

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra rostlinné výroby
a agroekologie

Téma bakalářská práce:

**Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana*
- biologická charakterizace**

Vedoucí bakalářské práce:

Landa Zdeněk, prof. Ing. CSc.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
ZF JU v Českých Budějovicích

Autor bakalářské práce:

Pavel Pavlíček
Bakalářský studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině

České Budějovice
Duben 2012

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavel PAVLÍČEK**
Osobní číslo: **Z09318**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině**
Název tématu: **Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* - biologická charakterizace**
Zadávající katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce: Zadané téma představuje literární kompilaci zaměřenou na analýzu současného stavu poznání v oblasti biologických charakteristik entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*, s důrazem na vliv abiotických faktorů na vývoj a účinnost tohoto patogena na vybrané druhy škodlivého hmyzu.

Výsledky této práce by měly sloužit k objektivnímu posouzení možností využít tohoto patogena v ochraně rostlin na území ČR. V literárním přehledu by měly být zahrnuty následující klíčové body:

- 1) Entomopatogenní houby.
- 2) Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub.
- 3) *Beauveria bassiana*.
 - Taxonomické zařazení.
 - Morfologická charakteristika.
 - Vývojový cyklus.
 - Kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana*.
 - Rozšíření - geografie.
 - Sortiment hostitelů.
 - Vztah k abiotickým faktorům.
 - Vliv *B. bassiana* na necílové organizmy.

Rozsah grafických prací: **15 stran**

Rozsah pracovní zprávy: **30 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

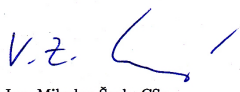
Seznam odborné literatury:

Weiser J., 1966: Nemoci hmyzu. Nakladatelství Akademia
Bailey A., et al., 2010: Biopesticides. CAB International Cambridge
**Publikace získané retrospektivní a průběžnou rešerší v bibliografické da-
tabázi CAB**

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie


Datum zadání bakalářské práce: **18. února 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2012**


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.

děkan

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDEJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice** ①


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 18. února 2011

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a použil jsem pouze zdrojů, uvedených na konci práce v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 31. března 2012

.....

Pavel Pavlíček

Děkuji prof. ing. Zdeňku Landovi, CSc. a ing. Andree Bohaté, PhD. za konzultace, cenné rady, připomínky, metodické a odborné vedení, které mi poskytli v průběhu zpracovávání bakalářské práce.

Anotace

Tato literární kompilace je zaměřena na současné poznání v oblasti biologických charakteristik entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* s důrazem na vliv abiotických faktorů na vývoj a její účinnost na vybrané druhy škodlivého hmyzu. Znalost abiotických faktorů je důležitá pro úspěšný výsledek při ochraně rostlin před škodlivými činiteli tímto entomopatogenem. Dále jsou zde uvedena i specifika, výhody a příklady používání zmiňovaného entomopatogena při biologické ochraně rostlin. V závěru jsou posuzovány možnosti využití entomopatogenní houby *B. bassiana* v ochraně rostlin na území České republiky i další aspekty týkající se praktického užívání a rozšíření.

Klíčová slova: entomopatogenní houby, *Beauveria bassiana*, biologická ochrana

Annotation

This literature compilation focuses on current knowledge in the biological characteristics of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, with emphasis on the influence of abiotic factors on the development and its effectiveness in selected species of harmful insects. Knowledge of abiotic factors is important for a successful outcome to protect plants against harmful agents this entomopathogen. There are also set out the specifics, benefits and examples of using the aforementioned entomopathogen in biological plant protection. In conclusion, the possibilities are assessed using the entomopathogenic fungi *B. bassiana* in plant protection in the Czech Republic and other aspects concerning the practical use and distribution.

Keywords: entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, biological control

OBSAH

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Úvod | 1 |
| 2. | Literární přehled | 2 |
| 2.1 | Entomopatogenní houby | 3 |
| 2.1.1 | Proč se zajímáme o entomopatogenní houby | 3 |
| 2.2 | Integrovaná ochrana | 5 |
| 2.3 | Biologická ochrana | 6 |
| 2.4 | Oblasti využití entomopatogenních hub | 6 |
| 2.5 | Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub | 7 |
| 3. | <i>Beauveria bassiana</i> | 8 |
| 3.1 | Historie | 8 |
| 3.2 | Taxonomické zařazení | 9 |
| 3.3 | Kmeny entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> | 10 |
| 3.4 | Morfologická charakteristika | 10 |
| 3.5 | Vývojový cyklus | 10 |
| 3.5.1 | Produkce metabolitů - toxinů | 13 |
| 3.6 | Vztah k abiotickým faktorům | 14 |
| 3.6.1 | Teplota | 14 |
| 3.6.2 | Vlhkost | 15 |
| 3.6.3 | Sluneční záření | 15 |
| 3.7 | Rozšíření – geografie | 16 |
| 3.8 | Sortiment hostitelů | 17 |
| 3.9 | Rozpad a chování v životním prostředí | 18 |
| 3.9.1 | Vliv na necílové organismy | 22 |
| 4. | Příklady použití | 28 |
| 5. | Závěr | 36 |
| 6. | Seznam citované literatury | 37 |

1. Úvod

V posledních letech roste zájem společnosti o zdravý životní styl. Stoupá obecné povědomí o lidském zdraví, kvalitě potravin, ale i celého životního prostředí. Mnozí z nás si ani neuvědomují, jak zemědělství v návaznosti na produkci potravin, všechny tyto oblasti výrazně ovlivňuje.

Z minulosti již víme, že pouze chemická ochrana rostlin (pesticidy) před škodlivými organismy, sebou přináší neblahé důsledky na životní prostředí, ekosystémy, organismy i lidské zdraví. Proto je důležité, že v důsledku těchto příčin, bylo nalezeno řešení v podobě integrované ochrany rostlin. Tento systém ochrany využívá mnoho metod regulace před škodlivými činiteli a zohledňuje všechny současné požadavky. Nejvhodnější metodou ochrany rostlin z pohledu všech složek životního prostředí je však biologická ochrana. Tato ochrana se dnes již běžně využívá za pomoci biologických prostředků na bázi makro i mikroorganismů, jako jsou například entomopatogenní houby. Pro aplikaci entomopatogenní houby, která přinese správný účinek ochrany, jsou nutné základní znalosti ze životního prostředí a vývoje těchto hub.

Tato práce je literární kompilací zaměřenou na biologickou charakteristiku a případné možnosti využití entomopatogenní houby *B. bassiana* v České republice. Jde o přiblížení této problematiky dle současných zjištění a výzkumů provedených v této oblasti. Je s podivem, že i když v České republice probíhají výzkumy účinků této entomopatogenní houby, se kterými mají v zahraničí kladné zkušenosti a biopreparáty na bázi *B. bassiana* jsou tam běžně registrovány a úspěšně aplikovány v běžné praxi, není u nás registrován žádný biopreparát na uvedené bázi. Oblastí a odvětví na využití této entomopatogenní houby je mnoho. Pro zajištění trvalé udržitelnosti společnosti a produkce kvalitních potravin pro obyvatelstvo je nutné hledat ty nejvhodnější řešení. Zde se nabízí jedna z možností, jak toho dosáhnout ve formě biologické ochrany, pomocí entomopatogenní houby *B. bassiana*.

2. Literární přehled

2.1 Entomopatogenní houby

Na celém světě je odhadováno něco okolo 1.5 milionu druhů hub a do současnosti popsáno asi 100 000 druhů (Crous et al. 2006; Bailey et al. 2011). Z tohoto počtu je známo více než 750 druhů, které mohou působit jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha druhů hmyzu. (Landa 1994; Hegedus a Khachatourians 1995; Sikorowski a Lawrence 2009,)

Entomopatogenní houby jsou nejdéle známé a nejčastěji determinované entomopatogenní mikroorganismy asociované s hmyzem, protože jejich růst na povrchu těla různých hostitelů je na rozdíl od ostatních skupin entomopatogenních mikroorganismů snadno vizuálně patrný (Landa 1994). Mezi nimi najdeme jak vysoce specifické houby (jeden hostitel, či vývojové stádium), tak i méně specifické (celá řada druhů, rodů, čeledí nebo i vyšších skupin), vztahující se k výskytu či napadení hostitele (Weiser 1966).

Entomopatogenní houby napadají převážnou většinu herbivorních (nebo fytofágních) druhů hmyzu a roztočů. Hostitele infikují pomocí spor, které přilnou na hostitelově těle a klíčí v návaznosti na podněty z prostředí nebo dle biochemických podmínek. Spory rostoucí skrz kutikulu využívají kombinaci enzymatické reakce a mechanického tlaku. Po průniku kutikulou se šíří v hostitelově haemocoel, mezibuněčném prostoru i okolo hlavních orgánů. Pokud je houba schopna překonat imunitní systém hostitele působící v haemocoel, pak se dále množí a šíří po celém zbytku těla, často ve formě kvasinkových buněk, které nepřírodně přežívají mimo hostitele. Hostitel hyne v důsledku mechanického poškození, vyčerpání živin a smrti buněk způsobené toxiny houby. Relativní význam těchto mechanismů se liší podle specifického houbového kmenu (izolátu) – vzorku nebo hostitele. V mnoha případech je pokles příjmu stravy jednou z prvních zjevných změn napadeného hostitele. Smrt nastává během 4-7 dnů od napadení s následnou produkcí velkého množství spor na uhynulém jedinci. Tisíce nebo miliony spor mohou být produkovány na velkém hmyzu jako jsou kobylinky nebo housenky. Spory mnoha druhů *Entomophthorales* jsou „vystřelovány“ do okolí usmrčeného hmyzu, aby mohla být houba přenesena na nového hostitele. Provádí také řadu dalších přizpůsobení pro zvýšení přenosu, včetně načasování uvolnění spor v obdobích dne, které jsou nejvhodnější k nákaze a ovlivnění hostitelova chování tak, aby nemocní jedinci umírali v exponovaných polohách (Hegedus a Khachatourians 1995; Bailey et al. 2011).

Důležité je i prostředí výskytu. Například některé skupiny (*Chytridiaceae*) jsou vázány na vodní prostředí, jiné (*Askomycetes*, *Deuteromycetes*) na půdu, další objevíme v provzdušněném pokryvu vegetace nebo lidských obydlích (*Entomophthoraceae*). Velkou skupinu tvoří houby žijící nejen na hmyzu, ale i na mrtvém substrátu organických zbytků (semena, listí, kůra) *Sporotrichum*, *Cephalosporium*, *Sphaerostilbe* a zčásti *Beauveria* (Weiser 1966).

Mezi hmyzem a houbami existují i různé vztahy. Např. houba *Septobasidium* má k červcům dvojí vztah - parazitický až symbiotický. Určité procento svými

haustoriemi vysává a ostatní pokryvem mycelia chrání před parazity. Jsou i takové, které si hmyz pěstuje, jelikož jsou pro něj užitečné například ambrosiové houby u mravenců a kůrovců (Weiser 1966).

2.1.1 Proč se zajímáme o entomopatogenní houby?

„Udržitelné hospodaření a ochrana před škůdci: velká výzva pro 21. století“

Co to vlastně znamená udržitelné hospodaření? Hospodaření, které zajistí uspokojivý život a naplnění jeho potřeb všem, kteří se na něm podílejí, bez poškození ekonomických, sociálních a environmentálních vyhlídek pro budoucí generace (Bailey et al. 2010)

Asi 40% ze všech možných světových výnosů je zničeno škůdci (bezobratlí, rostlinné patogeny a plevele) před sklizní. Další 20% je zničeno po sklizni. Od počátku 60. let 19. století byla ochrana před škůdci silně závislá na použití syntetických, chemických pesticidů, což mělo neblahý důsledek na člověka i životní prostředí (Bailey et al. 2010).

Až v 26 milionech případů ročně na celém světě dojde k otravě pesticidy, na které 220 tisíc lidí zemře, převážně v rozvojových zemích (Bailey et al. 2010). Již byla prokázána souvislost mezi dlouhodobým účinkem pesticidů na lidský organismus a výskytem Parkinsonovy nemoci, týkající se zejména chlororganických sloučenin (Elbaz et al. 2009)

Vývoj a výroba pesticidů je značně nákladná, proto se na trhu uplatňují pesticidy hubící široké spektrum škůdců (efektivnější z pohledu výrobce i zemědělce). Negativním důsledkem používání pesticidů je i působení na necílové druhy, které jsou v ekosystémech užitečné (přirození nepřátelé – predátoři). Což má často za následek, že pokud škůdce přežije účinky pesticidů, jeho populace se zvětší, z důvodu nepřítomnosti přirozených nepřátel a v těchto případech je nutné aplikovat zvýšené dávky pesticidů. Organismy, které dosud nebyly považovány za škůdce, protože byly přirozenými nepřáteli udržovány na nízké úrovni, se stanou druhotným škůdcem, v důsledku nadměrného používání pesticidů. Například v USA došlo v letech 1960-1980 vlivem používání pesticidů ke zvýšení počtu druhů škůdců bavlny ze dvou na osm (Bailey et al. 2011). Nevhodné používání pesticidů vyvolává snížení účinnosti na populaci cílového škůdce (rezistence). Dědičná rezistence se může projevit snížením citlivosti buněk nebo vznikem mechanismů odbourávajících toxicitu pesticidů.

Vhodným příkladem je rezistence sledovaná u DDT, která nastala již po sedmi letech užívání. Obecně se rezistence na insekticidy vyvine během deseti let (Bailey et al. 2011).

Příkladem takového škůdce, který si rychle vytvoří rezistenci, může být černopáska bavlníková (*Heliothis armigera* Hübner). Tento široce polyfágní druh se vyskytuje v Africe, Asii, Indii, Japonsku, Austrálii, Novém Zélandu, Evropě a migruje i do České republiky. Vyskytuje se na území jižní a střední Moravy a středních Čech. Právě v tomto případě se nabízí možnost využití biologické ochrany například

pomocí entomopatogenní houby *B. bassiana*, jejíž aplikace na tohoto škůdce byla úspěšně provedena (Březíková 2007; Prasad et al. 2010).

Biologická ochrana se jeví výhodná i z hlediska dlouhodobé efektivity. Uvádí se, že 1 USD vložený do biologické ochrany se navrací 30 krát, u chemické ochrany 5 krát (Diribeková et al. 1991).

V neposlední řadě je důležité, že produkce entomopatogenních hub pro biologickou ochranu rostlin je snadná a pro jejich aplikaci je možno využít stejnou techniku jako pro konvenční chemické pesticidy.

Tyto poznatky by měly být popudem pro alternativní ochranná opatření jako je integrovaná ochrana škůdců (Bailey et al. 2010).

Tabulka 1. Dostupný výběr alternativních metod k pesticidům
(převzato z Advisory Committee on Pesticides 2003; Bailey et al. 2010).

| Technologie | Rozšíření | Účinek |
|---|-----------------|------------|
| Biologická ochrana | | |
| Entomopatogenní houby | Běžně rozšířený | Dobrý |
| Entomopatogenní viry | Běžně rozšířený | ? |
| Mikrobiální antagonisté rostlinných patogenů | Běžně rozšířený | ? |
| Predátoři a parazitoidi | Běžně rozšířený | Dobrý |
| Konzervace (přirozený výskyt predátorů bezobratlých škůdců) | Běžně rozšířený | Dobrý |
| Mikrobiální herbicidy | Možný | ? |
| Biochemikálie | | |
| Hmyzí feromony | Běžně rozšířený | Dobrý |
| Antifeedanty | Možný | ? |
| Rostlinné extrakty | Místní zdroje | Proměnlivý |
| Další metody | | |
| Komoditní chemikálie | Běžně rozšířený | Průměrný |
| Změna prostředí | Běžně rozšířený | Dobrý |
| Fyzikální a mechanická ochrana (regulace) | Běžně rozšířený | Dobrý |
| Výběr druhu, odrůdy, osiva, sadby | Běžně rozšířený | Dobrý |
| Osevní postup | Běžně rozšířený | Dobrý |

2.2 Integrovaná ochrana

Chemická ochrana rostlin sebou přinesla mnoho negativních důsledků v souvislosti s používáním organických pesticidů. Reakcí na tyto důsledky byl vznik integrované ochrany rostlin proti škůdcům a patogenům, která je v současné době využívána (Hrudová et al. 2009).

Integrovaná ochrana je rozhodnutí na základě procesu, který zahrnuje koordinované využití více opatření pro optimalizaci kontroly všech druhů škůdců (hmyz, patogeny, plevele a obratlovce), ekologicky a ekonomicky správným způsobem. Z této užitečné definice je zřejmé, že integrovaná ochrana vyžaduje celou řadu opatření na řešení celé řady problémů. Pro tuto strategii je důležitý monitoring plodin, zvážení vhodného zásahu a ekonomických prahových hodnot (kritický počet), pro aplikaci ochrany rostlin na odlišné škůdce. Ochrana proti škůdcům by měla být účinná, avšak s minimálními dopady na ostatní složky agroekosystému, s ohledem na potřeby výrobců, celé společnosti a životního prostředí. (Bailey et al. 2010).

V roce 2009 byla Evropským parlamentem a Radou EU přijata velmi významná směrnice, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Z této směrnice vyplývá, že členské státy (včetně České republiky) popíší ve svých národních akčních plánech způsoby, kterými zajistí, aby všichni profesionální uživatelé uplatňovali obecné zásady integrované ochrany rostlin podle přílohy III nejpozději od 1. ledna 2014.

SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2009/128/ES

ze dne 21. října 2009,

kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů

Výňatek ze směrnice

6 „integrovanou ochranou rostlin“ pečlivé zvažování veškerých dostupných metod ochrany rostlin a následná integrace vhodných opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin a jiných forem zásahu na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit a které snižují či minimalizují rizika pro lidské zdraví nebo životní prostředí. „Integrovaná ochrana rostlin“ klade důraz na růst zdravých plodin při co nejmenším narušení zemědělských ekosystémů a podporuje přirozené mechanismy ochrany před škodlivými organismy;

4. Členské státy popíší ve svých národních akčních plánech způsoby, kterými zajistí, aby všichni profesionální uživatelé uplatňovali obecné zásady integrované ochrany rostlin podle přílohy III nejpozději od 1. ledna 2014 (Anonym 2009).

2.3 Biologická ochrana

Biologická ochrana rostlin je ochrana prováděná biologickými prostředky. Záměrným využíváním přirozených nepřátel škodlivých organismů nebo antagonistických organismů, případně jejich metabolitů, k potlačování populací škodlivých druhů omezováním jejich vývoje a šíření. Jejím cílem není vymýcení populací škodlivých činitelů, ale regulace jejich četnosti na tolerované úrovni, pod ekonomickým prahem škodlivosti (Věchet 2010).

2.4 Oblasti využití entomopatogenních hub

V zemědělství se využívají entomopatogenní houby hlavně v ochraně rostlin (biologická a integrovaná) polních kultur, skleníkových plodin a sadech proti škůdcům patřícím do různých řádů hmyzu. Najdeme i případy, kde jsou využity i proti hmyzu parazitujícím na zvířatech jako je třeba drůbež. V USA byla provedena studie, v které byla sledována možnost využití *B. bassiana* v chovech drůbeže proti čmelíkovci ptačímu (*Ornithonyssus sylviarum*) (Rassette et al. 2011). Dále byl například prováděn výzkum a aplikace komerčně vyráběného biopreparátu *B. bassiana* – balEnce v komerčních klecových chovech drůbeže nosnic proti mouše domácí (*Musca domestica*) (Kaufman et al. 2005). Nebo byl sledován i přirozený výskyt *B. bassiana* v populaci *Musca domestica* v drůbežárnách v La Plata v Buenos Aires (Siri et al. 2005). Tento výzkum není důležitý jen z hlediska zemědělství, nýbrž i z pohledu zdravotnictví, jelikož *Musca domestica* je důležitý vektor patogenů, které mohou být přenosné na domácí zvířata, stejně tak i na člověka. Bylo zjištěno, že *Musca domestica* je nosičem etiologického původce tyfové horečky, úplavice, cholery, ovčí mastitidy, zánětu spojivek, dětské obrny a dalších. Dále vektorem prvoků cyst měňavka úplavičná (*Entamoeba histolytica*), *Escherichia coli*, lamblie střevní (*Giardia intestinalis*) (Siri et al. 2005).

V návaznosti na zemědělství se nabízí využití v potravinářství týkající se skladování zemědělských komodit, konkrétně skladování obilí v obilních skladech a silech, kde může působit například skladištní škůdce kožojed šedý (*Dermestes maculatus*) (Lord 2011). Další oblastí využití je lesnictví, kde se například využívá v ochraně před lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) v lesních porostech a dalšími (Landa et al. 2001; Kreutz et al. 2004).

2.5 Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub

Tabulka 2. Přehled některých hlavních telemorf a anamorf rodů Hypocreales patogenních na bezobratlých (Sung et al. 2007).

| Clavicipitaceae | Čeleď Cordycipitaceae | Ophiocordycipitaceae |
|---|--|--|
| <i>Hypocrella, Metacordyceps, Regiocrella, TorrubIELla</i> | Telemorfy <i>Cordyceps s.str., TorrubIELla</i> | <i>Ophiocordyceps, Elaphocordyceps</i> |
| <i>Aschersonia, Metarhizium, Nomuraea, Paecilomyces, Pochonia, Rotiferophthora, Verticillium</i> | Anamorfy <i>Beauveria, Engyodontium, Isaria, Lecanicillium, Mariannaea-like, Microhilum, Simplicillium</i> | <i>Haptocillium, Harposporium, Hirsutella, Hymenstilbe, Paraisaria, Purpureocillium, Sorosporella, Syngliocladium, Tolypocladium, Verticillium</i> |

Zvýrazněným písmem jsou rody se zastoupením druhů významných v biologické ochraně rostlin (Landa 1994; Evans 2003). Nepohlavní fáze rozmnožování (stadium) životního cyklu se nazývá anamorfa a pohlavní telemorfa (Váňa 1996). V našich podmínkách České republiky v oblasti mírného pásu se vyskytuje u rodu *Beauveria* pouze stádium anamorfy (Zimmermann 2007).

Tabulka 3. Nejvýznamnější druhy komerčně užívané nebo zamýšlený jejich vývoj. (Landa 1994, Koubová 2009).

| Druh | Obecná charakteristika |
|---|--|
| <i>Aschersonia aleyrodis</i> | molícovití (<i>Aleyrodidae</i>) |
| <i>Aschersonia goldiana</i> | <i>Aleyrodidae</i> |
| <i>Beauveria bassiana</i> <i>Beauveria brongniartii</i> | široce polyfágní entomopatogenní druhy |
| <i>Hirsutella thompsonii</i> | akarifágní, sviluška chmelová (<i>Tetranychus urticae</i>), <i>Phyllocoptruta oleivora</i> |
| <i>Hirsutella rhossiliensis</i> | nematofágní – háďátka (hlístice) |
| <i>Lecanicillium lecanii (resp. muscarium)</i> | široce polyfágní entomopatogenní druh |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> | široce polyfágní entomopatogenní druh |
| <i>Nomuraea rileyi</i> | housenky motýlů (<i>Lepidoptera</i>) |
| <i>Paecilomyces farinosus</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> | široce polyfágní, entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy |
| <i>Tolypocladium cylindrosporum</i> | dvoukřídlí - <i>Diptera</i> , komárovití - <i>Culicidae</i> |

3. Beauveria bassiana

3.1 Historie

První, kdo rozlišil entomopatogenní houbu *B. bassiana* a zjistil její patogenitu na bourci morušovém (*Bombyx mori*), byl Agostino Bassi z Lodi (Itálie) v roce 1835. Popsal ji v díle „*Del mal del segno calcinacio o moscardino*” (Weiser 1966). Nazýval ji bílou muskardínou (Zimmermann 2007).

Determinace této entomopatogenní houby provedl v roce 1835 Giuseppe Balsamo-Crivelli, který ji zařadil do rodu *Botrytis* (*Botrytis paradoxa*), později změnil označení na *Botrytis bassiana* na počest jejího objevitele.

O dva roky později, Audouin dospěl k domněnce, že tato houba není úzce specifická pouze na bource, ale je možné její využití i proti jinému hmyzu. Již v roce 1852, Vittadini v laboratorních podmínkách dokázal, že infekce je otázkou dávky spor (Weiser 1966).

V období rozvoje klasické mikrobiologie v druhé polovině 19. století, za života Louise Pasteura (*1822,†1895) se objevují teorie využití parazitických mikroorganismů k hubení škodlivých organismů. Zde je třeba vzpomenout amerického entomologa německého původu Hermanna Hageny (*1817,†1893), jednoho z předních zakladatelů této teorie (Dirlbeková et al. 1991).

V roce 1912 provedl Vuillemin revizi systematického zařazení do rodu *Beauveria* a druhu *bassiana*. Tyto poznatky a zjištění z 19. století jsou pouze vědeckým sdělením a do praxe nijak nepronikaly (Dirlbeková et al. 1991).

Profesor zoologie I. I. Mečnikov na univerzitě v Oděse (*1845,†1916) se stal zakladatelem celé školy pracovníků pro biologickou ochranu proti škůdcům a první prakticky prokázal možnost a užitečnost, umělé produkce entomopatogenních hub pro ochranu rostlin. Dokonce i první realizoval masovou produkci infekčních částic entomopatogenních hub pro biologickou ochranu zemědělských plodin (Dirlbeková et al. 1991).

Steinhaus (1949), MacLeod (1954) a později De Hoog (1972) provedli nejobsáhlejší studie o rodech *Beauveria* a *Tritirachium*, dále historii rodu *Beauveria* a jeho druhů a nakonec i kulturní a morfologickou charakteristiku (Zimmermann 2007).

V části „*Fungous infection's*”, Steinhaus (1949) shrnul průběh infekce, vývoj onemocnění a praktické využití *B. bassiana* proti některým hmyzím škůdcům, jako například zavíječ kukuřičný (*Ostrinia (Pyrausta) nubilalis*) nebo obaleč jablečný (*Carpocapsa pomonella*). Také se zmínil o praktickém využití *Beauveria globulifera*, která byla později součástí *B. bassiana* proti *Blissus leucopterus* (Zimmermann 2007).

V knize od Müller-Kögler z roku 1965 je zmíněno 28 druhů a čeledí škůdců hmyzu vyskytujících se v sadech, sklenicích, lesích a v tropech, proti kterým byla použita *B. bassiana* z kontrolních účelů. V roce 1981 Ferron vydal recenzi na hubení škůdců houbami *Beauveria* a *Metarhizium* včetně základních a praktických hledisek. V té době byl užíván biopreparát s *B. bassiana* (Boverin) v SSSR na tisících hektarech především proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a obaleči

jablečném (*Cydia pomonella*). V Číně byla *B. bassiana* produkována a široce aplikována proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) v kukuřici, *Dendrolimus punctatus* na borovici a *Nephotettix* na rýži a čaji (Zimmermann 2007).

3.2 Taxonomické zařazení

Taxonomické uspořádání hub členíme na oddělení *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* (Kalina a Váňa 2005). Většina druhů entomopatogenních hub užívaných v biologické ochraně rostlin patří do dvou oddělení *Zygomycota* řád *Entomophthorales* a *Ascomycota* (Hegedus a Khachatourians 1995; Bailey et al. 2011). Druhy hub z oddělení *Zygomycota* se vyznačují asexuálním (nepohlavním) rozmnožováním na konkrétních hostitelích během vegetačního období. Ale po přezimování, využívají i rozmnožování sexuální (pohlavní), které se vyznačuje produkcí klidových spor na konci roku. *Ascomycota* zahrnují houby rozmnožující se sexuálně, tak i druhy, které se jeví, že tuto schopnost ztratily (Bailey et al. 2011).

Další členění *Beauveria* je pododdělení *Pezizomycotina*, třída *Sordariomycetes*, podtřída *Hypocreomycetidae*, řád *Hypocreales* (Kalina a Váňa 2005). Nedávné fylogenetické rozdělení dokazuje, že *Beauveria* je monofyleticky v rámci *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*) a obě *B. bassiana* i *B. brongniartii* byly vývojově spojeny do *Cordyceps* (Rehner et al. 2011).

Během let bylo popsáno na 14 druhů *Beauveria*, které se lišily růstem na umělých půdách a na hmyzu. MacLeod (1954) spojil tyto druhy do dvou *B. bassiana* a *B. tenella*. Později De Hoog (1972) vymezil rod *Beauveria* Vuillemin na *B. bassiana*, *B. brongniartii* a *B. alba*. Hlavní synonyma *B. bassiana* jsou vyznačena v následující tabulce (Zimmermann 2007).

Tabulka 4. Hlavní synonyma *B. bassiana* (Zimmermann 2007).

| | |
|---|---|
| <i>B. bassiana</i> (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (1912) | <i>Beauveria laxa</i> Petch (1931) <i>Beauveria globulifera</i> (Speg.) Picard (1914) <i>Botrytis bassiana</i> Balsamo (1835) <i>Botrytis necans</i> Masee (1914) <i>Botrytis bassiana</i> Sacc. subsp. <i>tenella</i> Delacroix (1937) <i>Botrytis bassiana</i> var. <i>lunzinensis</i> Szilvinyi (1941) <i>Botrytis brongniartii</i> subsp. <i>delacroixii</i> (Sacc. Delacroix (1893) <i>Botrytis effusa</i> Beauverie (1911) <i>Botrytis stephanoderis</i> Bally (1923) <i>Sporotrichum densum</i> Link (1809) <i>Sporotrichum globuliferum</i> Speggazzini (1880) <i>Sporotrichum minimum</i> Speggazzini (1881) <i>Isaria shiotae</i> Kuru (1931) |
|---|---|

3.3 Kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana*

Současné, využívané, či nalezené kmeny entomopatogenních houbových kultur *B. bassiana* a jejich hostitelů obsahuje sbírka ARSEF (Anonym 2005).

3.4 Morfologická charakteristika

B. bassiana se vyznačuje bílými, později nažloutlými a příležitostně načervenalými koloniemi. Spodní strana je bezbarvá nebo nažloutlá až narůžovělá. Konidiogenní buňky tvoří kulovité nebo baňkovité základní části a až 20 µm dlouhé rachis, většinou se formují cik-cak. Konidie jsou hyalinní, kulovité až široce eliptické, obvykle 2-3 x 2-2,5 µm. Vznikají ve skupinách a formují se ve shluky (Zimmerman 2007).

Klasifikace se provádí nejen dle morfologických charakteristik, ale i dle molekulárních identifikačních technik, z důvodů subjektivity morfologických charakteristik (Thakur a Sandhu 2008).

3.5 Vývojový cyklus

Stejně jako u jiných entomopatogenních hub rod *Beauveria* napadá hostitelský hmyz obecně percutánně.

K přichycení na kutikulární povrch dojde v důsledku hydrofobnosti konidií. Konidie obsahují na vnějším povrchu hydrofobin.

Klíčení a úspěšná infekce závisí na řadě faktorů, např. vnímavý hostitel, stádium hostitele a některé faktory životního prostředí, jako jsou optimální teplota a vlhkost. Klíčení je dále ovlivněno některými kutikulárními lipidy, například mastnými kyselinami, aldehydy, voskovými estery, ketony a alkoholy, které mohou mít antimikrobiální aktivitu. Nicméně kutikula může být potažena látkami, které jsou důležité pro rozpoznávání hub. Těmito látkami jsou volné aminokyseliny nebo peptidy schopné způsobit přichycení a klíčení.

Obecně platí, že houba proniká tenčí, nesklerotizovanou oblastí pokožky, což jsou spoje mezi segmenty (Zimmermann 2007).

V místě dotyku s pokožkou se houba začne vyvíjet, spora se otvírá a vypouští klíček, který proniká chitinovou kutikulou do těla hmyzu. Pronikání klíčku je umožněno fermenty, vylučovanými v místě růstu klíčku. Ty změkčují chitinový povrch, vytravují otvor, kterým pronikají do nitra hmyzu. V roce 1958, Huber prokázal chitinasu (růstový vrcholek klíčku, spory, hyfy atd.) v živných půdách kultur *B. bassiana*, *Metarhizium* a *Cordyceps militaris* a *Aspergillus flavus* (Weiser 1966).

Druhým místem, kterým proniká infekce do hmyzu, je ústní ústrojí a následně střevo v případě, že se postupující spora zachytí delší dobu v záhybu při jeho průchodu. Infekce střevem je těžko průkazná a možná spíše jen u dospělých jedinců hmyzu. Infekční jsou pouze vzdušné konidie a válcovité endokonidie. Hyfy kutikulu neprorůstají, z důvodu nemožnosti vylučování enzymu chitinasu, který by narušil

chitin v kutikule. Třetím místem infekce jsou stigmata hmyzu a posledním jsou pohlavní orgány (Weiser 1966).

Průběh infekce a vývojový cyklus se skládá z následujících kroků:

- přichycení spory na povrchu kutikuly hostitele
 - klíčení spor
 - pronikání skrz kutikulu (penetrace)
 - překonání hostitelovy reakce a imunitního obranného systému
 - proliferace uvnitř hostitele prostřednictvím tvorby hyfálních útvarů/blastospor (parazitická fáze vývojového cyklu)
 - saprofytická fáze vývojového cyklu z mrtvého hostitele a nakonec vznik nových konidií (sporulace)
- (Zimmermann 2007).

Inkubační doba je závislá na hostiteli, stadiu hostitele, teplotě a virulenci kmene. U mšice může trvat 3-4 dny, zatímco v larvách vrubouna 2-4 týdny. Patogen může ovlivňovat během inkubační doby celkové chování, příjem potravy a s tím spojené snížení tělesné hmotnosti, ovlivnění plodnosti, způsobit malformace až behaviorální horečku (Zimmermann 2007).

Nákazu způsobují konidie, klíčící na povrchu kutikuly. Po jejich krátkém růstu na povrchu, vnikají vlákna kolmo do chitinového pokryvu kutikuly a pronikají do tělní dutiny. Jsou-li všechny podmínky příznivé, začíná klíčení 10 hodin po aplikaci a bývá z větší části dokončeno do 20 h při 20-25°C. Za nepříznivých podmínek trvá až několik dní (Zimmermann 2007).

V místě průniku do kutikuly se vytvoří nepravidelný terčik (reakce fenoloxidas se vzduchem), kterým vnikají dovnitř vlákna, ta se oddělují od základu na povrchu kutikuly, postupně se vyčerpávají a odumírají. Hyfová tělíska mají kvasinkový tvar a jsou krátká. Hemolymfa je roznáší po celém těle, lymfocyty je napadají, fagocytují je a následně hynou. Ani megalocyty (spojení větší počtu lymfocytů do shluků) nezabrání postupující infekci. Hyfy se pomnožují, spotřebovávají živiny z hemolymfy, do které vylučují metabolity a proteázy. Pohyb hemolymfy se zastavuje, tukové zásoby se resorbují, až zůstanou jen slupkovité shluky buněk. Střevo většinou není napadeno po celou dobu infekce (Weiser 1966).

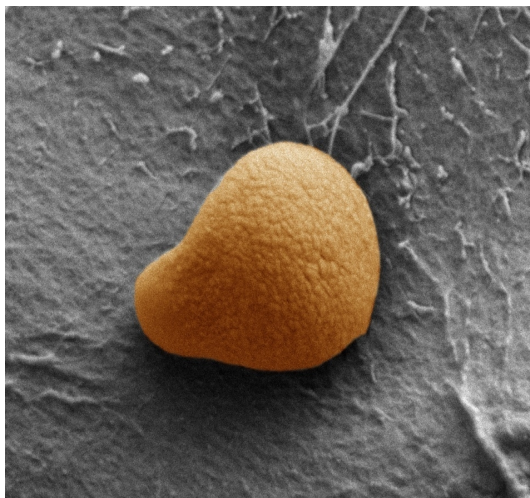
Hostitel hyne v době, kdy jsou zničeny všechny lymfocyty. Poté se v těle tvoří dlouhá vlákna, odlišná od kvasinkových, na kterých vyrůstají válcovité konidie po dvou i více na krátké stopce. Válcovité konidie, endokonidie (blastospory), jsou 7 μm dlouhé a 2-3 μm široké. Jejich obsah je hustší a nazelenalý. Na počátku nákazy vznikají krátké hyfy, jež narůstají do 7-18 μm délky a 3 μm šířky. Jsou prohnutého až kyjovitého tvaru. Endokonidie nezůstávají dlouho uzavřeny. Otvírají se uvnitř tělo hostitele, v hemolymfě z nich narůstají další hyfy a na těch se po určitém růstu tvoří znovu endokonidie. Narůstající hyfy vyplní tělo hmyzu bez deformace povrchu tak, že jsou při rozkrojení zprvu sýrovité, později houbovitě vláknité, až nakonec sklerotizované (Weiser 1966). Při dostatku vlhkosti prorůstají pak hyfy na povrch těla hmyzu (saprofytická fáze). Za velmi suchých podmínek může houba setrávat ve fázi

hyf uvnitř uhynulého hostitele nebo produkovat konidie uvnitř těla (Zimmermann 2007). Vnitřek těla se mění v sklerocium, ve kterém vysycháním a zráním se zesilují stěny vláken a plazma se zahušťuje, mění se do namodralého nebo nazelenalého zbarvení. Na povrchu mumifikovaného těla se zdvihají vlákna, na kterých se vyvíjejí vzdušné konidie (Weiser 1966).

Entomopatogenní houba *B. Bassiana* produkuje nejméně tři různé jednobuněčné rozmnožovací částice. Vzdušné konidie, vegetativní buňky zvané blastospory a submerzní konidie, které mohou být izolovány od agarových plátů (Holder a Keyhani 2005).

Snímky zobrazující některé fáze vývojového cyklu *B. bassiana*.

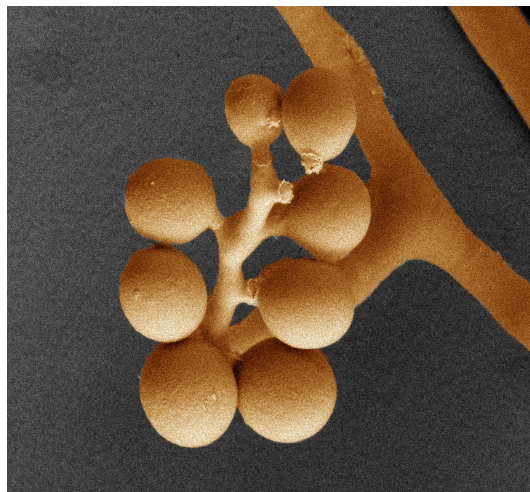
(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).



Obrázek 1. Klíčící konidie.



Obrázek 2. Primární hyfa - klíček (prorůstání do hostitele).



Obrázek 3. Sporulace.



Obrázek 4. Mycelium prorůstající na povrch usmrčeného hostitele.

3.5.1 Produkce metabolitů - toxinů

Mikroorganismy, zejména houby, produkují celou řadu látek nebo metabolitů, převážně v rámci jejich sekundárního metabolismu, které mají obvykle různorodé účinky a funkce. Vzhledem k registraci těchto přípravků a případnému hodnocení rizik jsou tyto metabolity i jejich funkce a účinky v popředí zájmu toxikologie. Roberts předložil první komplexní přehled na toxiny entomopatogenních hub v roce 1981 (Zimmermann 2007). Další recenzi na toxické metabolity u těchto hub provedli Vey et al. (2001). *B. bassiana* produkuje několik toxických sloučenin in vitro a in vivo. Většina z těchto insekticidních molekul jsou nízkomolekulární sekundární metabolity, převážně cyklické peptidy jako beauvericin, bassianolide a pigmenty bassianin i tenellin. Dalšími jsou bassianolid, bassiacridin, beauveriolide, beauverolidy, oosporein a kyselina šťavelová (Zimmermann 2007).

Beauvericin je nejdůležitější sloučeninou, která byla poprvé zjištěna u *B. bassiana* a vyskytuje se i u dalších hub. Ne všechny izoláty *B. bassiana* produkují beauvericin in vitro. Výzkum beauvericinu prokázal, že tento metabolit má insekticidní, antibiotické, cytotoxické a ionoforické vlastnosti. Roberts (1981) zaznamenal některé toxické účinky proti bakteriím, larvám komárů, žábřonožky solné a dospělcům mouchy domácí. Jsou známy některé účinky beauvericinu na mšice (*Schizaphis graminum*). Dále byly zjištěny antimykobakteriální (*Mycobacterium tuberculosis*) a antiplasmodiální (*Plasmodium falciparum*) účinky beauvericinu a beauvericinu A izolovaného z *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. Beauvericin je specifický inhibitor cholesterolu acyltransferázy, který je toxický kromě již zmíněných i k myším a lidským buněčným liniím. Tento inhibitor může vyvolat programovanou buněčnou smrt podobnou k apoptóze a způsobit cytolýzu. V případě rostlin tato sloučenina neměla větší vliv na kořeny melounu, rajčat, pšenice a ječmene, avšak vykazuje vysokou toxicitu vůči protoplastům těchto rostlin. I přesto je pravděpodobné, že beauvericin nalezený a izolovaný z potravin nebo krmiv v přírodě, pochází spíše z rodu *Fusarium* a jeho druhů spíše než od *B. bassiana* (Zimmermann 2007).

Jiný sekundární metabolit, podobný svými ionoforickými a antibiotickými účinky beauvericinu, je bassianolid. Biosyntézu strukturálně příbuzné látky, tzv. PF1022, zaznamenali Weckwerth et al. (2000). PF1022 má silné antihelmintické vlastnosti a byl nalezen v houbě produkující pouze sterilní mycelium.

Z kmenu *B. bassiana*, který způsobil infekci kobyly, purifikovaly Quesada-Moraga a Vey (2004) toxický, insekticidní protein bassiacridin, který je specifický ke kobylykám.

Namatame et al. (2004) zjistili, že Beauveriolides mají potenciál jako léčiva v humánní medicíně.

Oosporein patří mezi jeden z hlavních sekundárních metabolitů, produkovaných mnoha kmeny *B. bassiana*. Působí jako antivirotikum a antibiotikum proti gram-pozitivním bakteriím, ale jen malý účinek, má na gram-negativní bakterie. Je zřejmé, že oosporein nemá antimykotické a fytotoxické účinky. Komplexní přehled o oosporeinu sepsali Strasser et al. (2000), Vey et al. (2001) a Seger et al. (2005 a,b). Poslední důležitou sloučeninou, produkovanou *B. bassiana* je

kyselina šťavelová. Ta je považována za významný faktor patogenity, jelikož je schopna rozpouštět specifické kutikulární proteiny, jak uvádí Vey et al. (2001).

3.6 Vztah k abiotickým faktorům

Šíření a přežití jakéhokoliv mikroorganismu v životním prostředí je silně ovlivněno několika abiotickými a biotickými faktory. Nejvíce limitující pro houby z faktorů abiotických v životním prostředí jsou teplota, vlhkost a sluneční záření. Tyto faktory jsou také zodpovědné za efektivní, komerční využití entomopatogenních hub. Význam těchto ekologických parametrů rozpoznali ve stejném roce Clerk a Madelin i Müller-Kögler (1965).

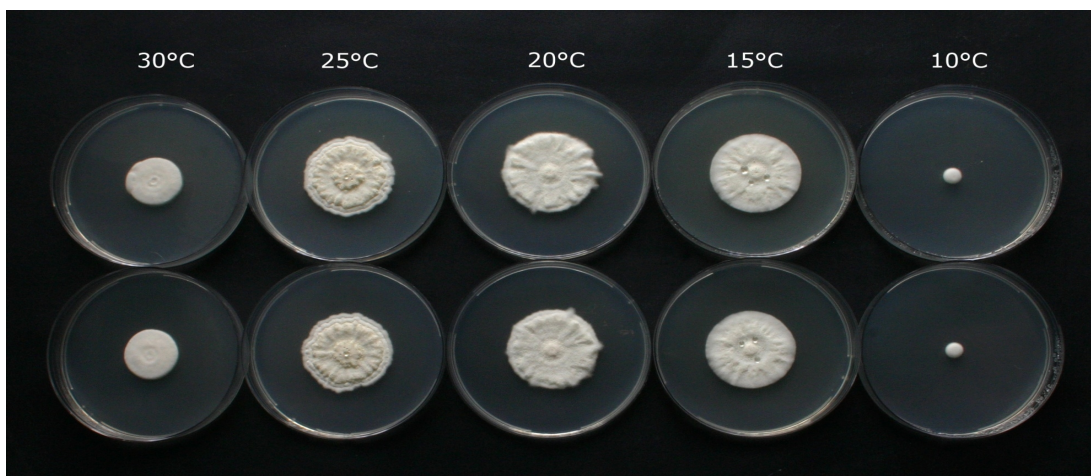
3.6.1 Teplota

Teplota může ovlivnit fáze vývojového cyklu a vlastnosti entomopatogena jako například klíčení, růst, životaschopnost v hostiteli a v životním prostředí. Vysoké teploty mohou inaktivovat entomopatogen před kontaktem s hostitelem, či mohou snížit nebo naopak urychlit růst v hostiteli, což je závislé na konkrétních požadavcích. Naproti tomu nízké teploty mohou snížit nebo zastavit klíčení i růst, a tím pádem zpomalit, či prodloužit úspěšnou infekci.

U *B. bassiana* je optimální teplota mezi 23-28°C, minimální 5-10°C a maximální okolo 30-38°C (závislé na testovaných kmenech). U afrických kmenů *B. bassiana* byla zpomalené klíčení, radiální růst a sporulace při 15 a 35 °C, zatímco optimální teplota odlišných kmenů byla mezi 20 a 30°C nebo 25-30°C. Naproti tomu kmeny *B. bassiana* pocházející z subantarktických půd z ostrova Macquarie vyklíčily při 5°C. Smrt způsobená vysokou teplotou nastává při 50°C po dobu 10 minut (Zimmermann 2007).

Obrázek 5. Polymorfismus středové kultury u *B. bassiana* vyvolaný růstem za různých teplot na Petriho miskách

(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).



3.6.2 Vlhkost

Vlhkost je velmi důležitým faktorem životního prostředí ovlivňujícím účinnost a přežití entomopatogena. Klíčení spor na kutikule hmyzu a následná sporulace po smrti hostitele, vyžadují vysokou vlhkost. Vysoká nebo nízká vlhkost vzduchu, ve spojení s vysokou teplotou, může mít vliv na životaschopnost a perzistenci houbových spor. Musíme rozlišovat mezi makroklimatem a mikroklimatem a mezi prostředím s vysokou vlhkostí nebo prostředím s nízkou vlhkostí na listech nebo povrchu hmyzu, při posuzování účinků vlhkosti v dané lokalitě. Obecně platí, že rozsah relativní vlhkosti (RH) pro klíčení *B. bassiana* konidie je 92-100%. K nepatrnému snížení klíčení dochází při 99% RH, zatímco klíčení a růst je zpomalen při 92% a 94%. Nicméně houbové infekce hmyzu byly zaznamenány i při relativně nízkých vlhkostech 60-70%. V těchto případech byla pravděpodobně vlhkost na povrchu hostitele nebo olistění vyšší. Úspěšné infekce byly také pozorovány při nízké relativní vlhkosti u olejových formulací preparátu. Životaschopnost při různých teplotách je také silně ovlivněna relativní vlhkostí samotné konidie. Například životaschopnost suché konidie *B. bassiana* byla 635 dní při 8°C a 0 % relativní vlhkosti naproti tomu 25-28 dnů při 25°C a 75.8% RH. Nižší relativní vlhkost dokonce zvyšuje životaschopnost spor i při vyšší teplotě (Zimmermann 2007).

3.6.3 Sluneční záření

Sluneční záření je nejvíce škodlivý faktor životního prostředí zejména UV-B (290 - 330 nm) a UV-A (330 - 400 nm), který ovlivňuje perzistenci houbových insekticidů. Výsledky prezentované v literatuře ukazují, že entomopathogeni jsou inaktivováni během několika hodin nebo dní, pokud jsou vystaveni slunečnímu záření. V laboratorních experimentech, při simulovaném slunečním záření, byly téměř všechny (99%) konidie *B. bassiana* deaktivovány při záření UV-C po téměř 16 minutách, při UV-A a UV-B asi po 31 min. Po ozáření simulovaným slunečním světlem nastal poločas rozpadu konidií *B. bassiana* okolo dvou hodin. V laboratoři se přežití konidií aplikovaných ve vodě na skleněných krycích sklíčkách a na žitňáku hřebenitém (*Agropyron cristatum*) snížila o více než 95% při expozici UV-B zářením po dobu 15 min. Přežití konidií v oleji bylo více zřetelné na skle (74% úmrtnost po dobu 60 min) než na listech (97% úmrtnost po dobu 60 min). Významné rozdíly v citlivosti k simulované slunečnímu záření mezi izoláty *B. bassiana* byly prokázány Morley-Davies et. al.(1995). Škodlivé účinky slunečního záření mají tedy za následek poměrně krátké přetrvávání mikrobiálních agens po aplikaci, což vedlo k začlenění různých UV protektantů do konidiálních přípravků či biopreparátů (Zimmermann 2007). Například jednou ze studií zabývající se zmírněním důsledků slunečního záření, bylo posuzování vhodnosti Tinopalu jako posilujícího adjuvantu ve formulacích entomopatogenní houby *B. bassiana*. Bylo zjištěno, že Tinopal poskytuje úplnou ochranu před slunečním zářením až 3 h od začátku expozice a za vhodných podmínek dokonce až 4 hodiny (Reddy et al. 2008).

Vědci se již zabývají i možností genetického ovlivnění vlastností kmenů *B. bassiana* dle vyhovujících abiotických faktorů použití (Zhang et al. 2009).

3.7 Rozšíření – geografie

B. bassiana je nejrozšířenější zástupce rodu entomopatogenních hub na světě. Najdeme ji jak v mírném pásu, tak i v tropických oblastech. MacLeod citovaný Zimmermannem (2007) uvádí, že *B. bassiana* byla izolována ze 63 různých druhů hmyzu v různých lokalitách po celé Kanadě. Dále se zmiňuje o přítomnosti kmenů i v plicních tkáních 14 hlodavců (Mancebo et al. 2009), nýbrž následné histologické vyšetření neprokázalo,

že houba vytváří patologické stavy či změny v tkáních.

Výskyt a rozšíření *B. bassiana* v různých zemích a oblastech nalezneme v publikaci Domsch et al. (1980). Zprávy o výskytu jsou známy z Turecka, Pobřeží slonoviny, rovníkové, západní, střední a jižní Afriky, Baham, Nepálu, východní Sibiře, Nového Zélandu a Japonska (další státy jsou uvedeny v tabulce 5.)

Vyskytuje se v půdách na různých stanovištích ať jsou to hory, vřesoviště, rašeliniště, savany, lesní a obdělávané půdy, písčité duny, pouštní půdy. Nalezneme ji v jeteli, v tekoucí vodě, odumřelé kůře, hnízdech volně žijících ptáků, jejich peří a trusu. *B. bassiana* byla také izolována na povrchu rostlin a dokonce i uvnitř pletiv (endofyty).

Byla dokonce odizolována i ze vzduchu, přestože není běžnou vzdušnou houbou, která by se zde vyskytovala. A to jak v lese, nemocnicích nebo vlhkých bytech alergických pacientů. V Norsku byl potvrzen i výskyt v povrchové pitné vodě, avšak nikoliv v podzemní (Zimmermann 2007).

Tabulka 5. Přirozený výskyt *B. bassiana* a *B. brogniartii* v půdě na odlišných místech různých států
(Zimmermann 2007).

| Místo nálezu | Výsledky | Odkaz |
|---|---|-------------------------|
| Kanada | 266 půdních vzorků z 86 míst, druhy s největší četností <i>B. bassiana</i> (187 izolátů) a <i>M. anisopliae</i> (357 izolátů) | Bidochka et. al. (1998) |
| Česká Republika, Jižní Čechy, orná půda | 146 půdních vzorků odizolováno 25 kmenů <i>B. bassiana</i> . | Landa et. al. (2002) |
| Finsko | Z 590 půdních vzorků byla <i>B. bassiana</i> izolována v 19,8%. | Vänninen (1996) |
| Německo | Ve 100 půdních vzorcích z různých lokalit a půdních typů byla <i>B. bassiana</i> přítomna v 22%. | Kleespies et al. (1989) |
| Itálie – Jižní část | Ve 188 půdních vzorcích nejběžnější entomopatogen <i>B. bassiana</i> . | Tarasco et al. (1997) |
| Japonsko | <i>B. bassiana</i> často izolována z lesních půd. | Shimazu et al. (2002) |
| Ostrov Macquaire | Ve 163 subantarktických půdních vzorcích jeden obsahoval <i>B. bassiana</i> . | Roddam a Rath (1997) |

| | | |
|---|---|-----------------------------------|
| Nepál | <i>B. bassiana</i> izolována z několika půdních vzorků | Dhoj a Keller (2003) |
| Nový Zéland | Výskyt <i>B. bassiana</i> byl vyšší na pastvě než v lese či orně půdě. | Barker a Barker (1998) |
| Norsko – Severní části | Výrazně vyšší výskyt entomopatogenních hub v půdě z polí na ekologických farmách než na farmách konvenčních. Nalezené druhy byly <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> a <i>T. cylindrosporum</i> . | Klingen et al. (2002) |
| Panama – tropický les | <i>B. bassiana</i> byla zjištěna v půdě blízko kolonií tropických mravenců. | Hughes et al. (2004) |
| Polsko – jablečné a švestkové sady | <i>B. bassiana</i> byla dominantní v půdě pod drnem v obou druzích sadů. | Sapieha-Waszkiewicz et al. (2003) |
| Polsko – chmelové plantáže a orná půda | <i>B. bassiana</i> ve všech půdních typech a oblastech. | Mietkiewski et al. (1996) |
| Polsko – hory Sudety | <i>B. bassiana</i> a <i>B. brongniartii</i> byly izolovány z různých oblastí. | Mietkiewski et al. (1994) |
| Polsko – různé půdní typy | <i>B. bassiana</i> byla dominantním druhem v blátě a spraši. | Tkaczuk a Mietkiewski (1996) |
| Španělsko - Alicante | <i>B. bassiana</i> se nejčastěji vyskytovala ve 21% v půdách z 61 stanovišť. | Asensio et al. (2003) |
| Švýcarsko | Analýza půdních vzorků z 82 polí : <i>B. brongniartii</i> se vyskytovala na půdních stanovištích kolonizovaných jejím hostitelem, chroustem obecným <i>Melolontha melolontha</i> , <i>B. bassiana</i> také izolována. | Keller et al. (2003) |
| USA | Půda z 105 stanovišť 21sadů: v 16. sadech převážně <i>B. Bassiana</i> a <i>M. anisopliae</i> . | Shapiro-Ilan et al. (2003) |

3.8 Sortiment hostitelů

B. bassiana je všudypřítomná entomopatogenní houba, která byla zjištěna a izolována z velkého počtu různých řádů hmyzu (Zimmermann 2007). MacLeod (1954) se zmiňuje o 60. druzích hmyzu, z nichž byly kmeny *Beauveria* izolovány. Leatherdale (1970) zapsal hostitele 106. druhů entomopatogenních hub známých z Velké Británie .

Současný sortiment hostitelů *B. bassiana* obsahuje sbírka ARSEF (viz kmeny). Na konci této práce uvádím možné příklady několika řádů a jejich zástupců, včetně jejich studií nebo aplikací, které již byly provedeny (viz kapitola 4.).

3.9 Rozpad a chování v životním prostředí

Studie o rozpadu a chování mikrobiálních agens jsou důležité vzhledem k jejich ekologické bezpečnosti. Například potenciální účinky na necílové organismy, včetně jejich rozptýlení v životním prostředí nebo případně možná znečištění podzemních vod (Zimmermann 2007).

Přenos vzduchem a perzistence

Konidie *B. bassiana* jsou suché, malých rozměrů a vytvářejí se v práškových seskupeních. Z uvedeného vyplývá, že tyto druhy konidií jsou snadno rozptýleny ve vzduchu. Proto je zřejmé, že šíření konidií je zajištěno pomocí hmyzu (Zimmermann 2007).

Existují i studie, v kterých se vědci snaží tuto možnost využít jako prostředek pro šíření biologické (mikrobiální) ochrany. Během pokusů v Kanadě a ve třech případech v Jordánsku byly hodnoceny faktory ovlivňující přenos *B. bassiana* včelami s využitím dávkovače inokula zabudovaného v úlu. Počty konidií, přenášené včelami a uvolněné z rozprašovače, se lišily v závislosti na typu použitého nosiče. Jako nosič byla použita mouka různých plodin, bramborový škrob a vločky z brambor. Nejvíce inokula získaly včely s nosičem kukuřičné mouky. Tato studie ukázala, že včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica* Pollmann) mají velký potenciál pro přenos *B. bassiana* v polních kulturách. To také otevírá další možnosti pro studium zavádění včel pro další mikrobiální činitele biologické ochrany (Al-Mazra'awi et. al 2007).

V další studii je využita možnost vektorování čmelákem (*Bombus impatiens* Cresson) a je zde studována optimální smrtelná dávka pro škůdce i přijatelná pro nosiče (Kapongo et al. 2008).

Životaschopnost spor *B. Bassiana* ve vzduchu je ovlivněna především abiotickými faktory (teplota, vlhkost a sluneční záření). Životnost suchých konidií na skleněných plochách se snižuje, jak uchováním při zvýšené teplotě od 8 do 25 °C, tak i působením světla. Vysoká skladovací vlhkost snižuje klíčivost dříve než při nízké vlhkosti. Nepochybně přirozené sluneční světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují přežití houbových spor ve vzduchu a na rostlinách (Zimmermann 2007).

Pohyblivost a perzistence ve vodě

Existují různé aspekty týkající se pohyblivosti a perzistence houbových spor ve vodě. Voda může být použita pro dlouhodobé uchovávání hub v laboratorních podmínkách, dále je zodpovědná za přesun - průsak spor do půdy, a také za rozptýl v prostředí dešťovými kapkami. Skladování houbových kultur ve vodě je snadná a levná metoda, kterou použil již v roce 1939 Castellani. (Zimmermann 2007) Boesewinkel (1976) byl schopen uchovávat 650 rostlinných patogenních a saprofytických hub úspěšně ve sterilní, destilované vodě při pokojové teplotě po dobu až sedmi let. Dešťové srážky hrají aktivní roli v šíření *B. Bassiana* z půdy na

povrch *O. nubilalis* (Zimmermann 2007).

Přesun a perzistence v půdě

Pohyblivost houbových spor v půdě je způsobeno především vodou (deštěm) a půdními členovci. Na rozdíl tomu perzistence závisí na několika abiotických (specifické vlastnosti půdy, teplota, vlhkost, voda a obsah agrochemikálií) a biotických faktorech (půdní mikroorganismy a půdní členovci).

Mobilita houbových spor v půdě má význam ze dvou různých důvodů. Prvním je efektivní biologická ochrana rostlin před půdními škůdci, kteří se většinou živí na kořenech hostitelských rostlin. V tomto případě je nutno houbu introdukovat v oblasti kořene, aby nastal kontakt s hostitelským hmyzem. A druhým důvodem jsou úvahy o vlivu na životní prostředí, kdy musí být prokázáno, že houba prosakuje pouze do kořenového prostoru a nedosahuje nebo nekontaminuje spodní vody (Zimmermann 2007). V této souvislosti Marshall a Bitton (1980) poukázali na to, že mikrobiální adheze má zásadní význam ve funkci a dále na vzájemné působení mezi mikroorganismy. Přichycení mikroorganismů na povrch zajišťuje, že nejsou vyloučeny z konkrétních ekosystémů. To znamená, že přichycení může být předpokladem pro vztah mezi mikro a makroorganismy.

Dále Mietkiewski et al. (1995) prokázali, že *B. Bassiana* byla nalezena od 0-5 cm do 20-25 cm hloubky v různých obhospodařovaných půdách. Otázkou však zůstává, jak hluboko mohou tyto houby prosakovat do půdy. První experimenty s ostatními druhy hub ukazují, že houbová spora a půdní typ může mít vliv na migraci.

Vertikální pohyb komerčně formulovaných konidií *B. bassiana* měřili Storey a Gardner (1987) ve čtyřech sloupcích (30,6 cm) prosetých půdních typů. Při aplikaci vodné suspenze konidií *B. bassiana* do půdy bylo nalezeno 90% z životaschopných kolonií tvořících jednotky v 15.2 cm půdního sloupce u dvou půdních typů. U dalších dvou půdních typů se přibližně 12,5% kolonií tvořících jednotky přemístily přes celý půdní sloupec 30.6 cm a byly nashromážděny v odpadních vodách. Když byl svislý pohyb formulovaných konidií *B. bassiana* sledován u nedotčených půdních typů, migrace byla výrazně nižší než u zkoumaných sloupců s prosátými půdami. Většina, tj. 94% z konidií zůstala v horních 5 cm u všech čtyř půdních profilů jak uvedli Storey a Gardner (1988) a dále Storey et al. (1989). Tato pozorování ukazují, že půdní typ i půdní porézní struktura (proseté proti nenarušené půdě) a pravděpodobně také tvar a velikost spor ovlivňují jejich pohyb v půdě. A nakonec pohyb v horizontálním i vertikálním směru je také umožněn chvostoskoky a žížalami.

Perzistence

V této souvislosti je jedním z hlavních aspektů půdní houbová stagnace. Watson a Ford (1972) uvádějí, že tento termín popisuje jev, kdy houbové životaschopné propagule, které nejsou pod vlivem endogenní či konstituční dormance, nekličí v nesterilní půdě při teplotě a vlhkosti příznivé pro klíčení. Případně růst hyf je opožděný nebo ukončený jinými podmínkami půdního prostředí, než jsou teplota a vlhkost.

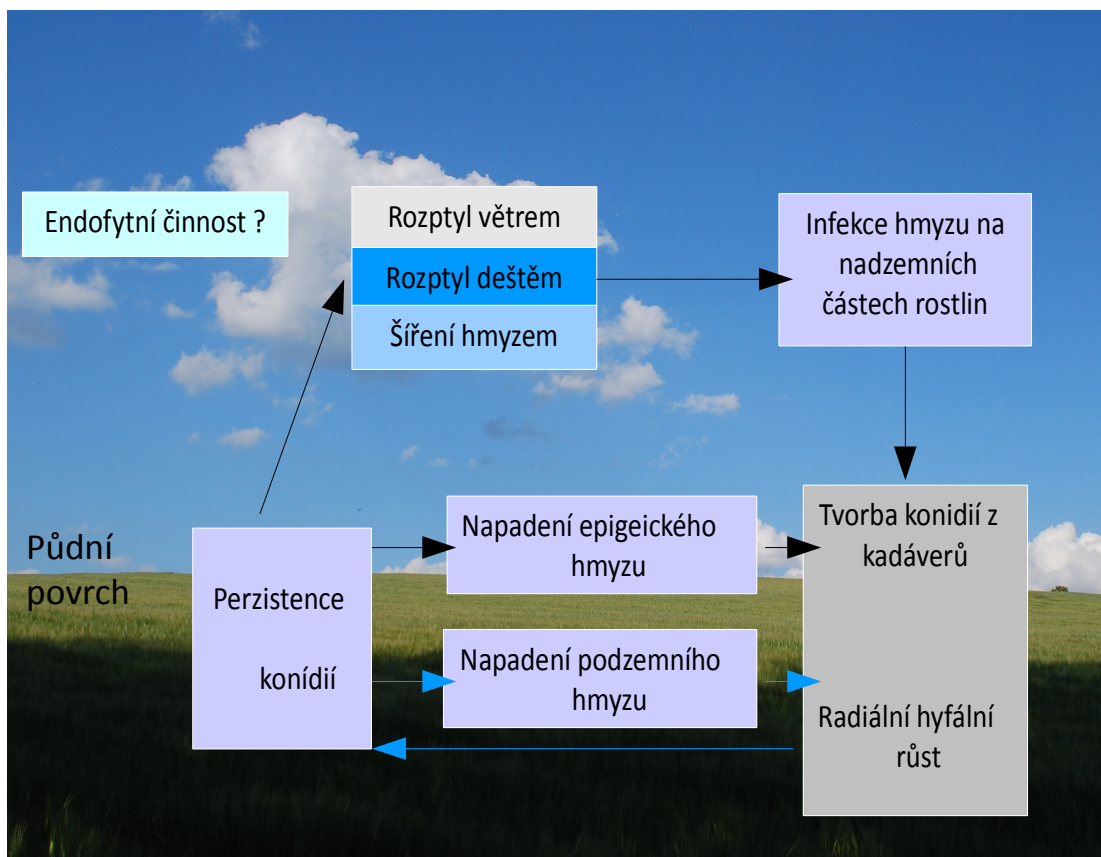
Rozšířené houbové stagnace v půdě našli a postulovali Dobbs a Hinson již v roce 1953. Půdní houbové stagnace byly určeny obecným a dynamickým jevem v přirozených půdách (Zimmermann 2007). První pokusy zaměřené na přežití *B. bassiana* v půdě provedli Huber (1958), později Wartenberg a Freund (1961). Autoři zjistili, že antibiotické mikroorganismy potlačují klíčení konidií *B. bassiana* v půdě. Došli k závěru, že *B. bassiana* je slabým saprofytem a hovoří o „konzervačním efektu“ způsobeném antibiotickými mikroorganismy, jako jsou aktinomycety. Podle Clerk (1969) někteří autoři uvádějí, že konidie *B. bassiana* podléhají fungistatickým účinkům v přírodních půdách. Nicméně povaha inhibitoru odpovědná za půdní houbovou stagnaci je stále neznámá, i když někteří autoři se domnívají, že inhibiční látky uvolněné půdními mikroorganismy hrají významnou roli v houbové stagnaci. Clerk (1969) zjistil, že konidie *B. bassiana* jsou schopny klíčit ve sterilizované půdě nebo půdě stimulované nějakým vnějším zdrojem živin. Z uvedeného vyvodil závěr, že přítomnost hmyzu v půdě by mohlo ovlivnit chování konidií. Dále pozoroval inhibici konidiálního klíčení a hyfálního růstu *B. bassiana* v nesterilizovaných vodných extraktech půdy. Extrakty z nejhlubších vrstev půdy byly méně inhibující, než extrakty z půd, překryté vrstvami bohatých na humus. Inhibice byla snížena autoklávováním a filtrováním extraktů, což naznačuje, že půdní mikroflóra má vliv na činnost *Beauveria spp.*

Müller-Kögler a Zimmermann (1980) dospěli ke zjištění, že *B. bassiana* uložená při 4°C ve sterilní půdě je životaschopná ještě po šesti letech. Dále se zabývali (1986) perzistencí konidií *B. bassiana* v uměle kontaminované zemině v laboratorních a polních podmínkách. Při zahájení experimentu v říjnu, se počet životaschopných konidií snížil z cca. 10^6g^{-1} v suché půdě na cca 10^4 až 10^3 po jednom roce v závislosti na hloubce půdy. Když byl experiment proveden v květnu, tak na začátku byla odpovídající hodnota 10^7 a po uplynutí jednoho roku přibližně 10^5g^{-1} konidií v suché půdě. Ztráta fungistatických mechanismů sterilizací předpokládal již McDowell et al. (1990). Groden a Lockwood (1991) doložili fungistatický vliv na *B. bassiana* ve dvou půdách z různých oblastí. Fungistatická úroveň se pohybovala v rozmezí let a narůstala se zvyšujícím se pH v půdě. Sterilizace půdy před biologickými zkouškami má za následek 10. - 1000. násobné snížení LC_{50} hodnoty smrtelného účinku prvního a třetího instaru *Elasmopalpus lignosellus*. Tyto nálezy jsou také podloženy Rosin et al. (1996), kteří zjistili, že půda obsahující čerstvý hnůj poškodila *B. bassiana*, zatímco vysoký podíl kompostovaného hnoje lze považovat za přínosný. Je zřejmé, že některé faktory v čerstvém hnoji snižují přežití *B. bassiana*.

Perzistence blastospor *B. bassiana* v půdě a jejich ochrana jílovitou vrstvou zkoumali Fargues et al. (1983). Nechráněné blastospor *B. bassiana* byly inaktivovány po 3 týdnech inkubace v půdě, zatímco blastospor potažené jílovitou vrstvou byly stále aktivní po dvou měsících při 20°C. Jílovitá vrstva je ochrana proti biologickému rozkladu houbových propagulí bakteriemi a prvky v půdě. Autoři uvádějí, že antagonisté zapojení do rozkladu blastospor, musí být považováni za důležitou součást environmentální reakce na hromadnou introdukcii houby pro biologickou ochranu. Storey et al. (1989) odhaduje, že perzistence aplikovaných konidií je asi 200 dnů, zatímco granulovaná formulace přetrvává déle. Studdert et al. (1990) studovali vztah mezi potenciálem půdní vody a teploty na přežití konidií *B.*

bassiana s jílovou povrchovou úpravou a bez ní ve dvou nesterilních půdách. Nejdelší průměrná hodnota poločasu rozpadu konidií byla 44,4 týdnů v písčité hlíně při 10. barech (0,0 baru = saturace) a 10°C. Jílovitá vrstva prodlužuje přežití konidií. Přežití bylo delší v nízké organické půdě v porovnání s vysokou organickou rašelinou. Výsledky naznačují, že přežití konidií je ovlivněno několika fyzikálními faktory a půdní mikroflórou. Sledování introdukovaných mikroorganismů v životním prostředí je nezbytné nejen pro rozvoj nových agens v biologické ochraně, ale také pro pochopení jejich interakce s životním prostředím, jejich ekologický dopad a posuzování bezpečnosti (Zimmermann 2007).

Obrázek 6. Životní cyklus anamorfy *B. bassiana* v severních oblastech mírného pásma dle současných znalostí ekologie hub
(Meyling a Eilenberg 2007; foto Pavlíček).



3.9.1 Vliv na necílové organismy

Výzkumy na přírodní výskyt *B. bassiana* prokázaly, že tato houba se široce vyskytuje v půdě, stejně tak i na hmyzu a ve vzduchu. To znamená, že existuje dlouhodobé evoluční soužití s jinými mikroorganismy, které zahrnují různé druhy interakcí. Z hlediska bezpečnosti je hlavním problémem to, že mikroorganismy, použité pro biologickou ochranu, by mohly ovlivnit nebo se přemístit na další necílové mikroorganismy. Agens biologické ochrany by měl přežít a být schopni vykonávat činnost biologické ochrany po aplikaci na rostliny nebo do půdy, ale neměl by narušovat rezidentní mikroflóru (Zimmermann 2007). Wang et al. (2004) sledovali osudy inundativně aplikovaných kmenů *B. bassiana* proti *Dendrolimus punctatus* v jihozápadní Číně. Původní a cizí kmeny byly znovu izolovány během jednoho roku a byla zjištěna převaha původních kmenů v místním prostředí. Což naznačuje, že je nové cizí kmeny nevytlačily. Kromě toho, výměna genetické informace u *B. bassiana* mezi původními a introdukovanými kmeny v oblasti, je nepravděpodobná, vzhledem k velkému počtu vegetativně kompatibilních skupin (Castrillo et al. 2004).

Existuje několik prací o interakci *Beauveria spp.* s hyperparasitickými, antagonistickými a především fytopatogenními houbami, které zmiňuje Zimmermann (2007).

Vliv na rostliny

B. bassiana je typický houbový entomopatogen obývající půdu. Nicméně, otázku možných fytopatogenních vedlejších účinků nebo jakýchkoliv jiných interakcí s rostlinami nelze opomenout. Za posledních 100 let byla *B. bassiana* použita pro biologickou ochranu u mnoha škůdců hospodářských plodin, troficky vázaných na listy nebo kořeny, kde bylo mnoho příležitostí k pozorování škodlivých účinků na rostliny (Zimmermann 2007).

Müller-Kögler při zkoumání literatury zabývající se touto problematikou v minulosti (1965) dospěl k zjištění, že vedlejší účinky nebo jiná jakákoliv fytopatogenní činnost na rostlinách není známa. Sami můžeme v současné době dospět k podobnému závěru.

Nedávný výzkum ukázal, že existují různé tri-trofické interakce mezi rostlinou, škůdcem neboli hmyzem troficky vázaným na rostlinu a entomopatogenní houbou napadající tyto herbivory. Elliot et al. (2000) vyslovili hypotézu, zdali rostliny nepoužívají entomopathogena jako osobního strážce proti herbivorům.

Nejzajímavější interakce jsou následující:

1. Rostliny mohou mít vliv na infekci entomopathogena;
2. Rostliny mohou mít vliv na perzistenci entomopathogena;
3. *B. bassiana* může přetrvávat jako endofyt uvnitř rostliny.

Existuje několik studií naznačujících, že rostlinné druhy mohou mít vliv na

infekčnost a perzistenci *B. bassiana*. Ramoska a Todd (1985) zjistili, že škůdci *Blissus leucopterus*, kteří byli krmeni čirokem a kukuřicí, jsou odolnější vůči *B. bassiana* než v případě škůdců *Blissus leucopterus* krmených ječmenem. Druh *Bemisia argentifolii* vyskytující se na bavlně, byla výrazně méně citlivá na houbu, než v případě melounu. Kouassi et al. (2003) zaznamenali na listech salátu a celeru, úmrtnost dospělců *Lygus lineolaris* 78-91%, sedm dní po ošetření. Poprawski et al. (2000) dospěli k zjištění, že nymfy molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) byly velmi citlivé k *B. bassiana* na okurkách, zatímco hmyz vyskytující se na rostlinách rajčete byl významně méně citlivý.

B. bassiana byla zaznamenána i jako endofyt některých rostlin, zvláště kukuřice, máku, kakaa a banánů (Zimmermann 2007).

Účinky na půdní organismy

B. bassiana je houba běžně vyskytující se v půdě s širokým sortimentem hostitelů, a proto je důležité sledovat interakce nebo účinky na další necílové bezobratlé organismy, obývající půdní prostředí. V roce 1964 Samšiňák zjistil, že roztoči sýrohub plísňový (*Tyrophagus putrescentiae*) a sladokaz moučný (*Acarus siro*) nejsou citliví k *B. bassiana*. *T. putrescentiae* je troficky vázán na živé i mrtvé larvy hmyzu infikované *Beauveria*. Tento druh roztoče je také schopen přenášet spory *B. bassiana* z infikovaných larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) na zdravé. Dále *B. bassiana* našli Visser et al. (1987) ve vysoké frekvenci a velkém počtu na *Onychiurus subtenis*. *Folsomia candida* není citlivý na *B. bassiana*. Prozatímni zjištění ukazují, že neexistují žádné nebo velmi nízké škodlivé účinky na testované, půdu obývající chvostoskoky a roztoče. Naproti tomu chvostoskoci působí jako vektor *B. bassiana* a tak mohou hrát důležitou roli pro šíření a přenos této houby v půdě (Zimmermann 2007).

Účinky na vodní organismy

Žádnou toxicitu nebo patogenitu nepozorovali Goettel a Jaronski (1997) u hrotnatky velké (*Daphnia magna*). GHA kmen nebyl také infekční na korýše (*Palaemonetes pugio*), po perkutánní a perorální kontaminaci. Beauvericin byl zjištěn jako vysoce toxický vůči larvám žábřonožky solné (*Artemia Salina*), buněčných liniím murén a může indukovat apoptózu. U *Americamysis bahia* byl beauvericin toxický při LC50 0,56 mg L⁻¹ (Zimmermann 2007).

Účinky na predátory, parazitoidy, včely, žížaly a jiné necílové členovce

Praktické využití těchto hub v různých systémech na ochranu plodin vyvolává otázku možných nežádoucích účinků na necílové organismy. To je zvláště důležité, pokud jsou komerční výrobky z těchto hub používány na rozsáhlých plochách, např. pro kontrolu kobylky na loukách nebo z evropských druhů u chrousta. Případně pokud je *B. bassiana* používána spolu s užitečným hmyzem ve sklenících. Obecně platí, že existuje rozdíl mezi fyziologickým hostitelským rozsahem a ekologickým

spektrům hostitelů. Fyziologické spektrum hostitelů ukazuje na řadu druhů hmyzu, které mohou být infikovány v laboratoři. Zatímco ekologické spektrum hostitelů, ukazuje na hmyz, který může být napaden v přírodě nebo v polních podmínkách. Necílový hmyz, infikovaný v laboratorních podmínkách, nemusí nutně být napaden v přírodě. Toto téma bylo také předmětem podrobné diskuse Hajek a Goettel v roce 2000 a o tři roky později Jaronski et al., jak uvádí Zimmermann (2007).

Je dobře známo, že *B. bassiana* má širokou řadu hostitelů, vyskytující se na několika stech druhů členovců, avšak hostitelská specifita je skutečně specificky kmenová vlastnost (Zimmermann 2007). Například *B. bassiana* izolovaná z brouka (*Olla v-nigrum*), byla patogenní na dospělce *O. v-nigrum*, ale ne na asijské dospělce brouka sluněčka východního (*Harmonia axyridis*) (Cottrell a Shapiro-Ilan 2003). GHA kmen *B. bassiana* nebyl významně patogenní buď k *O. V-nigrum* nebo *H. Axyridis* (Zimmermann 2007).

Existuje mnoho studií o vlivu *B. bassiana* na užitečné a jiné necílové organismy. Většina studií proběhla v laboratoři a jen několik v polních podmínkách. Jednu z prvních souhrnných zpráv sepsali Goettel et al. (1990), v které uvedli účinky *B. bassiana* na necílové bezobratlé organismy, jako je *B. mori*, predátory, parazitoidi, včely a jiné opylovače. Dále obecné informace shrnuli Goettel et al. (1997, 2001) a Vestergaard et al. (2003), kteří došli k závěru, že i přes širokou řadu hostitelů *B. bassiana*, dosavadní zjištění naznačují, že tato houba může být použita s minimálním dopadem na necílové organismy. Zejména vhodným výběrem izolátu a uvážení vhodných časoprostorových faktorů. Vestergaard et al. (2003) neodhalili dle údajů z terénních šetření žádné známky možných nepříznivých účinků na obratlovce, včely, užitečný hmyz, žížaly a rostliny. Příklady účinků na užitečné a necílové organismy *B. bassiana* (kmeny a formulace) uvádí ve své práci Zimmermann (2007).

Vliv na obratlovce (ryby, obojživelníci, plazi a ptáci)

Možné vedlejší účinky entomopatogenních hub na obratlovcích a lidech byly shrnuty Müller-Kögler (1967) před více než 40. lety. Dnes jsou podrobné bezpečnostní testy obratlovců zahrnuty v ceně nákladů registračního procesu komerčních produktů *Beauveria* a byly prováděny s několika izoláty *B. bassiana*. Obecně platí, že *B. bassiana* není toxická a infekční pro obratlovce, nicméně v několika případech byla infekce zaznamenána (Zimmermann 2007).

Ryby

Zkoušky bezpečnosti na ryby pro *B. bassiana* u izolátu GHA produktu Naturalis-La provedli Goettel a Jaronski (1997). Nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky ani deformace v embryích a plůdcích ryb jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) po použití kmenu GHA. Na rozdíl od tohoto případu, u embryí a plůdků vnitrozemské ryby (*Menidia beryllina*), vystavených účinkům konidiím *B. bassiana*, byly zjištěny různé nežádoucí účinky (Genthner a Middaugh 1992).

Obojživelníci

Donovan-Peluso et al. (1980) nezjistili při pokusech na skokana levhartího (*Rana pipiens*), krmeného suspenzí *B. bassiana*, žádné vedlejší účinky.

Plazi

Infekce způsobená *B. bassiana* byla pozorována v zajetí u aligátora amerického (*American alligator*) (Fromtling et al. 1979) a dále byla *B. bassiana* přítomna při vzniku plicního onemocnění u želv v zajetí (Georg et al. 1962; Gonzales-Cabo 1995). Teplotní stres u plazů chovaných v zajetí, může vysvětlit jejich citlivost na houby (Zimmermann 2007).

Ptáci

Ptáci mohou být vystaveni účinkům entomopatogenních hub přímo, jelikož konzumují spory společně s potravou a nebo konzumací hmyzu infikovaného houbou. Obavy z možných vedlejších účinků u ptáků jsou zmiňovány již více než 100 let (Zimmermann 2007). Při pokusech u mladých *Falco sparvensis* a bažanta obecného (*Phasianus colchicus*) Althouse et al. (1997) neprokázali žádné vedlejší účinky. Copping (2004) uvádí, že toxicita pro křepelky je u *B. bassiana* kmene ATCC 74040 orálně (sondou), LD50 (5 dní) 2000 mg kg⁻¹ denně. Jiná studie byla prováděna na kuru domácím (*Gallus domesticus*), při které byly vyhodnocovány vlivy na jeho krmení, chování, histologii, zažívací systém a anatomii, za použití kmenu *B. bassiana* Unioeste 4. Tento kmen byl přidáván do krmiva a podáván orálně po dobu 28 dnů. Nebyly pozorovány žádné negativní vlivy, ani tkáně nevykazovaly jakékoli změny, což poskytuje pádné důvody pro bezpečnost *B. bassiana* pro necílové organismy jako je *G. domesticus* (Haas-Costa et al. 2010).

Účinky na savce a lidské zdraví

Bezpečnost entomopatogenních hub, zejména *B. bassiana*, na savce a člověka, je hlavním zájmem a musí být považován za jedno z hlavních potenciálních rizik používání hub v biologické ochraně. Proto je neobvyklé, že alergická, patogenní nebo toxická rizika pro člověka a savce nebyla zdůrazněna v mnoha pojednáních (Steinhaus 1957; Müller-Kögler 1967; Ignoffo 1973, Austwick 1980; Burges 1981; Saik et al. 1990, Siegel & Shadduck 1990; Goettel et al. 1997, 2001; Vestergaard et al. 2003) (Zimmermann 2007). Nedávno se objevily dokumenty o přidávání *B. Bassiana* do lidské stravy v Jižní Koreji, což dokládá zcela nový aspekt této houby. Yoon et al. (2003) uvádí, že výtažky ze synnemat z *B. bassiana*, měly antikoagulační a na imunitní systém modulační účinky, které by mohly poskytnout užitečné fyziologické účinky pro člověka. V další studii Yoon et al. (2003) zjistili, že synnemata *B. Bassiana* by mohla být používána jako přísada do pšeničné mouky pro přípravu nudlí a chleba.

Alergie

Alergie je způsobena určitou bílkovinou a antigeny polysacharidu, takže všechny typy mikroorganismů jsou potenciálně alergizující pro člověka. Obecně se může vyskytnout celá řada alergických reakcí na různé houby (Zimmermann 2007). Podle Nolard (2004), 5-15% populace trpící respirační alergií, byla senzitivní na jednu nebo několik forem. Expozice hub souvisejících antigenů může vyvolat senzibilizaci a pozdější expozice mohou vyvolat reakce jako respirační obtíže, slzení a zarudnutí. Hlavní trasou je respirační senzibilizace. Alergie týkající se bezpečnosti biopesticidů jsou umístěny v typu I a III. Typ I. alergie je okamžitá reakce na relativně malé množství inhalovaného alergenu vedoucí k rýmě, těžkému astmatu nebo slzení. Typ III. alergie je opožděná reakce 4-8 h po expozici, relativně silná inhalační dávka alergenu, způsobující horečku, bolesti hlavy a slabost. Základy alergie způsobované houbami sepsaly Gumowski et al. (1991). Nolard (2004) rozlišuje mezi „alergií vyskytující se ve venkovním prostředí“ , „alergií vyskytující se ve vnitřním prostředí“ a alergiemi vyskytujícími se v pracovním prostředí. V případě *B. bassiana*, alergie nebo alergické reakce mohou nastat u pracovníků ve výrobních zařízeních, kteří jsou vystaveni opakovaně vysokým koncentracím spor, a pokud se houby uvolňují do ovzduší v inhalovatelné formě, po aplikaci z důvodu biologické ochrany. Při průzkumu hub ze sputum, prováděném u pacientů hospitalizovaných s chronickou plicní nemocí, bylo zjištěno více než 15% z více jak 3000 sputum vzorků, obsahujících jednu nebo více kolonií *B. bassiana* (Pore et al. 1970). Ze 103 vzorků sputa od mužských telefonních pracovníků, pět obsahovalo *Beauveria* sp. (Comstock et al. 1974). Gumowski et al. (1991) uvedli asi 100 houbových rodů spojených s alergií, avšak *B. bassiana* není zmiňována. Nicméně, existují i dokumenty, které naznačují, že *B. bassiana* může způsobovat alergie nebo alergické reakce. Müller-Kögler (1967) uvádí několik případů alergických reakcí u lidí způsobené těmito druhy, a to zejména v průběhu výrobního procesu. Obecně vzato se vyskytovaly příznaky jako bolesti hlavy, slabost a horečka. Dr. Samšíňáková (Praha) a její asistentka v roce 1965 zaznamenaly vysokou horečku a reakci podobnou anafylaktickému šoku při výrobě práškové formulace spor *B. bassiana*. Nicméně, když pracovala se suchými a prašnými blastosporami *B. bassiana*, tak takovéto reakce nepozorovala. Tato pozorování potvrzují, že houbové konidie obsahují více faktorů způsobujících alergenitu ve srovnání s hyfami a ponořenou kulturou produkovaných blastospor. Alergické reakce u pracovníků byly zaznamenány také Mel'nikova a Murza (1980). Na rozdíl od těchto poznatků, žádné incidenty lidské zvýšené senzitivity, nebyly zjištěny u pracovníků společnosti Mycotech v průběhu mnoha let masové produkce houby. Některé případné inhalace a údaje o dráždivosti *B. bassiana* uvedl Copping (2004). Pro kmen ATCC 74040 inhalace LC50 krysy $1,2 \times 10^8$ CFU/zvíře. Případně dráždí oči, kůži a dýchací cesty. Tyto výzkumy a nálezy ukazují, že konidie *B. bassiana* mají alergenní potenciál. V molekulárních studiích *B. bassiana* surových extraktů, mají četné IgE reaktivní proteiny, z nichž některé jsou cross-reaktivní mezi alergeny jiných hub (Westwood et al. 2005). Silně reaktivní potenciál *B. bassiana* specifického alergenu (35 kDa) byl identifikován a potvrzen intradermální kožními testy (Zimmermann 2007).

Patogenita - toxicita

Kromě alergie je jedním z hlavních problémů v oblasti užívání entomopatogenních hub riziko infekce na člověka nebo savce. Na druhou stranu, larvy *B. mori* napadené houbou *B. bassiana*, byly využívány jako lék stovky let v čínské medicíně (Müller-Kögler 1965).

Druhy *Beauveria* byly vzácně identifikovány jako zástupci lidských infekcí. V přehledu o výskytu méně častých, avšak lékařsky důležitých houbových patogenů na příjemce. Nicméně se *B. bassiana* v těchto přehledech neobjevuje, i když existují některé případy, kdy byla hlášena jako příčina mykotické keratitidy u člověka a na rohovce králíka, jak zmiňuje Zimmermann (2007). V nedávné době Gürcan et al. (2006) zdokumentovali první případ empyému způsobený *B. bassiana* u muže ve věku 51 let v Turecku. Autoři se domnívají, že dlouhodobý možný průnik vzduchu po operaci plic byl hlavní příčinou nákazy. Pacient se zotavil bez antimykotické léčby. Izolovaný kmen *B. bassiana* se nevyvíjel při 37°C. Při testech na kryších a dalších obratlovcích nebyla zjištěna žádná toxicita. Přehledy a hodnocení o toxicitě - patogenitě jsou dostupné na stránkách EPA - Environmental Protection Agency – Federální vládní agentura USA pro ochranu životního prostředí (Anonym 2012) (Zimmermann 2007).

Bezpečnost obecně

Ať už se jedná o klasickou biologickou ochranu nebo augmentativní existuje tu stejný problém, a to jestli je subjekt mikrobiálního přirozeného nepřítele používán v ochraně endemický nebo ne. Například mnoho druhů hub je klasifikováno na základě morfologických měřítek, jež musí být uváděna při celosvětové distribuci. Nicméně studie užívající molekulární nástroje ukazují, že ve skutečnosti tyto jednotlivé morfologie druhů se mohou skládat ze skupin geneticky odlišných „kryptických“ nebo skrytých druhů s vlastní charakteristikou a různým geografickým rozdělením. Jestliže byly aplikovány druhy hub považované za mikrobiální biopesticid, mohla být šance nevědomé introdukce nepůvodních, „kryptických“ druhů do nové země. Je zřejmá role pro výzkum rozmanitosti a biogeografie mikrobiálních přirozených nepřátel pro podporu životního prostředí vyhodnocením rizik mikrobiálních biopesticidů. Například molekulární fylogenetická studie entomopatogenní houby *B. bassiana* ukázala, že kmen houby izolovaný v USA a nyní užívaný v komerčním prodeji biopesticidů v USA a Evropě, je člen kryptických druhů, který je původní v Severní Americe a Evropě. Takovéto základní studie na mikrobiální fylogenezi budou hrát důležitou roli v regulaci mikrobiálních biopesticidů (Bailey et al. 2011).

4. Příklady použití

Brouci (Coleoptera)

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

V prvním případě byla *B. bassiana* na tomto hostiteli využita v kombinaci s pěti insekticidy při testech in vitro, při kterých nebyla prokázána inhibice entomopatogenní houby, proto byl tento způsob ochrany rostlin použit při polních klecových zkouškách. Zde však tato kombinace způsobila úhyn obecně vyšší než způsobený jednotlivými prostředky ochrany rostlin, avšak interakce synergické nebylo patrné. Tento výsledek naznačuje, že tato kombinace je aditivní (Anderson et al. 1989).

Další možná aplikace je společná synchronní infekce *L. decemlineata* s *Bacillus thuringiensis* ssp. entomopatogenní bakterií Morrisoni Bonifoi & de Barjak var. Tenebrionis Krieg et al. a hyphomycetou *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin nebo *B. bassiana* (Bals.) Vuillemin. Kombinace entomopatogenní bakterie s *B. bassiana* vede k rychlé smrti 95-100% larev. Bakterie zastavují výživu hmyzu, zatímco houbové spory usmrcují oslabené larvy. Synergický efekt dvou patogenů je zaznamenán na poměrně nízké hodnotě titru hyphomycety ($1-5 \times 10^6$ konidií/ml) a je evidentní v dynamice úmrtnosti všech larválních věkových kategorií. Tyto bakteriální a houbové patogeny nevykazují žádný antagonismus na umělých živných médiích. Tento mikrobiální komplex je vysoce účinný v přirozených podmínkách, kdy dosahuje larvální úmrtnost 80-90% a není provedena defoliace rostlin (Kryukov et al. 2009). Samostatné využití zde neuvádím, jelikož výsledky byly velmi proměnlivé a listové aplikace neposkytly komerčně přijatelnou regulaci (Kaufman et al. 2005)

Bázlivec kukuřičný (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte)

Bázlivec kukuřičný je nejvíce destruktivní škůdce kukuřice (*Zea mays* L.) v severní Americe a úspěšně se rozšířil i do střední Evropy počátkem 90. let minulého století. Proto se Toepfer a Kuhlmann (2004) rozhodli určit výskyt původních přirozených nepřátel *D. v. virgifera* v Evropě. Tato práce shrnuje tři roky polních, terénních průzkumů prováděných v Maďarsku, Jugoslávii a Chorvatsku. Všechna vývojová stadia byla zkoumána z hlediska výskytu parazitoidů, hlístic a houbových patogenů. Lze usoudit z výsledků průzkumu, že původní přirození nepřátelé nenapadají všechna vývojová stadia *D. v. virgifera* v Evropě. Výjimkou je výskyt houby *B. bassiana* (Bals.) Vuill. a *M. anisopliae* (Metschn.) Sorok. napadající dospělce *D. v. virgifera* při extrémně nízké úrovni (1%). Nicméně žádný jiný entomopatogenní houbový patogen, entomopatogenní hlístice nebo parazitoid nebyl nalezen. V severní a střední Americe se vyskytuje několik přirozených nepřátel napadajících *D. v. virgifera*, nicméně v Evropě je zřejmé, že původní přirozené nepřátelé nejsou přizpůsobeni k vysoké hustotě populace invazního druhu.

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* Linnaeus)

V laboratorních podmínkách a terénních klecích byl zkoumán horizontální přenos entomopatogenní houby *B. Bassiana* (Boverol †) mezi dospělci *Ips typographus*. V laboratorním experimentu byl pozorován přenos konidií mezi brouky ošetřenými biopreparátem a neošetřenými, v různých poměrech od 1:1 až 1:20 (úmrtnost od 75% - do 96% dle poměru a času). V druhém laboratorním experimentu, byla zkoumána účinnost *B. bassiana* po přenosu z kontaminovaných na zdravé brouky po dobu 5 dnů.

Dále následovaly dva pokusy v polních klecích ve smrkovém porostu, kde byl prokázán horizontální přenos *B. bassiana* (Boverol†) mezi brouky. V prvním byl přenos zkoumán po následné introdukci inokulovaných brouků *B. Bassiana* do populace neinokulovaných. Významné snížení bylo pozorováno v délce mateřských chodeb a počtů larev a kulek. Ve druhém polním klecovém experimentu, byly nalákány přírodní populace do letové klece pomocí feromonové pasti, a ta byla ošetřena *B. bassiana* nebo neošetřena každý druhý den. V tomto případě došlo k významnému snížení v počtu otvorů, délce mateřských chodeb a nebyly nalezeny žádná další vývojová stádia pod kůrou smrkových kmenů. Z toho vyplývá že, *B. bassiana* má potenciál pro kontrolu *I. typographus*, avšak je nutné pokračovat v dalších polních pokusech a ověřit její účinnost (Kreutz et al. 2004). I v České republice byly prováděny výzkumy u tohoto škůdce (Landa et al. 2001).

Obrázek 7 - 8. Způsoby aplikace biopreparátu *B. bassiana* v lesním porostu
(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).





Obrázek 9. *Ips typographus* porostlý houbou *B. bassiana* na stromové kůře
(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská
univerzita v Českých Budějovicích).



Kožojed šedý (*Dermestes maculatus* De Geer)

Tento brouk je nejen strávník organického materiálu a mršin, nýbrž i škůdce drůbežáren, muzeí, kultur *B. mori*, dokonce i skladů potravin. *B. bassiana* a další entomopatogenní houby byly testovány na účinnost proti larvám *D. maculatus*, na různém povrchu jako beton, plast, kůže a dřevo. Negativní vliv na účinnost mělo pouze dřevo a nejvíce efektivní druh byla *B. bassiana*. Nejvyšší mortalita byla při nejnižší vlhkosti. Výsledky ukazují, že *B. bassiana*, může být užitečná pro ochranu před tímto hostitelem při aplikaci za nízkých dávek na povrchy, které nemají vliv na životaschopnost konidií (Lord 2011).

Dvoukřídlí (Diptera)

Moucha domácí (*Musca domestica* Linnaeus)

Aplikace komerčně vyráběného přípravku *B. bassiana* balEnce, byl porovnán s ošetřením pyrethrinu pro ochranu proti dospělým *M. domestica* v New Yorku v zařízeních klecového chovu nosnic. Rozvoj rezistence vůči pesticidům u tohoto škůdce zvýšil zájem producentů využívat alternativních metod, proto se Kaufman et al. rozhodli použít tento přípravek na bázi *B. bassiana*. Tato integrovaná ochrana zahrnovala zavedení parazitoidů, napadajících stádia kukly blanokřídilých na *M. domestica*, které bylo použito ve všech zařízeních. Populace dospělých much byly nižší v zařízeních ošetřených postřikem *B. bassiana* a v období po něm, což bylo zaznamenáno na bodových kartách. Počet larev *Musca domestica* se obnovil v zařízeních ošetřených *B. Bassiana*, ve kterém byla současně méně než polovina z nich ošetřena pyrethrinem. Úroveň hladiny parazitismu kukel byla nízká, ale podobná v obou ošetřovaných způsobech. Počty dospělců a larev *Carcinops pumilio*, získaných ze zařízení ošetřovaných *B. bassiana* bylo o 43 a 66% vyšší než ze zařízení ošetřovaných pyrethrinem (Kaufman et al. 2005).

Polokřídlí (Hemiptera)

Molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood)

U tohoto škůdce bylo zkoumáno využití přenosu biopreparátu *B. bassiana* (BotaniGard 22WP v různých dávkách) přes vektor hmyzu (čmeláka – *Bombus impatiens*) ve skleníkových klecích na skleníkové plodině rajčete. Bylo zjištěno, že malá dávka nezpůsobí nákazu a velká může způsobit úhyn nosiče (*B. impatiens*). Optimální dávka byla zjištěna střední a to 6.24×10^{10} inokula biopreparátu (Kapongo et al. 2008).

Jiný pokus byl prováděn v kombinaci s prostředky biologické ochrany parazitoida a predátora. Výzkumníci se zabývali otázkou na poli biologické ochrany, zdali nedochází k vzájemnému rušení mezi biologickými činiteli, které následně mohou narušit ochranu rostlin proti škůdcům. Studie zkoumala výsledek interakce mezi entomopathogenem *B. bassiana* s predátorem *Dicyphus hesperus* a

parazitoidem *Encarsia formosa*, stejně jako jejich vliv na ochranu před *T. vaporariorum* na skleníkovou plodinu rajčete. V experimentálních sklenicích *T. vaporariorum* byly zavedeny populace predátora a parazitoida. Po více než 27. dní byly na rostliny rajčete aplikovány tři postřiky založené na produktu *B. bassiana* BotaniGard (odst. $5,13 \times 10^3$ konidií/mm²) nebo vody (z důvodu kontroly). Studie naznačuje, že aplikace *B. bassiana* pro krátkodobou biologickou ochranu *T. vaporariorum* je v souladu se současným použitím *E. Formosa* a *D. Hesperus* na skleníkovou plodinu rajčete (Labbé et al. 2009)

Mšice broskvoňová (*Myzus persicae* Sulzer)

I zde na tomto škůdci byl prováděn stejný pokus přes vektor hmyzem (*B. impatiens*) a přenos biopreparátu *B. bassiana*, avšak s využitím na skleníkové plodině sladké papriky s podobnými výsledky (Kapongo et al. 2008).

Jiný pokus byl prováděn v laboratorních podmínkách v kombinaci s parazitoidem *Aphidius matricariae* a tímto hostitelem v interakci s *B. bassiana*. Nejprve byla infikována dvakrát LC95 *B. bassiana* pro třetí instar *M. persicae* (2×10^8 konidií/ml). Následně, v různých časových intervalech byly mšice ponechány 1-denním samičkám parazitoida k naklazení po dobu 24 hodin. Počet vytvořených mumií samičkami *A. matricariae* a procentní vznik F1 generace mšic se výrazně lišily v závislosti na časovém intervalu mezi aplikací houby a expozicí u parazitoida. Rovněž byl studován vliv *B. bassiana* na vývoj parazitoida. Při první expozici hostitele parazitoidem po dobu 24 hodin a následnou aplikací *B. bassiana* nebyly zjištěny žádné výrazně odlišné účinky *B. bassiana* na *A. matricariae*. Počet produkovaných mumií samicemi parazitoida *A. matricariae* se pohybovaly od 11,8 do 24,8. Produkce byla výrazně odlišná, pokud byly mšice nejprve vystaveny parazitoidům a potom ošetřeny *B. bassiana* (24, 48,72 a 96 h po expozici). Při správném načasování je možno využít *A. matricariae* a *B. bassiana* v kombinaci při biologické ochraně proti mšici broskvoňové (Rashki et al. 2009).

Blanokřídlí (*Hymenoptera*)

Pilatka třešňová (*Caliroa cerasi* Linnaeus)

Tento významný destruktivní škůdce višně (*Prunus cerasus*) v Turecku je rozšířen i na další příbuzné druhy. Aslantas et al. hodnotili potenciál entomopatogenních hub pro ochranu proti *C. Cerasi*. Zkoumali účinky expozičních metod a konidiálních koncentrací (1×10^6 , $1,5 \times 10^6$, 1×10^7 a $1,5 \times 10^7$ konidií/ml) na vyspělé larvy *C. Cerasi* napadené *B. bassiana* v laboratorních podmínkách. Konidiální suspenze *B. bassiana* byla aplikována rozstřikem přímo na larvy a také na listy, což mělo za následek 100% úmrtnost během 2,90 a 2,77 dnů. Medián letální doby (LT50) a dny nejvyšší úmrtnosti byly za použití koncentrace konidií 1.0×10^7 jak pro přímý postřik, tak i listovou expozici. Tato studie naznačuje, že *B. bassiana* má dobrý potenciál pro ochranu višně před *C. Cerasi* (Aslantas et al. 2008)

Motýli (*Lepidoptera*)

Zavíječ voskový (*Galleria mellonella* Linnaeus)

B. bassiana vděčí za svou entomopatogenní činnost sekrecí dvou degradujícím enzymům kutikuly proteáze a chitináze. Proto byla biosyntéza těchto enzymů u indického kmene *B. bassiana* studována během růstu za různých podmínek fermentace. Následně proběhly biologické zkoušky *B. bassiana* proti zavíječi voskovému, *Galleria mellonella* (Linnaeus) larev s různými koncentracemi konidií (10^3 - 10^8 /ml). U těchto dávek způsobujících úmrtnost 43.33% se zvýšila na 86.67% za 144 hodin po aplikaci. Studie naznačuje, že optimální jsou střední, kultivační podmínky, které indukují optimální úroveň enzymů, degradujících kutikulu spojených s tvorbou spor. Tyto závěry tak mohou tvořit kritérium pro rozvoj nízkonákladových, výrobních, vysokokapacitních technologií biopesticidů na bázi *B. bassiana* (Kaur et al. 2010)

Obrázek 10. Používané biopreparáty na bázi *B. bassiana* a jejich balení v zahraničí
(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).



Obrázek 11. Štítek jednoho z biopreparátů
(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).

BotaniGard® 22WP
WETTABLE POWDER MYCOINSECTICIDE

Use in controlling Whitefly, Aphids, Thrips, Psyllids, Weevils and Scalebugs in Ornamentals and Vegetables, Indoor/Outdoor Nursery, Greenhouse, Shadehouse, Commercial Landscape, Interiorscape and Turf.

| | |
|--|---------|
| Active Ingredient: <i>Beauveria bassiana</i> Strain GHA | 22.0%* |
| Inert Ingredients: | 78.0%** |
| Total: | 100.0% |

*Based on the weight estimate of 4.78×10^{-12} grams per spore.
**Contains petroleum distillates.
BotaniGard 22WP contains 2×10^{13} viable spores per pound.

KEEP OUT OF THE REACH OF CHILDREN
CAUTION

Store between 50°F and 85°F
See additional precautionary statements and first aid statements in attached booklet.

Obrázek 12. Prášková formulace biopreparátu *B. Bassiana*
(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).



Obrázek 13. Emulgovatelná suspenze biopreparátu *B. bassiana* v Petriho misce
(Foto archiv Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích).



5. Závěr

Na základě studia vědeckých podkladů, jsem dospěl k názoru, že entomopatogenní houba *B. bassiana* je na poli biologické ochrany obdivuhodný, ale v České republice doposud podceňovaný fenomén.

Vyskytuje se přirozeně na celém světě a její kmeny je možno využívat proti hospodářským škůdcům patřícím do různých řádů hmyzu, při znalosti specifických podmínek. Při vhodné aplikaci je *B. bassiana* pro životní prostředí nezávadná a biodegradovatelná. V případě využívání endemických kmenů *B. bassiana*, nehrozí možné ohrožení původních místních populací hub. Kultivace biopreparátů na bázi *B. bassiana* se jeví jako běžně dostupná a její uchování nevyžaduje žádné zvláštní nároky. Aplikace biopreparátů *B. bassiana* se může provádět běžnými prostředky pro ochranu rostlin jakou využívá konveční zemědělství. Je možno ji kombinovat s dalšími prostředky biologické ochrany. Pro zavedení biopreparátů na bázi *B. bassiana* do biologické ochrany rostlin v České republice hovoří velké množství úspěšně provedených plošných aplikací na škůdce známých ze zahraničí.

Abychom mohli tohoto entomopatogena v biologické ochraně rostlin před škodlivými činiteli využívat, je důležitá i registrace přípravku. V tuto chvíli není žádný prostředek na bázi *B. bassiana* v České republice povolen. S registrací biopreparátu samozřejmě souvisí i ekonomická stránka produktu. Aby měla nějaká společnost nebo firma zájem tento produkt registrovat, musí být komerčně úspěšný. Tato úspěšnost závisí, také velkou měrou na informovanosti konečného spotřebitele – uživatele. Proto je důležité, že v České republice existují společnosti jako Mycolab s.r.o., zabývající se poradenstvím v oblasti integrované ochrany rostlin. Pro zvýšení informovanosti o možnosti využívání biopreparátů na bázi *B. bassiana* v zemědělství a jeho následné plošné rozšíření, bude dle mého názoru nutná podpora ze strany státu. Jako příklad státní podpory v této oblasti může být USA, kde je založený fond na podporu při registraci těchto přípravků. Podpora těchto produktů je důležitá i z pohledu k trvalé udržitelnosti společnosti.

V současné době existuje mnoho škůdců rezistentních vůči chemickým pesticidům. Proto je nutné hledat jiná řešení v oblasti ochrany rostlin před škodlivými činiteli a využívat všech dostupných možností a informací. Z pohledu ochrany rostlin před škodlivými činiteli se použití biopreparátů na bázi *B. bassiana* jeví jako velmi vhodné.

6. Seznam citované literatury :

- Al-Mazra'awi M.S., Kevan P. G., Shipp L. 2007: Development of *Beauveria bassiana* dry formulation for vectoring by honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae) to the flowers of crops for pest control. *Biocontrol Science & Technology*, 17: 733-741.
- Althouse C.M., Petersen B.E., McEwen L.C. 1997: Effects on young American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to *Beauveria bassiana* bioinsecticide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 507-512.
- Anderson T. E., Hajek A. E., Roberts D. W., Priesler H. K., Robertson J. L. 1989: Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) - Effects of Combinations of *Beauveria bassiana* with Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 82: 83-89.
- Anonym 2005: Sběrka entomopatogenních houbových kultur ARSEF.
<http://www.bio-nica.info/biblioteca/Humber2005Beauveria.pdf>
- Anonym 2009: Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009 /128/ ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů.
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.douri=OJ:L:2009:309:0071:0086:CS:PDF>
- Anonym 2012: <http://cs.wikipedia.org/wiki/EPA>
- Aslantas R., Eken C., Hayat R. 2008: *Beauveria bassiana* pathogenicity to the cherry slugworm, *Caliroa cerasi* (Hymenoptera: Tenthredinidae) larvae. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24: 119-122.
- Bailey A., David C., Wyn P. G., Greaves J., Prince G. 2010: *Biopesticides - Pest Management and Regulation*. CABI first edition Wallingford, ISBN 978-1-84593-559-7, 232 p.
- Boesewinkel H.J. 1976: Storage of fungal cultures in water. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 183-185.
- Březíková M. 2007: Černopáska bavlníková *Heliothis* (*Helicoverpa*) *armigera* (Hübner, 1808). eagri.cz/public/web/file/58507/Cernopaska_bavlnikova.pdf
Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou.

- Castrillo L.A., Griggs M.H., Vandenberg J.D. 2004: Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* : likelihood of recombination in the field. *Journal of Invertebrate Pathology*, 86: 26-37.
- Clerk G.C., Madelin M.F. 1965: The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 48: 193-209.
- Clerk G.C. 1969: Influence of soil extracts on the germination of conidia of the fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13: 120-124.
- Comstock G.W., Palmer C.E., Stone R.W., Goodman N.L. 1974: Fungi in the sputum of normal men. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 54:55-62.
- Copping L.G., (ed.) 2004. *The manual of biocontrol agents*. 3rd ed. Alton: British Crop Protection Council, p. 702.
- Cottrell TE, Shapiro-Ilan DI. 2003. Susceptibility of native and an exotic lady beetle (Coleoptera:Coccinellidae) to *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 137-144.
- De Hoog G.S. 1972: The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology*, 1: 1- 41.
- Dirlbeková O., Nesrsta M., Dirlbek J., Jedlička M. 1991: Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin (I. *Deuteromycetes*, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill). Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, 52s.
- Domsch KH, GamsW, Anderson T.H. 1980: *Compendium of soil fungi*. London, Academic Press, 450s, ISBN 0-12-220402-6.
- Donovan-Peluso M., Wasti S.S., Hartmann G.C. 1980: Safety of entomogenous fungi to vertebrate hosts. *Applied Entomology and Zoology*, 15: 498-499.
- Elbaz A., Clavel J., Rathouz P. J., Moisan F., Galanaud Jean-Philippe, Delemotte B., Alperovitch A., Tzourio Ch. 2009: Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 66: 494-504.
- Elliot S.L., Sabelis M.W., Janssen A., Van der Geest L.P.S., Beerling E.A.M., Fransen J. 2000: Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology Letters*, 3: 228-235.
- Evans H.C. 2003: *Clavicipitalean Fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts*. CRC Press, ISBN: 978-0-8247-4255-3, 978-0-203-91270-6, 640 p.

- Fargues J., Reisinger O., Robert P.H., Aubart C. 1983: Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: Influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospore survival in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 131-142.
- Fromtling R.A., Kosanke S.D., Jensen J.M., Bulmer G.S. 1979: Fatal *Beauveria bassiana* infection in a captive American alligator. *American Veterinary and Medical Association*, 175: 934-936.
- Genthner F.J., Middaugh D.P. 1992: Effects of *Beauveria bassiana* on embryos of the inland silverside fish (*Menidia beryllina*). *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2840-2845.
- Georg L.K., Williamson W.M., Tilden E.B., Getty R.E. 1962: Mycotic pulmonary disease of captive giant tortoise due to *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Sabouraudia*, 2: 80-86.
- Gonzales-Cabo J.F., Espejo-Serrano J., Barcena-Asensio M.C. 1995: Mycotic pulmonary disease by *Beauveria bassiana* in a captive tortoise. *Mycoses*, 38: 167-169.
- Groden E., Lockwood J.L. 1991: Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 7-16.
- Goettel M.S., Poprawski T.J., Vandenberg J.D., Li Z., Roberts D.W. 1990: Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M., Lacey L., Davidson E.W., (eds). *Safety of microbial insecticides*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 209-231.
- Goettel M.S., Jaronski S.T. 1997: Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society Canada*, 171: 83-99.
- Goettel M.S., Hajek A.E., Siegel J.P., Evans H.C. 2001: Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N., (eds.) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, CAB International, pp. 347-376.
- Gumowski P.I., Latgé J.P., Paris S. 1991: Fungal allergy. In: Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G., (eds.) *Handbook of applied mycology*. Vol. 2: Humans, animals and insects, New York: Marcel Dekker, pp. 163-204.
- Gürcan S., Tugrul H.M., Yörük Y., Özer B., Tatman-Otkun M., Otkun M. 2006: First case report of emphysema caused by *Beauveria bassiana*. *Mycoses*, 49: 246-248.

- Haas-Costa J., Alves L. F. A., Daros A. A. 2010: Safety of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to *Gallus domesticus* L. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53: 465-471.
- Hegedus D.D., Khachatourians G. G. 1995: The impact of biotechnology on hypromycetous fungal insect biocontrol agents. Biotechnology Advances, 13: 455-490.
- Holder D.J., Keyhani N.O. 2005: Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to Substrata†. Applied and Environmental Microbiology, 71: 5260-5266.
- Hrudová E., Pokorný R., Víchová J. 2006: Integrovaná ochrana rostlin. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, ISBN 978-80-7157-980-9, 151s.
- Huber J. 1958: Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. Archiv für Mikrobiologie, 29: 257-276.
- Kapongo P. J., Shipp L., Kevan P., Broadbent B. 2008: Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper. BioControl, 53: 797-812.
- Kaufman P. E., C. Reasor, D. A. Rutz, Donald A., J. K. Ketzis, J. J. Arends 2005: Evaluation of *Beauveria bassiana* applications against adult house fly, *Musca domestica*, in commercial caged-layer poultry facilities in New York state. Biological Control, 33: 360-367.
- Kalina T., Váňa J. 2005 :Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum Univerzita Karlova v Praze, ISBN 80-246-1036-1 606s.
- Kaur R., Gupta V.K., Jindal V., Dilawari V.K.B. 2010: Growing *Beauveria bassiana* for cuticle degrading activities and its bioefficacy against Greater Wax Moth, *Galleria melonella*. Biopesticides International, 6: 96-104.
- Koubová D. 2009: Využití hub v biologické ochraně proti škůdcům. http://www.bio-info.cz/uploads/download/Vyuziti_hub_v_biologicke_ochrane_rostlin.pdf
- Kreutz J., Zimmermann G., Vaupel O. 2004: Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the Spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. Biocontrol Science and Technology, 14: 837- 848.

- Crous P.W., Rong I.H., Wood A., Lee S., Glen H., Botha W., Slippers B., Beer W.Z. de, Wingfield M.J., Hawksworth D.L. 2006: How many species of fungi are there at the tip of Africa. *Studies in Mycology*, 55: 13-33.
- Kaufman P. E., Reasor C., Rutz D. A., Ketzis J.K., Arends J.J. 2005: Evaluation of *Beauveria bassiana* applications against adult house fly, *Musca domestica*, in commercial caged-layer poultry facilities in New York state. *Biological Control*, 33: 360-367
- Kouassi M., Coderre D., Todorova S.I. 2003: Effect of plant type on the persistence of *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 415-427.
- Kryukov V. Yu., Khodyrev V. P., Yaroslavtseva O. N., Kamenova A. S., Duisembekov B. A., Glupov V. V. 2009: Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis ssp. morrisoni* in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Applied Biochemistry & Microbiology*. 45: 511- 516.
- Labbé R. M., Gillespie D. R., Cloutier C., Brodeur J. 2009: Compatibility of an entomopathogenic fungus with a predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. *Biocontrol Science & Technology*, 19: 429-446.
- Landa Z. 1994: Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin – habilitační práce. Katedra rostlinné výroby, oddělení ochrany rostlin, Zemědělská fakulta JU v Českých Budějovicích, 95s.
- Landa Z., Horňák P., Osborne L.S., Nováková A., Bursová E. 2001: Entomogenous fungi associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in the Bohemian Forest. *Sylva Gabreta*, 259-271.
- Leatherdale D. 1970. The arthropod hosts of entomogenous fungi in Britain. *Entomophaga*, 15: 419-435.
- Lord J. C. 2011: Influence of substrate and relative humidity on the efficacy of three entomopathogenic fungi for the hide beetle, *Dermestes maculatus* (Coleoptera, Dermestidae). *Biocontrol Science and Technology*, 21: 475-483
- MacLeod D.M. 1954: Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany*, 32:818-890.
- McDowell J.M., Funderburk J.E., Boucias D.G., Gilreath M.E., Lynch R.E. 1990: Biological activity of *Beauveria bassiana* against *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on leaf surfaces and soil. *Environmental Entomology*, 19: 137-141.

- Mancebo A., Gonzalez F., Aldana L., Gonzalez Y., Lugo S., Gonzalez B., Fuentes D., Arteaga M.E., Gonzalez Y., Bada A. M. 2009: *Beuveria bassiana* 9205 in rats using different routes of exposition pathogenicity of the entomopathogenic fungus. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91: 99-108.
- Mel'nikova E.A., Murza V.I. 1980: Investigations of the safety of industrial strains of microorganisms and microbial insecticides. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 24: 425-431.
- Meyling N.V., Eilenberg J. 2007: Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43: 145-155.
- Mietkiewski R., Gorski R., Tkaczuk C. 1995: Occurrence of entomopathogenic fungi in soil in relation to depth. Proceedings of the conference on 'Actual and potential use of biological pest control on plants', Skierniewice, Poland, 22-23 November 1993, pp. 94-99.
- Müller-Kögler E. 1965: Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. Berlin, P. Parey Verlag, 444 s.
- Müller-Kögler E. 1967: Nebenwirkungen insektenpathogener Pilze auf Mensch und Wirbeltiere: Aktuelle Fragen. *Entomophaga*, 12: 429-441.
- Müller-Kögler E., Zimmermann G. 1980: Zur Aufbewahrung entomogener Pilzkulturen. *Entomophaga*, 25: 301-311.
- Müller-Kögler E., Zimmermann G. 1986. Zur Lebensdauer von *Beauveria bassiana* in kontaminiertem Boden unter Freiland- und Laboratoriumsbedingungen. *Entomophaga*, 31: 285-292.
- Morley-Davies J., Moore D., Prior C.J. 1995: Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycological Research*, 100: 31-38.
- Marshall K.C., Bitton G. 1980: Adsorption of microorganisms to surfaces. New York, J. Wiley & Sons Inc, ISBN 978-0471031574, 452s.
- Namatame I., Tomoda H., Ishibashi S., Omura S. 2004: Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101: 737-742.
- Nolard N. 2004: Allergy to moulds. *BCCM Newsletter* 16: 1-3.

- Pore R.S., Goodman N.L., Larsh H.W. 1970: Pathogenic potential of fungal insecticides. *American Review on Respiratory Disease*, 101: 627-628.
- Prasad A., Syed N., Purohit S. 2010: *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin: a successful biopesticide against key pest *Helicoverpa armigera* (Hubner). <http://www.ijpbs.net/issue-2/159.pdf>.
- Poprawski T.J., Walker J.J. 2000: Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemisia whiteflies* (Homoptera: Aleyrodidae). *Mycopathologia*, 151: 11-20.
- Quesada-Moraga E., Vey A. 2004: Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research* 108: 441-452.
- Ramoska W.A., Todd T. 1985: Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the chinch bug (Hem., Lygaeidae) as a result of feeding activity on selected host plants. *Environmental Entomology*, 14: 146-148.
- Rassette M. S., Pierpont E. I., Wahl T., Berres M. 2011: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 6: 910-915.
- Reddy N. P., Khan P. A., Devi K. U. 2008: Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Pest Management Science*, 64: 909-915.
- Rehner S. A., Minnis A. M., Sung Gi-Ho, Luangsa-Ard J. J., Devotto L., Humber R. A. 2011: Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103:1055-1073.
- Rashki M., Kharazi-pakdel A., Allahyari H., Alphen J. J. M. van 2009: Interactions among the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), the parasitoid, *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Braconidae), and its host, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Biological Control*, 50: 324-328.
- Roberts D.W. 1981: Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges H.D., (ed.) *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London: Academic Press, pp. 441-464.
- Rosin F., Shapiro D.I., Lewis L.C. 1996: Effects of fertilizers on the survival of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 194-195.

- Sikorowski P. P., Lawrence A. M. 2009: Major diseases of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* in Mississippi fields and insectaries. <http://msucares.com/pubs/techbulletins/tb218.htm>
- Siri A., Scorsetti A. C., Dikgolz V. E., López Lastra C. C. 2005: Natural infections caused by the fungus *Beauveria bassiana* as a pathogen of *Musca domestica* in the Neotropic. *Biocontrol*, 50: 937-940
- Seger C., Sturm S., Längle T., Wimmer W., Stuppner H., Strasser H. 2005a: Development of a sensitive high performance liquid chromatography-diode array detection assay for the detection and quantification of the *Beauveria* metabolite oosporein from submerged culture broth and biocontrol formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1364-1369.
- Seger C., Erlebach D., Stuppner H., Griesser U.J., Strasser H. 2005b: Physicochemical properties of oosporein, the major secreted metabolite of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Helvetica Chimica Acta*, 88: 802-810.
- Steinhaus E. A. 1949: Principles of insect pathology. New York, McGraw-Hill Book Company, 757s.
- Storey G.K., Gardner W.A. 1987: Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. *Environmental Entomology*, 16: 178-181.
- Storey G.K., Gardner W.A. 1988: Movement of an aqueous spray of *Beauveria bassiana* into the profile of four Georgia soils. *Environmental Entomology*, 17: 135-139.
- Storey G.K., Gardner W.A., Tollner E.W. 1989: Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia in soil of two tillage systems. *Environmental Entomology*, 18: 835-839.
- Strasser H., Vey A., Butt T.M. 2000: Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10: 717-735.
- Studdert J.P., Kaya H.K., Duniway J.M. 1990: Effect of water potential, temperature, and clay-coating on survival of *Beauveria bassiana* conidia in a loam and peat soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 417-427.
- Sung G.-H., Hywel-Jones N.L., Sung J.-M., Luangsa-ard J.J., Shreshtha B., Spatafora J.W. 2007: Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57: 5-59.

- Thakur R., Sandhu S. Sardul 2008: Species confirmation of fungal isolates by molecular analysis. *Indian Journal Microbiology*, 50: 280-291
- Toepfer S., Kuhlmann U. 2004: Survey for natural enemies of the invasive alien chrysomelid, *Diabrotica irgifera virgifera* in Central Europe. *BioControl*, 49: 385-395.
- Váňa J. 1996: Systéma vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, ISBN 80-7184-175-7, 164s.
- Vey A., Hoagland R., Butt T.M. 2001: Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C.W., Magan N., (eds.) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford: CAB International, pp. 311-346.
- Věchet L. 2010: Biologická ochrana a indukovaná rezistence rostlin k chorobám a škůdcům. <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-7427-048-2.pdf>
- Visser S., Parkinson D., Hassall M. 1987: Fungi associated with *Onychiurus subtenuis* (Collembola) in an aspen woodland. *Canadian Journal of Botany*, 65: 635-642.
- Wang C., Fan M., Li Z., Butt T.M. 2004: Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 861-870.
- Wartenberg H., Freund K. 1961. Der Konservierungseffekt antibiotischer Mikroorganismen an Konidien von *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde (Abt. II)*, 114: 718-724.
- Watson A.G., Ford E.J. 1972: Soil fungistasis - A reappraisal. *Annual Revue of Phytopathology*, 10: 327-348.
- Weckwerth W., Miyamoto K., Inuma K., Krause M., Glinski M., Storm T., Bonse G., Kleinkauf H., Zocher R. 2000: Biosynthesis of PF1022A and related cyclooctadepsipeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 17909-17915.
- Weiser J., 1966: *Nemoci Hmyzu*. Academia Praha, 554s.
- Vestergaard S., Cherry A., Keller S., Goettel M. 2003: Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen H.M.T., Hajek A.E., (eds.) *Environmental impacts of microbial insecticides*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 35-62.

- Westwood G.S., Huang S.W., Keyhani N.O. 2005: Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clinical and Molecular Allergy*, 3: 1-8.
- Yoon C.S., Bae S.H., Song H.H., Park H.S., Lee C. 2003: Effect of synnemata of *Beauveria bassiana* on the properties of noodle and the baking qualities of bread. Institute of Food Technologists, Annual Meeting, Chicago, Abstract 60D-16.
- Zhang Y., Zhao J., Fang W., Zhang J., Luo Z., Zhang M., Fan Y., Pei Y. 2009: Mitogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 3787-3795.
- Zimmermann G. 2007: Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553-596.