



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra rostlinné výroby

Diplomová práce

Význam aplikace entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na lapáky za účelem zjištění účinnosti na zachycené dospělé líčkožrouta smrkového *Ips typographus* L.

Autor práce: Bc. Jiří Bárta

Vedoucí práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

České Budějovice
2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne: 28.04.2023

.....
Podpis

Abstrakt

Diplomová práce se zabývala vlivem entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na škůdce *Ips typographus*, který je na našem území i v Evropě zodpovědný za kůrovcové kalamity. V lesním hospodářském celku Bošilec byly vybrány dvě lokality, kdy byly na každé lokalitě naistalovány vždy dva lapáky ze smrku ztepilého, jeden byl ošetřen entomopatogenní houbou *B. bassiana* a druhý sloužil jako kontrola. Výzkum na účinnost houby *B. bassiana* na vývoj lýkožrouta smrkového probíhal v jarním období. Na konci dubna byla uskutečněna aplikace roztoku houby *B. bassiana* postřikem na lapáky. Konkrétně roztok obsahoval koncentraci spor 1×10^7 v 1 ml houby *B. bassiana*, živinu a detergent. Kontrolní lapáky nebyly ošetřeny. V průběhu května bylo prováděno samotné hodnocení pokusu s následným vyhodnocením výsledků. Hlavním úkolem bylo zjistit, zda je houba *B. bassiana* schopna celkově snížit populaci lýkožrouta smrkového po náletu na ošetřené lapáky. Konkrétně jaký vliv má patogen na vývojový cyklus škůdce v průběhu nové generace pod kůrou ošetřeného lapáku. Během experimentu byly sledovány následující parametry: počet závrtů, počet snubních komůrek, počet vajíček, larev a dospělců. Zároveň byl sledován stav populace vyjádřený kategoriemi živí, mrtví nebo infikovaný jedinec. Přítomnost *B. bassiana* byla detekována po skončení primárního experimentu. Z výsledků vyplývá, že houba *B. bassiana* infikovala vajíčka a dospělé jedince. Infekce na larvách prokázána nebyla. Významným zjištěním je, že spory houby přežívají na povrchu kůry po dobu několika týdnů. Výsledky bylo prokázáno, že entomopatogenní houba *B. bassiana* je vhodným kandidátem pro ochranu lesních porostů proti lýkožroutu smrkovému.

Klíčová slova: entomopatogenní houby, *Beauveria bassiana*, *Ips typographus*, biologická ochrana, lapák

Abstract

The thesis dealt with the influence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the pest *Ips typographus*, which is responsible for bark beetle calamities in our country and Europe at large. Two sites were selected in the forest management Bošilec, where two traps of Norway spruce (*Picea abies*) were installed at each site. One was treated with the entomopathogenic fungus *B. bassiana* and the other was as a control. The research on the effectiveness of the fungus *B. bassiana* on the development of spruce bark beetle was conducted in spring. At the end of April, the application of the *B. bassiana* solution was carried out by spraying the traps. Specifically, the suspension contained a concentration of 1×10^7 spores in 1 ml of *B. bassiana* fungus, nutrient, and detergent. Control traps were not treated. The main objective was to determine whether the fungus *B. bassiana* can reduce the overall population of spruce budworm after the infestation of treated traps. Specifically, what effect does the pathogen have on the developmental cycle of the pest during the new generation under the bark of the treated trap? The following parameters were monitored during the experiment, the number of borers, the number of mating chambers, and the number of eggs, larvae, and adults. At the same time, the population status expressed by the categories of live, dead, or infected individuals was monitored. The presence of *B. bassiana* was detected after the end of the primary experiment. The results showed that the fungus *B. bassiana* infected eggs and adults. Infection on larvae was not demonstrated. A significant finding is that the spores of the fungus survive on the bark surface for several weeks. The results showed that the entomopathogenic fungus *B. bassiana* is a suitable candidate for the protection of forest stands against spruce bark beetle.

Keywords: entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Ips typographus*, biological control, trapping

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval především Ing. Andree Bohaté, PhD., vedoucí této diplomové práce, za odborné vedení, věcné připomínky, rady a konzultace, jež mi věnovala v průběhu zpracování závěrečné práce. Poděkování patří také mé rodině, která mě podporovala během celého studia.

Obsah

| | |
|---|----|
| Úvod..... | 8 |
| 1 Literární přehled..... | 9 |
| 1.1 <i>Ips typographus</i> z hlediska biologie a ekologie | 9 |
| 1.2 Přirození nepřátelé <i>Ips typographus</i> | 11 |
| 1.3 <i>Beauveria bassiana</i> z hlediska biologie a ekologie..... | 13 |
| 1.4 Studie a výzkum houby <i>Beauveria bassiana</i> | 16 |
| 1.5 Potenciální přínosy a rizika užití houby <i>Beauveria bassiana</i> proti <i>Ips typographus</i> | 19 |
| 2 Cíl práce | 21 |
| 3 Materiál a metodika..... | 22 |
| 3.1 Entomopatogenní houba <i>B. bassiana</i> | 22 |
| 3.2 Produkce spor <i>B. bassiana</i> | 22 |
| 3.3 Charakteristika výzkumné lokality Bošilec..... | 23 |
| 3.4 Výběr vhodných stromů | 24 |
| 3.5 Příprava aplikačního roztoku..... | 25 |
| 3.6 Aplikace roztoku v lesním porostu..... | 26 |
| 3.7 Vyhodnocení lesního pokusu | 27 |
| 3.8 Test virulence na larvách <i>Tenebrio molitor</i> | 28 |
| 3.9 Statistika | 30 |
| 4 Experimentální část a výsledky..... | 31 |
| 4.1 Kolonizace hostitelské dřeviny „lapáku“ | 31 |
| 4.2 Počet závrťů | 31 |
| 4.3 Počet snubních komůrek | 35 |
| 4.4 Počet larev a vajíček lýkožrouta smrkového | 36 |
| 4.5 Ověření přítomnosti houby <i>B. bassiana</i> v ošetřeném lapáku..... | 42 |
| 4.6 Laboratorní biotest <i>B. bassiana</i> na larvy <i>T. molitor</i> | 44 |

| | | |
|---|--------------------------------|----|
| 5 | Diskuse..... | 45 |
| | Závěr | 49 |
| | Seznam použité literatury..... | 50 |

Úvod

Již několik let panuje v lesních porostech na území České republiky nepříznivá situace způsobená vysokou aktivitou škůdců z podčeledi *Scolytinae*, kůrovci. Ničení a poškozování stromů, především smrků zteplých, způsobují některé druhy z této podčeledi. Nejen v českých, ale i evropských lesních porostech způsobují rozsáhlé kůrovcové kalamity. Ke stabilizaci této situace, respektive eliminaci populace lýkožrouta smrkového, nepřispívá stále se zvyšující průměrná teplota, která je důsledkem probíhající klimatické změny. Zároveň smrkovým porostům neprospívá kolísání teplot typických pro jednotlivá roční období. Teplotní podmínky mají totiž pozitivní vliv na biologický vývoj lýkožrouta smrkového, který je díky nim schopný vyrojít se několikrát do roka, a ničit tak větší objem lesních porostů, zejména pokud se jedná o monokultury.

Lesní hospodáři a spolky věnující se ochraně lesů hledají různé způsoby, jak kůrovcovou kalamitu zastavit, případně zpomalit či oslabit. Detekce napadených stromů je ale během plošného monitoringu v důsledku časové a finanční náročnosti velmi obtížná. Důležité je provádět různá opatření, která by způsobila eliminaci jedinců *Ips typographus* již před prvním rojením. Metody eliminace musejí být v souladu s Integrovanou ochranou lesa. Podle ní lze například pesticidy využívat jen v krajních případech, za doporučeného postupu. Cílem je hledat alternativní metody ochrany lesních porostů.

Entomopatogenní houby představují jistou naději pro biologickou ochranu proti kůrovcům. Zejména druh *B. bassiana* má nejlepší předpoklady pro praktické využití v boji proti lýkožroutu smrkovému. Diplomová práce je zaměřena právě na aplikaci druhu *B. bassiana* na lapáky stromů, tj. jakožto preventivní opatření v eliminaci rojících se dospělců. Po proniknutí dospělců pod kůru lapáků může aplikovaná houba infikovat následná vývojová stadia a v případě dokončení vývojového cyklu lýkožrouta může být horizontálně přenášena, a tím po aplikaci může zůstat přítomna v prostředí, a proto ji lze považovat za dlouhodobější variantu kontroly *Ips typographus*. Na míru účinnosti houby *B. bassiana* mají sice vliv abiotické podmínky prostředí, ale pokud by se zavedlo v budoucnu její praktické použití v rámci Integrované ochrany lesa, mohla by být důležitým faktorem v eliminaci lýkožrouta smrkového a dalších agresivnějších druhů kůrovců.

1 Literární přehled

1.1 *Ips typographus* z hlediska biologie a ekologie

Ips typographus (lýkožrout smrkový) neboli kůrovec náleží do řádu *Coleoptera* (brouci), čeledi *Curculionidae* (nosatcovití) a podčeledi *Scolytinae*. Jedná se o jednoho z nejznámějších zástupců druhů kůrovců pocházejících z Evropy a části Asie. Je hlavním škůdcem jehličnatých stromů, zejména smrku ztepilého (*Picea abies*), a je zodpovědný za zničení milionů hektarů lesa ročně. Vývoj lýkožrout smrkový realizuje pod kůrou většiny druhů smrků, nicméně jeho vývoj může probíhat i pod kůrou modřinu nebo borovice (Křístek & Urban 2004, Wermelinger 2004).

Ips typographus je malý válcovitý brouk, který během života podstoupí čtyři vývojová stádia. Vajíčka mají oválný tvar a jsou lesklá, jejich rozměry se pohybují od 0,5 – 1 mm. Apodní hemicefální larva, která se vylíhne z vajíček, má rohlíčkovitý tvar. Larvy lýkožrouta smrkového jsou přibližně 2 mm dlouhé, bílé barvy a živí se vnitřní kůrou jehličnatých stromů (Kolb et al. 2012). Velikost nejstaršího larválního instaru dosahuje 5-7 mm. Kuklení začíná na konci posledního larválního instaru, kdy kukla dosahuje velikosti přibližně 5 mm. Morfologické znaky dospělého jsou již patrné na kukle, kde jsou viditelné končetiny, křídla a hlava (Zumr 1995). Dospělý brouk, jenž se líhne z kukly, je zpočátku bílý, na vzduchu začne brouk postupně hnědnout. Mladý jedinec je typický svou zlatou barvou, je tedy označován za „zlatého brouka“. Postupem času začne tmavnout až černat, jeho tělo se stává lesklým. Malý hrbolík uprostřed hlavy je charakteristický pro obě pohlaví. Tento hrbolík mají samečci větší než samičky, čelo samičky je hustěji ochlupené. Tykadla dospělých jedinců jsou paličkovitá. Lýkožrout smrkový má dva páry křídel, jeden z nich je blanitý a druhý je nazýván krovkami. Zadní část krovek je zkosená, s výraznou prohlubeninou, která je specificky tečkovaná a matná. Na každé krovce jsou po stranách umístěny 4 páry zoubků. Dospělý jedinec se vyznačuje výrazným ochlupením (Zumr 1995, Kudela 1970).

V hledáčku lýkožrouta smrkového jsou především smrky, které jsou z různých příčin oslabeny. Hovoříme o stromech, které jsou oslabené z důvodu vysokých teplot, napadené různými druhy hub nebo jsou součástí polomu po větrné aktivitě. Přednost dávají vzrostlejší, tudíž starším stromům. Lýkožrout smrkový je schopen rychle vytvořit silnou populaci následující generace, zejména v polomech, kde je schopen se rychle rozmnožovat a šířit. Tato skutečnost je podpořena i tím, že strom se nemá

šanci ubránit náletu tohoto škůdce. Na polomech lýkožroutu totiž nebrání nic v založení potomstva ve velmi brzké době.

V místech, v nichž není *Ips typographus* přemnožen, může vykonávat i sanitární funkci. Přispívá ke zmlazení a přirozené obnově lesa díky přírodnímu rozkladu dřevin, které jsou z nějakého důvodu poničené. Naproti tomu v oblastech, kde dojde k přemnožení lýkožroutů, a tudíž výskytu lokálních ohnisek, dochází k nenávratným škodám i ve zdánlivě nepoškozených a zdravých porostech (Zahradník 2004). V současné době je lýkožrout nejvýznamnějším škůdcem nejen českých, ale i evropských lesů, zejména pak smrkových porostů (Schelhaas et al. 2003).

Ips typographus přečkává zimu pod kůrou infikovaného stromu. Takto dokáže přežít zimu pod kůrou stromů až 90 % jedinců lýkožrouta smrkového. Dalším způsobem, jak dospělý jedinec dokáže přezimovat, je výskyt hrabanky v těsné blízkosti stromů. Dospělý jedinec snese teploty až 20 °C pod bodem mrazu (Zumr 1995). Jaro je obdobím, kdy se dospělí jedinci lýkožrouta smrkového probouzejí k životu. Čas prvního rojení je odvozen od příznivých teplot a obvykle se pohybuje v období mezi koncem dubna a začátkem června. Samečci nalétávají do lesního porostu, kde si hledají vhodný strom k tomu, aby se prokousali jeho kůrou a začali tvořit snubní komůrky o velikosti 5 x 5 mm. Tento proces trvá 2 až 4 dny. Poté jsou do nich pomocí agregačního feromonu, který produkuje sameček, nalákány samičky. Zpravidla připadají na jednoho samečka dvě samičky, ve výjimečných případech jsou nalákány tři samičky nebo naopak jenom jedna (Jeger et al. 2017). Průměrně se v jednom stromu nachází kolem 30 snubních komůrek. Jejich reálný počet se však odvíjí od velikosti stromu, jeho stáří a počtu brouků, kteří strom napadnou. (Köhler & Schöller 2005).

Po aktu páření kladou samičky lýkožrouta smrkového vajíčka do vertikálních chodbiček (Doležal & Sehnal 2007). Počet nakladených vajíček se odvíjí od počtu samiček obývajících napadený strom, tedy čím více samiček, tím méně každá z nich naklade vajíček. Jedna samička je schopna během svého života naklást 20 až 100 vajíček, v průměru pak naklade 60 vajíček (Anderbrant 1990). Vývojový cyklus lýkožrouta smrkového je závislý na počasí a příznivých teplotách pro vývoj. Z vajíček se začnou larvy líhnout po 6-18 dnech. Jakmile se larvy vylíhnou, začnou vyžírat chodbičky kolmo k matečné chodbě. Poté začnou vznikat galerie, které představují specifický znak poškození nejen broukem *Ips typographus*, ale i ostatními zástupci kůrovců. Larvální stadium, respektive proces vývoje, trvá 6 až 50 dní. Larva během svého vývoje prochází 3 instary. K zakuklení larvy dochází ihned po dokončení vý-

voje na konci chodbičky. Následuje přeměna kukel na dospělé jedince, jejichž pohlavní dospělost nastává mezi 2 až 3 týdnem. V tomto rozmezí dospělí jedinci provádějí úživný žír, díky němuž dojde k dozrání pohlavních orgánů. Vylíhnutým dospělcům se během krmení na lýku stromu vytvrdí kutikula. Jakmile dojde u dospělců k ukončení pohlavního vývoje a procesu dokončení sklerotizace vnější schránky, opouští brouk rodný strom a hledá si nový vhodný smrk ke kolonizaci (Schebek et al. 2017, Skuhravý 2002). Doba vývoje jedné generace brouka *Ips typographus* trvá zpravidla 6 až 10 týdnů, ovšem v závislosti na specifických podmínkách daného prostředí (Pfeffer 1954). Aby se tento proces mohl uskutečnit, nesmí teplota padnout pod 10,5 °C či se vyšplhat přes 40 °C (Wermelinger & Seifert, 1998).

To, jestli je požerek jednoramenný nebo až tříramenný, závisí na počtu nalákaných samiček do snubních komůrek. Matečné chodby jsou rovné a rovnoběžné s podélnou osou kmene. Šíře matečných chodeb dosahuje 3 mm a jejich délkové rozmezí je přibližně 6-14 cm (Skuhravý 2002).

Na území České republiky v letech, kdy panují méně příznivé podmínky, může docházet k tomu, že se lýkožrout smrkový rojí pouze jednou za rok. V současné době mývá *Ips typographus* minimálně 2 generace do roka. Avšak může docházet i k situacím, kdy jsou teplotní a srážkové podmínky pro tohoto brouka tak příznivé, že se vyrojí až čtyři generace během jednoho roku. Nicméně v těchto případech může také nastat stav, kdy poslední generace nestihne dokončit svůj vývoj v dospělého jedince, a tak se pokusí přečkat zimu v larválním stadiu. Někteří jedinci zimu nepřežijí, jelikož spodní teplotní hranice životaschopnosti činí -13 °C pro larvy a -17 °C pro kukly (Kasumović 2018). Pokud strom najednou kolonizuje více samiček, dochází k vynořování a následnému znovu zavrtávání samiček v kůře stromů. Ty tímto způsobem bez potřeby dalšího páření na jiném místě kůry stromu kladou takzvané sesterské pokolení. Sesterské rojení je specifické svým typickým požerkem. Má pouze jednu matečnou chodbu, přičemž na jejím začátku není snubní komůrka (Skuhravý 2002, Wermelinger & Seifert 1999).

1.2 Přirození nepřátelé *Ips typographus*

V Evropě se vyskytuje více než 70 parazitů a predátorů lýkožrouta smrkového. Někteří z nich se vyskytují i na území České republiky, a představují tak pro lýkožrouta smrkového přirozenou hrozbu (Kenis et al. 2004). Hmyzí predátoři *Ips typographus*,

kteří se u nás vyskytují, náleží do řádu brouci a dvoukřídli. Mimo nich na lýkožroutu smrkovém predují také roztoči a datloví ptáci. Datloví ptáci z čeledi *Picidae* jsou z obratlovců nejpočetnější skupinou predátorů kůrovců. Z hlediska druhů jsou pro lýkožrouta smrkového nejsmrtelejšími datel černý (*Dryocopus martinus*), strakapoud velký (*Dendrocopos major*) nebo datlík tříprstý (*Picoides tridactylus*). Tito ptáci neohrožují jedince brouka pouze požíváním, nýbrž i tím, že odstraňují kůru, ve které brouci žijí a rozmnožují se (Kenis et al. 2004). Z řad bezobratlých je nejvýznamnějším predátorem pestrokrovečnick mravenčí (*Thanasimus formicarius*), který se vyskytuje na kmenech stromů, kde loví dospělé brouky lýkožrouta smrkového. Samičky pestrokrovečnicka kladou vajíčka do chodbiček lýkožrouta smrkového, ze kterých se následně líhnou narůžovělé larvy predátora. Larvy pestrokrovečnicka se zase pohybují pod kůrou a živí se larvami lýkožroutů (Kenis et al. 2004).

Na lýkožroutu smrkovém parazitují i parazitoidy, entomopatogenní hlístice a různé druhy mikroorganismů (Wermelinger 2002). Parazity, resp. parazitoidy lze dělit na endoparazity a ektoparazity a náležejí do řádu blanokřídli (*Hymenoptera*). Za nejúspěšnějšího ektoparazita, jenž parazituje na lýkožroutu smrkovém, lze považovat lumčíka dutohlava (*Coeloides bostrichorum*), u nějž byla prokázána 90 i více procentní účinnost (Zelený & Lozan, 2004). K endoparazitům dospělců kůrovce patří například lumčík kyjorohý (*Ropalophorus calvicornis*). Do dospělých jedinců *Ips typographus* nakladou samičky lumčíka vajíčka, která se v nich následně vyvíjí a prodělávají celý život (Lipták & Kozanek 2013). Lýkožrouti jsou schopni se po parazitaci zavrtat do kůry stromu, nicméně později blanokřídli parazitoidy svého hostitele zahubí (Kenis et al. 2004).

Přirozenými nepřáteli lýkožrouta smrkového mohou být i entomopatogenní viry, entomopatogenní bakterie, entomopatogenní houby a entomopatogenní prvoci, čili jeho patogeny. K infekci těmito mikroorganismy dochází stykem a vzájemným kontaktem mezi nakaženými dospělými jedinci nebo tím, že dospělci pozřou patogen, který se začne vyvíjet uvnitř trávicího traktu hostitele. K infekci může docházet v průběhu vývoje jedinců, od naklazení vajíček samičkami, přes larvální vývoj, kuklení, až po vylíhnutí dospělců následné generace. Mikroorganismy mohou být do populace lýkožrouta smrkového zaneseny i jedinci jiného druhu kůrovce (např. *Ips duplicatus*). Entomopatogenní viry a bakterie infikují dospělé skrze potravu, naopak houby pronikají do těla lýkožrouta pasivně pomocí přirozených otvorů nebo aktivně skrze integument (ochranný kryt těla brouka) pomocí penetrace (Wegensteiner et al.

2015). V souvislosti s eliminací lýkožrouta smrkového jsou entomopatogenní mikroorganismy velmi rozmanitou skupinou. Některé patogeny tak mohou vyvolávat zvýšenou mortalitu v populaci cílového druhu, některé ovlivňují chování jedinců nebo snižují plodnost.

Entomopatogenní houby, které napadají lýkožrouta smrkového, patří do oddělení *Ascomycota*, řádu *Hypocreales* (Wegensteiner 2004). Houby jsou extracelulárními patogeny, tedy patogeny, které se vyvíjejí v tělesné dutině, v níž koluje tekutina hemolymfa. Nejrozšířenějším patogenem hmyzu ze skupiny entomopatogenních hub je druh *Beauveria bassiana*, která způsobuje onemocnění u mnoha druhů hmyzu včetně *Ips typographus* (Takov et al. 2019). *Beauveria bassiana* je hojně zkoumaná a využívána jako biologická ochrana proti lýkožroutu smrkovému (Jakuš & Blaženec 2011). Mezi další houbové patogeny lýkožrouta patří *Isaria farinosa*, *Isaria fumosorosea*, *Akanthomyces muscarium*, *A. attenuatus* nebo prvok *Metschnikowia typographi* (Wegensteiner 2004).

1.3 *Beauveria bassiana* z hlediska biologie a ekologie

Beauveria bassiana je druh entomopatogenní houby náležející do oddělení *Ascomycota*, řádu *Hypocreales*, čeledi *Cordycipitaceae*. Jedná se o druh houby, která je pro hmyz patogenní a způsobuje hmyzu primární onemocnění s následkem usmrcení. Entomopatogenní houby jsou fakultativními saprotrofy, které jsou schopny napadat živé hostitele a po jejich usmrcení využívat jejich živiny pro svůj růst a vývoj.

Produkují řadu sekundárních metabolitů, kterými hostitele usmrccují (Jeger et al. 1998). Druh *B. bassiana* je kosmopolitně rozšířený druh, což znamená, že se přirozeně vyskytuje v mnoha různých oblastech po celém světě. Nejčastějším místem výskytu bývají tropické a subtropické oblasti, kde se vyskytuje zejména v pohlavní formě rodu *Cordyceps*, v oblastech mírného pásma je známa v anamorfní formě, tou je *Beauveria bassiana* (Rehner & Buckley 2005). *B. bassiana* se primárně vyskytuje především v zemědělských i nezemědělských půdách, kde způsobuje infekce u půdních škůdců (Zimmermann 2007a). Zároveň se hojně vyskytuje v lesních ekosystémech, kde způsobuje přirozené epizoozie u širokého spektra dospělých jedinců různých druhů kůrovců (Kim & Lee 2018, Landa et al. 2001a). Dále také rozkládá rostlinný materiál, vyskytuje se v organické hmotě a na stanovištích se zvýšeným výsky-

tem hmyzu (Landa et al. 2001a, Rehner & Campbell 2003, Meyling & Eilenberg 2007).

Beauveria bassiana je bílá vláknitá houba, která se vyznačuje produkcí nepohlavních konidií, což jsou malé výtrusy, pomocí nichž se šíří v prostředí (Kumar & Sharma 2020). Bílé vatovité mycelium, které houba *Beauveria bassiana* vytváří, se může vlivem sporulace stávat celistvým, kompaktním. Změna barvy na krémově bílou je podmíněna stářím kultury. Kolonie ze spodní strany, které narostly na umělé živné půdě, mají bílou až nažloutlou barvu. Během doby, kdy se houba vyvíjí, se na myceliu utváří baňkovité konidiogenní buňky, které přechází v rachis o pravidelné délce 20 μm . Pro konidie je typické uspořádání cik – cak. Vyvíjí se na rachisu, konkrétně jedna konidie na jednom zubu (Zimmermann 2007a). Konidiogenní buňky přecházejí z kulovitých rozměrů až do tvaru baňkovitého. Rozměry jednotlivých konidií se pohybují v rozmezí 2-3 x 2,5 μm (Mycobank 2013a,b).

Konidie se nejčastěji šíří vzduchem a následně se přichytávají na svého hostitele. Jakmile se přichytí, vyklíčí v hyfu a následně formují mycelium (vegetativní forma houby). Po určité době pronikne pomocí penetračního hrotu do kutikuly hmyzu (Raja et al. 2014). Houba je navíc známá svou produkcí enzymů, které mají za úkol rozložit kutikulu, a umožnit tak šíření spor houby na další brouky (Pedrigo et al. 2019). Před proniknutím se na konci hyfy vytváří útvar apresorium, který produkuje právě primární metabolity, a tím narušuje kutikulu. Penetrační hrot následně tlakem snadněji pronikne do tělní dutiny hostitele. Uvnitř hostitele houba vyplňuje tělní dutinu, kdy se v hemolymfě vytváří blastospory, hyfová tělíska, která využívají tkáň a orgány. Houba následně způsobí hostitelovu smrt (Raja et al. 2014).

Entomopatogenní houby jako je *Beauveria bassiana* se do svého hostitele mohou dostat i pomocí přirozených otvorů. Při proniknutí přes ústní otvor spory uvnitř napadeného jedince produkují toxiny, které jej zabíjejí (Koul & Walia 2008). Pro *B. bassiana* je typická produkce sekundárních metabolitů (*bassiacridin*, *bassianin*, *bassianolid*, *beauvericin*, *beauveriolid*, *oosporein*, *tenellin*). Jejich působením se snižuje imunitní odolnost daného hostitele, což má za následek jeho usmrcení (Steinwender et al. 2010). V pohlavní fázi houba *Cordyceps* produkuje na hmyzu stromata, ve kterých jsou uloženy plodnice houby perithecia, ve kterých jsou uloženy askospory ve vřecích. Askospory mají podobu větších výtrusů a rovněž se uvolňují do prostředí, kde mohou po napadení hostitele klíčit a vytvářet mycelium, které následně penetruje do hostitele (Hoy & Thomas 1998). *Beauveria bassiana* je také fakultativní sapro-

trof, jenž se vyznačuje tím, že se může nejprve chovat jako parazit a po usmrcení hostitele jako saprofyt.

Druh *B. bassiana* je hlavním patogenem mnoha druhů hmyzu včetně mnoha zemědělských škůdců, kteří část svého vývoje stráví v půdě. Ve skleníku infikuje zejména mšice, třásněnky, molice, svilušky a další. Díky vlastnosti hubit či regulovat populace těchto škůdců je často záměrně využívána jako prostředek biologické ochrany. Je součástí mykoinsekticidů, které jsou ve světě produkovány (Humber 2001). O této houbě jakožto přirozeném nepříteli hmyzu je známo, že infikuje jak dospělé jedince, tak i larvální nebo nymfální stádia hmyzu (Sánchez-Tocino et al. 2014). Nejúčinnější je v raných fázích vývoje, infikuje i vajíčka hmyzu. Zároveň může infikovat i kukly. *B. bassiana* je účinná i proti dospělému hmyzu, nicméně záleží na druhu hostitele. U kůrovců infikuje hlavně dospělé jedince a vajíčka, larvy jsou infikovány sporadicky (McPherson 1987).

Přežívání a šíření houby *Beauveria bassiana* v prostředí je závislé nejen na působení biotických faktorů, ale i těch abiotických. Vlhkost, sluneční záření a teplota mají zásadní vliv na vývoj entomopatogenních hub. Teplota má za následek ovlivnění této entomopatogenní houby různými způsoby. Může ovlivňovat délku vývoje houby a zároveň délku procesu usmrcení hostitele. Pro růst a vývoj houby *Beauveria bassiana* je optimální teplota v rozmezí 23-28 °C. Spodní hranice teploty pro vývoj houby se pohybuje okolo 5-10 °C. Toto rozmezí teplot lze označit za hranici životaschopnosti této houby. Naopak za maximální výši teplot je považována teplota nad 30 °C. Smrtelná teplota pro spory je 37 °C (Zimmermann 2007a). Čas, který je potřeba k usmrcení hmyzu entomopatogenními houbami, a stupeň infekce jsou přímo úměrné s okolní teplotou (Inglis et al. 2001).

Vlhkost je dalším zásadním činitelem, od kterého se odvíjí účinnost a životaschopnost entomopatogenních hub v prostředí. Důležitý parametr v přirozeném prostředí, jenž zaručuje klíčivost spor, růst, vývoj a infekci, je přítomnost vody, nikoliv volné vody. Houba *Beauveria bassiana* stejně jako převážná většina entomopatogenních hub vyžaduje pro svůj vývoj vysokou relativní vlhkost. Pro klíčivost spor a následnou proliferaci na povrch těla hostitele vyžaduje více než 90-95 % relativní vzdušné vlhkosti. Jakmile jsou vytvořeny příznivé podmínky, objevují se u spor známky klíčení, tvorba klíčnicích hyf a následných infekcí (Hallsworth & Magan 1999). V půdách je infekce možná i při nižší vlhkosti, kde mortalita hmyzu může dosáhnout vysokých hodnot (Ekesi et al. 2003). Kombinace teploty a vlhkosti pro-

středí je ve velmi úzké korelaci. Symbióza těchto dvou abiotických faktorů má značný vliv na perzistenci houbových spor a samotnou životnost houby *Beauveria bassiana* (Zimmermann 2007a).

Kombinací abiotických faktorů je ovlivněna i samotná reakce hostitelského hmyzu na infekci houbou *Beauveria bassiana* (McCoy et al. 1992). Značný vliv na poškození entomopatogenních hub má také sluneční záření, primárně podíl ultrafialových paprsků. Nejškodlivějším faktorem prostředí, který ovlivňuje perzistenci samotných houbových insekticidů, je sluneční záření, zejména UVB spektra (285-320 nm) a UVA spektra (320-400 nm). Citlivost konidií, hyfových tělísek a hyf k účinkům slunečního záření je taktéž výrazná (Braga et al. 2001). Největší škody způsobuje ozáření krátkými vlnovými délkami. Jako nejškodlivější část přirozeného záření se jeví UV-B (285-320nm) (Fargues et al. 1997).

Pokud chceme dosáhnout největší efektivity eliminace některého z druhů hmyzu, je nejvhodnější spory houby *Beauveria bassiana* aplikovat v prostředí s vyšší vlhkostí a teplotami mezi 15 a 25°C. Abychom ještě zvýšili šanci na úspěch hubení daného druhu, měla by být houba aplikována v době, kdy jsou v prostředí přítomny nejmladší instary larev nebo nymf hmyzu, protože právě v tom okamžiku jsou na působení houby nejcitlivější (Boivin et al. 2013). Při produkci spor potřebuje houba k růstu, vývoji a následné sporulaci dostatek uhlíku, dusíku a dalších základních živin (Kostanjšek & Kogovšek 2008).

1.4 Studie a výzkum houby *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana je známá jako účinný prostředek biologické ochrany proti širokému spektru hmyzích škůdců. *B. bassiana* byla rozsáhle studována a o její ekologii je k dispozici velké množství informací. Studie účinnosti čistých kmenů i biopreparátů ukazují na její výbornou schopnost eliminovat přemnožené druhy škůdců. V současné době je hojně záměrně využívána proti mšicím, třásněnkám, molicím a roztočům nejen ve skleníkovém prostředí, ale i v přirozených podmínkách. Dále houba *B. bassiana* vyniká svou schopností přežít v různých podmínkách prostředí. Zpravidla je schopna přežít v přírodě i v mrazech, při vysoké teplotě i nízké vlhkosti, popřípadě při omezeném výskytu živin. Je také schopna přežít v široké škále půdních typů včetně písčítých, bahnitých a jílovitých (Khan 2016). Kromě toho se jí daří i

v rozsáhlém spektru stanovišť od zemědělských pozemků, přes lesy až po městské oblasti (Kumar & Singh 2018).

Pojmenování této houby je odvozeno od objevitele Agostina Bassi di Lordiho, italského vědce, který jako první sledoval nákazu houbou *Beauveria bassiana*. První zmínka o této houbě, tudíž i počátky evidence se datují k roku 1807. Chovy bource morušového bývaly opakovaně postihovány touto nákazou, známou také jako bílá muskardina. Mumifikace a usmrcení jednotlivých vývojových stadií bource signalizovaly hlavní znak výskytu této nákazy. První pokusy byly tedy realizovány na housenkách bource morušového *Bombyx mori* (Rhener 2005, Zimmermann 2007a). Vuillemin oficiálně popsal rod až o 100 let později, konkrétně v roce 1912. Van Beneden v jednom ze svých pokusů již v roce 1902 vložil infikovaného jedince do sklenice se zdravým jedincem a následně pozoroval, že zdravý jedinec zemřel na infekci houbou. Van Beneden také prováděl pokusy, aby určil optimální podmínky pro růst houby a hubení hmyzu (Van Beneden 1902). Podrobnější taxonomii se věnovali vědci jako de Hoog, MacLeod a Petch (Vega & Blackwell 2005). V roce 1954 byly spojeny MacLeodem veškeré druhy rodu *Beauveria* pouze do dvou druhů – *Beauveria bassiana* a *Beauveria tenella* (Weiser 1966). O necelých 20 let později, roku 1972, byl rod *Beauveria* rozdělen de Hoogem na tři druhy. Konkrétně na – *Beauveria alba*, *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii* (Zimmermann 2007).

V průběhu let mnoho vědců navazovalo na průkopníky, kteří houbu *B. bassiana* zkoumali. Primárně z hlediska kontroly jednotlivých hmyzích škůdců, kteří svým přemnožením ovlivňují zemědělskou produkci. Na našem území byla *Beauveria bassiana* podrobněji studována od 70. let minulého století. Tehdy českoslovenští vědci v laboratoři analyzovali morfologické vlastnosti houby *Beauveria bassiana*, její patogenitu a schopnost produkovat konidie. Studovali také různé faktory prostředí, jako je teplota, vlhkost a světlo. Výzkum prováděli na různých druzích hmyzu včetně mandelinky bramborové, zavíječe kukuřičného a mouchy domácí. Výsledkem studie bylo, že *Beauveria bassiana* by mohla být použita jako alternativní prostředek k chemickým insekticidům (Kubát 1970). Jako prostředek biologické ochrany škůdců se *Beauveria bassiana* využívala už od 50. let 20. století (Whipps 1999). Využití houby *Beauveria bassiana* k hubení lýkožrouta bylo poprvé zaznamenáno počátkem 70. let minulého století výzkumníky z Československa (Kolarik & Václavík 1974). Během těchto let v Československu probíhalo i několik výzkumů na účinky aplikace houby *Beauveria bassiana* na lýkožrouta smrkového *Ips typographus*. Vědci tehdy

zaznamenali vysokou náchylnost druhu *Ips typographus*, která vedla i k vysoké mortalitě populace po tom, co byla vystavena této houbě (Kolář & Šebela, 1970).

První studie, která prokázala, že *Beauveria bassiana* může být využita jako účinný prostředek proti lýkožroutu smrkovému, byla v Československu provedena v roce 1989. Tento výzkum přinesl pozitivní výsledky, jež byly publikovány v časopise *Folia Entomologica Bohemoslovaca*. Vědci zjistili, že *B. bassiana* je účinným prostředkem pro kontrolu *Ips typographus*. Houba dokázala v laboratorních pokusech snížit populaci lýkožrouta smrkového až o 99 %. Studie v přirozených podmínkách lesních porostů prokázala, že houba se dokázala rychle šířit a nebyla ovlivněna chladnými zimními teplotami v Československu. Během výzkumu dokázala houba hubit zejména dospělé jedince. Houba i po vyhubení lýkožrouta smrkového zůstala přítomna v kmenu stromu, což se prokázalo jako předpoklad, že by mohla být efektivním dlouhotrvajícím prostředkem pro kontrolu kůrovcových náletů (Košťál & Košťálová, 1989).

S výsledky získanými na našem území se shodují i zahraniční studie, které dokazují, že *Beauveria bassiana* je schopna účinně snížit populaci lýkožrouta smrkového. Výzkum publikovaný v časopise *Biological Control* říká, že tato houba je schopna zahubit larvy a kukly brouka a snižuje jejich počet až o 50 %. Zároveň dokáže snížit počet dospělých jedinců až o 90 %. Podle těchto studií by houba *Beauveria bassiana* mohla být využívána jako účinné kontrolní opatření proti *Ips typographus* (Goméz-Jiménez et al. 2011). *Beauveria bassiana* se nejčastěji používá v experimentech k potlačení zamoření lýkožroutem smrkovým v Evropě a Severní Americe (Kostov & Petkov 2018).

Kromě laboratorních testů jsou také prováděny testy terénní, aby se posoudila účinnost *Beauveria bassiana* při ochraně hmyzích škůdců v přirozeném prostředí. Během těchto experimentů dochází ke stanovení účinnosti houby na populaci kůrovců (Kaur & Singh 2020). Testování houby *Beauveria bassiana* na lýkožrouta smrkového v lesních porostech se provádí aplikací houby na kůru napadených stromů. Houba se aplikuje ve formě suchého prášku smíchaného s nosičem jako je voda, mastek nebo jíl. Na kmen stromu je houba aplikována pomocí rozprašovače, postřikovače nebo injekcí. Po aplikaci může houba infikovat jedince různých vývojových stadií *Ips typographus* žijící v kůře, případně napadne i dospělé brouky při rojení (Schylter & Stenlid 2001).

Četnost aplikace na napadené stromy závisí na závažnosti napadení a způsobu ošetření (Schopf et al. 2014). Pokud by byla aplikace houby úspěšná, měla by pomoci potlačit populaci lýkožrouta smrkového současně s dalšími druhy kůrovců. Tím, že infikuje larvy brouků, usmrcuje je, a ty tím neukončí vývoj v dospělce, dochází ke snížení populace lýkožrouta smrkového (Goméz-Munuera & Pérez-Hidalgo 2012).

Výzkum praktického využití entomopatogenních hub proti lýkožroutu smrkovém probíhal i na Jihočeské univerzitě v Č. Budějovicích pod vedením prof. Zdeňka Landy. V letech 1998-2011 realizovali řešitelé ze Zemědělské fakulty JU pilotní monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v zemědělských i nezemědělských půdách Jihočeského kraje a současně rozsáhlý monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub vázaných na lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) v porostech smrčín na vybraných lokalitách NP Šumava, KRNAP a CHKO Jeseníky v ČR (Landa et al. 2010, Landa et al. 2001a, Landa et al. 2001b). Během monitoringu byli na každé lokalitě vyhledáváni infikovaní dospělci lýkožrouta smrkového, kteří byli umístěni do sterilních falkonů, dále byl odebrán vzorek kůry z napadeného stromu, kde se nevyskytovali infikovaní dospělci, a následně byl odebrán vzorek půdy v okolí napadeného stromu *Ips typographus*. Po zpracování vzorků v laboratoři bylo prokázáno, že se ve všech půdních vzorcích vyskytovaly druhy entomopatogenních hub s dominancí druhů *Beauveria bassiana* a *Metarhizium brunneum*, přičemž dominance *Beauveria bassiana* byla při monitoringu hub v populacích kůrovce smrkového jednoznačně pozorována na všech lokalitách. Z dospělců a kůr byly kmeny *B. bassiana* izolovány a kmeny vyčištěny. Všechny kmeny *B. bassiana* byly charakterizovány a nejúčinnější kmeny proti dospělým jedincům *Ips typographus* byly hromadně vyprodukovány a re-introdukovány zpět do lokalit svého původu. Reintrodukce byla zavedena pro účely integrované ochrany lesa proti populaci kůrovce (Landa et al. 2010, Landa et al. 2008, Landa et al. 2007). V současné době je patentován kmen CCM 8382 houby *B. bassiana*, s nímž byl realizován pokus v rámci této diplomové práce.

1.5 Potenciální přínosy a rizika užití houby *Beauveria bassiana* proti *Ips typographus*

Beauveria bassiana je účinná proti *Ips typographus*, jenž je jedním z hlavních škůdců jehličnatých stromů. Jde o přirozeně se vyskytující druh houby, který je specificky

spjat s jedinci *Ips typographus*, tudíž neškodí jinému užitečnému hmyzu. Mezi výhody použití této houby proti lýkožroutu smrkovému patří skutečnost, že může být využita jako alternativní prostředek k chemickým insekticidům. Ve světě existují firmy, které houbu *B. bassiana* masově produkují a na bázi této houby vyrábějí biopreparáty. Experimentální biopreparáty se mohou snadno aplikovat buď jako postřikovou suspenzi, nebo aplikaci v práškové formě. Aplikace mohou být prováděny i letecky, zejména v místech kůrovcových ok (Landa et al. 2010, Landa et al. 2007, Kamoun & Humber 2005).

Beauveria bassiana se jako prostředek biologické ochrany používá již několik let a zatím nebyl prokázán vznik rezistence. Některé studie dokazují, že vývoj odolnosti lýkožrouta smrkového proti houbě *Beauveria bassiana* je možný, nicméně riziko výskytu je zatím poměrně nízké (Pinnoi et al. 2015).

Jedním z dalších témat, které provází výzkum a využívání houby *Beauveria bassiana*, je potenciální riziko účinku na necílové organismy. Houba může ovlivnit i jiné druhy, například užitečný hmyz (opylovače). To může následně vést ke snížení biodiverzity. Testy na opylovatele byly realizovány v rámci možnosti využití opylovatelů ve sklenících k šíření spor *B. bassiana* do populací skleníkových škůdců. V důsledku regulace populace opylovatelů nebyla myšlenka využití k šíření spor realizována. Vliv aplikace *B. bassiana* v přirozených podmínkách na přirozené nepřátele byl sledován, nicméně vysoká mortalita přirozených nepřátel byla minimální (Bischoff et al. 2013).

V laické veřejnosti existují také obavy, že by užití *B. bassiana* proti *I. typographus* mohlo vést ke zvýšení výskytu spor houby v prostředí, a tím likvidaci širokého spektra hmyzích hostitelů. Na základě tohoto předpokladu byly prováděny studie, které prokázaly, že toto riziko není veliké (Bischoff et al. 2013, Kostovčík & Kolařík 2017), protože se v přírodě vyskytují mykofágní druhy, které se živí sporamai hub. Díky těmto druhům je v přírodě zajišťována rovnováha.

Celkové shrnutí je takové, že houba *Beauveria bassiana* by mohla být využívána v praktické ochraně lesních porostů, kde nemohou být plošně používány insekticidy. Zejména pak v chráněných krajinných oblastech a na územích národních parků.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je hodnocení účinnosti entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na lýkožrouta smrkového po aplikaci na odchytné lapáky. V průběhu času byl sledován vývoj lýkožrouta smrkového na ošetřených a neošetřených lapákách.

- 1) Sledování abundance dospělců lýkožrouta smrkového odchycených na lapákách po jarním rojení.
- 2) Sledování vývojového cyklu lýkožrouta smrkového na ošetřených a neošetřených lapákách v časových intervalech.
- 3) Hodnocení přežívání spor houby *Beauveria bassiana* po aplikaci na lapáky.
- 4) Hodnocení účinnosti houby *B. bassiana* na dospělé lýkožrouta smrkového, resp. vybraného alternativního hostitele pomocí laboratorního biotestu.

3 Materiál a metodika

3.1 Entomopatogenní houba *B. bassiana*

Kmen CCM 8382 entomopatogenní houby *B. bassiana* byl odizolován v roce 2004 z infikovaného dospělého lýkožrouta smrkového *Ips typographus* na lokalitě Prameny Vltavy, NP Šumava, ČR. Kmen je patentován a je uložen v České sbírce mikroorganismů (CCM) v Brně.

3.2 Produkce spor *B. bassiana*

Pro produkci spory byla použita čistá kultura kmene, která byla kultivována na živné půdě PDA (Potato Dextrose Agar) po dobu 10 dní při 25 °C. Z čisté kultury byla připravena suspenze, ve které byl stanoven titr spor, a následně byla suspenze adjustována na titr o koncentraci spor 1×10^7 spor v 1 ml.

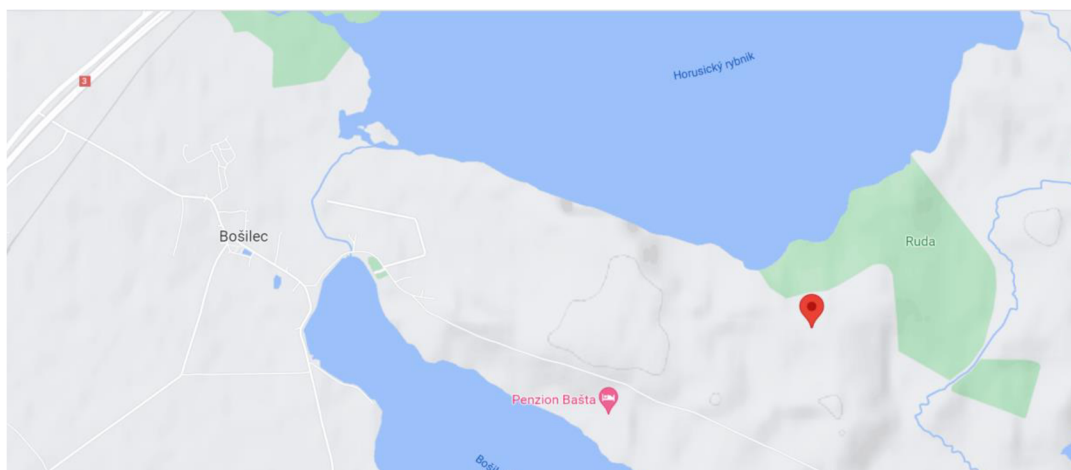
Pro větší produkci spor byl připraven a vysterilován přirozený substrát, který byl po vychladnutí naočkován suspenzí kmene CCM 8382. Nainokulovaný přirozený substrát v Erlenmeyerových baňkách byl během dne minimálně třikrát důkladně protřepáván, aby došlo k rovnoměrnému nasáknutí suspenze do partikulí přirozeného substrátu. Po nasáknutí byl nainokulovaný přirozený substrát převeden do sterilních plastových boxů. Kultivace probíhala v 25 °C po dobu 14 dnů. Po této době byla odstraněna víka z boxů a biomasa kmene byla sušena. Po usušení byly sklizeny čisté spory kmene *B. bassiana*, které byly dále využity v lesním experimentu.

Pro zjištění koncentrace byl navážen 1 gram sklizených čistých spor, který byl převeden do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky. K čistým sporám bylo přidáno 25 ml 0,05% roztoku Tween 80 a 2 ml přípravku Istroekol (úč. 1. olej řepkový – 80%). Istroekol byl použit jako smáčedlo. Spory ve zkumavce byly po dobu 30 minut protřepávány na třepačce Multi Reax (Heildolph). Následně byl roztok doplněn do 100 ml a byl dále ředěn ředící řadou tak, aby bylo možné koncentraci spor spočítat.

3.3 Charakteristika výzkumné lokality Bošilec

Lokality, kde byly prováděny pokusy, se nachází na lesním hospodářském celku Obecní lesy Bošilec. Obec Bošilec leží v okrese České Budějovice v Jihočeském kraji. Nachází se zhruba 6 km jihozápadně od Veselí nad Lužnicí a 25 km severovýchodně od Českých Budějovic.

První porost je v lesním hospodářském celku (dále jen LHC) označovaný značkou 506C12. Nachází se přibližně 2,9 km východně od obce Bošilec. Věk celého porostu je odhadován na 115 let. Výměra plochy činí 5,14 ha. V hospodářské knize je plocha označována jako lesní typ 3P1 (oglejená kyselá jedlová doubrava modální).¹ Na stanovišti je cílový hospodářský soubor 47 (hospodářství oglejených stanovišť středních ploch).² Procentuální zastoupení dřevin je následující: borovice 90 %, smrk 5 %, dub 5 %. Celá plocha je po svém obvodu zastíněna lesním porostem.



3

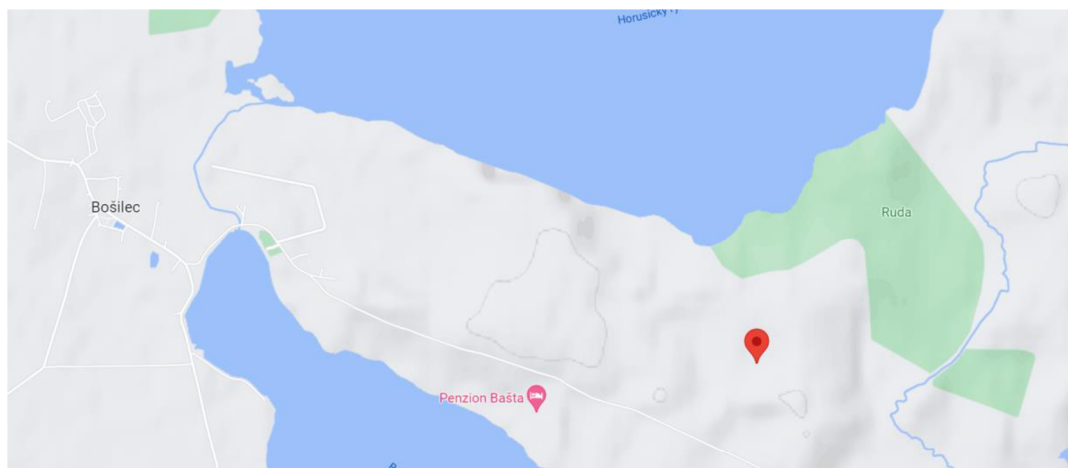
Druhý porost (v této práci označován jako porost č. 2) je v LHC (lesním hospodářském celku) označen kódem 506D09a. Nachází se cca 2,7 km východně od obce Bošilec. Věk porostu v této části lesa je 85 let. Plocha je vyměřena na 2,04 ha. Lesní typ je stejně jako v případě plochy číslo jedna 3P1. Stejný je i cílový hospodářský

¹ Přehled lesních typů a souborů lesních typů v ČR (stav k 1.1.2019). Lesnická typologie v ČR. Dostupné z: <http://katalogy.publikace.com/typologie-lesa/grafy-a-tabulky>

² Hospodářská úprava lesů (HÚL). Cílové hospodářské soubory. Dostupné z: <https://hul.mendelu.cz/teorie-cviceni-hul-i/hospodarsky-soubor/chs/>

³ Souřadnice plochy č. 1. Dostupné z: <https://www.google.com/maps/place/49%C2%B008'44.5%22N+14%C2%B040'54.3%22E/@49.1469863,14.6671223,14.54z/data=!4m3!1m8!3m7!1s0x470cb3ece971fab:0xa7fc3d5b24cf65e7!2s373+65+Bo%C5%A1ilec!3b1!8m2!3d49.1493184!4d14.6462193!16s%2F07kg3gt!3m3!8m2!3d49.145693!4d14.681755!5m1!1e4>

soubor, který stejně jako v případě první plochy nese číslo 47. Skladba dřevin je na tomto místě následující: borovice 80 % a smrk 20 %. Téměř celá plocha je zastíněna lesním porostem, výjimku tvoří pouze severní strana, na níž se nachází cesta. Ta v této části tvoří světelný průzor.



4

3.4 Výběr vhodných stromů

Po domluvě s místním odborným lesním hospodářem bylo rozhodnuto, že pro pokus budou na obou lokalitách vybrány smrky v rozmezí 70–100 let. Právě smrky v tomto věkovém rozpětí jsou nejnáchylnější k náletům samečků lýkožrouta smrkového. Obě vybrané lokality byly od sebe vzdáleny necelých 200 m. Vzrostlé stromy určené pro pokus na jedné lokalitě byly vybrány tak, aby byly od sebe vzdáleny maximálně do 20 metrů. Tímto způsobem byly vytvořeny téměř totožné podmínky pro ošetřenou i kontrolní variantu na dané lokalitě.

Pro pokusy bylo důležité, aby byly stromy pokáceny na plochu, která byla zastíněna. Zastínění bylo důležité nejen pro účinnost ve smyslu nalákání dospělců lýkožrouta smrkového, ale i proto, aby nedošlo k inaktivaci spor kmene houby *B. bassiana* po jeho aplikaci na takto připravené lapáky. Těžbu stromů prováděl kvalifikovaný těžář jednoruční motorovou pilou za pomoci palice a klínu. Po pokácení všech vybraných smrků (2 x 2 smrky) následovalo jejich důkladné odvětvení.

⁴ Souřadnice plochy č. 2. Dostupné z:

<https://www.google.com/maps/place/49%C2%B008'38.1%22N+14%C2%B040'51.4%22E/@49.1464117,14.6714093,14.74z/data=!4m3!1m8!3m7!1s0x470cb3ece971fab:0xa7fc3d5b24cf65e7!2s373+65+Bo%C5%A1ilec!3b1!8m2!3d49.1493184!4d14.6462193!16s%2Fm%2F07kg3gt!3m3!8m2!3d49.143903!4d14.680941!5m1!1e4>



Obrázek 1 – Kácení vytipovaného stromu, autor Jiří Bárta, 29. 4. 2022

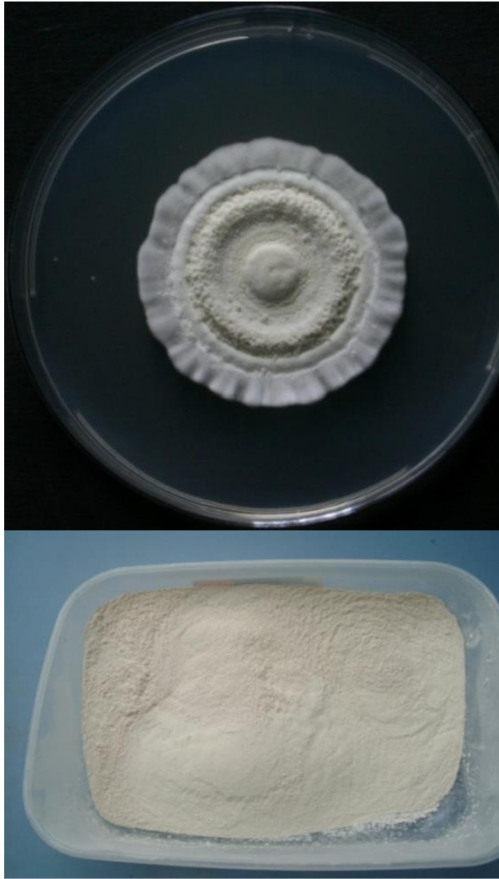


Obrázek 2 – Odvětvení vytipovaného stromu, autor Jiří Bárta, 29. 4. 2022

Na každé lokalitě byly pokácené smrky resp. „lapáky“. Na první lokalitě byla dvojice označena jako „Lapák 1“ (ošetřený a kontrolní lapák) a na druhé „Lapák 2“ (ošetřený a kontrolní lapák).

3.5 Příprava aplikačního roztoku

Pro účely ošetření byly čisté spory kmene *B. bassiana* naváženy v množství určeném k ošetření lapáků. Před vlastní aplikací byla připravena suspenze. Do přípravku, který obsahoval životaschopné spory houby *Beauveria bassiana* (obr. 3c), bylo přidáno 300 ml vody s 10 ml Istroekolu. Obě dvě složky bylo potřeba důkladně promíchat v uzavřené nádobě. Směs byla několikrát důkladně protřepána, aby došlo k rovnoměrnému uvolnění spor z klastrů spor, které druh *B. bassiana* po sklizni čistých spor dělá. Do připraveného roztoku byly přidány 2 kapky přípravku Jar, který též zaručil lepší uvolnění spor z klastrů. Přípravky Istroekol a Jar jakožto detergenty zajistily lepší ulpění spor na povrchu lapáků a přítomný řepkový olej i ochranu spor před případným suchým počasím.



Obrázek 3a – Čistá kultura *B. bassiana*
Obrázek 3b – Sklizené čisté spory houby



Obrázek 3c - Směs aplikovaného roztoku, autor Jiří Bárta, 28. 4. 2022

Vzniklá suspenze (roztok) spor měla typicky bílou barvu, což bylo dáno barvou entomopatogenní houby *B. bassiana*. Roztok byl připraven přibližně dvě hodiny před samotnou aplikací na lapáky. Časový odstup hrál roli v aktivaci spor tím, že poskytl dostatek času na to, aby spory nasály dostatek vody, která je důležitá k nabobtnání a následnému urychlení klíčení spor po aplikaci.

3.6 Aplikace roztoku v lesním porostu

Na lokalitách s umístěnými lapáky byla připravená suspenze spor v litrové lahvi převedena těsně před samotnou aplikací do 10 litrů vody, které byly v tlakovém zádo-
vém postřikovači. Finální roztok obsahoval v každém ml 1×10^7 spor. Tato koncentrace spor je dostatečně účinná. Finální roztok byl před samotnou aplikací na kmen poraženého stromu (lapáku) důkladně promíchán, a i v průběhu aplikace byl pohyby protřepáván. Pro každý ošetřený lapák byl připraven finální roztok zvlášť.



Obrázek 4 - Smíchání všech komponentů těsně před aplikací roztoku, autor Jiří Bárta, 29. 4. 2022

Postřik s obsahem spor kmene *B. bassiana* byl nanášen rovnoměrně po obvodu celých kmenů lapáků. Aplikace směsi byla provedena za polojasného počasí, kdy se teplota pohybovala okolo 18 °C. Tyto podmínky byly pro nanesení roztoku vhodné, jelikož nedošlo ke srážkám, které by mohly přípravek z lapáků smýt těsně po aplikaci. Ošetření bylo důkladné, aby aplikovaná tekutina mohla proniknout mezi šupinky kůry. Po aplikaci následovalo zakrytí kmene odřezanými větvemi, aby se zvýšila pravděpodobnost náletu samečků lýkožrouta smrkového. Kontrolní lapáky nebyly ošetřeny a byly také zakryty ořezanými větvemi.

3.7 Vyhodnocení lesního pokusu

Hodnocení stavu lapáků probíhalo v časových intervalech v závislosti na kolonizaci lapáků dospělci lýkožrouta smrkového.

První hodnocení (15. 5. 2022) bylo zaměřeno na sledování rozdílů v počtu závrťů, které způsobují samečci lýkožrouta smrkového. Z každého lapáku byla vyříznuta kůra o rozměrech 10 x 20 cm ve čtyřech úsecích (po 2,5 metrech), na nichž byly závrty počítány. Během druhého měření (22. 5. 2022) bylo zjišťováno, jaký je ve stro-

mech počet snubních komůrek po náletu samečeků lýkožrouta smrkového. Pro stanovení počtu snubních komůrek byla z kontrolního i ošetřeného lapáku odebrána kůra o velikosti 10 x 20 cm. Vzorek kůry byl z každého lapáku vykrojen jeden metr od spodní hranice stromu. Třetí hodnocení bylo zaměřeno na počet larev. Po nalákání samiček do snubní komůrky došlo se samečkem ke kopulaci a následnému kladení vajíček, z nichž se vylíhly larvy *Ips typographus*. Hodnocení larev bylo sledováno na 4 úsecích každého lapáku. Každý úsek byl ve vzdálenosti 2,5 m. Na každém úseku byla vyříznutá kůra o rozměru 10 x 20 cm.

3.8 Test virulence na larvách *Tenebrio molitor*

Hodnocení virulence bylo zjišťováno pomocí biotestu na larvách potměníka moučného *Tenebrio molitor*. Z chovu byly vybrány larvy stejné velikosti a následně se povrchově sterilovaly v roztoku 0.05% NaClO. Po namočení do roztoku po dobu 3 s byly třikrát promyty ve sterilní destilované vodě a ponechány na filtračním papíře, aby oschly. Suché larvy byly ponořeny do suspenze houby 1.0×10^7 spor v 1 ml. Ošetřené larvy byly umístěny jednotlivě do buněk vícekomůrkové destičky (vlhké komůrky). Kontrola byla připravena namáčením larev do 0.05% roztoku Tween 80. Pro každou variantu bylo ošetřeno 20 larev. Vlhké komůrky byly inkubovány ve 20 °C a 25 °C. Biotest byl vyhodnocován ve dvoudenních intervalech po dobu 20 dnů. Účinnost hub, resp. vývoj patogena na larvách hostitele, byla hodnocena pomocí stupnice FDI (Fungal Development Index). Každé larvě byl přiřazen pomocí binokuláru index a následně spočítán průměrný index. Stupnice vývoje houbového patogena FDI je v rozmezí indexů od 0 do 3, v intervalu 0,5.

Charakteristika jednotlivých indexů je následující: 0,0 = na povrchu larvy *T. molitor* nejsou viditelné žádné symptomy houbové infekce (např. melanizační skvrny); 0,5 = na povrchu larvy se vyskytují drobné, ohraničené melanizační skvrny, které nesplývají do větších celků, larva se ještě hýbe; 1,0 = melanizační skvrny na povrchu larvy splývají a vytvářejí rozsáhlá ohniska, larva je mrtvá; 1,5 = na povrchu larvy jsou viditelná vlákna houby; 2,0 = povrch larvy je porostlý hustým vzdušným myceliem bez přítomnosti konidií; 2,5 = na vzdušném myceliu jsou zjištěny morfologické struktury související s počátkem sporulace; 3,0 = na vzdušném myceliu jsou zjištěny morfologické struktury související s plnou sporulací *B. bassiana*.



Obrázek 5 - Aplikace roztoku na kmen stromu, autor Jiří Bárta, 29. 4. 2022



Obrázek 6 - Zakrytí kmene větvemi, autor Jiří Bárta, 29. 4. 2022

3.9 Statistika

Pro hodnocení počtu závrtů způsobených dospělými samečkami *Ips typographus* byla data podrobena analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru pro statistickou analýzu (StatSoft Inc., verze STATISTIKA 12). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Tukeyho testu ($P < 0,05$).

4 Experimentální část a výsledky

4.1 Kolonizace hostitelské dřeviny „lapáku“

Po aplikaci entomopatogenní houby *B. bassiana* byly lapáky zakryty větvemi. Lapáky byly vizuálně hodnoceny v čase. Přítomnost samečků po rojení byla patrná až po 16 dnech od aplikace. Hlavním důvodem pozdějšího náletu (rojení) byly podprůměrné denní teploty a zvýšená oblačnost na konci dubna a v prvních týdnech května 2022. Po náletu dospělců usnadnila zavrtávání a tvorbu snubních komůrek samečky lýkožrouta smrkového nefunkčnost pryskyřičných kanálků způsobená poškozením vodících pletiv stromů. Po úspěšné kolonizaci zpravidla dochází k uvolňování agregačního feromonu, jenž řídí hromadný nálet samečků i samiček na již oslabený strom. Tím dochází k většímu množství závrťů a následně vývoji kůrovců v lapáku.

4.2 Počet závrťů

Hodnocení počtu závrťů bylo realizováno dne 15. 5. 2022. Při tomto hodnocení bylo primárním cílem spočítat závrty, které způsobili samečci lýkožrouta smrkového. Po odstranění větví, kterými byly lapáky zakryty, byly na kůře stromu patrné drtinky, jež jsou specifickým jevem pro přítomnost lýkožrouta smrkového, resp. podkorního hmyzu v napadeném stromě. Absence srážek dopomohla k jednodušší identifikaci počtu závrťů.

Na obou lokalitách byly z kontrolního a ošetřeného lapáku vyříznuty pláty kůry o rozměrech 10 x 20 cm na 4 úsecích každého lapáku. Úseky byly od sebe vzdálené 2,5 m. Úsek 1 se nacházel nejnižší u kořene kmene lapáku, naopak úsek 4 byl nejvyšším místem lapáku, tedy místem nejbližší koruně poraženého stromu. Při analýze kůr bylo jednoduché zpozorovat snahu samečků o vytváření snubních komůrek. Počet závrťů v jednotlivých úsecích lapáku je znázorněn v tabulce 1.

Tabulka 1: Průměrný počet závrťů na kontrolní a ošetřené variantě lapáků entomopatogenní houbou *B. bassiana* po vyhodnocení 4 x 2,5 m lapáku

| Varianta | Lapák 1 | | Lapák 2 | |
|--------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | Průměr±SMODCH | HSD Tukey | Průměr±SMODCH | HSD Tukey |
| <i>B. bassiana</i> | 86,50±17,62 | a | 123,50±6,56 | a |
| kontrola | 129,75±42,45 | a | 137,50±37,60 | a |

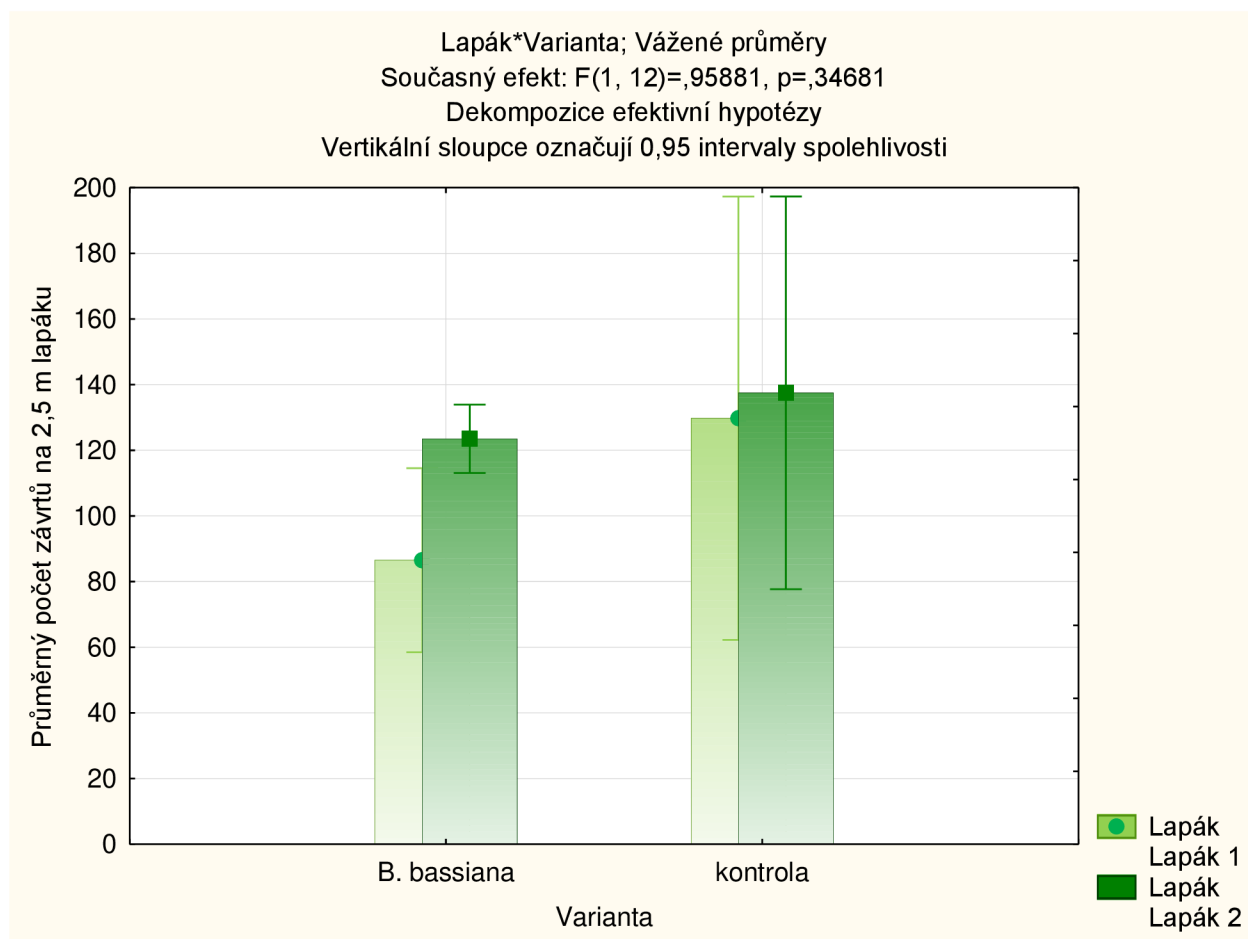


Obrázek 7 – Závrtý s drtinkami v kmeni stromu „lapáku“ (drtinky značí místo zavrtání samečků lýkožrouta smrkového pod kůru lapáku)

V obou lokalitách vykazovaly ošetřené lapáky entomopatogenní houbou *B. bassiana* menší míru infestace lýkožroutem smrkovým. Průměrný počet závrťů byl nižší ve srovnání s kontrolní variantou lapáku. Na první lokalitě byl tlak lýkožrouta o málo menší než na lokalitě druhé. Počet závrťů byl na ošetřených variantách lapáků o 10 až 33 % nižší v porovnání v počtu závrťů u kontrolních variant. Rozdíl mezi lokalitami

($F=2,2442$; $df=1,12$; $p=0,1599$) i variantou ošetření ($F=3,6731$; $df=1,12$; $p=0,0794$) nebyl statisticky průkazný. Statisticky se nelišila ani vzájemná interakce mezi lokalitou a ošetřením lapáků ($F=0,9588$; $df=1,12$; $p=0,3468$).

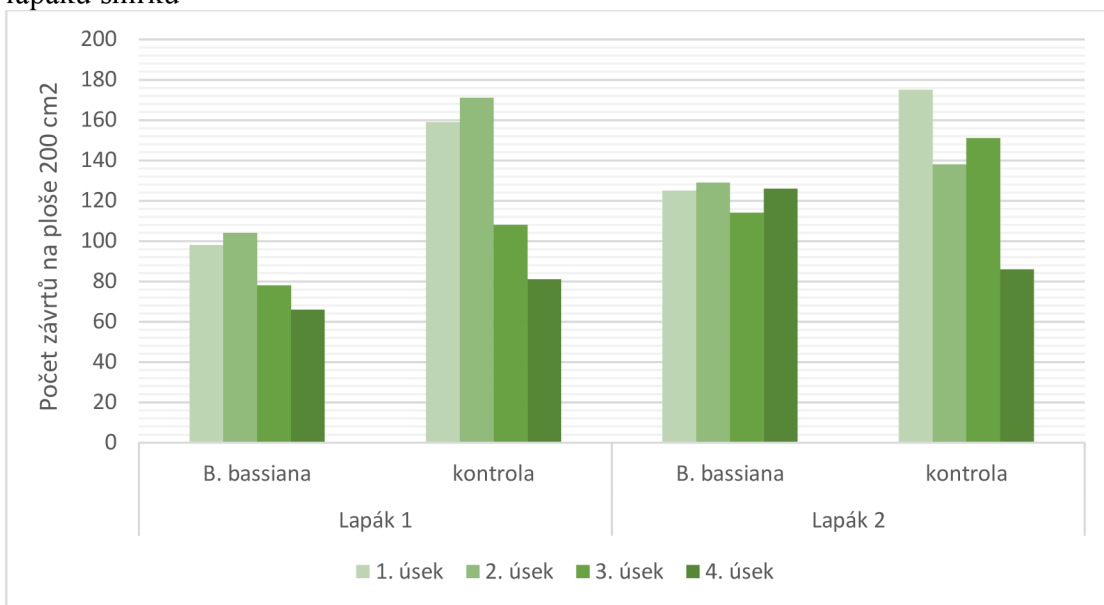
Graf 1: Porovnání průměrných závrtů na kontrolních a ošetřených variantách lapáků



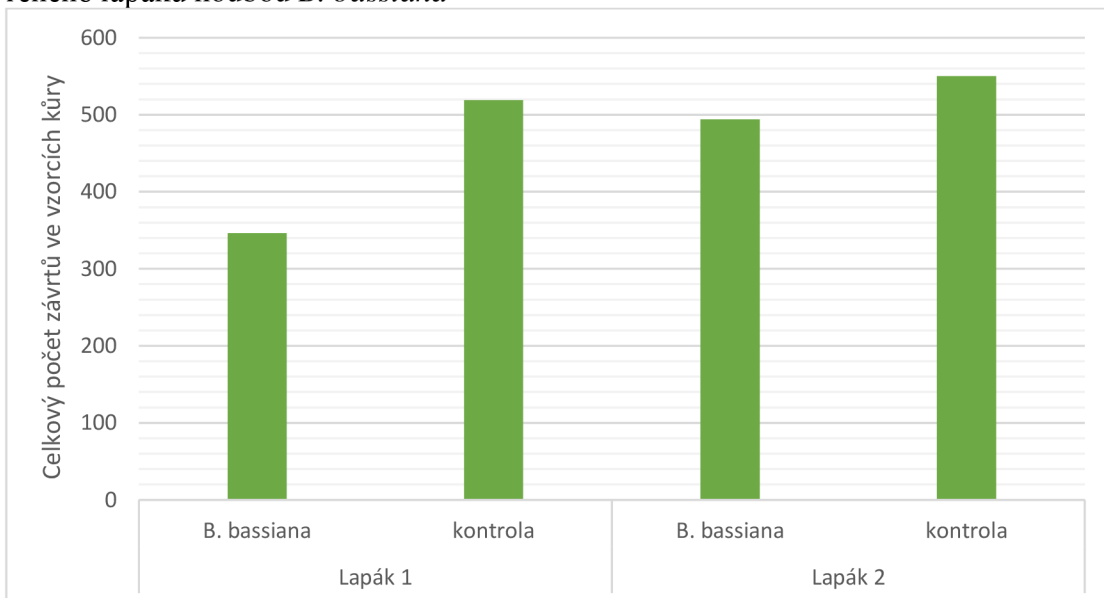
V rámci jednotlivých úseků byly zaznamenány rozdíly v počtech závrtů. Nejvíce závrtů bylo pozorováno v prvních 5 metrech od paty stromu. Na druhé lokalitě byl počet na ošetřeném lapáku houbou *B. bassiana* vyrovnáný. Naopak na obou kontrolách se počty na jednotlivých úsecích lišily.

Celkový počet závrtů na kontrolních variantách lapáků byl 520 a 550, zatímco houba *B. bassiana* měla pozitivní efekt na snížení počtu závrtů. Na ošetřených variantách lapáků byl počet závrtů 346 a 494, tj. v průměru přibližně o 110 závrtů méně než na kontrole.

Graf 2: Počet závrťů v jednotlivých úsecích odebraných z kontrolního a ošetřeného lapáku smrku



Graf 3: Celkový počet závrťů ze vzorků kůry odebraných na 10 m kontrolního a ošetřeného lapáku houbou *B. bassiana*



4.3 Počet snubních komůrek

Během druhého měření, které bylo provedeno 22. 5. 2022, byly hodnoceny počty snubních komůrek vytvořených samečky lýkožrouta smrkového. Z každého lapáku byla odebrána kůra o rozměru 10 x 20 cm. Vzorek kůry byl vykrojen přibližně jeden metr od spodní hranice stromu. Je však nutné podotknout, že počet snubních komůrek se mohl výrazně lišit na jiných místech lapáku.

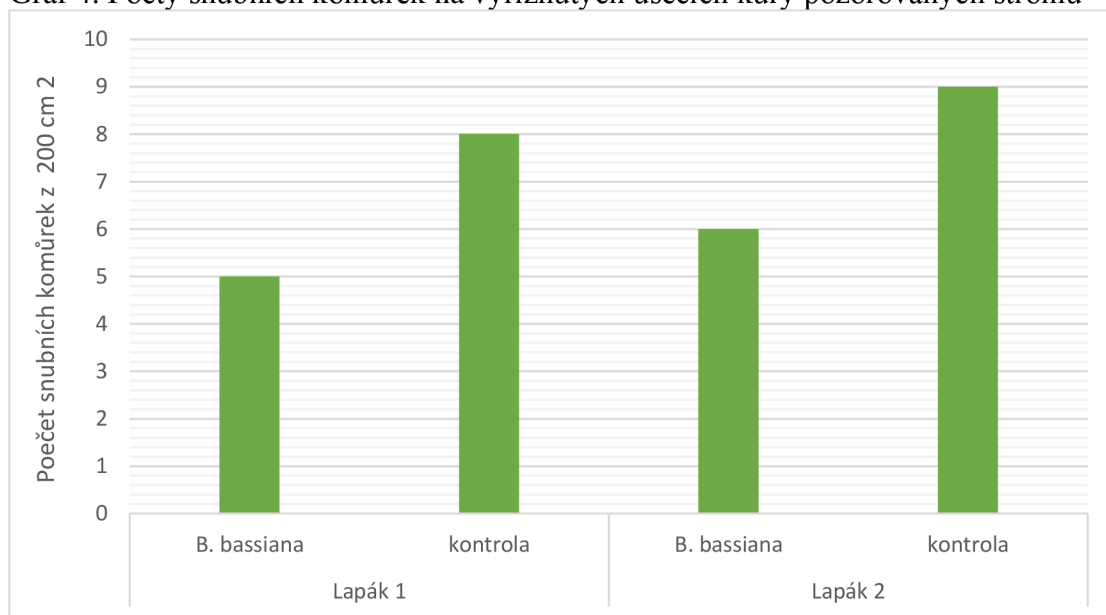


Obrázek 8 – Snubní komůrky s matečnými chodbami v kůře z ošetřeného lapáku entomopatogenní houbou *B. bassiana*

Z výsledků je patrné, že počet závrťů koreloval s počtem snubních komůrek. Na ošetřených variantách lapáků byl zaznamenán nižší počet snubních komůrek ve srovnání s počty na kontrolních variantách. Počet komůrek byl počítán na vyříznutém kusu

kůry. Na 200 cm² byl počet snubních komůrek u ošetřené varianty 5 resp. 6. Na kontrolních kůrách bylo zaznamenáno o 3 a 4 snubních komůrek více.

Graf 4. Počty snubních komůrek na vyříznutých úsecích kůry pozorovaných stromů



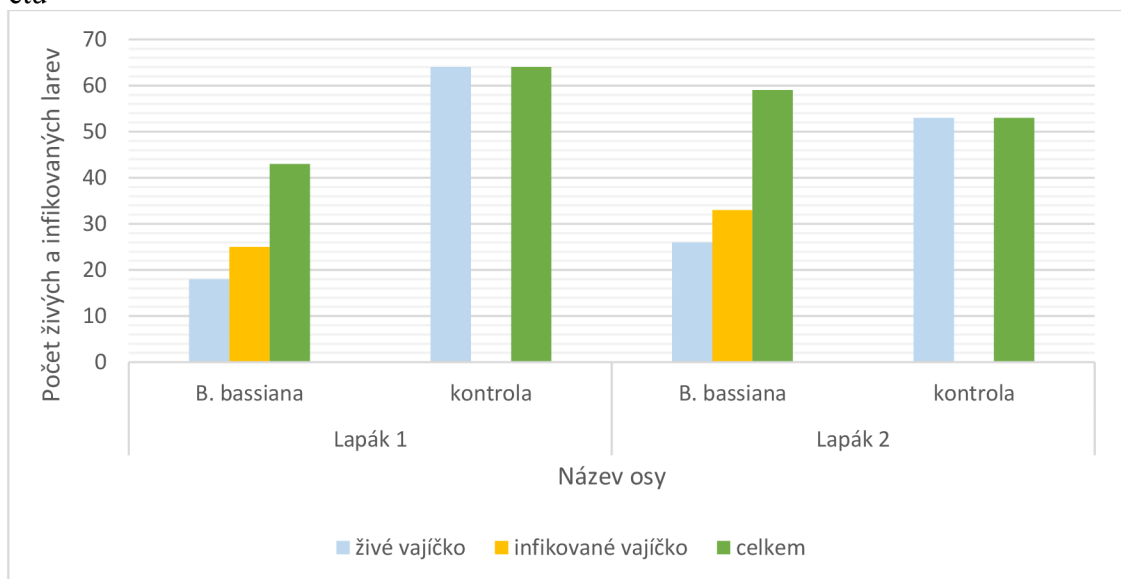
4.4 Počet larev a vajíček lýkožrouta smrkového

Třetí hodnocení bylo zaměřeno na zjištění počtu potomstva lýkožrouta smrkového, hodnocení proběhlo 31. 5. 2022. Po vytvoření snubních komůrek nastalo období, kdy samečci začali pomocí feromonů do hostitelského kmene lákat samičky. Po páření nakladly samičky vajíčka, z nichž se vylíhly larvy *Ips typographus*, které byly počítány. Z každého lapáku byla na 4 úsecích vzdálených 2,5 m od sebe vyříznuta kůra o rozměrech 10 x 20 cm. V každé vytvořené galerii lýkožroutem smrkovým byl stanoven počet larev. Zároveň byly při kontrole hodnoceny celkové počty vajíček, kterým byla přiřazena kategorie živé a infikované vajíčko.



Obrázek 9 a 10 – Počet larev ve stromu č. 4, v úseku 2

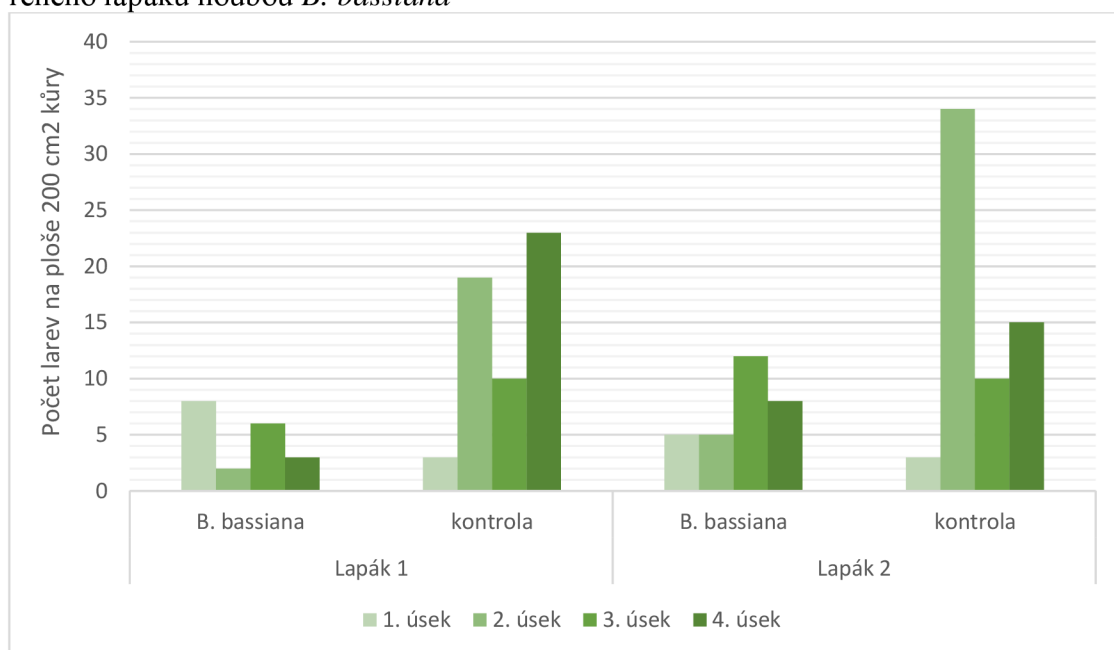
Graf 5: Průměrný počet živých a infikovaných vajíček ze vzorků kůr odebraných na 10 m kontrolního a ošetřeného lapáku houbou *B. bassiana*, včetně celkového počtu



Po odebrání vzorků kůr o velikost 200 cm² byl sledován stav populace lýkožrouta smrkového. Ve vytvořených galeriích se v době hodnocení vyskytovala vajíčka a larvy lýkožrouta. U vajíček byla na ošetřených variantách zaznamenána i infikovaná vajíčka, která tvořila větší poměr než vajíčka zdravá. V kontrolních variantách se

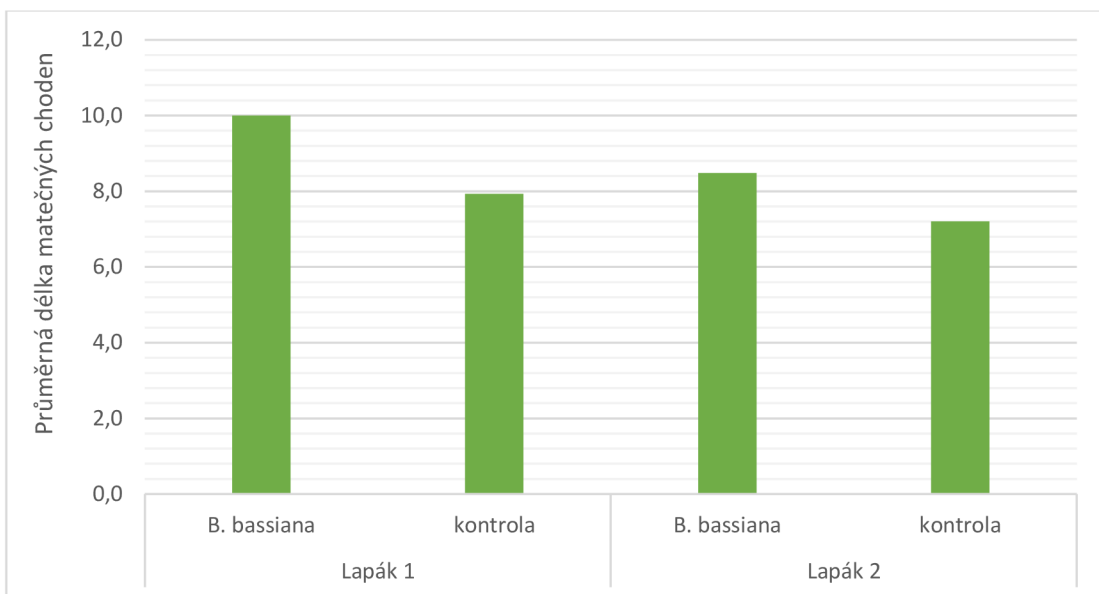
nevyskytovala žádná přirozeně se vyskytující infikovaná vajíčka. Na lokalitě 1 bylo zaznamenáno i více vajíček v kontrole než u ošetřené varianty. Tento fakt se nepotvrdil na druhé lokalitě.

Graf 6: Stanovení počtu larev ze vzorků kůr odebraných na 10 m kontrolního a ošetřeného lapáku houbou *B. bassiana*



Při stanovení počtu larev lýkožrouta smrkového nebyly zaznamenány žádné infikované larvy. Na kontrolních variantách lapáků byl zaznamenán daleko vyšší počet larev ve srovnání s ošetřenými lapáky. Rozdíl v počtu larev byl v kontrolních variantách více než dvojnásobný. U ošetřených smrků byla zaznamenána větší průměrná délka matečných chodeb ve srovnání s kontrolní variantou. Tento jev byl zaznamenán zejména na první lokalitě pokusu.

Graf 7: Průměrná délka matečných chodeb na kontrolním a ošetřeném lapáku houbou *B. bassiana*





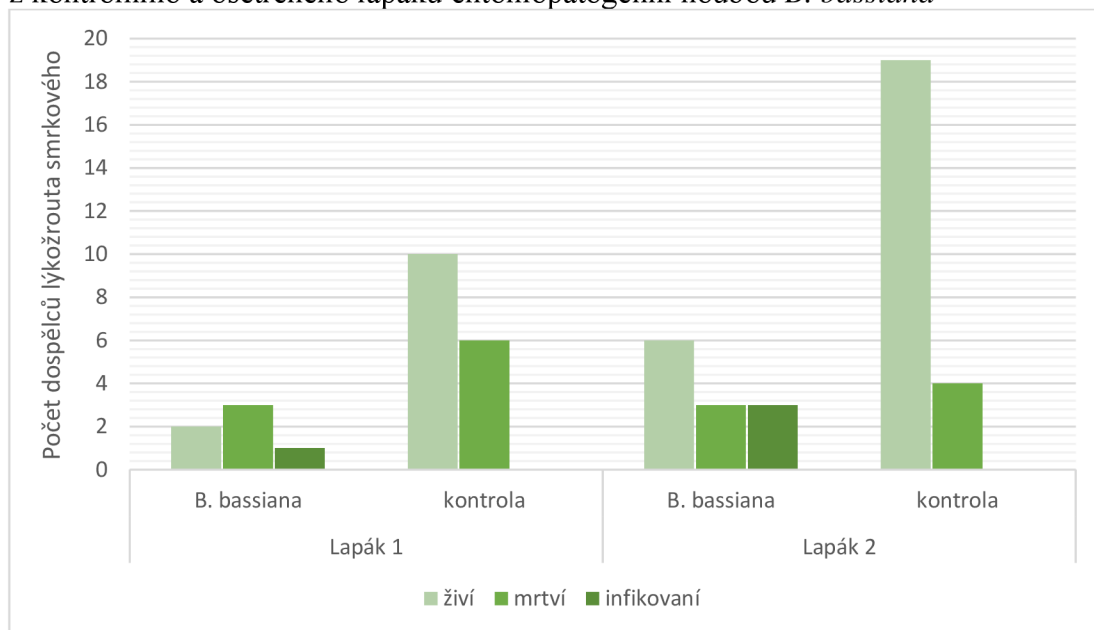
Obrázek 11 – přikrytí stromů plachtou Storanet

Po vyhodnocení larev byla na kmen každého lapáku natažena plachta Storanet, která měla za úkol zabránit po prodělání celého vývojového cyklu *Ips typographus* vylétnutí dospělých jedinců.

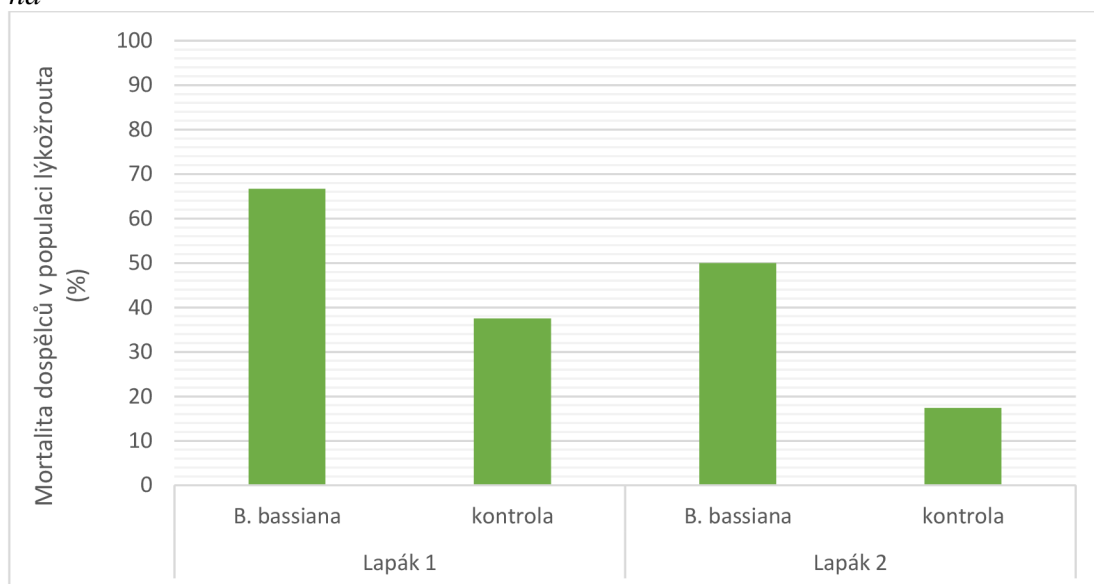
Po odstranění sítě byl zaznamenán stav populace dospělců lýkožrouta. V populacích se vyskytovali živí, mrtví i infikovaní dospělci. Mrtví jedinci byli nale-

zeni u všech lapáků, ať kontrolních nebo ošetřených. U ošetřených lapáků byli zaznamenáni i infikovaní dospělci.

Graf 8: Stanovení počtu živých, mrtvých a infikovaných dospělců *I. typographus* z kontrolního a ošetřeného lapáku entomopatogenní houbou *B. bassiana*



Graf 8: Celkový počet dospělců na kontrolním a ošetřeném lapáku houbou *B. bassiana*

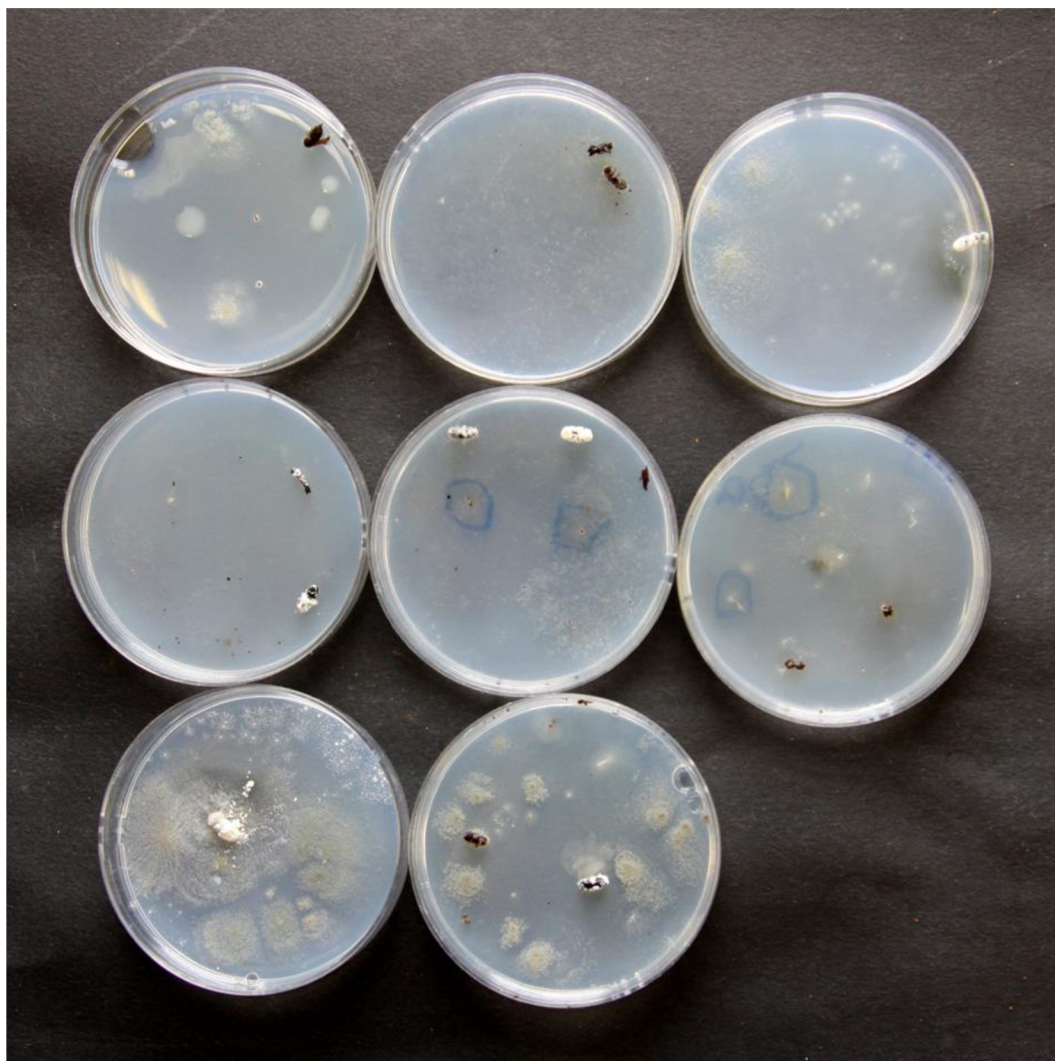


Ve srovnání s ošetřenými lapáky byl zaznamenán výrazně vyšší počet zdravých jedinců v kontrolní variantě lapáků. Celkový počet dospělců v kontrole byl 16, resp. 23 jedinců, zatímco v ošetřené variantě 6, resp. 12 jedinců. Mortalita se pohybovala u

ošetřených lapáků od 50 do 67 %, naopak u kontrolních lapáků byla mortalita výrazně nižší, a to v hodnotě od 17 do 38 %.

4.5 Ověření přítomnosti houby *B. bassiana* v ošetřeném lapáku

Dospělci *I. typographus* nové generace byli po odstranění sítě odebráni z povrchu kůry a umístěni na 2% vodní agar. Po 10 dnech kultivace byla na dospělcih pozorována infekce způsobená patogenem *B. bassiana*.



Obrázek 12 - Vliv entomopatogenní houby *B. bassiana* na vyvolání infekce dospělci *I. typographus* po aplikaci houby na lapáky

Z odebraných vzorků kůr na konci experimentu byla ověřena přítomnost houby *B. bassiana*. Z obrázku 13 je patrné, že houba se na povrchu stromů a pod šupinkami

kůry udržela, a lze říci, že kmeny poražených stromů byly nejen správně ošetřeny, ale došlo i k navýšení jejího inokula.



Obrázek 13 – Re-izolace houby *B. bassiana* z kůry ošetřených lapáků na selektivní půdu na bázi účinné látky dodine

Pro ověření přítomnosti houby byla kůra též nastříhána na menší kousky, které byly následně vloženy do Petriho misky. Po přípravě arén byly do Petriho misek vloženy larvy potemníka moučného, které sloužily jako návnada pro entomopatogenní houbu. Po 14 dnech bylo ověřeno, že houba byla na konci experimentu v kůře přítomna. Důkazem jsou bíle porostlé, tj. infikované larvy potemníka moučného.



Obrázek 14 – Re-izolace entomopatogenní houby *B. bassiana* z kůry ošetřených lapáků za pomoci návnady larev potemníka moučného

4.6 Laboratorní biotest *B. bassiana* na larvy *T. molitor*

Účinnost entomopatogenní houby *B. bassiana* byla testována na larvách potměníka moučného při teplotě 20 °C a 25 °C. Hodnocení bylo ukončeno po 12 dnech, kdy bylo dosaženo u larev 100% mortality a houba byla na povrchu těla larvy *T. molitor* plně vysporulovaná (FDI = 3).

Tabulka 2: Průměrný index FDI (Fungal Development Index) na larvách *T. molitor* inkubovaných v různých teplotách

| Den/teplota | 20°C | | 25°C | |
|-------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| | kontrola | <i>B. bassiana</i> | kontrola | <i>B. bassiana</i> |
| 4. | 0,00±0,00 | 0,89±0,60 | 0,00±0,00 | 1,08±0,69 |
| 6. | 0,00±0,00 | 1,80±0,65 | 0,00±0,00 | 2,15±0,76 |
| 8. | 0,00±0,00 | 2,53±0,58 | 0,00±0,00 | 2,60±0,60 |
| 10. | 0,00±0,00 | 2,92±0,15 | 0,10±0,00 | 2,95±0,15 |
| 12. | 0,00±0,00 | 3,00±0,00 | 0,12±0,00 | 3,00±0,00 |

Ve 20 °C byl zaznamenán pomalejší vývoj houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor* ve srovnání s ošetřenými larvami inkubovanými ve 25 °C. Po 4 dnech biotestu došlo ve 25 °C k 100% mortalitě larev způsobené houbou *B. bassiana*, u některých jedinců již došlo k proliferaci houby na povrch hostitele. Některé larvy byly po 4 dnech ve 20 °C ještě živé. Po 6 dnech docházelo již při 25 °C k počátku sporulace a po 10 dnech došlo téměř u všech larev k úplné sporulaci houby.

5 Diskuse

Termínem biologická ochrana je myšleno záměrné používání živých organismů (bakterií, hlístic, hmyzu, roztočů, virů atd.) k potlačování vlivu na vybrané škodlivé biologické činitele (Landa 2002). Mezi tyto činitele řadíme širokou škálu škůdců, vybrané původce, kteří způsobují onemocnění rostlin, a také plevelné rostliny. Díky biologické ochraně rostlin je výskyt těchto škodlivých činitelů výrazně nižší, popřípadě je jejich škodlivost držena pod úrovní ve srovnání se situací, kdy biologická ochrana není uplatněna (Vondrášková 2008). Výhody, jež poskytuje využívání biologické ochrany rostlin oproti konvenčnímu způsobu chemické ochrany, jsou patrné. Při využívání biologické ochrany je riziko vzniku rezistence malé a specifita vůči vybranému druhu vysoká, kdežto u používání chemických přípravků je riziko vzniku rezistence velmi vysoké, v kombinaci s velmi malou specifitou k cílovému druhu.

Nejvýznamnějšími mikroorganismy, které jsou v biologické ochraně rostlin využívány, jsou entomopatogenní viry, entomopatogenní bakterie, entomopatogenní houby a entomopatogenní hárátka. Jedna z nejvýznamnějších druhů entomopatogenních hub, která je používána v biologické ochraně rostlin, je houba *Beauveria bassiana*. Jde o druh houby, který se vyskytuje běžně v půdě a má velký potenciál k regulaci populací škůdců, ať už záměrně ve sklenících, nebo přirozeně se vyskytující ve volné přírodě. Tato houba je právem označována za kosmopolitně vyskytující se druh, který se vyskytuje v lesních ekosystémech, zemědělských i nezemědělských půdách (Inglis et al. 2001, Medo & Cagaň 2011).

V současné době jsou v České republice uvedeny v Registru přípravků na ochranu rostlin pouze 3 registrované komerční přípravky. Nutné je však poznamenat skutečnost, že biopreparát BotaniGard WG na bázi kmene GHA houby *Beauveria bassiana* je určen k ošetření skleníkových kultur proti molicím a trásněnkám. Biopreparát Naturalis na bázi kmene ATCC-74040 houby *B. bassiana* je registrován proti širšímu spektru škůdců, nicméně ani jeden z biopreparátů není registrován proti kůrovcům (Folorunso et al. 2021). Otázkou zůstává, jak je možné, že na trhu v ČR nejsou registrovány další biopreparáty na bázi jiných druhů entomopatogenních hub? Jako hlavní problém můžeme označit fakt, že je pro zahraniční firmy vyrábějící biopreparáty na bázi mikroorganismů v České republice velmi malý trh, protože ve světě jsou biopreparáty registrovány zejména do skleníkových kultur (Landa 2002). Pro pěstitele skleníkových kultur v ČR jde tedy o ekonomicky náročnější alternativní

přípravky. Nevýhodou pro uvedení na trh je skutečnost, že se jedná o vysokou počáteční investici do výroby preparátu, a tím vyšší výslednou pořizovací cenu, kterou nejsou koncoví spotřebitelé ochotni zaplatit.

Z plošného monitoringu, který probíhal v NP Šumava vyplývá, že entomopatogenní houby jsou v úzké asociaci s *Ips typographus* (Landa et al. 2001a, Landa et al. 2010). Entomopatogenní houby jsou schopny vyvolávat onemocnění hmyzu a je uváděno více než 700 druhů entomopatogenních hub z přibližně 100 rodů různých řádů, oddělení hub (Roberts 1989, Inglis 2001). Houba *B. bassiana* byla izolována téměř na všech lokalitách NP Šumava, jedná se tedy o dominantní druh, vyskytující se v přirozeném prostředí lesních ekosystémů (Landa et al. 2010). *Beauveria bassiana* jakožto přirozený organismus v přírodě se jeví jako jedna z potencionálních možností pro ochranu smrků proti lýkožroutu smrkovému. Za pozitivum můžeme označit nízkou pravděpodobnost vzniku rezistence u cílových jedinců po aplikaci *B. bassiana* (Landa et al. 2001). Doposud aplikované širokospektrální insekticidy mají negativní vliv na necílové organismy potažmo na životní prostředí.

Ke snížení populací *Ips typographus* jsou používány různé způsoby. Integrovaná ochrana lesa zahrnuje použití metod biologických, bioracionálních, chemických a mechanických. Zásady Integrované ochrany rostlin (IOR), které plynou z rámcové směrnice Evropského parlamentu a Rady o udržitelném využívání pesticidů 2009/128/ES, článek č. 14 a příloha č. III, musí profesionální uživatel bezpodmínečně dodržovat. Zásady IOR jsou zaneseny do legislativy České republiky, a to ve Vyhlášce 205/2012 Sb., přesněji ve Vyhlášce o obecních zásadách integrované ochrany rostlin.

V Integrované ochraně rostlin u lesních porostů je důležitým prvkem monitoring. Monitoring je proces, při kterém se zkoumá stav, v němž se porost nachází. Jeho cílem je sledování a vyhodnocení výskytu jednotlivých druhů škodlivých činitelů, které způsobují škodu na konkrétním porostu, respektive rostlině. Během monitoringu jsou sledovány vybrané druhy klíčových škůdců, které se vyskytují v konkrétní oblasti, a zároveň se sleduje, v jakém stupni vývoje se daný škůdce nachází (Zahradník 2004).

Mezi užitečné způsoby ochrany lesa řadíme agrotechnické metody. Důležitá jsou pěstební opatření, jež mají za úkol vyhotovit vhodnou skladbu lesa a následně realizovat výsadbu smíšených lesních kultur. Hlavním cílem je snížení počtu zakládání smrkových monokultur. Tímto krokem logicky dojde v budoucnu k eliminaci infes-

tovaných a poškozených stromů lýkožroutem *Ips typographus*. Použití feromonů řadíme mezi metody bioracionální. Feromony jsou umístěny v mechanické konstrukci, jde o takzvané lapače. Vzájemné použití těchto dvou metod (bioracionální a mechanické) současně je využíváno při monitoringu dospělých jedinců v dané oblasti. K mechanickým metodám je řazeno používání trojnožek, lapáků a manuální odstranění kůry napadených stromů. Trojnožky a lapáky mohou být ošetřeny pesticidy. Jestliže je nutné použití pesticidů, musí obsahovat takové látky, jež nepůsobí širokospektrálně na další druhy hmyzu, včetně přirozených nepřátel, a také nesmí zatěžovat životní prostředí. Využití chemických metod přichází v úvahu jen v krajních případech a nemohou být použity v chráněných krajinných oblastech a na území národních parků. Jednou ze strategií biologické ochrany je podpora a konzervace přirozených nepřátel (Eilenberg et al. 2001). Právě jejich podpora je v lesních ekosystémech důležitá, protože hrají zásadní roli v regulaci lýkožrouta smrkového (Landa et al. 2010).

Pokácený, odvětvený smrk se nazývá lapák. Dělíme je především na lapáky I. série a lapáky II. série. Lapáky I. série jsou primárně určeny k náletu lýkožroutů z jarního rojení. Kácení těchto stromů je možno provádět v závislosti na povětrnostních podmínkách, reliéfu terénu a nadmořské výšce od října do března. Nejvhodnější termín pro přípravu lapáků I. série je přelom února a března. Z celkového množství pokácených lapáků by měly být umístěny 2 třetiny na výsluní, zbylá třetina stromů by se měla nacházet v polostínu. Kontrola lapáků probíhá 7.-10. den od počátku rojení lýkožrouta smrkového v intervalu každých 7-10 dní. Důležité je vedení evidence, kdy se zaznamenává počet závrtů na vybraný úsek plochy. Průběžný monitoring lapáku je ukončen odstraněním kmene z lesního porostu, popřípadě asanací (Křístek et al. 2002). V nejvíce napadené části lapáků se po ukončení rojení hodnotí závažnost a stupeň napadení. Jestliže je nutné pokácet další stromy, je automaticky vyhodnocen stupeň napadení jako závažný.

Při biologické ochraně pomocí entomopatogenních hub jsou ošetřené lapáky též kontrolovány za účelem zjištění účinnosti na kůrovce. Z výsledků diplomové práce vyplývá, že na ošetřených lapácích se zdržoval menší počet dospělých lýkožroutů, čímž docházelo k redukci v počtu závrtů a zakládání snubních komůrek. Lze konstatovat, že ošetření entomopatogenní houbou *B. bassiana* mělo odpudivý efekt na lýkožrouta. Zároveň je patrné, že vývojový cyklus lýkožrouta byl vlivem entomopatogenní houby zpomalen. V populaci se nacházelo více vajíček než larválních instarů.

Vajíčka se líhla tudíž pomaleji. Na konci experimentu byly lapáky pokryty insekticidními sítěmi, aby došlo k zabránění odletu dospělců druhé generace. Na povrchu lapáků byli zaznamenáni mrtví jedinci, kteří mohli být otráveni insekticidní sítí. Nelze proto říci, jaký mělo ošetření houbou *B. bassiana* efekt na celkovou mortalitu dospělců lýkožrouta smrkového. Nicméně v populacích brouků nové generace byli zaznamenáni infikovaní jedinci houbou *B. bassiana*. Lze tedy konstatovat, že houba je schopna po aplikaci vyvolat primární onemocnění rojících se kůrovců, kteří se zavrtávají do kůry stromů, a zároveň je z výsledků prokázáno, že jsou spory schopny přečkávat na povrchu lapáků po celou dobu experimentu. Ve výluhu ze vzorku kůry byla zjištěna přítomnost kolonie entomopatogenní houby *B. bassiana* ve vysoké koncentraci, lze říci, že supresivita byla na povrchu kůry lapáku vysoká. Tento fakt je důležitý pro konstatování, že brouci nové generace, kteří ošetřený lapák opouštějí, jsou schopni se cestou na povrch lapáku infikovat. K infekci tak může dojít až po následném osídlení zdravého stromu v okolí, čímž se šíří infekce v prostředí horizontálně (Inglis et al. 2001).

Závěr

- Entomopatogenní houba *B. bassiana* vyvolává primární onemocnění na vajíčkách a dospělých *Ips typographus*.
- Na larvách *Ips typographus* nebyla zaznamenána infekce *B. bassiana*.
- Ošetření entomopatogenní houbou *B. bassiana* ovlivňuje vývoj lýkožrouta smrkového, resp. prodlužuje vývoj jednotlivých vývojových stádií.
- Houba *B. bassiana* je schopna infikovat i dospělé nové generace, dospělci nové generace vylézající z pod kůry lapáků díky přítomnosti životaschopných spor jsou následně infikováni.
- Patogen může být díky životaschopnosti spor roznášen pomocí nové generace dospělců lýkožrouta smrkového v prostředí.
- Houba *B. bassiana* je schopna se uchytit po aplikaci v přirozeném lesním prostředí, z čehož vyplývá, že lze houbu aplikovat i preventivně.
- Houba *B. bassiana* je účinná na alternativního hostitele potemníka moučného *T. molitor*.
- K plné sporulaci houby *B. bassiana* na povrchu hostitele došlo již po 6 dnech biotestu. Nová generace spor se tak může šířit v prostředí a infikovat zdravé jedince v populacích škůdců.
- Optimální teplota pro vývoj houby *B. bassiana* na hostiteli je 20 – 25 °C, při relativní vzdušné vlhkosti vyšší než 90 %.
- Entomopatogenní houba *B. bassiana* je vhodné bioagens k regulaci populací lýkožrouta smrkového nebo dalších zástupců čeledi *Scolytinae*.

Seznam použité literatury

- Anderbrant O. (1990): Gallery construction and oviposition of the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) at different breeding densities. *Ecological Entomology*, 15(1), 1–8.
- Bischoff M. A. (2013): Risk assessment of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for non-target organisms when used against *Ips typographus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4787-4795.
- Boivin G. A., Bélanger M. L., Couture M. J., Brousseau M. J. (2013): *Beauveria bassiana*: A Potential Biopesticide for Insect Control. *BioControl*, 58, 6.
- Braga G. U. L., Flint S. D., Miller C. D., Anderson A. J., Roberts D. W. (2001): Both solar UVA and UVB radiation impair conidial curability and delay germination 39 in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 74: 734-739.
- Doležal, P., Sehnal, F. Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Applied Entomology*, 131(3), 2007, 165–173.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol* 46, 387–400.
- Ekesi S, Maniania N.K., Lux S.A., (2003): Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *Journal of Invertebr. Pathol.*, 83: 157–167.
- Folorunso E. A., Roy K., Gebauer R., Bohatá A., Mraz J. (2021). Integrated pest and disease management in aquaponics: A metadata-based review. *Rev. Aquacult.*, 13, 971–995.
- Gómez-Jiménez M., Pérez-Sierra A., Sánchez-Carrillo S. (2011): Effectiveness of *Beauveria bassiana* against *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Biological Control*, 58(1), 1-5.
- Gómez-Munuera M., Pérez-Hidalgo N. (2012): The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a potential biocontrol agent of the spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 22(7), 809-818.
- Hougardy E., Grégoire C.-J. (2001): Bark-beetle parasitoids population surveys following storm damage in spruce stands in the Vosges region (France). *Integrated Pest Management Reviews*, 6: 163-168.
- Hoy M. A., Thomas M. C. (1998): *Beauveria bassiana*: A Fungal Pathogen of Insects. *Annual Review of Entomology*, Vol. 43: 47-79.
- Inglis G. D., Goettel M. S., Butt T. M., Strasser H. (2001): Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests, In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds): Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.
- Jakuš R., Blaženc M. (2011): Treatment of bark beetle attacked trees with entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Folia Forestalia Polonica*, series A, 53(2), 150–155.
- Jeger M. J., Rayner A. D. M., Fravel. D. A. (1998): The Biology of *Beauveria bassiana* and its Potential for Biological Control of Insect Pests. *Annual Review of Entomology*, vol. 43, 705-731.

-
- Jeger M. J. (2017): Pest categorisation of *Ips typographus*. *EFSA Journal*, 15(7), Article number e04881.
- Kaur G., Singh A. (2020): Field Evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for Management of Insect Pests. *International Journal of Scientific Research and Reviews*, 11(1), 5-13.
- Kamoun S., Humber R. A. (2005): The use of *Beauveria bassiana* for the control of *Ips typographus*. *Plant Disease*, 89(12), 1283-1290.
- Kasumović L., Lindelöw A., Hrašovec B. (2018): Influence of predator abundance and winter mortality on reproduction of bivoltine populations of *Ips typographus* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Izvorni znanstveni članci – Original scientific papers. Šumarski list*, 9–10, 473–479.
- Kenis M., Wermelinger B., Grégoire J.C. (2004): Research on parasitoids and predators of Scolytidae – a review. In: Lieutier F., Day K., Battisti A., Grégoire J.-C. & Evans H. (eds), *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe: a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London, Chapter 11, 237–290. ISBN: 978-1-4020-2240-1
- Kenis M., Wermelinger B., Gregoire C. J. (2007): Research on parasitoids and predators of Scolytidae – a review. In: Lieutier F., Battisti A., Grégoire J.-C., Day K.R., Evans H.F. (Eds.): *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*, Dordrecht: Springer Netherlands, 237-290.
- Khan M. A. (2016): Ecology of *Beauveria bassiana*: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(4), 519-524.
- Khan M. A., Shahzad M. A., Khan M. A. (2015): *Beauveria bassiana*: A Potential Biopesticide for Insect Pest Management. *International Journal of Agriculture and Biology*, 17(6), 1179-1185.
- Kim J. K., Lee Y. H. (2018): *Beauveria bassiana*: A Versatile Entomopathogenic Fungus for Biological Control of Insects. *Journal of Microbiology*, 56(3), 185–194.
- Kirichenko A., Kuznetsov V., Kuznetsova O. (2019): *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae) in the Russian Far East: Distribution, damage, and control. *Forests*, 10(3), 233.
- Köhler T., Schöller M. (2005): Nuptial chamber production of *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) in relation to tree size and age. *European Journal of Entomology*, 102(3), 449-455.
- Kolarik M., Václavík J. (1974): Control of the spruce weevil *Ips typographus* L. by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina). *Folia Entomologica Bohemoslovaca*, 71(3), 159-164.
- Kolář F., Šebela M. (1970): The efficacy of *Beauveria bassiana* against *Ips typographus* L. (Coleoptera: Scolytidae). *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 21(3), 229-233.
- Kolb A. (2012): *Ips typographus*: Biology, Ecology and Management of Spruce Bark Beetle. *Forest Ecology and Management*, vol. 266, 1–15.
- Kostovcik M., Kolarik M. (2017): The potential of entomopathogenic fungi for control of *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 27(2), 151-160.

-
- Košťál V., Košťálová M. (1989): *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent of the bark beetle *Ips typographus* in Czechoslovakia. *Folia Entomologica Bohemoslovaca*, 56(3), 151-159.
- Kostanjšek R., Kogovšek P. (2008): *Beauveria bassiana*: A versatile fungus for biocontrol and other applications. *Biotechnology Advances*, 26(3), 209-225.
- Kostov P., Petkov N. (2018): Control of *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae) with *Beauveria bassiana* in Bulgaria. *Journal of Pest Science*, 91(3), 45-854.
- Koul O., Walia S. (2008): Entomopathogenic fungi: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology*, 46(1), 425-449.
- Křístek J., Urban J. (2004): Lesnická entomologie. Nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha 2, 445 s.
- Křístek J. a kol. (2002): Ochrana lesů a přírodního prostředí. Matice lesnické společnosti s.r.o. Písek, 386 s.
- Kubát J. (1970): The effect of environmental factors on the development of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Folia Microbiologica*, 15(2), 139-145.
- Kudela M. (1970): Atlas lesního hmyzu: škůdci na jehličnanech. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 287 s.
- Kumar A., Sharma S. (2018): *Beauveria bassiana*: A review on its biology, ecology and control. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(5), 1337-1350.
- Kumar A., Sharma S. (2020): *Beauveria bassiana*: An Entomopathogenic Fungus. *Microbial Biopesticides*. 23-44.
- Kumar S., Singh S. (2018): *Beauveria bassiana*: A potential biocontrol agent against insect pests. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 1537-1541.
- Landa Z. 2002: Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, 225-280.
- Landa Z., Hornak P., Osborne L. S., Novakova A, Bursova E. (2001a): Entomogenous fungi associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in Bohemian Forest. *Silva Gabreta*, 6, 273-286.
- Landa Z., Bielikova L., Osborne L. S., Bobkova P. (2001b): Assessment of isolation of entomogenous fungi collected from spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in Bohemian Forest. *Silva Gabreta*, 6, 259-272.
- Landa Z., Bohatá A., Šimková J., Skalický A., Doul L., Kalista M. (2010): Potential of local strains of entomopathogenic fungi as components of ecologically based program of protective treatments against spruce bark beetle *Ips typographus*. Aktuality šumavského výzkumu IV, Správa NP a CHKO Šumava, Vimperk, s. 61-65.
- Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O. (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, 10, 14-15.
- Landa Z., Bohatá A., Kalista M. (2008): Záměrné využívání autochtonních kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 47 s.
- Lipták B., Kozanek M. Pathogens, parasitoids and predators of the spruce bark beetle (*Ips typographus* L.) and their potential use in biological control. *Entomofauna carpathica*, 25(2), 2013, 69-82.

-
- McCoy C.W., Storey G.K., Tigano-Milano M.S. (1992): Environmental factors affecting entomopathogenic fungi in the soil. *Pesq Agropec Bras.*, 27, 107–111.
- McPherson J. E. (1987): Insect Growth Regulators: A New Tool for Insect Management. *Journal of Economic Entomology*.
- Medo J., Cagáň L. (2011): Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biol Control*, 59, 200–208.
- Meyling V. N., Eilenberg J. (2007): Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential from conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145-155.
- Pedigo L. P., Hoy M. A., Adang M. J. (2019): Insect Pathology. In: *Academic Press*.
- Pinnoi S. A. (2015): Resistance of *Ips typographus* to *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 1-7.
- Pollet M., Germann C., Bernasconi V.M. (2011): Phylogenetic analyses using molecular markers reveal ecological lineages in Medetera (Diptera: Dolichopodidae). *The Canadian Entomologist*, 143(6), 662–673.
- Raja K. B., Tyag A. K., Srivastava A. K. (2014): *Beauveria bassiana*: A Fungal Pathogen of Insects. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 5(4).
- Rehner S. A., Campbell J. F. (2003): *Beauveria bassiana*: A Cosmopolitan Entomopathogenic Fungus. *Mycologia*, 95(3), 459-467.
- Roberts W. D. (1989): World picture of biological control of insects by fungi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 89-100.
- Sánchez-Tocino M. P., Pérez-García, J. M., Pozo J. A. (2014): *Beauveria bassiana*: A Potential Biopesticide for Insect Control. *BioControl*, 59(4), 461–477.
- Schebeck M., Hansen E. M., Schopf A., Ragland G. J., Stauffer C., Bentz B. J. (2017): Diapause and overwintering of two spruce bark beetle species. *Physiological Entomology*, 42(3), 200–210.
- Schelhaas M. J., Nabuurs G. J., Schuck A. (2003): Natural disturbances in the European forests in the 19th and 20th centuries. *Global Change Biology*, 9(11), 1620–1633.
- Schlyter F., Stenlid J. (2001): Field testing of *Beauveria bassiana* for control of *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(3), 814-819.
- Schop G., Köhler M., Schultka R. (2014): Integrated pest management of *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae) using *Beauveria bassiana* in an Austrian spruce forest. *European Journal of Entomology*, 111(2), 191-198.
- Skuhrový V. (2002): Lýkožrout smrkový a jeho kalamity. Agrospoj, Praha, 196 s.
- Takov D., Doychev D., Pilarska D., Draganova S., Nedelchev S., Linde A. (2019): Occurrence of pathogens and nematodes in forest beetles from Curculionidae and Attelabidae in Bulgaria. *Biologia* 74, 1339–1347.
- Valigurová A. (2007): Comparative morphology of developmental stages of gregarines and cryptosporidia with an emphasis on host-parasite interactions. *Ph.D. Thesis. Masaryk University*, pp., 293.
- Van Beneden P.J. (1902): Sur le *Beauveria bassiana*, nouveau genre de champignons. *Bulletin de l'Académie Royale des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique*, 40, 7-14.
- Vega F., Hofstetter R. (2014): Bark Beetles. Academic Press. ISBN 9780124171565.

-
- Wegensteiner R. (2004): Pathogens in bark beetles. In: Lieutier F., Day K., Battisti A., Grégoire J.-C. & Evans H. (eds), *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe: a Synthesis*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London, chapter 12, 291-313. ISBN: 978-1-4020-2240-1
- Wegensteiner R., Wermelinger B., Herrmann M. (2015): Natural Enemies of Bark Beetles: Predators, Parasitoids, Pathogens and Nematodes. In: *F. E. Vega & R. W. Hofstetter (Eds.), Bark Beetles. Biology and Ecology of Native and Invasive Species*. 247-304. ISBN: 978-0-12-417156-5.
- Wermelinger B. (2004): Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* — a review of recent research. *Forest Ecology and Management*, 202, 67-82.
- Wermelinger B., Seifert M. (1998): Analysis of the temperature dependent development of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology*, 122(4), 185-191.
- Wermelinger B., Seifert M. (1999): Temperature-dependent reproduction of the spruce bark beetle *Ips typographus*, and analysis of the potential population growth. *Ecological Entomology*, 24(1), 103–110.
- Wermelinger B. (2002): Development and distribution of predators and parasitoids during two consecutive years of an *Ips typographus* (Col., Scolytidae) infestation. *Journal of Applied Entomology*, 126(10), 521-527.
- Whipps M E. (1999): *Beauveria bassiana*: An Entomopathogenic Fungus for Biological Control of Insects. *Annual Review Entomologi*, Vol. 44, 519-543.
- Zahradník P. (2004): Ochrana smrčín proti kůrovčům. Kostelec nad Černými lesy: *Lesnická práce*, 39 str.
- Zelený J., Lozan A. (2004): Přirození nepřátelé lýkožrouta *Ips typographus*. In 28. Setkání lesníků tří generací „Nebezpečí kůrovce v roce 2004“. Sborník referátů. ISBN 80-02-01600-9
- Zimmermann G. (2007): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553-596.
- Zumr V. (1995): Lýkožrout smrkový – biologie prevence a metody boje. 1. vyd. Písek, *Matice lesnická*, 131 s.