

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a entomologie



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

**Hodnocení efektivity využití houby *Beauveria bassiana* v
biologickém boji proti ponravám chrousta maďalového
Diplomová práce**

Autor: Bc. David Novák

Vedoucí práce: doc. Mgr. Karolina Resnerová, Ph.D.

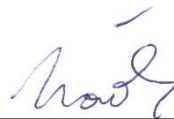
2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Hodnocení efektivity využití houby *Beauveria bassiana* v biologickém boji proti pon

ravám chrousta maďalového" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3. 4. 2023



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. David Novák

Lesní inženýrství

Název práce

Hodnocení efektivity využití houby *Beauveria bassiana* v biologickém boji proti ponravám chrousta maďalového

Název anglicky

Evaluation of the effectiveness of the use of fungi *Beauveria bassiana* in the biological control against forest cockchafer larvae

Cíle práce

- zhodnotit možnost využití *Beauveria bassiana* k prevenci vzniku škod žírem ponrav chroustů
- srovnat dva typy aplikace *B. bassiana* proti ponravám chroustů v poloprovozních podmínkách
- vyhodnotit zdravotní stav a kořenový systém borovic oslabených žírem chroustů dle typu ošetření při výsadbě

Metodika

V březnu proběhne odběr ponrav chroustů II. instaru z terénu. Následně bude založen pokus v poloprovozních podmínkách ve fóliovníku. Bude vysazeno celkem 200 sazenic *Pinus sylvestris* (velikost 20-25 cm) v různých variantách:

- a) kontrola (n=25),
- b) sazenice s hydrogelem a ponravou (n=25),
- c) sazenice s hydrogelem s roztokem *B. bassiana* a ponravou (n=50),
- d) sazenice s hydrogelem (n=50),
- e) a sazenice s ponravou a nosičem obsahujícím *B. bassiana* (n=50).

U každé sazenice bude na začátku a konci pokusu změřena výška, tloušťka kořenového krčku a váha. Ve 14denních intervalech bude dále kontrolována vitalita. Po čtyřech měsících budou sazenice vyzvednuty a analyzována mortalita ponrav. Poté budou na vzorku 10-15 sazenic z každé varianty vyhodnoceny kořenové systémy borových sazenic v programu WinRhizo: délka kořenů podle průměru, počty kořenových špiček, počet krátkých zakončení a stanovena hmotnost kořenů.

Na dalších sazenicích ve stejném počtu 10-15 z každé varianty bude provedena analýza cukrů (sacharóza, trehalóza, glukóza, fruktóza, mannitol, rafinóza, arabinóza) a polyfenolických sloučenin z větví a kořenů.

Získané výsledky budou vyhodnoceny standardními statistickými metodami a srovnány z obdobnými výsledky z dalších výzkumů. Závěrem bude vyhodnocena efektivita použití *B. bassiana* v biologickém boji proti ponravám chroustů maďalových.

Harmonogram

březen 2022 – odběr ponrav chroustů v terénu, výsadba borovic a založení pokusu ve fóliovníku

duben-srpen 2022 – kontrola vitality sazenic

září-prosinec 2022 – ukončení pokusu, laboratorní analýzy a statistické zhodnocení

leden-březen 2023 – předložení literární rešerše, zpracovaných dat a diskuse ke kontrole



Doporučený rozsah práce

50 stran včetně příloh

Klíčová slova

biologický boj; entomopatogenní houby; hydrofilní polymery; *Melolontha hippocastani*

Doporučené zdroje informací

- Kozel A.V., Zvereva E.L., Kozlov M.V. 2017. Impacts of root herbivory on seedlings of three species of boreal forest trees. *Applied Soil Ecology* 117: 203-207.
- Lalík M., Galko J., Nikolov C., Rell S., Kunca A., Zúbrik M., Hyblerová S., Barta M., Holuša J. 2021. Potential of *Beauveria bassiana* application via a carrier to control the large pine weevil. *Crop Protection* 143: 105563. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105563>
- Mayerhofer J., Enkerli J., Zelger R., Strasser H. 2015. Biological control of the European cockchafer: persistence of *Beauveria brongniartii* after long-term applications in the Euroregion Tyrol. *Biocontrol* 60: 617-629.
- Niemczyk M., Karwanski, M., Grzybowska U. 2017. Effect of Environmental Factors on Occurrence of Cockchafers (*Melolontha* spp.) in Forest Stands. *Baltic Forestry* 23: 334-341.
- Niemczyk M. 2015. Risk of the mass occurrence of cockchafer (*Melolontha* spp.) grubs in the ecotone of mature stands in Lubaczow Forest District. *Sylwan* 159:326-335.
- Skrzecz I., Sowińska A., Janiszewski W. 2014. Effects of botanical antifeedants on *Melolontha melolontha* grub feeding on Scots pine roots. *Folia Forestalia Polonica, series A* 56 (3): 135-140.
- Sukovata L., Jaworski T., Karolewsk, P., Kolk A. 2015. The performance of *Melolontha* grubs on the roots of various plant species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39 (1): 107-116.
- Wagenhoff E., Blum R., Henke L., Delb H. 2015. Aerial spraying of NeemAzal (R)-T/S against the forest cockchafer (*Melolontha hippocastani*, Col.: Scarabaeidae) in South-West Germany: The effects of two field trials performed in 2007 and 2008 on local populations. *Journal of Plant Diseases and Protection* 122: 169-182.
- Woreta D. 2015. Control of cockchafer *Melolontha* spp. grubs – A review of methods. *Folia Forestalia Polonica, series A* 57 (1): 33-41.
-

Předběžný termín obhajoby

2022/23 LS – FLD

Vedoucí práce

Mgr. Karolina Resnerová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ochrany lesa a entomologie

Elektronicky schváleno dne 26. 4. 2022

prof. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 31. 8. 2022

prof. Ing. Róbert Marušák, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 03. 04. 2023

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Mgr. Karolině Resnerové, Ph.D. za obrovskou pomoc jak při organizaci experimentu, při korektuře samotné práce a za nesmírnou trpělivost se studentem při psaní práce. Karlu Daďovi za asistenci při zakládání i ukončování experimentu a při práci v laboratoři. Manželům Ing. Petru a doktorce Soně Šenfaldovým za asistenci při zakládání, ukončování a udržování pokusu ve fóliovníku. Revírníkovi Ing. Jiřímu Ehrenbergerovi za povolení nasbírat ponravy na jím spravovaném revíru. Ing. Martinu Resnerovi, Ksenii Kotsiubniak a Iryně Kotsiubniak za pomoc při výkopu zemních sond a hledání ponrav. Bc. Zuzaně Šemberové za pomoc při homogenizaci vzorků. RNDr. Alině Kalyniukové, Ph.D. za velmi významnou pomoc při analýze cukrů v jehlicích a kořenech sazenic.

Ale hlavně bych chtěl poděkovat mým rodičům za nekonečnou finanční a psychickou podporu v průběhu jak zpracovávání diplomové práce, tak celého mého studia už od základní školy.

Hodnocení efektivity využití houby *Beauveria bassiana* v biologickém boji proti ponravám chrousta maďalového

Souhrn

Ponravy chrousta maďalového v kombinaci se suchem mohou být významnou překážkou při pěstování borovice lesní na chudých písčítých stanovištích. Moderní pojetí integrované ochrany rostlin navíc klade důraz na preferenci biologického boje se škůdci. Proto byly v rámci této studie podrobeny testům dvě metody aplikace ochrany dvouletých sazenic s využitím entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., Bull. Soc ke kterým byla přidána ponrava. Experiment trval po dobu 5 měsíců. První testovaná metoda byla aplikace kuličky vyrobené z obilnin a porostlé houbou ke kořenům sazenice. V druhém případě byly spory rozmíchány v dostatečné koncentraci s hydrogelem, jež byl rovněž aplikován ke kořenům. Efekt hydrogelu byl testován i samostatně bez přítomnosti houby. Nejlépe rostly sazenice z kontrolní kategorie bez ponravy i jakéhokoliv ošetření a sazenice ošetřené pouze hydrogelem bez přítomnosti ponravy. Studie odhalila, že nejprůkaznějším ukazatelem vlivu ponravy na sazenice je změna hmotnosti a výškový přírůst sazenice. Obě varianty ochrany prokázaly mít pozitivní vliv na vitalitu rostlin. U ošetřených sazenic oproti kontrolní kategorie bylo nalezeno na konci experimentu výrazně méně živých ponrav. Zároveň u jedinců, u kterých ponrava nebyla nalezena, byl prokázán nižší ztráta délky kořenového systému. Kategorie chráněná nosičem porostlým *B.bassiana* také vykazovala značně nižší hodnoty, oproti ostatním kategoriím obsahující ponravu, sacharidu trehalózy v kořenech sazenice, již rostliny obvykle reagují na stres.

Klíčová slova: *Melolontha hippocastani*, entomopatogenní houby, hydrogel, biologický boj, *Pinus sylvestris*

Evaluation of the effectiveness of the use of fungi *Beauveria bassiana* in the biological control against forest cockchafer larvae

Summary

The grubs of the forest cockchafer in combination with dry weather can be a major obstacle in attempts to grow forest pines on poor sandy stands. In addition, the modern view of integrated pest management highly prefers using natural enemies of targeted pests over synthetic insecticides. For this reason, were evaluated two methods of treatment of two years old pine seedlings against added grubs using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., Bull. Soc. The experiment had been taken for 5 months. The first method of treatment served a ball made of grains, covered with the fungus, that was put to the roots of the seedlings. The other method of treatment was using hydrogel as a carrier for the fungus spores, also applied to the roots. The effect of hydrogel had been tested also separately with neither the fungus spores nor the grubs. The best growth overall had been observed in the control category (no treatment and no grubs) and the seedlings treated by hydrogel only (without grubs). The study had shown that the best indicator of grub influence on the seedlings is the change of the seedlings weight and height increment. Both treatment methods proved to have a beneficial effect on the vitality of the seedlings. The number of living grubs that were found at the end of the experiment was significantly lower in the case of treated pines than in the case of the control category with grubs. In addition, the overall length of the root system had been greater in the plants, where the grub hadn't been found. The category protected by carrier overgrown by *B. bassiana* had shown lower amounts of the stress indicator, carbohydrate trehalose in the roots, compared to other categories.

Keywords: *Melolontha hippocastani*, entomopatogenic fungi, hydrogel, biological control, *Pinus sylvestris*

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 <i>Melolontha hippocastani</i>	10
3.2 Imago	10
3.3 Vývin.....	11
3.4 Hibernace a rojení.....	12
3.5 Škody způsobené chrousty	12
3.6 Integrovaná ochrana rostlin proti chroustům rodu <i>Melolontha</i>	13
3.6.1 Monitoring	14
3.6.2 Možnosti ochrany rostlin	15
3.7 Biologický boj	15
3.7.1 Entomopatogenní houby	16
4 Metodika	18
4.1 Odběr ponrav	18
4.2 Začátek experimentu	18
4.3 Ukončení experimentu	21
4.4 Měření kořenů v programu WinRHIZO	21
4.5 Homogenizace	21
4.6 Extrakce cukrů	22
4.6.1 Analýza cukrů pomocí kapalinového chromatografu	23
4.7 Statistická analýza získaných dat	23
5 Výsledky	24
5.1 Měření ve fóliovníku	24
5.2 Faktor přítomnosti ponravy	32
5.2.1 Vliv přítomnosti ponravy na kořenový systém.....	34
5.2.2 Cukry obsažené v jehlicích a kořenech sazenic	37
5.2.3 Závislost obsahu cukrů na přítomnosti ponravy	42
6 Diskuse	44
6.1 Vitalita a fyzické vlastnosti sazenic	44
6.2 Dopad přítomnosti ponravy na sazenice a jejich kořenové systémy	45
6.3 Cukry	46
7 Závěr	50
8 Literatura	51

1 Úvod

V letech 2015 a 2018 bylo zaznamenáno nezvykle nízké množství srážek (Knížek a Liška 2022). Tento stav snížené dostupnosti vody vedl k oslabení stromů, které hromadně chřadly a odumíraly a byly náchylnější vůči hmyzím škůdcům jako jsou např. kůrovci. Výrazně byly zasaženy zejména jehličnaté hospodářské dřeviny jako například borovice a smrky. V důsledku těchto faktorů vznikly rozsáhlé holiny, které jsou postupně obnovovány.

Obnova porostů je kvůli suchu komplikovaná, a proto se stále častěji hledají řešení pro zadržování vody v přírodě a při pěstování lesa. Jedním z možných řešení je využití hydrogelů, jež se prokazují být vhodným řešením období nedostatku vody při pěstování dřevin (Tomášková et al. 2020). Hydrogel je hydrofilní polymer, který je schopen, v závislosti na druhu, absorbovat vodu o hmotnosti 100násobku či až 400násobku vlastní hmotnosti (Macků et al. 2022). Zároveň ale umožňuje kořenům rostliny, aby z něj vodu čerpala v případě suchého období (Vundavalli et al. 2015). Ošetření hydrogelem umožnilo pěstování sazenic dřevin dokonce i v subtropických podmínkách (Tomášková et al. 2020). Proto by se mohlo jednat o vhodné řešení pěstování lesa při změně klimatu v Evropě.

Další faktory, které komplikují obnovu porostů, jsou biotického charakteru, jako je přítomnost různých škůdců, jež jsou schopni sazenice svojí činností ničit. V případě borovice lesní (*Pinus sylvestris* Linné) jsou jednou z takovýchto hrozeb chrousti rodu *Melolontha* (Kula 2021). Nejenže jsou imaga schopna působit škody defoliací na rozsáhlých plochách ale jejich larvy mohou prakticky znemožňovat obnovování porostů na chudých písčitéch stanovištích, na kterých je borovice lesní často pěstována (M. Švestka, 2006; Knížek & Liška, 2020). S rostoucím tlakem na odklon od syntetických pesticidů je důležitá aktivní snaha o objevování nových metod biologického boje s těmito škůdci. Jednou z možností biologického boje se škůdci je využití přirozených, ideálně hostitelsky specifických, patogenů, jako jsou entomopatogenní houby nebo prazitické hlístovky. Houby rodu *Beauveria* již proti byly proti chroustům úspěšně testovány (Keller 2000). V mnohých případech byl pro ošetření půdy houbami tohoto rodu zvoleny inokulované obilniny. Jeden takový způsob (kulička z obilných zbytků porostlá houbou) byl úspěšně testován při ochraně sazenic borovice lesní proti klikorohům rodu *Hylobius* (Lalík et al. 2021). Výhodou této metody je jednoduchost aplikace, proto bylo vhodné metodu otestovat i proti ponravám. Další testovanou metodou byla využití hydrogelu jako nosiče spor *B.bassiana* v návaznosti na komplikace způsobené suchem. Účinnost těchto řešení ochrany sazenic proti ponravám chroustů rodu *Melolontha* bude zkoumána v rámci této studie. Předpokladem výzkumu bylo, že sazenice s přidanou

entomopatogenní houbou budou mít při vystavení žíru ponrav chroustů lepší vitalitu a růstové charakteristiky než borovice bez tohoto typu ochrany

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení možnosti využití entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* k prevenci vzniku škod žírem ponrav chroustů rodu *Melolontha*. Druhým cílem studie bylo srovnání dvou typů aplikace *B. bassiana* ke kořenům sazenic v poloprovozních podmínkách. Posledním cílem této studie bylo zhodnocení zdravotního stavu sazenic borovice lesní, oslabených žírem ponrav chroustů dle typu ošetření při výsadbě a následné srovnání poškození jejich kořenových systémů.

3 Literární rešerše

3.1 *Melolontha hippocastani*

Melolontha hippocastani, Fabricius, 1801 česky chroust maďalový je bezobratlý živočich, který je řazen do řádu Coleoptera, čeledi Scarabaeidae (Obr. 1, Obr. 2). Byl popsán v jižní Evropě jako brouk, podobný chroustu obecnému s černou hlavou a chlupatým hrudníkem a bílými končetinami (Fabricius 1801). Imago *M. hippocastani* je středně velký brouk s orthognátní hlavou, kousavým ústrojím a výrazným pohlavním dimorfismem (Obr. 1-3) v podobě rozdílné velikosti a tvaru tykadel a pygidia (Kula 2021).



Obr. 1 *Melolontha hippocastani*-imago, samec
Autor: Zdeněk Chalupa (biolib.cz)

3.2 Imago

Dospělci se při úživném žíru nejčastěji zaměřují na listnaté dřeviny, zejména břízu, ale i dub, buk a další (Feddersen 1896). Zaznamenán byl také žír na jeřábu, topolu, vrbě, lísce či ovocných stromech (Henschel 1895; Boden 1895; Zweigelt 1928; Woreta a Sukovata 2010). Na jehličnatých stromech se mohou imaga živit buď mladými jehlicemi, což bylo pozorováno na smrku ztepilém (*Picea abies* (L.) H. Karst, 1881) a jedli (*Abies nordmanniana* Spach, 1841) (Bothe 1899). Mimo jehličí byla také pozorována konzumace prašníkových květů na borovici a smrku (Henschel 1895). V případě smrku a modřínu byl pozorován i žír na letorostech (Erichson et al. 1866).



Obr. 2 *Melolontha hippocastani*-imago, samice
Autor: David Selnekovic (biolib.cz)



Obr. 3 Znaky pohlavního dimorfismu rodu *Melolontha* - vlevo tykadlo samce, vpravo tykadlo samice
Převzato z (Balthasar 1956)

3.3 Vývin

Rod *Melolontha* je hmyz s přeměnou dokonalou, jehož larvální stadium se nazývá ponrava (Obr. 4). Přeměna probíhá ve 3 instarech. Konkrétně ponravy *M. hippocastani* se převážně vyskytují v borových porostech s příměsí listnatých stromů na písčitém stanovišti, kde samice preferují klást svá vajíčka (Delb a Mattes 2001). Larvy, obzvláště 2. a 3. instaru, preferují kořeny cévnatých rostlin, například rodů jako *Rumex*, *Chenopodium*, *Stellaria*, *Achillea*, *Daucus*, *Solanum*,



Obr. 4 Ponrava chrousta rodu *Melolontha*
Převzato z: (Muška et al. 2012)

Festuca, *Cirsium*, *Taraxacum* a *Plantago*. Bylo také laboratorně prokázáno, že samice chroustů jsou schopny rozeznat, jaké rostliny na stanovišti rostou a naklást vajíčka tam, kde je vhodná rostlinná skladba zejména pak velké množství druhu *Taraxacum officinale* F.H. Wigg (Horber, 1961; Hauss & Schütte, 1978). Z nakladených vajíček v zemi se larvy prvního instaru začínají líhnout po 30-40 dnech (Henschel 1895). Doba, za kterou se vajíčka vylíhnou závisí na teplotě půdy. Ta musí mít více než 17 °C. Pokud je teplota nižší, vývoj se zpomaluje a tím se posouvá termín líhnutí. Ponravy se v tomto stadiu zůstávají až do léta pospolu, kdy se začínají samostatně lézt za potravou (Kowalska 2001). Takto malé larvy se mohou živit kořeny rostlin, to spíše ale v případě, že v substrátu není dostatečné množství humusu, jež je ponravami upřednostňován (Schuch 1935; Thiem 1949) Aby toho byly schopné, získávají symbiotické bakterie z trusu samice, která vajíčka nakladla (Kowalska 2001). Po konci vegetačního období a s příchodem chladnějších teplot (teplota půdy 10-11 °C) se ponravy o velikosti 10-13 mm zavrtávají hlouběji do země cca do hloubky 30-60 cm (Schwerdtfeger 1939). Do druhého instaru se následující rok larvy vyvíjejí během července. V tomto instaru se jejich strava skládá výhradně z jemných kořínků rostlin. V 1. a 2. instaru vykazují ponravy nejrychlejší růst, který se pohybuje mezi 250–300% hmotnosti (Woreta a Sukovata 2015). Ponrava musí být velmi aktivní při vyhledávání vhodných kořínků jako potravu. Její aktivita je výrazně ovlivněna teplotou, kdy teplota půdy 8 °C je pro larvu hraniční pro vstup do vrchních vrstev rhizosféry (Laengle et al. 2005). Při nižších teplotách se ale stále vyskytují hlouběji pod povrchem v nezamrzné hloubce cca 40 cm (Kula 2021). Následující rok ponravy vyrostou do třetího instaru.

V této fázi jsou již schopny nalézt a požírat kořeny v hloubce 30 cm již při teplotě podloží 7 °C (Ené 1942). Ponravy o velikost přibližně 50 mm už dokážou ožírat i silnější kořeny (Valenta a Gavelis 1970). Během tohoto instaru larvy ale mnoho na hmotnosti nepřibírají, ba naopak byl pozorován úbytek jejich hmotnosti což může být způsobeno metabolickou přípravou na stadium kukly (Woreta a Sukovata 2015; Kozel et al. 2017). Před samotným zakuklením se larva zavrtá do hloubky mezi 35-80 cm (Valenta a Gavelis 1970). Hloubka, do které se ponravy prohrabaly závisí na vlhkosti, kdy v případě sucha se prohrabávají hlouběji. Poté se ponrava v druhé polovině června zakuklí (Kula 2021). Kromě změny barvy z bílé na zažloutlou ponrava, kromě hlavy a zadečku, narovná tělo. Následně po vyhrabání skulinky se larva začne po dobu 4 dnů, kdy je kukla vytvořena. Informace o délce trvání tohoto stadia se liší. Dle Vogel (1950) je tato fáze 3 týdny dlouhá, Escherich (1923) zase uvádí 4-8 týdnů.

3.4 Hibernace a rojení

Imaga po vylíhnutí zůstávají v půdě, jelikož k tomu dochází v období na začátku měsíce září (Kula 2021). Hloubka, do které se zavrtávají v závislosti na hladině spodní vody a hrubosti podloží se pohybuje od 0,15 do 1,5 m (Escherich 1923; Kratochvíl et al. 1953; Kowalska 2001). Většina se ale nalézá v hloubce od 15 cm do 40 cm (Kula 2022).

Rojení vždy probíhá jednou za 4 roky, protože v každém instaru stráví zhruba ponrava 1 rok. Koncem dubna i přes první polovinu května se dospělci začínají vyhrabávat ze svých komůrek, po kterých zůstávají v zemi výletové otvory (Kula 2021). Termín, kdy chrousti vyletí, závisí na teplotě, kdy v hloubce 0,1-0,2 m přetrvávala teplota půdy vyšší než 10 °C po dobu alespoň 3 dny (Escherich 1923). Zároveň musí být teplota vzduchu 12-20 °C (Wagenhoff et al. 2014; Zivanovic 1972). Ovšem podle Trotuş et al., (2013) stačí, aby půda měla průměrnou teplotu už mezi 6,1-14,2 °C a vzduch 5,5-13,2 °C. Každopádně čím je teplota vyšší, tím dříve dojde k výletu brouků (Kowalska 2001). Podle dat Wagenhoff et al. (2014) samci vylétají jako první a jejich rojení kulminuje 7-10 dní po začátku. Rojení samic kulminuje 7-14 dní po počátku výletu. Gradační maxima přítomnosti *M. hippocastani* se dle dostupných dat opakují každých 30-40 let (Nunberg 1951).

3.5 Škody způsobené chrousty

Ponravy chroustů rodu *Melolontha* jsou schopny působit škody na relativně velkých plochách. Například ve střední Evropě v období tří za sebou jdoucích rojení v letech 1986, 1990

a 1994 byly zaznamenány škody na území o velikosti mezi 10–15 tis. ha, což bylo způsobeno zákazem, jakkoliv proti ponravám zasahovat (Schmid-Vielgut et al. 1992; Delb 2000).

V České republice byly po přelomu tisíciletí na ploše o velikosti 10 tis. ha nalezeny škody na 50-300 ha výsadeb a obnovovaných ploch (Švestka 2006). V letech 2007–2012 byly škody způsobené ponravami chroustů zjištěné na plochách nepřesahující 51 ha za rok (Knížek a Pešková 2008; Knížek 2009; 2010; 2011; Knížek a Modlinger 2013). V roce 2013 již tato plocha čítala 71 ha a o rok později ponravy způsobily škody již na 104,5 ha (Knížek et al. 2015). Tato území se v následujícím období tedy roky 2015 a 2016 značně rozšířilo nejprve na 256 ha a poté 379 ha (Knížek et al. 2016; 2017). V tom samém období bylo také zaznamenáno poškození dospělci zejména *M. hippocastani* na ploše 190 ha v roce 2015 a 379 ha v roce 2016. Dále v letech 2017 a 2018 byly škody působené ponravami nižší, konkrétně na 81 ha a 63 ha (Knížek a Liška 2018; 2019). Dospělci v tomto období působili škody jen vzácně. Ovšem v roce 2019 tento trend otáčí a jsou pozorovány škody působené na větší ploše o rozloze 321 ha (Knížek a Liška 2020). To bylo přisuzováno chladnému deštivému počasí, což zapříčinilo rojení na větší ploše, ale nebylo tolik intenzivní, jak se původně očekávalo. Vyšší aktivita dospělců byla zaznamenána i v roce 2020, tedy škody na ploše celkem 314 ha z toho téměř polovina (152 ha) byly škody v Královehradeckém kraji (Knížek a Liška 2021). Ponravy působily škody jen v omezené míře. V roce 2021 již rojení neprobíhalo a v České republice působily větší škody opět ponravy, a to na ploše celkem 187 ha (Knížek a Liška 2022). Další rojení chroustů rodu *Melolontha* je očekáváno v roce 2023.

Nejohroženější stanoviště jsou obzvláště 1-2leté kultury na volných pasekách 1-2 roky po rojení (Švestka a Drápela 2012). Toto ohrožení trvá přibližně do 10let věku porostu, kdy se odhaduje, že k uhynutí stromku stačí 2-5 ponrav (Záruba, 1956; Švestka & Kapitola, 2003). Podle Kněžík & Liška (2022) jsou ponravami *M. hippocastani* nejvíce ohrožené teplé oblasti Čech a Moravy zejména pak východní Polabí a dolní Pomoraví, kde se chroust běžně přemnožuje. Na takovýchto místech, která jsou trvale zatížena přítomností chroustů, ať už larvami či dospělci, není možné dlouhodobě založit kultury (Knížek a Liška 2020).

3.6 Integrovaná ochrana rostlin proti chroustům rodu *Melolontha*

V rámci integrované ochrany rostlin je cílem snížení množství škůdce pod takzvaný práh hospodářské škodlivosti (Kula 2021). V současné době je k dosažení zmíněného cíle preferováno využití co nejšetrnějších prostředků k životnímu prostředí. Při boji se škůdcem se bere v potaz ekosystém jako celek, a nikoliv pouze škůdce tak, aby nebyly poškozeny

ekosystémové vazby. Nejčastěji je k tomuto využíváno insekticidů v různých formách či posílení přítomnosti přirozených parazitů nebo parazitoidů. V České republice je povinné se řídit předepsanými zásadami o integrované ochraně rostlin.

Povolené prostředky a způsoby ochrany jsou definovány směrnicí Evropského parlamentu 2009/128/ES, jež stanovuje rámec pro činnost Společenství za účelem udržitelného používání pesticidů (nařízení č. 1107/2009) (Zahradník 2014). V České republice se obsah této směrnice stala součástí zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči. Kapitola o integrované ochraně rostlin byla do zmíněného zákona dodána v rámci novely tohoto zákona č. 199/2012 Sb., která byla ještě doplněna o vyhlášku č. 205/2012 Sb. o obecných zásadách integrované ochrany rostlin. Vyhláška vešla v platnost 1. ledna 2014.

3.6.1 Monitoring

Základní součástí integrované ochrany rostlin je monitoring přítomnosti škůdce. V případě imag chroustů rodu *Melolontha* toho lze docílit kupříkladu světelnými lapači, kopáním půdních sond v období přezimování v zemi (srpen až duben), sklepávání chroustů z korun stromu a chytání je do plachet či použitím pastí s feromonovou návnadou (Kula 2021). Nutno dodat, že feromonovými návnadami je možné zachytit primárně samice (Huiting et al. 2006). Navíc se nejedná o tak významné množství, aby se tento postup uplatnil při snižování populace chroustů. Odchyt dospělců je důležitý, pokud je potřeba zjistit období, kdy je vhodné ošetřit žíroviště (Zahradník 2014). Tento časový úsek se pohybuje mezi 3 až 10 dny, ve chvíli, kdy již nalétly samice, ale ještě neodlétly. Vhodným načasováním zásahu proti samicím se zamezí i škodám způsobeným ponravami. Obvykle se tak uskutečňuje na začátku května.

Pro lesní školy, holiny určené k zalesnění nebo jiná vysoce ohrožená místa je ale hlavní monitoring přítomnosti ponrav v půdě (Kula 2021). Toho lze docílit například kopání kontrolních sond na místech, kde je obvyklý jejich výskyt (Zahradník 2014). Jejich velikost a počet závisí na stanovišti, vegetaci, době realizované kontroly a na zákonech každého státu, který určuje kritické počty jedinců škůdce zpravidla na metr čtvereční (Kula 2021). Zahradník, (2014) doporučuje vyhloubit takový počet sond, aby při rovnoměrném rozmístění po zkoumané ploše byla zachycena celá ohrožená oblast. Přičemž minimální počet sond by měl být alespoň 5 sond na hektar. Dále specifikuje i rozměry jednotlivých sond, tedy 1x1x0,5 m. Podobné rozměry uvádí i Muška, (1993) , v jeho případě 1x1x0,6 m. Ideální čas pro použití tohoto druhu kontroly je v případě *M. hippocastani* období srpen až září. V pozdějších termínech je pro získání dobře vypovídajících výsledků zvětšit hloubku sond a to na 0,7 až 1 m

(Zahradník 2014). Kula (2018) stanovil kritické počty průměrné abundance na metr čtvereční dle jednotlivých instarů ponrav na: 2 ponravy 1. instaru, 1 ponrava 2. instaru, 0,5 ponravy 3. instaru.

3.6.2 Možnosti ochrany rostlin

Jednou z možností, jak ochránit sazenice před ponravami chroustů *Melolontha*, je před sadbou provedení hloubkové orby ohrožené půdy do hloubky alespoň 20-30 cm, ale spíše 0,5 m (Zahradník 2014). Tento způsob sebou ale nese nevýhodu v podobě výrazného narušení ekosystému. Další preventivním opatřením může být využití možnosti odkladu zalesnění. Díky tomu lze naplánovat výsadbu na rok rojení, takže velké množství ponrav 3. instaru již v zemi nebude přítomna. Zahradník, (2014) také doporučuje intenzivně nelikvidovat v místě sadby buřeň, protože ponravy často dají přednost kořenovému systému bylin před kořeny stromků jakožto zdroji potravy. Posledním preventivním doporučením je zvažování podrostního způsobu hospodaření na ponravami ohrožených stanovištích. V případě lesních školek je možné využití sítí s jemnými oky. Ty lze v období rojení pokládat na podklad stanoviště a tím zamezit zaprvé tomu, aby samice ze země vylezly a vykovávaly úživný žír a zadruhé přilétajícím samicím, aby do země nakladly vajíčka.

Pro chemickou obranu proti chroustům a jejich ponravám je možno využít pouze přípravky, která jsou oficiálně schválené Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ). Tento způsob ochrany je ale velmi výjimečný, a to pomocí letecké aplikace látky, kdy cílem je zabránit samicím naklást vajíčka (Zahradník 2014). Pro použití tohoto způsobu je navíc potřeba povolení ÚKZÚZ, a to pouze v kritických situacích, kdy je škůdcem ohrožen celý ekosystém. Zahradník (2014) tento postup doporučuje pouze pro ošetření okraje porostu do hloubky 50-100 m.

3.7 Biologický boj

Přírozenou mortalitu chroustů ovlivňuje hned několik abiotických i biotických faktorů. Pro imaga mohou být nebezpečné například v období před rojením náhlé mrazy, během kterých přeruší žír a shlukují se k sobě (Kula 2021). To může přispět k jejich mortalitě, protože tak ztratí čas při regeneračním žíru. Dále se o redukci dospělé populace chroustů zasluhují i ostatní živočichové, jako například sýček obecný (Hámori et al. 2017). Dále jsou jako predátoři uváděni špačci, havrani, lelek lesní z ptáků a černá zvěř, rejsci nebo netopýři ze savců (Kula 2021). Nutno podotknout, že na populaci *M. hippocastani* nemají příliš velký vliv.

V případě ponrav je jedním z hlavních ohrožujících faktorů sucho (Kula 2021). Jednak z důvodu ztíženého svlékání kůže a dále kvůli nutnosti zahrabání se do větší hloubky. Tím se ponrava potencionálně vzdaluje od kořenů. Mezi významnější biotické faktory se řadí mykózy a virózy společně s parazitoidy.

3.7.1 Entomopatogenní houby

Studovaná možnost biologického boje s *M. hippocastani* je využití entomopatogenních hub (Niemczyk et al. 2019). Jedním z rodů takových hub je rod *Beauveria* popsáný v roce 1912, které jsou považovány za hlavním patogenem chroustů (Paul Vuillemin, 1912 (Trzebitzky, 1996)). Dvěma stěžejními zástupci jsou v tomto případě



Obr. 5 *Beauveria bassiana* - hyfy s konidiami

Převzato z <https://www.indiamart.com/proddetail/beauveria-bassiana-21650325633.html>

Beauveria brongniartii Sacc. 1892 a *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., Bull. Soc. (1912), které jsou vřecovýtrusné (Ascomycota) houby, řazeny do podkmenu Pezizomycotina, řádu Hypocreales čeledi Cordycipitaceae (viz. index fungorum 2023) (Obr. 5). Jsou schopny překonat kutikulu hostitele pomocí kombinace mechanických sil a enzymů, jako například lipáza nebo chitináza, které při klíčení konidií uvolňují (Lung a Strasser 2000). Houba následně, která se úspěšně dostane do hostitelského organismu zabráni jeho příjmu potravy společně s vypouštěním toxinu a tím hostitele usmrtí (Boucias et al. 1994). Proti chroustům byla, primárně testovaná *B. brongniartii*, z velké části i kvůli tomu, že byla na chroustech rodu *Melolontha* nalezena ve velkém množství evropských zemí a na všech instarech (Blaisinger 1988; Dolci et al. 2006; Keller 1988; Maass 2002). V některých zemích je dokonce schválena jako oficiální bioinsekticid (Keller 2000). V tomto případě se využívalo jako nosiče houby zrna ječmene jakožto obrany proti larvám chroustů (Aregger-Zavadil 1992). Při aplikaci ošetřeného *B. brongniartii* ječmene proti larvám tohoto brouka, bylo pro účinné použití stanoveno množství 40 kg/ha (Keller a Schweizer 2001). Efektivita ochrany je ale závislá jednak na půdních podmínkách, ročním úhrnem srážek a teplotě (Dolci et al. 2006). Dalším faktorem ovlivňující schopnost růstu těchto hub se prokázalo být pH substrátu, do kterého byly uloženy.

Například *B. bassiana* vyhovuje pH půdy 8-8.5 (Quesada-Moraga et al. 2007). *B. brongniartii* zase vykazovala největší efekt při pH 6,8 (Sierpinska 2009). Jako nosič hub rodu *Beauveria* byla také využita koule porostlá houbou vyrobená ze směsi mouky, cereálií a slepičích vajec (Lalík et al. 2021). V tomto případě byla testována pouze na druhu *Hylobius abietis* Linnaeus, (1758). Ideální období pro aplikaci entomopatogenních hub pro ochranu rostlin, bylo doporučeno jaro či léto z důvodu vyšších průměrných teplot v těchto obdobích, ale preferovanější je aplikace na jaře, kvůli vyšší vlhkosti (Kessler a Keller 2003; Maass 2002). Konkrétně v případě *B. brongniartii* byla zjištěna přímá návaznost na přítomnost ponrav *Melolontha melolontha* Fabricius, kdy v případě absence larvy je houba redukována až na 10 % (Kessler et al. 2004). Pokud jsou ale larvy v okolí houby přítomné, je možné tímto způsobem jejich populaci regulovat až po dobu 10 let po aplikaci, protože *Beauveria* je schopna snáze přežít s opakujícím se životním cyklem. Spory je možné taky aplikovat na velké plochy letecky (Boucias et al. 1994). Výhodou této metody, bylo zmenšení plochy těžce poškozených lesů, ale na druhou stranu se zvětšilo poškození mimo ošetřené plochy. Ošetření se projevilo hlavně až na dalších generacích dospělců *Melolontha*, a proto se spíše preferuje ošetření v zemi přímo proti larvám (Jung et al. 2005). Směs s obsahem spor *B. brongniartii* byla testována proti ponravám chroustů i v lesní školce, kde dosáhla úspěšnosti 75 % i bez přidání jakékoliv dávky insekticidu (Ciornei a Andrei 2011).

Jedním z komerčně prodávaných přípravků pro biologický boj s chrousty rodu *Melolontha* je přípravek Melocont® či Beauveria-Schweizer® (Mayerhofer et al. 2015). V obou případech se jedná o produkty, obsahující sterilizovaná jádra ječmene kolonizované druhem *B. brongniartii*. Tyto produkty jsou primárně aplikovány na povrchu či pod povrchem země. Dalšími přípravky na podobné bázi jsou například Betel® využívaný ve Francii, Engerlingspilz® používaný ve Švýcarsku (Strasser 2000).

Alternativou k využití entomopatogenních hub může být využití některého z jiných přirozených patogenů či parazitoidů chroustů rodu *Melolontha*. Příkladem mohou být entomopatogenní Nematoda jako například hlístovky rodu *Steinernema* či potencionálně hlístice *Heterorhabditis downesi* Stock, Griffin & Burnell, (2002) (Zahradník 2014; Kula 2021).

4 Metodika

4.1 Odběr ponrav

Ponravy chrousta *Melolontha hippocastani* byly nasbírány dne 1.4. 2022. Sběr se uskutečnil poblíž obce Býšť v okrese Pardubice. Zde byly v hloubce od 0,5 m do 1,5 m pomocí ručních nástrojů (srdcová lopata, krumpáč) ponravy vyhledávány a odebírány. V blízkém okolí stanovišť se nacházel smíšený les se druhovou skladbou smrk, borovice, dub. Podloží bylo písčité do hloubky větší než 1,5 m.

Sběr probíhal na dvou stanovištích označených písmeny A a B.

- Stanoviště A (GPS 50.144087, 15.882988) bylo zalesněno sazenicemi druhu *P. sylvestris* a oploceno. Nacházely se zde také mladé smrky a nálet dubu. V tomto místě bylo nalezeno celkem 58 ponrav v druhém instaru.
- Stanoviště B (GPS 50.144015, 15.882575) nebylo zalesněno, ale bylo oploceno. Na oplocené ploše byly ponechány 2 stromy pro přirozené zalesnění. Zde bylo nalezeno 64 ponrav ve druhém instaru. Nalezeny byly převážně v místech pod zbylými kořeny pařezů vytěžených stromů.

Z této lokality bylo také odebráno 140 litrů písku pro vytvoření směsi s obsahem původního podloží.

4.2 Začátek experimentu

Pro experiment bylo vybráno místo ve fóliovníku, který se nachází v Kostececi nad Černými lesy, Truba 839 v areálu arboreta Fakulty Lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze. Jako sadební materiál byly zvoleny dvouleté prosto kořenné sazenice *P. sylvestris*.

Substrát pro sazenice byl namíchan v poměru 1 část zeminy, 5 částí písku, 1 část písku z místa odběru. Za použití míchačky na beton bylo zajištěno důkladné promíchání substrátové směsi. Na dno 5-ti litrových květináčů byl umístěn opad (dubové listí a borové jehlice), aby se snížila pravděpodobnost, že se ponrava prohrabe a vypadne z květináče spodními otvory. Následně byly květináče naplněny namíchaným substrátem do poloviny jejich kapacity. Poté do nich byly vloženy prosto-kořenné sazenice *P. sylvestris*. V průběhu sadby byly měřeny rozměry sazenic (tloušťka kmínku, výška, hmotnost) (Tab.1).

Celkem bylo vysazeno 196 sazenic *P. sylvestris*. Sazenice byly rozděleny do 5 skupin:

- 1) K - Kontrolní rostliny - pouze sazenice
- 2) KP - Kontrolní rostliny s přidanou jednou ponravou
- 3) H - Hydrogel – sazenice s roztokem hydrogelu přidaného pod kořen
- 4) B - Sazenice s roztokem hydrogelu namíchaném spolu s konidii *B. bassiana* a jednou ponravou
- 5) G - Sazenice s přidaným kulatým nosičem s houbou *B. bassiana* a jednou ponravou

Ad. 1) Do 25 květináčů se sazenicemi označených kódem KP, byly vloženy ponravky, které byly umístěny 2 cm od kmínku do hloubky 4 cm. Ponravám byly předem změřeny rozměry tělních částí, tedy hlavová schránka a jejich celá délka.

Ad. 2) Dále bylo zasazeno 50 sazenic z kategorie H, kam bylo před umístěním sazenice do substrátu pod kořeny nalito 200 ml hydrogelu (Obr. 6) čistého roztoku.

Ad. 3) Stejným způsobem bylo zasazeno i 50 sazenic kategorie B. Zde bylo využito 70 ml namíchaného hydrogelu s konidii *B. bassiana* a 130 ml čistého roztoku s hydrogelem.



Obr. 6 Mísa, obsahující 50 g krystalického hydrogelu
Autor fotografie: David Novák

Pro extrakci konidií z hub, vypěstovaných na Petriho miskách, bylo namícháno 0,05% roztok Tweenu (3 l destilované vody; přidáno 1,5 ml Tween 20). Do nádoby o objemu 5 l s roztokem bylo vloženo celkem 20 kusů Sabouraud dextrose agar porostlého houbou *B. bassiana* (kultivace proběhla na LOS Banská Štiavnica). Směs byla důkladně promíchána a protřepána, aby v roztoku zůstalo co největší množství konidií. Následně byl obsah nádoby pročištěn přes filtr složený ze síta a lékařské gázy, který zachytil veškerý agar a zbytky hyf. Dále byl čistý roztok 4krát naředěn destilovanou vodou z důvodu usnadnění počtů konidií. Ze zředěného roztoku se odebraly dva vzorky. Poté bylo na Bürkerově komůrce, na dvou čtvercových polích pro každý vzorek, spočítáno množství konidií. Dále byl spočítán průměrný počet konidií na vzorek a koncentrace celého roztoku.

Výpočet koncentrace:

Celkový počet konidií:

Vzorek 1

1. 117 konidií
2. 103 konidií

Vzorek 2

1. 119 konidií
2. 100 konidií

$$(117 + 103 + 119 + 100) = 439$$

$$\text{Průměrný počet konidií: } 439/4 = 109,75$$

$$\text{Průměrný počet konidií v 1ml: } 439 * 250\ 000 = 109750000$$

Průměrný počet konidií na pole byl 109,75. Konečná koncentrace spor v 1 ml byla stanovena na $1,1 \cdot 10^8$, což je dostatečná koncentrace pro mortalitu hmyzu (koncentrace má být vyšší než $1 \cdot 10^8$).

K této variantě sazenic byly také rovnou vloženy ponravy. I v tomto případě byly ponravy umístěny 2 cm od kmínku do hloubky 4 cm.

Ad. 4) Poslední varianta G obsahovala sazenice vysazené obdobným způsobem jako v předchozích případech, pouze s rozdílem, že namísto roztoku s hydrogelem se ke kořenům vkládal kulatý nosič porostlý houbou *B. bassiana* a ponrava.

Všechny květináče byly umístěny na kovových roštích v různých místech skleníku. Připravené rostliny byly zalévány každý den v 18:00.

Vitalita sazenic byla hodnocena každých 14 dnů na stupnici od 1 do 4 kdy:

- 1 = zdravá
- 2 = lehké znaky žloutnutí jehlic
- 3 = výrazně žloutnoucí jehlice
- 4 = mrtvá rostlina

Kontroly vitality probíhaly v období od 2. dubna 2022 do 2. září 2022. Při každé návštěvě fóliovníku byla pořizována fotodokumentace celé plochy po jednotlivých stolech. V případě, že jedinec vykazoval viditelné znaky snížené vitality (tedy kategorie 2-4), bylo pořizeno detailní foto takového jedince.

4.3 Ukončení experimentu

Experiment byl ukončen 13. září 2022, kdy bylo provedeno konečné měření dřevin (výška, tloušťka, hmotnost) a odběr vzorků (jehličí ze špičky sazenice, vzorek kořenového systému). Odebírání vzorků předcházelo označení dvou sad, tedy 392 zkumavek o objemu 50 ml. Do každé zkumavky byl vložen malý papírový čtvereček o rozměru 1x1 cm s příslušným označením sazenice napsaným obyčejnou tužkou. Následně byly stromky vyjmuty z květináče i se substrátem odloženy na připravený valník. U kategorií KP, B a G byl důkladně prohledán veškerý obsah květináče pomocí síta, aby bylo možno zaznamenat, zda ponrava přežila či nikoliv. V případě nalezení larvy byly opět změřeny její rozměry, tedy délka těla a hlavová schránka. Dále byly sazenicím důkladně promyty kořeny ve vodě. Následovalo odebrání vzorků kořenů a jehlic (ze špičky). Zkumavky se vzorky byly umístěny do speciálních nádob s tekutým dusíkem. V těchto nádobách byly přepraveny do prostor Dřevařského pavilonu, Fakulty Lesnické a dřevařské, České zemědělské Univerzity v Praze, kde byly velmi opatrným způsobem z nádob vyjmuty. Vyjmuté zkumavky byly umístěny do mrazícího přístroje, který je schopen udržovat konstantní teplotu -80°C. Do laboratoře byly také převezeny všechny sazenice v dostatečně velké nádobě s vodou.

4.4 Měření kořenů v programu WinRHIZO

Každá sazenice byla označena příslušným kódem. Následně byl vybrané sazenici ustřižen kompletní kořenový systém, který byl pečlivě zbaven veškerých nečistot. Takto upravené kořeny byly vloženy do nádoby o velikosti 20x25 cm, naplněné destilovanou vodou. Jednotlivé části kořenů byly, rovnoměrně rozprostřeny po nádobě o kalibrovaných rozměrech. Dále byla nádoba umístěna na skener (EPSON Expression 10000XL) a naskenována do počítače. Po naskenování kořenů byla v programu WinRHIZO Pro 2016 označena oblast pro měření a program změřil a spočítal veškeré údaje, jako například plochu kořenů či délku kořenů. Tímto způsobem byly změřeny všechny sazenice. Voda v nádobě byla pravidelně měněna, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků, kvůli volně se pohybujícím částem, jež mohl počítač vyhodnotit jako kořen.

4.5 Homogenizace

Vzorky kořenů byly přeneseny ze zkumavky do vyčištěné a 70 % ethanolem vydezinfikované ocelové nádoby, do které byly přidány 3 ocelové kuličky. Poté byly tyto

nádobky vloženy do homogenizátoru. Zde probíhala homogenizace po 2 minutách při frekvenci 30 úderů za sekundu. Tento krok bylo u některých vzorků nutno opakovat dle potřeby, dokud prachová zrna z kořenů neodpovídala přibližně přesně požadované hrubosti. Vzorky byly vždy homogenizovány v párech. Upravený vzorek byl následně vysypán na čistý papír a usazené zbytky prachu byly z nádobky získány pomocí miniaturní laboratorní lžičky. Obsah nádobky byl následně přesypán do své zkumavky a předán k odebrání vzorku dle požadované váhy. Ocelové nádobky i kuličky byly vždy po homogenizaci vyčištěny 70 % ethanolem.

Homogenizované preparáty byly poté naváženy pomocí analytických vah do nádobek typu Eppendorf, a to na přibližně přesně 30 mg prachu s přesností na 1 mg. Z každé zkumavky byly takto připraveny 2 vzorky. Veškerý materiál byl následně skladován v mrazicím zařízení, schopném udržet konstantní teplotu -35°C .

V případě homogenizovaných jehlic bylo do nádobek typu Eppendorf naváženo po 50 mg prachu s přesností na 1 mg. V tomto případě se nedělala druhá kopie, ale připravily se dvě další 100 mg navážené s přesností na 0,1 mg. Jeden vzorek byl umístěn do nádoby typu Eppendorf a druhý do skleněné vialky, jež byl dále zalit 1 ml hexanu pro maximální zachování aromatických látek.

4.6 Extrakce cukrů

Pro zjištění počtu a druhů cukrů obsažených v homogenizovaných vzorcích kořenů sazenic bylo v první fázi, použito 1200 μl methanolu a 200 μl purifikované destilované vody jakožto extrakční roztok. Obě kapaliny byly odměřeny pomocí automatické pipety do nádobek typu Eppendorf, které obsahovaly navážené vzorky. Mezi pipetováním byly měněny špičky o vhodném objemu. Po dodání roztoku do nádobek byl obsah důkladně promíchán pomocí vortexu.

Připravené vzorky byly následně umístěny do thermoshakeru, kde byly míchány za stálé teploty 60°C . Po uplynutí 45 minut byla provedena centrifugace vzorků při rychlosti 13000 rotací za minutu do dobu 5 minut. Tímto vznikla kapalná a pevná fáze.

Dále byly vzorky vyjmuty z centrifugy a pomocí injekční stříkačky byla odsáta kapalná fáze. Ta byla přenesena do připravené skleněné vialky. Z vialky byly následně odebrány různé objemy kapaliny, jež byly ředěny purifikovanou destilovanou vodou v různých poměrech:

200 μl roztoku naředěno v poměru 1:7 (1400 μl vody)

50 μl roztoku naředěno v poměru 1:30 (1500 μl vody)

Tímto způsobem byly vytvořeny dva páry vzorků.

4.6.1 Analýza cukrů pomocí kapalinového chromatografu

Cukry byly analyzovány pomocí LC-qTOF-MS/MS. Tato analýza byla provedena na Agilent 1290 Infinity II párovaná s Agilent 6546 LC/MS QTOF system (Agilent, USA). Chromatografická separace byla provedena pomocí on Supel Co apHera NH2 Polymer column (150x2 mm, 5 μ m) při 30 °C. Jako mobilní fáze byl použit acetonitrile (A) ředěný purifikovanou destilovanou vodou (B). Gradient eluce byl proveden za počátečního poměru mobilní fáze 80:20 (A:B) v 0,5-13 min 55:45 (A:B) a v 14-15 min 80:20 (A:B) při rychlosti průtoku 0,2 mL *min⁻¹ (Madsen et al. 2015). Objem vstřikování byl nastaven na 1 μ L. Proces byl prováděn v negativním ionizačním módu. Parametry QTOF byly optimalizovány použitím standardů (sacharóza, mannitol, trehalóza). Optimalizace proběhla při: rozsah skenování 100-1000 m/z; teplota vysoušecího plynu, 280 °C; rychlost proudění mobilní fáze, 12,0 L/min; teplota mobilní fáze, 400 °C; kapilární napětí, 2,0 kV; fragmentor, 120 V; kolizní energie při 10, 20 a 40 eV. MS/MS data byla získána při rozmezí skenování 50-800 m/z. Měřeny byly dvě hmotnostní korekce: 112.9855 m/z a 922.0098 m/z. K získání dat byl následně použit software Agilent Mass Hunter Acquisition. Analýza dat byla provedena za použití software Quantitative Analysis 10.0 a Q-TOF Quantitative analysis.

4.7 Statistická analýza získaných dat

Terénní data byla zpracována do tabulek v programu MS Excel pro Microsoft 365. Statistická analýza a grafické zpracování získaných dat bylo provedeno v programu R (v. R-4.2.2) a TIBCO Software Inc. (testy normality, Kruskal-Wallisův test).

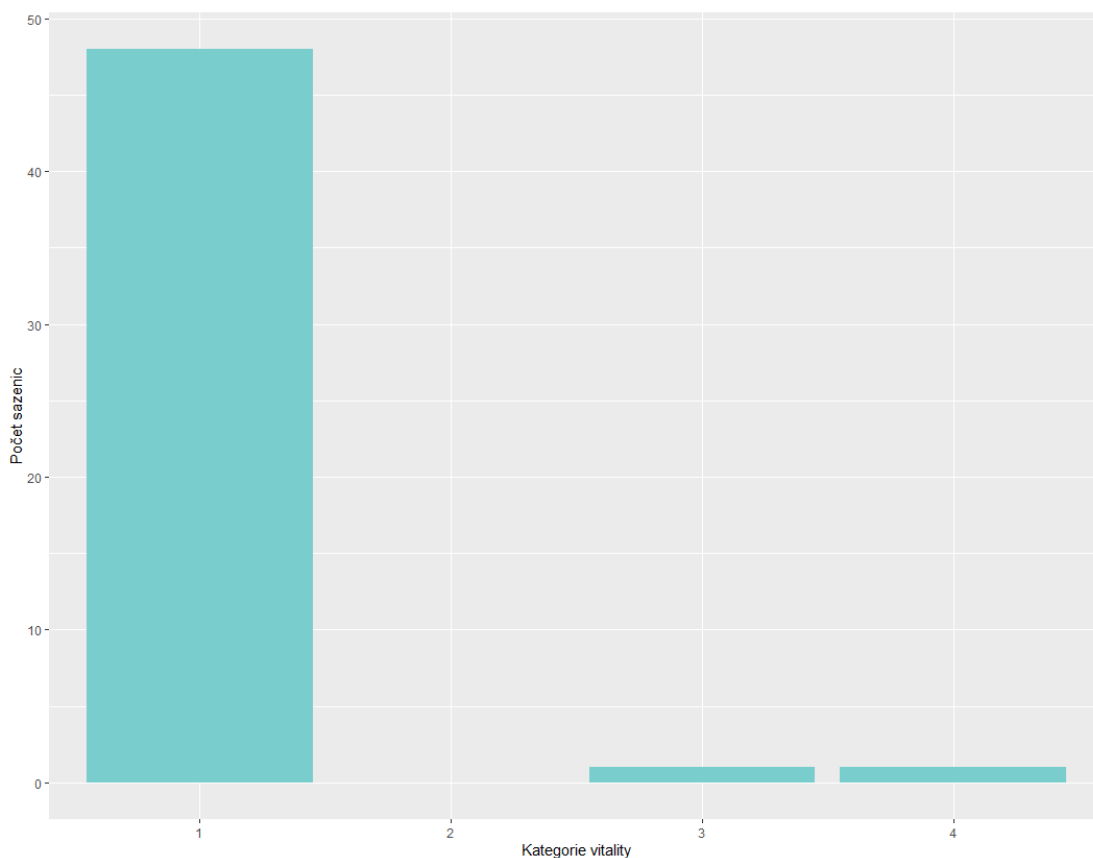
5 Výsledky

5.1 Měření ve fóliovníku

V září 13. 2022 při ukončení experimentu bylo vyhodnoceno 28 sazenic jako kategorie 4. Konkrétně se jednalo o:

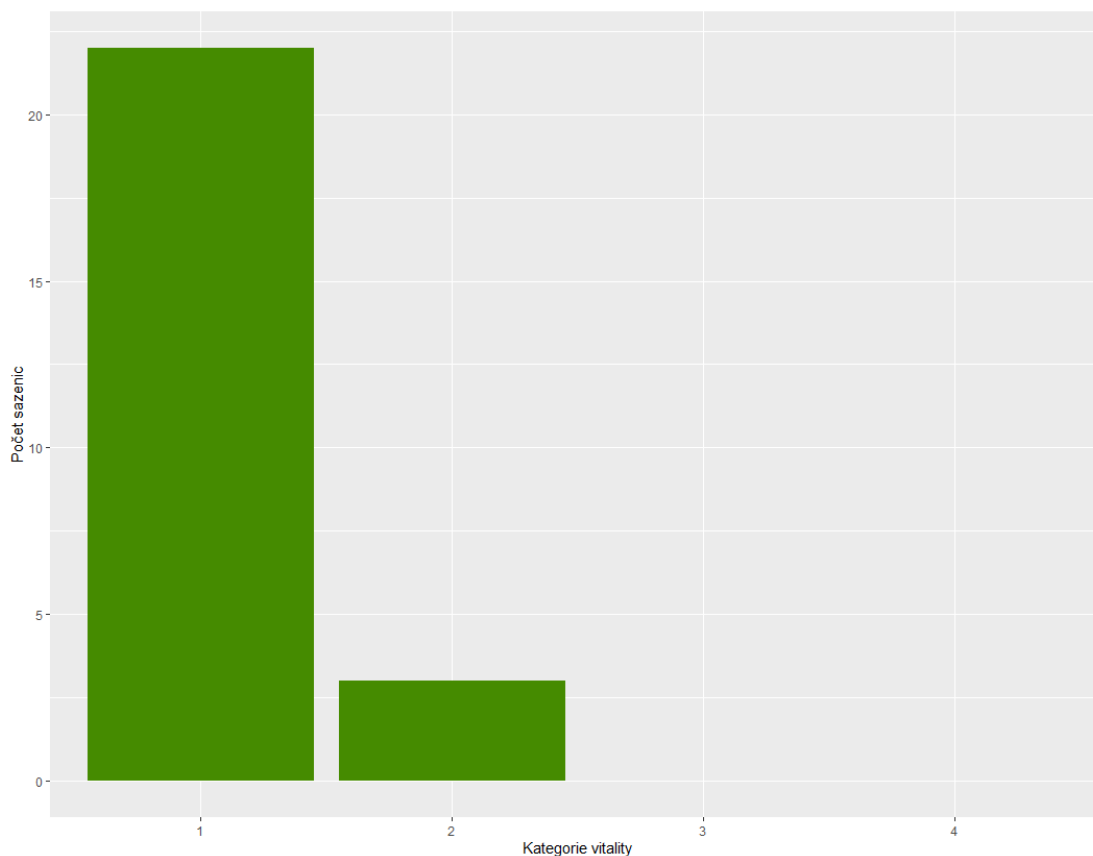
- K = 0 sazenic (0 %)
- KP = 6 sazenic (24 %)
- B = 7 sazenice (14 %)
- G = 14 sazenic (29,8 %)
- H = 1 sazenice (2 %)

Nejvyšší zastoupení nepoškozených sazenic bylo zaznamenáno u kategorie s hydrogelem a bez ponravy (H), jež činilo 48 kusů z 50, tedy 96 %. První ze zbylých dvou sazenic vykazovala známky zhoršeného stavu již při 3. kontrole. Její stav se následně zhoršil při 5. kontrole a byla umístěna do kategorie 3. Druhé sazenici byl zaznamenán zhoršený stav při 6. kontrole. V tomto případě byla sazenice při poslední, 11. kontrole, umístěna do kategorie 4 (Obr. 7).



Obr. 7 Srovnání vitality sazenic borovice lesní v kategorii H během experimentu v roce 2022

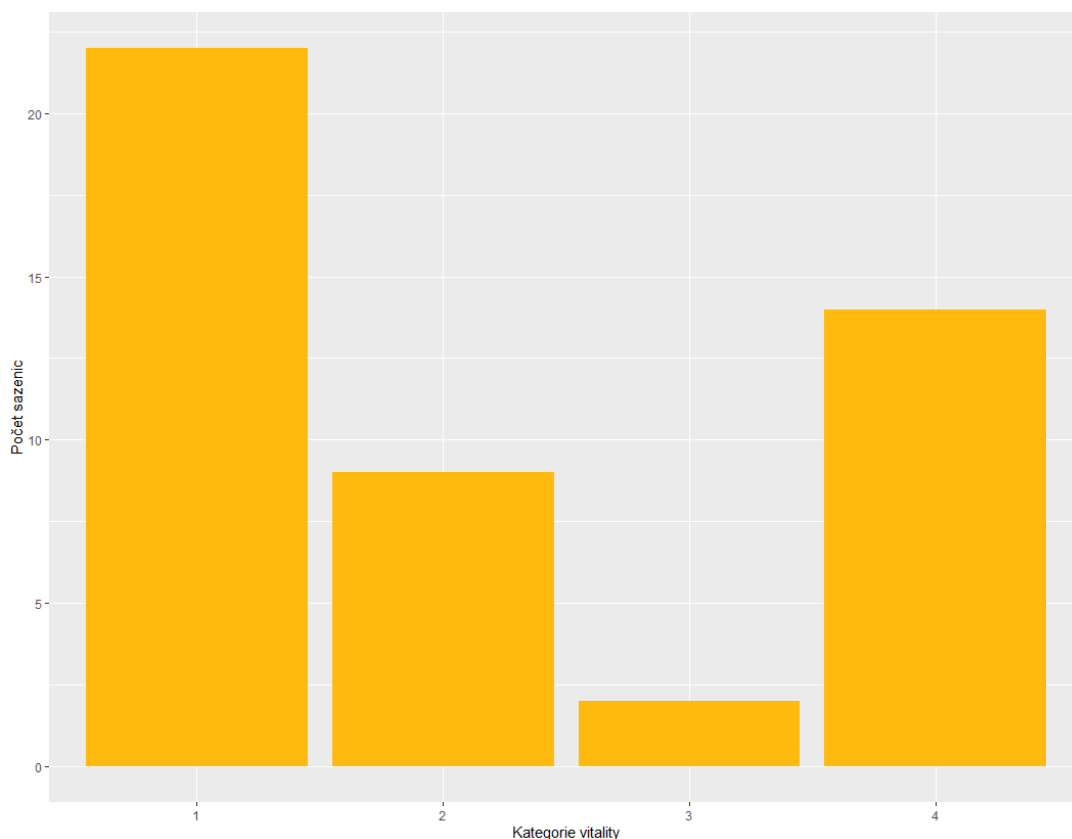
Dále bylo z 25 sazenic v kontrolní kategorii (K) 22 (88 %) vyhodnoceno jako kategorie 1. Vitalita posledních 3 sazenic spadala do kategorie 2. V žádném dalším případě nebyla zaznamenána sazenice s výrazněji zhoršeným stavem (Obr. 8).



Obr. 8 Srovnání vitality sazenic borovice lesní v kategorii K během experimentu v roce 2022

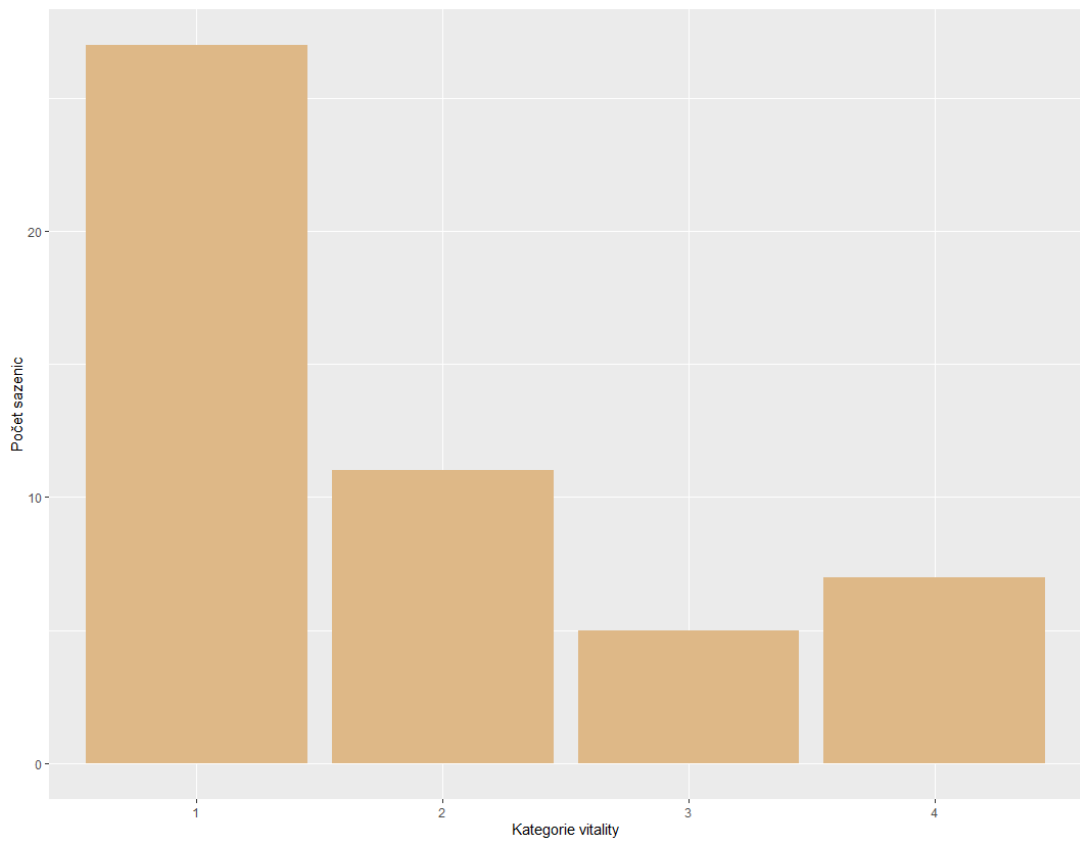
V kategorii B, tedy sazenice ošetřené hydrogelem s konidii *B. bassiana*, bylo na konci zařazeno 27 sazenic do kategorie 1 (54 %), 11 sazenic kategorie 2, 5 sazenic kategorie 3 a 7 mrtvých sazenic kategorie 4 (Obr. 9). Poprvé byly identifikovány známky snížené vitality během 7. kontroly. V tomto případě šlo o rychlé zhoršení stavu z 1. kategorie rovnou na 3. Při příští kontrole byly také nalezeny první 2 mrtvé sazenice. Další výrazný skok následoval v 9. kontrole, kde přibylo dalších 6 odumřelých sazenic. Ve dvou případech sazenice se stav sazenice rapidně zhoršil z kategorie 1 do kategorie 4 během jedné kontroly a dále v jednom případě z kategorie 2 do kategorie 4. Poslední sazenice nejevící známky života byla zaznamenána při poslední kontrole.

Ve variantě ošetřené nosičem porostlým houbou *B. bassiana* (G) bylo klasifikováno 22 sazenic jako kategorie 1 (46,8 %), 9 sazenic kategorie 2, 2 sazenice kategorie 3 a 14 kategorie 4 (Obr. 10). První zhoršení vitality bylo v této variantě zaznamenáno již při 3. kontrole, a to v případě jedné sazenice z kategorie 1 do kategorie 3. Následující týdny přibylo až 9 sazenic v kategorii 2. Až během 6. kontroly byla identifikována první mrtvá sazenice. Další výraznější skok přišel 8. kontrolu, kdy se počet mrtvých sazenic zvýšil na 5. Hodnocením na 9. kontrole byly přidány 4 další sazenice ve 4. kategorii. Na poslední kontrole se toto číslo zvětšilo na konečných 14 odumřelých sazenic. V této kategorii bylo náhlé zhoršení vitality z 1. kategorie na 4. zaznamenáno ve 3 případech a z 2. na 4. bylo zaznamenáno 2krát.

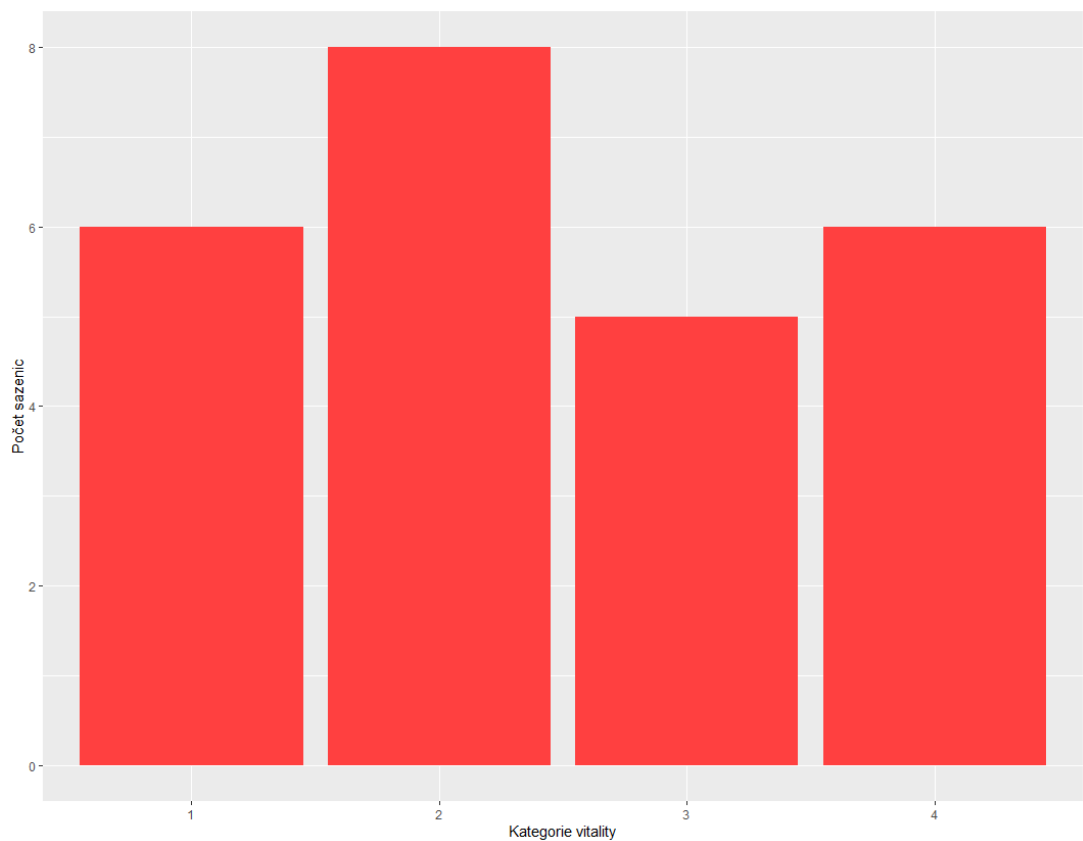


Obr. 9 Srovnání vitality sazenic borovice lesní v kategorii B během experimentu v roce 2022

Poslední byla kontrolní kategorií byla kategorie s ponravou a bez žádné formy ochrany (KP). Nakonec bylo nalezeno 6 plně vitálních sazenic kategorie 1 (24 %), 8 sazenic kategorie 2, 5 sazenic kategorie 3 a 6 mrtvých kategorie 4 (Obr. 11). Zde bylo první zhoršení vitality sazenice zaznamenáno při 3. kontrole z 1. do 2. kategorie. Osmá kontrola odhalila první 3 sazenice v kategorii 4. Toto číslo bylo navýšeno o jednu sazenici při 10. kontrole a následně při poslední 11. kontrole, kdy bylo dosaženo konečných 6 sazenic v kategorii 4. Náhlé zhoršení stavu sazenic zde bylo pozorováno v 1 případě z 1. na 4. kategorii a ve 3 případech z 2. na 4. kategorii.



Obr. 10 Srovnání vitality sazenic borovice lesní v kategorii G během experimentu v roce 2022



Obr. 11 Srovnání vitality sazenic borovice lesní v kategorii KP během experimentu v roce 2022

Průměrné hodnoty rozměrů sazenic na začátku i na konci experimentu byly spočítány a zaznamenány (Tab.1).

Tabulka 1 Průměrné hodnoty měření jednotlivých kategorií

Varianta	Začátek experimentu			Konec experimentu		
	Průměr (mm)	Výška (cm)	Hmotnost (g)	Průměr (mm)	Výška (cm)	Hmotnost (g)
K	4,95	30,60	14,76	6,23	45,00	43,96
KP	5,72	29,61	19,60	6,26	38,37	23,96
B	4,44	25,52	14,06	5,04	34,98	25,56
G	4,89	28,60	12,87	5,44	36,99	26,38
H	5,07	28,11	16,24	5,86	44,05	39,72

Během experimentu byly statisticky nejvýznamnější hmotnostní změny sazenic (Obr. 12). Průměrnou změnu hmotnosti za 5 měsíců v jednotlivých kategoriích lze vyjádřit procentuálně:

- K = + 197 %
- H = + 144,6 %
- G = + 105 %
- B = + 81,8 %
- KP = + 22,2 %

Mediány hodnot změny hmotnosti sazenic jednotlivých kategorií byly stanoveny na:

- K = 29 g
- H = 24,5 g
- G = 4 g
- B = 1,5 g
- KP = -1 g

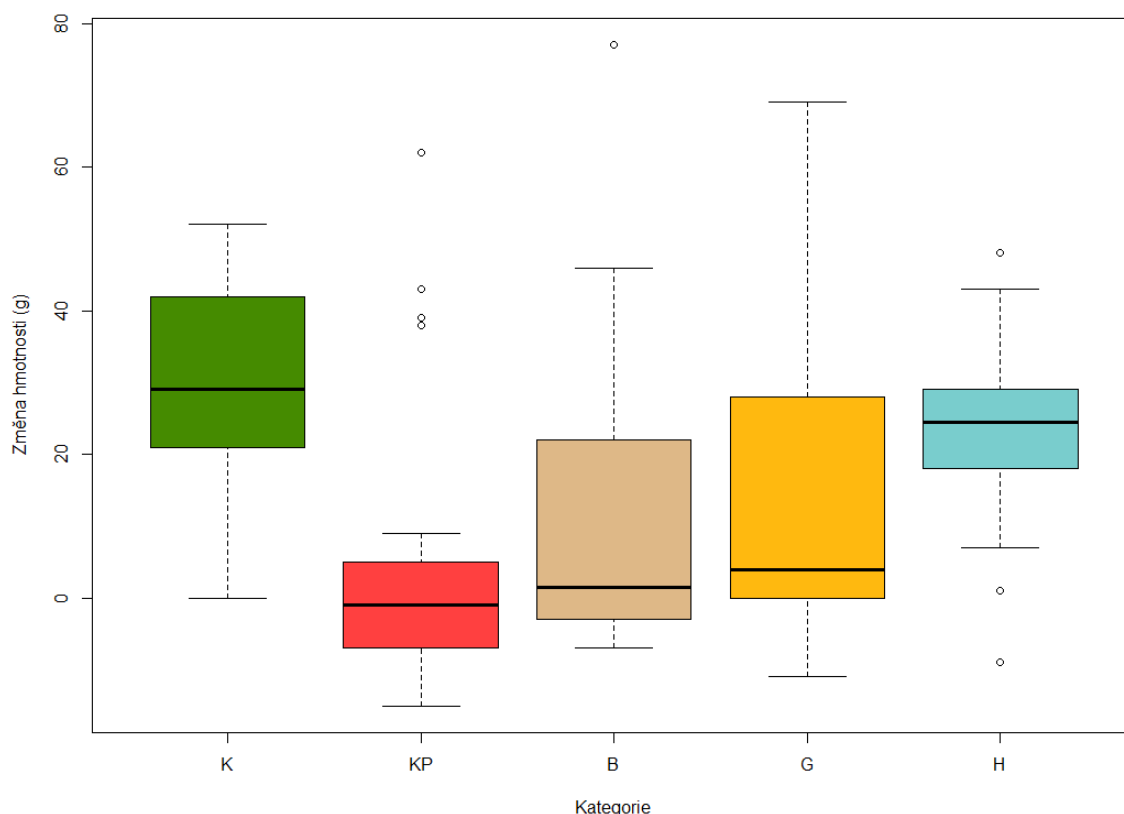
Kategorie K zaznamenala jak nejvyšší maximální hmotnostní přírůst (52 g) a spolu s kategorií H byly tyto změny významně vyšší ve srovnání s kategoriemi KP, B, G. Mezi K a H nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly (Tab. 2).

Tabulka 2 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test - změna hmotnosti sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		<0,0001	0,0002	0,0032	1
KP	<0,0001		0,9566	0,2486	<0,0001
B	0,0002	0,9566		1	0,0024
G	0,0032	0,2486	1		0,0381
H	1	<0,0001	0,0024	0,0381	

U většiny kategorií byly zaznamenány i ztráty na hmotnosti. V případě kategorie KP bylo nalezeno 13 takových sazenic. Kdy nejvyšší ztráta byla -15 g. Dále v kategorii B bylo 19 sazenic s maximální ztrátou -7 g, v kategorii G bylo 11 sazenic s maximální ztrátou -11 g a v kategorii H byla nalezena 1 sazenice, která jež ztratila -9 g. V kategorii K nebyla žádná sazenice, která by během experimentu přišla o část své hmotnosti.

Nejvyšší výškový přírůst byl zjištěn u kategorie H společně s kontrolními rostlinami (K) (Obr. 13).



Obr. 12 Srovnání změny hmotnosti sazenic borovice lesní během experimentu v roce 2022

Mediány hodnot výškového přírůstu jednotlivých kategorií:

- H = 16,4 cm
- K = 14,1 cm
- B = 6,9 cm
- G = 6,9 cm
- KP = 6,5 cm

Velikostí přírůstu se od kategorie K lišily statisticky pouze sazenice z kategorie G (Tab. 3).

Tabulka 3 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – výškový přírůst sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,1354	0,1497	0,0159	1
KP	0,1354		1	1	0,0005
B	0,1497	1		1	<0,0001
G	0,0159	1	1		<0,0001
H	1	0,0005	<0,0001	<0,0001	

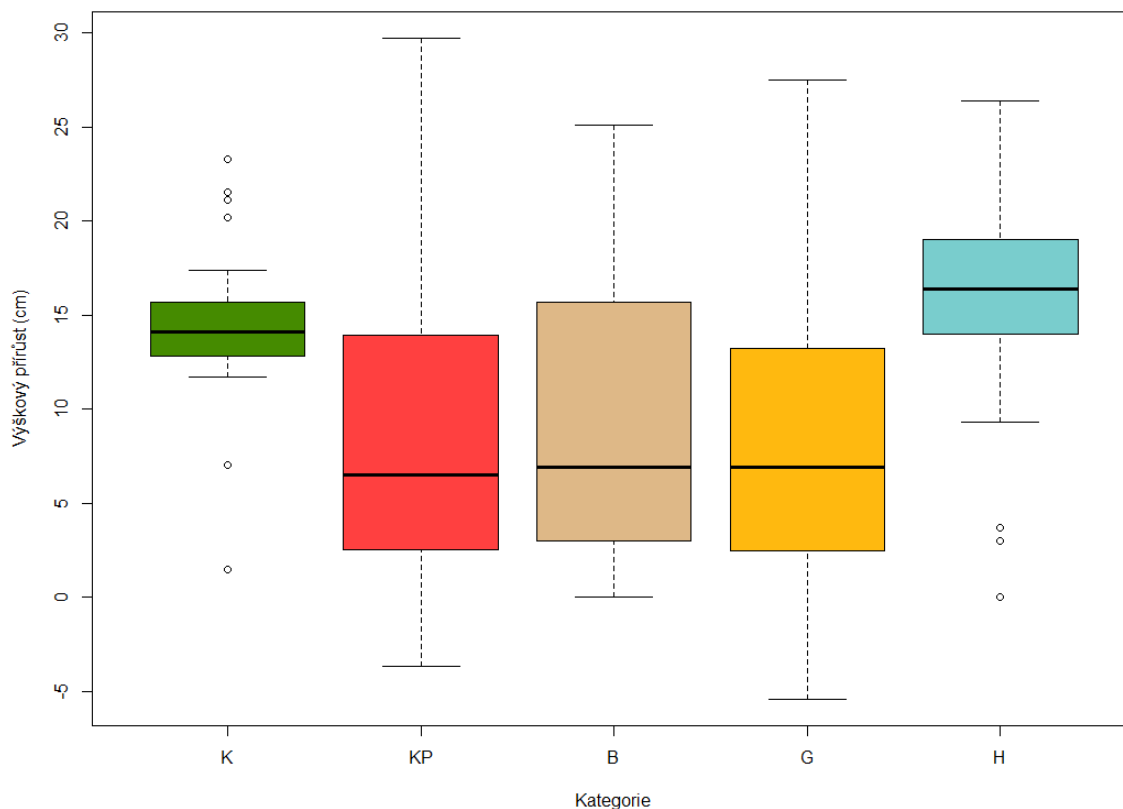
Vícenásobné porovnání hodnot také ukázalo, že mezi kategoriemi KP, B a G není statisticky významná odlišnost. V případě mediánů kategorií B a G dokonce není ani faktický rozdíl, protože jejich mediány jsou shodné tedy 6,9 cm.

Nejvýraznější byla statistická rozdílnost v případě kategorie H vůči kategoriím B, G a KP.

Data o tloušťkovém přírůstu prokázala pouze omezené rozdíly mezi jednotlivými skupinami (Obr. 14).

Mediány hodnot výškového přírůstu jednotlivých kategorií:

- K = 0,91 mm
- H = 0,59 mm
- B = 0,28 mm
- G = 0,23 mm
- KP = 0,19 mm

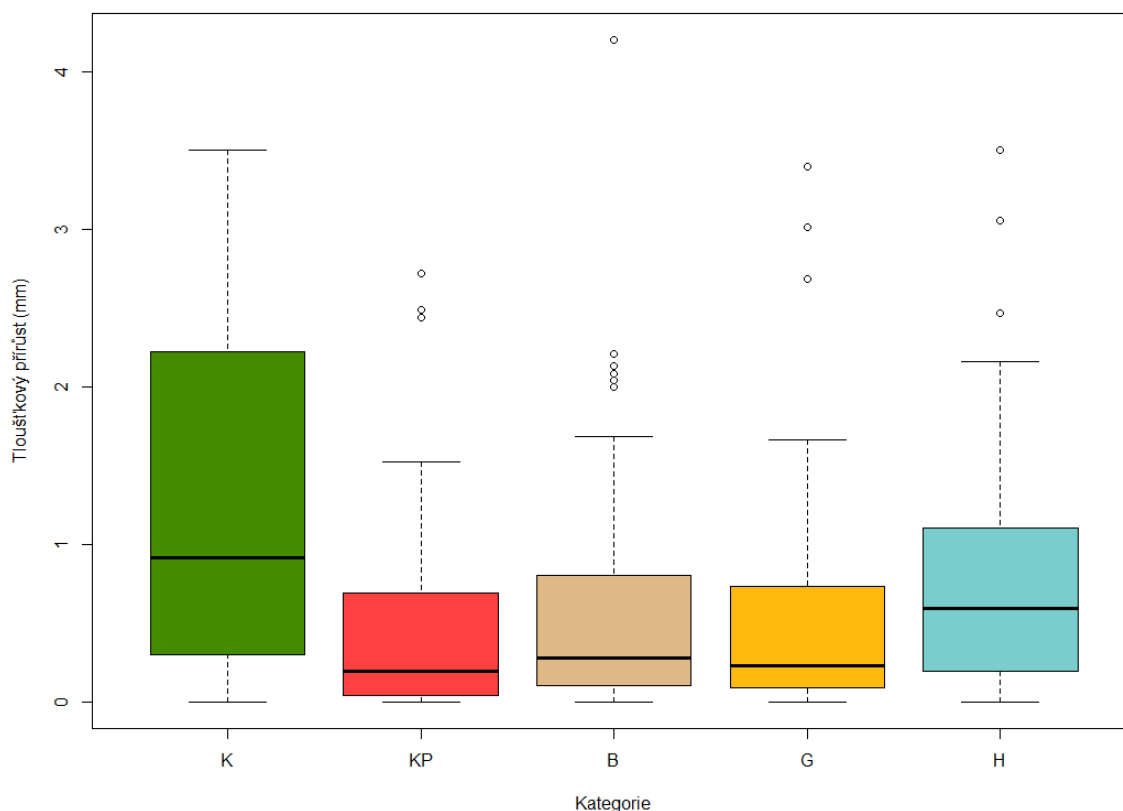


Obr. 13 Srovnání výškových přírůstů sazenic borovice lesní během experimentu v roce 2022

Mediány kategorií K a H sice naznačují jistý trend, ale ten se ve vícenásobném porovnání neprojevil jako příliš významný (Tab. 4). Rozdíly můžeme pozorovat v mezi kategorií K, KP a G. Ve všech ostatních případech ale nebyla prokázána statisticky významná odlišnost.

Tabulka 4 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – tloušťkový přírůst sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,0249	0,051	0,0104	1
KP	0,0249		1	1	0,2291
B	0,051	1		1	0,5261
G	0,0104	1	1		0,1145
H	1	0,2291	0,5261	0,1145	



Obr. 14 Srovnání tloušťkových přírůstů sazenic borovice lesní během experimentu v roce 2022

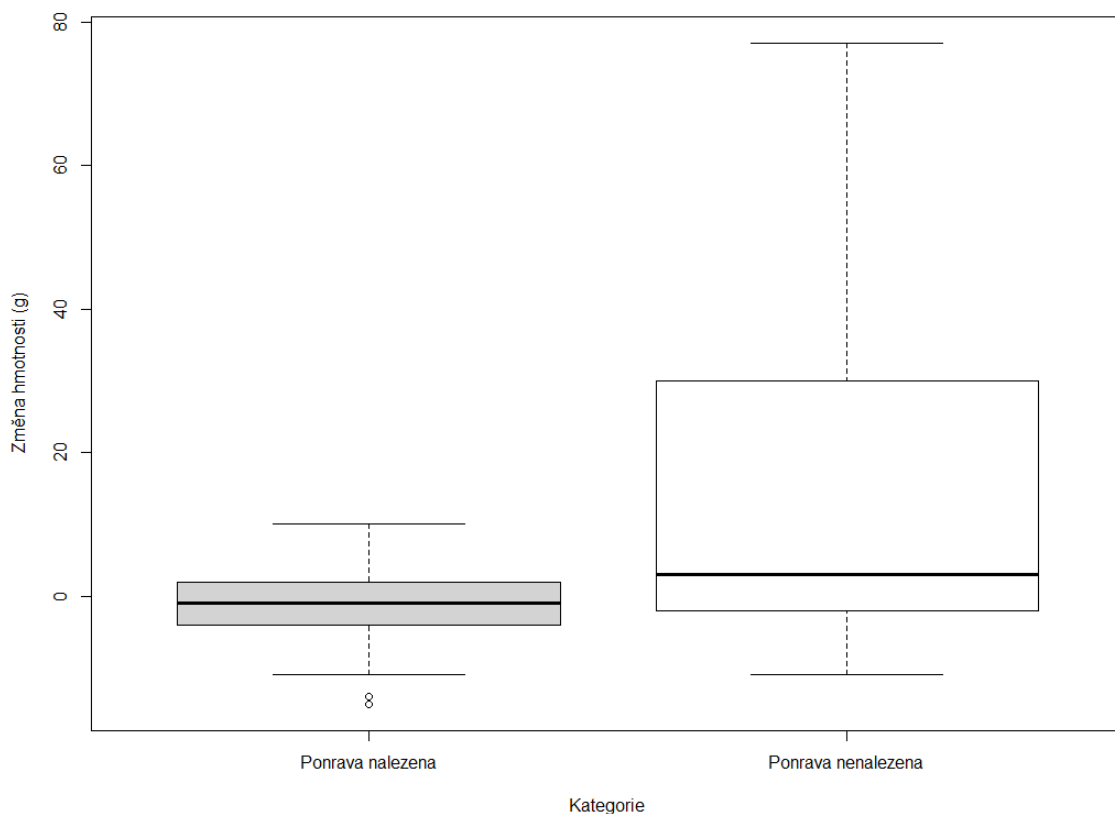
5.2 Faktor přítomnosti ponravy

Přítomnost ponravy, respektive nalezení ponravy, ve substrátu na konci experimentu u kategorií KP, B a G, byl prokázán jako faktor, který má vliv na změnu hmotnosti sazenice s hladinou významnosti $p = 0,0013$ (Kruskal-Wallisův test) (Obr. 15). Medián v případě, že ponrava nebyla nalezena byl stanoven na 3 g a v případě, že byla nalezena byl medián změny hmotnosti -1 g.

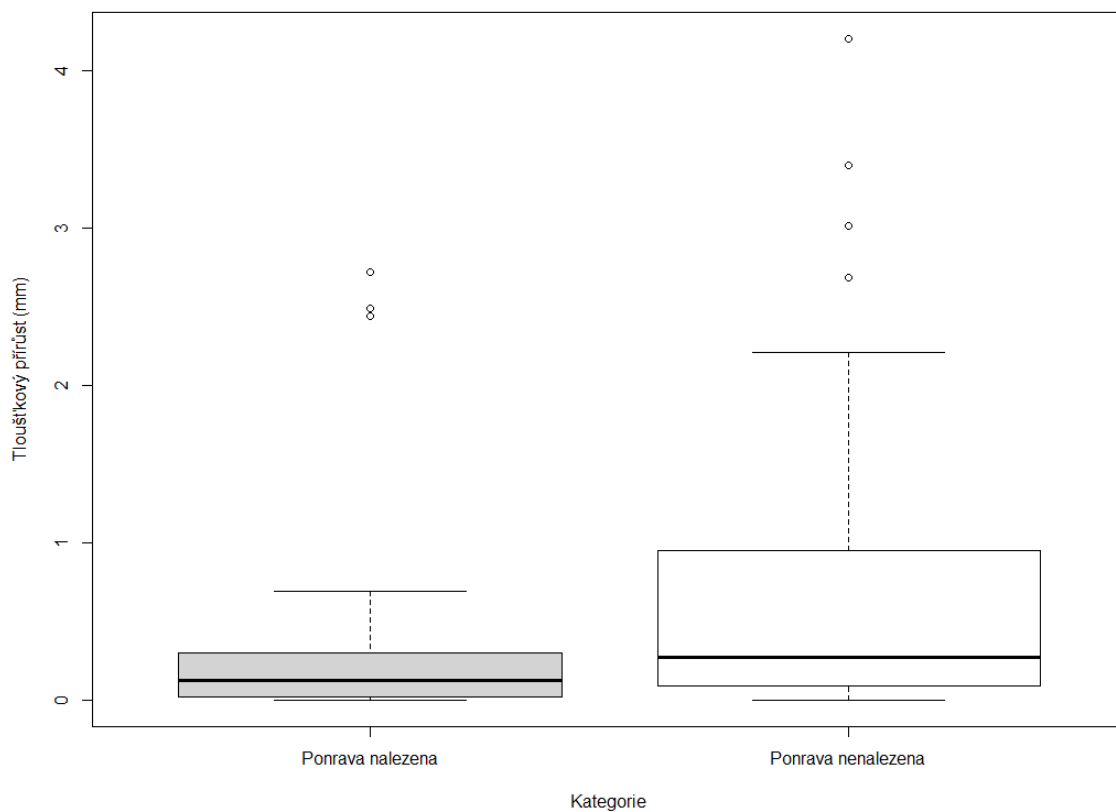
V případě tloušťkového přírůstu bylo možno pozorovat podobný, statistický průkazný trend, a to s hladinou významnosti $p = 0,0202$ (Kruskal-Wallisův test) (Obr. 16). Medián skupiny, kde byla ponrava nalezena byl 0,12 mm. Ve skupině, v níž nebyla ponrava nalezena byl medián spočítán na 0,27 mm.

Přírůst výšky se neprokázal být ovlivněn nalezením či nenalezením ponravy po skončení experimentu.

Žádný statisticky významný vliv nalezení ponrav nebyl prokázán ani v případě vitality.



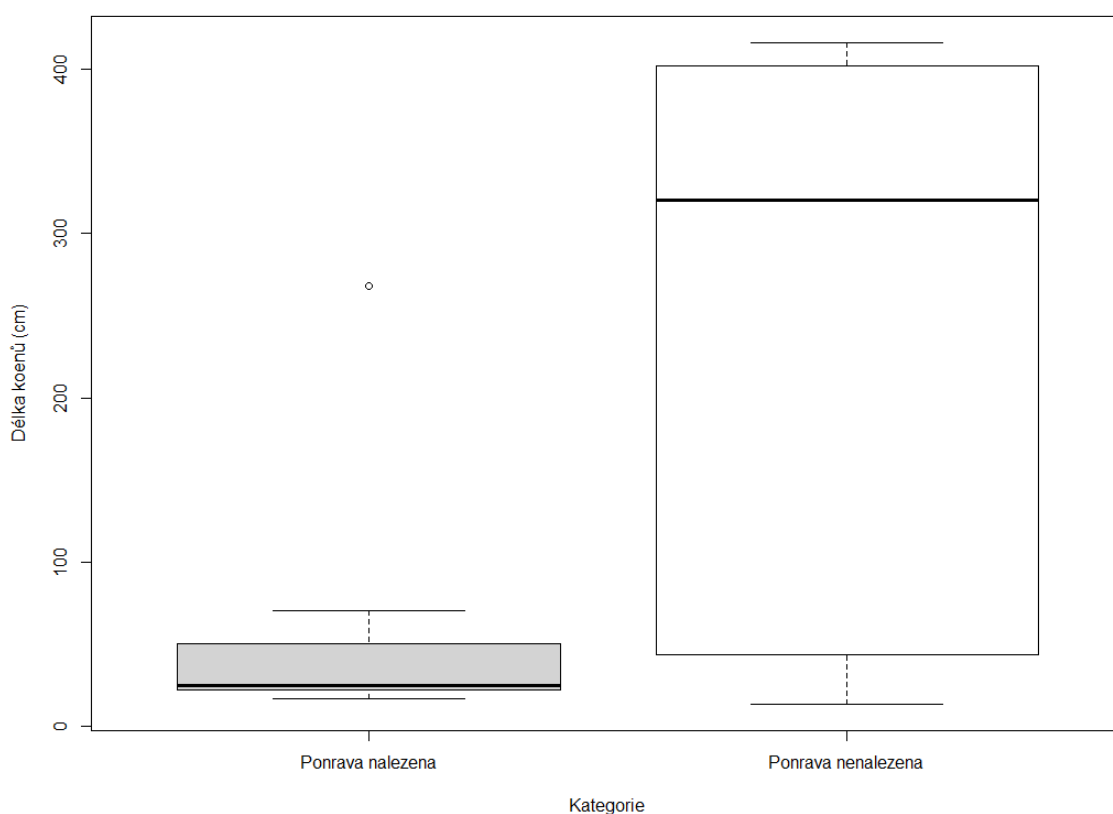
Obr. 15 Srovnání změny hmotnosti sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy na konci experimentu během experimentu 2022



Obr. 16 Srovnání tloušťkového přírůstu sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

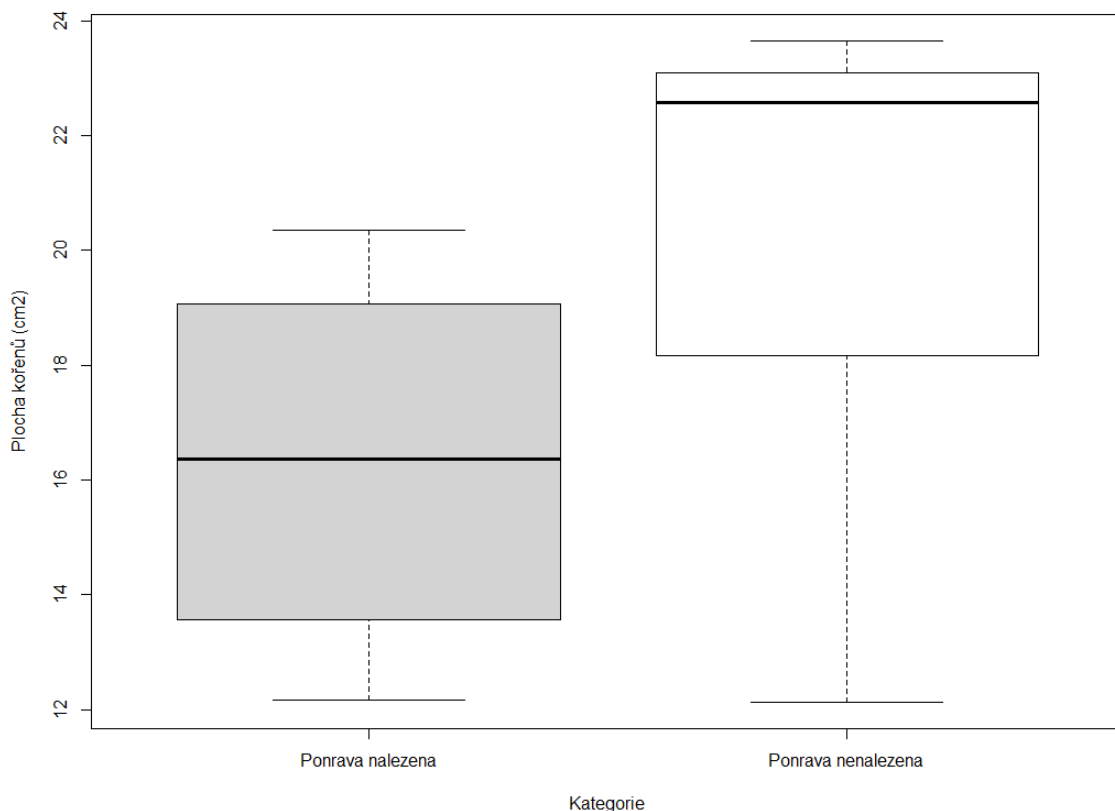
5.2.1 Vliv přítomnosti ponravy na kořenový systém

Analýzou dat získaných měření kořenových systému sazenic pomocí software Winrhizo byl objeven vliv přítomnosti ponravy na konci experimentu na celkovou délku kořenového systému nezávisle na kategorii, ze které sazenice pocházely (Obr. 17). Hladina významnosti tohoto vztahu byla stanovena na $p = 0,0077$. (Kruskal-Wallisův test) Medián kategorie s nalezenou ponravou byl 24,4 cm a u kategorie, kde nebyla ponrava nalezena 320,14 cm.



Obr. 17 Srovnání konečné celkové délky kořenů sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

Tento faktor se ukázal být významným i v případě celkové plochy kořenů na hladině významnosti $p = 0,0422$ (Kruskal-Wallisův test) (Obr. 18). Zde byl medián stanoven na 16,37 cm, pokud byla ponrava nalezena a 22,58 cm, pokud nebyla nalezena.



Obr. 18 Srovnání konečné celkové plochy kořenů sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

Dalším parametrem na základě dat je projektovaná plocha (projected area) kořínků na základě jejich délky na kořenovém systému. V případě kořínků do 0,5 cm byla nalezena odlišnost kategorie G s kategoriemi K a H (Tab. 5). Mezi kategoriemi K a H nebyl nalezen žádný rozdíl.

Ve skupině kořenů od délky 0,5 cm do 1 cm se prokázala statisticky významná odlišnost všech kategorií obsahující ponravu tedy KP, B a G od kategorií bez ponravy tedy K a H (Tab. 6). V rámci těchto dvou uskupení se jednotlivé kategorie od sebe nijak nelišily.

Tabulka 5 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – projektovaná plocha kořenů celkové délky do 0,5 cm sazenic borovice lesní dle kategorií v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,1605	0,1616	0,0493	1
KP	0,1605		1	1	0,0982
B	0,1616	1		1	0,0526
G	0,0493	1	1		0,0076
H	1	0,0982	0,0526	0,0076	

Tabulka 6 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – projektovaná plocha kořenů celkové délky od 0,5 cm do 1 cm sazenic borovice lesní dle kategorií v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,0062	0,035	0,0327	1
KP	0,0062		1	1	0,008
B	0,035	1		1	0,0383
G	0,0327	1	1		0,032
H	1	0,008	0,0383	0,032	

Rozdíly byly ještě nalezeny ve skupině kořenů od 1,5 cm do 2 cm (Tab. 7). Zde byl nalezen statisticky významný rozdíl pouze mezi kategorií KP a H.

Tabulka 7 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – projektovaná plocha kořenů celkové délky od 1,5 cm do 2 cm sazenic borovice lesní dle kategorií v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,2617	1	1	1
KP	0,2617		0,6334	1	0,0434
B	1	0,6334		1	1
G	1	1	1		0,1272
H	1	0,0434	1	0,1272	

Poslední skupinou, kde byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi byla plocha kořenů (surface area) o délce od 0,5 cm do 1 cm (Tab. 8).

Tabulka 8 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – plocha kořenů celkové délky od 0,5 cm do 1 cm sazenic borovice lesní dle kategorií v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,0082	0,0398	0,2763	1
KP	0,0082		1	0,5827	0,0265
B	0,0398	1		1	0,1255
G	0,2763	0,5827	1		1
H	1	0,0265	0,1255	1	

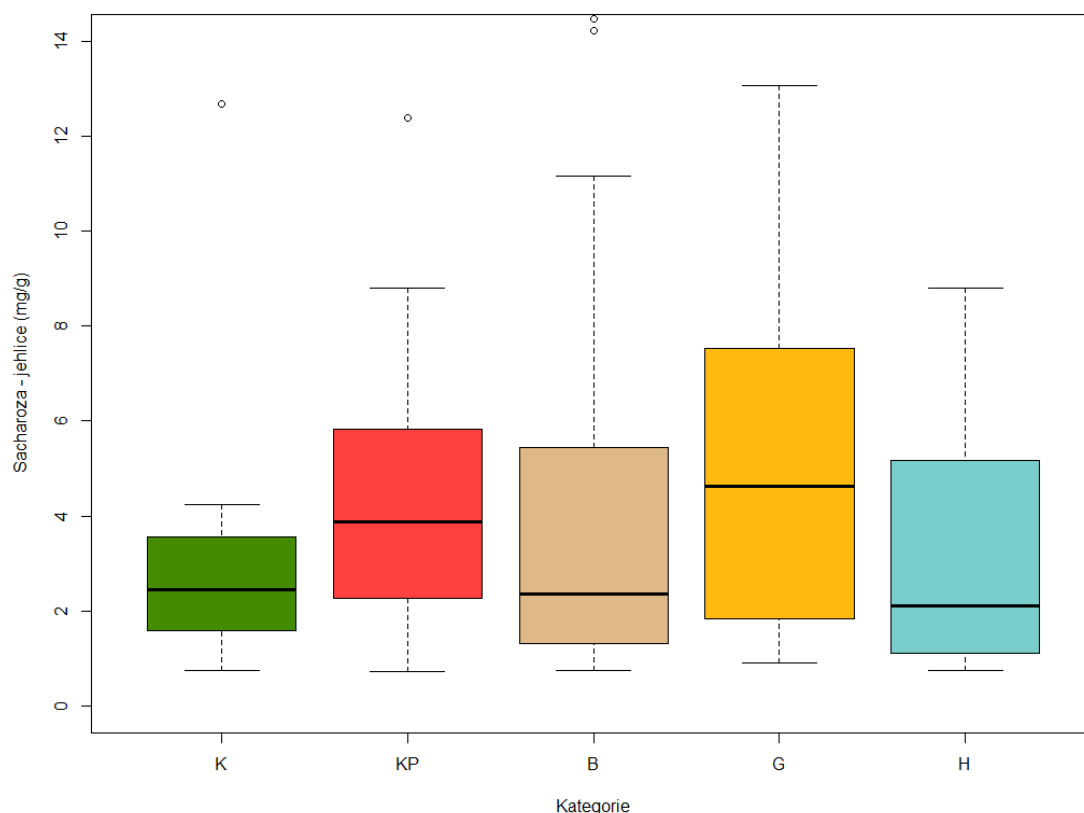
Zde byl nalezen rozdíl hlavně mezi kontrolní kategorií K a kategoriemi KP, B. Dále potom se prokázala být-i odlišná kategorie KP od H.

V jiných parametrech nebyla nalezena žádná statisticky prokazatelná odlišnost či závislost.

5.2.2 Cukry obsažené v jehlicích a kořenech sazenic

Analýza obsahu cukrů v kořenech a jehlicích sazenic byla zaměřena na přítomnost a množství sacharózy, trehalózy a mannitolu.

Při testování závislosti množství sacharózy v jehlicích nebyl nalezen žádný významný rozdíl mezi kategoriemi (Obr. 19).

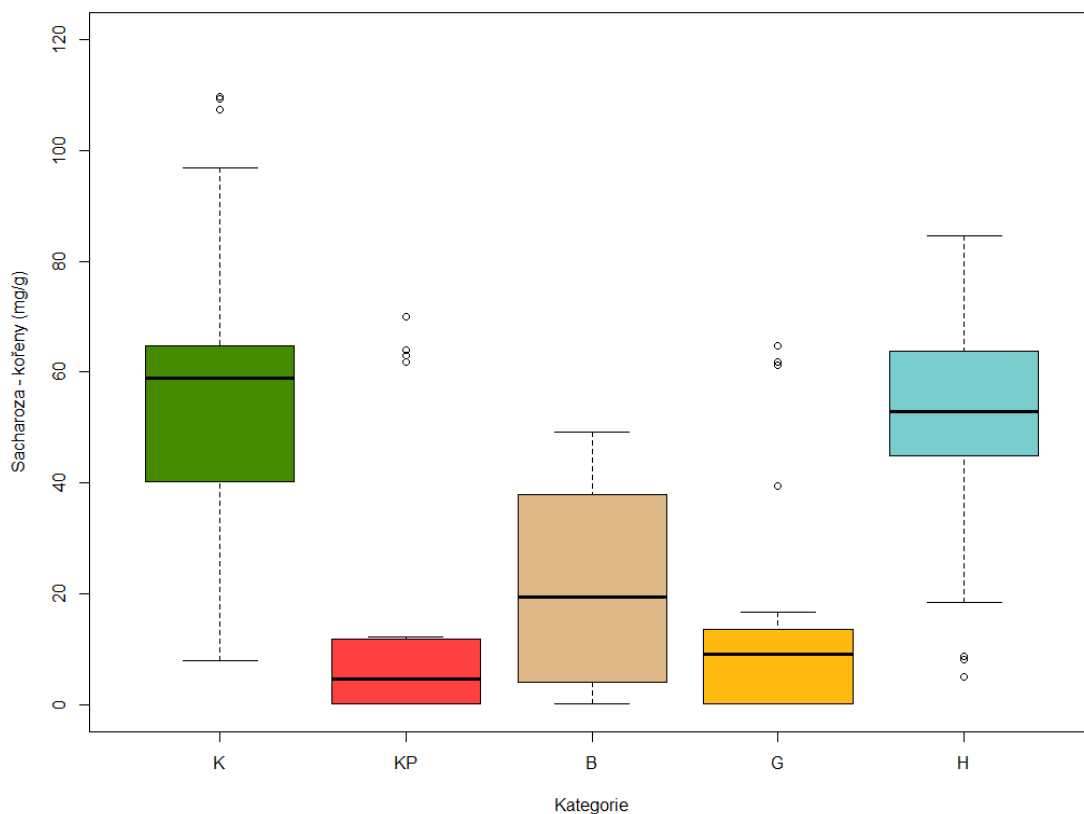


Obr. 19 Srovnání obsahu sacharózy v jehlicích sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

V případě sacharózy, která se nachází v kořenech byl objeven silný trend mezi skupinou kategorií KP, B, G a skupinou kategorií K a H (Tab. 9), (Obr. 20). Mezi jednotlivými

Tabulka 9 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – obsah sacharózy v kořenech sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		<0,0001	<0,0001	<0,0001	1
KP	<0,0001		1	1	<0,0001
B	<0,0001	1		1	<0,0001
G	<0,0001	1	1		<0,0001
H	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	



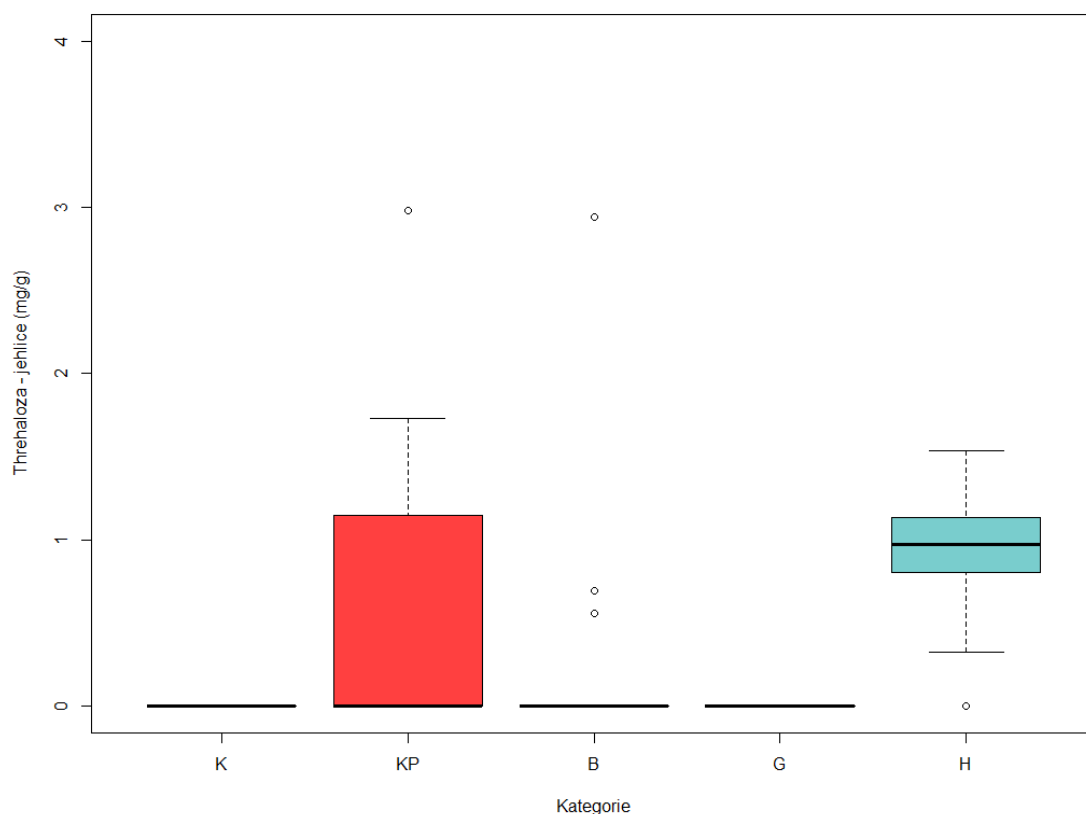
Obr. 20 Srovnání obsahu sacharózy v kořenech sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

kategoriemi KP, B a G nebyl nalezen žádný rozdíl. Stejně tomu bylo i v případě kategorií K a H.

Výsledky testování dat obsahu trehalózy v jehlicích sazenic prokázaly odlišnost kategorie H od všech ostatních kategorií s výjimkou kategorie KP (Tab. 10), (Obr. 21). U kategorie KP se ale prokázal rozdíl s kategorií G.

Tabulka 10 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – obsah trehalózy v jehlicích sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,0671	1	1	<0,0001
KP	0,0671		0,7033	0,033	0,2577
B	1	0,7033		1	<0,0001
G	1	0,033	1		<0,0001
H	<0,0001	0,2577	<0,0001	<0,0001	

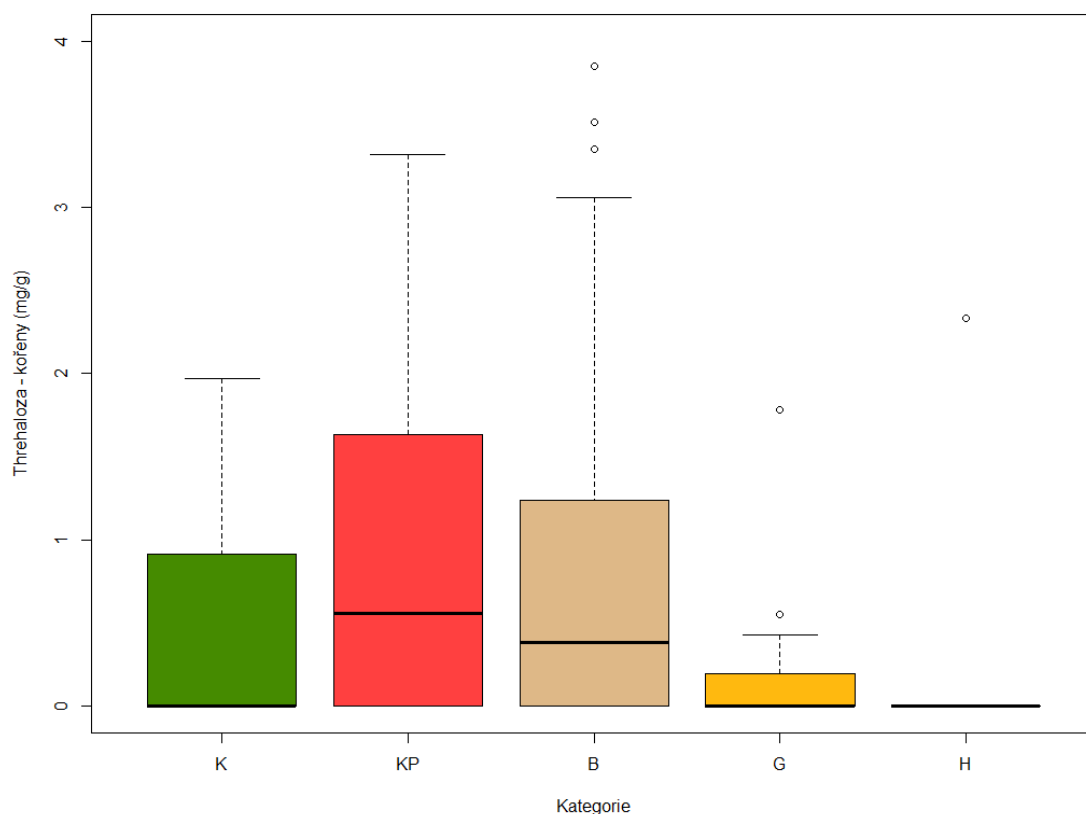


Obr. 21 Srovnání obsahu trehalózy v jehlicích sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

Obsah trehalózy v kořenech sazenic se výrazně lišil v případě kategorie H od kategorií B a KP (Tab. 11), (Obr. 22). Kategorie KP a B se také obsahem trehalózy lišily od kategorie G.

Tabulka 11 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – obsah trehalózy v kořenech sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,6034	0,5793	1	0,1023
KP	0,6034		1	0,0361	<0,0001
B	0,5793	1		0,0151	<0,0001
G	1	0,0361	0,0151		0,955
H	0,1023	<0,0001	<0,0001	0,955	

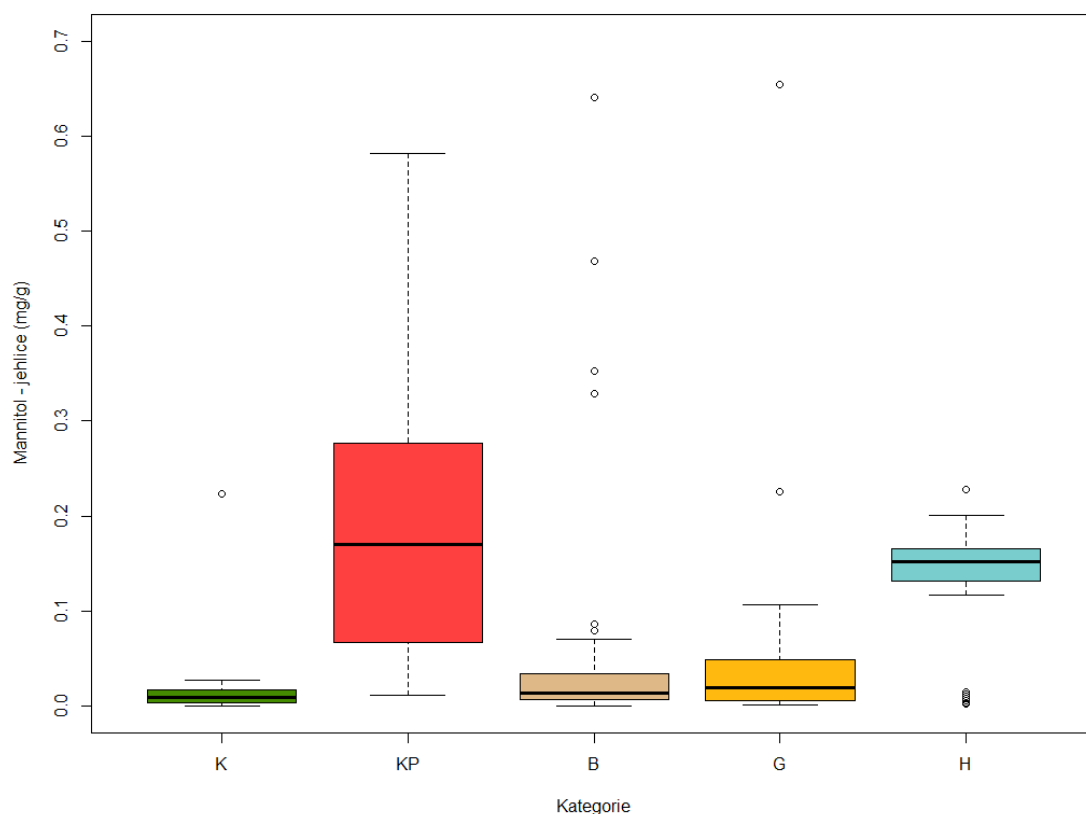


Obr. 22 Srovnání obsahu trehalózy v kořenech sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti poravy chrousta na konci experimentu 2022

Testování hodnot mannitolu v jehlicích sazenic ukázalo značnou variabilitu mezi většinou kategorií (Tab. 12), (Obr. 23). Kategorie H se lišila od kategorií K, B a G. Skupina K se navíc silně odlišovala od kategorie KP. U kategorie KP byl nalezen rozdíl i s kategoriemi B a G.

Tabulka 12 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – obsah mannitolu v jehlicích sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		<0,0001	1	1	<0,0001
KP	<0,0001		0,0006	0,0007	1
B	1	0,0006		1	0,0005
G	1	0,0007	1		0,0008
H	<0,0001	1	0,0005	0,0008	

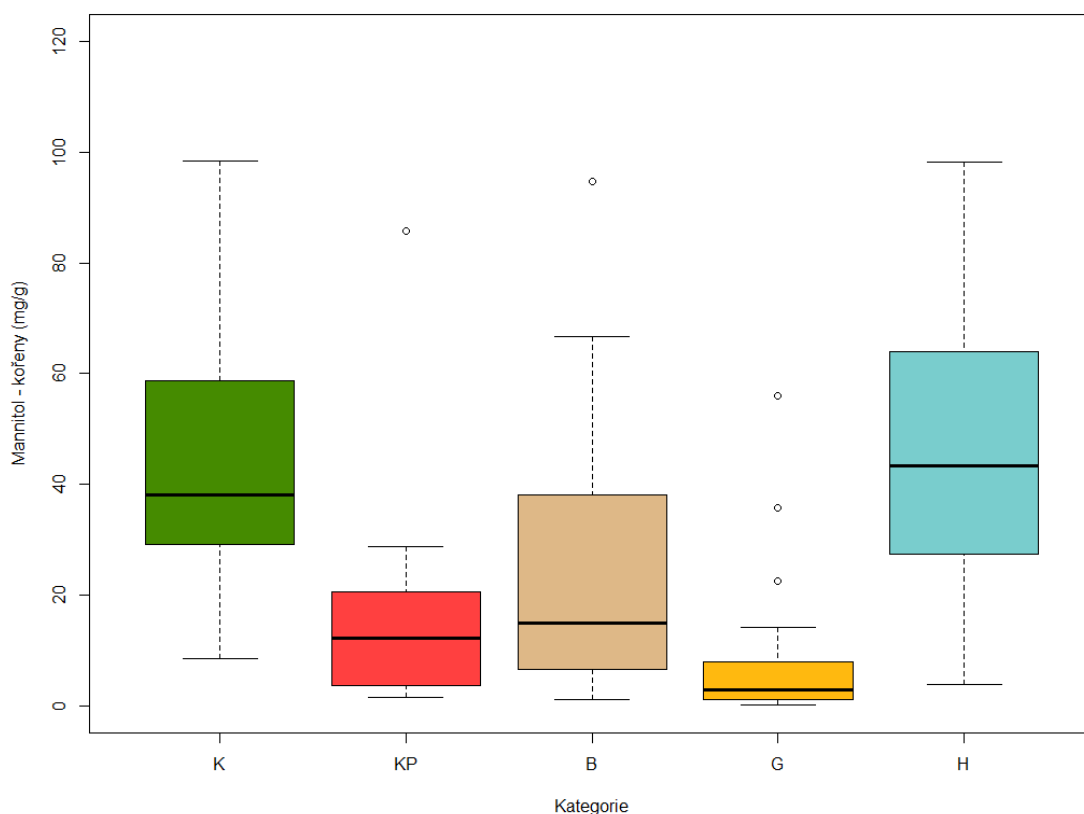


Obr. 23 Srovnání obsahu mannitolu v jehlicích sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

Trend byl nalezen i v případě obsahu mannitolu v kořenech zkoumaných sazenic (Tab. 13), (Obr. 24). Zde byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinou kategorií K, H a skupinou kategorií KP, B a G. Navíc byla nalezena i odlišnost mezi kategoriemi G a B.

Tabulka 13 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – obsah mannitolu v kořenech sazenic borovice lesní v experimentu v roce 2022
Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	K	KP	B	G	H
K		0,0039	0,04	<0,0001	1
KP	0,0039		1	0,4179	0,0001
B	0,04	1		0,0011	0,0008
G	<0,0001	0,4179	0,0011		<0,0001
H	1	0,0001	0,0008	<0,0001	



Obr. 24 Srovnání obsahu mannitolu v kořenech sazenic borovice lesní v závislosti na přítomnosti ponravy chrousta na konci experimentu 2022

5.2.3 Závislost obsahu cukrů na přítomnosti ponravy

V rámci zkoumání dat o obsahu cukrů v částech sazenice v závislosti na přítomnosti na ponravě byly použity 3 kategorie a to kategorie, kde ponrava nebyla k sazenice vložena (N), ponrava byla nalezena na konci experimentu (A), ponrava byla k sazenici vložena, ale nebyla nalezena (D).

V případě sacharózy obsažené v jehlicích, byl nalezen rozdíl mezi kategorií A a N (Tab. 14).

Tabulka 14 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – závislost sacharózy v jehlicích sazenic borovice lesní na přítomnosti ponravy v experimentu v roce 2022

Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	N	A	D
N		0,0364	0,4733
A	0,0364		0,3757
D	0,4733	0,3757	

Velmi silný trend byl zaznamenán také v případě závislosti sacharózy v kořenech na přítomnosti ponravy (Tab. 15). Zde se prokázal být rozdíl mezi všemi skupinami.

Tabulka 15 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – závislost sacharózy v kořenech sazenic borovice lesní na přítomnosti ponravy v experimentu v roce 2022

Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	N	A	D
N		<0,0001	<0,0001
A	<0,0001		0,0011
D	<0,0001	0,0011	

Trehalóza v jehlicích sazenic se prokázala být rozdílná v případě kategorie A od N a D od N (Tab. 16).

Tabulka 16 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – závislost trehalózy v jehlicích sazenic borovice lesní na přítomnosti ponravy v experimentu v roce 2022

Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	N	A	D
N		0,0025	0,0008
A	0,0025		1
D	0,0008	1	

V kořenech se ukázal také být statisticky významný rozdíl mezi všemi kategoriemi (Tab. 17). Přítomnost ponravy neprokázala mít statisticky významný vliv na množství

Tabulka 17 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – závislost trehalózy v kořenech sazenic borovice lesní na přítomnosti ponravy v experimentu v roce 2022

Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	N	A	D
N		<0,0001	0,0063
A	<0,0001		0,0259
D	0,0063	0,0259	

mannitolu v jehlicích sazenic. Na koncentraci mannitolu v kořenech byl ale prokázán rozdíl mezi skupinami, a to mezi skupinou N a skupinami A i D (Tab. 18).

Tabulka 18 Vícenásobné porovnání: Kruskal-Wallisův test – závislost mannitolu v kořenech sazenic borovice lesní na přítomnosti ponravy v experimentu v roce 2022

Zeleně = statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	N	A	D
N		<0,0001	<0,0001
A	<0,0001		0,2005
D	<0,0001	0,2005	

6 Diskuse

6.1 Vitalita a fyzické vlastnosti sazenic

Vitalita sazenic byla kontrolována každých 14 dní. K prvním změnám zdravotního stavu sazenic začalo docházet převážně až po 5. kontrole. Největší skokové zhoršení stavu sazenic bylo ale pozorováno až během 3 posledních kontrol. Lze proto předpokládat, že mortalita by byla ještě vyšší, pokud by experiment trval delší dobu. Většina sazenic, které buď odumřely anebo na konci experimentu byl jejich stav vyhodnocen kategorií 3, pocházely z kategorií obsahující ponravu. Co se týče kategorií K a H, pouze jedna sazenice byla ohodnocena číslem 4. To by bylo pravděpodobně možné přisoudit přirozené mortalitě nebo jinému poškození při výsadbě. Není, ale pochyb o tom, že ponravy mají přímý negativní vliv na vitalitu sazenic a značně omezují možnost jejich pěstování, jak uvádí Knížek & Liška, (2020) a to i v počtech kdy je jedna ponrava na sazenici. To dokazuje i fakt, že nejvitalnější a nejlépe rostoucí sazenice byly ve variantách bez ponravy. Kategorie G a B vykazovaly vyšší procentuální mortalitu než kategorie K a H. V porovnání s kategorií KP ovšem zde byl pozorován znatelně větší podíl rostlin v kategoriích 1 a 2. Proto lze říct, že obě formy ochrany mají pozitivní vliv na vitalitu sazenic.

Žádná z metod ošetření houbou *B. bassiana* ovšem neprokázalo mít statisticky průkazný vliv na změny rozměrů sazenic jako je změna hmotnosti, výškový přírůst a tloušťkový přírůst. Je vhodné ale poznamenat, že v obou kategoriích, tedy B a G, byla zaznamenána data s větším rozptylem, která naznačovala jistý stupeň ochrany.

Pro změnu hmotnosti byla nalezena značná podobnost mezi skupinami K a H a průkazný rozdíl od ostatních kategorií. Je zřejmé, že změna hmotnosti je dobrým ukazatelem stavu dvouletých sazenic. Znalost této skutečnosti, by mohla pomoci i při výzkumech integrované ochrany rostlin i proti jiným kořenem poškozujícím druhům hmyzu. Zjevnou nevýhodou tohoto ukazatele je nutnost vyjmutí rostliny z půdy, což může mít pro rostlinu fatální následky.

Dalším dobrým ukazatelem, který ovšem na rozdíl od měření změny hmotnosti nevyžaduje vyjmutí sazenice z půdy, se prokázal být výškový přírůst. V tomto případě mohl být pozorován dokonce mírně vyšší přírůst u skupiny H tedy sazenice ošetřené hydrogelem než v případě kontrolní skupiny. Tento rozdíl, ovšem nebyl dostatečně signifikantní, aby bylo možno dojít k jednoznačnému závěru. To je pravděpodobně způsobeno výběrem druhu

testované rostliny, protože dle studie (Tomášková et al. 2020) působil hydrogel výrazně pozitivně spíše při použití v kombinaci s listnatými druhy dřevin.

Tloušťkový přírůst se neprokázal být výrazným ukazatelem, což může být pravděpodobně způsobeno nízkým věkem sazenic a krátkou dobou trvání experimentu. Z těchto důvodů pak byly tloušťkové přírůsty minimální a dostupnými způsoby spolehlivě neměřitelné. Opět zde byl ale pozorován stejný trend jako u předchozích parametrů a to, že kontrolní skupina K a skupina s H vykazovaly nejvyšší přírůst ze všech. Tento přírůst ovšem nebyl tak výrazný jako v případě změny hmotnosti nebo výškovém přírůstu.

6.2 Dopad přítomnosti ponravy na sazenice a jejich kořenové systémy

Na konci experimentu bylo nalezeno celkem 29 živých ponrav ze 122 aplikovaných. Vysoká mortalita nemohla být přímo potvrzena, z důvodu nemožnosti nalézt ostatky mrtvých. I přes to lze předpokládat, že v některých případech byla ochrana sazenic některou z testovaných metod úspěšná. Tomu naznačuje i fakt, že bylo nalezeno nejvíce živých ponrav v kategorii KP, celkem bylo nalezeno 52 % živých ponrav, která nebyla ošetřena žádnou houbou. Na rozdíl od ostatních kategorií s ponravou, tedy B a G, kde bylo nalezeno dohromady pouze 16,5 % ze všech ponrav. Navíc byly zaznamenány i situace, kdy kategorie s přítomnou ponravou dosáhla hmotnosti podobné jako sazenice z kontrolní kategorie. V těchto případech se můžeme tedy domnívat, že ponrava byla zabita relativně brzy po začátku experimentu. Toto tvrzení ale nelze jednoznačně potvrdit, protože nebylo možné fyzicky monitorovat, v jaký moment byla ponrava zabita. Nutno podotknout, že mortalita v kontrolní neošetřené kategorii KP byla mírně vyšší, než jaká byla pozorována v případě jiného experimentu testování biologického boje s ponravami rodu *Melolontha* v poloprovozních podmínkách kde mortalita kontrolní skupiny dosáhla pouze 45 % (Sukovata et al. 2015). Nicméně faktor ošetření sazenic houbou *B. bassiana* se prokázal být důležitý v případě fyzických vlastností sazenice a podobně jako pozorovali Lalík et al., (2021) u populace druhu *H. abietis* došlo k úspěšné redukci dospělců pomocí houby *B. bassiana*. Výrazný rozdíl v účinnosti mezi nosičem porostlým houbou a využitím hydrogelu s konidii *B. bassiana* ale pozorován nebyl. Ve srovnání změny hmotnosti skupin, kde byla ponrava úspěšně nalezena a skupinou, kde nebyla nalezena, byl spočítán rozdíl střední hodnoty 4 g. Při průměrné změně hmotnosti 10,81 g v rámci sazenic kategorií KP, B a G lze považovat zmíněný rozdíl za signifikantní. Podobný fenomén bylo možné pozorovat i v případě tloušťkového přírůstu. Rozdíl mezi středními hodnotami skupin s nalezenou a nenalezenou ponravou činil 0,15 cm. I přes to, že poměr mezi rozdílem kategorií

a průměrným tloušťkovým přírůstem, jež činil u sazenic ze zmíněných kategorií 0,595 cm, nebyl tak velký jako v u změny hmotnosti, tento rozdíl byl i přes to statisticky prokazatelný.

Závislost na tom, zda byla ponrava na konci experimentu nalezena či nikoliv byla objevena i v případě kořenů sazenic. Velmi výrazný rozdíl bylo možné pozorovat hlavně v případě celkové délky kořenového systému. A to ať už v průměrné délce tak v mediánech. Prokazatelný byl i vliv na celkovou plochu kořenového systému, byť jen s řádově nižší významností, než tomu bylo u délky kořenů.

Na základě těchto údajů lze usuzovat, že aplikace *B. bassiana* je z hlediska ochrany před ponravou je, byť v omezené míře, benefiční pro kořenový systém sazenic i přes to, že ponrava není ihned houbou zlikvidována. Pro potvrzení tohoto závěru je ale potřeba další a detailnější studie, která by byla přímo zaměřena na danou problematiku.

Analýza plochy kořenů, které byly děleny dle jejich délky, naznačila potencionální preference ponravy. Na základě kategorií se jednoznačně nejvíce lišily kořeny v rozmezí 0,5 cm až 1 cm. Prokazatelný rozdíl v případě vyhodnocení metodou projektované plochy dokonce naprosto přesně kopíruje rozdělení kategorií podle přítomnosti ponravy, kdy plochy kořenů kategorií K a H jsou statisticky naprosto shodné zároveň odlišné od kategorií KP, G a B, jež jsou si shodné navzájem. Podobná data poskytla hodnocení „surface area“, jež naznačila podobný trend u kořenů délky mezi 0,5 cm a 1 cm délky s výjimkou kategorie u porovnání kategorií G x K a B x H. V ostatních případech nebyl podobný výsledek pozorován pouze místy, a to na hranici statistické signifikance. Dalo by se tedy předpokládat, že 2. instar ponrav druhu *M. hippocastani* preferuje primárně kořínky o délce mezi 0,5 cm a 1 cm. Tento výsledek byl ale očekávatelný, jelikož je známo, že ponravy preferují rostliny s jemnějšími kořeny (Horber, 1961; Hauss & Schütte, 1978).

6.3 Cukry

Sacharóza je tvořena díky fotosyntetické funkci rostliny v asimilačních orgánech (Lunn a Furbank 1999). Jedná se o sacharid, skládající se ze dvou částí, molekuly glukózy a molekuly fruktózy. Její funkce je primárně zásobní, respektive je využívána rostlinou jako zdroj energie a uhlíku. Nejčastěji je rostlinou uchovávána v kořenech či plodech (Lunn a MacRae 2003). Jednou z její mnoha funkcí je i signální funkce, kdy pomáhá udržovat homeostázu v reakci na okolní vlivy prostředí (Ciereszko et al. 2001). Výsledky této práce ukázaly výrazné snížení množství sacharózy v kořenech, pokud byla přítomna ponrava. Jelikož, kořeny jsou oblast, která je vysoce aktivní díky přítomnosti meristémů ve špičkách kořínků, vysoká koncentrace

sacharózy je očekávatelná. O tomto tvrzení vypovídají i získaná data, kdy přítomnost sacharózy byla výrazně vyšší v kořenech sazenic K a H. Jeden z důvodů nižší koncentrace zásobního sacharidu v kořenech ostatních kategorií je pravděpodobně právě přítomnost ponravy, jež se primárně zaměřuje na menší kořínky. V jejichž špičkách se koncentruje velké množství sacharózy, která poskytuje energii dělícím se buňkám. Výrazný pokles či navýšení koncentrace sacharózy v jehlicích nebyl zaznamenán.

Disacharid trehalóza je jedním z cukrů, které jsou převážně známe pro jejich spojení s buňkami hub (Jorge et al. 1997). Obvykle se vyskytuje v buňkách, které se zrovna nedělí, nebo ve sporách. V případě rostlin se trehalóza vyskytuje nejčastěji v řasách (Lunn et al. 2014). Za hlavní funkci trehalózy reakce na stres. Ve vyšších cévnatých rostlinách se vyskytuje ale v nižších koncentracích, protože její funkci přebírají jiné cukry jako sacharóza. Data této práce ukazují, že dle očekávání v jehlicích se nenacházela vysoká koncentrace trehalózy. Jedinou výraznou výjimkou byly sazenice kategorie H, ve kterých bylo detekováno výrazně větší množství trehalózy než v případě ostatních kategorií. Tento jev není možné na základě získaných dat vysvětlit. Pro vysvětlení této reakce sazenic na hydrogel je potřeba dalšího výzkumu. Trehalóza v kořenech již byla detekována ve zvýšeném množství. Co se týče kategorie KP, zde lze tuto reakci vysvětlit působením ponravy jakožto stresového faktoru. K podobnému závěru by bylo možné dojít i v případě kategorií B a G. V tomto případě lze ovšem předpokládat, že množství trehalózy ovlivnila i přítomnost a potencionálně úspěšná kolonizace houbou *B. bassiana*. Na základě nižší koncentrace disacharidu u sazenic kategorie G lze předpokládat, že tento způsob ochrany sazenice snižuje stres rostliny způsobený ponravou.

Mannitol je sacharid produkovaný cévnatými rostlinami z pravidla společně s jinými cukry jako je rafinóza nebo sacharóza (Stoop et al. 1996). Rostliny ji produkují jako reakci na abiotický stres jako například vysoké hodnoty salinity v okolí. Data této studie ukazují, že zvýšená koncentrace mannitolu oproti ostatním kategoriím v jehlicích sazenic, byla sledována pouze u kategorie KP a H. V případě kategorie KP lze potencionálně tento jev vysvětlit působením ponravy. Na druhou stranu nebyla nalezena žádná data o zvýšené produkci mannitolu rostlinami v reakci na ponravy či jiné larvy. Zvýšené množství tohoto cukru bylo spíše pozorován při napadení rostliny fytopatogenní houbou, jelikož jak houby, tak rostliny tento sacharid využívají (Meena et al. 2015). O poznání vyšší koncentrace mannitolu byla nalezena v kořenech. Vyvozování závěrů na základě předložených dat je velmi spekulativní. Koncentrace mannitolu v případě *B. bassiana* přímo spojená s koncentrací trehalózy jako

reakce na stres houby způsobený teplotou (Liu et al. 2009). Navíc některé organismy jsou schopny mannitol využívat i pro tvorbu ATP (Stoop a Mooibroek 1998). Na základě této informace je tedy možné, že snížená hodnota tohoto sacharidu v kořenech u kategorií KP, B a G může být způsobena právě stresem působeným ponravou, respektive podobně jako v případě sacharózy žírem metabolicky aktivních kořenových špiček. Pro potvrzení tohoto výroku by byla potřeba specializovaná studie.

Jelikož se dá na základě získaných dat říci, že v kořenech se obecně nacházely zkoumané sacharidy ve větších koncentracích, bylo zřejmé, že rozdíl mezi tím, kdy ponrava přítomna byla či nebyla bude prokazatelný. V případě cukrů v kořenech tomu tak skutečně ve většině případů bylo. Jediná výjimka byla nalezena v případě mannitolu v kořenech sazenic. Zde nebyl nalezen prokazatelný rozdíl mezi koncentrací sacharidu u sazenic, kde ponrava nalezena na konci experimentu byla a mezi sazenicemi, kde nalezena nebyla. Na druhou data o sazenicích, ke kterým ponrava přidána nebyla vůbec, se odlišují od těch, u kterých ponrava přežila, s velmi vysokým statistickým významem. Co se jehlic týče, nebyl nalezen výrazný rozdíl mezi tím kdy ponrava přežila či nepřežila. Zde je výjimkou trehalóza, jejíž koncentrace na přežití ponravy záležela.

U *B. bassiana* jakožto endofytické houby byl pozorován i vliv na růst u různých rostlin (Sánchez-Rodríguez et al. 2015; Lopez a Sword 2015; Jaber a Enkerli 2016; Shaalan et al. 2021). V některých případech byl pozitivní například při kolonizaci *Gossypium hirsutum* Linné, *Vicia faba* Linné, nebo *Cucumis sativus* Linné. V jiných se dostavil negativní efekt (Sánchez-Rodríguez et al. 2015). Podobný efekt ještě nebyl zkoumán v případě dřevin. V rámci této studie, ale nebyla pozorována výrazná změna v růstu oproti sazenicím, které nebyly *B. bassiana* ošetřeny. Je možné, že přítomnost houby i na dřeviny má nějaké pozitivní účinky, jak bylo dříve naznačeno daty o změně hmotnosti. Na základě získaných údajů provedeného experimentu se dá pouze spekulovat o efektu endofytické houby na *P. sylvestris* a to z několika důvodů. 1) Do experimentu nebyla zařazena kategorie, která by byla ošetřena *B. bassiana* a zároveň k ní nebyla přidána ponrava *M. hippocastani*. Proto, pokud by se dostavil ať už pozitivní či negativní efekt na jakýkoliv z měřených parametrů, nelze vyloučit výrazné zkreslení výsledků právě kvůli přítomnosti larvy, která mohla potencionální přírůsty konzumovat. 2) Během analýzy dat nebylo přímo zjišťováno, zda byly sazenice vůbec endofytem kolonizovány. Přítomnost vyšší koncentrace trehalózy u kategorie B sice může nepřímou naznačovat úspěšnou kolonizaci (Jorge et al. 1997). Zároveň tomu ale odporuje fakt, že u sazenic kategorie G byla koncentrace trehalózy nižší i v porovnání s kontrolní kategorií K. Proto nelze říct, zda byly sazenice úspěšně

kolonizovány. Tento fakt je ještě umocněn tím, že při experimentech, které se zaměřují na působení endofytů na rostliny byla využita aplikace konidií houby přímo na semena rostlin s dalším ověřením o úspěšnosti inokulace ošetřených semen (Shaalán et al. 2021). V námi provedeném experimentu bylo ale pouze vloženo médium hydrogelu s konidiami či v podobě nosiče porostlého houbou přímo pod kořeny již rostlých sazenic. V některých případech zmíněných rostlin byla ale pozorována zvýšená odolnost proti škůdcům například u *C. sativus* a *Cucumis melo* Linné proti druhu mšice *Aphis gossypii* (Shaalán et al. 2021; González-Mas et al. 2019). Pokud by byl podobný efekt objeven i v případě některé z lesních dřevin, které se využívají pro hospodářské účely, mohlo by se jednat o užitečný nástroj pro integrovanou ochranu rostlin. Je ovšem nutno podotknout, že se objevily i případy, kdy kolonizace rostliny (*Vicia faba*) nejen že nezvýšila rezistenci zkoumané rostliny před *A. gossypii*, ale dokonce v druhé generaci potencionálně zvýšila jejich schopnost množení (Jensen et al. 2019).

7 Závěr

Efekt přítomnosti houby *B. bassiana* na mortalitu ponrav chrousta maďalového se neprokázal být tak výrazný, aby bylo možné ji využívat jako plnohodnotnou ochranu rostliny před škůdcem. Na druhou stranu se jeví vhodné její použití jako podpůrného prostředku v kombinaci s dalšími opatřeními, neboť redukuje množství ponrav v půdě.

Aplikace využitím hydrogelu jako nosiče spor se neprokázalo být výrazně lepší či spolehlivějším způsobem oproti použití kulového nosiče porostlého houbou a naopak. Hydrogel jako takový ovšem prokázal, že díky němu může sazenice benefitovat. Pro objevení možných konkrétních výhod, které může hydrogel v kombinaci se sporama *B. bassiana* přinést, například při absenci ponrav, je potřeba provést další výzkum.

Ponravy mají výrazný vliv na zdravotní stav sazenic. U kořenového systému jsou ponravou druhého instaru nejohroženější kořínky v délce od 0,5 cm do 1 cm. Mezi druhem ošetření nebyl zaznamenán významný rozdíl, ale jakákoliv forma ochrany se prokázala být lepší než varianta kontrolní, obsahující ponravu. Tomu nasvědčuje i fakt, že u kontrolní varianty s ponravou byla objevena prokazatelně vyšší koncentrace trehalózy, tedy cukru, který rostlina produkuje v reakci na výrazný stres.

8 Literatura

- AREGGER-ZAVADIL, E., 1992. Grundlagen zur Autoökologie und Artspezifität des Pilzes *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Pech als Pathogen des Maikäfers (*Melolontha melolontha* L.) [online]. Zürich. b.n. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000643444>
- BALTHASAR, V., 1956. Brouci listoroží - *Lamellicornia*. B.m.: Praha: Nakladatelství Československé akademie věd. Fauna ČSR.
- BLAISINGER, P., 1988. Rapport sur le hanneton en France. Table Ronde sur *Melolontha melolontha*, Saint-Vincent, 9–10. 7–11.
- BODEN, K., 1895. Der Maikäferflug des Jahres 1895 und die dabei gemachten Beobachtungen. Zeitschr. f. Forst- u. Jagdwesen. 637.
- BOTHE, H., 1899. Über *Melolontha vulgaris* L. und *M. hippocastani* F. Ill. Zeitschr. f. Entomologie - 4, 267.
- BOUCIAS, D. G., S. Y. HUNG, I. MAZET a J. AZBELL, 1994. Effect of the Fungal Pathogen, *Beauveria bassiana*, on the Lysozyme Activity in Spodoptera exigua Larvae. Experientia. 50, 142–147.
- CIERESZKO, I., H. JOHANSSON a L. A. KLECZKOWSKI, 2001. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. Biological Society [online]. 354, 67–72. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1042/bj3540067>
- CIORNEI, C., A. M. ANDREI, D. Lupastean, 2011. Integrated control of *Melolontha melolontha* L. in Romanian forest nurseries. IOBC/WPRS Bulletin. 66, 225–228.
- DELB, H., 2000. Erste Erfahrungen mit einer integrierten Bekämpfung des Waldmaikäfers (*Melolontha hippocastani* F.) in der nördlichen Oberrheinebene. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. 376, 250–251.
- DELB, H. a J. MATTES, 2001. Monitoring of *Melolontha hippocastani* F. at the upper Rhine Valley, Germany. Journal of Forest Science. 47((Special Issue 2)), 70–72.
- DOLCI, P., F. GUGLIELMO, F. SECCHI a O. I. OZINO, 2006. Persistence and efficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (northwest Italy). Journal of Applied Microbiology [online]. 100(5), 1063–1072. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02808.x
- ENÉ, I.-M., 1942. Experimentaluntersuchungen über das Verhalten des Maikäferengerlings (*Melolontha spec.*). Zeitschrift für Angewandte Entomologie [online]. 29(4), 529–600. ISSN 14390418. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.1942.tb00543.x
- ERICHSON, W. F., H. von KIESENWETTER, G. KRAATZ, E. REITTER, H. R. SCHAUM, G. SEIDLITZ a J. WEISE, 1866. Naturgeschichte der Insecten Deutschlands 1. Abtheilung Coleoptera [online]. Berlin: Nicolaische Buchhandlung. Dostupné z: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/105802>
- ESCHERICH, K., 1923. Die Forstinsekten Mitteleuropas Bd. II. Verlagsbuchhandlung Paul Parey Berlin. Dostupné z: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/69489#page/5/mode/1up>
- FABRICIUS, Johan C., 1801. Systema Eleutheratorum secundum ordines, genera, species, adiectis synonymis, locis, observationibus, descriptionibus. Impensis Bibliopolii academici novi. 160-185.
- FEDDERSEN, 1896. Der Maikäfer und seine Bekämpfung. Zeitschrift für Forst- und Jagdwesen. 265–318.

- GONZÁLEZ-MAS, N., A. SÁNCHEZ-ORTIZ, P. VALVERDE-GARCÍA a E. QUESADA-MORAGA, 2019. Effects of endophytic entomopathogenic ascomycetes on the life-history traits of *aphis gossypii* glover and its interactions with melon plants. *Insects* [online]. 10(6). ISSN 20754450. Dostupné z: doi:10.3390/insects10060165
- HÁMORI, D., G. SZÉL a D.WINKLER, 2017. Food composition of the Little Owl (*Athene noctua*) in a farmland area of Central Hungary, with particular attention to arthropod diversity. *Ornis Hungarica* [online]. 25(2), 34–50. ISSN 12151610. Dostupné z: doi:10.1515/orhu-2017-0014
- HAUSS, R. a F. SCHÜTTE, 1978. Über die Eiablage des Maikäfers (*Melolontha melolontha* L.) in Abhängigkeit von den Wirtspflanzen des Engerlings. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* [online]. 86(1–4), 167–174. ISSN 14390418. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.1978.tb01924.x
- HENSCHER, G. A O, 1895. Die schädlichen Forst-und Obstbaum-Insekten, ihre Lebensweise und Bekämpfung: praktisches Handbuch für Forstwirthe und Gärtner. B.m.: P. Parey.
- HORBER, E., 1961. Versuche zur Verhinderung der vom Maikäferengerling (*Melolontha vulgaris* F.), von der Fritfliege (*Oscinella frit* L.) and vom Maiszünsler (*Pyrausta nubilalis* Hbn.) verursachten Schäden mittels resistenter Sorten. *Landw. Jb. Schweiz.* 75, 633–669.
- HUITING, H.F., L.G. MORAAL, F.C. GRIEPINK a A. ESTER, 2006. Biology, control and luring of the cockchafer, *Melolontha melolontha* Literature report on biology, life cycle and pest incidence, current control possibilities and pheromones [online]. Dostupné z: www.alterra.nl
- JABER, L. R. a J. ENKERLI, 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control* [online]. 103, 187–195. ISSN 10499644. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocontrol.2016.09.008
- JENSEN, R. E., A. ENKEGAARD a T. STEENBERG, 2019. Increased fecundity of *Aphis fabae* on *Vicia faba* plants following seed or leaf inoculation with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE* [online]. 14(10). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0223616
- JORGE, J. A., M. de Lourdes T.M. POLIZELI, J.M. THEVELEIN a Héctor F. TERENCEZI, 1997. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 154(2), 165–171. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12639.x
- JUNG, K., J. GONSCHORREK, J. RUTHER a G. ZIMMERMAN, 2005. Field testing of new biocontrol strategies to decrease population density in *Melolontha hippocastani*, an important scarab species in Germany. In: *Proceedings of the XXXV Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Iguassu Falls, Brazil.* s. 85–88.
- KELLER, E., 1988. Entwicklung der maikäferpopulation in kanton Thurgau (Schweitz). *Table Ronde sur Melolontha melolontha, Saint-Vincent, 9–10 giugno.* 16–19.
- KELLER, S., 2000. Use of *Beauveria brongniartii* in Switzerland and its acceptance by farmers. *IOBC/WPRS Bulletin.* 23(8), 67–71.
- KELLER, S. a C. SCHWEIZER, 2001. Ist das Drahtwurm-Problem ein Pilz-Problem. *Agrarforschung.* 7(8), 248–251.
- KESSLER, P., J. ENKERLI, C. SCHWEIZER a S. KELLER, 2004. Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *BioControl.* 49(5), 563–581.
- KESSLER, P. a S. KELLER, 2003. Influence of soil environment on growth and persistence of *Beauveria brongniartii*. Athens (Greece): International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, West Palaearctic Regional Section.

- KNÍŽEK, M., 2009. Zpravodaj ochrany lesa. [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-011-9. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M., 2010. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-030-0. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M., 2011. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-040-9. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M. a J. LIŠKA, 2018. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-161-1. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M. a J. LIŠKA, 2019. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-189-5. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M. a J. LIŠKA, 2020. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-198-7. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M. a J. LIŠKA, 2021. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-212-0. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz/los>
- KNÍŽEK, M. a J. LIŠKA, 2022. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-231-1. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz/los>
- KNÍŽEK, M., J. LIŠKA a R. MODLINGER, 2015. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 9788074170928. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M., J. LIŠKA a R. MODLINGER, 2016. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-111-6. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M., J. LIŠKA a R. MODLINGER, 2017. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 978-80-7417-142-0. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M. a R. MODLINGER, 2013. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 9788074170638. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KNÍŽEK, M. a V. PEŠKOVÁ, 2008. Zpravodaj ochrany lesa [online]. B.m.: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. ISBN 9788086461939. Dostupné z: <http://www.vulhm.cz>
- KOWALSKA, J., 2001. May bugs - a threat and possibilities of control. *Sylwan*. 145(7), 97–105.
- KOZEL, A. V., E. L. ZVEREVA a M.V. KOZLOV, 2017. Impacts of root herbivory on seedlings of three species of boreal forest trees. *Applied Soil Ecology* [online]. 117–118, 203–207. ISSN 09291393. Dostupné z: [doi:10.1016/j.apsoil.2017.05.011](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.011)
- KRATOCHVÍL, J., V. LANDA, K. NOVÁK a V. SKUHRAVÝ, 1953. Chrousti a boj s nimi. B.m.: Nakladatelství ČSAV, Praha.
- KULA, E., 2018. Integrovaná ochrana lesa proti chroustu maďalovému (*Melolontha hippocastani* Fabr.). „Možnosti snížení škod chroustem maďalovým (*Melolontha hippocastani* Fabr.) v území LS Strážnice“. *Lesy České republiky*, s. p., Hradec Králové Mendelova univerzita Brno. 361–380.
- KULA, E., 2021. Chroust maďalový: (*Melolontha hippocastani* Fabricius, 1801). *Lesy České republiky*, s.p. Hradec Králové. ISBN 978-80-86945-35-4.
- KULA, E., 2022. Hibernace imag chrousta maďalového (*Melolontha hippocastani* Fabr.)(Coleoptera, Scarabaeidae) v podmínkách nížin borů Česka. *Zprávy Lesnického Výzkumu* [online]. 183–192. Dostupné z: <https://www.vulhm.cz/files/uploads/2022/10/672.pdf>

- LAENGLER, T., B. PERNFUSS, C. SEGER a H. STRASSER, 2005. Field efficacy evaluation of *Beauveria brongniartii* against *Melolontha melolontha* in potato cultures. *Sydowia* [online]. 57(1), 54–93. Dostupné z: www.biologiezentrum.at
- LALÍK, M., J. GALKO, CH. NIKOLOV, S. RELL, A. KUNCA, M. ZÚBRIK, S. HYBLEROVÁ, M. BARTA a J. HOLUŠA, 2021. Potential of *Beauveria bassiana* application via a carrier to control the large pine weevil. *Crop Protection* [online]. 143. ISSN 02612194. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cropro.2021.105563](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105563)
- LIU, Q., S. H. YING, M. G. FENG a X. H. JIANG, 2009. Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* [online]. 95(1), 65–75. ISSN 00036072. Dostupné z: [doi:10.1007/s10482-008-9288-1](https://doi.org/10.1007/s10482-008-9288-1)
- LOPEZ, D. C. a G. A. SWORD, 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control* [online]. 89, 53–60. ISSN 10499644. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biocontrol.2015.03.010](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010)
- LUNG, T. & STRASSER, H. (2000) Estimating chitinase activity of *Beauveria brongniartii* in submerged culture, in *Integrated Control of Soil Pests*. Keller S. (Ed.). IOBC/WPRS Bulletin 23 (8), pp. 107–112.
- LUNN, J. E. a R. T. FURBANK, 1999. Tansley Review No. 105: Sucrose biosynthesis in C4 plants [online]. srpen 1999. ISSN 0028646X. Dostupné z: [doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00450.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00450.x)
- LUNN, J. E. a E. MACRAE, 2003. New complexities in the synthesis of sucrose [online]. 2003. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 13695266. Dostupné z: [doi:10.1016/S1369-5266\(03\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00033-5)
- LUNN, J. E., I. DELORGE, C. M. FIGUEROA, P. VAN DIJCK a M. STITT, 2014. Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal* [online]. 79(4), 544–567. ISSN 1365313X. Dostupné z: [doi:10.1111/tpj.12509](https://doi.org/10.1111/tpj.12509)
- ŠVESTKA, M., 2006. Distribution of tribes of cockchafers of the genus *Melolontha* in forests of the Czech Republic and the dependence of their swarming on temperature. *Journal of Forest Science*. 52, 520–530.
- MAASS, F., 2002. Preliminary results on the efficacy of *Beauveria*-Schweizer in the Kaiserstuhl area after a three year period. *IOBC/WPRS Bulletin*. 25(7), 79–84. ISSN 0253-1100.
- MACKŮ, J., K. RESNEROVÁ, I. TOMÁŠKOVÁ, T. HOLEČEK, K. HÁJKOVÁ a J. TROMBÍK, 2022. Způsoby aplikace hydrogelu a možnosti jeho využití v lesnickém provozu s inovovanými možnostmi dávkování [online]. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce. Jíloviště-Strnady: VÚLHM. ISBN 978-80-7417-243-4. Dostupné z: www.vulhm.cz
- MADSEN, S. R., G. KUNERT, M. REICHELT, J. GERSHENZON a B. A. HALKIER, 2015. Feeding on Leaves of the Glucosinolate Transporter Mutant *gtr1gtr2* Reduces Fitness of *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology* [online]. 41(11), 975–984. ISSN 15731561. Dostupné z: [doi:10.1007/s10886-015-0641-3](https://doi.org/10.1007/s10886-015-0641-3)
- MAYERHOFER, J., J. ENKERLI, R. ZELGER a H. STRASSER, 2015. Biological control of the European cockchafer: persistence of *Beauveria brongniartii* after long-term applications in the Euroregion Tyrol. *BioControl* [online]. 60(5), 617–629. ISSN 15738248. Dostupné z: [doi:10.1007/s10526-015-9671-6](https://doi.org/10.1007/s10526-015-9671-6)

- MEENA, M., V. PRASAD, A. ZEHRA, V. K. GUPTA a R. S. UPADHYAY, 2015. Mannitol metabolism during pathogenic fungal-host interactions under stressed conditions [online]. 2015. B.m.: Frontiers Media S.A. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.01019
- MUŠKA, A., 1993. Swarming of the cockchafer and larval damage in vine-growing regions of southern Moravia and in the Slovakian republic in 1993. Vinohrad, Bratislava. (3), 40–41.
- MUŠKA, F., Z. KREJCAR, A. JAKL, L. LAMPÍŘ, J. KAZDA, J. ROŽNOVSKÝ a A. MUŠKA, 2012. Škodlivé výskyty ponrav chrousta obecnéhona cukrové a krmné řepě na území České republiky – historický přehled do roku 2008. Listy cukrovarnické a řepařské. 128, 296–299.
- NIEMCZYK, M., A. SIERPIŃSKA, A. TEREBA, K. SOKOŁOWSKI a P. PRZYBYLSKI, 2019. Natural occurrence of *Beauveria* spp. in outbreak areas of cockchafer (*Melolontha* spp.) in forest soils from Poland. BioControl [online]. 64(2), 159–172. ISSN 15738248. Dostupné z: doi:10.1007/s10526-019-09927-3
- NUNBERG, M., 1951. Występowanie chrabąszcza na terenach Polski. Lesne Prace Badawcze. 66.
- VUILLEMIN, P. M., 1912. *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées. Bulletin de la Societe Botanique de France [online]. 59(1), 34–40. ISSN 00378941. Dostupné z: doi:10.1080/00378941.1912.10832379
- QUESADA-MORAGA, E., J.A. NAVAS-CORTÉS, E. A.A. MARANHAO, A. ORTIZ-URQUIZA a C. SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycological Research [online]. 111(8), 947–966. ISSN 09537562. Dostupné z: doi:10.1016/j.mycres.2007.06.006
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A. R., M. C. DEL CAMPILLO a E. QUESADA-MORAGA, 2015. *Beauveria bassiana*: An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. Scientia Horticulturae [online]. 197, 193–202. ISSN 03044238. Dostupné z: doi:10.1016/j.scienta.2015.09.029
- SHAALAN, R. S., E. GERGES, W. HABIB a L. IBRAHIM, 2021. Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* induces growth promotion effect and increases the resistance of cucumber plants against *Aphis gossypii*. Journal of Plant Protection Research [online]. 61(4), 358. ISSN 1899007X. Dostupné z: doi:10.24425/jppr.2021.139244
- SCHMID-VIELGUT, B, C TRZEBITZKY a H BOGENSCHUETZ, 1992. Forest cockchafer populations in Baden-Wuerttemberg. AFZ. Allgemeine Forst Zeitschrift fuer Waldwirtschaft und Umweltvorsorge (Germany, FR). ISSN 0002-5860.
- SCHUCH, K., 1935. Beobachtungen über die Biologie des Maikäfers. Arbeiten über physiologische und angewandte Entomologie. (2), 157–174.
- SCHWERDTFEGGER, F., 1939. Untersuchungen über die Wanderungen des Maikäfer-Engerlings (*Melolontha melolontha* L. und *Melolontha hippocastani* F.). Zeitschrift für Angewandte Entomologie [online]. 26(2), 215–252. ISSN 14390418. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.1939.tb01566.x
- SIERPIŃSKA, A., 2009. Field trials on the use of *Beauveria brongniartii* against *Melolontha* spp. white grubs in forest plantations in Poland—a case study of Koźienice. IOBC/WPRS Bulletin. 45, 449–452.
- STOOP, J. M H a H. MOOIBROEK, 1998. Cloning and Characterization of NADP-Mannitol Dehydrogenase cDNA from the Button Mushroom, *Agaricus bisporus*, and Its Expression in Response to NaCl Stress. Applied and Environmental Microbiology. 64(12), 4689–4696. ISSN 0099-2240.
- STOOP, J., M.H., J., D. WILLIAMSON a M., D. PHARR, 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. Elsevier Science. 1(5), 139–144.

- STRASSER, H., 2000. Progress report on the registration of *Beauveria brongniartii*. IOBC/WPRS Bulletin. 23(8), 93–97.
- SUKOVATA, L., T. JAWORSKI a A. KOLK, 2015. Efficacy of *Brassica juncea* granulated seed meal against *Melolontha* grubs. Industrial Crops and Products [online]. 70, 260–265. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.059
- ŠVESTKA, M a K. DRÁPELA, 2012. Assessment of the abundance of *Melolontha hippocastani* Fabr. grubs and the extent of damage to forest plantations in relation to environmental conditions. Zprávy Lesnického Výzkumu. 57(1), 8–15. ISSN 0322-9688.
- ŠVESTKA, M. a P. KAPITOLA, 2003. Přemnožení chroustů v lesích ČR a obrana proti nim. Sborník ze semináře Škodliví činitelé v lesích Česka. 2004, 52–57.
- THIEM, H., 1949. Über Erfahrungen bei der Aufzucht von Engerlingen. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Angewandte Entomologie auf der 11. Mitgliederversammlung zu München. 11, 77–95.
- TOMÁŠKOVÁ, I., M. SVATOŠ, J. MACKŮ, H. VANICKÁ, K. RESNEROVÁ, J. ČEPL, J. HOLUŠA, S. M. HOSSEINI a A. DOHRENBUSCH, 2020. Effect of different soil treatments with hydrogel on the performance of drought-sensitive and tolerant tree species in a semi-arid region. Forests [online]. 11(2). ISSN 19994907. Dostupné z: doi:10.3390/f11020211
- TROTUŞ, E., M. NAIE a A.-A. BUBURUZ, 2013. Research on the flight evolution of *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera, Scarabaeidae) species in the central of Moldavia conditions, Romania. Cercetări Agronomice în Moldova. 46(2), 65–71.
- VALENTA, V. a V. GAVELIS, 1970. The complex of measures for the control of cockchafers (*Melolontha melolontha* L., *M. hippocastani* F.). Acta Entomologica Lituanica. 1, 155–162. ISSN 0365-1959.
- VOGEL, W., 1950. Eibildung und Embryonalentwicklung von *Melolontha vulgaris* F. und ihre Auswertung für die chemische Maikäferbekämpfung [online]. Dostupné z: doi:10.3929/ethz-a-000096204
- VUNDAVALLI, R., S. VUNDAVALLI, M. NAKKA a D. S. RAO, 2015. Biodegradable Nano-Hydrogels in Agricultural Farming - Alternative Source For Water Resources. Procedia Materials Science [online]. 10, 548–554. ISSN 22118128. Dostupné z: doi:10.1016/j.mspro.2015.06.005
- WAGENHOFF, E, R BLUM a H DELB, 2014. Spring phenology of cockchafers, *Melolontha* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae), in forests of south-western Germany: results of a 3-year survey on adult emergence, swarming flights, and oogenesis from 2009 to 2011 [online]. Dostupné z: www.calsky.com.
- WORETA, D. a L. SUKOVATA, 2010. Effect of food on development of the *Melolontha hippocastani* F. beetles (Coleoptera, Melolonthidae). Forest Research Papers [online]. 71(2), 195–199. ISSN 1732-9442. Dostupné z: doi:10.2478/v10111-010-0015-0
- WORETA, D. a L. SUKOVATA, 2015. Survival and growth of the *Melolontha* spp. grubs on the roots of the main forest tree species. Forest Research Papers [online]. 75(4), 375–383. Dostupné z: doi:10.2478/frp-2014-0035
- ZAHRADNÍK, P., 2014. Metodická příručka integrované ochrany rostlin pro lesní porosty. První vydání. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce. ISBN 978-80-7458-057-4.
- ZÁRUBA, C., 1956. Ponravy-škůdci lesních škoek a kultur. B.m.: SZN Praha.
- ZIVANOVIC, V, 1972. Contribution to knowledge of the ethology of the common cockchafer (*Melolontha melolontha* L.) in western Serbia. Zastita Bilja. 23(119/120), 263–274. ISSN 0372-7866.

ZWEIGELT, F., 1928. The Cockchafer. Studies on its biology and Occurrence in southern Central Europe. Monographien zur angewandten Entomologie. 9, 453.