

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Účinnost některých rostlinných extraktů na vybrané
charakteristiky hmyzu**

Bakalářská práce

Autor práce: Anna Marie Zlonická

Vedoucí práce: Ing. Jan Kazda, CSc.

Konzultant: Ing. Roman Pavela, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci „Účinnost některých rostlinných extraktů na vybrané charakteristiky hmyzu“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce Ing. Janu Kazdovi a odbornému školiteli Ing. Romanu Pavelovi za poskytnuté rady a podporu.

Účinnost některých rostlinných extraktů na vybrané charakteristiky hmyzu

Souhrn

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit biologickou účinnost, především toxicitu, několika vybraných rostlinných extraktů na modelové druhy hmyzích škůdců, jakožto součásti širšího výzkumného úsilí o nalezení nových zdrojů botanických insekticidů. Do nedávna byly téměř výlučně používány insekticidy syntetické, které ale mají řadu nežádoucích vedlejších účinků na člověka a celý ekosystém. Botanické insekticidy jsou proto klíčové pro zajištění budoucí potravinové bezpečnosti lidstva.

Byly vybrány metanolové extrakty z rostlin *Helianthus tuberosus*, *Paulownia tomentosa*, *Populus nigra*, *Celastrus angulatus* a *Coriandrum sativum*. Jako modeloví škůdci polních plodin byly vybrány larvy 3. instaru *Spodoptera littoralis* (Boisd.) a dospělci *Myzus persicae* (Sulzer), a jako vektor lidských infekcí larvy 3. instaru *Culex quinquefasciatus* (Say).

Sledována byla především akutní toxicita, u *S. littoralis* pak navíc chronická toxicita, inhibice růstu a protipožerová účinnost. Všechny provedené testy byly laboratorního charakteru za přesně kontrolovaných podmínek. Pomocí koncentračních sérií a probitové analýzy byly stanoveny hodnoty letálních dávek (koncentrací) LD₅₀ (LC₅₀).

Nejvyšší toxicita pro *S. littoralis* byla zjištěna u extraktů z *Coriandrum sativum* (37% mortalita při 500 µg/larvu akutně a LD₅₀ = 98 µg/cm² chronicky) a z *Populus nigra* (19% mortalita při 500 µg/larvu akutně a LD₅₀ = 211 µg/cm² chronicky). Nejvyšší protipožerovou účinnost měl extrakt *Helianthus tuberosus* (99,8 % při 100 µg/cm²).

Také pro *C. quinquefasciatus* měly nejvyšší toxicitu extrakty z *Coriandrum sativum* (LD₅₀ = 52 µg/ml akutně) a z *Populus nigra* (LD₅₀ = 358 µg/ml akutně).

Nejvyšší toxicitu pro *M. persicae* měly extrakty z *Coriandrum sativum* (LC₅₀ = 0,9 % w/v akutně) a z *Populus nigra* (LC₅₀ = 2,1 % w/v akutně).

Za nejvhodnější pro další vývoj botanických insekticidů lze doporučit především extrakt z kůry *Populus nigra* (odpadní materiál a energetická plodina – potenciál nízké ceny), a dále extrakt z *Coriandrum sativum* (nejvyšší toxicita z testovaných). Tyto dvě rostliny navíc pocházejí z evropského kontinentu.

Klíčová slova: botanické insekticidy, rostlinné extrakty, ekologické zemědělství

Effects of selected plant extracts on specified insect characteristics

Summary

The goal of this bachelor thesis was to assess the biological efficacy (toxicity) of several plant extracts against model insect pest species. This work is a part of a larger research effort conducted to discover new sources of botanical insecticides. Such insecticides are crucial to assure the future food security of mankind without suffering the side effects common with synthetic insecticides.

Methanol extracts from the following plant species have been tested: *Helianthus tuberosus*, *Paulownia tomentosa*, *Populus nigra*, *Celastrus angulatus*, *Coriandrum sativum*. Model insect pest species were *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Myzus persicae* (Sulzer) for crop pests and *Culex quinquefasciatus* (Say) for human disease vectors.

Acute toxicity has been determined for all three pest species. For *S. littoralis*, tests for chronic toxicity, growth inhibition and antifeedance were also conducted. The tests were performed in laboratory settings in a well-controlled environment. Extracts were applied in a series of doses/concentrations in order to determine the lethal dose/concentration LD_{50} (LC_{50}).

The highest toxicity against *S. littoralis* has been found in *Coriandrum sativum* (37% mortality at 500 $\mu\text{g}/\text{larva}$ acute and $LD_{50} = 98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ chronic) and *Populus nigra* (19% mortality at 500 $\mu\text{g}/\text{larva}$ acute and $LD_{50} = 211 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ chronic) extracts.

The highest toxicity against *C. quinquefasciatus* has been likewise found in *Coriandrum sativum* ($LD_{50} = 52 \mu\text{g}/\text{ml}$ acute) and *Populus nigra* ($LD_{50} = 358 \mu\text{g}/\text{ml}$ acute) extracts.

The highest toxicity against *M. persicae* has been found in *Coriandrum sativum* ($LC_{50} = 0,9 \%$ w/v acute) and *Populus nigra* ($LC_{50} = 2,1 \%$ w/v acute).

The best candidates for further development are the extracts from *Populus nigra* (a potentially cheap source as a biofuel plant) and *Coriandrum sativum* (for its highest toxicity). Both of these plants grow naturally in Europe.

Keywords: botanical insecticides, plant extracts, ecological agriculture

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Historie ochrany rostlin před hmyzími škůdci	9
3.2 Mechanismy přirozené obrany rostlin před hmyzem	10
3.2.1 Mechanická obrana.....	10
3.2.2 Chemická obrana.....	10
3.2.3 Působení obranných látek na hmyz.....	11
3.3 Botanické insekticidy	12
3.3.1 Botanické insekticidy první generace.....	12
3.3.2 Botanické insekticidy druhé generace.....	14
3.3.3 Botanické insekticidy třetí generace.....	15
3.3.4 Výhody a nevýhody botanických insekticidů.....	15
3.4 Charakteristika vybraných hmyzích škůdců	16
3.4.1 <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval).....	16
3.4.2 <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	17
3.4.3 <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say).....	18
3.5 Charakteristika rostlin poskytujících testované extrakty	19
3.5.1 <i>Helianthus tuberosus</i> L.....	19
3.5.2 <i>Paulownia tomentosa</i> (Steud.).....	19
3.5.3 <i>Populus nigra</i> L.....	20
3.5.4 <i>Celastrus angulatus</i> (Maxim.).....	21
3.5.5 <i>Coriandrum sativum</i> L.....	21
4 Materiály a metody	23
4.1 Pokusné prostředí	23
4.2 Pokusný hmyz	23
4.3 Použité rostlinné extrakty	23
4.4 Metodika testů biologické účinnosti	24
4.4.1 Akutní toxicita.....	24
4.4.2 Chronická toxicita.....	25
4.4.3 Protipožerová účinnost.....	25
4.4.4 Inhibice růstu.....	26
4.5 Výpočty a statistické metody	27
5 Výsledky	28
5.1 Biologická účinnost extraktů na <i>Spodoptera littoralis</i>	28
5.2 Biologická účinnost extraktů na <i>Culex quinquefasciatus</i>	29
5.3 Biologická účinnost extraktů na <i>Myzus persicae</i>	30
6 Diskuse	32
7 Závěr	34
8 Použitá literatura	35

1 Úvod

Vznik zemědělství se datuje do doby přibližně před 10 000 lety a již od této doby se lidé setkávali s problémem poškozování plodin různými škůdci, zejména hmyzem. Již ve starověku byly užívány různé ochranné metody založené na jednoduchých rostlinných extraktech. S příchodem rozsáhlých zemědělských monokultur a odrůd intenzivně šlechtěných na výnos se problém ochrany plodin prohloubil (Isman, 2006).

Ochrana zemědělských plodin před hmyzími škůdci zůstává jedním z nejpálčivějších problémů zemědělské výroby v zemích západní industrializované společnosti. Rozvojem chemické vědy a průmyslu a jím produkovanými syntetickými insekticidy v 1. pol. 20. stol. byl umožněn prudký růst zemědělské výroby v těchto zemích. Tento rozvoj podpořil růst materiálního blahobytu, a později přispěl i k transformaci společnosti v postindustriální. Cenou za tento vývoj však byla kontaminace potravního řetězce těžko odbouratelnými rezidui těchto chemických látek. Plíživé, obtížně odhalitelné působení těchto látek velmi pravděpodobně přispívá k rozvoji mnoha tzv. civilizačních chorob, navzdory snaze o vývoj nových syntetických insekticidů méně škodlivých jak pro zdraví lidské, tak pro zdraví celého ekosystému (Isman, 2006; Dubey, 2011; Pavela, 2011a).

V poslední třetině 20. stol. se začal nově rozvíjet starobylý způsob ochrany rostlin pomocí extraktů z vybraných druhů rostlin, které samy jeví proti hmyzím škůdcům zvýšenou odolnost, tzv. botanických insekticidů. Účinné látky v těchto přípravcích zůstávají ve své původní, chemicky neupravené podobě a díky tomu jsou v ekosystému již z principu snadněji odbouratelné (Pavela, 2011a). Pro nalezení nejvhodnějších zdrojů takovýchto extraktů je zapotřebí prozkoumat velké množství rostlin a tato práce je příspěvkem k tomuto úsilí.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo srovnat biologickou účinnost vybraných rostlinných extraktů (*Helianthus tuberosus*, *Paulownia tomentosa*, *Populus nigra*, *Celastrus angulatus*, *Coriandrum sativum*) na vybrané charakteristiky hmyzu a navrhnout možné využití nejúčinnějších extraktů v ochraně rostlin.

Hypotéza: rostlinné extrakty ovlivňují chování hmyzu a mohou být využity v ochraně rostlin jako alternativa chemické ochrany.

3 Literární rešerše

3.1 Historie ochrany rostlin před hmyzími škůdci

Zemědělství vznikalo před přibližně 10 000 lety. Postupně byly pěstovány a selektovány rostliny rýže, pšenice a kukuřice v oblastech jihovýchodní Asie, tzv. úrodného půlměsíce a Egypta, Ameriky. Už z doby před 3000 lety je ze záznamů doloženo užívání ochranných metod založených na jednoduchých rostlinných extraktech, které negativně účinkovaly proti hmyzu, plísním a jiným škůdcům. Často se k tomuto účelu používaly rostliny s léčivými účinky na člověka (Isman, 2006).

V oblasti Evropy se velmi rozšířeným insekticidem stal tzv. dalmátský prach, což je prach z drcených listů řimbab (*Pyrethrum*). Je známo, že okolo r. 470 př. Kr. vydal perský král Xerxes nařízení k užívání tohoto prachu proti vším a blechám ve svém vojsku. Po objevení Ameriky se do Evropy dostaly rostliny tabáku a v 16. a 17. stol. začaly být vodné výluhy z něho používány proti savým škůdcům. V roce 1828 byla izolována hlavní účinná látka nikotin (Pavela, 2006).

V době zemědělské revoluce v 18. a 19. stol. vedlo pěstování rozsáhlých monokultur ke zvýšenému výskytu některých škůdců. V té době také začal být v oblasti Ameriky a jihovýchodní Asie používán insekticid rotenon, extrahovaný z rostlin skupiny kožnatců (*Derris*) (Pavela, 2006). V tomto období začaly být extrakty z řimbab, pyretra, používány komerčně také v zemědělství.

V první polovině 20. stol. byly velmi často používány insekticidy anorganické, jako např. sloučeniny síry nebo těžkých kovů olova a arsenu. Hmyz byl huben i pomocí plynů jako kyanovodík (Šefrová, 2006).

Revoluci v oblasti zemědělských insekticidů způsobil po druhé světové válce první masově užívaný syntetický organický insekticid DDT, který byl zprvu považován, na rozdíl od těžkých kovů, za nezávadný lidskému zdraví. Ačkoliv nevykazoval akutní toxicitu pro člověka, bylo postupně prokázáno, že jeho rezidua v potravním řetězci měla za následek např. vývojové poruchy plodu nebo zvýšený výskyt rakoviny. Objevily se také první populace hmyzu rezistentní k DDT. V roce 1972 byl DDT v USA zakázán (Pavela, 2011a).

DDT a další chlorované insekticidy, jako např. hexachlorcyklohexan (HCH), byly poté nahrazeny organofosfáty, karbamáty a syntetickými pyretroidy (Kocourek, 2000). Vývoj syntetických pyretroidů začal v sedmdesátých letech a jejich výhodou se ukázala být mj. nízká aplikační dávka.

I tyto modernější syntetické pesticidy však zanechávají v ekosystému rezidua, jejichž negativní vliv jak na lidské zdraví, tak na chod celého ekosystému byl v posledních desetiletích dokumentován v mnoha studiích. Proto vznikla myšlenka tzv. integrovaného

systému ochrany rostlin (integrated pest management, IPM). Tento systém by měl umožnit pomocí kombinace biologických, fyzikálních a agrotechnických postupů podstatně snížit množství užívaných syntetických pesticidů. Moderní botanické insekticidy jsou pak důležitou složkou IPM (Pavela, 2011a).

3.2 Mechanismy přirozené obrany rostlin před hmyzem

Jednou z možností ochrany rostlin před škůdci je využití chemických látek, které proti nim rostliny přirozeně produkují. Takové přípravky se nazývají botanické pesticidy, nebo insekticidy v případě hmyzu (Pavela, 2006). Následuje proto stručná charakteristika přirozených obranných mechanismů.

3.2.1 Mechanická obrana

Mechanickou obranu rostliny před škůdci tvoří různé pokožkové a podpokožkové výrůstky, kterými mohou být žláznaté nebo žahavé trichomy, chlupy, nebo trny. Jednodušší formy trichomu jsou tvořené prostým vychlípáním buněk epidermu. Složitější pak vznikají vícenásobným dělením buněk. Trichomy mohou obsahovat dráždivý sekret, který se při zlomení trichomu vylíje, jako např. u kopřivy. Tento sekret pak spadá do chemické obrany (Novák a Skalický, 2009).

Odlišným druhem mechanické obrany je pak produkce kluzké voskové vrstvy na povrchu rostliny, v rostlinné říši velmi rozšířená. Některé druhy hmyzu, např. mandelinky, dokáží však tuto ochranu překonat produkcí lepkavých látek vylučovaných na koncích nohou (Novák a Skalický, 2009).

3.2.2 Chemická obrana

Kromě látek nezbytně nutných pro stavbu, činnost a vývoj rostlinného těla (primární metabolity) produkují rostliny i řadu látek, které v základních rostlinných procesech žádnou roli nemají (sekundární metabolity). Tyto látky plní řadu vedlejších funkcí jako atraktanty, detoxikační faktory, regulátory růstu nebo tvaru a také jako látky obranné. (Novák a Skalický, 2009). Obranné látky, tzv. allelochemikálie, rostlina syntetizuje a ukládá. Mohou sloužit k obraně jak před hmyzími škůdci, tak před houbami nebo vyššími býložravými živočichy (Dubey, 2011). K tomuto účelu slouží řada různých skupin chemických látek: alkaloidy, saponiny, taniny, silice, pryskyřice a další. Tento druh obrany je považován za evolučně starší než obrana mechanická (Kocourek, 2000).

3.2.3 Působení obranných látek na hmyz

3.2.3.1 Přímý účinek

Za přímý účinek považujeme akutní a chronickou toxicitu dané látky pro hmyz. Akutní toxicita znamená mortalitu do 24 případně 48 hodin, chronická toxicita pak mortalitu v řádu dnů. Chemickou povahou se látky v této skupině řadí například mezi alkaloidy, jednoduché fenoly či aromatické terpeny. Mechanismus účinku těchto látek souvisí obvykle s nervovou soustavou hmyzu a s blokací přenosu nervového signálu nebo excitace a deexcitace neuronů. Pak se tyto látky nazývají nervovými (srdečními) jedy (Pavela, 2011a).

3.2.3.2 Nepřímý účinek

Řada rostlinných obranných látek řazených mezi allelohormony neboli allomony, nepoškozuje přímo zdraví hmyzího jedince, ale chrání rostlinu před poškozením svým spíše preventivním charakterem, tedy nepřímým účinkem (Pavela, 2011b). Tyto látky dále rozdělujeme dle jejich účinku na:

- Antifidantní látky

Látky s protipožerovým neboli antifidantním účinkem (angl. antifeedants) odrazují hmyz od příjmu takto ošetřené rostlinné potravy, aniž by u něj způsobovaly přímou toxicitu. Chemicky jsou to především jednoduché aromatické fenoly, alkaloidy, terpeny či limonoidy (Pavela, 2011b).

V 70. letech 20. stol. byl prokázán silný protipožerový účinek výtažku ze semen azadirachty indické, *Azadirachta indica* Juss. (Isman, 2006). Od tohoto objevu se staly protipožerové látky předmětem výzkumu pro jejich výhodné vlastnosti: mají vysokou selektivitu, jsou tvořeny složitým souborem látek a díky tomu na ně špatně vzniká rezistence, a mají i další biologické účinky omezující růst hmyzu a jeho plodnost (Pavela, 2011a).

- Repelentní látky

Takto označujeme látky, které odrazují hmyz i od pouhého dosednutí na rostlinu. Tyto účinky má řada jednoduchých aromatických uhlovodíků, které se lehce uvolňují do vzduchu (Pavela, 2011a). V USA se prodávají oleje z eukalyptu nebo z cedrového dřeva jako repelenty proti hmyzu obtěžujícímu člověka. Lze jich ale použít i k ochraně hospodářských zvířat nebo včelstev (Isman, 2006).

Těkavost nutná k šíření látky vzduchem však znamená, že se aplikované množství rychle vyčerpá, a proto obecně tyto látky nacházejí v ochraně rostlin menší uplatnění (Pavela, 2011b).

- Antiovipoziční látky

Za antiovipositivity považujeme látky, které odrazují samičky hmyzu od kladení vajíček na ošetřenou rostlinu. Často takto působí i látky antifidantního charakteru, neboť takovou rostlinu samička vyhodnotí jako nevhodnou pro vývoj svého potomstva. Tuto funkci u rostlin plní mnoho aromatických terpenů, alkaloidů, fenolů, polyfenolů a limonoidů (Pavela, 2011a).

3.3 Botanické insekticidy

Botanické insekticidy jsou přípravky na bázi různých druhů extraktů rostlin, které využívají insekticidních vlastností sekundárních metabolitů vybraných rostlin. Určité množství insekticidně působících látek tvoří většina volně rostoucích rostlin (na rozdíl od šlechtěných plodin), pouze některé druhy je však tvoří v takovém množství, že lze z jejich extraktů připravit prakticky použitelný insekticid (Pavela, 2006; Pavela, 2011a).

3.3.1 Botanické insekticidy první generace

Jako první generace se označují insekticidy používané v Evropě především od 16. do konce 19. století, před začátkem prudkého rozvoje syntetické chemie a chemického průmyslu. V jiných oblastech světa, především v Americe a v Asii odkud byly do Evropy dovezeny, se však používaly již od starověku. Převážně to byly jednoduché extrakty. V Evropě byly tyto extrakty zdokonaleny a jejich výroba dostala průmyslovou podobu. Do této kategorie patří především extrakty z rostlin tabáku, kožnatce a chryzantém, a dále rostlinné oleje (Pavela, 2006).

3.3.1.1 Nikotin

Používají se listy rostlin několika druhů tabáku: *Nicotiana tabacum* L. (tabák virginský), *Nicotiana rustica* L. (tabák selský) a *Nicotiana glauca* L. (tabák lesní). Pocházejí ze Střední a Jižní Ameriky, odkud byly od počátků kolonizace Ameriky introdukovány téměř do celého světa (Pavela, 2006).

První zmínka o použití vodného výluhu tabáku jako insekticidu pochází z roku 1560. V roce 1828 byla izolována účinná látka a nazvána nikotin, po svém prvním dovozu do Evropy. Nikotin je alkaloid, toxický nejen pro hmyz, ale i pro člověka. Narozdíl od většiny ostatních botanických insekticidů je v prostředí velmi stabilní. Na hmyz účinkuje jako srdeční jed. Nikotin a další podobně účinkující alkaloidy z tabáku se staly základem pro vývoj syntetických insekticidů, neonikotinů (Pavela, 2006).

3.3.1.2 Rotenon

Do této skupiny patří více rostlin s podobnou účinnou látkou: *Derris elliptica* (Wall.) (kožnatec vejčitý), *Derris fordii* Lour. (kožnatec Fordův), *Derris robusta* Benth. (kožnatec velký), mnoho dalších druhů kožnateců. Jsou to keře i stromy, pocházející z oblasti jihovýchodní Asie. Rotenon a jeho deriváty tvoří také mnohé další rostliny z čeledi *Fabaceae* (Pavela, 2011a).

V Malajsii byly listy nebo rozemleté kořeny odedávna používány při lovu ryb k jejich omračování vlitím do vodního toku. První zprávy o použití extraktu jako insekticidu pochází z roku 1848. Rotenon a jeho deriváty náleží mezi isoflavonoidy. Později byla z extraktů izolována řada dalších látek s podobnými insekticidními účinky. Všechny tyto látky působí jako nervové jedy, zabraňující dýchání hmyzu. Pro teplokrevné živočichy jsou tyto látky pouze mírně toxické, ale pro vodní živočichy představují vážné nebezpečí. Proto se od jejich užívání v blízkosti vodních toků převážně upustilo. Zejména v Americe je však k dispozici řada komerčních přípravků na této bázi (Pavela, 2006).

3.3.1.3 Pyretrum

Také chryzantémy neboli řimbaby mají velmi výrazné insekticidní účinky. Týká se to především druhů *Chrysanthemum cinerariifolium* Vis. (řimbaba stračkolistá), pocházející ze Středozeří a *Chrysanthemum coccineum* Willd. (řimbaba šarlatová), pocházející z Kavkazu. Pyretrum je synonymní rodové jméno těchto druhů a také obvyklý název přípravků z těchto rostlin (Pavela, 2006).

Insekticidní účinky jsou známy již mnoho staletí. Tradičními oblastmi původu byla Dalmácie (dalmátský prach), nebo také Evropa a Kavkaz (kavkazský, také arménský prášek proti hmyzu). Za napoleonských válek byly tyto rostlinné drtě používány proti vším a blechám. Poté se výroba rozšířila i do Japonska. Kolem roku 1850 se začal prodávat i výtazek z nich (Pavela, 2011a).

Hlavními účinnými látkami pyretra jsou Pyrethrin I a II, Cinerin I a II a Jasmolin I a II (souhrnně pyretriny). Jsou to nervové jedy, působí kontaktně a požerově. Vlivem UV záření se rychle rozkládají, je tedy nutné používat čerstvé přípravky. Rychlá degradace v prostředí je, stejně jako u jiných botanických insekticidů, nevýhodou i výhodou zároveň. Na základě pyretrinu však byly v druhé polovině 20. stol. vyvinuty a používány stabilní syntetické insekticidy pyretroidy (Pavela, 2006).

3.3.1.4 Rostlinné oleje

Proti hmyzu mohou působit také rostlinné mastné kyseliny nacházející se v rostlinných olejích. Dochází k synergické kombinaci mechanického a chemického účinku. Mastné kyseliny tvoří na povrchu těla hmyzu souvislý film, přes který nemůže hmyz dýchat. Zároveň

další látky obsažené v oleji mají chemický účinek podobný ostatním, výše uvedeným kategoriím insekticidů. První komerční přípravky na bázi arašídového a olivového oleje začaly být dostupné kolem roku 1920. Lze však účinně použít i emulze minerálních olejů, které mají především první jmenovaný účinek. Vhodná je pak kombinace s některým z botanických insekticidů. Tato kombinace může mít pesticidní účinnost se širším záběrem (Pavela, 2006).

3.3.2 Botanické insekticidy druhé generace

S prudkým rozvojem chemického průmyslu v první polovině 20. století a adopcí jím produkováných syntetických pesticidů byly pesticidy botanické v industrializovaném světě zdánlivě zcela zastíněny, vytlačeny a zapomenuty. Po tom, co však vyšly najevo stinné stránky chemizace, se k nim začala pozornost vracet a opět se rozběhl vědecký výzkum hledající nové botanické insekticidy, které by byly selektivnější a šetrnější k člověku i k celému ekosystému. Díky modernímu aparátu analytické chemie byla v tomto období odhalena široká škála účinných látek a objasněny mechanismy jejich působení na škodlivý hmyz (Pavela, 2006).

3.3.2.1 Azadirachtin

Hlavní účinná látka v semenech stromu *Azadirachta indica* Juss. byla izolována v roce 1960. Je to jedna z nejúčinnějších látek, vytvářených rostlinami pro svou obranu proti hmyzu. Azadirachtin je účinnou složkou mnoha komerčních botanických insekticidů, nazývaných také neem oleje (Pavela, 2011a).

Rostlina je v oblasti svého původu, jihovýchodní Asii, již tisíce let používána jako léčivá. Roste v teplotách až do 50 °C. Azadirachtin není zdaleka jedinou biologicky aktivní látkou v této rostlině. Při výzkumu počínajícím rokem 1920 byly nalezeny látky s účinky antivirovými, antifungálními, antibakteriálními, a také anitpyretickými, analgetickými a imunomodulačními (Pavela, 2006). Ty se staly základem mnoha léků a hygienických prostředků.

Hlavním mechanismem růstově modulačního účinku azadirachtinu na hmyz je působení vývojových poruch skrze jeho podobnost hmyzím hormonům, především svlékacímu hormonu ecdisonu. Způsobuje však i řadu vedlejších poruch, např. v procesu páření a v plodnosti. Mimo přímé toxicity však působí i jako antifidant a repelent. Hlavní uplatnění má olej ze semen rostliny. Působí proti všem běžným druhům hmyzu. Nevýhodou je jeho nestabilita v UV záření, která působí leckdy nespolehlivou účinností méně kvalitních výrobků (Pavela, 2006).

3.3.2.2 Pongamie

Z indického kontinentu pochází také stromy *Pongamia glabra* Vent. a *Derris indica* (Lamk.), jejichž extrakty jsou používány při výrobě komerčních botanických insekticidů (Pavela, 2006). Původně se jejich extrakty užívaly medicíně. Olej ze semen byl také využíván jako palivo. V pongamovém oleji byla pak od roku 1969 postupně objevena řada účinných látek, insekticidních, fungicidních i antibakteriálních. Hlavní účinná látka, karanjin, byla izolována v roce 1976 a byla ověřena její účinnost proti blýskavkám. Pongamový olej vyžaduje zajištění emulgace, buď chemicky, nebo mechanicky třepáním. Působí proti mšicím, molicím a sviluškám. Působí také repelentně a antiovipozičně. V kombinaci s azadirachtinem má pongamový olej synergické účinky.

V Evropě zatím není příliš rozšířen kvůli regulačním bariérám, ale v Čechách vyrábí úspěšně přípravek na jeho základě firma Agro CS ve spolupráci s VÚRV, Praha–Ruzyně (Česká hlava [online], 2013).

3.3.2.3 Esenciální oleje

Do uzavřených prostor se hodí nově zkoumaná skupina insekticidů, kterou tvoří těkavé éterické oleje mnoha rostlin: tymián, majoránka, hřebíček, bazalka a další. Insekticidní (kontaktní a fumigační) vlastnosti těchto nízkomolekulárních látek zatím nebyly uspokojivě objasněny. Významná je velmi nízká toxicita na teplokrevné živočichy, mj. ve srovnání s pyrethrem. Objevují se již však první komerční přípravky na této bázi (Pavela, 2006).

3.3.3 Botanické insekticidy třetí generace

Za třetí generaci botanických insekticidů, která je zatím převážně pouze předmětem výzkumu, se považuje skupina látek s preventivním účinkem. Sloužily by jako látky pomocné, vykazující synergický účinek s ostatními skupinami insekticidů (Pavela, 2011a).

3.3.4 Výhody a nevýhody botanických insekticidů

Řada vlastností botanických insekticidů je zároveň jejich výhodou i nevýhodou (Pavela, 2011a). Jakožto látky vyprodukované živými organismy jsou těmito organismy i lehce rozložitelné, a díky tomu z ekosystému vymizí během dnů, takže i látky s nezanedbatelnou toxicitou pro člověka, jako např. rotenony, nekontaminují výsledný zemědělský produkt nebo okolí. Oproti tomu syntetické insekticidy mohou přetrvávat v potravním řetězci mnoho let. Nevýhodou rychlé rozložitelnosti botanických insekticidů je pak ale krátká doba působení (persistence), což vyžaduje lepší načasování jejich aplikace, opakovanou aplikaci (vyšší cena) a klade vyšší nároky na znalosti zemědělce o jednotlivých škůdcích a jejich životních cyklech.

Další výhodou botanických insekticidů je fakt, že jsou složeny z mnoha účinných látek, na rozdíl od jedné nebo několika málo účinných látek u insekticidů syntetických. Toto velmi výrazně zpomaluje až znemožňuje vznik resistance u populací škůdců, neboť účinná resistance by znamenala nutnost vzniku několika vhodných detoxikačních metabolických drah zároveň. Na rostlinách, které botanické insekticidy poskytují, vidíme, že jen velmi málo druhů hmyzu je schopno prorazit tuto biochemickou obranu, např. u rostlin tabáku je to lišaj tabákový, *Manduca sexta*. Tyto rostliny bývají v přírodě často škůdci téměř nenapadené (to bývá při terénním průzkumu pro nové zdroje botanických insekticidů často první známkou toho, že by rostlina by mohla být pro tento účel vhodná). Moderní aplikace syntetických insekticidů se snaží tento aspekt botanických pesticidů napodobit v tzv. antirezistentních strategiích (Dubey, 2011).

Jednoznačnou nevýhodou je cena komerčních botanických pesticidů. To má dva důvody - jednak má komerční výroba mnohem menší objem než u syntetických pesticidů a nemůže tedy těžit z ekonomických výhod masové výroby, a jednak je výroba závislá na pěstování rostlin, na rozdíl od syntetických insekticidů, jejichž surovinou bývá často ropa. Vzhledem k tomu, že většina dnes dostupných botanických insekticidů pochází z rostlin, které nejsou pěstovány na evropském kontinentu, připočítává se k ceně také transport. Nově objevený potenciál mnoha rostlin starého kontinentu by však mohl tento stav zvrátit (Pavela, 2010; Pavela, 2011d).

Výhodou botanických insekticidů je také to, že je malí pěstitelé mohou připravovat s minimálním technickým vybavením sami, neboť jejich příprava již z principu nemůže zahrnovat náročné chemické kroky. Jednoduché návody pro přípravu takových insekticidů v českých podmínkách poskytuje Pavela (2006).

3.4 Charakteristika vybraných hmyzích škůdců

3.4.1 *Spodoptera littoralis* (Boisduval)

Blýskavka bavlníková, angl. Cotton leaf worm

Třída: *Insecta* (Hmyz), Řád: *Lepidoptera* (Motýli), Čeleď: *Noctuidae* (Můrovití)

Tento motýl pochází z Afriky a Jižní Asie, odkud se rozšířil i do Evropy, zejména do Francie, Itálie, Portugalska z Řecka. Je polyfágní a hostitelem mu jsou rostliny z více jak 40 čeledí. Nejvíce škodí na bavlně, rajčeti, kukuřici, rýži a píceňkách (Hussey and Gostick, 1964; Smith et al., 1997).

Dospělci mají šedá až lehce namodralá přední křídla se žlutou žilkou, zadní křídla pak bílá s hnědým lemem. Rozpětí křídel se pohybuje kolem 3-4 cm. Objevují se časně z jara,

létají především za šera a za tmy. Samičky kladou na spodní stranu listu shluky žlutých, kulovitých vajíček, jejichž embryonální vývoj trvá 3-4 dny (INRA, 2013).

Larva blýskavky, polypodní housenka, má po vylíhnutí světle zelené tělo a hnědavou hlavu. Housenka prochází šesti vývojovými instary. Larva před zakuklením je dlouhá kolem 4 cm. Aktivita housenek je především noční, v denních hodinách se ukrývají v půdě.

Housenky se kuklí v půdě (hloubka 2-5 cm); kukla je dlouhá kolem 2 cm a má červeno-oranžový odstín. Líhnutí přichází po 14 dnech. Za ideálních podmínek může mít blýskavka bavlníková až deset generací ročně.

V Evropě dochází ke škodám nejvíce ve skleníkových kulturách okrasných rostlin a zeleniny, v oblasti Sicílie také u píce a kukuřice (Smith et al., 1997).

Kontrola tohoto škůdce byla doposud závislá především na neurotoxických insekticidech jako jsou organofosfáty, karbamáty a pyretroidy (Pavela, 2014). Výsledky však nikdy nebyly zcela uspokojivé, protože tento druh je schopen si rychle vyvinout resistenci k většině těchto sloučenin. Botanické insekticidy se svým širokým spektrem účinných látek by tak mohly být vítanou pomocí.

Tento škůdce je v ČR karanténní a jeho výskyt je nutno hlásit Státní rostlinolékařské správě dle Vyhlášky č. 215/2008 Sb., o opatřeních proti zavlečení a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů.

3.4.2 *Myzus persicae* (Sulzer)

Mšice broskvoňová, angl. Green peach aphid

Třída: *Insecta* (Hmyz). Řád: *Sternorrhyncha*, Čeleď: *Aphididae* (Mšicovití)

Mšice broskvoňová je dicyklická mšice, jejíž zimní (primární) hostitel je broskvoň. Dále má letní (sekundární) hostitele, mezi kterými je řada polních plodin (Rotrekl, 2000). Bezkrídla živorodá samička je štíhlá, její zbarvení bývá různé od zelené až po světle hnědočervenou. Je 1,8 až 2,5 mm velká a na čelních hrbolcích vyrůstají tmavá tykadla stejně dlouhá jako tělo.

Přezimují černá vajíčka v trhlinách kůry broskvoní. Z vajíček se líhnou nymfy, které dospívají v zakladatelky. Na broskvoních pak bezkrídle živorodé samičky dávají bez oplození vznik dalším generacím (2 až 3 generace). V květnu a začátkem června se v populaci objevují okřídlené živorodé samičky, které se rozlétají na letní hostitele. Na podzim se pohlavní formy mšic vrací na broskvoň, kde po oplození vejcorodé samičky kladou přezimující vajíčka.

Mšice broskvoňová je široce polyfágní druh a je známo více než 100 druhů hostitelských rostlin. Škodí především jako přenašeč virů, např. mozaiky vodnice a viru západní žloutenky řepy; na brambory přenáší Y-virus, A-virus, M-virus, S-virus a svinutku; na cukrovou řepu přenáší žloutenku a mozaiku (Kazda 2014).

3.4.3 *Culex quinquefasciatus* (Say)

Komár pisklavý, angl. Southern house mosquito

Třída: *Insecta* (Hmyz) , Řád: *Diptera* (dvoukřídlí), Čeleď: *Culicidae* (komárovití)

Culex quinquefasciatus je středně velký komár, vyskytující se především v tropických a subtropických oblastech. Je přenašečem mnoha lidských onemocnění a parazitů, např. elefantiázy (*Wucheria bancrofti*), ptačí malárie, viru West Nile nebo viru Zika. Komáři odpovídají za více než 50 % infekcí hlísty elefantiázy. Celkově se odhaduje, že kolem 1 mil. lidí ročně zemře na choroby přenášené komáry (Vinogradova, 2000).

Dospělci bývají velikosti kolem 4 mm. Hlavní část těla je hnědá, končetiny jsou pak tmavší a hlava světle hnědá.

Larva má krátkou, silnou hlavu. Kolem úst se nachází dlouhá, žlutá vlákna, která slouží k filtraci organického materiálu. Larvy se živí organickým materiálem z vody a jejich vývoj trvá při 30 °C kolem pěti až osmi dnů. Larvy prochází čtyřmi instary, a ke konci čtvrtého se přestávají krmit a mění v kukly. Po 36 hodinách se líhnou dospělci. Samci i samičky se živí sáním na rostlinách. Teprve po spáření vyhledávají samičky k sání teplokrevné živočichy, savce a ptáky, jejichž krev je potřebná k vývoji vajíček. Dospělé samičky létají v noci, vyhledávají stojaté vodní plochy s obsahem živin, vhodné ke snůšce vajíček. Jedna samička může mít během života až pět snůšek po několika tisících vajíček.

Nejúčinnější cesta k omezení šíření zmíněných nemocí je pomocí aplikace insekticidů na larvy a dospělé přenašeče. Používají se především syntetické insekticidy (Corbel et al., 2004). Ty jsou však toxické pro ryby a další necílové organismy (Rohani et al., 2001), především však vzniká u komárů resistance k těmto prostředkům. Proto je nutné vyvinout nové, environmentálně bezpečné a vysoce specifické insekticidy (Pavela, 2007).

Druh je taxonomicky kontroverzní, někdy je označován jako *Culex pipens quinquefasciatus*.

3.5 Charakteristika rostlin poskytujících testované extrakty

3.5.1 *Helianthus tuberosus* L.

Slunečnice topinambur, angl. Jerusalem artichoke

Řád: Asterales (hvězdnicotvaré), Čeleď: Asteraceae (hvězdnicovitě).

Slunečnice topinambur je plodina se středně dlouhou vegetační dobou, nenáročná na půdu, pěstovaná převážně pro hlízy, které mají vysoký obsah inulínu.

Topinambur (lidově židovské brambory) pochází ze Severní Ameriky, kde volně roste (Moudrý et Stražil, 1996). Je to vytrvalá 50–250 cm vysoká rostlina s hlízovitým oddenkem a přímou, nahoře větvenou lodyhou. Vstřícné listy na líci drsné, na rubu bělavě pýřité, jsou většinou hrubě pilovité, protáhle vejčité až zašpičatělé, zúžené v křídlatý řapík. Kveté v září až říjnu žloutkově žlutými úbory 4–8 cm v průměru, rozmístěnými jednotlivě na konci větví. Jednotlivé úbory pak mají odstálé zašpičatělé, tmavozelené, lepkavě brvitě jako průměr terče dlouhé zákrovní listeny. Terčovitě lůžko s trubkovitými kvítky velikosti 6 mm je vypuklé, žlutavé až hnědnoucí. Úbor se dále skládá z 12–15 žlutých jazykovitých květů velikosti 3–4 cm, nažky 5–6 mm mívá lysé nebo chlupaté s 1–4 brvitými štětinkami. Hlízy s bílou nebo červenou slupkou bývají nepravidelného tvaru (Biom.cz, 2002).

Topinambur je nenáročný, dobře snáší chladnější, sušší i vlhčí klima. Roste prakticky na všech půdách včetně půd horších nebo lesních, často zplaňuje. Jeho hlízy jsou význačně vysokou odolností vůči mrazu (až do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Délka vegetační doby je 4 až 8 měsíců. Je možné jej pěstovat i na pozemcích, které z různých důvodů dočasně nelze jinak zemědělsky využívat.

Díky uvedeným vlastnostem je možné topinambur využívat i energeticky. Hlízy je možné využít k produkci bioetanolu a suchou nat' k výrobě bioplynu nebo k přímému spalování.

3.5.2 *Paulownia tomentosa* (Steud.)

Pavlovnice plstnatá, angl. Empress tree

Řád: *Lamiales* (hluchavkotvaré), Čeleď: *Paulowniaceae* (pavlovniovité)

Původní oblastí výskytu pavlovnice je Čína. Je to velmi rychle rostoucí, středně velký opadavý strom (10–20 m) se širokou vzdušnou korunou (Málek a kol., 2012). Velice rychle roste zejména v mládí, tehdy také produkuje největší listy, což ji činí zajímavou ze

sadovnického hlediska. Její až 50 cm veliké tří až pětilaločné listy jsou plstnaté, stejně jako letorosty. Na podzim se nijak nezbarvují, opadají po prvním mrazu.

Kostru koruny tvoří tlusté větve, na jejichž koncích se vyvíjejí květní pupeny. Ty vykvetou až v následujícím roce nápadnými fialovými květy ve velkých květenstvích. Kvete ještě před olistěním na přelomu dubna a května. Plodem jsou pak kožovité lepkavé tobolky vejcovitého tvaru.

Pavlovnice je světlomilná, mladé stromky mohou namrzat.

Roste v širokém rozsahu půdních typů. Je odolná ke znečištění. Díky těmto vlastnostem se chová jednak jako pionýrská, a jednak (v některých oblastech) jako invazní.

V zemi svého původu, v Číně, je pavlovnice oblíbena a široce pěstována jako truhlářská surovina. Na jihovýchodě USA, kde se chová invazně, se chystá její pěstování jako energetické plodiny. Díky těmto skutečnostem může být rostlinný materiál pavlonií levně dostupný (Yadav, 2013).

V České republice je pěstována v parcích. Také je u nás zkoumán její potenciál jako energetické plodiny (Pavela, 2016).

3.5.3 *Populus nigra* L.

Topol černý, angl. Black poplar

Řád: *Malpighiales* (malpighiotvaré), Čeleď: *Salicaceae* (vrbovité)

Topol černý (*Populus nigra*) je listnatý opadavý strom z čeledi vrbovité (*Salicaceae*). Pochází z velkých říčních údolí střední a jižní Evropy, dnes roste navíc i v západní a střední Asii a severní Africe. Dorůstá výšky až kolem 30 metrů, a jeho věk může dosáhnout několika staletí (Kremer, 1995). Druh zahrnuje mnoho poddruhů s často velmi odlišným habitem.

Koruna má široké, silné větve. Kmen bývá rovný, ve starším věku začíná být svalcovitý a mnohdy nerovný. Kůra, v mládí šedobílá, později tvoří trhlinatou hnědošedou borku. Starší větvíčky jsou žlutošedé s velkými naběhlými lenticelami. Koření mělce, dlouze protáhle. Má dobrou výmladnost z pařezů, sválových hrbolů na kmeni a také z kořenů.

Dlouze řapíkaté listy dlouhé 4–10 cm vyrůstají na makroblastech ve střídavém postavení. Jsou dlouze zašpičatělé, tvarem bývají kosočtverečné až kosočtverečně okrouhlé, při bázi uťaté nebo široce klínovité, okraj mají vroubkovaný až jemně pilovitý. Lesklé sytě zelené, na rubu matné a poněkud světlejší.

Květem topolu černého jsou jednopohlavné jehnědy. Samčí dorůstají délky kolem 5 cm, jsou válcovité, tlusté, s prašníky červenými až purpurovými. Samičí jehnědy jsou světle zelené se žlutými bliznami a bývají štíhlejší. Topol kvete v březnu až dubnu, semena pak dozrávají v červnu.

Plodem topolu jsou v 10–15 cm dlouhých jehnědách uložené hnědé tobolky se dvěma chloupky. Zralé tobolky praskají, semena jsou světle hnědá, se sněhobílým vlnatým svazečkem chmýří. V době zralosti je pak vítr ve velkém množství roznáší po okolí.

Topol je světlomilná, nenáročná dřevina. Nejlépe prospívá na lehčích, propustných humusovitých půdách. Je vlhkomilný, roste i na opakovaně zaplavovaných půdách na březích řek a potoků a ve vlhkých lesích. Na příliš suchých stanovištích bývá náchylnější k chorobám, díky svému mohutnému kořenovému systému však je schopen čerpat vodu i z větší hloubky.

Jako odolná a rychle rostoucí dřevina slouží například jako zdroj obnovitelných zdrojů energie – používá se jako palivo ve formě štěpky nebo pilinových briket (Lefèvre, 1997), případně na výrobu bioetanolu (Li et. al, 2014).

3.5.4 *Celastrus angulatus* (Maxim.)

Zimokeř hranatý, angl. Chinese staff vine

Řád: *Celastrales* (jesencotvaré), Čeleď: *Celastraceae* (jesencovité)

Rod zimokeř je široce rozšířen ve východní Asii, Australasii, Africe a v Severní i Jižní Americe (Hieke et Pinc, 1978). Tvoří popínavý keř, který je až 8 m dlouhý. Letorosty má 4–6 hranné, hnědé s přehrádkovanou dřevní, úžlabní pupeny vejčité. Listy s velkou čepelí mají světle zelené řapíky, vrcholek špičatý, okraj vroubkovaný či vroubkovaně pilovitý, báze je klínovitá. Květy zimokeře jsou v latnatých kyticích, 10–20 cm dlouhých. Vřetena a stopky květů jsou lysé nebo krátce rezavě chlupaté. Květy jsou malé, zelenavé, dvoudomé, sepaly trojúhelné až vejčité. Terč květu je diskovitý, slabě 5laločný, tyčinky asi 3 mm, patyčinky v samičích květech jsou asi 1 mm dlouhé, pestíky 3–4 mm dlouhé, semeníky kulovité. Tobolky jsou kulovité a žluté, 8–10 mm široké. Semena zimokeře jsou eliptická, oranžová, 3,5–5,5 × 1,5–3 mm velká (Dendrologie online). Všechny části rostliny jsou pro člověka jedovaté.

Keř je velmi ozdobný díky svým listům a bohatstvím plodů. V Číně je tradičním zdrojem dřeva pro truhlářskou výrobu. V mnoha oblastech světa, zvláště na jihovýchodě USA, je dnes zimokeř hranatý invazní dřevinou.

3.5.5 *Coriandrum sativum* L.

Koriandr setý, angl. Coriander

Řád: *Apiales* (miříkotvaré), Čeleď: *Apiaceae* (miříkovité)

Coriandrum sativum je jednoletá rostlina dorůstající až 70 cm. Lodyhu má přímou, jemně rýhovanou, nahoře rozvětvenou. Střídavě postavené mladé přízemní listy koriandru jsou vroubkované, trojlaločné, horní listy jsou jedenkrát až třikrát peřenosečné s

vykrajovaným okrajem. Květenství tvoří okolíky v barvě bílé až růžové, plodem jsou kulaté dvounažky (Lutovská a Mikešová 2004).

Koriandr původně pochází ze Středomoří, ve střední Evropě se jeho pěstování rozšířilo od 16. století. V zahrádkách a na polích se pěstuje jako koření, z nich pak často zplaňuje (Pavela, 2006). Nejlépe se mu daří v slunných a teplých oblastech a na půdě s dostatkem vápníku a fosforu. Jinak není na druh půdy náročný. U nás nejlépe prospívá na jižní Moravě.

V bylinářství se používá proti nadýmání, na mírnění křečí a zlepšení stavu nervové soustavy (Lutovská a Mikešová, 2004).

Plody se po dozrání sbírají celé (Pavela, 2006) v červenci až v srpnu (Lutovská a Mikešová, 2004). V semenech koriandru je obsaženo mnoho biologicky aktivních látek. Insekticidní účinek má mezi nimi řada aromatických terpenů a fenolů. Tyto látky vykazují antifidantní a repelentní účinky na hmyz, stejně jako další, jejichž biologická aktivita se zatím pouze předpokládá.

Byl ověřen účinek na mandelinku bramborovou, u které extrakt způsoboval inhibici růstu larev a úmrtnost. U některých motýlích škůdců působil extrakt proti ovipozici. Dobré výsledky měl extrakt také proti mšicím (Pavela, 2006).

4 Materiály a metody

4.1 Pokusné prostředí

Testy byly provedeny ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., Praha – Ruzyně. Laboratorní podmínky byly následující: teplota 25 ± 1 °C, relativní vlhkost 60 – 70 %, fotoperioda 16 hodin světla: 8 hodin tmy.

4.2 Pokusný hmyz

Spodoptera littoralis: Larvy blýskavky bavlníkové byly použity v testech akutní a chronické toxicity a protipožerové a růstově inhibiční účinnosti. Byly získány ze zavedeného laboratorního chovu (více než 20 generací) Oddělení entomologie VÚRV v Praze. Krmeny byly semisyntetickou dietou získanou od Stonefly Industries, Bryan, TX, USA. Kolonie byly chovány při teplotě 25 ± 1 °C a fotoperiodě 16:8 (světlo:tma) hodin. Testy byly prováděny na larvách 3. instaru, 0–6 hodin po svlékání (Pavela, 2014).

Culex quinquefasciatus: Komáři byli chováni v laboratořích výzkumného týmu Sekundární metabolity rostlin v ochraně plodin, VÚRV Praha při teplotě 25 ± 2 °C, rel. vlhkosti 70 ± 5 % a fotoperiodě 16:8 (světlo:tma) hodin (Pavela, 2009).

Myzus persicae: Mšice pocházející z klonu druhu *Myzus persicae* (Sulzer) byly chovány na rostlinách kedlubny (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) při teplotě 22 ± 2 °C, rel. vlhkosti 50 ± 10 % a fotoperiodě 16:8 (světlo:tma) hodin.

4.3 Použité rostlinné extrakty

Rozdrcený rostlinný materiál byl extrahován v 100% čistém metanolu (poměr rostlina:metanol byl 1:10). Po 24 hodinách macerace při pokojové teplotě byly extrakty přefiltrovány. Filtráty byly zahuštěny *in vacuo* v rotačním evaporátoru a uloženy při 4° C. Zdroje testovaných extraktů (geografický původ a použitá část rostliny) jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Zdroje testovaných extraktů

Rostlina	Část rostliny	Původ vzorku
<i>Helianthus tuberosus</i>	listy	VÚRV Ruzyně, ČR
<i>Paulownia tomentosa</i>	kůra	VÚRV Ruzyně, ČR
<i>Populus nigra</i>	kůra	Hodonín, ČR
<i>Coriandrum sativum</i>	celá nadzemní část	Hodonín, ČR
<i>Celastrus angulatus</i>	semena	VÚRV Ruzyně, ČR

4.4 Metodika testů biologické účinnosti

4.4.1 Akutní toxicita

4.4.1.1 *Spodoptera littoralis*

Pro stanovení akutní toxicity byla určována mortalita larev 24 hodin po aplikaci roztoku extraktu elektronickou mikropipetou přímo na dorsum housenek 3. instaru. Zásobní roztok extraktu byl v příslušné dávce rozpuštěn v acetonu. Na každou larvu byl aplikován vždy 1 μ l roztoku. Na kontrolní larvy byl aplikován pouze aceton. Jako výchozí dávka bylo zvoleno 500 μ g/ml. Po ošetření byly larvy umístěny do plastových nádob průměru 10 cm se semisyntetickou dietou a uloženy v růstové komoře (světlo 16 h : tma 8 h, 25 °C). Za mrtvé byly housenky považovány, jestliže nereagovaly na podněty pinzetou. Test byl opakován čtyřikrát a v každém opakování bylo použito deset housenek.

4.4.1.2 *Culex quinquefasciatus*

Larvicidní testy akutní toxicity byly provedeny podle metodiky World Health Organization (1996) s drobnými úpravami (Pavela, 2008). Byly použity larvy 3. instaru. Rostlinné extrakty byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). V samotném testu pak byl 1 ml naředěného roztoku přidán do 224 ml destilované vody ve skleněné nádobě o objemu 500 ml. Roztok byl lehce promíchán, aby se zajistila jeho homogenita. Vybrané larvy pak byly přeneseny v destilované vodě do nádoby s roztokem. Plocha hladiny byla 125 cm² (25 larev na nádobu). Test byl proveden čtyřikrát, s koncentracemi extraktu v roztoku postupně 1000; 750; 500; 250; 150; 100; 50; 30 μ g/ml a čistý DMSO jako kontrola. Nádoby byly umístěny v růstové komoře (světlo 16 h : tma 8 h, 25 °C). Mortalita byla určena po uplynutí 24 hodin, během kterých byly larvy bez potravy.

4.4.1.3 *Myzus persicae*

V testech akutní toxicity extraktů na mšici broskvoňovou byly použity rostliny kedlubny (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) v květináčích, rostlé při teplotě 22 ± 2 °C a fotoperiodě 16 h : 8 h (světlo:tma). Rostliny vstupovaly do experimentu s již rozvinutou kolonií dospělců mšice. Nejprve byl zjištěn a zaznamenán počet jedinců na rostlině, poté byl na rostlinu aplikován extrakt elektronickým rozprašovačem v množství 60 ml na 1 m² půdní plochy. Po 48 hodinách byli opět všichni jedinci spočítáni. Mortalita byla určena jako poměr zjištěných počtů po a před experimentem. Celý test byl zopakován čtyřikrát pro každou zvolenou koncentraci.

Pro zjištění letální koncentrace LC₅₀ a CI₉₅ byla zvolena tato série koncentrací: 10; 8; 5; 3; 1,5; 1; 0,5; 0,25 % w/v. Výpočet biologické účinnosti byl upraven dle Hendersona a Tiltona (1955).

4.4.2 Chronická toxicita

4.4.2.1 *Spodoptera littoralis*

Chronická toxicita u larev 2. instaru blýskavky bavlníkové byla určována podle mortality larev, které se 5 dní vyvíjely na potravě kontaminované daným extraktem. Potravou byly kolečka listů rajčete (2 cm²), na které bylo elektronickou mikropipetou aplikováno 20 μl roztoku rostlinného extraktu rozpuštěného v acetonu ve zvolené koncentrační sérii. Roztok byl aplikován v množství 10 μl na 1 cm² listu. Po odpaření rozpouštědla byla do Petriho misek s tenkou vrstvou agaru na dně (pro stabilizaci vlhkosti vzduchu) vložena čtyři listová kolečka. Následně byly vloženy larvy. Výkrojky byly doplňovány každý den, čímž bylo larvám umožněno krmit se *ad libitum*. Petriho misky byly uloženy v růstové komoře (světlo 16 h : tma 8 h, 25 °C). Po 5 dnech byla zjištěna mortalita larev. Za mrtvé byly larvy považovány, pokud nereagovaly na podněty pinzetou.

Mortalita byla stanovena pro koncentrační řadu 5; 4; 3; 2; 1; 0,5 % (tj. 500–50 μg/cm²). Zvýsledků byly statistickým zpracováním odhadnuty hodnoty LD₅₀ a stanoveny příslušné intervaly CI₉₅. Pro každou koncentraci byl test proveden čtyřikrát s deseti larvami.

4.4.3 Protipožerová účinnost

4.4.3.1 *Spodoptera littoralis*

Pro zjištění protipožerové účinnosti byl zvolen „no-choice“ test, tj. larvám 3. instaru byla nabídnuta potrava ošetřená extraktem bez možnosti volby neošetřené stravy. Před zahájením experimentu byly larvy 5 hodin bez potravy. Experimenty byly prováděny v Petriho miskách

prům. 9 cm. Na dno misek byl položen navlhčený filtrační papír a na něj 2 výkrojky z listu rajčete o průměru 1,7 cm.

V acetonu bylo rozpuštěno takové množství zásobního roztoku extraktu, aby bylo při aplikaci 20 µl roztoku rovnoměrně na každý výkrojek dosaženo plošné koncentrace 100 µg/cm². V kontrolním experimentu byl na výkrojky aplikován pouze aceton. Potom byla miska ponechána 10 minut, aby se aceton odpařil a následně byly do misky vloženy 2 hladové larvy *S. littoralis*. Test byl opakován pětkrát. Experiment byl ukončen, když kontrolní larvy zkonzumovaly přibližně 90 % plochy listových výkrojků (což bylo přibližně 10 hodin). Plocha výkrojků zkonzumovaná larvami byla určena počítačovým zpracováním fotografie výkrojku.

Index protipožerové účinnosti (feeding deterrence index, FDI) byl ze zjištěných ploch spočten dle vzorce

$$FDI = 100 \times [(C - T) / (C + T)],$$

kde C je plocha výkrojku zkonzumovaná kontrolními larvami a T je plocha výkrojku zkonzumovaná larvami s ošetřenými výkrojky (Pavela, 2014).

4.4.4 Inhibice růstu

4.4.4.1 *Spodoptera littoralis*

Inhibice růstu extraktem byla testována obdobně jako chronická toxicita, s následujícími odlišnostmi. Na výkrojky z listu rajčete byl aplikován daný extrakt mikropipetou tak, že výsledná plošná koncentrace extraktu na výkrojku byla 100 µg/cm². V kontrole byl aplikován pouze aceton. Čerstvě svlečené larvy 3. instaru byly zváženy a umístěny po jedné do Petriho misek prům. 6 cm. Po 5 dnech byly larvy opět zváženy. Test byl opakován třikrát, v každém opakování bylo použito deset larev. Test probíhal v růstové komoře (světlo 16 h : tma 8 h, 25 °C).

Inhibice růstu (growth inhibition, GI) byla ze zjištěných přírůstků hmotnosti larev spočtena dle vzorce

$$GI = 100 - [T / C \times 100],$$

kde C je přírůstek hmotnosti kontrolních larev a T je přírůstek hmotnosti larev konzumujících ošetřené výkrojky (Pavela, 2014).

4.5 Výpočty a statistické metody

Testy akutní a chronické toxicity, v nichž mortalita kontroly překročila 20 %, nebyly brány v úvahu.

Mortalita v testech na homogenních populacích, v našem případě *Spodoptera littoralis* a *Culex quinquefasciatus* byla upravena dle Abbottova vzorce (Abbott, 1925)

$$(\% \text{ opravená mortalita}) = 100 \times [1 - T_{\text{after}} / C_{\text{after}}],$$

kde T_{after} je počet přeživších ošetřených jedinců na konci testu a C_{after} je počet živých kontrolních jedinců na konci testu.

Mortalita v testech na nehomogenní populaci mšic *Myzus persicae* byla upravena dle Henderson-Tiltonova vzorce (Henderson et Tilton, 1955)

$$(\% \text{ opravená mortalita}) = 100 \times [1 - (C_{\text{before}} T_{\text{after}}) / (C_{\text{after}} T_{\text{before}})],$$

kde T_{after} je počet přeživších ošetřených jedinců na konci testu, C_{after} je počet živých kontrolních jedinců na konci testu, C_{before} je počet kontrolních jedinců na začátku testu a T_{before} je počet ošetřených jedinců na začátku testu.

Probitová analýza závislosti mortality na dávce byla provedena počítačovým programem na základě metodiky Finneyho (1971). Výstupem analýzy byly odhad letálních dávek LD_{50} (LC_{50}) a konfidenčního intervalu CI_{95} .

5 Výsledky

5.1 Biologická účinnost extraktů na *Spodoptera littoralis*

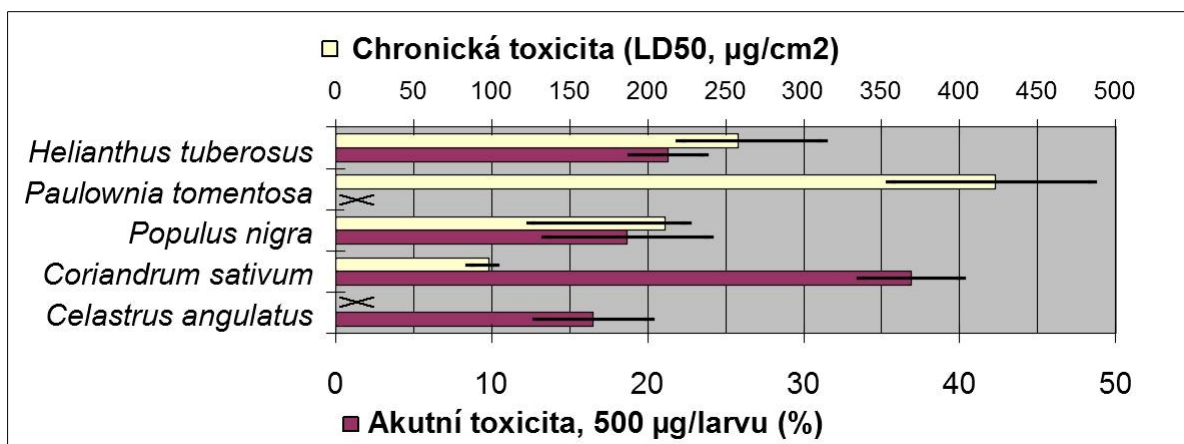
U škůdce *Spodoptera littoralis* byla zkoumána biologická účinnost všech extraktů ve smyslu akutní toxicity, chronické toxicity, inhibice růstu a protipožerové účinnosti. Z výsledků testů byly statistickým zpracováním odhadnuty hodnoty letálních dávek LD₅₀ a vypočteny příslušné konfidenční intervaly CI₉₅. Výsledky testů po statistickém zpracování jsou uvedeny v tabulce 2 a v grafech 1 a 2. Biologickou účinnost vykazovaly všechny extrakty ve všech testech, kromě testu akutní toxicity extraktu z *Paulownia tomentosa*.

- Nejvyšší akutní toxicita byla zjištěna u extraktu *Coriandrum sativum* (37 %). Nulovou toxicitu měl pak extrakt *Paulownia tomentosa*.
- Nejvyšší chronickou toxicitu jevil opět extrakt *Coriandrum sativum* (statisticky významně na 95% hladině spolehlivosti), nejnižší *Celastrus angulatus* (LD₅₀ chronické toxicity u něj byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace, a proto nebyla hodnota LD₅₀ a CI₉₅ stanovena).
- Nejsilněji inhibovaly růst extrakty *Populus nigra* a *Helianthus tuberosus* (99 % a 98 %), ovšem i nejslaběji účinkující, *Celastrus angulatus*, dosáhl 70 %.
- Téměř 100% protipožerovou účinnost měl extrakt *Helianthus tuberosus*, nejnižší opět *Celastrus angulatus* (79 %)

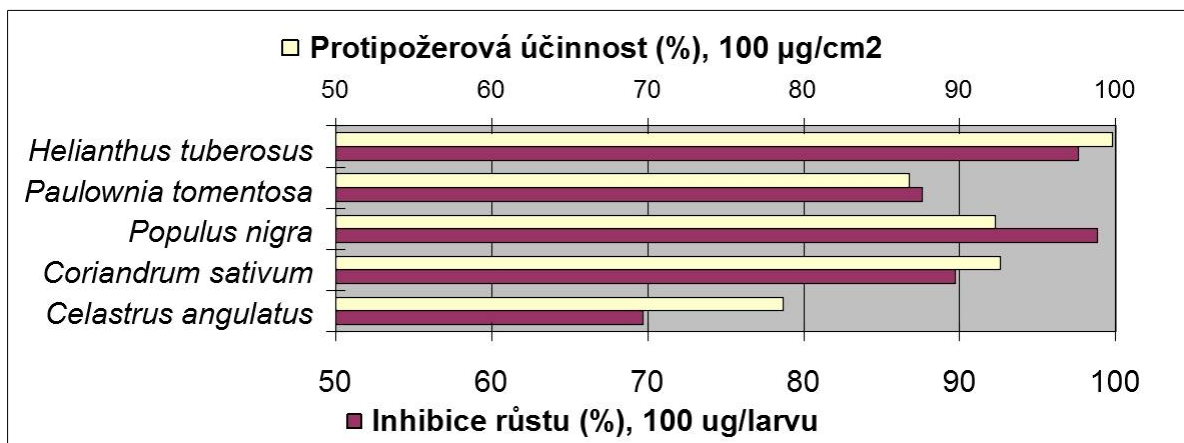
Tabulka 2: Výsledky testů biologické účinnosti extraktů na *Spodoptera littoralis*.

(Spodoptera littoralis, larva)	akutní toxicita	chronická toxicita		inhibice růstu (%)	protipožerová účinnost (%)
	mortalita (%) 500 µg/larvu 3. instar	LD ₅₀ (µg/cm ²) 2. instar	CI ₉₅	100 µg/larvu 3. instar	100 µg/cm ² 3. instar
Extrakt					
<i>Helianthus tuberosus</i>	21,3 ± 2,3	258	(221–312)	97,6	99,8
<i>Paulownia tomentosa</i>	0,0 ± 0,0	423	(356–485)	87,6	86,8
<i>Populus nigra</i>	18,7 ± 5,2	211	(125–225)	98,8	92,3
<i>Coriandrum sativum</i>	36,9 ± 3,2	98	(86–102)	89,7	92,6
<i>Celastrus angulatus</i>	16,5 ± 3,6	>500	–	69,7	78,7

CI₉₅ = 95% interval spolehlivosti. Hodnoty, které se v daném rozsahu nepřekrývají, jsou odlišné s 95% pravděpodobností.



Graf 1: Akutní a chronická toxicita extraktů pro *Spodoptera littoralis*.



Graf 2: Protipožerová účinnost a inhibice růstu vlivem extraktů u *Spodoptera littoralis*.

5.2 Biologická účinnost extraktů na *Culex quinquefasciatus*

U druhu *Culex quinquefasciatus* byla zkoumána biologická účinnost všech extraktů ve smyslu akutní toxicity, použity byly larvy 3. instaru. Z výsledků testů byly statistickým zpracováním odhadnuty hodnoty letálních dávek LD₅₀ a vypočteny příslušné konfidenční intervaly CI₉₅. Výsledky testů po statistickém zpracování jsou uvedeny v tabulce 3 a grafu 3. Hodnota LD₅₀ pro extrakty *Paulownia tomentosa* a *Celastrus angulatus* byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace, a proto nebyla tato hodnota a její CI₉₅ stanovena.

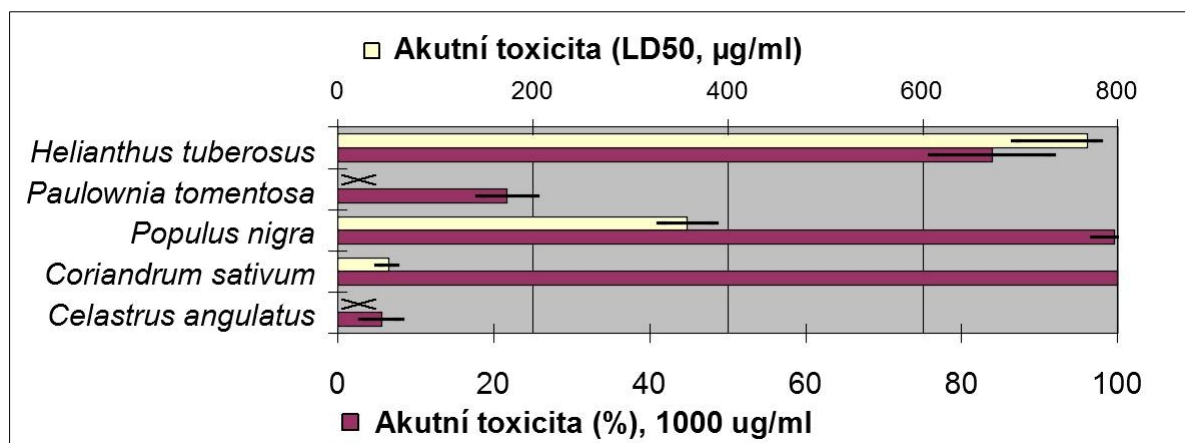
- Extrakty *Coriandrum sativum* a *Populus nigra* projevily při dávce 1000 µg/ml téměř 100% akutní toxicitu.
- Nejnižší akutní toxicitu měly extrakty *Paulownia tomentosa* (22 %) a *Celastrus angulatus* (6 %).

- LD_{50} extraktu *Coriandrum sativum* ($52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) byla 6-krát nižší než druhý nejlepší extrakt v tomto testu. Tento extrakt je tedy jednoznačně nejúčinnější (statisticky významně na 95% hladině spolehlivosti).

Tabulka 3: Výsledky testů biologické účinnosti extraktů na *Culex quinquefasciatus*.

(Culex quinquefasciatus, larva 3. instar)	akutní toxicita		
	mortalita % 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CI_{95}
<i>Helianthus tuberosus</i>	$83,9 \pm 7,6$	769	(695–780)
<i>Paulownia tomentosa</i>	$21,7 \pm 3,5$	>1000	–
<i>Populus nigra</i>	$99,6 \pm 2,5$	358	(332–386)
<i>Coriandrum sativum</i>	$100,0 \pm 0,0$	52	(42–58)
<i>Celastrus angulatus</i>	$5,6 \pm 2,3$	>1000	–

CI_{95} = 95% interval spolehlivosti. Hodnoty, které se v daném rozsahu nepřekrývají, jsou odlišné s 95% pravděpodobností.



Graf 3: Akutní toxicita extraktů pro *Culex quinquefasciatus*, 3. instar.

5.3 Biologická účinnost extraktů na *Myzus persicae*

U škůdce *Myzus persicae* byla zkoumána biologická účinnost všech extraktů ve smyslu akutní toxicity. Z výsledků testů byly statistickým zpracováním odhadnuty hodnoty letálních koncentrací LC_{50} a vypočteny příslušné konfidenční intervaly CI_{95} . Výsledky testů po statistickém zpracování jsou uvedeny v tabulce 4 a grafu 4. Hodnota LC_{50} pro akutní toxicitu

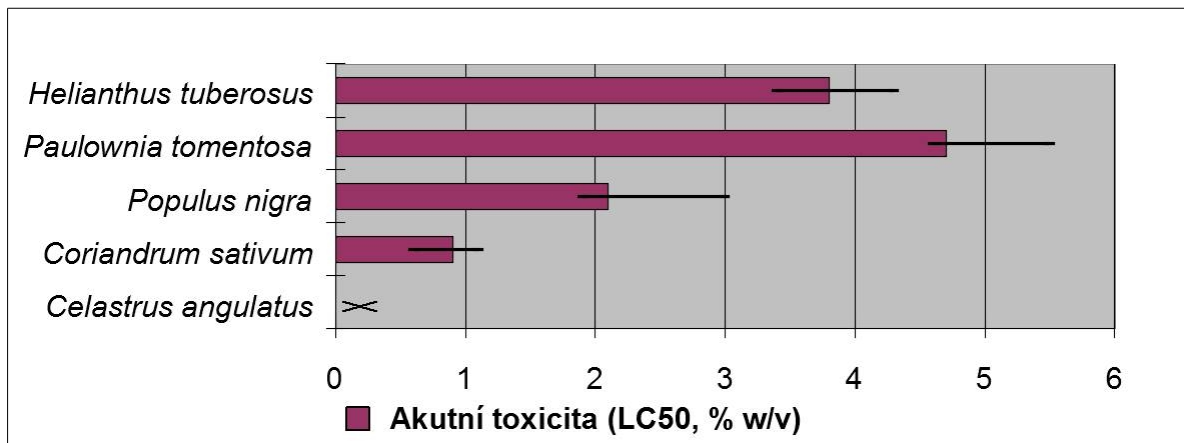
extraktu *Celastrus angulatus* byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace (10 % w/v), a proto nebyla tato hodnota a její CI₉₅ stanovena.

Nejvyšší akutní toxicitu projevily extrakty *Coriandrum sativum* (LC₅₀ = 1 % w/v) a *Populus nigra* (LC₅₀ = 2 % w/v). Rozdílnost jejich výsledků není na 95% hladině spolehlivosti statisticky významná.

Tabulka 4: Výsledky testů biologické účinnosti extraktů na *Myzus persicae*.

(Myzus persicae, dospělci)	akutní toxicita		
	Extrakt	LC ₅₀ (% w/v)	CI ₉₅
<i>Helianthus tuberosus</i>		3,8	(3,3–4,2)
<i>Paulownia tomentosa</i>		4,7	(3,9–4,8)
<i>Populus nigra</i>		2,1	(1,2–2,3)
<i>Coriandrum sativum</i>		0,9	(0,7–1,2)
<i>Celastrus angulatus</i>		>10	–

CI₉₅ = 95% interval spolehlivosti. Hodnoty, které se v daném rozsahu nepřekrývají, jsou odlišné s 95% pravděpodobností.



Graf 4: Akutní toxicita extraktů pro *Myzus persicae*.

6 Diskuse

Nejvyšší toxicita pro všechny tři vybrané modelové druhy hmyzu byla zjištěna u extraktu *Coriandrum sativum*. Tento výsledek byl ve většině případů statisticky významný na hladině spolehlivosti 95 %. Druhou nejvyšší toxicitu, jak v testech na akutní, tak na chronickou toxicitu pak měl pro všechny tři druhy extrakt z *Populus nigra*.

Kříženec topolu (*Populus nigra* L. x *Populus maximowiczii*) se pěstuje jako rychlerostoucí energetická plodina (Kovářová et al., 2002) a jako takový by mohl poskytnout levnější insekticid, než extrakt *Coriandrum sativum*, který má sice v přepočtu na miligram vyšší toxicitu, ale pravděpodobně také vyšší cenu. Roční výnos topolu je 10–20 t hmoty v absolutní sušině z plochy 1 ha (Kovářová et al., 2002). Oproti tomu výnos sušiny koriandru bývá 1,4–2,8 t/ha zrna a 2,3–3,0 t/ha slámy (Moudrý, 2016). Je však otázkou, jaká část sklizené hmoty je v obou případech použitelná pro přípravu extraktu a závěr proto není jednoznačný.

V práci Li et al. (2014) byly zkoumány účinné látky v metanolovém extraktu *Populus nigra* a mezi hlavní zjištěné sloučeniny patřily bis(2-ethylhexyl)ester kyseliny adipové a deriváty kyseliny ftalové. Extrakt *Populus nigra* byl zkoumán také v práci Pavela (2010), kde byl zjištěn FDI 50 % při 500 µg/cm².

Chemické složení nadzemní části *Coriandrum sativum* bylo zkoumáno v práci Oganessian et al. (2007). Byla zjištěna přítomnost 43 složek, mezi nimi 21 fenolických sloučenin. Nalezeny byly především flavonoidy, kumariny a fenolkarboxylové kyseliny.

Vlastnosti ostatních testovaných extraktů lze shrnout takto:

Helianthus tuberosus: Extrakt z této rostliny vykázal především nejvyšší protipožerový a růstově inhibiční účinek na *Spodoptera littoralis*. Tento závěr souhlasí se zjištěním Sujatha et Lakshminarayana (2006), že řada divokých druhů rodu *Helianthus* vykazuje v polních i laboratorních zkouškách velmi vysokou protipožerovou účinnost a chronickou toxicitu na *Spodoptera litura* (druh velmi blízký *S. littoralis*, dříve považovaný za identický).

Paulownia tomentosa: Nízká toxicita na *S. littoralis* zjištěná v této práci je v souladu s faktem, že rod *Spodoptera* je význačným škůdcem pavlovní (Kumar et Ahmad, 1998). Pavlovnice je rychle rostoucí strom, který začíná být pěstován pro bioenergetické účely (Yadav, 2013). Tyto vlastnosti by zvyšovaly jeho vhodnost jako potenčální suroviny pro výrobu komerčního insekticidu. Biologická účinnost extraktu pavlovnice však pravděpodobně není dostatečná.

Celastrus angulatus: Tento extrakt téměř ve všech testech vykázal nejnižší toxicitu ze všech zkoumaných extraktů, často mimo testovaný rozsah dávek/koncentrací. Toxicita i

protipožerová účinnost extraktu z *C. angulatus* byla však zjištěna proti *Mythimna separata* (*Noctuidae*) v práci Wang MinAn et Wu WenJun (2002). LD₅₀ pro akutní toxicitu pro jednotlivé složky se pohybovalo v rozsahu 20–400 µg/g. Navzdory nízké toxicitě v naší práci je od čínské firmy Jiangsu Inter-china Group Corporation, China, komerčně dostupný insekticid-akaricid pod názvem „CELASTRUS ANGULATUS 1%EC“ na základě etanolového extraktu z této rostliny (Jiangsu, [online]). Účinnou látkou v něm je angulatin A. Látky nacházející se v rostlině, jejímž domovem je Čína, budou pravděpodobně účinné především proti domácím škůdcům. Škůdci v této práci byli vybráni pro relevantnost v evropských podmínkách. Toto by mohlo vysvětlovat relativně nízkou účinnost extraktu zjištěnou v naší práci.

Zjištěné pořadí extraktů z hlediska toxicity od nejnižší po nejvyšší (vztažené na miligram extraktu) neznámá, že by musely být ve stejném pořadí vhodné jako praktické pesticidy. Pro zjištění pořadí komerční vhodnosti by bylo nutné zohlednit také cenu extraktů (přesněji potenciál ceny v případě masové výroby), která v sobě zahrnuje výnos použitelné části rostliny, náročnost pěstování a náročnost zpracování. Také by bylo nutné zjistit účinek na necílové druhy hmyzu a zbytek ekosystému a případné interakce s jinými druhy pesticidů a dalších látek používaných v zemědělské výrobě. Všechny tyto otázky se však nacházejí mimo rámec této práce.

7 Závěr

V rámci celkového úsilí o nalezení nových vhodných zdrojů extraktů potřebných k environmentálně přijatelné kontrole hmyzích škůdců byla v této práci stanovena biologická účinnost extraktů z několika rostlin. Téměř všechny měly výrazný negativní biologický účinek na zvolené škůdce.

Za nejvhodnější pro další vývoj botanických insekticidů na základě zkoumaných extraktů lze doporučit především extrakt z *Populus nigra* (pro potenciál pro levnou masovou výrobu), a dále extrakt z *Coriandrum sativum* (dosáhl zdaleka nejvyšších hodnot akutní i chronické toxicity pro všechny tři modelové druhy hmyzu). Tyto dvě rostliny navíc pocházejí z evropského kontinentu, narozdíl od většiny současných botanických insekticidů.

Většina extraktů zkoumaných v této práci pochází z rychle rostoucích, nenáročných rostlin, často využívaných jako energetické plodiny. V energetické produkci vzniká mnoho odpadního materiálu, který by mohl být velmi levnou surovinou pro výrobu botanických insekticidů. Pokud by z některé z těchto rostlin byl vytvořen komerční insekticid s nižší cenou, než je zatím běžné, mohlo by to významně přispět ke konkurenceschopnosti botanických insekticidů proti syntetickým. To by vedlo k rychlejšímu nahrazování syntetických pesticidů a následně i ke zlepšení stavu ekosystémů zamořených jejich residui.

Z výše uvedeného plyne, že hypotéza, ze které práce vycházela, byla ověřena.

8 Použitá literatura

Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18. 265-267.

Biom.cz. Topinambur hlíznatý (*Helianthus tuberosus* L.) - netradiční alternativní plodina pro průmyslové a energetické využití [online]. 2002-03-04 [cit. 2016-03-08]. Dostupné z: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/topinambur-hliznaty-helianthus-tuberosus-l-netradicni-alternativni-plodina-pro-prumyslove-a-energeticke-vyuziti>>. ISSN: 1801-2655.

Corbel, V., Duchon, S., Zaim, M., Hougard, J. M., 2004. Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*. 41 (4). 712–717.

Česká hlava PROJEKT z.ú. Česká hlava mezi pesticidy [online]. 2013 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <<http://www.ceskahlava.cz/cz/napsali-o-nas/ceska-hlava-mezi-pesticidy-135/>>.

Dubey, N. K., Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., Prakash, B. 2011. Global scenario on the application of natural products in integrated pest management programmes. In: Dubey, N. K. (ed.) *Natural products in plant pest management*. CABI. Wallingford. ISBN 978-1-84593-671-6.

Finney, D. J. 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press. London. ISBN 9780521080415.

Goddard, L.B., Roth, A. E., Reisen, W. K., Scott, T. W. 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*. 8. 1385–1391.

Henderson, C. F., Tilton, E. W. 1955. Tests with acaricides against the brown wheat mite. *Journal of Economic Entomology*. 48. 157-161.

Hieke, K., Pinc, M. 1978. *Praktická dendrologie, díl 1*. Nakladatelství SZN. Praha. 000128363.

Hussey, N.W., Gostick K. G. 1964. Effects of Low-temperature Storage on the Eggs of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Nature*. 203. 323-324.

INRA. Cotton worm, African cotton leafworm [online]. 2013 [cit. 10. 3. 2016], dostupné z: <<http://www.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6spolit.htm>>.

Jinagsu Inter-China Group Corporation. CELASTRUS ANGULATUS 1%EC [online]. 2016 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <<http://www.bio-agro.com/Productview.Asp?ID=114>>

Kazda, J. 2014. Škůdci polních plodin. Profí Press, s.r.o. Praha. ISBN 9788086726618.

Kocourek, F. 2000. Vzájemné vztahy mezi rostlinami a škůdci – Jak se rostliny hmyzu brání a co je rezistence. Agro. 5 (8). 23 – 27.

Kovářová, M., Abrham, Z., Jevič, Z., Šedivá, Z., Kocánová, V. Pěstování a využití energetických a průmyslových plodin. Biom.cz [online]. 2002-07-10 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/pestovani-a-vyuziti-energetickyh-a-prumyslovych-plodin>>. ISSN: 1801-2655.

Kremer, B. P. 1995. Stromy. Ikar. Praha. ISBN 80-7176-184-2

Kumar, M., Ahmad, M., 1998. Noctuid infestation to the introduced species of Paulownia. Annals of Forestry. 6 (2). 177-185.

Lefèvre, F. Légionnet, A. Vries, S., Turok, J. 1998. Strategies for the conservation of a pioneer tree species, *Populus nigra* L., in Europe. Genetics Selection Evolution. 30 (suppl. 1). 181–196.

Li, D., Peng, W., Ge, S., Mo, B., Zhang, Z. and Qin, D., 2014. Analysis on active molecules in *Populus nigra* wood extractives by GC-MS. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 27(6). 2061-2065.

Lutovská, M. Mikešová, I. 2004. Léčivé rostliny: o sběru a pěstování. Dokořán s.r.o. Most. p. 233. ISBN: 80-86569-68-3.

Málek, Z. Horáček, P. Kiesenbauer, Z. 2012. Stromy pro sídla a krajinu, Vydavatelství Ing. Petr Baštan. Olomouc. ISBN 9788087091364.

Mencl, J., Šimr, J., Hieke, K., Kunt, M., Horáček, P., Ponížil, P. Dendrologie online [online]. 2016 [cit. 2016-03-09]. Dostupné z: <<http://database.dendrologie.cz>>

Moudrý, J. Stražil, Z. 1996. Alternativní plodiny. 1. vyd. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. České Budějovice. 90 s. ISBN 80-7040-198-2.

Moudrý, J. Databáze - Koriandr setý [online]. 2016 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Koriandr_sety.htm>

Novák, J. Skalický, M. 2009. Botanika: Cytologie, histologie, organologie a systematika. Druhé vydání. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN 978-80-904011-5-0.

Oganesyan, E. T., Nersesyan, Z.M., Parkhomenko, A. Yu. 2007. Chemical composition of the above-ground part of *Coriandrum sativum*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 41 (3). 149-153.

Pavela, R. 2006. Rostlinné insekticidy: hubíme hmyz bez chemie. Grada Publishing, a.s. Praha. p. 74. ISBN: 80-247-1019-6

Pavela, R., 2007. Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. *Pesticide Technology* 1. 47–52.

Pavela, R., 2008. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 102. 555–559.

Pavela, R. 2009. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products*. 30. 311–315.

Pavela, R. 2010. Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. *Industrial Crops and Products*. 32. 213–219.

Pavela, R. 2011a. Botanické pesticidy. Kurent. České Budějovice. 128 s. ISBN 978-80-87111-26-0.

Pavela, R. 2011b. Natural Products as Allelochemicals in Pest Management. In: Dubey, N. K. (ed.) . *Natural products in plant pest management*. CABI. Preston. Wallingford. ISBN 978-1-84593-671-6.

Pavela, R. 2011c. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L. *Parasitology Research*. 109 (6). 1547–1553.

Pavela, R. 2011d. Screening of Eurasian plants for insecticidal and growth inhibition activity against *Spodoptera littoralis* larvae. *African Journal of Agricultural Research*. 6(12). pp. 2895-2907.

Pavela, R., Žabka, M., Tylová, T., Kresinová, Z., 2014. Insecticidal activity of compounds from *Ailanthus altissima* against *Spodoptera littoralis* larvae. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 51 (1). 101-112.

Pavela, R. 2016. Osobní sdělení.

Rohani, A., Chu, W. L., Saadiyah, I., Lee, H. L., Phang, S.M., 2001. Insecticide resistance status of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* collected from urban and rural in major towns of Malaysia. *Tropical Biomedicine*. 18 (1). 29–39.

Rotrekl, J. 2000. *Zemědělská entomologie (nejdůležitější škůdci polních plodin)*. Mendelova zemědělská a lesnická universita v Brně. ISBN 80-7157-473-2

Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott P. R., Holderness M. 1997. *Quarantine Pests for Europe*. CAB international and EPPO, 1425 pp. ISBN 0-85199-154-8.

Sujatha, M., Lakshminarayana, M. 2007. Resistance to *Spodoptera litura* (Fabr.) in *Helianthus* species and backcross derived inbred lines from crosses involving diploid species. *Euphytica*, 155 (1-2). 205-213.

Šefrová, H. 2006. *Rostlinolékařská entomologie*. Konvoj. Brno. ISBN 9788073020866.

Vinogradova, E. B. 2000. *Culex Pipiens Pipiens Mosquitoes: Taxonomy, Distribution, Ecology, Physiology, Genetics, Applied Importance and Control*. Pensoft Publishers. Sofia. ISBN 9546421030.

World Health Organization, 1996. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/WHOPES/IC/96.1.

Yadav, N. K., Vaidya, B. N., Henderson, K., Lee, J. F., Stewart, W. M., Dhekney, S. A. and Joshee, N. 2013. A review of *Paulownia* biotechnology: a short rotation, fast growing multipurpose bioenergy tree. *American Journal of Plant Sciences*. 4(11). p.2070.