

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie



Hodnocení vlivu patogenů na plodnost samic lýkožrouta modřínového (*Ips cembrae*)

Bakalářská práce

Autor: Zuzana Kláčmerová

Vedoucí práce: Mgr. Karolina Lukášová, Ph.D.

2017

Czech University of Life Sciences Prague

Faculty of Forestry and Wood Sciences

Department of Forest Protection and Entomology



Assessment of the impact of pathogens on larch bark beetle (*Ips cembrae*) female fertility

Bachelor thesis

Author: Zuzana Kláčmerová

Supervisor: Mgr. Karolina Lukášová, Ph.D.

2017

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zuzana Klačmerová

Hospodářská a správní služba v lesním hospodářství

Název práce

Hodnocení vlivu patogenů na plodnost samic lýkožrouta modřínového (*Ips cembrae*)

Název anglicky

Assessment of the impact of pathogens on larch bark beetle (*Ips cembrae*) female fertility

Cíle práce

- zhodnotit vliv různých skupin patogenů na plodnost samic *Ips cembrae*
- srovnat plodnost nakažených a zdravých samic *I. cembrae*

Metodika

- během března budou na vybraných lokalitách v České republice připraveny stromové lapáky (*Larix decidua*)
- během května-června bude z rozvinutých požerků na lapácích odebírán maximální počet samic a u každé spočítán počet vajíček v matečné chodbě
- popsané vzorky budou během července-srpna prohlédnuty po pitvě vnitřních orgánů pod světelným mikroskopem
- všechny zjištěné patogenní organismy budou zaznamenány a statisticky konfrontovány s počtem nakladených vajíček
- statisticky bude srovnána plodnost zdravých a nakažených samic a zhodnocen vliv patogenů na fertilitu samic

Doporučený rozsah práce

30 stran

Klíčová slova

lýkožrout modřínový, Scolytinae, stromové lapáky, mikrosporidie, hlístice

Doporučené zdroje informací

- Elsner G. 1997: Relationships between cutting time in winter and breeding success of *Ips cembrae* in larch timber. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie*, 11: 653-657.
- Grodzki W. 2008: *Ips cembrae* Heer. (Col.: Curculionidae, Scolytinae) in young larch stands – a new problem in Poland. *Forstschutz Aktuell*, 44: 8-9.
- Grodzki W. 2010: Possibility of the reduction of *Ips cembrae* (Heer) (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) populations in larch stands in southern Poland. *Sylvan*, 154: 160-167.
- Holuša J., Lukášová K., Wegensteiner R., Grodzki W., Pernek M. & Weiser J. 2012: Pathogens of the bark beetle *Ips cembrae*: microsporidia and gregarines known from other *Ips* species. *Journal of Applied Entomology*, 137: 181-187.
- Holuša J., Weiser J. & Žižka Z. 2009: Pathogens of the spruce bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. *Central European Journal of Biology*, 4: 567-573.
- Lukášová K. & Holuša J. 2011: *Gregarina typographi* (Eugregarinorida: Gregarinidae) in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae): changes in infection level in the breeding system. *Acta Protozoologica*, 50: 311-318.
- Lukášová K. & Holuša J. 2012: Patogeny lýkožroutů rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): review. *Zprávy lesnického výzkumu*, 3: 230-240.
- 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 Zoologica Bulgarica*, 62: 201-209.
- Wegensteiner R. 2004: Pathogens in bark beetles. pp. 291-313. In: Lieutier F., Day K., Battisti A., Gregoire J.-C. & Evans H. (eds.) *European Bark and Wood Boring Insects in Living Trees, a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Weiser J., Pultar O. & Žižka Z. 2000: Biological protection of forest against bark beetle outbreaks with poxvirus and other pathogens. *IUAPPA, Section B*, 12: 168-172.

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FLD

Vedoucí práce

Mgr. Karolína Lukášová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ochrany lesa a entomologie

Elektronicky schváleno dne 8. 10. 2015

Elektronicky schváleno dne 30. 10. 2015

prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

Vedoucí katedry

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Děkan

V Praze dne 21. 02. 2017

Prohlášení

"Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Hodnocení vlivu patogenů na plodnost samic lýkožrouta modřínového (*Ips cembrae*)** vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Karoliny Lukášové, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědoma, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby."

Ve Slaném dne 17. 4. 2017

.....
Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Karolině Lukášové, Ph.D. za cenné rady a připomínky v průběhu psaní práce a za její odborné vedení. Dále děkuji panu prof. Ing. Jaroslavu Holušovi, Ph.D. za pomoc při terénním výzkumu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá zhodnocením vlivu různých skupin patogenů na plodnost samic lýkožrouta modřínového (*Ips cembrae*). V roce 2015 probíhal výzkum, při kterém se porovnávaly počty vykladených vajíček u zdravých a nakažených samic. Na třech lokalitách Středočeského kraje v rozmezí měsíce března a dubna byly pokáceny modřínové lapáky. Napadené stromy byly podříznuty a ponechány na slunném místě přikryté větvemi. Sběr vzorků vykladených samic byl proveden v měsíci červnu, kdy byly samice *I. cembrae* vykladené. Vzorky byly prohlédnuty po pitvě vnitřních orgánů pod mikroskopem v laboratoři ČZU v Praze. Celkem bylo pro studii vypitváno 381 samic lýkožrouta modřínového. Výsledky byly statisticky analyzovány a porovnávány s výsledky jiných autorů. Nalezené patogeny lze zařadit mezi patogeny běžně parazitující u lýkožrouta modřínového. Z výsledků mé studie plyne, že obecně nejsou zjevné rozdíly mezi zdravými a nakaženými *I. cembrae*. Výjimku však tvoří lokalita Rakovník, na které byl zaznamenán vyšší počet vajíček u samic bez přítomnosti hlístovek a ty s přítomností *Chytridiopsis typographi* vytvářely signifikantně delší matečné chodby.

Klíčová slova: lýkožrout modřínový, *Scolytinae*, stromové lapáky, mikrosporidie, hlístice

Abstract

This bachelor thesis deals with the assessment of the impact of pathogens on larch bark beetle (*Ips cembrae*) female fertility. In 2015 there was a research being done where the numbers of laid eggs from healthy and infected female beetles were compared. During March and April in three locations of Central Bohemian region some larch trees were cut down, used as traps and left at sunny spots, covered with branches. The collecting of samples was done in June, after the female beetles laid their eggs. First part of the research was a dissection of internal organs that was done on collected female beetles from these locations. Second part of the research was done on their laid eggs. The total number of examined beetles that were used for this research is 381. All these samples were carefully examined under microscopes in CULS laboratory in Prague. The pathogens that were found can be classified as commonly parasitic pathogens for the larch bark beetle. My own research did not prove that the infested female beetles would lay less eggs than healthy ones. Exception is Rakovník location, where was recorded higher number of laid eggs in females without nematodes, and female infected by *Chytridiopsis typographi* created significantly longer maternal galleries than healthy ones.

Keywords: *Ips cembrae*, Scolytinae, tree trap, microsporidia, nematodes

Obsah

1. Seznam obrázků, grafů a tabulek	10
1.1. Obrázky	10
1.2. Grafy a tabulky	10
2. Úvod.....	11
3. Cíle.....	13
4. Literární přehled	14
4.1. Charakteristika <i>Ips cembrae</i>	14
4.2. Způsob života <i>Ips cembrae</i>	14
4.3. Obranná opatření	15
4.4. Patogeny	15
4.4.1 Viry	16
4.4.2 Prvoci (Protozoa)	16
4.4.3 Měňavky (Rhizopoda).....	16
4.4.4 Hromadinky (Apicomplexa)	17
4.4.5 Houby (Fungi).....	17
4.4.6 Mikrosporidie	18
4.4.7 Hlístice (Nematoda)	18
5. Metodika	20
6. Výsledky	23
7. Diskuze	30
8. Závěr	33
9. Seznam použité literatury	34

1. Seznam obrázků, grafů a tabulek

1.1. Obrázky

Obr. 1 Vyznačení lokality Křivoklát	22
Obr. 2 Vyznačení lokality Rakovník	22
Obr. 3 Vyznačení lokality Kostelec nad Černými Lesy.....	23
Obr. 4 Vypitvaná část střeva a vaječník <i>I. cembrae</i>	24
Obr. 5 Střevo lýkožrouta modřínového s hlístovkami a mimostřevní hlístovky s vajíčky.....	25
Obr. 6 Střední část střeva lýkožrouta modřínového s tlustostěnnými cystami mikrosporidie <i>Chytridiopsis typographi</i>	26
Obr. 7 Detail cyst <i>Chytridiopsis typographi</i> se sporami v tělní dutině	27

1.2. Grafy a tabulky

Graf 1 Zobrazení závislosti délky matečných chodeb na počtu vykladených vajíček samicemi na lokalitě Křivoklát	27
Graf 2 Srovnání počtu nakladených vajíček u zdravých a parazitovaných samic střevními hlístovkami.....	28
Graf 3 Srovnání počtu nakladených vajíček u zdravých a parazitovaných samic mimostřevními hlístovkami.....	28
Graf 4 Zobrazení závislosti délky matečných chodeb na počtu vykladených vajíček samicemi na lokalitě Rakovník.....	29
Graf 5 Srovnání délky matečných chodeb u zdravých a infikovaných samic <i>Ch. typographi</i>	30
Graf 6 Zobrazení závislosti délky matečných chodeb na počtu vykladených vajíček samicemi na lokalitě Kostelec nad Černými Lesy	30
Tab. 1 Zastoupení druhů patogenů na zkoumaných lokalitách.....	24

2. Úvod

Lýkožrout modřínový je jedním ze šesti druhů rodu *Ips* v České republice, avšak jediným zástupcem vyvíjejícím se na stromech modřínu. Tento druh patří k hlavním škůdcům, kteří napadají zpravidla oslabené stromy v jejich kmenové části nebo silnější vytěžené dřevo. Časté je u tohoto druhu nalétávání na stromy napadené tesaříkem modřínovým (*Tetropium gabrieli* Weise, 1905). Výhodné podmínky pro vývoj získává tento druh po obdobích velkého sucha, kdy jsou stromy oslabené. V tomto případě přichází na řadu množení a následné působení škod jakožto primárního škůdce na přežívajících nebo zdravých stromech. Rozsáhle škody způsobené nálety vznikají v nižších a středních nadmořských výškách (Knížek, 2006).

V případě přemnožení se může vyvíjet také na smrku, jak tomu bylo po suchém období v roce 2003. Hojným škůdcem na smrkových porostech se považuje také od mniškové kalamity ve 20. letech 20. století, ke které došlo v oblasti Křivokláta a Brd. V této souvislosti s poškozením modřínových porostů suchem v roce 2003 je nyní přemnožen na řadě lokalit. V případě přemnožení škodí v modřínových porostech napadáním zdravě vypadajících stojících stromů, které svým hromadným náletem udolává, ale také zralostním žírem mladých brouků na slabých větvíčkách v korunách stromů nebo regeneračním žírem starších jedinců na kmíncích nebo silnějších větvích (Knížek, 2006).

Výskyt *Ips cembrae* je ve střední Evropě v oblasti Alp a Karpat, od západní Francie po západní oblast evropské části Ruska (Knížek, 2006).

Mezi hlavní hostitelskou dřevinu patří modřín *Larix decidua* Mill, příležitostně se však také vyskytuje na smrku *Picea abies* (L.) Karsten. Revidován byl výskyt lýkožrouta modřínového na limbě (*Pinus cembra* L. – odtud jeho latinské druhové jméno), jedná se zde o výskyt lýkožrouta menšího – *Ips amitinus* Eichhoff, 1871 (Knížek, 2006).

Hostitelské druhy dřevin se mohou u některých druhů kůrovců příležitostně překrývat a jednotlivé druhy lýkožroutů se vzhledem ke své podobné bionomii

potkávají a nejspíše si i předávají patogenní organismy (Lukášová, Holuša 2012). Vliv patogenů na populační dynamiku *I. cembrae* je doposud neprostudovaným tématem a zjištění dopadů infekcí na plodnost samic je důležitým poznatkem pro další vývoj studia tohoto škůdce.

3. Cíle

Cílem mé práce je zjistit zda patogeny, kterými jsou napadeny samice *Ips cembrae* ovlivňují počet vykladených vajíček a poté srovnat plodnost nakažených a zdravých samic.

4. Literární přehled

4.1. Charakteristika *Ips cembrae*

Ips cembrae (Heer, 1836) patří do řádu brouků (Coleoptera), čeledi nosatcovití (Curculionidae), podčeledi kůrovcovitých (Scolytinae). Lýkožrouta modřínového nalezneme v Evropě (Rakousko, Chorvatsko, Česká republika, Dánsko, Anglie, Finsko, Francie, Německo, Maďarsko, Itálie, Nizozemsko, Polsko, Rumunsko, Skotsko, Srbsko a Černé Hora, Slovensko, Slovinsko, Švédsko, Švýcarsko, Ukrajina a Wales) a ve středním Rusku (OEPP / EPPO 2005).

Za poslední roky bylo zaznamenáno několik místních přemnožení *I. cembrae* v celé střední Evropě (Knížek, Zahradník 2004; Krehan, Cech 2004; Stratmann 2004; Knížek, Holuša 2007; Grodzki 2009).

Lýkožrout modřínový je považován za vážného škůdce v některých evropských zemích (Grégoire, Evans 2004), přestože množství škod způsobené na dřevě tímto druhem je malé v porovnání s jinými druhy kůrovce ve střední Evropě (Zahradník 1997).

4.2. Způsob života *Ips cembrae*

V České republice má lýkožrout modřínový nejčastěji ročně dvě generace. Na počátku měsíce května začíná jarní rojení, za přívnětivého počasí může začínat již koncem dubna. Druhá generace se objevuje počátkem července.

Zralostní žír může probíhat v místě jejich vývoje, nebo se také imaga mohou vykousávat ven a nalétávat do korun zdravých modřínů, kde se zavrtávají do čerstvých stromových výhonů. V průběhu července dochází k druhému rojení. Druhá generace ukončuje svůj vývoj ještě v roce líhnutí (Knížek 2006).

Požerky sesterské generace jsou zakládány samicemi *I. cembrae* po regeneračním žíru, za přívnětivých podmínek může dojít k založení třetí generace. Požerek je u rodu *Ips* zakládán samcem, který vyhloubí vstupní otvor a snubní komůrku. Díky agregačnímu feromonu přivolává další jedince, samice po páření vyhlodá matečnou chodbu, podél které do postranních zářezů naklade vajíčka. Následně si vylíhlé larvy hlodají larvální chodby dlouhé 4-8 cm, na konci každé chodby je larvální kolébka. *I. cembrae* požírá lýko stromu, bělové dřevo je na

povrchu takřka bez poničení. Vývoj lýkožrouta od vajíčka po dospělého trvá přibližně devět týdnů (Knížek 2006).

4.3. Obranná opatření

Napadány jsou nejčastěji modřínové stromy uvnitř porostů, což vytváří takzvaná kůrovcová kola. *Ips cembrae* také nalétává na krajní prosluněné stromy. Asanaci můžeme provést mechanickou či chemickou. Mezi mechanickou asanaci radíme odkornění nebo štěpkování. Odkornění modřínů není vhodné provádět za přítomnosti vývoje kukly a imaga, nelze tak dostatečně zahubit pozdější vývojová stadia, v takovém případě je zapotřebí využít frézové odkorňovače na motorovou pilu nebo stabilní odkorňovač. To stejné platí i u štěpkování, avšak pokud je štěpkování realizováno ve stádiu žlutého brouka, je zde možnost přežití malé části lýkožroutů. K chemické asanaci je nutné využívat výhradně přípravky uvedené v seznamu, který vydává Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Další možností jak zachytit lýkožrouty je využití odvětvených stromů - tzv. stromových lapáků. Stromové lapáky je nejlepší pokládat na prosluněná místa v měsíci březnu a počátkem dubna. V případě vyšší populační hustoty lýkožroutů bývá obsazen kmen v celé délce, většinou však bývá nejdříve nalétnuta horní strana lapáku, není to ale pravidlem. V případě nalétnutí lýkožrouty jsou na lapácích zřetelně vidět drtinky (Knížek 2006).

Základním krokem k předcházení útoků *I. cembrae* je zajištění vhodné dřevinné skladby lesů, větší biodiverzita uvnitř lesních porostů a v neposlední řadě zlepšení podmínek pro život ptactva a entomofágní hmyz. Obecným základem prevence je zvyšování ekologické stability lesních porostů, především vhodnou dřevinnou skladbou, zvyšování biodiverzity lesních porostů, zejména zlepšováním podmínek pro ptactvo (Knížek 2006).

4.4. Patogeny

Dnes je známo několik desítek druhů patogenů a hlístic, které byly nalezeny v tělech lýkožroutů rodu *Ips*. První zprávy pocházejí z počátku 20. století (Fuchs 1915), další až z poloviny 20. století. Nemoci jsou více studovány od poloviny devadesátých let (Wegensteiner 2004). V tomto období byl objeven největší počet

druhů, poslední pak v roce 2006 (Weiser et al. 2006), přehled všech nemocí zpracoval Takov et al. (2010).

V největší míře případů je nám známa pouze ultrastruktura nemocí a výše infekčních onemocnění různých populací. Není nám ale znám vztah k početnosti hostitelů. V současnosti probíhá zkoumání vývojových cyklů u druhů, u kterých doposud není jasný vývoj. Ještě méně znalostí máme o hlísticích. Všechny druhy spojené s rodem *Ips* byly zpracovány v monografii Rühma (1956), na toto téma bylo doposud napsáno jen několik prací (Lukášová, Holuša 2012). Dodnes bylo popsáno více než 20 druhů patogenů (mikrosporidie, viry, prvoci, zelené řasy) u brouků podčeledi Scolytinae (Wegensteiner, Weiser 1996a, 2004; Händel et al. 2003).

4.4.1 Viry

Virová onemocnění způsobují rozpad tkání hostitele na kalnou tekutinu. Mezi známý vir vyskytující se u druhů rodu *Ips* se řadí *Entomopoxvirus*, který napadá pouze střevo, ve kterém se projevuje tvorbou bílkovinných světlolomných inkluzí (Weiser, Wegensteiner 1994; Wegensteiner, Weiser 1995; Weiser et al. 2000; Burjanadze, Goginashvili 2009; Yaman, Baki 2011). Hostitel tak může na následky perforace střeva uhynout. U nás je virus zaznamenán například z Šumavy (Weiser et al. 2000; Weiser 2002).

4.4.2 Prvoci (Protozoa)

Mezi patogeny vyskytující se u lesních a zemědělských škůdců řadíme také prvoky, především měňavky, hromadinky a kokcidie (Weiser 1966).

Jejich význam v použití v biologickém boji proti škůdcům je omezený, Některé druhy např. gregariny jsou mnohdy označovány jako komenzální organismy a neogregariny, které napadající tukové těleso se špatně šíří, proto je možnost jejich využití v biologickém boji proti škůdcům omezený. K předání nemoci dochází až po uhynutí a rozkladu tkání hostitele (Lukášová, Holuša 2012).

4.4.3 Měňavky (Rhizopoda)

Ve střevech kůrovců se vyskytují měňavky *Malamoeba scolyti* (*Rhizopoda*, *Amoebidae*) rodu *Malamoeba*, které byly poprvé popsány u druhu *Dryocoetes*

autographus (Ratzeburg, 1837). Plně popsali životní cyklus *M. scolyti* u *D. autographus* (Purrini, Žižka 1983). Pro tento patogen jsou typické velké vejčité cysty, které z napadených jedinců vycházejí spolu s trusem přes zadní střevo. Při přemnožení dochází k ucpání trubic, což znemožňuje vylučování odpadních látek z těla postižených jedinců (Weiser 2002).

4.4.4 Hromadinky (Apicomplexa)

Hromadinky se řadí mezi obvyklé parazity bezobratlých a zahrnují tak tři skupiny: Archigregarinida, Eugregarinida a Neogregarinida (Théodoridés 1984).

Za poslední roky byla prokázána jejich fylogenetická příbuznost se zástupci rodu *Cryptosporidium*, která je významnou skupinou patogenů obratlovců (Barta, Thompson 2006). V dnešní době je popsáno více než 1 700 druhů gregarin ze zhruba 3 200 hostitelských druhů (Clopton 2000). Zástupci hromadinek se obvykle vyskytují u hmyzu (Zuk 1987; Simmons 1990; Lange, Wittenstein 2002; Smith et al. 2007; Smith, Cook 2008; Locklin, Vodopich 2010), obzvláště u brouků (Coleoptera) (Schawang, Janovy 2001; Yaman 2002, 2007; Sienkiewicz, Lipa 2008).

Ve střední části střeva u mnoha zástupců podčeledi Scolytinae byla zjištěna eugregarina *Gregarina typographi* (Fuchs 1915). (Takov et al. 2007, 2010; Yaman 2007, 2010; Holuša et al. 2009; Kereselidze et al. 2010). Gregariny mají přímý vývojový cyklus, což znamená, že nemají žádného mezihostitele (Clopton, Gold 1996). K infikování dochází po požití oocyst v nakaženém trusu, zbytcích těla uhynulých kůrovců a kanibalismem při tvorbě požerku nebo při zralostním žíru.

4.4.5 Houby (Fungi)

Houbová onemocnění jsou spíše sekundárním faktorem, která se objevují až po úhynu jedinců způsobeným jinými faktory, jako je poškození nebo přehřátí.

K hlavním patogenům patří výhradně *Beauveria bassiana* (Bals.) a *Beauveria brongniartii* (Sac.), která pokrývají těla hostitelů hustým bílým povlakem mycelií a konidiemi. *B. bassiana* se vyskytuje u více než 100 druhů hmyzu (Hajek, St. Leger 1994). Je možné ji potencionálně využít na kontrolu mnoha hospodářských škůdců

a je také hodnocena jako náhrada za běžně užívané chemické pesticidy (Roberts, Hajek 1992).

Dále řadíme mezi houbové entomopatogeny příležitostný patogen v hemolymfě a střevním epitelu kůrovců, jedná se o kvasinku *Metschnikowia typographi* (Ascomycota: Metschnikowiaceae) (Weiser et al. 2003; Unal et al. 2009).

4.4.6 Mikrosporidie

Dnes se tato skupina parazitů považuje za primitivní houby, za to dříve byly mikrosporidie řazeny k prvokům (Corradi, Keeling 2009; Redhead et al. 2009). Nejčastěji se vyskytují jako patogeny lesních i zemědělských škůdců, vyvíjejí se ve všech tkáních a vývojových stádiích hostitele. K přenosu dochází nejčastěji pozřením nakažené potravy (Holuša, Weiser 2005). Existuje také možnost napadení vaječníků, což se stává pouze v případě velmi silné infekce (Weiser et al. 2000; Phelps, Goodwin 2008).

Mezi nejběžnější mikrosporidii u kůrovcůse řadí *Chytridiopsis typographi* (původně *Haplosporidium typographi*) [(Weiser, 1954) Weiser, 1970], která se vyznačuje tvorbou velmi odolných silnostěnných cyst. *Ch. typographi* vytváří vředovitá ohniska, ve kterých dochází k porušení střeva.

4.4.7 Hlístice (Nematoda)

Mezi smrtící endoparazity hmyzu řadíme entomopatogenní hlístice (Nematoda: Heterorhabditidae, Mermithidae, Steinernematidae) (Gaugler, Kaya 1990; Gaugler 2002), které jsou užívány v biologickém boji proti škůdcům žijících kryptickým způsobem života (Ramos Rodríguez et al. 2006) tradičně ve vlhkém a v půdním prostředí (Kaya, Gaugler 1993). Výhodná je jejich nízká patogenita pro obratlovce (Kaya, Gaugler 1993; Bathon 1996).

Hlístice se dostávají do tělních dutin brouků tělními otvory, do kterých následně vypustí díky symbiotickým bakteriím rodů *Xenorhabdus* a *Photorhabdus* (Forst et al. 1997) endotoxiny, což vede k usmrcení jedince. Hlístice využívají i nadále těla mrtvých jedinců pro další vývoj (Croll 1970).

Průměrně je střevními hlísticemi nakaženo zhruba 50 % kůrovců (Wegensteiner, Weiser 1996b; Burjanadze, Goginashvili 2009; Kereselidze et al. 2010).

5. Metodika

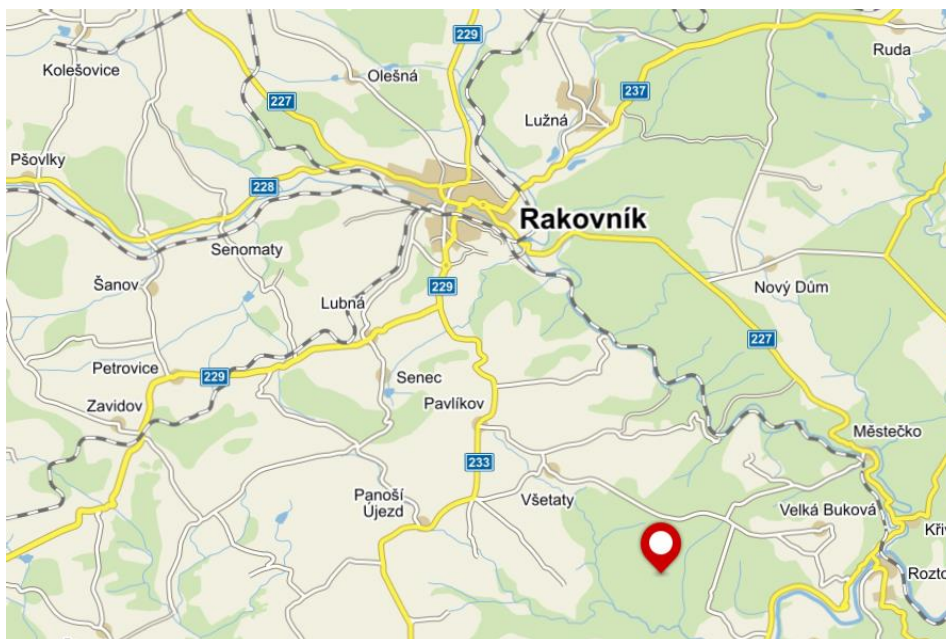
Podklady pro bakalářskou práci byly získány na terénních výjezdech, při kterých se prováděl sběr samic lýkožrouta modřínového. První sběr dospělců byl proveden dne 2. 6. 2015 na dvou lokalitách, jednalo se o lokalitu Křivoklát (Obr. 1) 425 m. n. m. (lokalita Malá Buková: 50.0259536N, 13.7953228E) a Rakovník (Obr. 2) 412 m. n. m. (lokalita Lužná: 50.1421369N, 13.8040444E). Třetí lokalitou, ve které proběhl sběr dat je Kostelec nad Černými Lesy (Obr. 3) 375 m. n. m. (lokalita Oplany: 49.9329053N, 14.8472327E) dne 6. 6. 2015.

Ke sběru vzorků docházelo na modřínových lapácích. Stromové lapáky byly tvořené z modřínů starých 60 - 80 let, které byly pokáceny v rozmezí měsíců března a dubna. K výzkumu byly zvoleny stromy s rozvinutými požerky tak, aby bylo jisté, že jsou samice *Ips cembrae* vykladené. Jednalo se tedy o požerky, ve kterých byly larvy ve stadiu I. a II. instaru, pokud jsme si tím nebyli jisti, brouky jsme k výzkumu nepoužili. Napadené stromy byly podříznuty a ponechány na slunném místě přikryté větvemi.

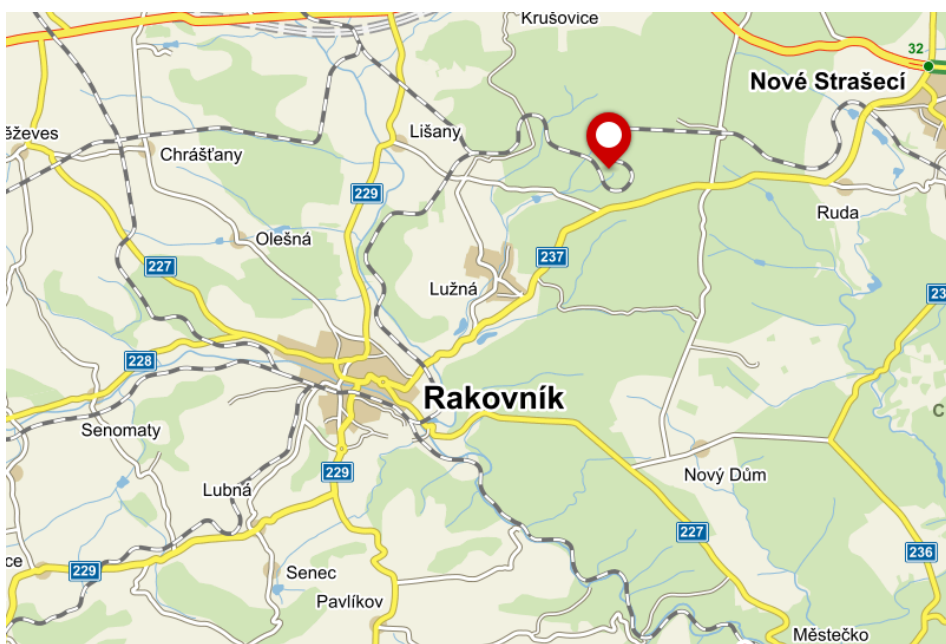
K odkornění kůry kolem závrťů byl použit ostrý nůž a poté byly odebrány samice *I. cembrae* z matečných chodeb a spočítána nakladená vajíčka společně s velikostí délky chodeb. Každá z odchycených samic byla uložena do uzavíratelné zkumavky. Nasbírané samice byly do doby pitvání uloženy v mrazáku a uchovány při - 10 ° Celsia.

Další práce byla prováděna ve školní laboratoři, vzorky byly rozmrazeny v Petriho miskách při pokojové teplotě, dále se ze samiček pinzetami pod binolupou vyjmula střeva, zakápla se lihem a na střevo se přiložilo krycí sklo. Takto se nadále vypreparovaná střeva *Ips cembrae* zkoumala pod mikroskopem Nikon Eclipse. Tento postup se opakoval celkem u všech vypitvaných 404 jedinců a byly zaznamenány všechny patogenní organismy, případně vyfotografovány pomocí kamery mikroskopu.

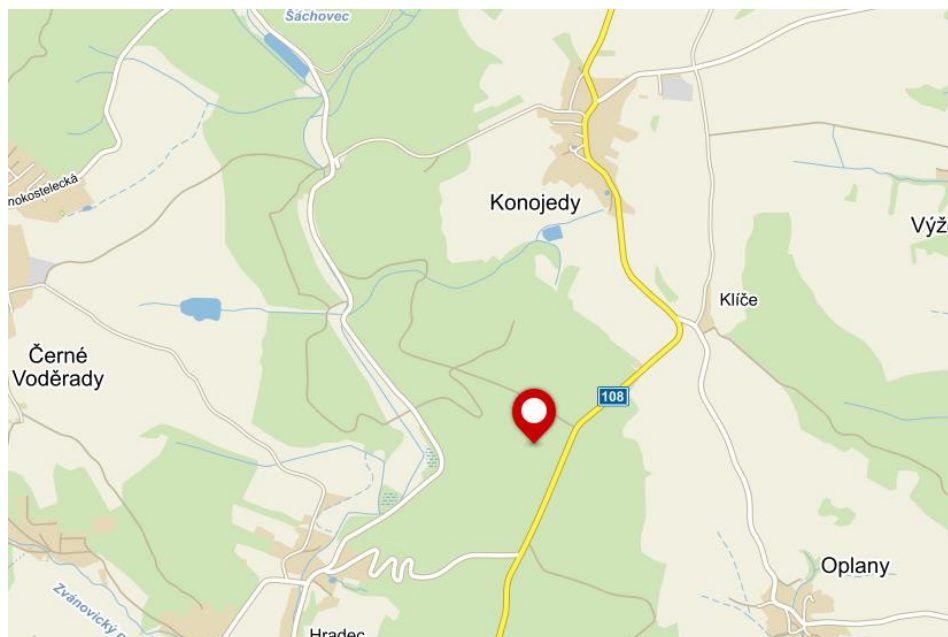
Zda se jedná o vzorek napadený či nikoliv a případně jakým patogenem bylo zapsáno do záznamového archu a poté veškerá data převedena do elektronické podoby.



Obr. 1 Vyznačení lokality Křivoklát (Malá Buková: 50.0259536N, 13.7953228E) nacházející se v západním okraji Středočeského kraje zhruba 30 kilometrů od Prahy, ve které převažují smrkové monokultury. Zdroj: www.mapy.cz



Obr. 2 Studijní plocha Rakovník (lokality Lužná: 50.1421369N, 13.8040444E) se nachází ve Středočeském kraji, okrese Rakovník spadající do mikroregionu Poddžbánsko, na které výrazně převažují jehličnaté dřeviny nad listnatými. Zdroj: www.mapy.cz



Obr. 3 Lokalita Kostelec nad Černými Lesy (Oplany: 49.9329053N, 14.8472327E).
Zdroj: www.mapy.cz

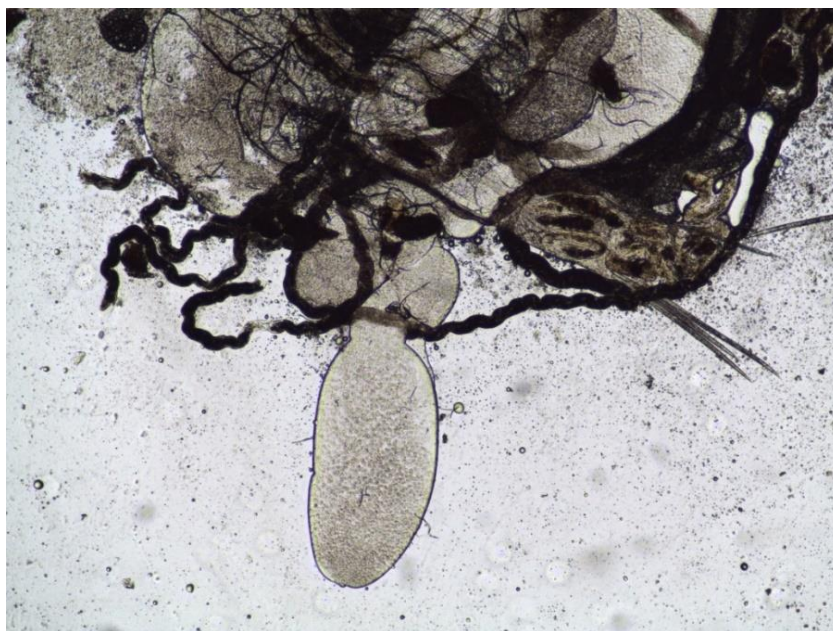
Přepis data a jejich zpracování bylo provedeno v softwaru Microsoft Excel 2016. Pokročilé statistické analýzy (Shapiro Wilkův test normality, Kruskal Wallis test, párové testy) byly vypočteny v programu STATISTICA 12.

6. Výsledky

Celkem bylo analyzováno 404 dospělců *Ips cembrae*, z toho bylo vypitváno 381 samic a 23 samců, kteří byli z analýzy vyloučeni. Pro zjednodušené zobrazení nalezených patogenů byla vypracována tabulka (Tab. 1).

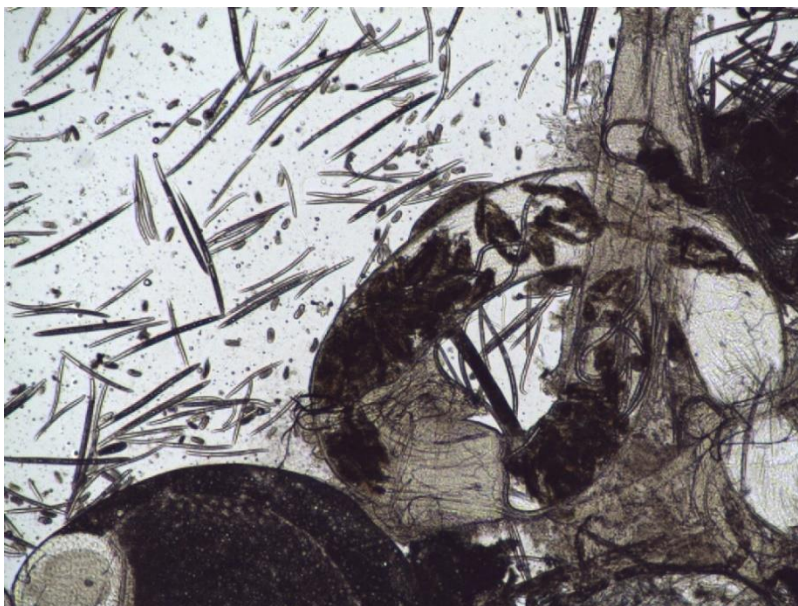
Tab. 1 Zastoupení druhů patogenů na zkoumaných lokalitách (%)

Lokalita	Křivoklát	Rakovník	Kostelec n. Č. L.
Průměrný počet vajíček	27,78±13,46	29,81±14,75	21,69±14,01
Průměrné délky chodeb	100,39±35,31	95,33±39,73	62,54±43,29
Střevní hlístovky	38,89±48,75	19,91±39,93	15,09±35,80
Mimostřevní hlístovky	11,11±11,11	16,74±37,37	8,49±27,87
<i>Chytridiopsis typographi</i>	3,70±18,89	2,72±16,25	2,83±35,80



Obr. 4 Vypitvaná část střeva (nahore) a vaječník (dole) lýkožrouta modřínového při zvětšení 100x.
Foto: Z. Klačmerová

Na lokalitě Křivoklát bylo celkově vypitváno 54 samic *I. cembrae*. Po získání preparátu střev (Obr. 4) a při pozdějším studování bylo zjištěno, že 38,89 % samic bylo napadeno střevními hlístovkami a 11,11 % obsahovalo mimostřevní hlístovky (Obr. 5). U 3,70 % *I. cembrae* byla zjištěna *Chytridiopsis typographi* (Obr. 6).

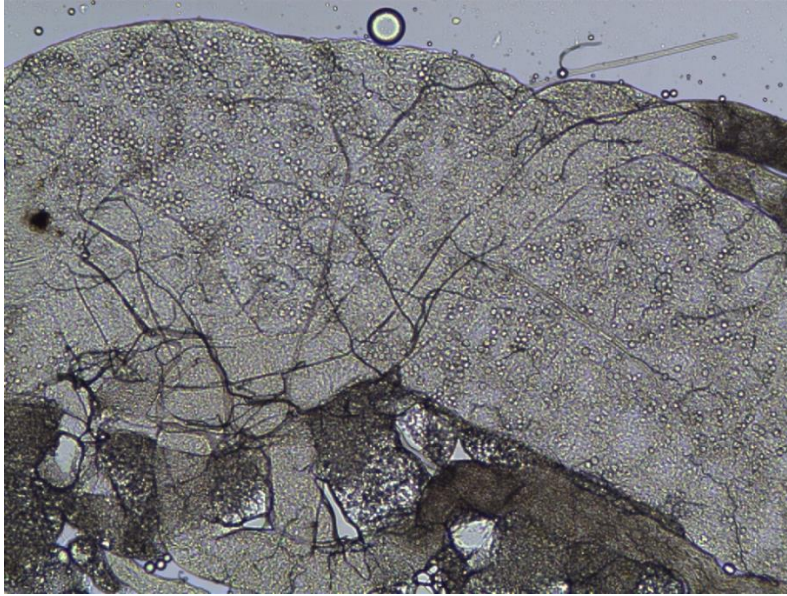


Obr. 5 Střevo lýkožrouta modřínového s hlístovkami (vpravo) a mimostřevní hlístovky s vajíčky (vpravo) při zvětšení 100x. Foto: Z. Kláčmerová

Na lokalitě Rakovník bylo odebráno 221 samic lýkožrouta modřínového. Téměř 20 % z nich bylo nakaženo střevními hlístovkami (Obr. 5), mimotělní hlístovky obsahovalo 16,74 %.

Na lokalitě Kostelec nad Černými Lesy bylo zjištěno napadení u 15,09 % samic střevní hlístovkou, mimotělními hlístovkami bylo napadeno 8,49 %. Více vypitvaných samic obsahovalo *Chytridiopsis typographi* (Obr. 7), přesněji 2,83 %.

Na lokalitě Malá Buková - Krivoklát nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi zdravými a nakaženými samicemi *I. cembrae* v počtu vykladených vajíček či délce matečných chodeb ani u střevních hlístovek (Shapiro – Wilkův test normality: $W = 0,6185$, $p < 0,05$; vajíčka - Kruskal Wallisův test: $H(1;54) = 3,7212$; $p > 0,05$; délka matečných chodeb - Kruskal Wallisův test: $H(1;54) = 0,1260$; $p > 0,05$), ani mimostřevních hlístovek (Shapiro – Wilkův test normality: $W=0,3644$, $p<0,05$; vajíčka - Kruskal Wallisův test: $H(1;54) = 2,5587$; $p > 0,05$; délka matečných chodeb - Kruskal Wallisův test: $H(1;54) = 1,8950$; $p > 0,05$) či v případě nákazy *Ch. typographi* (Shapiro – Wilkův test normality: $W=0,1882$, $p<0,05$; vajíčka - Kruskal Wallisův test: $H(1;54) = 0,4128$; $p > 0,05$; délka matečných chodeb - Kruskal Wallisův test: $H(1;54) = 0,1343$; $p > 0,05$).

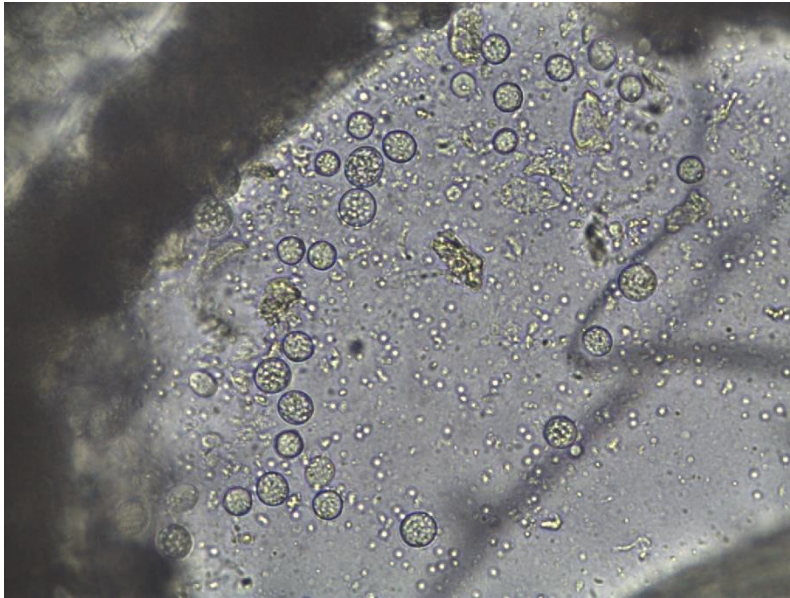


Obr. 6 Střední část střeva lýkožrouta modřínového s tlustostěnnými cystami mikrosporidie *Chytridiopsis typographi* při zvětšení 100x. Foto: Z. Klačmerová

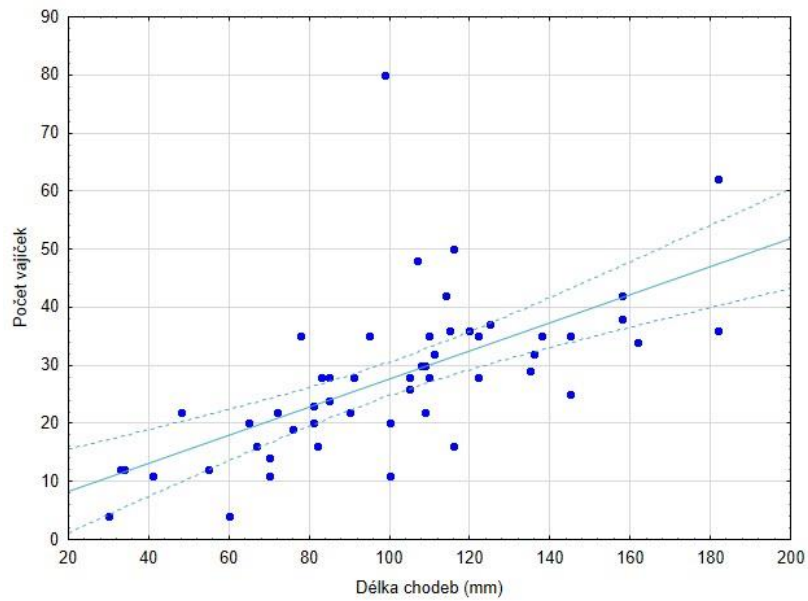
Počet vajíček vykladený jednou samicí na studované lokalitě pozitivně koreloval s délkami matečných chodeb ($y = 54,1699 + 1,6639 \cdot x$; $r = 0,6341$; $p < 0,05$; $r^2 = 0,4021$; Graf 1).

Na lokalitě Lužná – Rakovník byl zaznamenán průkazně vyšší počet vykladených vajíček samicemi bez přítomnosti parazitace střevními hlístovkami (Shapiro – Wilkův test normality: $W = 0,4886$, $p < 0,05$; Kruskal Wallisův test: $H(1;221) = 6,9315$; $p < 0,05$; Graf 2), stejně jako u matečných chodeb, které byly u zdravých samic delší (Kruskal Wallisův test: $H(1;221) = 13,2492$; $p < 0,05$).

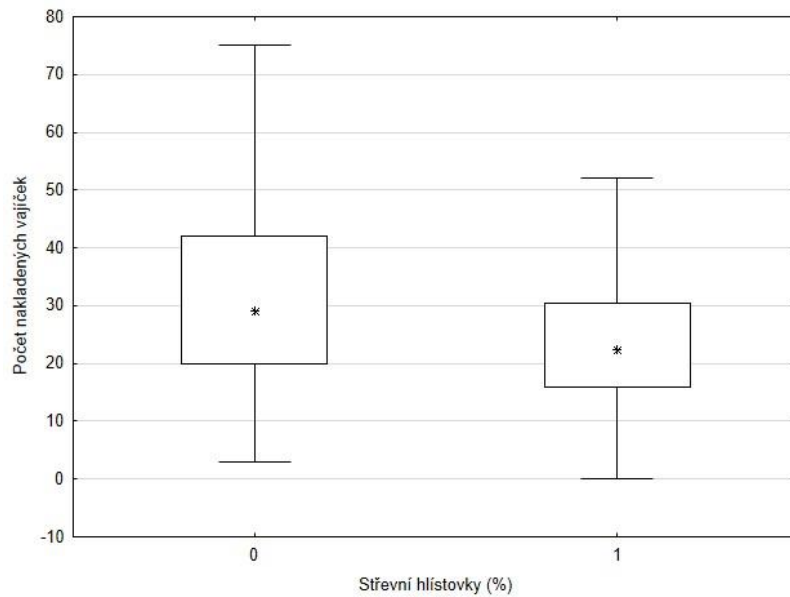
Obdobně tomu bylo i v případě srovnání nakažených a zdravých samic *I. cembrae* hlístovkami v hemolymfě (Shapiro – Wilkův test normality: $W = 0,4502$, $p < 0,05$; vajíčka - Kruskal Wallisův test: $H(1;221) = 11,6903$; $p < 0,05$; Graf 3; délka matečných chodeb - Kruskal Wallisův test: $H(1;221) = 14,8725$; $p < 0,05$).



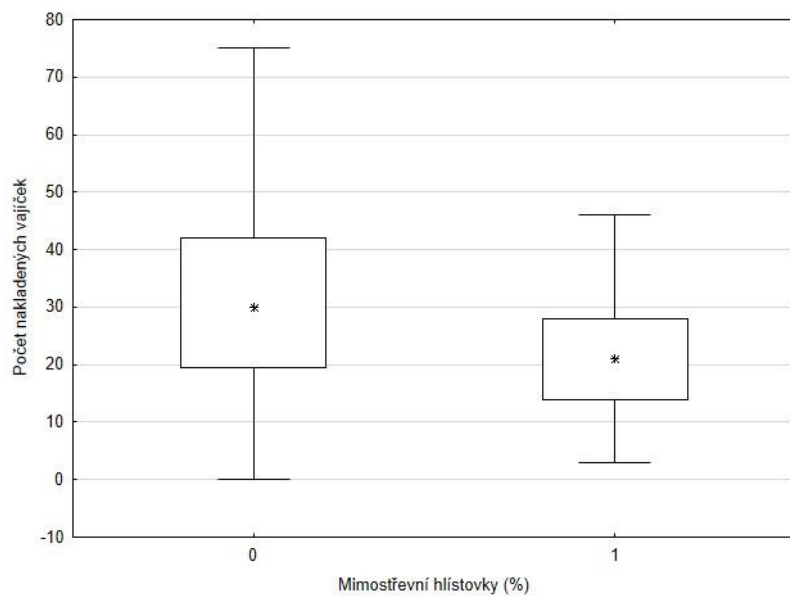
Obr. 7 Detail cyst *Chytridiopsis typographi* se sporami v tělní dutině lýkožrouta modřínového při zvětšení 200x. Foto: Z. Klačmerová



Graf 1 Zobrazení závislosti délky matečných chodeb na počtu vykladených vajíček samicemi na lokalitě Malá Buková v roce 2015. Regresní pásy představují 0,95 interval spolehlivosti.



Graf 2 Srovnání počtu nakladených vajíček u zdravých (0) a parazitovaných samic (1) střevními hlístovkami. Boxplot tvoří medián \pm 25-75% kvartil, svorka představuje rozsah neodlehých hodnot.



Graf 3 Srovnání počtu nakladených vajíček u zdravých (0) a parazitovaných samic (1) mimostřevními hlístovkami. Boxplot tvoří medián \pm 25-75% kvartil, svorka představuje rozsah neodlehých hodnot.

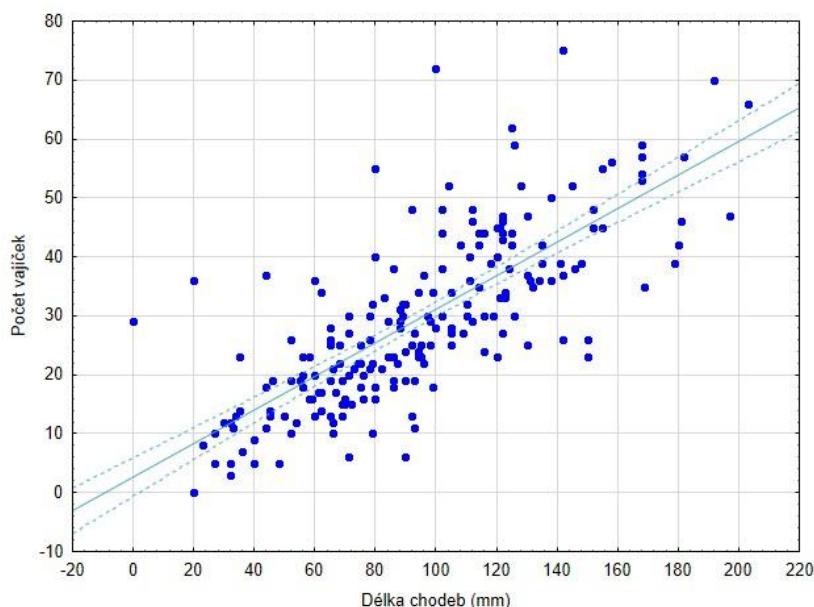
Samice infikované *Ch. typographyi* vykazovaly stejný počet nakladených vajíček (Shapiro – Wilkův test normality: $W=0,3845$, $p<0,05$; Kruskal Wallisův test: $H(1;106) = 0,4817$; $p > 0,05$), avšak zdravé samice vytvářely statisticky

signifikantně kratší matečné chodby (Kruskal Wallisův test: $H(1;106) = 4,4994$; $p < 0,05$; Graf 5).

Naopak u mikrosporidie *Ch. typography* nebyl zjištěn rozdíl mezi zdravými a napadenými samicemi v počtu vajíček (Shapiro – Wilkův test normality: $W=0,1490$, $p < 0,05$; Kruskal Wallisův test: $H(1;221) = 0,8395$; $p > 0,05$) ani délce matečných chodeb (Kruskal Wallisův test: $H(1;221) = 1,3354$; $p > 0,05$).

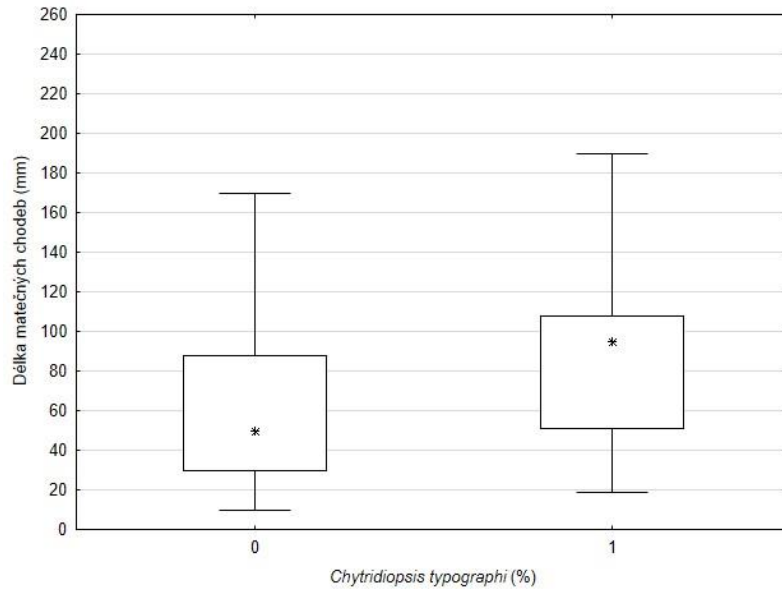
Vykladená vajíčka na této lokalitě rovněž pozitivně korelovala s délkou matečných chodeb samic *I. cembrae* ($y = 2,6399 + 0,2849 \cdot x$; $r = 0,7678$; $p < 0,05$; $r^2 = 0,5894$; Graf 4).

Třetí lokalita Kostelec nad Černými Lesy se vyznačovala vyrovnanými délkami chodeb i počty nakladených vajíček u samic nakažených střevními (Shapiro – Wilkův test normality: $W=0,4276$, $p < 0,05$; vajíčka - Kruskal Wallisův test: $H(1;106) = 0,02$; $p > 0,05$; délka matečných chodeb - Kruskal Wallisův test: $H(1;106) = 0,742$; $p > 0,05$) i mimostřevními hlístovkami (Shapiro – Wilkův test normality: $W=0,3114$, $p < 0,05$; vajíčka - Kruskal Wallisův test: $H(1;106) = 0,4404$; $p > 0,05$; délka matečných chodeb - Kruskal Wallisův test: $H(1;106) = 0,3415$; $p > 0,05$).

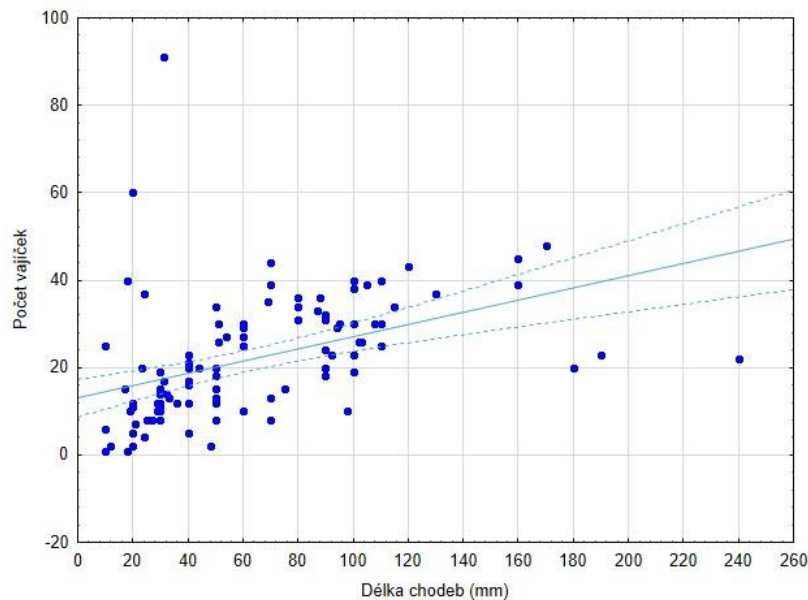


Graf 4 Zobrazení závislosti délky matečných chodeb na počtu vykladených vajíček samicemi na lokalitě Lužná v roce 2015. Regresní pásy představují 0,95 interval spolehlivosti.

Počet vajíček vykladený jednou samicí rovněž i na této lokalitě pozitivně koreloval s délkami matečných chodeb ($y = 12,9607 + 0,1396*x$; $r = 0,4313$; $p < 0,05$; $r^2 = 0,1860$; Graf 5).



Graf 5 Srovnání délky matečných chodeb u zdravých (0) a infikovaných samic (1) mikrosporidií *Ch. typographi*. Boxplot tvoří medián \pm 25-75% kvartil, svorka představuje rozsah neodlehých hodnot.



Graf 6 Zobrazení závislosti délky matečných chodeb na počtu vykladených vajíček samicemi na lokalitě Kostelec nad Černými Lesy v roce 2015. Regresní pásy představují 0,95 interval spolehlivosti.

7. Diskuze

Chytridiopsis typographi se řadí mezi ideální patogen pro porovnání plodnosti nakažených samic, jelikož byla nalezena na všech třech zkoumaných plochách. Největší výskyt byl objeven v Kostelci nad Černými Lesy, kde průměrné nakažení dosahovalo 3,70 %. Možná hladina infekce *Ch. typographi* je proměnná většinou v rádech desítek procent (Wegensteiner 2004; Wegensteiner, Weiser 2004; Holuša et al. 2009; Wegensteiner et al. 2010). *Chytridiopsis typographi* (Wegensteiner 2004; Takov et al. 2010) byl odhalený na veškerých plochách zkoumaných Holušou et al. (2012). Nakažení patogenem bylo běžně nízké, avšak ve třech případech větší než 45 %, čímž byl *Ips cembrae* novým hostitelem pro tento druh patogenu (Holuša et al. 2012).

Gregarina typographi patří mezi běžné a nespecifické patogeny kůrovců (Wegensteiner 2004; Kereselidze et al 2010; Takov et al 2010). Kolem 53 % kůrovců se stane hostiteli *G. typographi* (Takov et al. 2010), v mnohých případech může být prevalence v populaci vysoká (až 44 %) (Wegensteiner et al. 1996; Wegensteiner 2004). Ve výzkumu Holuši et al. (2012) byla *Gregarina typographi* zaznamenána na dvou lokalitách v Chorvatsku a Rakousku, nejvíce nakažených jedinců bylo v Rakousku a to 2,1%. *C. typographi* a *G. typographi* se často vyskytují společně s vysokou úrovní infekce (Haidler et al. 2003), vysoká úroveň infekce je také možná, pokud je přítomen pouze jeden patogen (Kereselidze, Wegensteiner 2007).

V naší studii nebyl nalezen podobně jako u výzkumu Holuši et al. (2012) *Entomopoxvirus typographi* (*ItEPV*) (Wegensteiner, Weiser, 1995). *ItEPV* byl však nalezen u *I. typographus* na Šumavě (Pultar, Weiser 2004) a v Rakousku (Wegensteiner 1994; Wegensteiner et al. 1996; Händel et al. 2001, 2003).

Podle studie Holuši et al. (2012) byl zjištěn druh *Nosema typographi* (Weiser 1954), jedná se o druh běžný u jedinců rodu *Ips*, avšak s malým výskytem (Weiser 1955; Wegensteiner, Weiser 1996; Händel et al. 2003; Pultar, Weiser 2004), jelikož se infekce vyskytuje v tukových tkáních (Purrini 1978, Wegensteiner, Weiser 1996) je jeho přenos komplikovaný. Tento druh *Nosema typographi* jsme ve studii z roku 2015 nenašli ani na jedné zkoumané lokalitě, nakažení v populacích druhu *Ips*,

zejména u *Ips typographus* je obvykle velmi malé, pohybuje se kolem 2 % i méně (Wegensteiner, Weiser 1996b; Händel et al. 2003).

Střevních hlístovek bylo nejvíce nalezeno na lokalitě Křivoklát a to 38,89 % nejméně pak v Kostelci 15,09 %. Naopak tomu bylo u mimostřevních hlístovek, kde jsme nejvíce napadených jedinců našli v Rakovníku 16,74 %, na lokalitě Křivoklát 11,11 % a nejméně v Kostelci nad Černými Lesy 8,49 %. Podle některých studií zabíjejí parazitické hlístice své hostitele (způsobují ucpání střeva a jeho perforaci) a redukují jejich životnost a plodnost (Lieutier 1980; Kaya 1984), např. zmenšením oocytů napadených samic lýkožroutů (Thong, Webster 1975). V naší studii se potvrdila snížená produkce vajíček při nákaze pouze na jedné lokalitě.

Na základě porovnání zjištěných výsledků se studií Holuši et al. (2012), při kterých se neobjevil žádný neexistující specifický patogen pro *I. cembrae* mohu říci, že na mnou studovaných lokalitách byly u odebraných *Ips cembrae* nalezeny běžně se vyskytující patogeny a paraziti.

Infekční hladina i složení patogenů jsou neměnné i na vzdálené lokality (Holuša et al. 2009). Vysvětlením je fakt, který byl v mnohých výzkumech prokázán. Jedná se o to, že hladina patogenů nezávisí na rozsahu napadených stromů (Holuša et al. 2009). Mezi další výsledek výzkumu patří skutečnost, že infekční hladiny nejsou souvztažné s odlišnými počty jedinců (Wegensteiner, Weiser 1996a). Při vysoké hustotě mají nedospělí *I. cembrae* nedostatek prostoru při zralostním žíru a dále pak protínají požerky a larvální chodby dalších lýkožroutů, což je příčinou větší možnosti nákazy z patogenních spor v místě požerku, tím se navyšuje infekční hladina patogenů (Wegensteiner, Weiser 1996a). Napadené stromy tak vytvářejí ohniska rozšíření *I. cembrae* a jejich patogenů příkladem je tomu tak na Šumavě či v Rakousku, kde se vyskytuje *ItEPV* a *Ch. typographi* v infekčních hladinách velkého rozsahu (Wegensteiner et al. 1996; Weiser et al. 2000; Holuša et al. 2007).

V důsledku nízkých populačních hustot se *I. cembrae* setkávají s jedinci svého druhu mimo požerky ojediněle a díky tomu spory patogenů nejsou pozřeny s trusem nebo zbytky odumřelých těl a nedochází tak k nákaze dalších jedinců (Wegensteiner, Weiser 1996a). Velikost infekční hladiny patogenů je do určité míry

vázána na populační denzitu a čas, jelikož nákaza matečných *Ips cembrae* se může od doby, kdy je vytvářena snubní komůrka po dokončení vývinu potomků i ztrojnásobit (Lukášová, Holuša 2011).

U podčeledi Scolytinae se mnozí autoři zabývali patogeny pouze z faunistického hlediska (Weiser et al. 1998; Wegensteiner 2004), kvůli tomu u mnoha patogenů neznáme přímé vlivy na imaga: vitalitu, fertilitu, letové schopnosti, přezimování atd. Příkladem je *Ips cembrae*, u kterého nejsou dostupné přijatelné údaje a donedávna nebyly vůbec žádné (Holuša et al. 2012). V naší studii nebyl rovněž prokázán přímý a přesvědčivý vliv patogenů na plodnost samic *I. cembrae* nebo délku jejich matečných chodeb.

8. Závěr

- nejsou zjevné rozdíly vykladených vajec u samic zdravých a nakažených patogeny s jedinou výjimkou hlístovek na lokalitě Rakovník
- patogen *Chytridiopsis typographi* rovněž nemá vliv na plodnost samic, avšak na jedné lokalitě samice vytvářely s infekcí delší matečné chodby se srovnatelnými počty vajíček jako zdravé samice
- plodnost samic *I. cembrae* tedy není silně ovlivněna patogenními organismy

9. Seznam použité literatury

- BARTA J. R., THOMPSON R. C., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, 22: 463-468.
- BATHON H., 1996. Impact of entomopathogenic nematodes on nontarget hosts. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 421-434.
- BURJANADZE M., GOGINASHVILI N., 2009. Occurrence of pathogens and nematodes in the spruce bark beetles, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in Borjomi gorge. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, 3: 145-149.
- CLOPTON R.E., 2000. Phylum Apicomplexa Levine, 1970: order Eugregarinorida Léger, 1900. In: Lee J. J. et al. (eds.): *Illustrated guide to the protozoa*. Lawrence, Society of Protozoologists: 205-288.
- CLOPTON R.E., GOLD R.E., 1996. Host specificity of *Gregarina blattarum* von Siebold, 1839 (Apicomplexa: Eugregarinida) among five species of domiciliary cockroaches. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 219-223.
- CORRADI N., KEELING P. J., 2009. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*, 23: 1-8.
- CROLL N. A. 1970. *The behavior of nematodes*. New York, St. Martin's Press: 117 s.
- FORST S., DOWDS B., BOEMARE N., STACKEBRANDT E., 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*, 51: 47-72.
- FUCHS G., 1915. Die Naturgeschichte der Nematoden und einiger anderer Parasiten 1. des *Ips typographus* L. 2. des *Hylobius abietis* L. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik*, 38: 109-222.
- GAUGLER R., 2002. *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, CABI Publishing: 372 s.

- GAUGLER R., KAYA H. K., 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, CRC Press: 365 s.
- GRÉGOIRE J.C., EVANS H.F., 2004. Damage and control of BAWBILT organisms – an overview. In: Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. Eds. by Lieutier F, Day K. R., Battisti A, Grégoire J. C., Evans H.F., Kluwer Academic, Dordrecht, 19–37.
- GRODZKI W., 2009. Kornik modrzewiowiec *Ips cembrae* (Heer) (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) w drzewostanach modrzewiowych południowej Polski. Leśne Prace Badawcze, 70: 355–361.
- HAILLER B., WEGENSTEINER R., WEISER J., 2003. Occurrence of microsporidia and other pathogens in associated living spruce bark beetles (Coleoptera, Scolytidae) in an Austrian forest. Insect pathogens and insect parasitic nematodes. IOBC WPRS Bulletins, 26: , 257–260.
- HAJEK A.E., ST. LEGER R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology, 39: 293–322.
- 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. Journal of Pest Science, 76: 22-32.
- HOLUŠA J., LUKÁŠOVÁ K., 2012. Patogeny lýkožroutů rodu *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae): review. Zprávy lesnického výzkumu, 57:2012 (3): 230-240.
- HOLUŠA J., LUKÁŠOVÁ K., WEGENSTEINER R., GRODZKI W., PERNEK M., WEISER J., 2012. Pathogens of the bark beetle *Ips cembrae*: microsporidia and gregarines known from other *Ips* species. Journal of Applied Entomology, 137: 188–196.
- HOLUŠA J., WEISER J., 2005. Biologické postupy boje s lesními škůdci. Zpravodaj ochrany lesa, 11: 18-23.

- HOLUŠA J., WEISER J., DRÁPELA K. 2007. Pathogens of *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in three areas in Central Europe. *Acta Protozoologica*, 46: 157-167.
- HOLUŠA J., WEISER J., ŽIŽKA Z., 2009. Pathogens of the spruce bark beetles *Ips typographus* and *Ips duplicatus*. *Central European Journal of Biology*, 4: 567-573.
- KAYA H. K., 1984. Nematode parasites of bark beetles. In: Nickle W. R. (eds.): *Plant and insect nematodes*. New York, Marcel Dekker, Inc.: 727-754.
- KAYA H. K., GAUGLER R., 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- KERESELIDZE M, WEGENSTEINER R., 2007. Occurrence of pathogens and parasites in *Ips typographus* L. from spruce stands (*Picea orientalis* L.) in Georgia. *IOBC WPRS Bulletin*, 30:, 207–210.
- 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 Zoologica Bulgarica*, 62: 131-139.
- KNÍŽEK M., 2006. Lýkožrout modřínový *Ips cembrae* (Heer). *Lesnická práce*, 12: 2-4.
- KNÍŽEK M., HOLUŠA J., 2007. Podkorní hmyz. In: *Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2006 a jejich očekávaný stav v roce 2007*. Ed. by Knížek M., *Zpravodaj Ochrany Lesa Supplementum*, VÚLHM, v.v.i. 74: 21-32.
- KNÍŽEK M., ZAHRADNÍK P., 2004. Podkorní hmyz. In: *Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2003 a jejich očekávaný stav v roce 2004*. Eds. by Kapitola P., Knížek M., Branař P., *Zpravodaj Ochrany Lesa Supplementum*, VÚLHM Jíloviště - Strnady, 80: 30-39.
- KREHAN H., CECH TL., 2004. Larch damage in Upper Styria. An example of the complex effects of damage agents. *Forstschutz Aktuell* 32: 4–8.

- LANGE C. E., WITTENSTEIN E., 2002. The life cycle of *Gregarina ronderosi* n. sp. (Apicomplexa: Gregarinidae) in the Argentine grasshopper *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 79: 27-36.
- LIEUTIER F., 1980. Le parasitisme d'*Ips sexdentatus* (Boern) (Coleoptera: Scolytidae) par les nématodes du genre *Parasitaphelenchus* Fuchs. Relations avec le parasitisme par *Contortylenchus diplogaster* (v. Lins.). *Revue Nématology*, 3: 271-281.
- LOCKLIN J. L., VODOPICH D. S., 2010. Patterns of gregarine parasitism in dragonflies: host, habitat, and seasonality. *Parasitology Research*, 107: 75-87.
- LUKÁŠOVÁ K., HOLUŠA J., 2011. *Gregarina typographi* (Eugregarinorida: Gregarinidae) in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae): changes in infection level in the breeding system. *Acta Protozoologica*, 50: 311-318.
- OEPP/EPPO 2005. *Ips cembrae* and *Ips subelongatus*. *Bulletin OEPP/ EPPO*, 35: 445-449.
- PHELPS N. B. D., GOODWIN A. E., 2008. Vertical transmission of *Ovipleistophora ovariae* (Microspora) within the eggs of the Golden Shiner. *Journal of Aquatic Animal Health*, 20: 45-53.
- PULTAR O., WEISER J., 2004. Výsledky posledních patologických studií dominantních kůrovců v NP Šumava a jejich využití. In: 28. setkání lesníků tří generací „Nebezpečí kůrovce v roce 2004“ Sborník referátů. 19. února 2004, Praha, Novotného lávka. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 82-88.
- PURRINI K., 1978. Protozoen als Krankheitserreger bei einigen Borckenkäferarten (*Col., Scolytidae*) im Königsee-Gebiet, Oberbayern. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 51: 171-175.
- PURRINI K., ŽIŽKA Z., 1983. More on the life cycle of *Malamoeba scolyti* (Amoebidae: Sarcomastigophora) parasitizing the bark beetle *Dryocoetes*

- autographus* (Scolytidae, Coleoptera). Journal of Invertebrate Pathology, 42: 96-105.
- RAMOS-RODRÍGUEZ O., CAMPBELL J. F., RAMASWAMY S. B., 2006. Pathogenicity of three species of entomopathogenic nematodes to some major stored-product insect pests. Journal of Stored Products Research, 42: 241-252.
- REDHEAD S. A., KIRK P. M., KEELING P. J., WEISS L. M., 2009. Proposals to exclude the phylum Microsporidia from the Code. Mycotaxon, 108: 505-507.
- ROBERTS D. W., HAJEK A. E., 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In: Leatham G. F. (ed.): Frontiers of industrial mycology. New York, Chapman and Hall: 144-159.
- RÜHM W., 1956. Die Nematoden der Ipiden. Mit 10 Tabellen im Text. Jena, Fischer: 437 s.
- SCHAWANG J. E., JANOVY J. JR., 2001. The response of *Gregarina niphandrodes* (Apicomplexa: Eugregarinida: Septatina) to host starvation in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. Journal of Parasitology, 87: 600-605.
- SIENKIEWICZ P., LIPA J., 2008. *Gregarina vizri* Lipa, 1968 (Apicomplexa: Eugregarinida) recorded in Poland in an expansive plant pest the cereal ground beetle *Zabrus tenebrioides* (Goeze) (Coleoptera: Carabidae). Journal of Plant Protection Research, 48: 189-193.
- SIMMONS L. W., 1990. Post-copulatory guarding female choice and the levels of gregarine infections in the field cricket *Gryllus binzaculatus*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 26: 403-407.
- SMITH A. J., COOK T. J., 2008. Host specificity of five species of Eugregarinida among six species of cockroaches (Insecta: Blattodea). Comparative Parasitology, 75: 288-291.
- SMITH A. J., COOK T. J., LUTTERSCHMIDT W. I., 2007. Effects of temperature on the development of *Gregarina cubensis* (Apicomplexa: Eugregarinida)

- parasitizing *Blaberus discoidalis* (Blattaria: Blaberidae). *Journal of Parasitology*, 93: 583-588.
- STRATMANN J., 2004. Borkenkäferkalamität 2003, was haben wir gelernt, sind wir für 2004 gerüstet? *Forst und Holz*, 59: 166–169
- TAKOV D., DOYCHEV D., WEGENSTEINER R., PILARSKA D., 2007. Study on the pathogens of bark beetles (Coleoptera, Scolytidae) from different coniferous stands in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica*, 59: 87-96
- 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 Zoologica Bulgarica*, 62: 201-209.
- THÉODORIDÉS J., 1984. The phylogeny of the Gregarina (Sporozoa). *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 13: 339-342.
- THONG C. H. S., WEBSTER J. M., 1975. Effects of bark beetle nematode, *Contortylenchus reversus*, on gallery construction, fecundity, and egg viability of douglas-fir beetle, *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera-Scolytidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 26: 235-238.
- UNAL S., YAMAN M., TOSUN O., AYDIN C., 2009. Occurrence of *Gregarina typographi* (Apicomplexa, Gregarinidae) and *Metschnikowia typographi* (Ascomycota, Metschnikowiaceae) in *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) populations in Kastamonu (Turkey). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8: 2687-2691.
- WEGENSTEINER R., 1996. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). *IOBC/WPRS Bulletin*, 19: 186-189.
- WEGENSTEINER R., 2004. Pathogens in bark beetles. In: Lieutier F. et al. (eds.): *Bark and wood boring insects in living trees in Europe: a synthesis*. Dordrecht, Kluwer: 291-313.

- WEGENSTEINER R., WEISER J., 1995. A new *Entomopoxvirus* in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 203-205.
- WEGENSTEINER R., WEISER J., 1996a. Occurrence of *Chytridiopsis typographi* (Microspora, Chytridiopsida) in *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) in a field population and in a laboratory stock. *Journal of Applied Entomology*, 120: 595-602.
- WEGENSTEINER R., WEISER J., 1996B. Untersuchungen zum Auftreten von Pathogenen bei *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) aus einem Naturschutzgebiet in Schwarzwald (Baden-Württemberg). *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 69:162-167.
- WEGENSTEINER R., WEISER J., 2004. Annual variation of pathogen occurrence and pathogen prevalence in *Ips typographus* L. (Col, Scolytidae) from the BOKU University Forest Demonstration Centre. *Journal of Pest Science*, 77: 221-228.
- WEGENSTEINER R., WEISER J., FÜHRER E., 1996. Observations on the occurrence of pathogens in the bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*, 120: 199-204.
- WEISER J., 1966. *Nemoci hmyzu*. Praha, Academia: 556 s.
- WEISER J., 2002. Patogenní organismy. In: Skuhřavý V. (ed.): *Lýkožrout smrkový (Ips typographus L.) a jeho kalamity*. Praha, Agrospoj: 97-100.
- WEISER J., HOLUŠA 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. *Journal of Pest Science*, 79: 127-135.
- WEISER J., PULTAR O., ŽIŽKA Z. 2000. Biological protection of forest against bark beetle outbreaks with poxvirus and other pathogens. *IUAPPA, Section B*, 12: 168-172.

- WEISER J., WEGENSTEINER R., 1994. A new *Entomopoxvirus* in the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) in Czechoslovakia. *Zeitschrift für angewandte Zoologie*, 80: 425-434.
- WEISER J., WEGENSTEINER R., HÄNDEL U., ŽIŽKA Z., 2003. Infections with the Ascomycete *Metschnikowia typographi* n. sp. in the bark beetle *Ips typographus* and *Ips amitinus* (Col., Scolytidae.). *Folia Microbiologica*, 48: 611-618.
- 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 Parasitologica*, 45: 191-195.
- YAMAN M., 2002. *Gregarina phyllotretae* Hoshide 1953, a protozoan parasite of the flea beetles, *Phyllotreta undulata* and *P. atra* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Turkey. *Applied Entomology and Zoology*, 37: 649-653.
- YAMAN M., 2007. *Gregarina typographi* Fuchs, a gregarine pathogen of the six-toothed pine bark beetle, *Ips sexdentatus* (Boerner) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 31: 359-363.
- YAMAN M., BAKI H., 2011. First record of *Entomopoxvirus* of *Ips typographus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) for Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 63: 199-202.
- ZAHRADNÍK P., 1997. Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 1996 a jejich očekávaný stav v roce 1997. *Zpravodaj Ochrany Lesa Supplementum VÚLHM Jíloviště-Strnady*, 4: 1-8.
- ZUK M., 1987. The effects of gregarine parasites, body size, and time of day on spermatophore production and sexual selection in field crickets. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 21: 65-72.