

## METODY CHOVU LÝKOŽROUTA SMRKOVÉHO *IPS TYPOGRAPHUS* (L.) PRO ZJIŠŤOVÁNÍ POŽEROVÉ TOXICITY TESTOVANÝCH LÁTEK

### SPRUCE BARK BEETLE *IPS TYPOGRAPHUS* (L.) BREEDING METHODS FOR SUBSTANCES FEEDING TOXICITY ASSAYS

ROMAN MODLINGER - MILOŠ KNÍŽEK

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady

#### ABSTRACT

Three different possibilities of spruce bark beetle breeding methods for substances feeding toxicity assays were tested – rearing of adults on cellulose wadding, methods of bark sandwiches for larvae and adults and method of sandwiches of bark with glass combination for larvae. Analysis of variance was used for evaluation of differences of the rearing methods, cluster analysis was used for optimal terms designation of adults rearing on cellulose wadding. Methods of adults rearing on cellulose wadding and bark sandwiches cannot be considered as qualitatively equal. Three the most appropriate terms of controls were recognized in the methods of adults rearing on cellulose wadding: always between the first and second, fifth and seventh and finally twelfth and fifteenth days since the experiment started. Methods of rearing of larvae in bark sandwiches and in sandwiches of bark with glass combination were found comparable in all aspects, but primary mortality of larvae, which is statistically higher in bark sandwiches.

**Klíčová slova:** kůrovcovití, Scolytinae, test toxicity, metody chovu kůrovců, sendvičové kůry, larva

**Key words:** bark beetles, Scolytinae, test of toxicity, bark beetles rearing methods, bark sandwiches, larva

#### ÚVOD

Metodami chovu různých druhů hmyzu se zaměřením na možnosti příjmu různého typu potravy nebo za účelem zjištění toxicity biologických či chemických látek, se zabývala celá řada autorů (např. SKUHRAVÝ 1968, JOLIVET 1998, KOVÁŘÍK 2000). Nejlépe prozkoumané jsou metody chovu u druhů hmyzu, jejichž larvy či dospělci žijí volně a konzumují celé rostliny nebo jejich části. Kůrovcovití (Curculionidae, Scolytinae) jsou vzhledem ke svému skrytému způsobu života pod kůrou, resp. v lýku, hostitelských dřevin (SAUVARD 2004), skupinou pro takové pokusy poměrně obtížnou, a to obzvlášť v případě chovu preimaginálních stádií.

Většina testů toxicity různých chemických přípravků byla prováděna u kůrovcovitých na dospělci. Testovanou látkou byly ošetřeny celé kmeny či jejich části (např. NOVÁK, ŠROT 1977). Tyto typy látek jsou lesnickou praxí často využívány při tlumení populačních výkyvů druhů s gradačním potenciálem. Použití sendvičových kůr pro chov lýkožrouta smrkového za účelem porovnání vlivu různých teplot na jeho vývoj bylo popsáno WERMELINGEREM a SEIFERTEM (1998). Chovem lýkožrouta smrkového na přirozeném materiálu se také zabýval FACCOLI et al. (2005), který využil úzkých skleněných trubiček obsahujících kůru s lýkem.

Variety umělé potravy pro chov hmyzu jsou velice široké (cf. COHEN 2004). Pro lýkožrouta smrkového tyto metody užil např. MATTANOVICH et al. (1999). Techniky užití náhradní potravy kůrovcům jsou různé, pro chovy „ambrosiového“ druhu kůrovců *Xyleborinus saxesenii* (RATZBURG) byla BIEDERMANNEM et al. (2009) potrava předkládána v úzkých skleněných trubičkách. Účelem naší práce bylo vyvinout rychlé, snadno

dostupné a vyhodnotitelné laboratorní metody sloužící pro testování toxicity různých látek jak pro dospělé, tak pro larvy lýkožrouta smrkového. Použity byly méně známé metody - metoda sendvičových kůr pro larvy a dospělé a metoda kůry v kombinaci s krycím sklem (Petriho miskou) pro larvy. Jako nová byla použita metoda chovu dospělců na buničité vatě. Testované metody byly navrženy zejména s ohledem na možnost opakovaného hodnocení při minimálním narušení vývoje jednotlivých stádií lýkožrouta smrkového.

#### METODIKA

V pokusech byla ověřována účinnost různých modifikovaných sekvencí cry3A genu z *Bacillus thuringiensis tenebrionis*. Sekvence genu byla optimalizována pro vysokou expresi ve smrku (*Picea abies*) a *Escherichia coli*. Různé varianty syntetického genu byly získány úpravami N a C kodonů genu. Geny byly klonovány do expresních vektorů pET (Novagen, Merck) a transformovány do bakterie *E. coli* BL21. Aplikovány byly extrakty z indukovaných buněk *E. coli* v 20% sacharóze. Všechny pokusy byly provedeny za pokojové teploty (22 – 23 °C).

#### Porovnání metody chovu dospělců na buničité vatě a na sendvičových kůrách

- Buničitá vata

Použito bylo 8 vrstev buničité vaty značky Batist, která byla vložena do Petriho misky a pomocí injekční stříkačky s jehlou (o tloušťce 0,5 mm) rovnoměrně ošetřena suspenzí příslušné varianty. Pro apli-

kaci každé z porovnávaných látek byla použita nová injekční stříkačka i jehla. Do každé z misek bylo vloženo 10 dospělců lýkožrouta smrkového, čerstvě získaných z požerků dovezených polen napadených smrků.

- **Sendvičové kůry pro dospělé**

Alternativní metodou k metodě chovu na buničité vatě je použití sendvičových kůr. Sendvičové kůry sestávaly ze dvou čtvercových výřezů kůry s lýkem o rozměru 6 x 6 cm. Do jedné z kůr byly vyhloubeny jamky v počtu odpovídajícímu množství použitých dospělců. Průměr těchto jamek byl přibližně 8 mm a jejich hloubka 3 - 4 mm (podle tloušťky lýka). Obě sendvičové kůry byly štětcem z lýkové strany potírány příslušnou testovanou látkou. Po zaschnutí aplikované látky byli do jamek v kůře přeneseni dospělci lýkožrouta smrkového pomocí jemné entomologické pinzety a kůry byly přiloženy lýkovou částí k sobě. K sevření sendvičových kůr byly použity čtyři plechové svorky protažené předem připravenými otvory v rozích kůry.

- **Porovnání**

Pro porovnání metod byly využity dva pokusy, v kterých byla srovnávána mortalita brouků na stejné variantě toxické látky (celkem bylo testováno 5 variant toxických látek) a kontrolním vzorku s destilovanou vodou. Každá z variant včetně kontrolní byla vyhotovena v pěti opakováních. V prvním pokusu byly použity sendvičové kůry, kontrola přežívání brouků proběhla 1., 4., 6. a 8. den a závěrečná kontrola 18. den po založení pokusu. Evidování byli aktivní brouci, kteří byli identifikováni podle přítomnosti čerstvých hnědých drtinek v připravených jamkách. Při závěrečném vyhodnocení byly obě kůry rozřezány pro zjištění stavu žíru dospělců. V druhém pokusu byli dospělci chováni na buničité vatě, kontroly proběhly 3. a 7. den po založení.

Ke statistické analýze byla použita vícefaktorová ANOVA v programu Statistica 9.0, kdy jako faktory byly určeny typ metody a den kontroly od data založení pokusu, odezvou byl počet mrtvých larev. Jako kontrola I byl porovnáván 3. den na buničité vatě a 4. den na sendvičových kůrách, jako kontrola II 7. den na buničité vatě a 8. den na sendvičových kůrách.

#### **Porovnání termínů kontrol dospělců na buničité vatě**

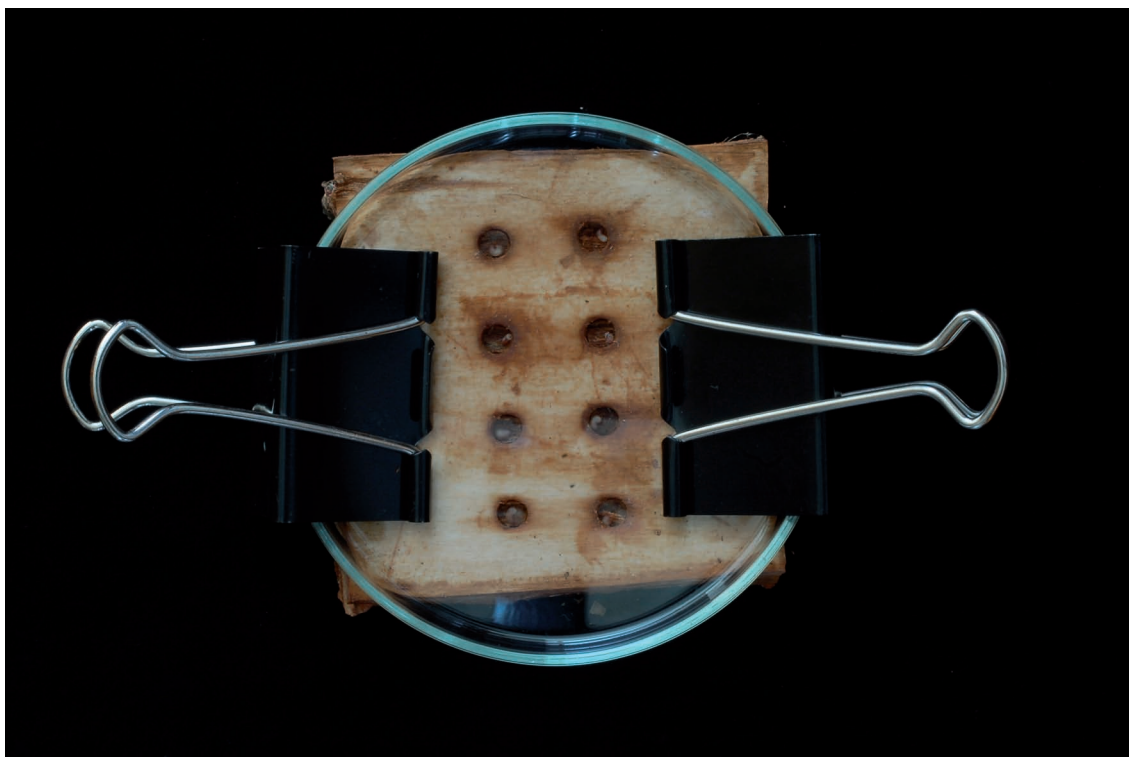
Ke stanovení nejvhodnějších termínů kontrol, resp. k jejich vzájemnému porovnání byly využity celkem čtyři pokusy s dospělci chovanými na buničité vatě. Kontroly každého pokusu probíhaly v různých intervalech a dohromady vytvořily 8 odlišných termínů kontrol, během kterých byly zaznamenávány počty přežívajících jedinců. Mrtví brouci byli z misek průběžně odstraňováni.

Ke statistickém vyhodnocení byla použita analýza shluků v programu NCSS 7.1. K nalezení nejlepší techniky tvorby dendrogramu byla využita rozhodčí kritéria – kofenetický korelační koeficient a obě míry těsnosti proložení delta (MELOUN, MILITKÝ 2006). Pro shlukování byly použity tři proměnné - mortalita brouků na variantě s destilovanou vodou, mortalita brouků na variantách s různými toxickými produkty a mortalita brouků na variantě se sonikátem expresních bakterií odvozených od *E. coli*.

#### **Porovnání metody chovu larev na sendvičových kůrách a na kůře s krycím sklem**

- **Sendvičové kůry pro larvy**

Uspořádání sendvičové kůry pro chov larev bylo totožné se sendvičovými kůrami pro dospělé, avšak jejich rozměr byl zvětšen na 9 x 9 cm



**Obr. 1.**

Kůra s krycím sklem pro chov larev

Bark covered by glass for larval breeding

z důvodu zajištění dostatečného prostoru k žíru jednotlivých larev. Pro tyto pokusy byly vybírány larvy 2. instaru, které byly přenášeny do připravených jamek v lýku pomocí navlhčeného štětce. V jednotlivých sériích testů bylo použito 8 nebo 10 larev.

- Kůra s krycím sklem pro larvy

Pro tento typ chovů bylo využíváno opět výřezů kůr s lýkem o rozměrech 9 x 9 cm a vyhloubenými jamkami. Lýková část kůry byla po aplikaci testovaných látek a vložení larev lýkožrouta smrkového ve 2. instaru překryta sklem (Petriho miskou – dnem vzhůru) o průměru 10 cm. Sklo bylo ke kůře připevněno dvojicí kancelářských svíracích klipů (obr. 1).

- Porovnání

K porovnání těchto metod byly využity pokusy o dvou typech designu. V roce 2009 byla metoda sendvičových kůr a metoda kůr s krycím sklem porovnána v pokusech časově oddělených, přičemž tyto pokusy probíhaly na shodných typech látek, v pěti variantách, jedné kontrolní variantě ošetřené destilovanou vodou a jedné variantě bez ošetření. Použito bylo vždy 10 larev a každá varianta byla provedena v pěti opakováních. Pokus se sendvičovými kůrami byl vyhodnocen po 9 dnech, pokus s kůrou a krycím sklem byl průběžně kontrolován 1., 5., 7., 9. a vyhodnocen 12. den od založení. V roce 2010 byl pro porovnání metod založen jediný souběžný pokus, v tomto pokusu však byly testovány jiné látky než v roce 2009. Osm variant látek (včetně kontrolní varianty ošetřené destilovanou vodou a varianty neošetřené) byly provedeny v šesti opakováních, z toho tři opakování metodou sendvičových kůr a zbylé tři opakování metodou kůr s krycím sklem. Použito bylo vždy 8 larev a pokus byl u obou metod vyhodnocen 6. den od založení.

Při kontrolách byl zaznamenáván stav larev, přičemž byly rozlišovány larvy v kategoriích rozmáčkly, mrtvé bez žíru, mrtvé s předchozím žírem, živé s žírem a živé dosud bez žíru. Žír larev byl analogicky žíru

dospělců hodnocen podle přítomnosti čerstvého trusu. Životaschopnost larev byla zjišťována jejich rušením poklepem na krycí sklo. Kromě kategorií larev byl zaznamenáván počet kukel, dospělců a rovněž počet jedinců, který nebyl při vyhodnocení nalezen. Jelikož byl v jednotlivých pokusech použit rozdílný počet larev (10, resp. 8), byly záznamy pro porovnání v jednotlivých kategoriích přepočteny do relativní škály.

Ke statistické analýze byla použita vícefaktorová ANOVA v programu Statistica 9.0, jako faktor byl zadán typ metody a rok pokusu, odezvou pak relativní počet mrtvých larev při vyhodnocení.

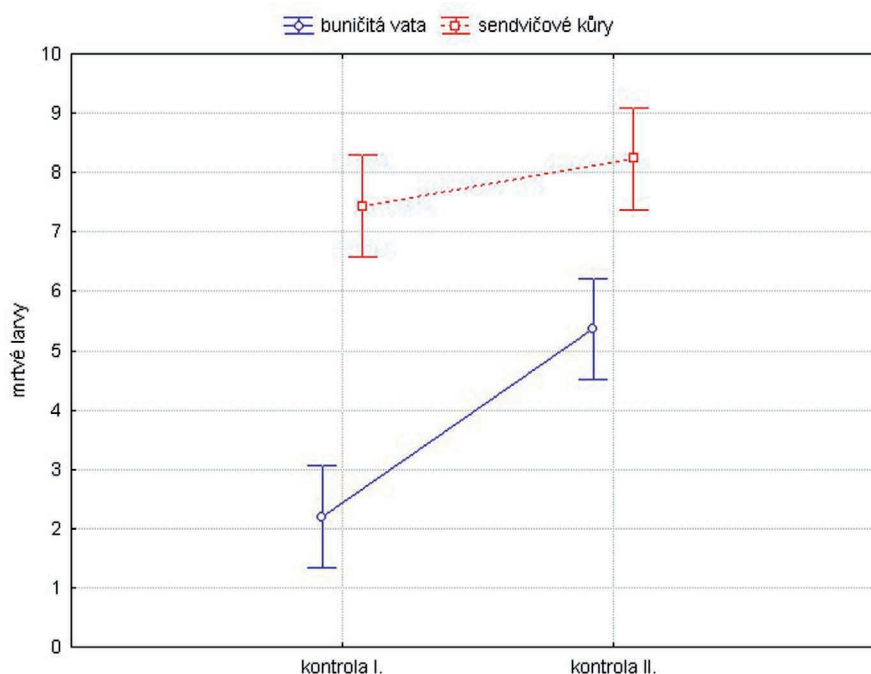
## VÝSLEDKY

### Porovnání metody chovu dospělců na buničité vatě a na sendvičových kůrách

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p < 0,001$ ) v počtu mrtvých brouků nalezených u chovu na buničité vatě a chovu na sendvičových kůrách, což je dobře patrné na grafu 1. Rovněž byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými kontrolami ( $p < 0,001$ ). Bonferroniho post-hoc porovnáním však nebyl rozdíl mezi I. a II. kontrolou v případě sendvičových kůr prokázán.

### Porovnání termínů kontrol dospělců na buničité vatě

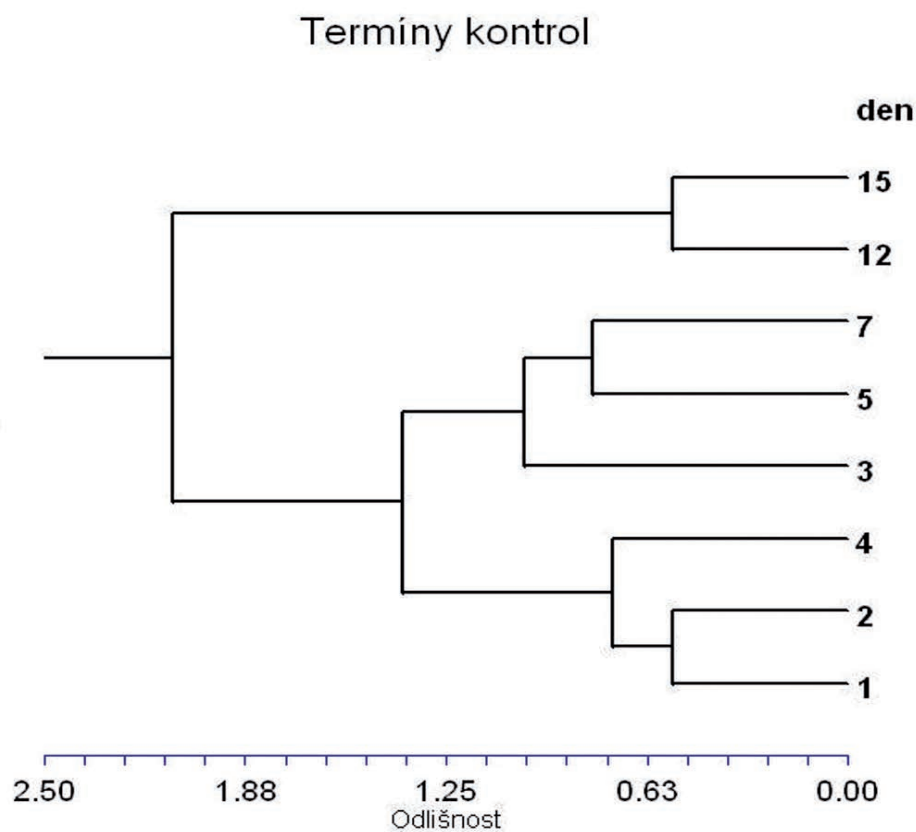
Pro tvorbu dendrogramu (obr. 2) byla vybrána metoda skupinového průměru (Group Average/Unweighted Pair-Group/, CC: 0,806698; Delta (0,5) 0,249480; Delta (1) 0,306865). Dendrogram tvoří tři hlavní skupiny termínů kontrol. První skupina kontrol mezi 1. - 4. dnem druhá skupina kontrol mezi 5. a 7. dnem a třetí skupina kontrol mezi 12. a 15. dnem.



Graf 1.

Porovnání přežívání brouků na buničité vatě a sendvičových kůrách

Comparison of beetle survival on cellulose wadding and sandwich barks



**Obr. 2.**

Dendrogram termínů kontrol přežívání dospělců na buničité vatě  
Dendrogram of control terms of adult survival on cellulose wadding



**Graf 2.**

Porovnání přežívání larev na sendvičových kůrách a kůrách s krycím sklem  
Comparison of larval survival on sandwich barks and barks covered by glass

### Porovnání metody chovu larev na sendvičových kůrách a na kůře s krycím sklem

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi metodou sendvičových kůr a metodou kůr s krycím sklem v podílu larev, jež byly nalezeny rozmáčkly (ať při fixaci kůr nebo soustavným tlakem svíracího klipu v případě kůr s krycím sklem). Rovněž nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v počtu mrtvých (graf 2) nebo živých larev a dovyvinutých dospělců (do této kategorie byly zahrnuty i kukly). Byl prokázán statisticky významný rozdíl v množství larev, které nebyly při závěrečné kontrole nalezeny ( $p < 0,001$ ). Sendvičové kůry vykazovaly průměrně vyšší počet nenalezených larev.

## DISKUSE

### Porovnání metody chovu dospělců na buničité vatě a na sendvičových kůrách

Použití buničité vaty k testům toxicity látek pro dospělé lýkožrouta smrkového nebylo doposud, alespoň podle znalostí autorů, publikováno. Výsledky statistické analýzy prokázaly rozdílnost metody chovu dospělců na buničité vatě a chovu na sendvičových kůrách. Ačkoliv kontrola I i kontrola II byla u buničité vaty proti kontrole na sendvičových kůrách o den opožděna, průměrný počet mrtvých jedinců byl u buničité vaty mnohem nižší. Z grafu 1 vyplývá, že k mortalitě dospělců došlo u sendvičových kůr již před 4. dnem a mortalita při dalších kontrolách se od sebe, vzhledem k nízkému počtu přežívajících dospělců, již nelišila. Naopak u buničité vaty byla hlavní část mortality mezi porovnávanými kontrolami zjištěna. Ačkoliv se při druhé kontrole průměrná mortalita v porovnání buničité vaty a sendvičových kůr přiblížila, zůstala přesto u buničité vaty o zhruba dva jedince nižší. Z praktického hlediska je použití chovu na buničité vatě vhodnější u pokusů, při kterých je potřeba provádět kontrolu dospělců v kratších, resp. jen v malém počtu intervalů.

### Porovnání termínů kontrol dospělců na buničité vatě

Na dendrogramu (obr. 2) jsou zachyceny skupiny termínů kontrol ode dne založení pokusu, které jsou si z hlediska mortality larev podobné. Kontrola 1. a 2. den je prakticky totožná. Kontrola 3. a 4. den již vykazuje jistou odlišnost. Tato změna pořadí termínů kontrol (z hlediska doby uplynulé od založení pokusu) jistě souvisí s fyziologickou kvalitou použitých jedinců lýkožrouta smrkového. Následující termíny kontrol 5. a 7. či 12. a 15. den tvoří zřetelně oddělené shluky.

### Porovnání metody chovu larev na sendvičových kůrách a na kůře s krycím sklem

Sendvičové kůry vykazují průměrně vyšší počet larev, jež nebyly při závěrečném hodnocení nalezeny. Vysvětlením tohoto jevu může být skutečnost, že mezi dvěma kůrami vznikají při vysychání různé široké mezery, kterými mohou larvy uniknout.

Pokusy v roce 2009 probíhaly časově odděleně a závěrečné vyhodnocení obou pokusů proběhlo v odlišném dni počítaném od založení příslušného pokusu. Jelikož byl druhý pokus hodnocen průběžně, bylo by možné použít kontrolu 9. den jako závěrečnou, což by odpovídalo konečnému hodnocení prvního pokusu, avšak při závěrečném hodnocení docházelo zpravidla k upřesnění údajů předchozích kontrol (podrobná analýza kůr v celém profilu). Při tes-

tu shody kontroly 9. den a vyhodnocení 12. den u druhého pokusu nebyl nalezen statisticky významný rozdíl, proto byl v analýze rozptylu použit 12. den. Nižší mortalita larev na obou porovnávaných metodách při pokusech uskutečněných v roce 2010 může být způsobena kratším intervalem mezi založením pokusu a vyhodnocením.

Výsledky statistické analýzy ukázaly, že rozdíly mezi metodou sendvičových kůr a kůry s krycím sklem, s jedinou výjimkou počtu larev nenalezených při závěrečném hodnocení, jsou nevýznamné. Z grafu 2 je v případě roku 2009 patrná mírná diference mezi oběma metodami, ale ani Bonferroniho post-hoc testem nebyly rozdíly metod prokázány. Značnou výhodou metody chovu larev na kůře s krycím sklem je možnost průběžné kontroly žíru larev.

## ZÁVĚR

Metody chovu dospělců na buničité vatě a sendvičových kůrách nelze považovat za kvalitativně shodné. Při použití metody chovu dospělců lýkožrouta smrkového na buničité vatě byly stanoveny tři nevhodnější termíny kontroly, a to mezi prvním a druhým dnem, pátým až sedmým a dvanáctým až patnáctým dnem od založení pokusu.

Metodu chovu larev na sendvičových kůrách a metodu chovu larev na kůře s krycím sklem lze považovat za srovnatelné, s výjimkou primární mortality larev, která je na sendvičových kůrách statisticky významně vyšší. Metoda chovu larev na kůře s krycím sklem poskytuje značnou výhodu v možnosti průběžné kontroly žíru larev bez jejich významného rušení.

### Poznámka:

Příspěvek byl vypracován v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QH7 1290 „Příprava transgenických linií smrku toxických pro kůrovcovitě“.

## LITERATURA

- BIEDERMANN P. H. W., KLEPZIG K. D., TABORSKY M. 2009. Fungus cultivation by ambrosia beetles: Behavior and laboratory breeding success in three xyleborine species. *Environmental Entomology*, 38/4: 1096-1105.
- COHEN A. C. 2004. *Insect Diets: Science and Technology*. Boca Raton, CRC Press: 324 s.
- FACCOLI M., BLAŽENEC M., SCHLYTER F. 2005. Feeding response by the sexes of bark beetle *Ips typographus* in tunnelling micro-assay to host and non-host compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 745-759.
- JOLIVET P. 1998. *Interrelationship Between Insects and Plants*. Boca Raton, CRC: 309 s.
- KOVARÍK F. (ed.) 2000. *Hmyz: Chov, morfologie*. Jihlava, Madagaskar: 295 s.
- MATTANOVICH J., EHRENHÖFER C., FÜHRER E. 1999. Zur Weiterentwicklung eines halbsynthetischen Nährmediums für *Ips typographus*. *Journal of Pest Science*, 72: 49-51.
- MELOUN M., MILITKÝ J. 2006. *Kompedium statistického zpracování dat*. Praha, Academia: 982 s.
- NOVÁK V., ŠROT M. 1977. *Chemická ochrana neodkorněného dřeva a asa-*

- nace kůrovců přípravky bez obsahu DDT. Lesnictví, 23/12: 969-984.
- SAUVARD D. 2004. General biology of bark beetles. s. 63-88. In: Lieutier F., KEITH D. R., BATTISTI A., GRÉGORIE J. C., EVANS H. F. 2004: Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. Dodrecht-Boston-London, Kluwer Academic Publishers: 569 s.
- SKUHRAVÝ V. (ed.) 1968. Metody chovu hmyzu. Praha, Academia: 288 s.
- 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: 185-191.

## SPRUCE BARK BEETLE *IPS TYPOGRAPHUS* (L.) BREEDING METHODS FOR SUBSTANCES FEEDING TOXICITY ASSAYS

### SUMMARY

Three different possibilities of spruce bark beetle breeding methods for substances feeding toxicity assays were evaluated in the presented paper. Cellulose wadding was used only for rearing of adults. Tested substances were applied directly to the cellulose wadding placed in the Petri dish. The most appropriate terms were stated for this method. The second method, method of bark sandwiches was used for larvae and adults. Sandwich consisted of two bark pieces of 6 x 6 cm for adults and 9 x 9 cm for larvae. Bark pieces were set by phloem sides together and fixed by binding clips. Tested substances were applied to the phloem surface by brush. Individuals of bark beetles were transferred to the fossettes in the phloem afterwards. The third method, method of sandwiches of bark and glass was used for larvae only. Phloem side of the bark pieces 9 x 9 cm was covered by glass (Petri dish of 10 cm in diameter) after application of tested substance and transfer of larvae of the second larval instar. Bark piece and glass were fixed by binding clips together. Two experiments of six variants and five replications were achieved for cellulose wadding and bark sandwiches rearing comparison. Four experiments evaluated in different intervals since trial establishment were achieved for the most appropriate terms statements. Three experiments were achieved to bark sandwiches and sandwiches of bark and glass for their comparison. Two of these experiments with seven variants and five replications started in different terms, the last one ran as parallel experiment with eight variants and five replications. Analysis of variance was used for evaluation of differences of the rearing methods, cluster analysis was used for optimal terms designation of adults rearing on cellulose wadding.

Methods of adults rearing on cellulose wadding and bark sandwiches cannot be considered as qualitatively equal. Three the most appropriate terms of controls were recognized in the methods of adults rearing on cellulose wadding: always between the first and second, fifth and seventh and finally twelfth and fifteenth days since the experiment started. Methods of rearing of larvae in bark sandwiches and in sandwiches of bark with glass combination were found comparable in all aspects, but primary mortality of larvae, which is statistically higher in bark sandwiches. Method of sandwiches consisting of bark covered by glass was found as highly convenient because of possibility of control of larvae feeding without their disturbing.

---

### ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Roman Modlinger, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.  
Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Česká republika  
tel.: 257 892 224; e-mail: modlinger@vulhm.cz