



národní
úložiště
šedé
literatury

Certifikovaná metodika pro hodnocení účinnosti akaricidních látek na skladištní roztoče a pro identifikaci rezistence

Hubert, Jan; Nesvorná, Marta; Stará, Jitka
2015

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-263435>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 21.10.2017

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Jan Hubert a kol.

**Certifikovaná metodika pro
hodnocení účinnosti akaricidních
látek na skladištní roztoče a pro
identifikaci rezistence**

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory MŠMT ČR a je výstupem řešení projektu: – NAZV QJ1230167

Metodika je určena pro státní správu. Metodice bylo uděleno osvědčení UKZUZ 082314/2015. O uplatnění metodiky byla dne 13. srpna 2016 uzavřena smlouva podle ustanovení § 269 zákona č. 513/1991 Sb. obchodního zákoníku.

Odborný oponent:
profesor RNDr. Jaroslav Smrž, CSc.

Oponent ze státní správy:
RNDr. Jan Juroch

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2015
ISBN 978-80-7427-181-6

Jan Hubert, Marta Nesvorná, Jitka Stará

Certifikovaná metodika pro hodnocení účinnosti akaricidních látek na skladištní roztoče a pro identifikaci rezistence

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2015

Certifikovaná metodika pro hodnocení účinnosti akaricidních látek na skladištní roztoče a pro identifikaci rezistence

Metodika je zpracována pro potřeby plnění zákona č. 258/2000 Sb. Metodika je zaměřena na problematiku týkající se ochrany skladovaných plodin a substrátů před napadením skladištními roztoči. Metodika přináší postupy pro stanovení diskriminačních dávek akaricidních látek pro hodnocení jejich účinnosti na skladištní roztoče a pro případnou identifikaci rezistence. Metodika obsahuje souhrn nových originálních informací o účinnosti akaricidních látek na skladištní roztoče v dvou typech laboratorních testů, tj. na impregnovaném filtračním papíru a v růstovém testu. Laboratorní testy popsané v této metodice je možné použít pro porovnání účinnosti jednotlivých akaricidních látek na roztoče nebo pro srovnání citlivosti různých populací roztočů.

Certified technological procedure of laboratory tests of acaricidal compounds against stored product mites.

The certified technological procedure was developed in order to support Czech national legislation - Act No. 258/2000. The procedure is aimed at the protection of stored plant substrates against infestation of mites (Acari: Astigmata). The procedure includes two tested methods (i) impregnated filter paper test and (ii) population growth tests. The procedure includes novel findings describing the discrimination doses of acaricidal compounds to the mites. The doses are useful for identification of resistance. The described methods enable the comparison of efficacy of different acaricidal compounds as well as the comparison of toxic effect to various populations of mites.

Obsah

1. CÍL METODIKY.....	6
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	
2.1 Vznik rezistence u členovců a možnosti včasné detekce rezistence.....	7
2.2 Případy vzniku rezistence u skladištních roztočů.....	8
2.3 Dostupné biocidní přípravky pro kontrolu skladištních roztočů.....	10
2.4. Testování akaricidů a možné rezistence u skladištních roztočů	10
2.5. Popis testu využívající impregnovaný filtrační papír.....	10
2.6. Příklad aplikace testu využívající impregnovaný filtrační papír.....	14
2.7. Popis testu využívající růstový test.....	20
2.8. Příklad aplikace testu využívající růst populace.....	23
2.9. Porovnání vhodnosti a náročnosti navržených testů pro vyhodnocení účinnosti akaricidních látek.....	28
2.10. Porovnání účinnosti akaricidních látek.....	28
3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	32
4. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	33
5. SEZNAM POUŽITÉ A SOUVISEJÍCÍ LITERATURY.....	34
6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	35

1. CÍL METODIKY

Napadení skladovaných obilovin členovci, tedy i roztoči, je nežádoucí a vede k jejich znehodnocení, což je promítnuto do Českých norem. Např. ČSN 46 12000 požaduje, aby byly obiloviny zcela bez živých škůdců. Stanovení napadení škůdci uvádí norma ČSN ISO 6639 a ČSN 46 1011. Z těchto důvodů jsou skladovatelé nuceni provádět kontrolní opatření vůči skladištním členovcům. V současné době neexistují biocidní přípravky, které by byly značeny ke kontrole skladištních roztočů. Skladovatelé proto používají insekticidní přípravky, které se liší svojí účinností na roztoče jako necílovou skupinu.

Přestože existují legislativní podklady stanovující „nulovou toleranci“ vůči kontaminacím roztočů, reálná situace je jiná a obiloviny v ČR jsou roztoči vysoce napadeny. Aplikací biocidních látek lze populace roztočů kontrolovat. Roztoči jsou vůči některým biocidním látkám tolerantní, dokonce existuje jev zvaný hormoligóza, kdy nízké dávky biocidních přípravků stimulují růst roztočů. Tento jev může být předstupněm vzniku rezistence vůči biocidním přípravkům. Skladovatelům a orgánům státního dozoru chybí často informace o citlivosti roztočů vůči biocidním látkám, včetně možností jak tuto citlivost stanovit.

Cílem této metodiky je poskytnout pracovníkům ve státní správě dvě testovací metody, které umožňují stanovit diskriminační koncentrace akaricidních látek a zároveň porovnat citlivost různých populací roztočů. Použitím této metodiky je možné snížit rizika spojená s infestací skladovaných komodit roztoči a zabránit nevhodným aplikacím biocidních látek. Pomocí diskriminačních koncentrací lze včas identifikovat rezistentní populace roztočů.

Přínos metodiky

- Aplikace nové metody využívající testování akaricidních látek v testu s impregnovaným filtračním papírem, včetně stanovení diskriminačních koncentrací.
- Aplikace nové metody využívající testování akaricidních látek v růstovém testu včetně stanovení diskriminačních koncentrací.
- Zcela nový soubor informací o vlivu biocidních látek na skladištní roztoče a identifikuje vhodné látky pro využití v ochraně skladovaných substrátů a rostlinných komodit.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Vznik rezistence u členovců a možnosti včasné detekce rezistence

Rezistence škůdců k insekticidům začala být výzkumně intenzivně řešena ve světě i v ČR v 60. letech minulého století, kdy byla hlavním problémem rezistence škůdců k DDT a chlorovaným uhlovodíkům. Dále se objevila rezistence k organofosfátům, karbamátům a pyretroidům. V té době byly vypracovány a standardizovány postupy a metodiky hodnocení rezistence, založené zpravidla na biologických testech (Anonymus 1969). V 90. letech minulého století došlo k oživení výzkumu problematiky rezistence z důvodu výskytu rezistentních populací škůdců k novým typům účinných látek, jako jsou inhibitory tvorby chitinu (Misfit et al., 1988), spinosiny (Mota-Sanchez et al., 2006), neonikotinoidy (Baker et al., 2007) a další látky. Rezistence byla prokázána dokonce u biologických látek, jako jsou *Bacillus thuringiensis* (Tabashnik 1994) nebo bakuloviry (Asser-Kaiser et al., 2007). V roce 1989 byl na Michiganské státní univerzitě zahájen program *Global Arthropod Pesticide Resistance Database* (APRD), který poskytuje přehled rezistence členovců (hmyzu a roztočů) (www.pesticideresistance.org). V roce 1984 byla založena organizace pro výzkum rezistence škůdců k zoocidům *Insecticide Resistance Action Committee* (IRAC) (www.illac-online.org), jejímž cílem je usnadnit komunikaci a vzdělávání v oblasti výzkumu a managementu rezistence hmyzu a roztočů k zoocidům (Spars & Nauen 2015). Tato organizace navrhuje ve spolupráci s vědci a pesticidními firmami metody pro detekci rezistence vybraných škůdců a doporučuje antirezistentní strategie pro zabránění nebo oddálení nástupu rezistence. V databázi IRAC jsou uvedeny metodiky pro hodnocení rezistence schválené organizací IRAC a dále odkazy na publikace, týkající se testování rezistence. U každé metodiky schválené IRAC je vždy uveden druh škůdce, jeho vývojové stádium a také spektrum insekticidů, k jejichž testování je metoda vhodná. Obvykle uvedená metoda není vhodná pro všechny typy insekticidu, které se proti danému škůdci používají.

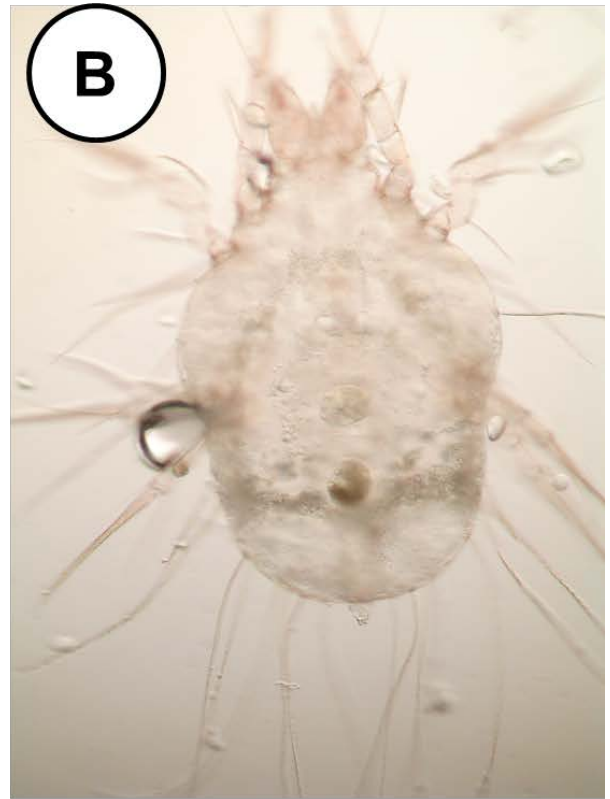
Dosud nebyl vytvořen žádný metodický postup umožňující testovat vliv akaricidních látek na skladištní roztoče. Na rozdíl od skladištních roztočů, fytofágní roztoči- svilušky se po druhé světové válce stali významnými fytofágními škůdci, kteří způsobují závažné škody. Tito škůdci vyvinuli řadu mechanismů rezistence vůči akaricidním látkám. Vysvětlení tohoto jevu je následující (Hoy 2011): (i) akaricidní látky a hnojiva stimulují reprodukci roztočů; (ii) aplikace pesticidů zlikvidovala přirozené nepřátele roztočů; (iii) roztoči jsou schopni uniknout predátorům v čase a prostoru. Ačkoliv tyto jevy jsou známé pro fytofágní roztoče, je možné, že stejné mechanismy mohou být platné i pro skladištní roztoče. Skladištní roztoči jsou vůči

některým biocidním látkám tolerantní, např. nebyl prokázán vztah popisující pokles růstu roztočů v potravě ošetřené chlorpyrifos-methylem u *Acarus siro* (Hubert et al., 2007). Při nízkých koncentracích pyrethroidu bifentrinu docházelo k stimulaci reprodukce a respirace roztoče *Tyrophagus putrescentiae* (Stará et al. 2011a). Skladištní roztoči významně snižují kvalitu skladovaných substrátů a přinášejí medicínální rizika (Hubert et al. 2012). Z těchto důvodů je důležitá chemická kontrola roztočů, avšak s chemickou kontrolou roztočů je nutné uvažovat o možném vzniku rezistence a zavádět antirezistentní strategie (Hoy 2011).

2.2. Případy vzniku rezistence u skladištních roztočů

Ačkoliv IRAC neuvádí případy detekce rezistence u skladištních roztočů, existují dokumentované případy ve Velké Británii. Roztoči, konkrétně druh *Acarus siro*, zde způsobovali velké škody v sýrařském průmyslu infestacemi sýra během jeho zrání. Proto byla prováděna ošetření, v letech 1970/1971 byla prokázána nefunkčnost lindanu v sýrárnách (Wilkin 1973). Od roku 1973 byla zavedena kontrola pirimiphos-methylem jako alternativa lindanu. V roce 1979 byl prokázán vznik rezistence u roztoče *Acarus siro* (Stables & Wilkin 1981, Thind & Muggleton 1998). Laboratorní pokus byl založen na aplikaci pirimiphos-methylu do obilí, kde byla kultivována populace roztoče s podezřením na rezistenci a vliv biocidní látky byl vyhodnocen po 14 dnech (Stables & Wilkin 1981). Stejnou metodou byla následovně prokázána rezistence u populace roztoče *Tyrophagus putrescentiae* pocházejícího ze sýrařských podniků (Stables 1984).

Následně byl změněn design testu prokazujícího rezistenci na test využívající impregnovaný filtrační papír. Mortalita roztočů byla sledována po 24 hodinách po expozici na akaricidní látce a pomocí probitové regrese byly stanoveny letální koncentrace akaricidní látky (LD_{50} , LD_{99} , ED_{50} and ED_{99}) a faktor rezistence (Thind & Muggleton 1998; Szlendak et al. 2000). Při aplikaci tohoto designu na rezistentní populaci *Acarus siro* vůči pirimiphos-methylu byl faktor rezistence 152 pro ED_{99} (Szlendak et al. 2000).



Obrázek č.1. Skladištní a prachoví roztoči, A – *Acarus siro*, B – *Lepidoglyphus destructor*, C- *Tyrophagus putrescentiae*, D – *Dermatophagoides farinae*.

2.3. Dostupné biocidní přípravky pro kontrolu skladištních roztočů

V EU nejsou registrovány žádné akaricidní přípravky pro hubení skladištních roztočů, proto je běžnou praxí používat insekticidní či biocidní přípravky. Dostupné jsou aktivní látky pirimiphos-methyl, cyflutrín, cypermetrín, chlorfenapyr a deltametrín (Stará et al. 2014). Jako biocidní látky jsou využívány přípravky s účinnými látkami azadirachtin, permetrín a kombinace permetrínu s pyroproxifenem. Tyto přípravky byly doplňovány benzyl-benzolátem, který však již není na seznamu povolených přípravků v EU (Stará et al. 2011b). Jako alternativní prostředky ochrany byly testovány rostlinné aldehydy (Hubert et al. 2008), bakteriální toxiny např. *Bacillus thuringiensis* var. *tenbrionis* (Erban et al. 2009), disruptory produkce chitinu (Šobotník et al. 2008), avermektiny (Erban et al. 2012) a diatomitové pudy (Nesvorná & Hubert 2014). Avšak žádná s těchto látek není registrována pro aplikaci v kontrole skladištních roztočů a dokonce ani proti roztočům prachovým.

2.4. Testování akaricidů a možné rezistence u skladištních roztočů

V databázi IRAC dosud chybí metodiky pro testování rezistence skladištních roztočů (Acari: Astigmata).. Vývoj metod pro testování akaricidů a možné rezistence u skladištních roztočů uvedených v této metodice vycházel ze starších testů, které byly prováděny ve VURV, v.v.i (např. Žďárková & Horák, 1974) a na pracovišti Ferra, York, Velká Británie (Thind & Muggleton, 1998, Collins 2006). Byly vyvinuty dvě metody testování akaricidních látek na skladištních roztočích v laboratorních podmínkách: (i) impregnovaný filtrační papír, tj. biotest s aplikací akaricidů na filtrační papír ve váženkách; (ii) růstový biotest, tj. pokus s aplikací akaricidů přímo do potravy roztočů, který zahrnuje i aplikaci do obilí, řepky a dalších skladovaných substrátů (Hubert et al. 2007, Stará et al. 2011a; 2011b, 2014).

2.5. Popis testu využívajícího impregnovaný filtrační papír

Tento test vychází z předpokladu, že roztoči se dostanou do kontaktu s akaricidní látkou přítomnou ve filtračním papíru, během jejich pobytu na tomto papíru. Nejčastěji používaná doba kontraktu je 24 hodin.

Popis experimentu: Pro testy jsou použity 10 mL váženky o průměru 25 mm (kat. číslo 2602 Vitrum, a.s., Praha), na dno váženek je umístěn filtrační papír (Whatman č. 3) ve formě kolečka o průměru 22 mm (Obrázek č. 2). Do každé váženky vložíme dva kusy filtračního papíru na sobě. Vzhledem k průměru předpokládáme plochu pro aplikaci biocidní látky 6,28 cm². Na filtrační papír je aplikována naředěná biocidní látka, pro ředění vycházíme z

doporučené koncentrace, kterou snížíme a zvýšíme 10x a 100x. Ředění provádíme v destilované vodě, pokud je to možné vzhledem k rozpustnosti. Do každé váženky je následně pipetováno 200 μ L testovaného naředěného biocidu. Akaricidní látka je ponechána 5 hodin za pokojové teploty aby došlo k odpaření vody. Před dodáním roztočů je filtrační papír navlhčen 100 μ L destilované vody. Tento objem vodného roztoku se dostatečně vsákne do filtračního papíru a vytvoří příznivé vlhkostní podmínky pro roztoče. Za nízké vlhkosti by došlo k mortalitě roztočů vlivem vysychání, při přelití by se roztoči utopili.

Obrázek č. 2. Váženka s impregnovaným filtračním papírem pro testování vlivu akaricidních látek na mortalitu roztočů

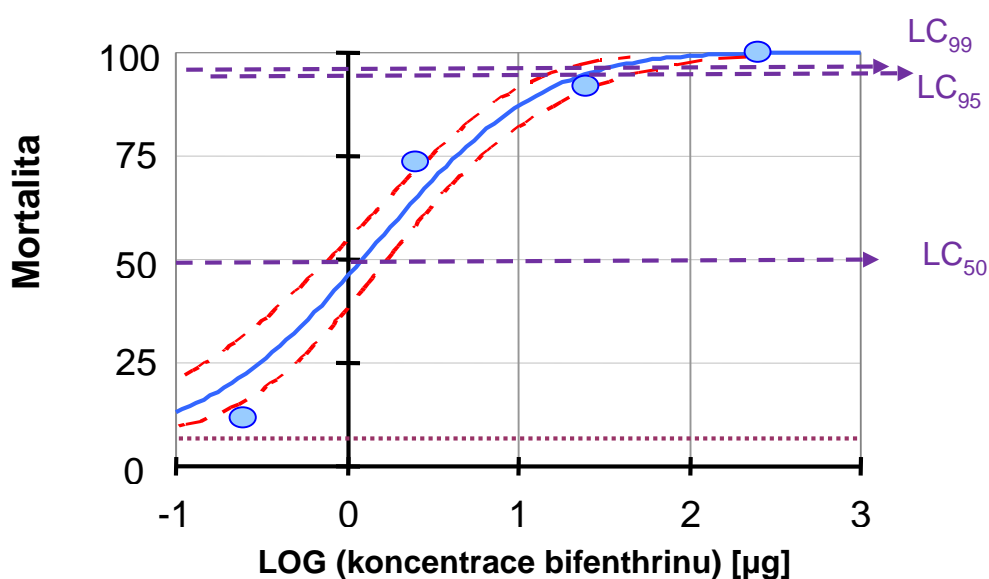


Do každé váženky je dodáno 10 dospělců roztočů známého stáří. Stáří roztočů se odhadne dle doby od založení laboratorní kolonie roztočů. Experiment se provádí minimálně v šesti opakováních pro každou koncentraci testované látky. Jako kontrola je používána destilovaná voda místo testované látky. Přirozená mortalita v našich experimentech dosahuje cca 5%. Váženky s roztoči umísťujeme do termostatu se stálou teplotou 25 °C, kde jsou ponechány 24 hodin k inkubaci. Po 24 hodinách se stanovuje mortalita roztočů prohlédnutím obsahu váženky. Pro vyhodnocení mortality je nutné vyjmutí filtračních papírků na Petriho misku. Roztoče pozorujeme pod stereoskopickou binokulární lupou např. Stemi 2000 (Carl Zeiss, Jena, Německo). Problémem bývá odhadnout, zda je roztoč skutečně usmrcen. Za

usmrčeného roztoče považujeme jedince, který nevykazuje známky pohybu ani po stimulaci štětečkem. Tělíčka mrtvých jedinců většinou bývají vyschlá, mají naoranžovělou barvu oproti živým roztočům, kteří mají bílou barvu a jsou nafouklí. Počet mrtvých a živých roztočů je zaznamenán do protokolu.

Analýza dat: Získaná data lze vyhodnotit např. pomocí programu XLSTAT (<http://www.xlstat.com/en/>). Výhodou programu je přímá návaznost na MS Excel. Pro výpočet je mimo základní verzi programu ještě nutné použít modul Dose. Před výpočtem stanovíme přirozenou mortalitu v procentech. Tento program počítá probitovou regresí, kde závislá proměnná je mortalita roztoče a nezávislá proměnná je koncentrace pesticidu. Program pracuje s přirozenou mortalitou, která je naměřena v kontrole. Dále program umožňuje transformovat koncentraci akaricidu, což může vést ke zpřesnění výpočtů v modelu. Program zobrazí závislost mortality na koncentraci akaricidu, vypočte parametry modelu a provede zpětné odhady koncentrace akaricidu. Z této tabulky se nejčastěji používají LC_{50} , LC_{90} , LC_{99} vyjadřující koncentraci pesticidu, při níž je dosaženo 50, 90 a 99 % mortality včetně 95% konfidenčních intervalů (Obrázek č. 3). Tyto odhady mohou být využity pro srovnávání různých populací jednoho druhu roztoče nebo vlivu různých akaricidních prostředků. Příklad těchto odhadů uvádí tabulka č. 1.

Obrázek č.3. Vliv mortality roztoče *Tyrophagus putrescentiae* v závislosti na koncentraci akaricidní látky (bifenthrin) vyjádřený pomocí probitového modelu, stanovení hodnot LC_{50} , LC_{90} , LC_{99} . (dle Stará et al. 2011a).



Tabulka č. 1. Porovnání vlivu insekticidních přípravků na mortalitu 3 odlišných populací roztoče *Tyrophagus putrescentiae* v testu využívající impregnovaný filtrační papír (podle Stará et al. 2014). Model probitové regrese $y = kx + q$, kde koncentrace účinné látky byla logaritmicky transformována. Pro fitované parametry modelu, tj. LD50, LD95 and LD99, je uveden fit a 95% konfidenční interval v závorce.

Účinná látka	Populace	Parametry probitové regrese			Zpětné odhady					
		R ²	k	q	LD ₅₀	Ri ₅₀	LD ₉₅	Ri ₉₅	LD ₉₉	Ri ₉₉
Pirimiphos	L	0.398	0.8 (0.7/1)	1.4 (1.1/1.7)	0.02 (0.01/0.03)	1.72	1.8 (0.8/6)	1.71	12 (4/66)	1.70
	D	0.363	0.7 (0.6/0.9)	1.1 (0.8/1.4)	0.06 (0.03/0.11)	2.49	5 (2/21)	4.92	46 (12/321)	6.50
	F	0.4	0.8 (0.7/1)	1.6 (1.3/1.9)	0.01 (0.01/0.02)		1 (0.5/3.4)		7 (2/35)	
Cypermethrin /PBO	L	0.203	0.4 (0.6/0.3)	-0.01 (-0.2/1.8)	0.67 (0.27/1.96)	1.14	4,615		165,62*8	
	D	0.272	0.7 (0.4/1.0)	-0.5(-0.8/-0.3)	4.50 (2.25/12)	7.66	997		9,007*	
	F	0.121	0.3 (0.2/0.4)	-0.01 (-0.2/0.2)	0.59 (0.16/4)		1,732,800		751,233,034	
Deltamethrin /PBO (*1)DeltaCAPS	L	0.547	3.1 (2.2/3.9)	-1.4(-1.9/-0.8)	2.6 (2/3)	2.33	9 (7/14)	1.05	16 (11/28)	
	D	0.457	2.7 (2/3.4)	-0.9 (-1.3/-0.5)	2 (1.6/2.6)	1.84	9 (7/14)		16 (10/32)	
	F	0.248	0.96 (0.67/1.3)	-0.1 (-0.3/0.1)	1 (0.6/2)		63(24/360)	6.77	327*	
(*2)K-oniol	L	0.355	0.7 (0.6/0.9)	1.3 (1/1.6)	0.013 (0.01/0.02)		2 (1/9)		20 (6/144)	
	D	0.522	1.0 (0.8/1.2)	0.9 (0.6/1.2)	0.11 (0.07/0.18)	8.62	5 (3/16)	2.23	26 (10/114)	1.28
	F	0.438	0.8 (0.6/1.0)	1.1 (0.8/1.4)	0.04 (0.02/0.07)	3.15	4 (2/16)	1.74	28 (8/183)	1.37
(*3)K-othrine	L	0.349	1.0 (0.6/1.3)	-0.3 (-0.6/-0.1)	1.71 (0.96/3.18)	12.76	90 (28/886)		456*	
	D	0.210	0.6 (0.4/0.7)	0.2 (-0.1/-0.4)	0.4 (0.2/0.9)	3.07	398*		6,560*	
	F	0.365	0.7 (0.6/0.9)	0.6 (0.4/0.8)	0.13 (0.07/0.24)		24 (9/116)		202*	
Cyflutrin	L	0.268	1.2 (0.7/1.7)	-0.5 (-0.8/-0.15)	2 (1/3)	1.55	47(20/363)		173*	
	D	0.421	2.8 (2.0/3.7)	-1.4 (-1.8/-0.9)	3 (2/4)	2.24	11 (8/22)		20(12/47)	
	F	0.214	0.7 (0.5/0.9)	-0.1 (-0.3/0.03)	1 (0.7/2)		442*		4,770*	
Chlorfenapyr	L	0.619	1.2 (0.9/1.4)	1.2 (0.9/1.4)	0.03 (0.02/0.05)	3.16	0.90 (0.5/2)	15.20	3 (1.5/10)	28.62
	D	0.604	1.0 (0.9/1.2)	1.9 (1.6/2.3)	0.01 (0.007/0.02)	1.16	0.5 (0.25/1)	8.35	2 (0.9/7)	18.68
	F	0.774	2.3 (1.7/2.9)	4.5 (3.3/5.6)	0.01 (0.007/0.014)		0.06 (0.04/0.1)		0.1 (0.1/0.3)	

Legenda: PBO – Piperonylbutoxide, (1) DeltaCaps, (2) K-Obiol, (3) K-Othrine, * - indikuje fity pro nereálné hodnoty; populace roztoče: L – laboratorní, D – psí granule, F – polní – řepka. Ri index rezistence

2.6. Příklad aplikace testu využívajícího impregnovaný filtrační papír

Materiál: váženka 25 mm (cat. číslo 2602 Vitrum, a.s., Praha) – 60 ks, filtrační papír (Whatman č. 3) ve formě kolečka o průměru 22 mm -120 ks, pipeta, špičky, stereomikroskop

Roztoči: roztok *Tyrophagus putrescentiae*, laboratorní populace, stáří kolonie 28 dní, bude použito 600 dospělých jedinců bez ztrát při manipulaci.

Software: MS Excel, XLSTAT, XLSTAT-Dose,

Biocidní látka: Actellic EC 25 (pirimiphos methyl 250g/L), ředěno ve vodě, tj. základní roztok (ZR) obsahuje v 50 mL 12.5 g účinné látky pirimiphos methyl, při aplikaci 200 µL ZR by bylo na 1 cm² filtrační papír nanášeno 25 000µg účinné látky pirimiphos methyl, v testu je filtrační papír s plochou 3.8 cm². Ředění následuje dle tabulky č. 2.

Tabulka č.2. Příklad ředění pirimiphos-methylu pro aplikaci v testu využívajícím impregnovaný filtrační papír

Ředění č.	(%)	roztok	akaricid	ddH ₂ O	µg na 1cm ²	µg na FP
1	1	ZR	0.5	49.5	250	
2	0.1	1	5	45	25	6.579
3	0.01	2	5	45	2.5	0.658
3	0.001	3	5	45	0.25	0.066
4	0.0001	3	5	45	0.025	0.007
5	0.000001	4	5	45	0.0025	0.001

Legenda: FP –filtrační papír

Postup pro provedení testu:

- (1) Zkontroluj stav experimentálních roztočů, tj. laboratorní kolonie
- (2) Příprav roztoky biocidní látky den před pokusem a uchovávej v lednici
- (3) Příprav váženky s filtračním papírem den před pokusem, vzhledem k náročnosti testu je vhodné test rozdělit do dvou následujících pracovních dní a testovat po 30 váženkách. Váženky musí být před pokusem zbavené reziduí pesticidu, to je řešeno např. sušením za vysokých teplot (170 °C po 2 hodiny).
- (4) Aplikuj 200 µL pesticidu do označených váženek, nech 2-3 hodiny zaschnout. Udělej 6 opakování pro každou testovanou koncentraci pesticidu, nebo 2 x 3 opakování jestliže bude experiment rozvržen do dvou dnů.
- (5) Navlhči filtrační papír ddH₂O -100 µL.
- (6) Příprav sérii kontrolních váženek s ddH₂O -100 µL na filtračním papíru bez přítomnosti biocidní látky.

- (7) Dej do každé váženky 10 dospělců roztočů pomocí štětečku. Nutno kontrolovat pod stereomikroskopickou bionokulární lupou.
- (8) Nech roztoče ve tmě a laboratorní teplotě 25 ± 1 °C po dobu 24 hodin.
- (9) Po 24 hodinách vyndej filtrační papír z váženky a prohlédni filtrační papír a povrch váženky pod stereomikroskopickou bionokulární lupou, stanov počet živých a mrtvých roztočů.
- (10) Stanov přirozenou mortalitu roztočů, tj. % mrtvých roztočů v kontrole. Je-li mortalita vyšší než 10%, došlo k chybě, např. špatná manipulace s roztoči, chybně navlhčený filtrační papír, špatně vyčištěné váženky a test není možné vyhodnotit.

Tabulka č. 3. Příklad mortality roztočů *Tyrophagus putrescentiae* na různém ředění pirimiphos methyl v aplikaci v testu využívajícím impregnovaný filtrační papír.

µg akarcidní látky na FP	Mortalita	Celkový počet
0.001	15	60
0.007	14	60
0.066	41	60
0.658	56	60
6.579	59	60

V tabulce č. 3 je uveden počet živých a mrtvých roztočů *Tyrophagus putrescentiae* v závislosti na koncentraci pirimiphos methyly. Přirozená mortalita v tomto případě byla 6%.

Postup pro vyhodnocení testu:

- (1) Použijeme program XLSTAT, procedura **DOSE**.
- (2) Zadání výpočtu: Pro tabulku č. 2 bude zadání následující, na listu „**General**“ „*Response variable*“ je sloupec mortalita, „*Quantitative*“ je sloupec koncentrace biocidu tj. aplikováno, „*Observation weights*“ je sloupec celkový počet jedinců. Je nutné v tomto případě změnit „*Response type*“ na Sum(Binary) protože data nejsou zadána jako jedničky a nuly, nýbrž součty jedniček a nul (Obrázek č.4).
- (3) Na listu „**Options**“ zvolíme možnosti „*take the log*“ protože většina modelů ukazuje vyšší vysvětlenou variabilitu pro logaritmicky transformovanou koncentraci biocidní látky, dále zadáme přirozenou mortalitu tj. „use defined“ a vyplníme 0,06 (Obrázek č.5).

Obrázek č. 4. Dialogové okno XLSTAT-Dose zadávání dat -*General*

The screenshot shows the XLSTAT software interface with a dialog box titled "Dose effect analysis" open. The dialog box has several tabs: "General", "Options", "Validation", "Prediction", "Missing data", "Outputs", and "Charts". The "General" tab is selected, showing the following settings:

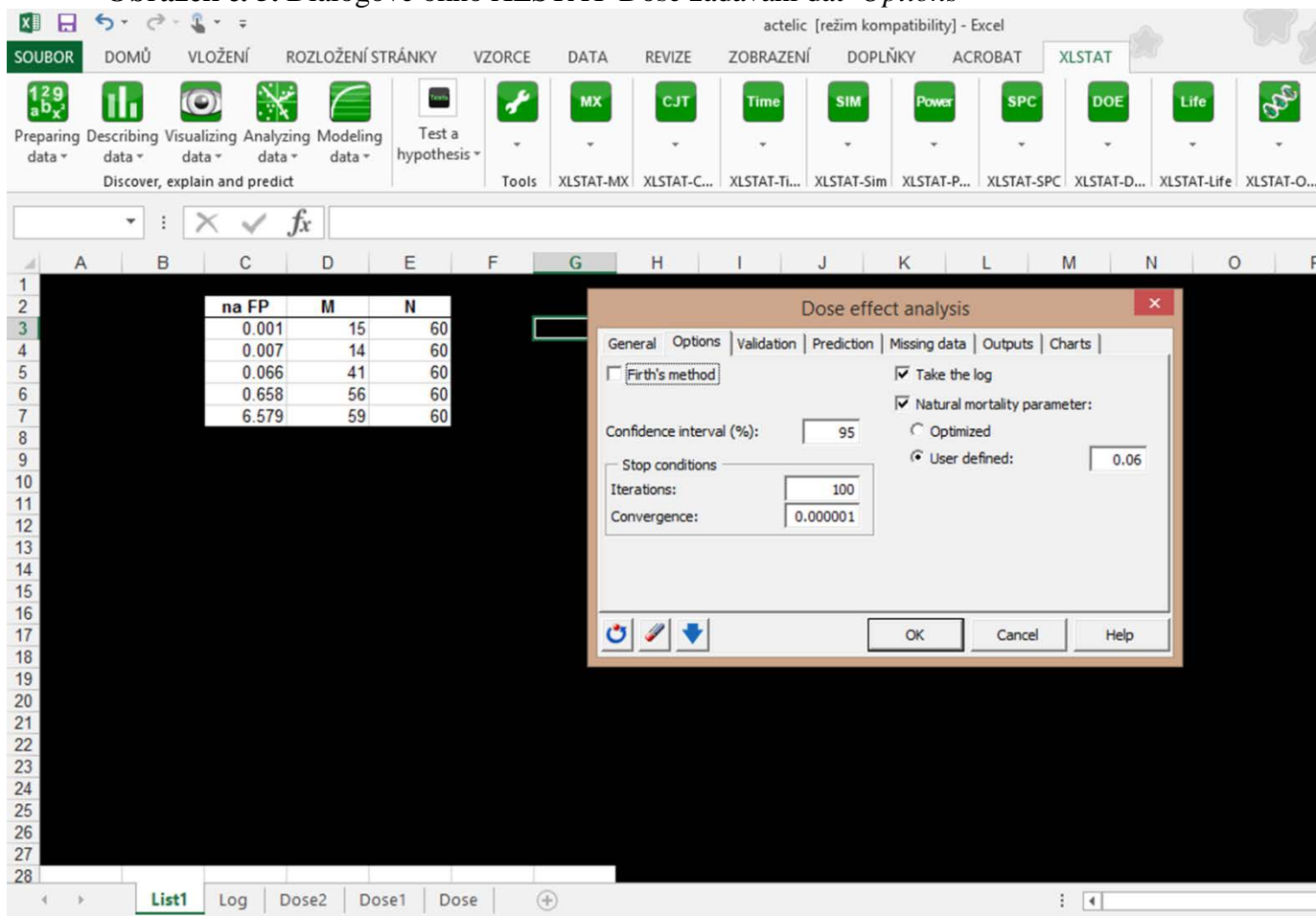
- Response variable(s): List1!\$D\$3:\$D\$7
- Response type: Sum(Binary)
- Model: Probit
- Observation weights: List1!\$E\$3:\$E\$7

The background Excel spreadsheet shows a table with the following data:

na FP	M	N
0.001	15	60
0.007	14	60
0.066	41	60
0.658	56	60
6.579	59	60

- (4) Pro list „*Outputs*“, doporučujeme zadat „*Descriptive statistic*“, „*Goodness of fit static*“, „*Model coefficient*“, „*Prediction and residuals*“ a „*Probability analysis*.“
- (5) Pro list „*Charts*“ doporučujeme zadat „*Regression charts*“, „*Prediction*“, „*Confidence intervals*“. Ostatní listy ponecháme tak jak je navrženo.
- (6) Provedeme výpočet, který se objeví na novém listu v MS Excel.

Obrázek č. 5. Dialogové okno XLSTAT-Dose zadávání dat -Options



Vyhodnocení výsledků:

Obrázek č. 6 ukazuje list výpočtů v proceduře. Na tomto listu jsou šedě zvýrazněné důležité informace.

- (1) Koeficient R^2 se pohybuje mezi 0 a 1 a ukazuje, jak dobře daný model fituje data, čím více se hodnota blíží 1, tím je fitování dat vyšší. V tomto případě je fit např. $R^2(\text{Nagelkerke}) = 0.515$.
- (2) Odhad parametrů modelu a jejich signifikance – „*Model parameters (Variable Y1)*“, v tomto případě jsou parametry modelu, absolutní člen = -1,415 i sklon 0,856, signifikantní na hladině $P < 0.0001$.
- (3) Výpočet ukazuje pro jednotlivé koncentrace akaricidní látky zjištěné a fitované hodnoty mortality.
- (4) Graf ukazuje průběh regrese, s vyznačením 95% intervalů spolehlivosti a přirozené mortality.

(5) Odhad koncentrací pro různé úrovně mortality poskytuje „ *Probability analysis with the fitted model (Variable YI)*“. V tomto případě jsou označeny hodnoty pro LC₅₀, LC₉₀ a LC₉₅. Program je uvádí spolu s konfidenčními intervaly (95%).

Pro praktické použití jsme nejčastěji využili R^2 , odhady parametrů s jejich konfidenčními intervaly a odhady LC₅₀, LC₉₀ a LC₉₅. Program je uvádí spolu s konfidenčními intervaly (např. Stará et al. 2011a, 2011b, 2014) (viz. tabulka č. 1).

Obrázek č. 6. Výsledky DOSE analýzy v programu XLSTAT. Šipky a šedě vyznačené části indikují důležité parametry.

Statistic	Independen	Full
Observations	300	300
Sum of weights	300.000	300.000
DF	299	298
-2 Log(Likelihood)	400.086	256.862
R2(McFadden)	0.000	0.358
R2(Cox and Snell)	0.000	0.380
R2(Nagelkerke)	0.000	0.515
AIC	402.086	260.862
SBC	405.790	268.270
Iterations	0	6

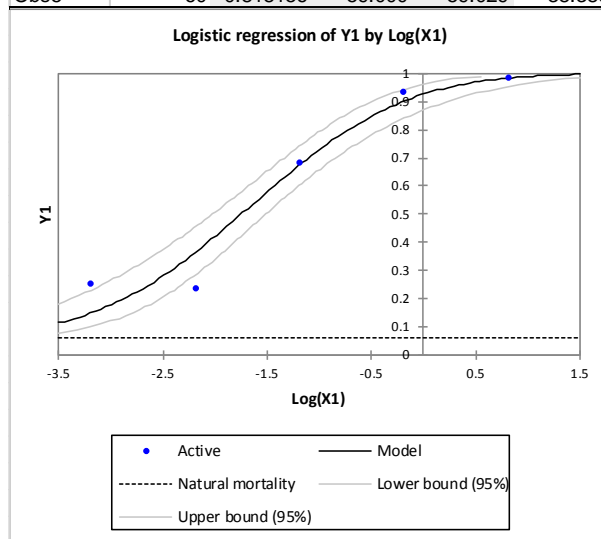
Model parameters (Variable Y1):

Source	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Wald Lower bound (95%)	Wald Upper bound (95%)	Odds ratio	Odds ratio Lower bound (95%)	Odds ratio Upper bound (95%)
Intercept	1.415		71.616	< 0.0001	1.087	1.742			
Log(X1)	0.856		76.966	< 0.0001	0.664	1.047	2.353	1.943	2.848

Natural mortality: 0.06

Predictions and residuals (Variable Y1):

Observation	Weight	Log(X1)	Y1	Pred(Y1)	Independent	Y1/Weight	Pred(Y1)/Weight	Std. residual	Std. residual (Independent)	Lower bound 95%	Upper bound 95%
Obs1	60	-3.18184	15.000	8.986	38.380	0.250	0.150	2.176	-6.287	6.065	13.888
Obs2	60	-2.18184	14.000	21.964	38.380	0.233	0.366	-2.134	-6.556	17.139	27.374
Obs3	60	-1.18184	41.000	40.639	38.380	0.683	0.677	0.100	0.705	36.295	44.645
Obs4	60	-0.18184	56.000	54.135	38.380	0.933	0.902	0.811	4.738	50.471	56.651
Obs5	60	0.818156	59.000	59.029	38.380	0.983	0.984	-0.029	5.545	57.228	59.718



Probability analysis with the fitted model (Variable Y1):

Probability	X1	Lower bound	Upper bound 95%
0.01			
0.05			
0.10	0.000	0.000	0.001
0.20	0.001	0.000	0.003
0.30	0.004	0.001	0.007
0.40	0.009	0.004	0.015
0.50	0.018	0.009	0.031
0.60	0.037	0.021	0.063
0.70	0.079	0.046	0.143
0.80	0.190	0.107	0.392
0.90	0.635	0.317	1.687
0.95	1.713	0.746	5.779
0.99	10.919	3.562	59.791

2.7. Popis testu využívajícího růstový test

Principem testu je, že skladištní roztoči se množí v skladovaných rostlinných substrátech. Aplikací akaricidních látek dojde buď k úplné eliminaci roztočů, nebo k snížení růstu jejich populace vlivem vyšší mortality juvenilních stádií roztočů, kteří se setkávají s akaricidní látkou ve svém okolí.

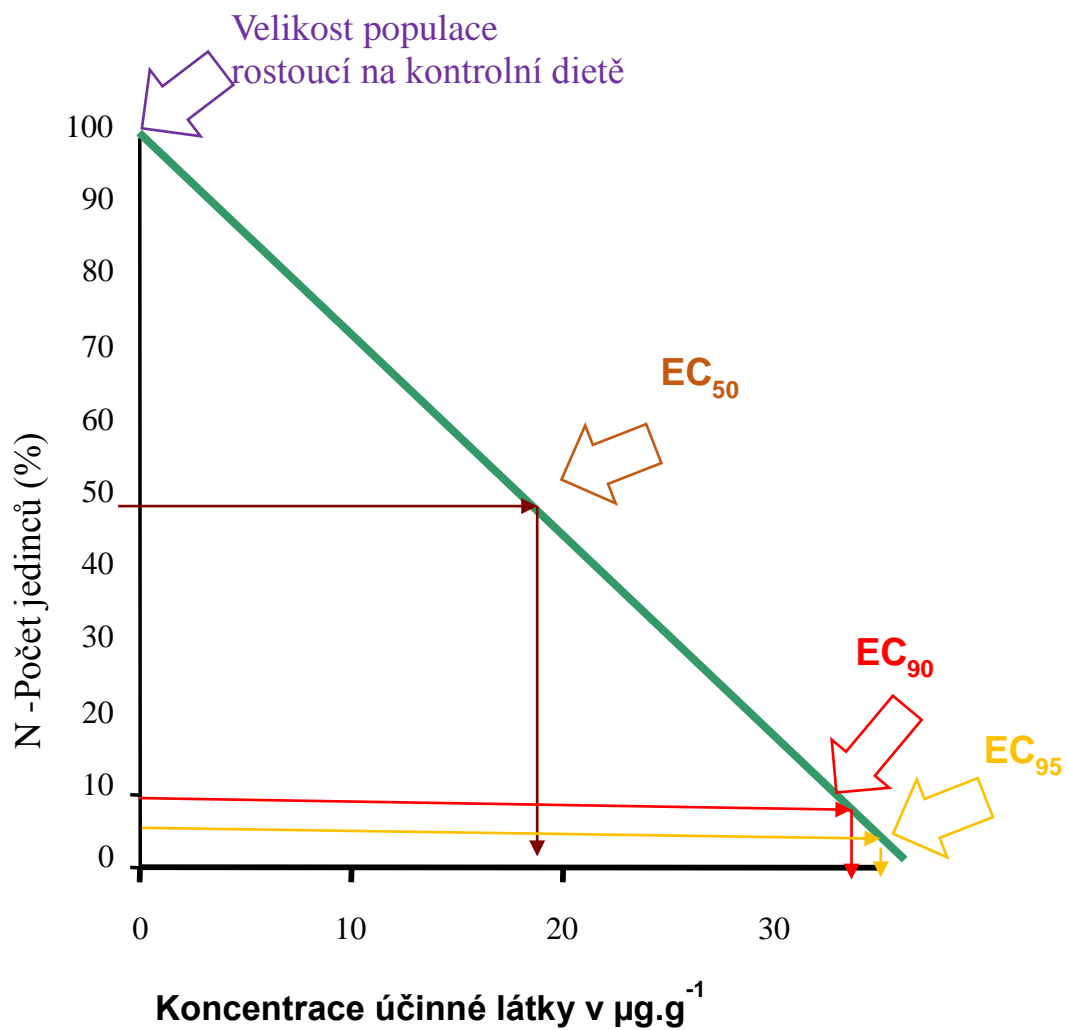
V těchto testech se vychází buď z aplikace akaricidu do obilí nebo řepky tak, že akaricid je zároveň použit i ke zvlhčení substrátu. Alternativně je naředěný akaricid aplikován do diety, která je poté lyofilizována, homogenizována a znovu navlhčena. Pro aplikaci do rostlinných substrátů je nutné nejprve odzkoušet, jaká bude výsledná vlhkost po přidání roztoku akaricidu.

Popis experimentu: Pro pokusy s aplikací do obilí se používá 10 g obilí, 10 opakování pro každou testovanou koncentraci akaricidu. Jako kontrola se použije obilí navlhčené ddH₂O. Obilí se umístí do plastových kelímků 250mL (Aliachem, s.r.o., Chropyně). Do každého kelímku se následně dodá 50 dospělých jedinců. Kelímky jsou inkubovány v termostatu ve tmě při laboratorní teplotě 25±1 °C po dobu 21 dní. Tento časový úsek je delší než doba vývoje jedné generace roztoče. Po této době je obsah kelímku proset na sítu o průměru 1 mm pomocí Retch AS 200 digit prosévačky. Prosetí roztoči z jednotlivých komůrek jsou štětečkem přemístěni do kádinky z části naplněné Oudemansovým roztokem (na 100 mL - 70% ethanol - 87 mL; ledové kyseliny octové - 8 mL, glycerol - 5 mL). Poté jsou počítání pomocí binokulární lupy. Zjistí se tak konečná velikost populace roztočů.

Analýza dat: Získaná velikost populace může být použita pro analýzu bez transformace nebo transformována, především když potřebujeme, aby tato veličina měla normální rozdělení. Alternativně získaná data přepočítáme tak, že stanovíme vnitřní rychlost růstu populace (r) podle vztahu $N_t = N_0 e^{rt}$. Kde N_t je velikost populace roztočů za 21 dní, t je doba experimentu, tj. 21 dní, N_0 je počáteční velikost populace roztočů, což je 50 jedinců, e je Eulerovo číslo. Stejně tak můžeme transformovat koncentraci akaricidní látky, nejvíce se nám osvědčila logaritmická transformace, kde připočteme ke koncentraci $1 \cdot 10^{-7}$ a poté zlogaritmujeme přirozeným logaritmem. Takto upravená data můžeme analyzovat tak, že transformovaná koncentrace akaricidu je nezávislá veličina, zatímco transformovaná velikost populace je závislá veličina. Pro výpočet použijeme lineární nebo polynomické regresní modely ($r = ax + b$, nebo $r = ax^2 + bx + c$; x = koncentrace akaricidu v μg na 1000 g obilí).

Pomocí modelu vypočteme EC_{50} , případně EC_{90} nebo EC_{99} včetně 95% konfidenčních intervalů (Obrázek č. 6).

Obrázek č. 6. Ukázka potlačujícího účinku akaricidních látek na růst roztočů, hypotetická situace, kde konečná velikost populace byla přepočtena na procenta, a ukázka odhadu EC_{50} , EC_{90} a EC_{95} .



Tabulka č.4. Porovnání insekticidních přípravků na mortalitu 3 odlišných populací roztoče *Tyrophagus putrescentiae* v testu využívajícím impregnovaný filtrační papír (podle Stará et al. 2014). Populační růst byl fitován polynomičným regresním modelem ($N = ax^2 + bx + c$; $x = \log$ koncentrace aktivní látky ($\mu\text{g/g}$)). V tabulce jsou uvedeny fitované parametry modelu a 95% konfidenční intervaly v závorkách. Nd - nebylo fitováno

Účinná látka	Populace	Parametry regresního modelu				Zpětný odhad		
		R2	a	b	c	EC ₅₀	EC ₉₅	EC ₉₉
	L	0.81	-1.5 (-2.8/-0.16)	-54 (-72/-35)	309 (244/374)	0.2 (0.005/ 18)	90 (18/nd)	134 (27/nd)
	D	0.56	-1.6 (-2.4/-0.7)	-30 (-43/-18)	265 (222/308)	18 (4/403)	330(50/nd)	(100/nd)
Pirimiphos	F	0.80	-14 (-17/-11)	-223 (-2664/-179)	(1125/1429)	12 (6/30)	74 (33/270)	82 (40/330)
Cypermethrin	L	0.52	-12 (-27/3)	-54 (-2478/169)	(1916/2776)	stoupá s koncentrací		
/PBO	D	0.18	ns			nd		
	F	0.01	ns			nd		
Deltamethrin	L	0.41	ns	ns	1742(1453/2030)	nd		
(*1)DeltaCAPS	D	0.35	-5.5 (-9/-2)	-70(-117/-22)	429 (344/514)	nd		
	F	0.29	ns	ns	1888 (1657/2108)		2.9	3.2
(*2)K-oniol	L	0.65	-11(-15/-8)	-192 (-247/-137)	-11 (-15/-8)	1.6 (0.5/3.3)	(1.7/ND)	(1.9/ND)
	D	0.20	ns	ns	nd	nd		
	F	0.79	-3 (-6/-0.52)	-105 (-145/-65)	379 (281/471)	0.07 (0.005/0.3)	16 (3/ND)	25 (5/ND)
(*3)K-othrine	L	0.48	ns	ns	1847 (1575/2118)	nd		
	D	0.56	-15 (-21/-9)	-197 (-280/-113)	445 (297/593)	3.4 (1/nd)	nd	nd
	F	0.06	ns			nd		
Cyflutrin	L	0.66	-25 (-34/-17)	-356 (-480/-232)	799 (561/1037)	nd		
	D	0.49	-13 (-19/-7)	-175 (-261/-89)	364 (199/530)	nd		
	F	0.36	2 (-3/9)	4 (-84/92)	833 (663/1003)	nd		
	L	0.81	-21 (-26/-17)	-367 (-446/-287)	434 (289/579)	1.2 (0.7//2.5)	2.6 (1.4/6.7)	3 (1.6/8.2)
	D	0.61	- 7 (-10/-4)	-122 (-169/-75)	119 (33/205)	0.7 (0.2/3)	2.1 (1/20)	2.5 (1/21)
Chlorfenapyr	F	0.84	-8 (-13/-4)	-202 (-270/-134)	217 (91/341)	0.11 (0.01/0.3)	2.2 (0.3/13)	2.7 (1/21)

2.8. Příklad aplikace testu využívajícího růst populace

Materiál: plastové misky 250 mL, přečištěná pšenice, pipeta, špičky, stereomikroskop

Roztoči: roztoč *Tyrophagus putrescentiae*, laboratorní populace, stáří kolonie 28 dní, bude použito 240 dospělých jedinců bez ztrát při manipulaci.

Software: MS Excel, XLSTAT, XLSTAT,

Biocidní látka: Actellic EC 25 pirimiphos methyl 250g/L, ředěno ve vodě, ředění následuje dle tabulky č. 2 a dosažená koncentrace na 1g obilí je v tabulce č.5. V testu je využito 150 g obilí, které je vlhčeno roztokem insekticidu obsahující 100 μ L naředěného pesticidu a 15 mL dd H₂O

Tabulka č. 5. Příklad ředění pirimiphos methyl pro aplikaci v testu využívajícím růstový test. Ředění vychází s tabulky č.2.

Ředění č.	(%)	koncentrace μ /g
2	0.1	10
3	0.01	1
3	0.001	0.1

Postup pro provedení testu:

- (1) Zkontroluj stav experimentálních roztočů, tj. laboratorní kolonie
- (2) Stanov množství vody potřebné k navlhčení pšenice na vlhkostní obsah 15%. V našem případě 15 mL. Připrav roztoky testované insekticidní látky. Jako kontrolu použij misky navlhčené 15 mL dd H₂O.
- (3) Připrav misky s navlhčeným obilím. Protřepej. Počkej 24 hodin.
- (4) Po 24 hodinách protřepej misky, dodej 50 kusů roztočů do každé misky v 6 opakováních od každé koncentrace insekticidní látky a kontroly.
- (5) Inkubuj misky s obilím v termostatu po 21 dní ve tmě v teplotě 25 \pm 1 °C.
- (6) Po 21 dnech prosej misky na prosévače Retsch 200 As digit a prosev převed' do Oudemansova roztoku.
- (7) Spočítej roztoče pod binokulárním stereomikroskopem.

V tabulce č. 6 jsou uvedené počty roztoče *Tyrophagus putrescentiae* v růstovém testu na různých koncentracích insekticidu pirimiphos methyl.

Tabulka č. 6. Příklad výsledků růstu populace roztoče *Tyrophagus putrescentiae* v pšenici ošetřenou roztokem insekticidu pirimiphos methyl o různých koncentracích. Koncentrace insekticidu byla transformována pomocí přirozeného logaritmu ($\ln+0,0000001$). N – výsledná velikost populace roztoče.

koncentrace mg/g	transformovaná	N
0	-16.118096	576
0	-16.118096	920
0	-16.118096	672
0	-16.118096	598
0	-16.118096	858
0	-16.118096	1120
0.1	-2.302584	288
0.1	-2.302584	286
0.1	-2.302584	378
0.1	-2.302584	252
0.1	-2.302584	713
0.1	-2.302584	462
1	0.000000	465
1	0.000000	360
1	0.000000	340
1	0.000000	240
1	0.000000	238
1	0.000000	323
10	2.302585	84
10	2.302585	204
10	2.302585	156
10	2.302585	221
10	2.302585	204
10	2.302585	378

Tabulka č.7. Zpětný odhad koncentrace pirimiphos methyl (μg na g) pro jednotlivé parametry EC pro roztoče *Tyrophagus putrescentiae*.

parametr	%	počty jedinců	výpočet transformované koncentrace s rovnice	výpočet koncentrace
EC100	100	798	-16.11842105	0.00
EC99	1	8	9.869078947	19324
EC95	5	40	8.819078947	6762
EC50	50	399	-2.973856209	0.05

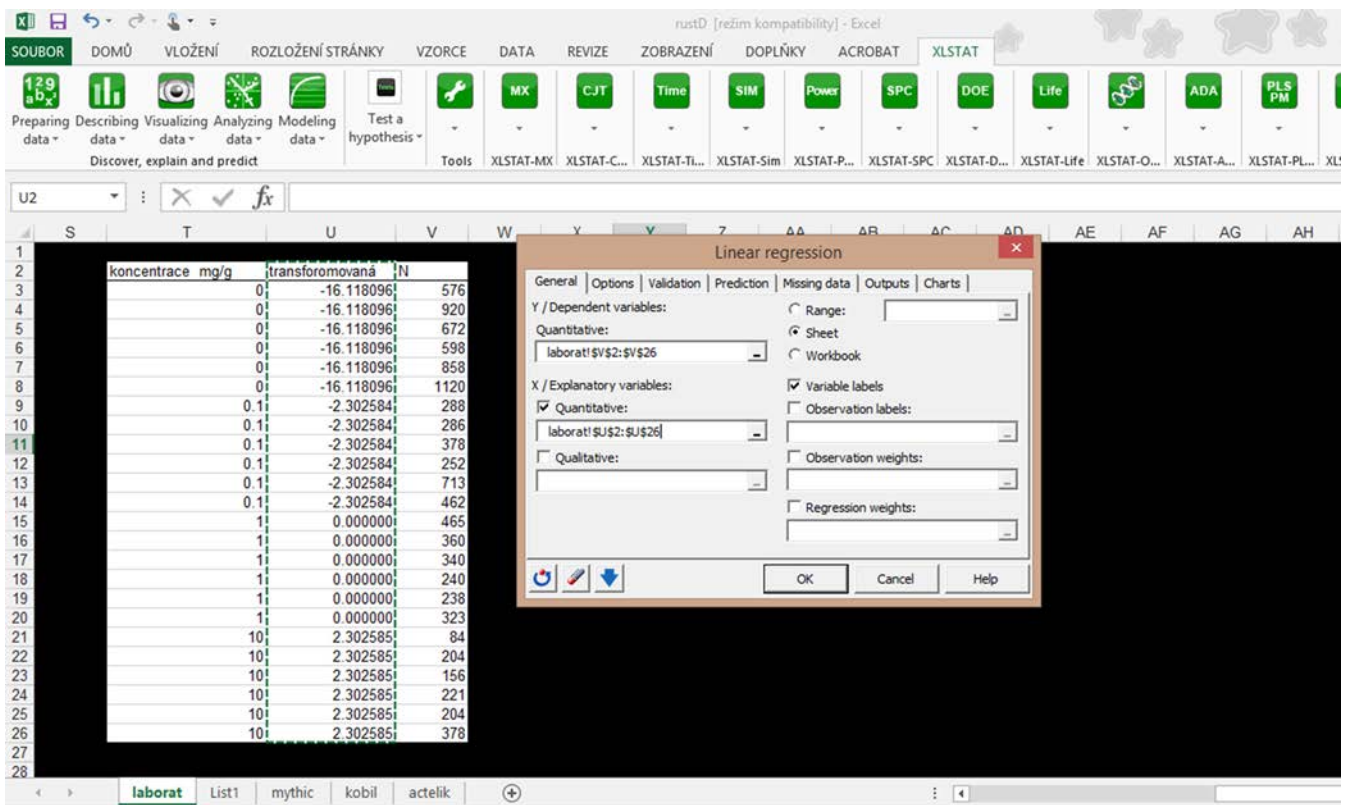
Postup pro vyhodnocení testu:

(1) Použijeme program XLSTAT – Lineární regresi.

(2) Zadání výpočtu: Pro tabulku č. 6 bude zadání následující, „dependent variable“ bude sloupec N, „X –explanatory variable“ bude sloupec transformovaná, tj. transformovaná koncentrace insekticidní látky. Dále se v dialogovém okně nebude měnit žádné nastavení (viz Obrázek č. 7).

(3) Ostatní položky nabídky neměníme a provedeme výpočet, který se objeví na novém listu MS Excel.

Obrázek č. 7. Dialogové okno XLSTAT zadávání do lineární regrese



Vyhodnocení výsledků:

Obrázky č. 8 a 9 ukazují výsledky lineární regrese.

- (1) koeficient R^2 se pohybuje v rozsahu 0 až 1, s rostoucí hodnotou roste spolehlivost fitování modelem. Zde dosahuje 0,7 .
- (2) Parametry modelu $y=ax+q$ jsou q –intercept 308,304 a a –transformovaná (koncentrace) -30,508.
- (3) průběh lineární regrese ukazuje obrázek č.9.

Obrázek č. 8. Výsledky lineární regrese v programu XLSTAT. Šipky indikují důležité parametry.

Regression of variable N:

Goodness of fit statistics:

Observations	24.000
Sum of weights	24.000
DF	22.000
R2	0.707
Adjusted R2	0.694
MSE	21355.139
RMSE	146.134
MAPE	31.404
DW	1.928
Cp	2.000
AIC	241.169
SBC	243.525
PC	0.346



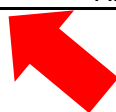
Analysis of variance:

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	1	1136032.268	1136032.268	53.197	< 0.0001
Error	22	469813.065	21355.139		
Corrected Total	23	1605845.333			

Computed against model $Y = \text{Mean}(Y)$

Model parameters:

Source	Value	Standard error	t	Pr > t	Lower bound (95%)	Upper bound (95%)
Intercept	308.340	34.221	9.010	< 0.0001	237.369	379.310
transformovaná	-30.358	4.162	-7.294	< 0.0001	-38.990	-21.726



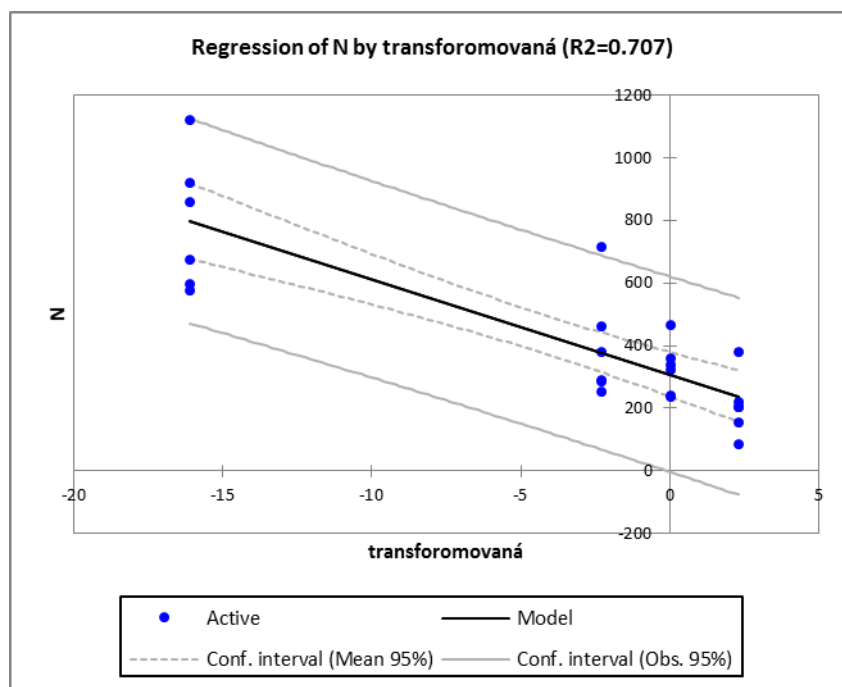
Equation of the model:

$$N = 308.339795066375 - 30.3576508474841 * \text{transformovaná}$$

Standardized coefficients:

Source	Value	Standard error	t	Pr > t	Lower bound (95%)	Upper bound (95%)
transformovaná	-0.841	0.115	-7.294	< 0.0001	-1.080	-0.602

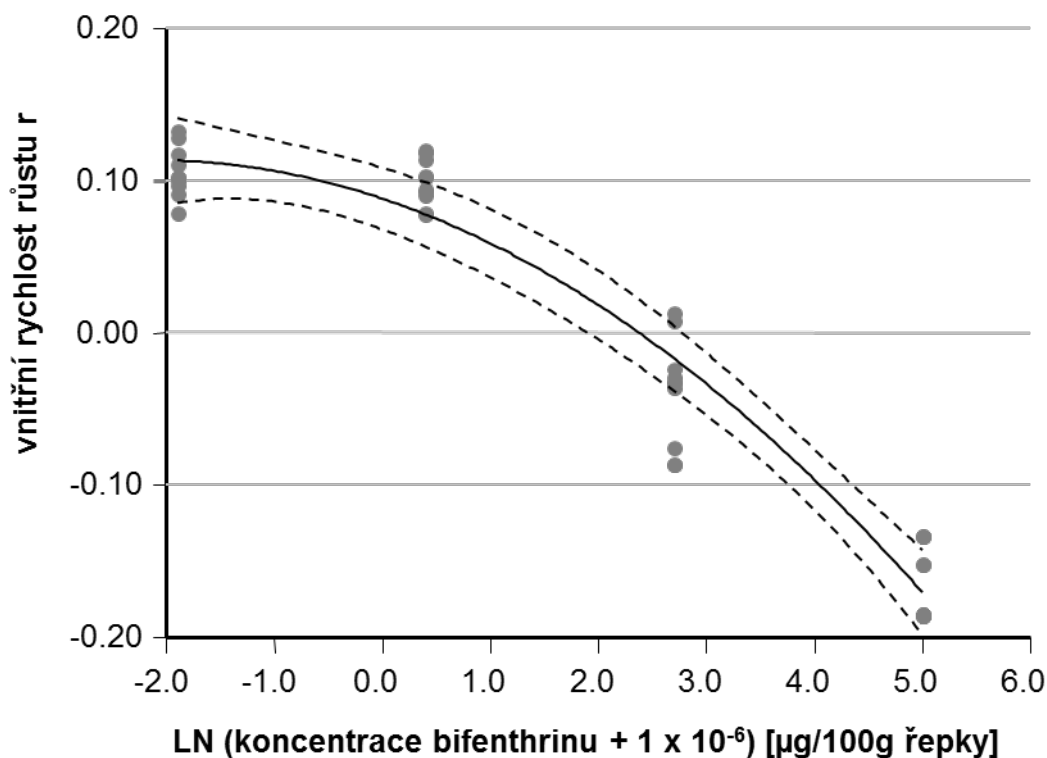
Obrázek č.9. Výsledky lineární regrese v programu XLSTAT –graf lineární regrese.



(4) zpětný odhad pro hodnoty vypočítáme dle vzorce $N=ax+q$, kde $a = -30,508$ a $q = 308,303$ a N –počet roztočů, x –transformovaná koncentrace. Hodnoty pro y jsou pro 100 % růst na kontrole 798 jedinců, pro EC50 budou hodnoty $y=798/2=399$, $EC95=798-((798/100)*95)$, $EC99=798-((798/100)*99)$, upravíme vzorec $N = -30,6*x+308$ na $(N-308)/-30,6=$ transformovaná koncentrace a dosadíme pro jednotlivá N (viz tabulka č. 7). Vypočtené koncentrace transformujeme pomocí funkce EXP (transformovaná koncentrace $-0,000001$).

Pro praktické použití jsme nejčastěji využili program QCExpert (<http://www.trilobyte.cz/>), kde lze snadno pracovat s polynomicou regresí (viz obr.č.10), parametry modelu, včetně konfidenčních intervalů jsme odečítali přímo z grafu. Zde jsme nestanovili konfidenční limity. Porovnání získaných dat programu XLSTAT a výsledků polynomicke regrese v programu QCEXPART (tabulka č. 4) ukazuje, že při polynomicém modelu se shodují EC_{50} , avšak odhady pro EC_{90} a EC_{95} jsou diametrálně rozdílné. Avšak vypočtené hodnoty pomocí lineární regrese leží v 95% konfidenčním intervalu polynomickeho modelu. Tato data indikují, že pirimiphos methyl v aplikaci do pšenice nepovede k 100% eradikaci roztočů, neboť hodnoty EC_{95} a EC_{99} jsou příliš vysoké. Aplikace insekticidu však sníží významně jejich populaci (Stará et al. 2014).

Obrázek č.10. Ukázka polynomicke regrese pro stanovení vlivu bifenthrinu v řepce na rychlost růstu roztoče *Tyrophagus putrescentiae* (Stara et al. 2011a).



2.9. Porovnání vhodnosti a náročnosti navržených testů pro vyhodnocení účinnosti akaricidních látek

V předložené metodice popisujeme obě tyto metody. Porovnání vhodnosti a náročnosti těchto metod uvádí tabulka č. 8. Metoda využívající impregnovaný filtrační papír je vhodnější pro porovnání účinnosti akaricidních látek a případnou identifikaci rezistence. Růstový biotest odhaluje dlouhodobý efekt akaricidních látek a případnou hormoligózu. Výhodou této metody je, že lze simulovat aplikaci akaricidní látky přímo do skladované rostlinné komodity, jako je pšenice, ječmen, řepka atd. Každá tato komodita ovlivňuje účinnost akaricidní látky.

2.10. Porovnání účinnosti akaricidních látek

Výsledky hodnocení účinnosti jednotlivých akaricidních látek jsou uvedeny v tabulkách č. 9 a 10. V tabulce č. 9 jsou uvedeny výsledky několika studií, kde byly akaricidní látky aplikovány do potravy nebo obilí. Tato tabulka ukazuje rezistenci k organofosfátu chlorpyrifosu u druhu *Tyrophagus putrescentiae*, kde dochází k masivnímu nárůstu

koncentrací akaricidu od začátku používání těchto látek do doby, kdy byly zakázány (viz. autoři Wilkin & Hope 1973 a Hubert et al. 2007).

Tabulka č. 8. Porovnání dvou biotestů pro testování akaricidních látek.

Srovnávané parametry	Impregnovaný filtrační papír	Růstový biotest
aplikace akaricidu	filtrační papír	potrava/substrát
doba experimentu	24 hodin	21 dní
počet opakování	6-10	6-10
počet jedinců/opakování	10	50
měřený parametr	Mortalita	velikost populace (N)
vyhodnocení experimentu	počítání-jedinců	extrakce, počítání jedinců
fitovaný model	probitová regrese	lineární, polynomická regrese
zjištěné parametry	LC ₅₀ , LC ₉₀ , LC ₉₅	EC ₅₀ , EC ₉₀
kontrola	mortalita na filtračním papíru bez pesticidů	velikost populace na kontrolní potravě
náročnost (hodiny) pro 1 koncentraci akaricidní látky	4	16

V případě *Acarus siro* se nepodařilo analýzu provést, použitý kmen byl vysoce tolerantní (Hubert et al. 2007). V tabulce č. 9 je porovnání akaricidních látek v biotestu s využitím filtračního papíru. Protože tento test je méně náročný, umožňuje porovnat více druhů. Avšak i zde jsou patrné některé rozdíly mezi druhy např. u druhu *Aleuroglyphus ovatus*. Existenci těchto rozdílů bude v budoucnu nutné ověřit dalším testováním. Z obou uvedených tabulek je zřejmé, že pro některé akaricidní látky dosud chybí údaje. Dále vzhledem k existenci obou typů testů je nutné tyto testy porovnat. Přes toto srovnání lze pro sledování rezistence doporučit test na filtračním papíru. Pro sledování výskytu rezistence u skladištních roztočů je nutné doplnit údaje o citlivosti jednotlivých druhů roztočů z laboratorních chovů vůči akaricidům. V dalším kroku budou získány nové kmeny roztočů a bude stanovena jejich citlivost vůči akaricidům a ta bude srovnávána s tabulkovými hodnotami. Dle tohoto srovnání bude možné zjistit, zda je nalezený testovaný kmen roztoče rezistentní nebo senzitivní. Pro sledování rezistence roztočů vůči akaricidním látkám lze doporučit test ve váženkách na filtračním papíru obsahujícím akaricidní látku..

Tabulka č. 9. Porovnání efektivních koncentrací akaricidních látek (v ppm) potlačujících růst roztočů. Jako efektivní koncentrace byly vybrány EC₅₀, EC₉₀, EC₉₉ – tj. koncentrace akaricidních látek snižující růst populace roztočů na 50, 90 a 99% ve srovnání s růstem na kontrole.

Testovaný akaricid	Druh	EC50	EC90	EC99	Autor
Benzyl-benzolát	<i>Acarus siro</i>	50	-	200	Collins 2006
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	-	-	200	
Permetrin	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	-	-	500	White 1984
	<i>Acarus siro</i>	8	-	-	
Permetrin/Pyriproxifen/Benzyl-benzolát	<i>Acarus siro</i>	2	600	-	Hubert et al. 2007
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	1	130	-	
	<i>Acarus siro</i>	0.5	4	-	
Deltametrin		13	12000	-	Hubert et al. 2007
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	4	-	-	Collins 2006
Deltametrin + S-bioalletrin		4	3000	-	Hubert et al. 2007
	<i>Acarus siro</i>	58	30000	-	
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	4	3000	-	
Chlorpyrifos	<i>Acarus siro</i>	-	-	2	Wilkin & Hope 1973
			tolerantní		Hubert et al. 2007
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	-	-	2	Wilkin & Hope 1973
		7	10000	-	Hubert et al. 2007

Tabulka č 10. Porovnání letálních koncentrací akaricidních látek v biotestu na filtračním papíru pro jednotlivé roztoče (dle Stará et al. 2011ab). Jako letální koncentrace, které jsou uvedené v mikrogramech, jsou LC₅₀ a LC₉₅, tj. koncentrace akaricidních látek způsobující mortalitu 50 a 95%.

Akaricidní látka	Druh	LC₅₀	LC₉₅
Benzyl benzoláte	<i>Acarus siro</i>	0.04	22
	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	17	375
	<i>Carpoglyphus lactis</i>	64	354
	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	0.01	2
	<i>Tyroborus lini</i>	21	242
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	6	88
	<i>Acarus siro</i>	0.08	8
Benzyl-benzoláte/ Permetrin/Pyriproxifen	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	3	39
	<i>Carpoglyphus lactis</i>	5	345
	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	0.01	1
	<i>Tyroborus lini</i>	6	84
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	2	731
	<i>Acarus siro</i>	0.12	11
	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	18	4,272
Neem (margosový extrakt)	<i>Carpoglyphus lactis</i>	4	473
	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	0.11	3
	<i>Tyroborus lini</i>	2	16
	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	2	32

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V České republice existuje jen velmi málo souhrnných informací o rizicích spojených s infestací skladovaných rostlinných produktů roztoči a možnostech jejich kontroly biocidními prostředky. V době, kdy se zvyšují nároky na kvalitu a bezpečnost potravin, je důležité zabránit škodlivému působení roztočů, zároveň však nekontaminovat potraviny rezidui pesticidů. Při častém používání insekticidních látek pro kontrolu skladištního hmyzu může vzniknout rezistence u roztočů jako vedlejší efekt těchto ošetření. Znalost účinnosti insekticidních a akaricidních látek na konkrétní populace skladištních roztočů umožní jejich efektivní kontrolu. V této metodice jsou shrnuty hlavní postupy testování biocidních přípravků na skladištní roztoče v laboratorních podmínkách. Obdobné postupy začínají být aplikovány ve Velké Británii, Německu a Spojených státech, avšak v podmínkách ČR nikdy dosud použity nebyly.

4. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Metodika je určena pro státní správu, laboratorní testy umožňují správnou volbu přípravků pro kontrolu roztočů a zároveň zabránění aplikace nefunkčního přípravku proti rezistentní populaci roztoče. Správnou volbou lze tak zabránit zbytečnému použití biocidního přípravku.

Náklady na laboratorní testy se pohybují okolo 10-15 tisíc Kč za provozní materiál, tj. kelímky, váženky, špičky, pipety. Většími náklady jsou binokulární stereoskopická lupa, jejíž cena se pohybuje od 5-100 tisíc Kč dle typu a kvality. Doporučený software se pohybuje v ceně okolo 30 tisíc Kč.

Zavedení postupu laboratorního testování biocidních přípravků přinese rozhodovací možnosti. Využitím správných přípravků je možné provést včasné ošetření, která jsou levnější než ošetření kalamitní populace škůdce v celém skladu či potravinářském provozu.

5. SEZNAM POUŽITÉ A SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Anonymus 1969: Recommended Method for the Detection and Measurement of Resistance of Agricultural Pests to Pesticides. 1. General principles. FAO Plant Prot. Bull. 17, 76-82.
- Asser-Kaiser S., Fritsch E., Undorf-Spahn K., Kienzle J., Eberle K.E., Gund N.A., Reineke A., Zebitz C.P.W., Heckel D.G., Huber J., Jehle J.A. 2007, Rapid Emergence of Baculovirus Resistance in Codling Moth Due to Dominant, Sex-Linked Inheritance, Science, 317: 1916-1918
- Baker M.B., Alyokhin A., Porter A.H., Ferro D.N., Dastur S.R., Galal N. 2007, Persistence and inheritance of costs of resistance to imidacloprid in Colorado potato beetle, J Econ Entomol, 100: 1871-1879.
- Collins D. A. 2006. A review of alternatives to organophosphorus compounds for the control of storage mites. J. Stored Product Res 42: 395-426.
- Erban T, Nesvorna M, Erbanova M, Hubert J. (2009) *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* control of synanthropic mites (Acari: Acaridida) under laboratory conditions. Exp Appl Acarol 49:339–346.
- Erban T, Rybansky J, Hubert J. 2012. The efficacy of four avermectins on the synanthropic mite *Lepidoglyphus destructor* under laboratory conditions. Exp Appl Acarol. 58(1):43-50.
- Hoy M. 2011 Agricultural Acarology Introduction to Integrated Mite Management. CRC Press, Taylor & Francis group, Boca Raton, FL, USA, 410 p.
- Hubert J. 2012. The Pest Importance of Stored Product Mites (Acari: Acaridida). 2012; Nova Publisher., ISBN: 978-1-61942-086-1
- Hubert J, Stejskal V, Munzbergova Z, Hajslova J, Arthur FH. 2007. Toxicity and efficacy of selected pesticides and new acaricides to stored product mites (Acari: Acaridida). Exp Appl Acarol. 42:283-290.
- Misfit H.R., Westward P.H., Mantel K.D., van de Baan H.E. 1998, Resistance to Diflubenzuron in the Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae), J Econ Entomol, 81 (6): 1511-1515
- Mota-Sanchez, D., Hollingworth R.M., Grafius E.J., Moyer D.D. 2006, Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), Pest Manag Sci, 62: 30-37.
- Sparks T, Nauen R 2015 IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. Pesticide Biochemistry and Physiology. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.014 in press
- Stables, L.M., Wilkin, D.R. 1981 Resistance to pirimiphos-methyl in cheese mites. Proceedings of the 1981 British Crop Protection Conference – Pest and Diseases, 2: 617–624 (1981)
- Stables, L.M. 1984. Effect of pesticides on three species of *Tyrophagus* and detection of resistance to pirimiphos-methyl in *T. palmarum* and *T. putrescentiae*. In: Acarology VI, Volume 2, D.A. Griffiths and C.E. Bowman (eds), pp. 1026–1033. Ellis Horwood, Chichester. (1984)
- Stará J., Nesvorná M., Hubert J. 2011a Long-term pre-exposure of the pest mite *Tyrophagus putrescentiae* to sub-lethal residues of bifenthrin on rapeseed did not affect its susceptibility to bifenthrin Crop Protection, 30(9):1227-1232.
- Stará J, Stejskal V, Nesvorná M, Plachý J, Hubert J. 2011b. Efficacy of selected pesticides against synanthropic mites under laboratory assay. Pest Manag Sci. 67:446-57.
- Stará J, Nesvorna M, Hubert J. 2014. Comparison of the effect of insecticides on three strains of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Astigmata) using an impregnated filter paper test and a growth test. Pest Manag Sci. 70(7):1138-44
- Szlendak, E., Conyers, C., Muggleton, J., Thind, B.B. (2000) Pirimiphos-methyl resistance in two stored product mites, *Acarus siro* and *Acarus farris*, as detected by impregnated paper bioassay and esterase activity assays. Exp Appl Acarol 24(1): 45-54
- Tabashnik B.E. 1994, Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*, Ann Rev Entom, 39: 47-79.
- Thind, B.B. and Muggleton, J. 1998. A new bioassay method for the detection of resistance to pesticides in the stored product mite *Acarus siro* (Acari: Acaridae). Exp. Appl. Acarol. 22: 543-552.
- Nesvorná M, Hubert J. 2014 Effect of diatomaceous earth-treated wheat on population growth of stored product mites under laboratory test. Int J Acarol. 40 (4):269 – 273
- Sobotnik J, Kudlíková-Křížková I, Vancová M, Munzbergová M, Hubert J. 2008. Chitin in the peritrophic membrane of *Acarus siro* as a target for novel acaricides. J. Econom. Entomol. 101(3):1028-1033.
- Zdarkova, E., Horak, E. 1974. *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae*: Toxicity of some insecticides assayed by a new testing method. J. Econom. Entomol 66: 1237-1238.
- White, N.D.G. 1984. Residual activity of organophosphorus and insecticides applied to wheat stored under simulated Western Canadian conditions. Canadian Entomologist 116: 1403-1410.
- Wilkin, D. R. (1973) Resistance to lindane in *Acarus siro* from and english cheese store. J Stored Prod Res 9: 101-104
- Wilkin, D.R. and Hope, J.A. 1973. Evaluation of pesticides against stored product mites. J. Stored Product Res. 8: 323–327.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Erban T, Nesvorna M, Erbanova M, Hubert J. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* control of synanthropic mites (Acari: Acaridida) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol.* 2009; 49:339–346.
- Erban T, Rybansky J, Hubert J. The efficacy of four avermectins on the synanthropic mite *Lepidoglyphus destructor* under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol.* 2012 Sep;58(1):43-50.
- Hubert J. *The Pest Importance of Stored Product Mites (Acari: Acaridida)*. 2012; Nova Publisher., ISBN: 978-1-61942-086-1
- Hubert J, Munzbergova Z, Nesvorná, M, Poltronieri P, Santino A, Acaricidal effects of natural six carbon and nine carbon aldehydes on stored product mites. *Exp Appl Acarol.* 2008; 44(4):315-321.
- Hubert J, Stejskal V, Munzbergova Z, Hajslova J, Artur F. Toxicity and efficacy of pesticides to stored product mites. *Exp Appl Acaro.* 2007; 42(4):283-90
- Nesvorná M, Hubert J. Effect of diatomaceous earth-treated wheat on population growth of stored product mites under laboratory test. *Int J Acarol.* 2014, 40 (4):269 – 273
- Sobotnik J, Kudlíková-Křížková I, Vancová M, Munzbergová M, Hubert J. Chitin in the peritrophic membrane of *Acarus siro* as a target for novel acaricides. *J. Econom. Entomol.* 2008; 101(3):1028-1033.
- Stara J, Nesvorna M, Hubert J. Comparison of the effect of insecticides on three strains of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Astigmata) using an impregnated filter paper test and a growth test. *Pest Manag Sci.* 2014, 70(7):1138-44
- Stará J., Nesvorná M., Hubert J. The toxicity of selected acaricides against five stored product mites under laboratory assay. *J. Pest Sci.* 2011, 84(3): 387-391.
- Stará J., Nesvorná M., Hubert J. Long-term pre-exposure of the pest mite *Tyrophagus putrescentiae* to sub-lethal residues of bifenthrin on rapeseed did not affect its susceptibility to bifenthrin *Crop Protection* 2011, 30(9):1227-1232.
- Stará J, Stejskal V, Nesvorná M, Plachý J, Hubert J. Efficacy of selected pesticides against synanthropic mites under laboratory assay. *Pest Manag Sci.* 2011,67(4):446-57.
- Stara J, Erban T, Hubert J. The effect of chitin metabolic effectors on the population increase of stored product mites. *Experimental and Applied Acarology. Exp Appl Acarol.* 2010, 52(2):155-67.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři této metodiky děkují panu profesorovi RNDr. Jaroslavu Smržovi, CSc. a RNDr. Janu Jurochovi za cenné připomínky k této metodice.

Autoři: Jan Hubert, Marta Nesvorná a Jitka Stará

Název: Certifikovaná metodika pro testování akaricidních látek na skladištních roztočích a identifikaci rezistence

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, Praha 6 - Ruzyně, 161 06

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz

Náklad: 300 výtisků

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na autora: hubert@vurv.cz

Autoři fotografií: Marta Nesvorná, Jana Krejčová

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2015

ISBN 978-80-7427-181-6