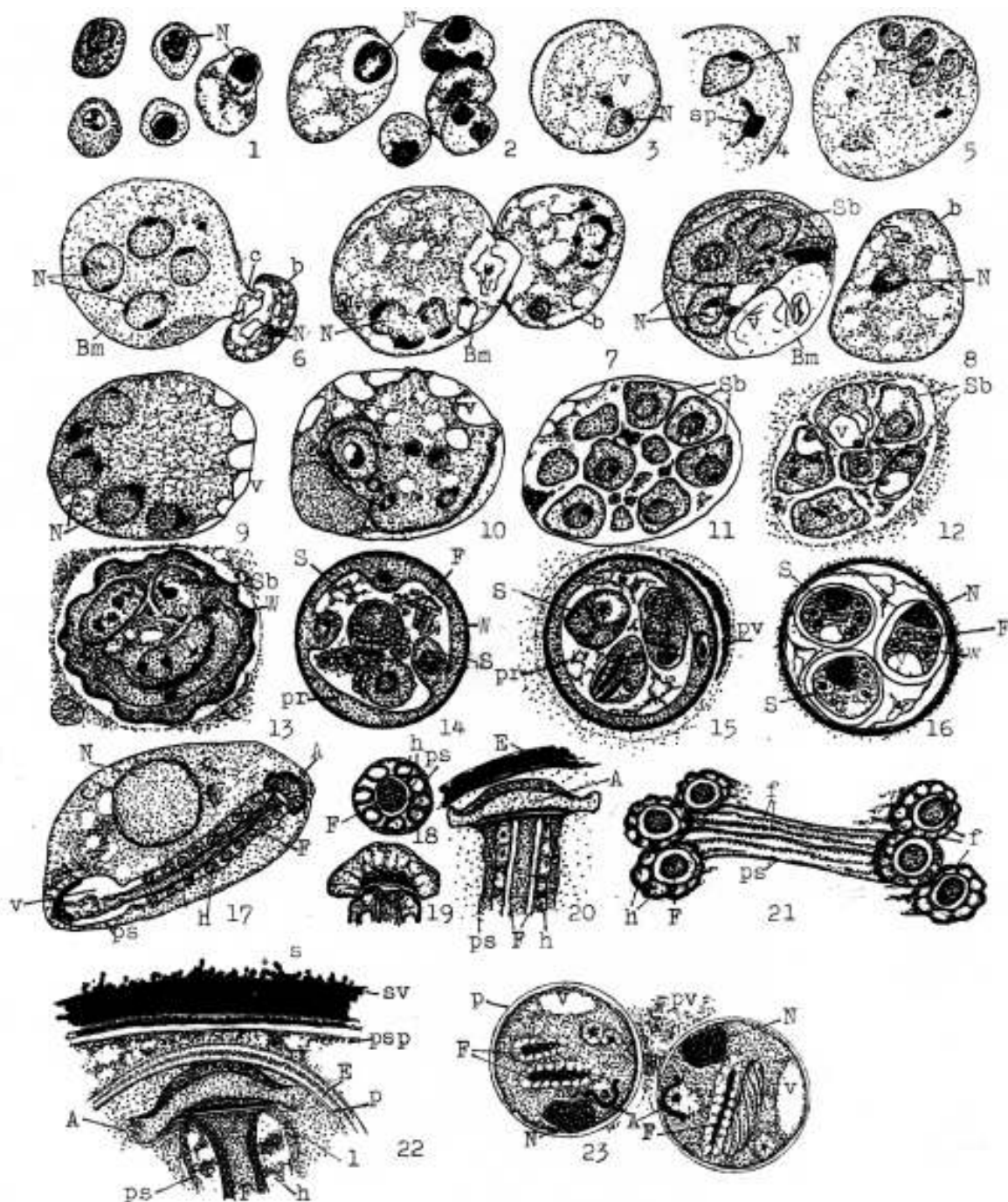




**Obr. 32.** *Ch. typographyi* ve světelném mikroskopu. Cysty mikrosporidie (šipky).

**1.** Ranný vývoj jádra (N). Tmavé jádro, méně denzní vakuolovaná cytoplazma. **2.** První stádia merogonie. **3.** Typický meront s jádrem (N) s depozitem denzní hmoty v místě budoucího jaderného plaku, velká vakuola v cytoplazmě (v). **4.** Část merontu s jádrem a jaderným plakem (sp) v místě jádra. **5.** Meront s jádry na straně jedné (N) a s vakuolou na opačné straně v místě pozdějšího odštěpování nové buňky. **6.** Štěpící se meront (Bm) se 4 jádry (N). Buňky se oddělují v místě úzkého pásu (c), kde je vytlačována cytoplazma a vzniká odštěpená buňka (b). **7.** Další stádium štěpení, kde mateřský meront (Bm) uzavírá místo štěpení systémem vakuol (v) a pokračuje ve svém vývoji jako sporont v tenkostěnné sporogonii. Odštěpená část zahajuje jako sesterský meront (b) tvorbu jádra. **8.** Obě buňky jsou kompletně oddělené (Bm, b). Mateřský meront zraje do stádia sporontu se sporoblasty (Sb) a zbytkem vakuol. Sesterská buňka roste do stádia merontu. **9.** Pod plazmatickou membránou se tvoří vakuoly (v). **10.** Uvnitř sporontu se tvoří asynchroně skupina sporoblastů (Sb). Jádra jsou redukována do formy jaderných plaků. Systém vakuol (v). **11.** Identické sporoblasty (Sb), v každém jedno jádro. Vakuoly se rozplynuly, zůstaly po nich pouze stopy jemných plazmatických zbytků. **12.** V každém sporoblastu (Sb) začíná tvorba pólového vlákna v místě zadní vakuoly (posterózóm) (v). Plazmatická membrána sporontu se rozpouští a skupiny ranných spor jsou společně v parazitoformní vakuole. **13.** Stěna sporontu zesiluje v důsledku ukládání denzního materiálu, zůstává ale plastická a zvlněná (W). Uprostřed se tvoří jednotlivé sporoblasty (Sb), odštěpující se ve vakuole. **14.** Jednovrstevná stěna sporoforního měchýřku zesiluje a vyhlazuje se (W). Uprostřed ve vakuole je shluk volných sporoblastů a vláken, které se vyvíjejí nezávisle a až během následujícího vývoje se spojují a tvoří jednotlivé mladé spory (S). Některá volná vlákna (F) zůstávají v pólovém vaku v centrální hmotě a čekají na oddělení nových sporoblastů z plazmódia, obalujícího stěnu sporoforního měchýřku (pr). **15.** Vlákno mladých spor (S) je omotáno okolo jádra. Celá masa plazmódia je transformována do sporoblastů a spor. Zbytky, nepotřebné pro tvorbu stádií, jsou uvolňovány do prazitoformní vakuoly (pv). **16.** Uvnitř zralého sporoforního měchýřku jsou tlustostěnné (w) zralé spory (S) s jádrem (N). Vlákno (F) je uzavřeno v pólovém vaku. Zbytky plazmatické vrstvy plazmódia, která je téměř celá použita pro tvorbu spor, zůstávají ve formě jemné membrány, která fixuje pozici spor v dozrávajícím sporoforním měchýřku. **17.** Během zrání tenkostěnné spory je vlákno (F) prodlužováno a tvoří pólový vak (ps) s vláknem, vyztuženým měchýřky (h). Apikální část vlákna je zakončena kotvícím diskem (A), zadní konec vychází ze zadní vakuoly (v). V cytoplazmě je velké jádro (N). **18.** Průřez pólovým vláknem (F) se znázorněnými měchýřky (h), obalené pólovým vakem (ps). **19.** Apikální část vlákna s kotvícím diskem. **20.** Apikální část vlákna (F) u tlustostěnné spory. Kotvící disk (A) přiléhá ke stěně spory (E). Disk má plochou centrální část, kterou je zakončeno vlákno. Pod povrchem pólového vaku (ps) jsou měchýřky (h). **21.** Příčný řez vláknem (F) u tlustostěnné spory. Vlákno je na průřezu identické s tenkostěnnou sekvencí (měchýřky - h), ale pólový vak (ps) podélně tvoří 10 - 12 záhybů (f). **22.** Průřez tlustostěnným sporoforním měchýřkem (sv). Uvnitř pod plazmatickou membránou (psp) je část zralé spory s kotvícím diskem (A), přiléhajícím k plazmatické membráně spory (p) a ke stěně spory (E). Pólové vlákno (F) je spojené s pólovým vakem (ps), obalujícím měchýřky (h). Vlákno je zakončeno plochým víčkem (l). Na povrchu sporoforního měchýřku jsou depozita sekrecí (s). **23.** Dvě tenkostěnné spory v parazitoformní vakuole (pv). Jádro (N) přiléhá ke stěně spory, tvořené jako plazmatická membrána (p), na opačné straně je posterózóm (v). Vlákno (F) je spojené s kotvícím diskem (A) ve formě denzního tmavého kalíšku.





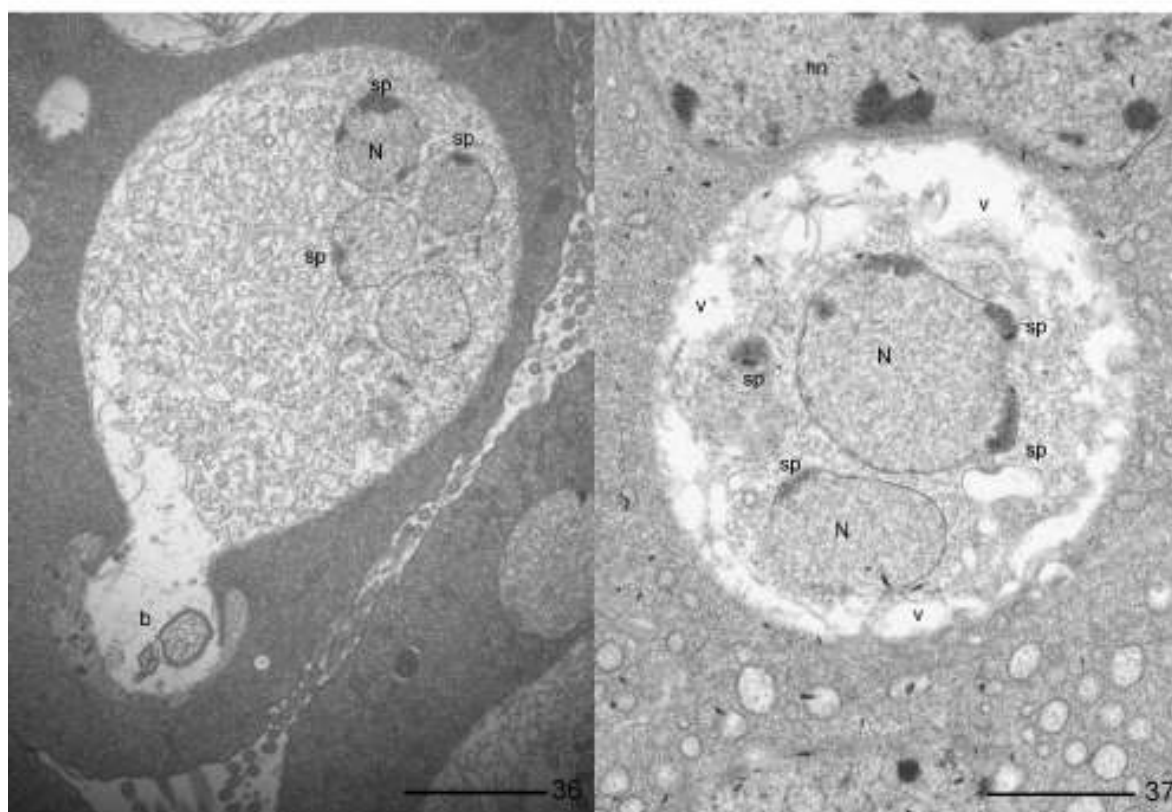
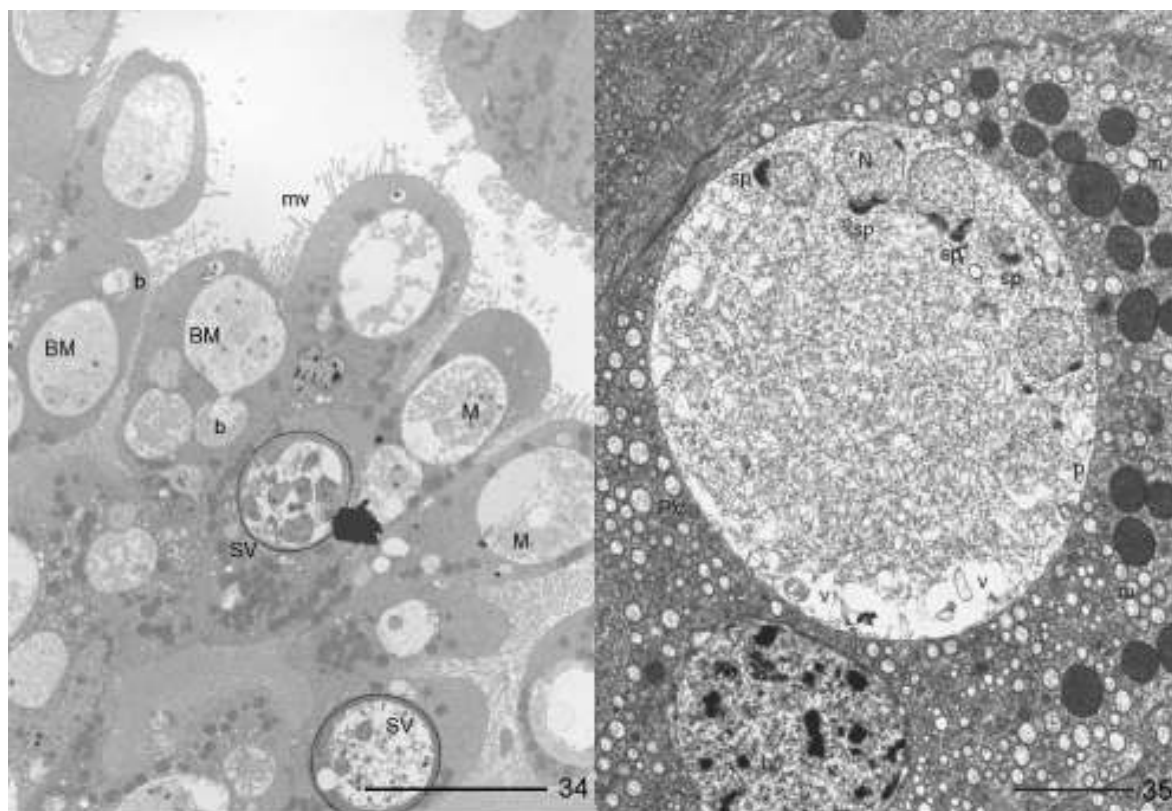
**Obr. 33.** Schématický vývoj a ultrastruktury mikrosporidie *Ch. typographi*. 1 - 8 merogonie. 9 - 12 tenkostěnná sporogonie, 13 - 16 tlustostěnná sporogonie, 17 - 23 spory a jejich orgány. Vysvětlivky a popis viz str. Stádia jsou znázorněna bez ohledu na měřítko a velikosti jednotlivých struktur (© Dr. J. Weiser).

**Obr. 34.** Celkový pohled na střevo I. smrkového s různými vývojovými stádii *Ch. typographyi*, především meronty (M) různé velikosti, někteří se štěpí (Bm) a od mateřské buňky se oddělují sesterské buňky (b). Dva tlustostěnné sporoforní měchýřky (SV) uvnitř se sporoblasty. Střevní buňky jsou vidět s povrchovými microvilli (mv). Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 35.** Meront s pěti jádry (N) s elektron - denzním jaderným plakem (sp) v jaderné membráně. Několik vacuol (v) v zadní části ve velmi vakuolizované cytoplazmě s mnoha ribozómy. Plazmatická membrána (p) je v těsném kontaktu s parazitoforní vakuolou (PV). Mitochondrie hostitelské buňky (m) a jádro (hn). Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 36.** Štěpicí se meront se 4 jádry (N) s jaderným plakem (sp) a odštěpující se částí (b). Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 37.** Meront s vakuolizovanou (v) částí membrány v cytoplazmě pod plazmatickou membránou. Dvě jádra (N) s jaderným plakem (sp) v jaderné membráně. Jádro hostitelské buňky (hn). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

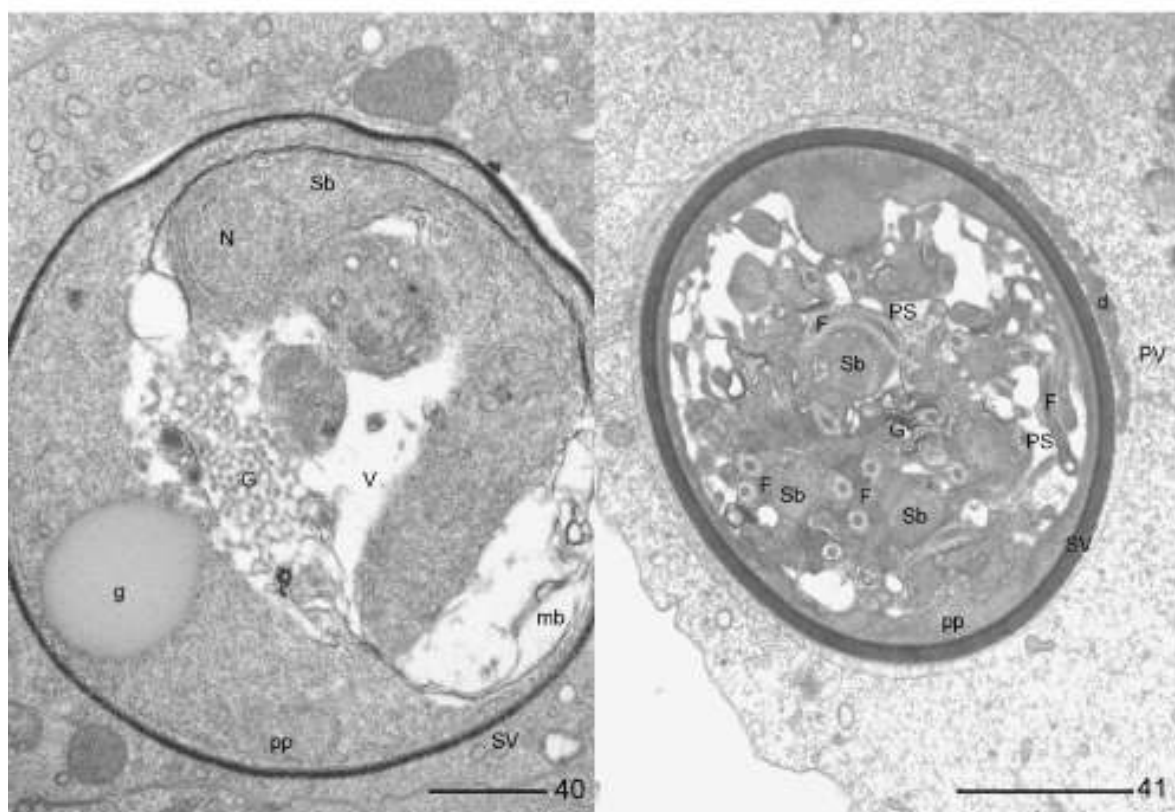
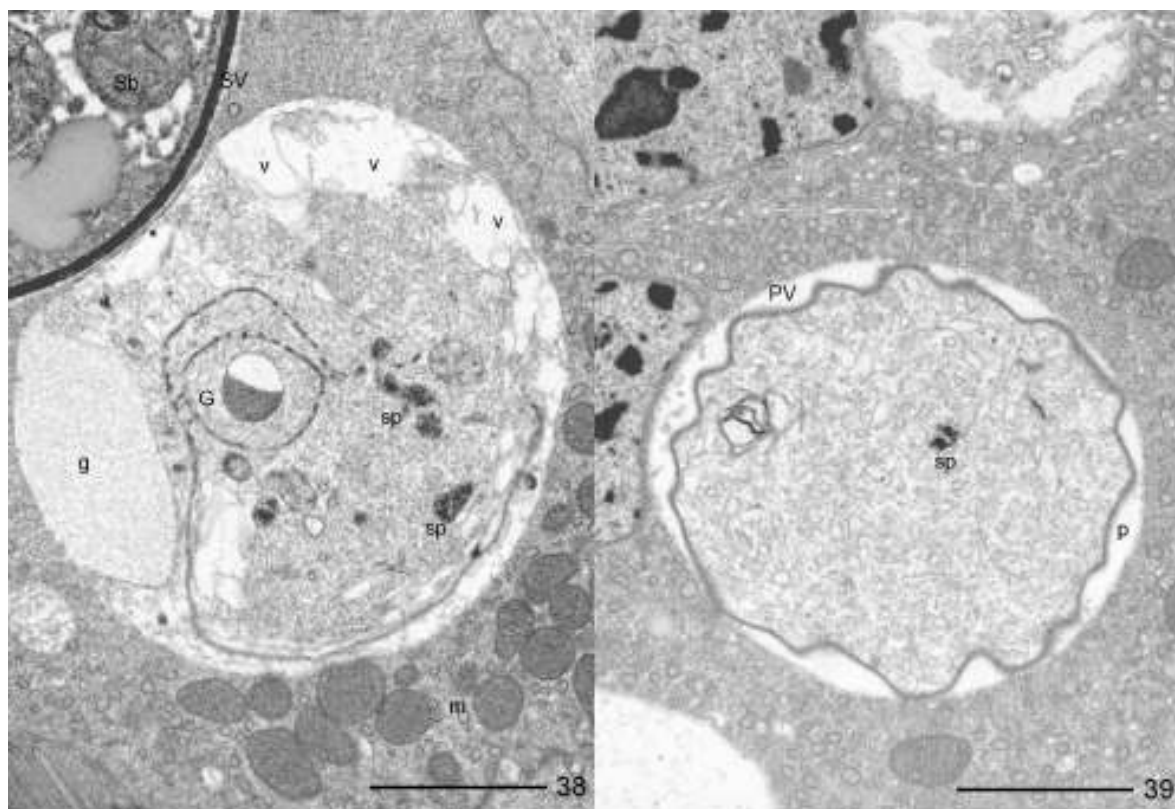


**Obr. 38.** Pozdní meront ve fázi přechodu do stádia sporontu s povrchově vakuolizovanou cytoplazmou (v), s denzním jaderným plakem (sp) v místě jádra buňky. Šedá sekreční zóna (g) adhezuje k parazitoformní vakuole vně merogoniálního stádia. Uprostřed je prstenec dvojité membrány (G) vyplněný denzními sekrecemi prodlouženými na povrch merontu. Tlustostěnný sporoforní měchýřek (SV) se sporoblasty (Sb). Mitochondrie hostitelské buňky (m). Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 39.** Rané stádium tlustostěnné sporogonie. Plazmatická membrána (p) je zesilována ukládáním depozitního materiálu. Jádro je reprezentováno malými denzními částicemi jaderného plaku (sp). Parazitoformní vakuola (PV). Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 40.** Tlustostěnný sporoforní měchýřek se ztlustlou rigidní dvojrstevnou stěnou (SV), obsahující zbytky plazmódia (pp) a velká centrální vacuola (V) s prstovitými sporoblasty (Sb) s jedním jádrem (N). Sekrece zůstávají uvnitř vakuoly (g). V centrální vakuole je Golgimu podobná síťovina (G) membrán a dvojitých membrán. Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 41.** Během tlustostěnné sporogonie se vyvíjí několik sporoblastů (Sb) uvnitř sporoforního měchýřku (SV). Zbytky plazmódia (pp) přiléhají ke stěně měchýřku a jednotlivé sporoblasty se tvoří uvnitř centrální vakuoly. Vakuola je vyplněna plazmatickými zbytky, Golgimu podobnými strukturami (G) a volnými pólovými vlákny (F), uzavřenými v pólovém vaku (PS). V prostoru mezi sporoforním měchýřkem (SV) a parazitoformní vakuolou (PV) jsou jemné sekrece (d). Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

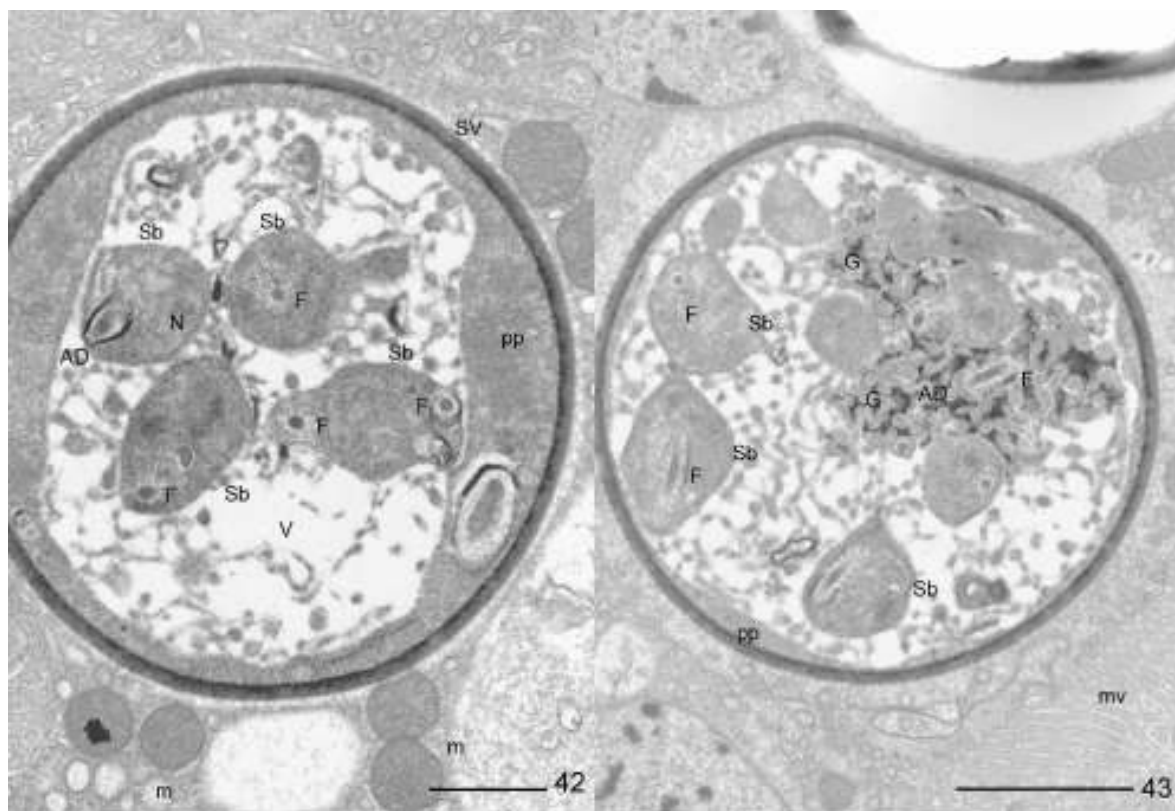


**Obr. 42.** Sporoforní měchýřek (SV) tlustostěnné sporogonie s plazmatickou výstelkou (pp) a 4 sporoblasty (Sb) v centrální vakuole (V). Dokončovaný sporoblast s jedním jádrem (N) a vláknem (F) v tenké plazmatické membráně. Volný prostor je vyplněn plazmatickými zbytky. Velmi dobře viditelné denzní membránové struktury uvnitř sporoblastu jsou části budoucího kotvícího disku vlákna (AD). mitochondrie hostitelské buňky (m). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 43.** Další tlustostěnný sporoforní měchýřek s redukovanými zbytky plazmatické výstelky (pp). 10 tvořících se sporoblastů (Sb) a centrální zóna, kde se tvoří vlákna (F) s diskem (AD). Tmavá masa je produktem Golgimu podobnému systému (G) a je využívána při tvorbě vlákna. Střevní mikrovilli (mv). Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 44.** Zralé spory mikrosporidie *Ch. typographyi*. Vnější tlustá exospora (ex) a světlejší endospora (en) tvoří stěnu spory. Jedno jádro (N) je na opačné straně, než zadní vakuola (pv), která je rozdělena na několik částí. V cytoplazmě jsou volné ribozómy. Pólové vlákno (F) tvoří 3 závity a je uzavřeno v podlouhlém pólovém vaku (PS). V meziprostoru okolo vlákna jsou kulovité granulace tvořící plástvovitou strukturu. Spory jsou uzavřeny ve sporoforním měchýřku (SV) na jehož povrchu jsou sekreční tubuly (t). Bar = 200 nm.

**Obr. 45.** Zralá spora se strukturami popsanými na obr. (11.), ale s viditelným kotvícím diskem (AD), který se dotýká stěny spory. Bar = 200 nm.



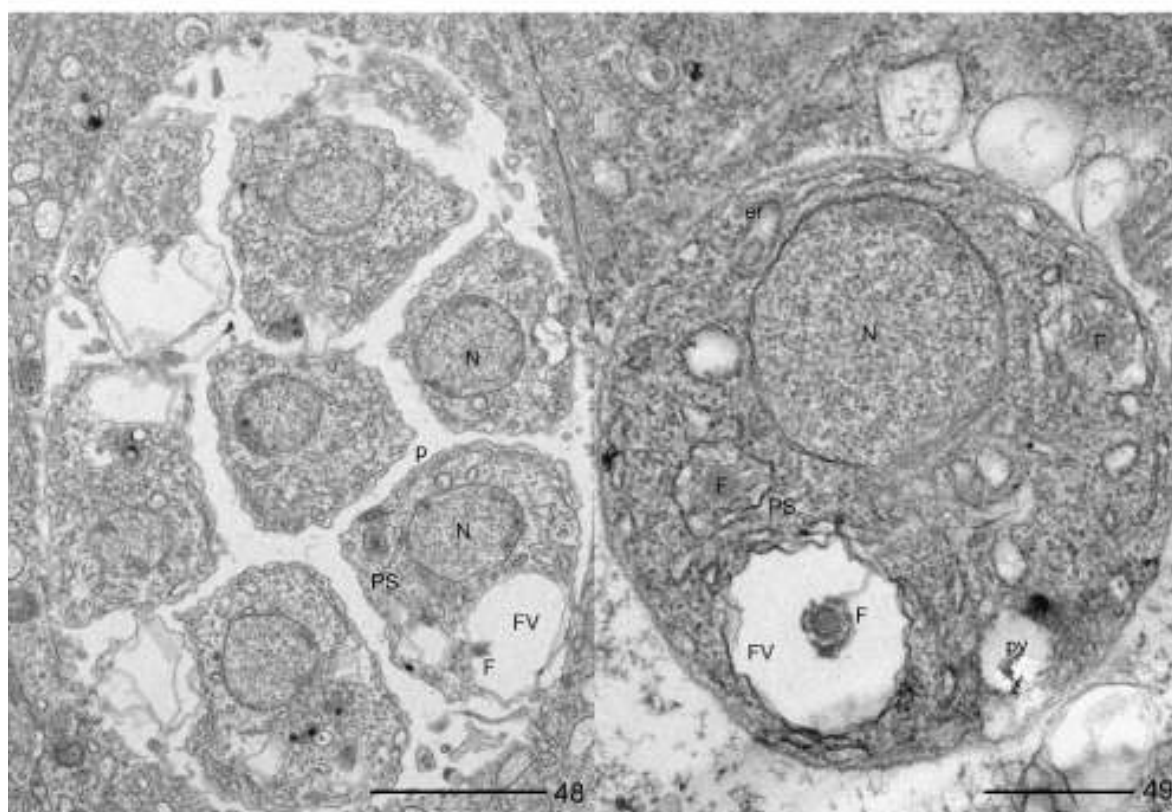
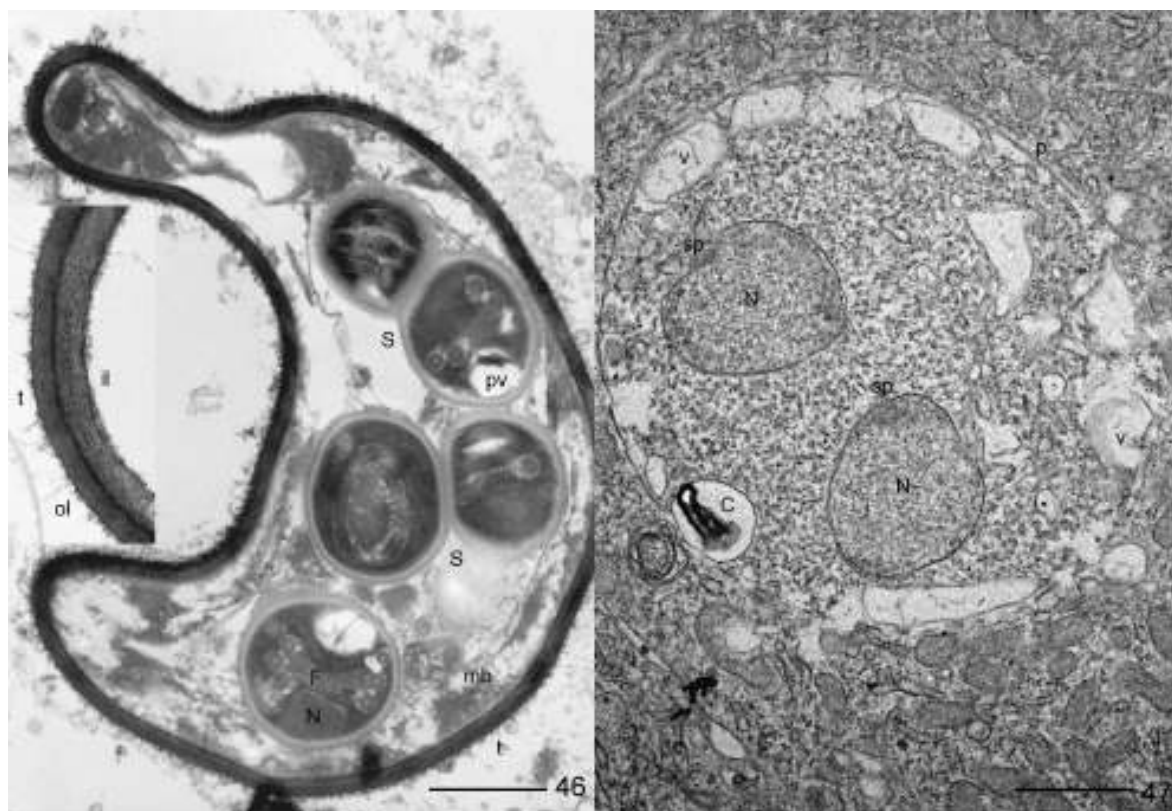
**Obr. 46.** Sporoforní měchýřek se zralými sporama *Ch. typographi*. Zralá spora (S) s jádrem (N), zadní vakuolou (pv) a vláknem (F) v pólovém vaku. Spory jsou uzavřeny v membráně (mb), která je původem z výstelky vakuoly, kde se tvořily sporoblasty. Tubulární sekrece (t) na povrchu měchýřku. Bar = 1  $\mu\text{m}$ . Uvnitř: Detil dvojvrstevné stěny sporoforního měchýřku - vnitřní vrstva (il), vnější vrstva (ol) a povrchové sekrece (t).

**Obr. 47.** Tenkostěnný sporont se dvěma jádry (N) s jaderným plakem (sp), s vakuolami (v) pod plazmatickou membránou (p). V cytoplazmě je vakuola se shlukem membrán (C). Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 48.** Synchronizovaný vznik jednojaderných (N) sporoblastů s tenkou plazmatickou membránou (p) a zárodky vlákna, vyvíjející se v pólovém vaku (PS). Konečná vakuola (FV) s koncem vlákna (F) vyrůstajícího z této vakuoly. Stěna sporoforního měchýřku je rozpuštěna stádia jsou volně. Bar = 2  $\mu\text{m}$ .

**Obr. 49.** Zralá tenkostěnná spora s jádrem (N) a dvěma průřezy vláknem (F) v pólovém vaku (PS). Konec vlákna je uprostřed konečné vakuoly (FV), zatímco zadní vakuola je malá (pv). V blízkosti jádra jsou cisterny endoplazmatického retikula (er). Bar = 500 nm.



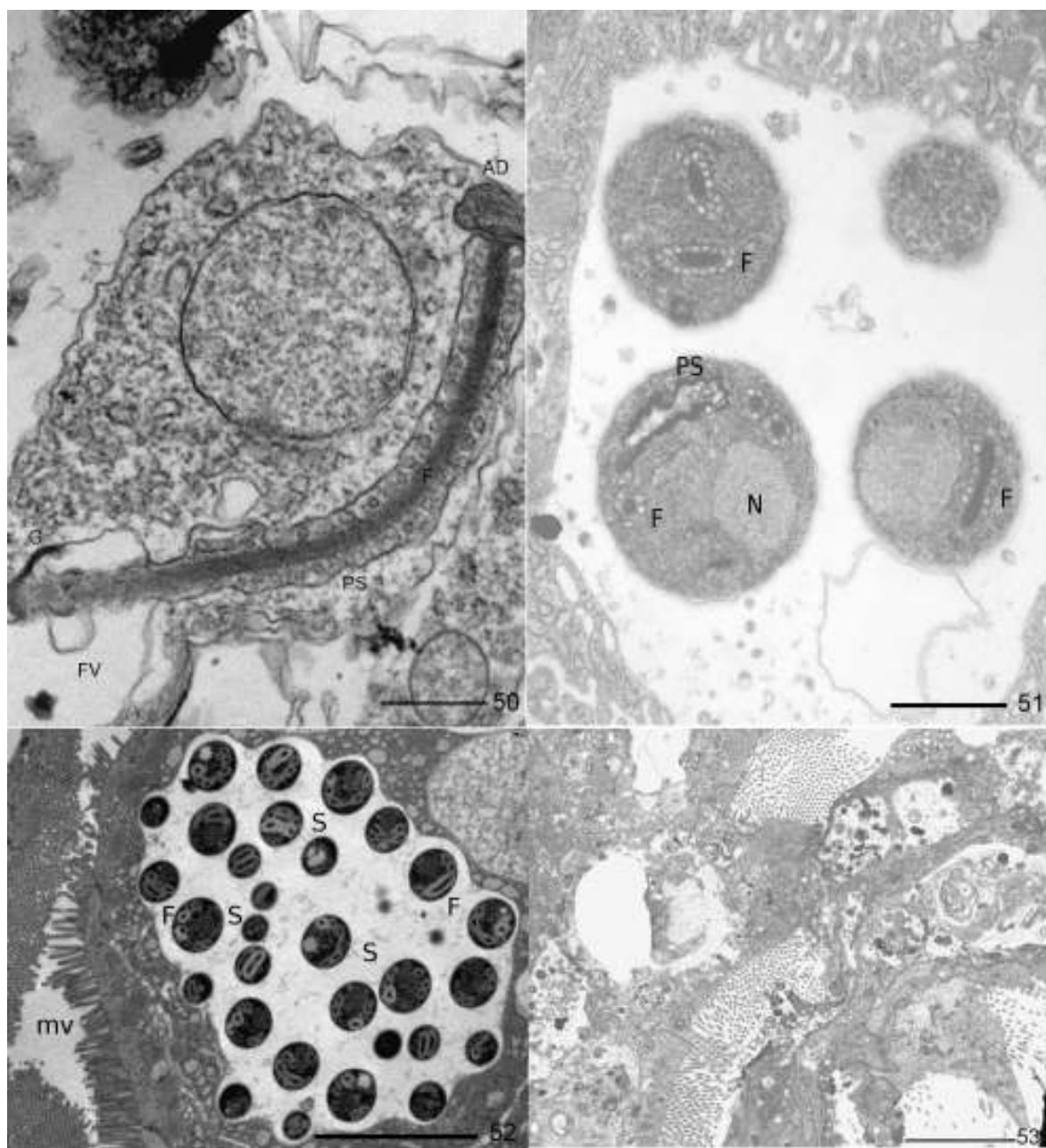


**Obr. 50.** Mladá tenkostěnná spora s vláknem (F) uvnitř pólového vaku (PS) s dutými kulovitými strukturami v plástvovitém uspořádání. Konec pólového vaku je spojen s konečnou vakuolou (FV). Kotvící disk je připojen ke konci vlákna s je oddělen od pólového vaku. Bar = 500 nm.

**Obr. 51.** Mladé spory tenkostěnné sporogonie. Pólové vlákno (F) v blízkosti jádra spory (N). Pólový vak (PS). Bar = 1  $\mu\text{m}$ . (© Prof. J. Vávra)

**Obr. 52.** Spory tenkostěnné sporogonie (S) se zřetelnými vlákny (F) ve střevě v blízkosti mikrovili (mv) ve sporoforním měchýřku. Bar = 5  $\mu\text{m}$ . (© Prof. J. Vávra)

**Obr. 53.** Střevo lýkožrouta po infekci mikrosporidií *Ch. typographi*. Je silně vakuolizované, s rozrušenou tkání, která je výsledkem lýze střevních buněk. Bar = 5  $\mu\text{m}$ .



## 9. Seznam literatury

- Adlung, K., Schicke, P., & Osvath, J. 1986. Analysis of an investigation to control the spruce bark beetle (*Ips typographus*) by means of pheromones. 1. Planning and evaluation of the individual trial. *Zeit. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz - J. Plant Dis. Protect.*, 93: 462 - 478.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Oma, E., Kutish, G. F., & Rock, D. L. 1999. The genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. *J. Virol.*, 73: 533 - 552.
- Alaoui-Ismaili, M. H. & Richardson, C. D. 1998. Insect virus proteins (FALPE and p10) self-associate to form filaments in infected cells. *J. Virol.*, 72: 2213 - 2223.
- Anderbrant, O. 1990. Gallery construction and oviposition of the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) at different breeding densities. *Ecol. Entomol.*, 15: 1 - 8.
- Arif, B. M. 1995. Recent advances in the molecular biology of entomopoxviruses. *J. Gen. Virol*, 76 ( Pt 1): 1 - 13.
- Austara, O., Annila, E., Bejer, B., & Ehnstrom, B. 1984. Insect pests in forests of the nordic countries 1977 - 1981. *Fauna Norv. Ser. B.*, 31: 8 - 15.
- Bakke, A. 1992. Monitoring bark beetle populations - effects of temperature. *J. App. Entomol. - Zeit. Angew. Entomol.*, 114: 208 - 211.
- Balbani, G. 1882. Sur les microsporidies ou psorospermies des articulés. *C. R. Acad. Sci.*, 95: 1168 - 1171.
- Bawden, A. L., Glassberg, K. J., Diggans, J., Shaw, R., Farmerie, W., & Moyer, R. W. 2000. Complete genomic sequence of the *Amsacta moorei* entomopoxvirus: Analysis and comparison with other poxviruses. *Virology*, 274: 120 - 139.

- Beard, C. B., Butler, J. F., & Becnel, J. J. 1990. *Nolleria pulicis* n. gen., n. sp. (Microsporida: Chytridiopsidae), a microsporidian parasite of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Protozool.*, 37: 90 - 99.
- Beckage, N. 1996. Interactions of viruses with invertebrate cells. In Söderhäll, K., Iwanaga, S., & Vasta, G., editors, *New directions in invertebrate immunity*, pages 375 - 399. SOS Publications. Fair Haven, NJ.
- Becker, M. N. & Moyer, R. W. 2007. Subfamily *Entomopoxvirinae*. In Mercer, A. A., Schmidt, A., & Weber, O., editors, *Poxviruses*, pages 253 - 271. Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.
- Becker, M. N. & Moyer, R. W. 2008. Entomopoxviruses. In Mahy, B. W. J. & van Regenmortel, M. H. V., editors, *Encyclopedia of Virology*, pages 136 - 140. Academic Press, Oxford, Oxford.
- Bergoin, M. & Dales, S. 1971. Comparative observations on poxviruses of invertebrates and vertebrates. In Maramorosch, K. & Kurstak, E., editors, *Comparative Virology*, pages 361 - 386. Academic Press. New York and London.
- Bergoin, M., Devauchelle, G., Duthoit., J.-L., & Vago, C. 1968a. Etude au microscope électronique des inclusions de la virose à fuseaux des coleopteres. *C. R. Acad. Sci., Serie D*, 266: 2126 - 2128.
- Bergoin, M., Devauchelle, G., & Vago, C. 1968b. Observations au microscope électronique sur le développement du virus de la maladie à fuseaux du coléoptère *Melolontha melolontha* L. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 267: 382 - 385.
- Bergoin, M., Devauchelle, G., & Vago, C. 1969. Electron microscopy study of the pox-like virus of *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera, Scarabaeidae). *Arch. gesammte Virusforschung*, 28: 285 - 302.

- Bergoin, M., Devauchelle, G., & Vago, C. 1971. Electron microscopy study of *Melolontha* poxvirus: The fine structure of occluded virions. *Virology*, 43: 453 - 467.
- Bergoin, M., Devauchelle, G., & Vago, C. 1976. Les inclusions fusiformes associées à l'Entomopoxvirus du coléoptère *Melolontha melolontha*. *J. Ultrastr. Res.*, 55: 17 - 30.
- Bird, F. T. 1974. The development of spindle inclusions of *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) infected with entomopox virus. *J. Invert. Pathol.*, 23: 325 - 332.
- Bird, F. T., Sanders, C. J., & Burke, J. M. 1971. A newly discovered virus disease of the spruce budworm, *Choristoneura biennis*, (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Invert. Pathol.*, 18: 159 - 161.
- Birgersson, G., Schlyetr, F., Bergstrom, G., & Lofqvist, J. 1988. Individual variation in aggregation pheromone content of the bark beetle, *Ips typographus*. *J. Chem. Ecol.*, 14: 1737 - 1762.
- Blissard, G. W. 1996. Baculovirus - insect cell interactions. *Cytotechnology*, 20: 73 - 93.
- Bombosch, S. & Dedek, W. 1994. Integrierter Pflanzenschutz gegen *Ips typographus* (L.). Kombination von Pheromonen und dem systemischen Insektizid Methamidophos (IPIDEX). *Zeit. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz*, 101: 508 - 518.
- Bridges, J. R. 1987. Prevalence of *Unikaryon minutum* (Microsporidia: Nosematidae) infection in outbreak populations of the southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). *J. Invert. Pathol.*, 49: 334 - 335.
- Buckner, C. H. & Cunningham, J. C. 1972. The effect of the poxvirus of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), on mammals and birds. *Can. Entomologist*, 104: 1333 - 1342.

- 
- Bulla jr., L. A. & Cheng, T. C. 1976. *Comparative pathobiology Vol. 1. Biology of microsporidia*. Plenum Press, New York, London.
- Burjanadze, M. & Goginashvili, N. 2009. Occurrence of pathogens and nematodes in the spruce bark beetles, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in Borjomi Gorge. *Bull. Georgian Nat. Acad. Sci.*, 3: 145 - 150.
- Byers, J. A. 1993. Simulation and equation models of insect population-control by pheromone-baited traps. *J. Chem. Ecol.*, 19: 1939 - 1956.
- Byers, J. A. 2000. Wind-aided dispersal of simulated bark beetles flying through forests. *Ecol. Modell.*, 125: 231 - 243.
- Byers, J. A. & Lofqvist, J. 1989. Flight initiation and survival in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) during the spring dispersal. *Holarct. Ecol.*, 12: 432 - 440.
- Cairns, J. 1960. The initiation of vaccinia infection. *Virology*, 11: 603 - 623.
- Canning, E. U. & Lom, J. 1986. *The microsporidia of vertebrates*. Academic Press, London.
- Cavalier-Smith, T. 2001. What are fungi? In McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G., & Lemke, P. A., editors, *Systematics and Evolution Part A The Mycota VII*, pages 3 - 37. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Corradi, N. & Keeling, P. J. 2009. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biol. Rev.*, 23: 1 - 8.
- Cunningham, J. C., Burke, J. M., & Arif, B. M. 1973. An entomopoxvirus found in populations of the large aspen tortrix, *Choristoneura conflictana* (Lepidoptera: Tortricidae) in Ontario. *Can. Entomologist*, 105: 767 - 773.
- Curgy, J.-J., Vávra, J., & Vivares, C. 1980. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cellul.*, 38: 49 - 52.

- 
- Dall, D., Sriskantha, A., Vera, A., Lai-Fook, J., & Symonds, T. 1993. A gene encoding a highly expressed spindle body protein of *Heliothis armigera* entomopoxvirus. *J. Gen. Virol.*, 74: 1811 - 1818.
- David, L. & Weiser, J. 1994. Role of hemocytes in the propagation of a microsporidian infection in larvae of *Galleria mellonella*. *J. Invert. Pathol.*, 63: 212 - 213.
- Devauchelle, G., Bergoin, M., & Vago, C. 1971. Etude ultrastructurale du cycle de replication d'un entomopoxvirus dans les hémocytes de son hôte. *J. Ultrastruct. Res.*, 37: 301 - 321.
- Dippel, C., Heidger, C., Nicolai, V., & Simon, M. 1997. The influence of four different predators on bark beetles in European forest ecosystems (Coleoptera: Scolytidae). *Entomol. Gener.*, 21: 161 - 175.
- Duelli, P., Studder, M., & Naef, W. 1986. The flight of bark beetles outside of forest areas. *J. Appl. Entomol.*, 102: 139 - 148.
- Eck, R. 1990. The parasitic hymenoptera associated with *Ips typographus* in the period of progradation spectrum of species and mortality rates by parasites in some forests of the former GDR (East Germany). *Entmol. Abh. (Dresden)*, 53: 151 - 178.
- Edlind, T. D., Li, J., Visvesvara, G. S., Vodkin, M. H., McLaughlin, G. L., & Katiyar, S. K. 1996. Phylogenetic analysis of  $\beta$  - tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5: 359 - 367.
- Eriksson, M., Neuvonen, S., & Roininen, H. 2008. *Ips typographus* (L.) attack on patches of felled trees: "Wind-felled" vs. cut trees and the risk of subsequent mortality. *Forest Ecol. Manag.*, 255: 1336 - 1341.
- ERMA New Zealand 2000. *Environmental Risk management authority decision: application NOC99015*. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Limited.



- 
- Faccoli, M. 2009. Effect of weather on *Ips typographus* (Coleoptera, Curculionidae) phenology, voltinism, and associated spruce mortality in the southeastern Alps. *Environ. Entomol.*, 38: 307 - 316.
- Faccoli, M. & Stergulc, F. 2006. A practical method for predicting the short-time trend of bivoltine populations of *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae). *J. Appl. Entomol.*, 130: 61 - 66.
- Fahse, L. & Heurich, M. 2011. Simulation and analysis of outbreaks of bark beetle infestations and their management at the stand level. *Ecol. Modell.*, 222: 1833 - 1846.
- Fan, M., Kuo, C., & Lu, X. 1987. Tentative study on entomopoxvirus of *Dendroctonus armandi* Tsai et Li (Chinese with english summary ). *Disinsec. Microorg.*, 1: 140 - 141.
- Federici, B. A., Granados, R. R., Anthony, D. W., & Hazard, E. I. 1974. An entomopoxvirus and nonoccluded virus-like particles in larvae of the chironomid *Goeldichironomus holoprasinus*. *J. Invert. Pathol.*, 23: 117 - 120.
- Forster, B., Meier, F., & Gall, R. 2003. Bark beetle management after a mass attack - some Swiss experiences. In McManus, M. L. & Liebhold, A. M., editors, *Ecology, survey and management of forest insects, proceedings*, volume 311, pages 10 - 15. IUFRO. Conference on Ecology, Survey and Management of Forest Insects, Agr Acad, Congress Ctr, Krakow, Poland, SEP 01 - 05, 2002.
- Furuta, Y., Mitsuhashi, W., Kobayashi, J., Hayasaka, S., Imanishi, S., Chinzei, Y., & Sato, M. 2001. Peroral infectivity of non-occluded viruses of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and polyhedrin-negative recombinant baculoviruses to silkworm larvae is drastically enhanced when administered with *Anomala cuprea* entomopoxvirus spindles. *J. Gen. Virol.*, 82: 307 - 312.

- 
- Gebhart, A. A., Holmes, S., & Reardon, R. C. 1997. *Bioinsecticides for forest and shade tree defoliators. Annotated bibliography of nontarget impacts*. Forest Health Technology Enterprise Team, USDA, Morgantown, 183 pp.
- Germot, A., Philippe, H., & Le Guyader, H. 1997. Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial - type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 87: 159 - 168.
- Goodwin, R. H., Adams, J. R., & Shapiro, M. 1990. Replication of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in serum - free cultures of a gypsy moth cell line. *J. Invert. Pathol.*, 56: 190 - 205.
- Goodwin, R. H. & Filshie, B. K. 1969. Morphology and development of an occluded virus from the black - soil scarab, *Othnonius batesi*. *J. Invert. Pathol.*, 13: 317 - 329.
- Goodwin, R. H. & Filshie, B. K. 1975. Morphology and development of entomopoxviruses from two Australian scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Invert. Pathol.*, 25: 35 - 46.
- Goodwin, R. H., Miller, R. J., & Beaton, C. D. 1991. Entomopoxvirinae. In Adams, J. R. & Bonami, J. R., editors, *Atlas of Invertebrate Viruses*, pages 259 - 285. CRC Press. Boca Raton.
- Goodwin, R. H. & Roberts, R. J. 1975. Diagnosis and infectivity of entomopoxviruses from three Australian scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Invert. Pathol.*, 25: 47 - 57.
- Granados, R. R. 1973a. Entry of an insect poxvirus by fusion of the virus envelope with the host cell membrane. *Virology*, 52: 305 - 309.
- Granados, R. R. 1973b. Insect poxviruses: pathology, morphology and development. *Misc. Publ. Entomol. Soc. America*, 52: 73 - 94.

- Granados, R. R. 1981. Entomopoxvirus infections in insects. In Davidson, E. W., editor, *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, pages 101 - 126. Allanheld, Osmun Publishers.
- Granados, R. R. & Lawler, K. A. 1981. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virus*, 108: 297 - 308.
- Granados, R. R. & Roberts, D. W. 1970. Electron microscopy of a poxlike virus infecting an invertebrate host. *Virology*, 40: 230 - 243.
- Grodzki, W., McManus, M., Knizek, M., Meshkova, V., Mihalciuc, V., Novotny, J., Turcani, M., & Slobodyan, Y. 2004. Occurrence of spruce bark beetles in forest stands at different levels of air pollution stress. *Environ. Pollution*, 130: 73 - 83.
- Haidler, B. 1998. *Pathogene und Parasiten von Fichtenborkenkafer in einem Fichtenbestand am Achner Kogel bei Tamsweg*. PhD thesis, Formal- und Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Wien, Diploma thesis.
- Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. 2010. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu. Rev. Entomol.*, 55: 593 - 608.
- Händel, U. 2001. *Untersuchungen zum Gegenspielerkomplex assoziiert lebender Fichtenborkenkafer (Col., Scolytidae) aus naturnahen und sekundären Fichtenbeständen unter besonderer Berücksichtigung der Pathogene*. PhD thesis, Universität für Bodenkultur Wien, PhD thesis.
- Händel, U., Wegensteiner, R., Weiser, J., & Žižka, Z. 2003. Occurrence of pathogens in associated living bark beetles (Col., Scolytidae) from different spruce stands in Austria. *Anz. Schädlinge.*, 76: 22 - 32.
- Hasegawa, M. & Hashimoto, T. 1999. Phylogenetic position of amitochondriate protists in the evolution of eukaryotes. *Biol. Bull.*, 196: 369 - 392.

- Hashimoto, T., Nakamura, Y., Kamaishi, T., & Hasegawa, M. 1997. Early evolution of eukaryotes inferred from protein phylogenies of translation elongation factors 1 $\alpha$  and 2. *Arch. Protistenkd.*, 148: 287 - 295.
- Hedgren, P. & Schroeder, L. 2004. Reproductive success of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) and occurrence of associated species: a comparison between standing beetle-killed trees and cut trees. *Forest Ecol. Manag.*, 203: 241 - 250.
- Henry, J. E., Nelson, B., & Jutila, J. W. 1969. Pathology and development of the grasshopper inclusion body virus in *Melanoplus sanguinipes*. *J. Virol.*, 6: 605 - 610.
- Holuša, J., Weiser, J., & Pultar, O. 2004. Possibility of using of virus against bark beetles? Experiences with simulated infection of two bark beetles, *Ips typographus* and *Ips duplicatus*, with three pathogens. In Csóka, G., Hirka, A., & Koltay, A., editors, *Biotic damage in forests. Proceedings of the IUFRO Symposium (WP 7. 03. 10, Methodology of forest pest and disease survey in Central Europe), Mátrafüred, Hungary, September 12-16*, pages 72 - 78.
- Holuša, J., Lukášová, K., Wegensteiner, R., Grodzki, W., Pernek, M., & Weiser, J. 2013. Pathogens of the bark beetle *Ips cembrae*: microsporidia and gregarines also known from other *Ips* species. *J. Appl. Entomol.*, 137: 181 - 187.
- Holuša, J., Weiser, J., & Drápela, K. 2007. Pathogens of *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae) in three areas in central Europe. *Acta protozool.*, 46: 157 - 167.
- Holuša, J., Weiser, J., & Žižka, Z. 2006. *Larssoniella duplicati* n. sp. (Microsporidia, Unikaryonidae), a newly described pathogen infecting the double-spined spruce bark beetle, *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in the Czech Republic. *J. Pest Sci.*, 79: 127 - 135.
- Holuša, J., Weiser, J., & Žižka, Z. 2009. Pathogens of the spruce bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. *Cent. Eur. J. Biol.*, 4: 567 - 573.

- 
- Huang, X., Huang, Y., Yuan, X., & Zhang, Q. 2006. Electron microscopic examination of the viromatrix of *Rana grylio* virus in a fish cell line. *J. Virol. Meth.*, 133: 117 - 123.
- Huger, A., Krieg, A., Emschermann, P., & Götz, P. 1970. Further studies on *Polyoxvirus chironomi*, an insect virus of the pox group isolated from the midge *Chironomus luridus*. *J. Invert. Pathol.*, 15: 253 - 261.
- Hukuhara, T. & Wijonarko, A. 2001. Enhanced fusion of a nucleopolyhedrovirus with cultured cells by a virus enhancing factor from an entomopoxvirus. *J. Invert. Pathol.*, 77: 62 - 67.
- Hukuhara, T., Wijonarko, A., Hosokawa, Y., & Iwano, H. 2003. Enhanced infection of an entomopoxvirus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae), by a granulovirus. *Appl. Entomol. Zool.*, 38: 255 - 259.
- Hukuhara, T., Xu, J., & Yano, K. 1990. Replication of an entomopoxvirus in two lepidopteran cell lines. *J. Invert. Pathol.*, 56: 222 - 232.
- Hurpin, B. & Robert, P. 1967. Sur la spécificité de *Vagoiavirus melolonthae*. *Entomophaga*, 12: 175 - 180.
- Hurpin, B. & Robert, P. 1968. Experiments on simultaneous infections of the common cockchafer, *Melolontha melolontha*. *J. Invert. Pathol.*, 11: 203 - 213.
- Hurpin, B. & Robert, P. H. 1972. Comparison of the activity of certain pathogens of the cockchafer *Melolontha melolontha* in plots of natural meadowland. *J. Invert. Pathol.*, 19: 291 - 298.
- Hurpin, B. & Vago, C. 1963. Une maladie inclusions cytoplasmiques fusiformes chez le coléoptère *Melolontha melolontha* L. *Rev. Pathol. Veg. Entomol. Agr. Fr.*, 42: 115 - 117.

- 
- Hyliš, M. 1999. *Charakterizace tří izolátů mikrosporidií (Protista: Microspora) z bekyně velkohlavé, Lymantria dispar L. (Lepidoptera: Lymantriidae)*. PhD thesis, Přírodovědecká fak. UK Praha, 163 pp.
- Iwano, H. & Ishihara, R. 1991. Dimorphism of spores of *Nosema* spp. in cultured cell. *J. Invert. Pathol.*, 57: 211 - 219.
- Juha, M., Lukášová, K., Holuša, J., & Turčáni, M. 2012. Netradiční způsoby boje s lýkožroutem smrkovým - *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae) - certifikovaná metodika. *Lesnický průvodce 3/2012*.
- Katagiri, K. 1973. A newly discovered entomopoxvirus of *Choristoneura diversana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Invert. Pathol.*, 22: 300 - 302.
- Katagiri, K., Kushida, T., Kasuga, S., & Ohba, M. 1975. An entomopoxvirus disease of the cupreous chafer, *Anomala cuprea* Hope (in Japanese with English summary). *Jap. J. App. Entomol. Zool.*, 19: 243 - 252.
- Kereselidze, M., Wegensteiner, R., Goginashvili, N., Tvaradze, M., & Pilarska, D. 2010. Further studies on the occurrence of natural enemies of *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Georgia. *Acta zool. bulg.*, 62: 131 - 138.
- King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. 2012. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc.
- Knell, J. & Allen, G. E. 1978. Morphology and ultrastructure of *Unikaryon minutum* sp. n. (Microsporidia: Protozoa), a parasite of the Southern Pine Beetle, *Dendroctonus frontalis*. *Acta Protozool.*, 17: 271 - 278.
- Kohlmayr, B., Weiser, J., Wegensteiner, R., Handel, U., & Zizka, Z. 2003. Infection of *Tomicus piniperda* (Col., Scolytidae) with *Canningia tomici* sp. n. (Microsporidia, Unikaryonidae). *Anz. Schädlingskunde - J. Pest Sci.*, 76: 65 - 73.

- 
- Kreutz, J., Vaupel, O., & Zimmermann, G. 2004a. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. *J. Appl. Entomol.*, 128: 384 - 389.
- Kreutz, J., Zimmermann, G., Marohn, H., Vaupel, O., & Mosbacher, G. 1999. Preliminary investigations on the use of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and other control methods against the bark beetle *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the field. In Mossakowski, D., editor, *Communications of the German Soc. General and Applied Entomol., FEB 2000*, volume 12, pages 119 - 125.
- Kreutz, J., Zimmermann, G., & Vaupel, O. 2004b. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. *Biocontrol Sci. Technol.*, 14: 837 - 848.
- Krueger, K. & Mills, N. J. 1990. Observations on the biology of three parasitoids of the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae): *Coleoides bostrychorum*, *Dendrosoter middendorffi* (Hymenoptera, Braconidae) and *Rhopalicus tutela* (Hymenoptera, Pteromalidae). *J. Appl. Entomol.*, 110: 281 - 291.
- Kudo, R. 1924. A biologie and taxonomic study of the Microsporidia. III. *Biol. Monogr.*, 9: 1 - 268.
- Kurstak, E. & Garzon, S. 1977. Entomopoxviruses (Poxviruses of Invertebrates). In Maramorosch, K., editor, *The Atlas of Insect and Plant Viruses, Including Mycoplasma Viruses and Viroids*, pages 29 - 37. Academic Press. New York.
- Labbé, A. 1899. Sporozoa. In Bütschli, O., editor, *Das Tierreich. 5 lief.*, page 180 pp. Friedlander und Sohn, Berlin.
- Lacey, L. A. 1997. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, London, 409 pp.

- 
- 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., Křenová, Z., & Vojtěch, O. 2007. Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, 86: 646 - 647.
- Langridge, W. H. R. 1983a. Detection of *Amsacta moorei* entomopoxvirus and vaccinia virus proteins in cell cultures restrictive for poxvirus multiplication. *J. Invert. Pathol.*, 42: 77 - 82.
- Langridge, W. H. R. 1983b. Virus dna replication and protein synthesis in *Amsacta moorei* entomopoxvirus-infected *Estigmene acrea* cells. *J. Invert. Pathol.*, 41: 341 - 349.
- Langridge, W. H. R., Oma, E., & Henry, J. E. 1983. Characterization of the dna and structural proteins of entomopoxviruses from *Melanoplus sanguinipes*, *Arphia conspirsa*, and *Phoetaliotes nebrascensis* (Orthoptera). *J. Invert. Pathol.*, 42: 327 - 333.
- Langridge, W. H. R. & Roberts, D. W. 1982. Structural proteins of *Amsacta moorei*, *Euxoa auxiliaris*, and *Melanoplus sanguinipes* entomopoxviruses. *J. Invert. Pathol.*, 39: 346 - 353.
- Lapointe, R., Thumbi, D., & Lucarotti, C. J. 2012. Recent advances in our knowledge of baculovirus molecular biology and its relevance for the registration of baculovirus-based products for insect pest population control. In Soloneski, S., editor, *Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics*, pages 481 - 522. InTech.
- Larsson, J. I. R. 1980. Insect pathological investigations on Swedish thysanura. II. A new microsporidian parasite of *Petrovius brevystylis* (Microcoryphia, Machilidae):



- description of the species and a creation of two new genera and new family. *Protistologica*, 16: 85 - 101.
- Larsson, J. I. R. 1993. Description of *Chytridiopsis trichopterae* n. sp. (Microspora, Chytridiopsidae), a microsporidian parasite of the caddis fly *Polycentropus flavomaculatus* (Trichoptera, Polycentropodidae), with comments on relationships between the families *Chytridiopsidae* and *Metchnikovellidae*. *J. Euk. Microbiol.*, 40: 37 - 48.
- Lieutier, F. 1978. Fluctuations of nematode populations associated with bark beetles. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 104: 423 - 434.
- Lipa, J. J. 1968. *Stempellia scolyti* Weiser comb. nov. and *Nosema scolyti* n. sp. microsporidian parasites of four species of *Scolytus* (Coleoptera). *Acta Protozool.*, 6: 69 - 78.
- Lipa, J. J. & Bartkowski, J. 1972. A newly discovered poxlike virus disease of dung beetles, *Geotrupes silvaticus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. of Invert. Pathol.*, 20: 218 - 219.
- Lozach, P.-Y., Huotari, J., & Helenius, A. 2011. Late-penetrating viruses. *Curr. Opinion Virol.*, 1: 35 - 43.
- Lozach, P.-Y., Mancini, R., Bitto, D., Meier, R., Oestereich, L., Överby, A. K., Pettersson, R. F., & Helenius, A. 2010. Entry of bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host & Microbe*, 7: 488 - 499.
- Lukášová, K. & Holuša, J. 2012. Patogeny lýkožroutů rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): Review. Pathogens of bark beetles of the genus *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): Review. *Zprávy lesnického výzkumu*, 57: 230 - 240.
- Lukášová, K., Holuša, J., & Turčáni, M. 2013. Pathogens of *Ips amitinus*: new species and comparison with *Ips typographus*. *J. Appl. Entomol.*, 137: 188 - 196.

- 
- Maddox, J. V., Baker, M. D., Jeffords, M. R., Kuras, M., Linde, A., Solter, L. F., McManus, M. L., Vávra, J., & Vossbrinck, C. R. 1999. *Nosema portugal* n. sp., isolated from gypsy moths (*Lymantria dispar*) collected in Portugal. *J. Invert. Pathol.*, 73: 1 - 14.
- Manier, J. & Ormières, R. 1968. Ultrastructure de quelques stades de *Chytridiopsis socius* Schn., parasite de *Blaps lethifera* Marsch. (Coleoptera, Tenebrionidae). *Protistologica*, 4: 181 - 185.
- Marlow, S. A., Billam, L. J., Palmer, C. P., & King, L. A. 1993. Replication and morphogenesis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus in cultured cells of *Estigmene acrea* (salt marsh caterpillar). *J. Gen. Virol.*, 74: 1457 - 1461.
- Matilainen, H., Rinne, J., Gilbert, L., Marjomäki, V., Reunanen, H., & Oker-Blom, C. 2005. Baculovirus entry into human hepatoma cells. *J. Virol.*, 79: 15452 - 15459.
- Matthews, R. E. 1979. Third report of the international committee on taxonomy of viruses. classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 12: 129 - 296.
- Mercer, A. A., Schmidt, A., & Weber, O. 2007. *Poxviruses*. Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.
- Mercer, J. & Helenius, A. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.*, 11: 510 - 20.
- Mercer, J., Schelhaas, M., & Helenius, A. 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 79: 803 - 833.
- Mills, N. J. 1985. Some observations on the role of predation in the neutral regulation of *Ips typographus* populations. *Z. Angew. Entomol.*, 99: 209 - 215.
- Milner, R. J. & Lutton, G. 1975. The pathogenicity of an entomopoxvirus from *Othonnius batesi* [Col.: Scarabaeidae] and its possible use as a control agent. *Entomophaga*, 20: 213 - 220.

- Mitchell, F. L. & Smith, J. W. 1985. Pathology and bioassays of the lesser cornstalk borer (*Elasmopalpus lignosellus*) entomopoxvirus. *J. Invert. Pathol.*, 45: 75 - 80.
- Mitsuhashi, W. 2002. Further evidence that spindles of an entomopoxvirus enhance its infectivity in a host insect. *J. Invert. Pathol.*, 79: 59 - 61.
- Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K., & Wada, S. 2007. Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *J. Virol.*, 81: 4235 - 4243.
- Mitsuhashi, W. & Miyamoto, K. 2003. Disintegration of the peritrophic membrane of silkworm larvae due to spindles of an entomopoxvirus. *J. Invert. Pathol.*, 82: 34 - 40.
- Mitsuhashi, W., Sato, M., & Hirai, Y. 2000. Involvement of spindles of an entomopoxvirus (EPV) in infectivity of the EPVs to their host insect. *Arch. Virol.*, 145: 1465 - 1471.
- Moore, S. & Milner, R. J. 1973. Quick stains for differentiating entomopoxvirus inclusion bodies. *J. Invert. Pathol.*, 22: 467 - 470.
- Moser, J. C. & Bogenschutz, H. 1984. A key to the mites associated with flying *Ips typographus* populations. *Z. Angew. Entomol.*, 99: 209 - 215.
- Moss, B. 2001. *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. In Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., & Straus, S. E., editors, *Fields Virology, 4th edition*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Nägeli, C. 1857. Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Ztg.*, 15: 760 - 761.
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., & Wileman, T. 2007. A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. In Maramorosch, K., Shatkin, A. J., & Murphy, F. A., editors, *Adv. Virus Res.*, volume Volume 70, pages 101 - 182. Academic Press.

- 
- Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., & Risco, C. 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biology of the Cell*, 97: 147 - 172.
- Nylund, A., Watanabe, K., Nylund, S., Karlsen, M., Saether, P. A., Arnesen, C. E., & Karlsbakk, E. 2008. Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Arch. Virol.*, 153: 1299 - 1309.
- Němec, V., Zumr, V., & Starý, P. 1993. Studies on the nutritional state and the response to aggregation pheromones in the bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae). *J. Appl. Entomol.*, 116: 358 - 363.
- Okland, B. & Bjornstad, O. N. 2003. Synchrony and geographical variation of the spruce bark beetle (*Ips typographus*) during a non-epidemic period. *Popul. Ecol.*, 45: 213 - 219.
- Palli, S. R., Ladd, T. R., Tomkins, W. L., Shu, S., Ramaswamy, S. B., Tanaka, Y., Arif, B., & Retnakaran, A. 2000. *Choristoneura fumiferana* entomopoxvirus prevents metamorphosis and modulates juvenile hormone and ecdysteroid titers. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, 30: 869 - 876.
- Palmer, C. P., Miller, D. P., Marlow, S. A., Wilson, L. E., Lawrie, A. M., & King, L. A. 1995. Genetic modification of an entomopoxvirus: deletion of the spheroidin gene does not affect virus replication in vitro. *J. Gen. Virol.*, 76: 15 - 23.
- Pechacek, P. 1994. Reaktion des Dreizehenspechts auf eine Borkenkafergradation. *Allg. Forst. Z.*, page 661.
- Pelkmans, L. & Helenius, A. 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opinion Cell Biol.*, 15: 414 - 422.

- Perera, S., Li, Z., Pavlik, L., & Arif, B. 2010. Entomopoxviruses. In Assgari, S. & Johnson, K., editors, *Insect virology*, pages 83 - 102. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Pettersen, H. 1978. Chalcid flies (Hymenoptera, Chalcidoidea) reared from *Ips typographus* and *Pityogenes chalcographus* at some Norwegian localities. *Norw. J. Entomol.*, 23: 47 - 50.
- Pultar, O. & Weiser, J. 1999. Infection of *Ips typographus* with entomopoxvirus in the forest. *7th Europe Meet. IOBC/IUFRO, Vienna*.
- Purrini, K. 1975. Zur Kenntnis der Krankheiten des Grossen Ulmensplintkafers, *Scolytus scolytus* F. im Gebiet von Kosovo, Jugoslawien. *Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 48: 154 - 156.
- Purrini, K. 1978. Protozoen als Krankheitserreger bei einigen Borkenkaferarten (Col., Scolytidae) im Königsee-Gebiet, Oberbayern. *Anz. Schädlingkde., Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 51: 171 - 175.
- Purrini, K. & Halperin, J. 1982. *Nosema calcarati* n. sp. (Microsporidia), a new parasite of *Pityogenes calcaratus* Eichhoff. (Col. Scolytidae). *Z. Angew. Entomol.*, 94: 87 - 92.
- Purrini, K. & Ormieres, R. 1981. On three new sporozoan parasites of bark beetles (Scolytidae, Coleoptera). *Z. Angew. Entomol.*, 91: 67 - 74.
- Purrini, K. & Weiser, J. 1984. Light- and electron microscopic studies of *Chytridiopsis typographi* (Weiser 1954) Weiser 1970 (Microspora), parasitizing the bark beetle *Hylastes cunicularius* Er. *Zool. Anz. Jena*, 212: 369 - 376.
- Purrini, K. & Weiser, J. 1985. Ultrastructural study of the microsporidian *Chytridiopsis typographi* (Chytridiopsida: Microspora) infecting the bark beetle, *Ips typographus* (Scolytidae: Coleoptera), with new data on spore dimorphism. *J. Invert. Pathol.*, 45: 66 - 74.

- 
- Radek, R. & Fabel, P. 2000. A new entomopoxvirus from a cockroach: Light and electron microscopy. *J. Invert. Pathol.*, 75: 19 - 27.
- Richards, A. L. & Jackson, W. T. 2013. Behind closed membranes: The secret lives of picornaviruses? *PLoS Patog.*, 9: -.
- Richards, C. S. & Sheffield, H. G. 1970. Unique host relations and ultrastructure of a new microsporidian of the genus *Coccospora* infecting *Biomphalaria glabrata*. *Proc. 4th Int. Colloq. insect Pathol.*, pages 439 - 452.
- Robert, P. 1968. Essais de laboratoire sur la conservation de la virulence de *Vagoiavirus melolonthae*. *Entomophaga*, 14: 159 - 175.
- Roberts, D. W. & Granados, R. R. 1968. A poxlike virus from *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arctiidae). *J. Invert. Pathol.*, 12: 141 - 143.
- Rühm, W. 1956. *Die Nematoden der Ipiden. Parasitol. Schriftenreihe.* Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E., Helenius, A., & Mercer, J. 2011. Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *EMBO J.*, 30: 3647 - 3661.
- Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E., & Mercer, J. 2012. Poxvirus host cell entry. *Curr. Opinion Virol.*, 2: 20 - 27.
- Schramm, B. & Krijnse-Locker, J. 2005. Cytoplasmic organization of poxvirus DNA replication. *Traffic*, 6: 839 - 846.
- Schwenke, W. 1996. Principles of population dynamics and control of the great spruce bark beetle, *Ips typographus* (L) (Col, Scolytidae). *Anzeiger Schadlings. Pflanzen. Umwelt.*, 69: 11 - 15.
- Sezen, K. & Demirbag, Z. 2006. A new isolate of *Melolontha melolontha* entomopoxvirus in Turkey: Morphology, infectivity and prevalence in the field. *Appl. Entomol. Zool.*, 41: 471 - 477.

- Skuhravý, V. 2002. *Lýkožrout smrkový a jeho kalamity*. Agrospoj Praha, 196 pp.
- Solter, L. F., Becnel, J. J., & Oi, D. H. 2012. Microsporidian entomopathogens. In Vega, F. E. & Kaya, H. K., editors, *Insect Pathology (Second Edition)*, pages 221 - 263. Academic Press.
- Stoltz, D. B. & Summers, M. D. 1972. Observations on the morphogenesis and structure of hemocytic poxvirus in the midge *Chironomus attenuatus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 40: 581 - 598.
- Sutter, G. R. 1972. A pox virus of the army cutworm. *J. Invert. Pathol.*, 19: 375 - 382.
- Švestka, M. & Pultar, O. 2006. Výzkum využití bakulovirů v preventivní ochraně lesa před bekyní mniškou (*Lymantria monacha* L.). *Zprávy lesnického výzkumu*, 51: 121 - 133.
- Švestka, M., Hochmut, R., & Jančařík, V. 1998. *Praktické metody v ochraně lesa*. Lesnická práce, Kostelec n. Černými lesy.
- Takemoto, Y., Mitsuhashi, W., Murakami, R., Konishi, H., & Miyamoto, K. 2008. The n-terminal region of an entomopoxvirus fusolin is essential for the enhancement of peroral infection, whereas the c-terminal region is eliminated in digestive juice. *J. Virol.*, 82: 12406 - 12415.
- Takov, D., Doychev, D., Linde, A., Draganova, S., & Pilarska, D. 2011. Pathogens of bark beetles (Coleoptera: Curculionidae) in Bulgarian forests. *Phytoparasitica*, 39: 343 - 352.
- Takov, D., Doychev, D., Wegensteiner, R., & Pilarska, D. 2007. Study of bark beetle (Coleoptera, Scolytidae) pathogens from coniferous stands in Bulgaria. *Acta zool. bulg.*, 59: 87 - 96.
- Takov, D. & Pilarska, D. 2009. Single and mixed infections in *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytinae) caused by the entomopathogens *Entomopoxvirus typographi*

- (Virales), *Gregarina typographi* (Sporozoa) and *Chytridiopsis typographi* (Microsporidia). *Acta zool. bulg.*, 61: 45 - 48.
- Takov, D., Pilarska, D., & Wegensteiner, R. 2010. List of protozoan and microsporidian pathogens of economically important bark beetle species (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Europe. *Acta zool. bulg.*, 62: 201 - 209.
- Tanada, Y. & Kaya, H. K. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press.
- Thong, C. H. S. & Webster, J. M. 1975. Effects of the bark beetle nematode, *Contortylenchus reversus*, on gallery construction, fecundity, and egg viability of the douglas fir beetle, *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Invert. Pathol.*, 26: 235 - 238.
- Tokarev, A. A., Alfonso, A., & Segev, N. 2009. Overview of intracellular compartments and trafficking pathways. In Segev, N., Afonso, A., Payne, G., & Donaldson, J., editors, *Trafficking inside cells: pathways, mechanisms and regulation.*, pages 3 - 14. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media.
- Tolonen, N., Doglio, L., Schleich, S., & Locker, J. K. 2001. Vaccinia virus dna replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol. Biol. Cell*, 12: 2031 - 2046.
- Tonka, T. & Weiser, J. 2009. Entomopoxvirus in the spruce bark beetle, *Ips typographus* and its laboratory management. In Kunca, A. & Zúbrik, M., editors, *Insects and Fungi in Storm Areas*. Proc. IUFRO WP 7.03.10, September 15-19, 2008, Štrbské Pleso, Slovakia, 92-95.
- Tonka, T., Weiser Jr., J., & Weiser, J. 2010. Budding: A new stage in the development of *Chytridiopsis typographi* (Zygomycetes: Microsporidia). *J. Invert. Pathol.*, 104: 17 - 22.



- 
- Traktman, P. 1996. Poxvirus DNA Replication. In DePamphilis, M. L., editor, *DNA replication in eukaryotic cells*, pages 775 - 798. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vago, C. 1963. A new type of insect virus. *J. Insect Pathol.*, 5: 275 - 276.
- Vago, C., Amargier, A., Hurpin, B., Meynadier, G., & Duthoit, J.-L. 1968a. Virose a fuseaux d'un scarabeidae d'amerique du sud. *Entomophaga*, 13: 373 - 376.
- Vago, C., Monsarrat, P., Duthoit, J.-L., Amargier, A., & Waerebeke, G. M. D. V. 1968b. Nouvelle virose a fuseaux observees chez un Lucanidae (Coleoptera) de Madagascar. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 266: 1621 - 1623.
- Vago, C., Robert, P., Amargier, A., & Duthoit, J.-L. 1969. Nouvelle virose a spheroides et a fuseaux observee chez le coleoptere *Phyllopertha horticola* L. *Mikroskopie*, 25: 378 - 386.
- Vite, J. P. & Baader, E. 1990. Present and future use of semiochemicals in pest-management of bark beetles. *J. Chem. Ecol.*, 16: 3031 - 3041.
- Vossbrinck, C., Maddox, J., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B., & Woese, C. 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, 326: 411 - 414.
- Vossbrinck, C. R. & Debrunner-Vossbrinck, B. 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia parasitol.*, 52: 131 - 142.
- Vávra, J. 1976. Structure of the microsporidia. In a T. C. Cheng, L. A. B., editor, *Comparative Pathobiology Vol. 1. Biology of microsporidia.*, pages 1 - 85. Plenum Press, New York, London.
- Vávra, J. 1986. *Biologie parazitických prvoků kmene Microspora. Dizertace.* Přírodovědecká fakulta UK, Praha.

- Wegensteiner, R. 1994. *Chytridiopsis typographi* (Protozoa, Microsporida) and other pathogens in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, 17: 39 - 42.
- Wegensteiner, R. 2007. Pathogens in bark beetles. In Lieutier, F., Day, K. R., Battisti, A., Gregoire, J.-C., & Evans, H. F., editors, *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a Synthesis*, pages 291 - 316. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Wegensteiner, R., Dedryver, C.-A., & Pierre, J.-S. 2010. The comparative prevalence and demographic impact of two pathogens in swarming *Ips typographus* adults: a quantitative analysis of long term trapping data. *Agri. Forest Entomol.*, 12: 49 - 57.
- Wegensteiner, R. & Weiser, J. 1995. A new entomopoxvirus in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Invert. Pathol.*, 65: 203 - 205.
- Wegensteiner, R. & Weiser, J. 1996. Untersuchungen zum Auftreten von Pathogenen bei *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) aus einem Naturschutzgebiet im Schwarzwald (Baden-Württemberg). *Anz. Schädlingskunde*, 69: 162 - 167.
- Wegensteiner, R. & Weiser, J. 2004. Annual variation of pathogen occurrence and pathogen prevalence in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). *J. Pest. Sci.*, 77: 221 - 228.
- Wegensteiner, R., Weiser, J., & Führer, E. 1996. Observations on the occurrence of pathogens in the bark beetle *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae). *J. App. Entomol.*, 120: 199 - 204.
- Weiser, J. 1954. Příspěvek k znalosti cizopasníků kůrovce *Ips typographus* L., I.. *Věst. čs. spol. zool.*, 18: 217 - 224.
- Weiser, J. 1955. Příspěvek k znalosti cizopasníků kůrovce *Ips typographus* L., II.. *Věst. čs. spol. zool.*, 19: 374 - 380.

- 
- Weiser, J. 1961. A new microsporidian from the bark beetle *Pityokteines curvidens* Germar (Col., Scolytidae) in Czechoslovakia. *J. Invert. Pathol.*, 3: 324 - 329.
- Weiser, J. 1965. *Vagoiavirus* gen.n., a virus causing disease in insects. *J. Invert. Pathol.*, 7: 82 - 85.
- Weiser, J. 1966. *Nemoci hmyzu*. Akademia Praha.
- Weiser, J. 1968. *Plistophora scolyti* sp.n. (Protozoa, Microsporidia) a new parasite of *Scolytus scolytus* F. (Col., Scolytidae). *Folia parasitol*, 15: 11 - 14.
- Weiser, J. 1969. A pox-like virus in the midge *Camptochironomus tentans*. *Acta Virol*, 13: 549 - 53.
- Weiser, J. 1970. Three new pathogens of the douglas fir beetle, *Dendroctonus pseudotsugae*: *Nosema dendroctoni* n. sp., *Ophryocystic dendroctoni* n. sp., and *Chytridiopsis typographi* n. comb. *J. Invert. Pathol.*, 16: 436 - 441.
- Weiser, J., Händel, U., Wegensteiner, R., & Žižka, Z. 2002. *Unikaryon polygraphi* sp. n. (Protista: Microspora), a new pathogen of the four-eyed spruce bark beetle, *Polygraphus poligraphus* (Col., Scolytidae). *J. Appl. Entomol.*, 126: 148 - 154.
- Weiser, J. & Pultar, O. 2002. Structure of antagonistic pathogens in population of the spruce bark beetle, *Ips typographus* and in associated *Pityogenes chalcographus* in the Šumava area. *VIIIth Eur. Cong. Entomol., Oct. 7-13, 2002, Thessaloniki, Greece*.
- Weiser, J., Pultar, O., & Žižka, Z. 2000. Biological protection of forest against bark beetle outbreaks with poxvirus and other pathogens. *IUAPPA Praha 2000 Section:B*, pages 168 - 172.
- Weiser, J., Tonka, T., & Zelený, J. 1999. Distribution of pathogens in populations of *Ips typographus* in the Šumava outbreak area. *7th European Meet. IOBC/EPRS/COST, March 22-26, Vienna*.

- 
- Weiser, J. & Vago, C. 1966. A newly described virus of the winter moth, *Operophtera brumata* Hübner (Lepidoptera, Geometridae). *J. Invert. Pathol.*, 8: 314 - 319.
- Weiser, J. & Wegensteiner, R. 1994. A new type of entomopoxvirus in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) in Czechoslovakia. *Zeit. angew. Zool.*, 80: 425 - 434.
- Weiser, J., Wegensteiner, R., & Žižka, Z. 1995. *Canningia spinidentis* gen. et sp. n. (Protista: Microspora), a new pathogen of the bark beetle *Pityokteines spinidens*. *Folia Parasitol.*, 42: 1 - 10.
- Weiser, J., Wegensteiner, R., & Žižka, Z. 1997. Ultrastructures of *Nosema typographi* Weiser 1955 (Microspora: Nosematidae) of the bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera: Scolytidae). *J. Invert. Pathol.*, 70: 156 - 160.
- Weiser, J., Wegensteiner, R., & Žižka, Z. 1998. *Unikaryon montanum* sp. n. (Protista: Microspora), a new pathogen of the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Parasitol.*, 45: 191 - 195.
- Weiss, L. M., Zhu, X., Cali, A., Tanowitz, H. B., & Wittner, M. 1994. Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol.*, 41: 81 - 90.
- Wermelinger, B. 2004. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - a review of recent research. *Forest Ecol. Manag.*, 202: 67 - 82.
- Wermelinger, B., Epper, C., Kenis, M., Ghosh, S., & Holdenrieder, O. 2012. Emergence patterns of univoltine and bivoltine *Ips typographus* (L.) populations and associated natural enemies. *J. Appl. Entomol.*, 136: 212 - 224.
- Weslien, J. 1992a. The arthropod complex associated with *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) species composition phenology and impact on bark beetle productivity. *Entomol. Fenn.*, 3: 205 - 213.

- 
- Weslien, J. 1992b. Effects of mass trapping on *Ips typographus* L. populations. *J. Appl. Entomol.*, 114: 228 - 232.
- Weslien, J. 1994. Interactions within and between species at different densities of the bark beetle *Ips typographus* and its predator *Thanasimus formicarius*. *Entomol. Exp. Appl.*, 71: 133 - 143.
- Weslien, J., Annala, E., Bakke, A., Bejer, B., Eidmann, H. H., Narvestad, K., Nikula, A., & Ravn, H. P. 1989. Estimating risks for spruce bark beetle (*Ips typographus* (L.)) damage using pheromone - baited traps and trees. *Scand. J. Forest. Res.*, 4: 87 - 98.
- Weslien, J. & Schroeder, L. 1999. Population levels of bark beetles and associated insects in managed and unmanaged spruce stands. *For. Ecol. Manag.*, 115: 267 - 275.
- Wijonarko, A. & Hukuhara, T. 1998. Detection of a virus enhancing factor in the spheroid, spindle, and virion of an entomopoxvirus. *J. Invert. Pathol.*, 72: 82 - 86.
- Williams, G. V. & Faulkner, P. 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In Miller, L. K., editor, *The Baculoviruses*, pages 61 - 107. Springer US.
- Wittner, M. & Weiss, L. M. 1999. *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D. C.
- Woods, S. A., Streett, D. A., & Henry, J. E. 1992. Temporal patterns of mortality from an entomopoxvirus and strategies for control of the migratory grasshopper (*Melanoplus sanguinipes* F.). *J. Invert. Pathol.*, 60: 33 - 39.
- Xu, J. & Hukuhara, T. 1992. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata*, by a factor in the spheroids of an entomopoxvirus. *J. Invert. Pathol.*, 60: 259 - 264.

- Yaman, M. & Baki, H. 2011. First record of entomopoxvirus of *Ips typographus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) for Turkey. *Acta zool. bulg.*, 63: 199 - 202.
- Yaman, M. & Radek, R. 2012. *Menzbieria chalcographi*, a new neogregarine pathogen of the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Kugelann) (Curculionidae, Scolytinae). *Acta Parasitol.*, 57: 216 - 220.
- Zahradník, P. 1997. Historie kůrovcových kalamit, prognózy a stanovení principů ochrany lesa proti kůrovcům. *Sbor. ref. z celost. konference "Kůrovcová kalamita - střet názorů"*, Písek., pages 5 - 9.
- Zitterer, P. M. 2002. *Antagonists of Ips acuminatus (Gyllenhall) with special consideration of pathogens*. PhD thesis, Universität für Bodenkultur Wien, Diploma thesis.
- Zumr, V. 1982. Flight activity of the spruce bark beetle *Ips typographus* to pheromone traps (Coleoptera, Scolytidae). *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 79: 422 - 428.
- Zumr, V. 1995. *Lýkožrout smrkový - biologie, prevence a metody boje*. Matice lesnická, Písek.
- Zumr, V. & Starý, P. 1992. The occurrence of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (L.), in individual forest zones. *Forest Ecol. Manag.*, 51: 251 - 258.
- Žižka, Z., Weiser, J., & Wegensteiner, R. 2001. Ultrastructures of the Entomopoxvirus Ab in the bark beetle *Ips typographus*. In Berger, J., editor, *Cells III.*, page 244 pp. Kopp Publ. České Budějovice.

## 10. Abstract

The bark beetle, *Ips typographus* is economically important pest of spruce standings across Europe. The knowledge of biology and ecology of bark beetles is important to protect spruce forests against beetles outbreaks. The research of pathogens of bark beetles is the main goal to use biological control of bark beetles and replace chemical or mechanical methods using today.

During the bark beetle outbreak in Sumava mountains three main pathogens showed up very promising. Microsporidium *Chytridiopsis typographi*, the virus *Ips typographus Entomopoxvirus* and negregarine *Menzbieria chalcographi* were the most occurred pathogens attacking beetles in Sumava outbreak area. Transmission of microsporidium and virus have been introduced and propagated in living bark beetles in laboratory. The reaserach of biology, transmission, morphogenesis and ultrastructure of these pathogens begun in living beetles in laboratory conditions.

Results which were obtained can be divided to virological and microsporidian parts. In both cases the infection and routine passage have been successful in laboratory condition and now the infections of microsporidium *Ch. typographi* nad ITEV are routinely propagated to purchase infected material.

Two different replication places has been found in the TEM preparations during the development of ITEV. Viroplasm type I and a distinct area in the cytoplasm of infected cell with minute globules. It seems that these globules contain part of a new DNA and after they enter crescent-shaped membranes they dissolve and synthesised parts of new genom are connected to form one new DNA filament.

The enter of virus particle across plasma membrane or extracelular virion has not been observed. There are virions protruding from the spheroid (occlusion body).

---

During the spheroid movement through the host midgut protruding virions are pushed to the midgut epithelium wall and enter the cell.

In the laboratory infected bark beetle midgut there were first report of the stage in the ITEV developmen, provisionally named here as a "interphase stage". This membrane bounded vesicle seems to be some kind of endosome. In this vesicle there are some signs of first steps in development of entering mature virus particle. Inside the vesicle small membranous globules are formed and after the rupture of bounding membrane the globules are released in the cytoplasm of host cell.

Unlike the original description of ITEV in laboratory infected beetles the synthesis and origin of microspindles was described. In TEM the first steps of newly formed virions occluded into the spheroid were observed, including microspindles occlusion. The cytoplasmic organisation of ITEV replication was first detected in host cells.

The speed of ITEV infection is faster in bark beetles compared with type species MMEV and other EV described from coleopteran hosts. ITEV develops in midgut epithelium of host. The potential use of ITEV in biological control of bark beetles is not possible with informations we have now. The production of biologicals mut be of economic importance for potential producers; on the other hand the most crucial question in biological control of bark beetles is the introduction of biological agents into the population beneath the bark. First the way how to manage ITEV beneath the bark must be decided and then the using of ITEV as a bioinsecticide can be discussed.

The successful infection of *Ch. typographi* has been managed in laboratory. Obtained results completed and revised findings which were published in first descriptions. Purchased results offer a possibility to compare old a new findings concernig this microsporidium.



---

Budding as a unique process of multiplication has been described in microsporidia. This process is uncommon in microsporidia and has not never been observed. It acts as a tool to multiple vegetative stages in the life cycle.

Mitosome - like organelles have been described in some stages of the developmental cycle of microsporidium *Ch. typographi*. The ultrastructures and complete life cycle was described in *Ch. typographi* and the former description was revised.

---

## 11. Přílohy