

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Zemědělská fakulta

Disertační práce

**MOŽNOSTI HODNOCENÍ ÚČINNOSTI ENTOMOPATOGENNÍCH
HUB NA VYBRANÉ CÍLOVÉ HOSTITELE**

Autor disertační práce
Ing. Aleš Skalický

Školitel
prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

ZF JU v Českých Budějovicích

České Budějovice
květen 2014

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Možnosti hodnocení účinnosti entomopatogenních hub na vybrané cílové hostitele“ vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....
Aleš Skalický

České Budějovice, květen 2014

Děkuji svým školitelům prof. Ing. Zdeňku LANDOVI, CSc. a prof. Ing. Vladislavu ČURNOVI, Ph.D. za odborné vedení při práci, cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc, které mi poskytovali v průběhu studia a zpracování předkládané práce.

Poděkování dále patří pracovníkům Katedry rostlinné výroby a agroekologie, oddělení Rostlinolékařství za pomoc, rady a připomínky.

Aleš Skalický

OBSAH

1. Úvod.....	6
2. Literární přehled.....	7
2.1 Integrovaná ochrana rostlin (IOR).....	7
2.2 Biologická ochrana rostlin.....	8
2.3 Entomopatogenní houby v ochraně rostlin před škůdci (a patogeny)	12
2.4 Životní cyklus entomopatogenních hub.....	15
2.5 Epizoozie způsobené entomopatogenními houbami.....	17
2.6 Biotesty.....	19
2.6.1 Inokulace.....	19
2.6.2 Inkubace a posouzení mortality.....	20
2.7 „Bezpečnost“ entomopatogenních hub.....	22
2.8 Stručná charakteristika vybraných druhů entomopatogenních hub.....	23
2.8.1 <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo-Criv.) Vuillemin.....	23
2.8.2 <i>Beauveria caledonica</i> Bissett & Widden.....	23
2.8.3 <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok.....	24
2.8.4 <i>Isaria fumosorosea</i> Wize.....	24
2.9 Teplota, vlhkost, sluneční záření – hlavní abiotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub.....	25
2.9.1 Teplota.....	25
2.9.2 Vlhkost.....	27
2.9.3 Kombinace teploty a vlhkosti.....	28
2.9.4 Sluneční záření.....	29
3. Cíle práce.....	31
4. Materiál a metodika.....	33
4.1 Izoláty entomopatogenních hub používané v jednotlivých studiích.....	33
4.2 Pěstování kultur a příprava suspenze.....	36
4.3 Standardní test klíčivosti.....	37
4.4 Standardní laboratorní biotest vývoje nákazy na hostiteli.....	38
4.5 Hodnocení mortality a infekce na cílovém hostiteli.....	41
4.5.1 Postup biotestu na larvách <i>T. molitor</i> a <i>G. mellonella</i>	41
4.5.2 Postup biotestu na bezkřídlých partenogenetických samičkách <i>M. persicae</i>	41
4.6 Radiální růst a sporulace na umělém živném mediu (PDA).....	42
4.7 Statistická analýza.....	42
5. Experimentální část.....	43
5.1 Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby <i>Beauveria bassiana</i> a <i>Beauveria caledonica</i> , získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potměníka moučného (<i>Tenebrio molitor</i>).....	43
5.1.1 Metodický postup.....	43
5.1.2 Výsledky.....	43

5.2 Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby <i>Beauveria bassiana</i> na larvy <i>Tenebrio molitor</i>	76
5.2.1 Metodický postup.....	76
5.2.2 Výsledky.....	77
5.3 Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů získaných z komerčních biopreparátů, na bezkřídlé partenogenetické samičky <i>Myzus persicae</i>	87
5.3.1 Metodický postup.....	87
5.3.2 Výsledky.....	88
5.4 Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby <i>Metarhizium anisopliae</i> odizolovaných z půd konvenčně obhospodařovaných konvenčním způsobem.....	92
5.4.1 Metodický postup.....	92
5.4.2 Výsledky.....	93
5.5 Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby <i>Isaria fumosorosea</i> a jejich pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i>	112
5.5.1 Metodický postup.....	112
5.5.2 Výsledky.....	113
6. Diskuse.....	124
7. Závěr.....	137
8. Summary.....	140
9. Seznam literatury.....	143
10. Přílohy.....	158

1. ÚVOD

Integrovaná ochrana rostlin (IOR) tvoří v dnešní době již plně respektovaný pilíř proti negativnímu působení škůdců či patogenů, v rámci něhož jsme schopni v případě vybraných kulturních plodin zajistit dostatečnou ochranu. Jejím hlavním cílem je optimalizace ochrany rostlin jak po stránce ekologické, tak současně po stránce ekonomické. Integrovaná ochrana rostlin v sobě zahrnuje metody agrotechnické, fyzikální, biologické, ale i chemické, dále je také nepostradatelnou součástí pro uplatnění principů IOR nutnost monitoringu výskytu „škodlivých“ organismů, odběr vzorků či vedení záznamů. Cílem IOR není eradikace škodlivých organismů, ale snaha udržet jejich výskyt pod ekonomickým prahem škodlivosti.

Entomopatogenní houby mohou tvořit nedílnou součást integrované ochrany rostlin, nicméně je třeba dbát na to, aby byly využívány způsobem, který nám zajistí dostatečnou účinnost tohoto agens. To především závisí alespoň na základních znalostech souvisejících především s poznáním jejich ekologie, kdy nám tyto vědomosti dovolí efektivní začlenění tohoto agens do komplexu všech přímých či nepřímých ochranných opatření vedoucích ke snižování závislosti na pesticidech.

Nicméně je třeba si otevřeně říci, že ať se využití entomopatogenních hub jako agens vhodného ke snížení populací „škůdců“ v rámci integrované, potažmo biologické, ochrany rostlin ve všech svých aspektech jeví jako velmi vhodné řešení, jejich využitelnost se bude v nejbližších letech (i přes neustálý vývoj a snahu nalézat řešení k jejich využitelnosti/aplikaci) nacházet pouze v určitých systémech pěstování rostlin a využití jiných metod v rámci integrované ochrany rostlin, především pak pesticidů, v konvenčním zemědělství (správná aplikace dle legislativy) bude nadále sehrávat v souhrnném měřítku ochrany rostlin hlavní roli. Nicméně jakékoli efektivní řešení (nejen ta, jenž se týkají využití entomopatogenních hub) vedoucí ke snížení závislosti na pesticidech jsou velkým přínosem a krokem k trvale udržitelnému zemědělství.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Integrovaná ochrana rostlin (IOR)

Prvotní koncept integrované ochrany rostlin byl navržen skupinou entomologů na Kalifornské univerzitě ve Spojených státech amerických v průběhu padesátých let dvacátého století jako reakce na dvě zásadní skutečnosti: a) vznik rezistence k insekticidům, b) negativní vliv insekticidů na populace přirozených nepřátel hmyzu. V začátcích IOR tedy nebylo znečištění životního prostředí insekticidy považováno za jeden z hlavních předpokladů k vývoji nových postupů v ochraně rostlin, i když i v té době byly ve větší míře pozorovány neúmyslné otravy různých druhů živočichů, včetně lidí (Perkins 1982).

Nový (filozofický) rámec ochrany rostlin byl stanoven v roce 1959 publikací článku Sterna et al. s názvem „The Integrated Control Concept“, jenž předkládal koncept ochrany rostlin založený na kombinaci a integraci biologické a chemické ochrany na základě ekonomických prahů škodlivosti, což lze považovat za první pokus o poskytnutí racionálního podkladu pro rozhodování o oprávněnosti zásahu proti škůdci (Rajinder et al. 2009) a nakonec také položil základ pro následný rozvoj strategie IOR (Castle et al. 2009).

Termín „integrovaná ochrana rostlin“ poprvé použili Smith a van den Bosh v roce 1967 a tento termín byl v roce 1969 oficiálně uznán Národní akademií věd Spojených států amerických. Za posledních padesát let došlo k výraznému pokroku v přijímání konceptu IOR v mnoha zemích světa, kdy současně s tím docházelo k vývoji teorie a zásad podpory IOR. Navíc byly vyvinuty nové prostředky a strategie konceptu IOR: (i) novější, více selektivní insekticidy, (ii) pokrok ve vývoji tzv. „biopesticidů“, (iii) postupy založené na využití semiochemikálií, (iv) koncept podpory a konzervace užitečných organismů, (v) využití strategie augmentativní biologické ochrany, (vii) nástup transgenních plodin schopných produkce specifických (cry) proteinů entomopatogenní bakterie *Bacillus thuringiensis* (Rajinder et al. 2009).

Definice IPM podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009

Integrovanou ochranou rostlin se rozumí 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.

Současné pojetí IOR se vyvinulo v koncept zahrnující ochranu rostlin proti hmyzím škůdcům, původcům onemocnění, plevelům a škůdcům podkmene *Vertebrata*, přičemž původní koncept integrované ochrany byl zaměřen pouze proti hmyzím škůdcům, a z tohoto důvodu ne všechny původní základy integrované ochrany jsou vhodné pro využití v ochraně rostlin proti ostatním výše zmíněným škodlivým organismům (Gray et al. 2009). Redukce používání pesticidů není explicitně stanovena jako cíl všech programů IOR, ačkoli snížení aplikace pesticidů je často výsledkem jejich správně aplikovaných zásad (Norris et al. 2003). Navíc aplikace pesticidů není považována za paušální řešení ochrany rostlin a je uvážlivě využívána spíše selektivně (Bailey et al. 2010). Další běžnou, byť mylnou představou, je ztotožnění konceptu IOR s principy ekologického způsobu hospodaření, které však není přímým cílem IOR, nicméně využívá mnoho stejných zásad (Norris et al. 2003).

Koncept IOR je postaven především na porozumění ekologii a populační biologii škodlivých organismů, což je základní podstatou vývoje programů IOR (Norris et al. 2003) a předpokládá využití široké palety dostupných metod ochrany rostlin, které zahrnují metody: biologické, agrotechnické, fyzikální a hostitelské rezistence rostlin, napomáhající v rozhodování o zásahu a v neposlední řadě metody chemické. Tyto rozdílné metody mohou být kombinovány různými způsoby tak, aby vyhovovaly lokálním potřebám. Dlouhodobým cílem je vylepšit funkčnost autoregulačních mechanismů ekologických faremních systémů, které omezují rozvoj škodlivých organismů tak, aby lidského zásahu bylo využito pouze tehdy, kdy populace škodlivého organismu dosáhne škodlivé úrovně (Bailey et al. 2010).

Stručně řečeno, koncept IOR je široce ekologický přístup ochrany rostlin před škodlivými organismy, využívající rozličných ochranných opatření zaměřených komplexně na škodlivé organismy agroekosystému a současně s tím zajišťuje vysokou kvalitu zemědělské produkce na udržitelné, ekologicky bezpečné a ekonomicky šetrné úrovni (Bajwa, Kogan 1997).

Biologicky intenzivní IOR /Biointenzivní IOR

Jelikož i programy ochrany rostlin, které jsou postavené zcela na používání pesticidů, kdy jejich aplikace následuje po překročení ekonomických prahů škodlivosti, mohou být označeny za programy spadající do konceptu IOR, byl s ohledem na tento trend navržen nový termín „Biologicky intenzivní/biointenzivní integrovaná ochrana rostlin“. Takovýto koncept ochrany rostlin je postaven na metodách: biologických, agrotechnických, hostitelské rezistence rostlin a metodách využití bioracionálních pesticidů a dalších nechemických metod, které jsou snáze implementovatelné do systémů biointenzivní IOR (Kogan 1998).

2.2 Biologická ochrana rostlin

Je obecně známo, že prvním případem kompletní a dlouhodobě udržitelné biologické ochrany před hmyzím škůdcem za využití jiného hmyzího druhu, byla v 80. letech 19. století introdukce sluněčka *Rodolia cardinalis*, s cílem potlačit červce *Icerya purchasi* v citrusových

sadech v Kalifornii (Orr 2009; Caltagirone, Doult 1989). Tento druh červce byl nalezen kolem roku 1868 v citrusových sadech Kalifornie a již o dvacet let později, v důsledku jím působených škod, stála produkce citrusů v jižní Kalifornii na pokraji své existence. Chemická opatření (fumigace stromů kyanidem) měla pouze omezené účinky a produkce citrusů byla výrazně redukována. Nicméně kolem roku 1887 bylo zjištěno, že v Austrálii (původní místo výskytu) není červec *I. purchasi* považován za škůdce a následně byli objeveni a introdukováni jeho dva přirození antagonisté: parazitická moucha *Cryptochaetum iceryae* a slunéčko *R. cardinalis*, přičemž především slunéčko *R. cardinalis* poskytovalo okamžitou a výraznou ochranu a během následujících dvou let bylo přemnožení červce *I. purchasi* potlačeno v celé Kalifornii. Nicméně i parazitická moucha *C. iceryae* byla zavedena v rámci biologické ochrany tohoto škůdce a nakonec se stala dominantním kontrolním agens *I. purchasi* v pobřežních oblastech Kalifornie (van Driesche, Bellows 1996).

I přesto, že biologická ochrana byla ve svých počátcích využívána v ochraně před hmyzími škůdci, není v žádném případě omezena jen a pouze na jednu konkrétní skupinu škodlivých organismů (DeBach, Rosen 1991). Biologická ochrana nabízí velice slibné metody ochrany rostlin před škůdci, původci onemocnění a pleveli. Potenciál biologické ochrany rostlin byl prokázán v mnoha zemědělských, zahradnických a lesnických systémech, ale také v situacích, kdy cílem použití ochranných opatření jsou přenašeči lidských nemocí, popř. další obtížný hmyz (Eilenberg 2006). Nicméně hlavní využití konceptu biologické ochrany (především pak biologické ochrany rostlin) spočívá v: (i) ochraně proti bezobratlým škůdcům za využití predátorů, parazitoidů a patogenů, (ii) ochraně proti plevelným druhům rostlin za využití herbivorů a patogenních organismů a (iii) ochraně proti původcům onemocnění rostlin za využití antagonistických mikroorganismů a indukované rezistence. Dále pak také biologická ochrana začíná být uplatňována ve výzkumu a praxi veterinární a humánní medicíny (Eilenberg et al. 2001). Biologická ochrana se ukázala být efektivní za velmi rozličných podmínek: (i) v oblastech kontinentálních, stejně tak jako ostrovních, (ii) v podmínkách klimatu mírného, stejně tak jako tropického, (iv) v pěstebních cyklech plodin ročních, stejně tak jako vytrvalých (DeBach, Rosen 1991).

Biologickou ochranou se tedy obecně rozumí použití živých organismů (a virů) k potlačení populační hustoty či vlivu na specifické škodlivé organismy, díky čemuž je četnost těchto škodlivých organismů nižší nebo jsou méně škodlivé ve srovnání se situací, kdy by biologická ochrana nebyla použita (Eilenberg et al. 2001).

Využití biologické ochrany rostlin nabízí několik výhod oproti využití konvenční chemické ochrany. Zatímco riziko vzniku rezistence je obecně při využití biologického kontrolního agens malé a specifita k cílovému organismu vysoká, chemická ochrana nabízí při vysokém riziku vzniku rezistence velice nízkou specifitu k cílovému organismu. Dále také při porovnání negativních dopadů (i přes minimum případů) se biologická ochrana ukazuje v mnohem lepším světle, kdy při využití biologického kontrolního agens „hrozí“ obecně nulové a/nebo pouze minimální vedlejší negativní dopady, zatímco při využití chemické ochrany je toto riziko nepoměrně vysoké. Nezpochybnitelné výhody z využití biologické ochrany plynou také pro samotné uživatele (farmáře) a zákazníky: (i) pěstitelé a ostatní personál nejsou exponováni negativním účinkům pesticidů, (ii) produkty jdoucí na trh neobsahují rezidua pesticidů, (iii) žádné či jen potenciálně minimální fyto toxické účinky, jenž by mohly vést ke ztrátám na výnosu, (iv) aplikace je mnohem uživatelsky příjemnější,

(v) biologická ochrana obecně vyžaduje mnohonásobně nižší četnost aplikací oproti konvenční chemické ochraně, (vi) konvenční chemická ochrana rostlin před některými škodlivými organismy je a/nebo může být obtížná či dokonce nemožná z důvodu potenciální a/nebo již vzniklé rezistence k pesticidům, (vii) není zde problém s ochrannou lhůtou (OL) po aplikaci jako u chemické ochrany, čili sklizeň může být provedena ve vhodnou dobu bez ohledu na termín aplikace, (viii) biologická ochrana je obecně trvalá, „jednou dobrý přirozený nepřítel – vždy dobrý přirozený nepřítel“, (ix) výsledné produkty jsou obecně více ceněny širokou veřejností, což může mít za následek lepší prodejnost či vyšší cenu těchto produktů nebo obojí zároveň (van Lenteren 2000).

I přes tyto nesporné výhody je třeba říci, že biologická ochrana není (či alespoň prozatím) obecně uplatnitelným „všelékem“ ve všech aspektech ochrany rostlin před vlivem škodlivých organismů. (Obecně asi nejvíce propracovaný koncept biologické ochrany je využíván v pěstebních systémech skleníkových provozů – nabízí možnost řízených kultivačních podmínek).

Veškeré antagonistické organismy zaváděné v rámci biologické ochrany, jež je nepostradatelnou součástí trvale udržitelného zemědělství, představují určitý stupeň rizika pro necílové druhy organismů a rozdílnost mezi úspěšným biologickým kontrolním agens a invazivním druhem může být velice úzká (Roy, Wajnberg 2008). Jelikož však většina programů biologické ochrany rostlin využívá relativně specifických prostředků, je riziko pro necílové organismy obecně velmi nízké. Biologická ochrana byla praktikována po více než 130 let s minimálním negativním dopadem na necílové organismy a s přijatelným rizikem pro všechny zainteresované strany (Delfosse 2005), i přesto je obvykle před použitím dané kontrolní agens posuzováno dle následujících čtyř oblastí: (i) charakterizace a identifikace, (ii) zdravotní rizikovost, (iii) rizikovost pro životní prostředí a (iv) účinnost (IOBC 2012).

Jako jeden z mála příkladů negativního dopadu užití biologické ochrany může posloužit introdukce slunéčka *Harmonia axyridis* jako kontrolního agens ve velké míře introdukovaného za účelem ochrany proti mšicím a červcům, ale i dalším škůdcům. Toto slunéčko původem z Asie, jenž je dnes v Severní Americe a Evropě považováno za invazivní druh (Brown et al. 2008; 2011), bylo mezi lety 1916–1985 opakovaně introdukováno v několika státech Severní Ameriky (Soares et al. 2008), v západní Evropě pak proběhla první introdukce ve Francii v roce 1982 (Brown et al. 2008). Při posuzování rizikovosti 31 exotických přirozených antagonistů škodlivých organismů, používaných v rámci biologické ochrany v Evropě, mělo slunéčko *H. axyridis* druhý nejvyšší index rizikovosti v dopadu na životní prostředí (van Lenteren et al. 2003), z čehož analogicky vyplývá, že *H. axyridis* má vysoký potenciál rizikovosti pro necílové druhy, jelikož: (i) je schopno se etablovat v různých podmínkách prostředí, (ii) je predátor širokého spektra hostitelů, dokonce i mimo třídu *Insecta*, (iii) může se živit rostlinným materiálem, (iv) může se šířit na velké vzdálenosti (více než 50 km za rok), čímž je schopno se šířit i do jiných než cílových oblastí, kde může napadat necílové druhy, včetně přirozených antagonistů škodlivých organismů. Introdukce *H. axyridis* v Severní Americe vedla k redukci populací původních přirozených predátorů (včetně jiných zástupců čeledi Coccinellidae) a nyní je tento jev pozorován také v severozápadní Evropě (van Lenteren 2008).

Základní strategie biologické ochrany rostlin (proti škůdcům a původcům onemocnění) (upraveno podle Eilenberg et al. 2001)

Klasická biologická ochrana

Záměrná introdukce (obvykle) exotického, obvykle ko-evolučně spjatého, biologického kontrolního agens s cílem jeho trvalého zavedení a dlouhodobé ochrany rostlin proti škůdcům.

Strategie klasické biologické ochrany rostlin závisí na nalezení vhodného biologického kontrolního agens (především predátorů a parazitoidů), které (obvykle) nepochází z oblasti, v níž je třeba efektivně redukovat populaci zavlečeného škůdce. Z tohoto důvodu se (obvykle) pro potřeby tohoto konceptu ochrany zavádí tzv. exotický druh kontrolního agens. Tato strategie je použitelná, i když v menší míře, také pro záměrnou introdukci mikroorganismů v ochraně rostlin před škůdci, nicméně ne proti původcům onemocnění rostlin.

Inokulativní biologická ochrana

Záměrné využití (uvolnění) živého organismu jako biologického kontrolního agens s očekáváním jeho následného množení a (s tím spojené) ochrany rostlin proti původcům onemocnění a škůdcům v delším časovém období, nicméně nikoli trvale.

Koncept inokulativní biologické ochrany rostlin je postaven na aplikaci biologického kontrolního agens, jehož (uvolněné) množství však není schopné okamžitě efektivně regulovat populaci škodlivých organismů, ale jeho úspěšnost závisí především na schopnosti namnožit se a teprve posléze efektivně redukovat populaci cílového organismu. Nicméně se i tak jedná pouze o časově omezenou účinnost, kdy je po určité době, např. v novém pěstebním cyklu plodin, nezbytná opětovná aplikace daného kontrolního agens.

Inundativní biologická ochrana

Využití živých organismů (a virů) v ochraně rostlin proti původcům onemocnění a škůdcům, kdy ochrany je dosahováno výhradně samotnými uvolněnými organismy.

Biologické kontrolní agens aplikované v rámci strategie inundativní biologické ochrany rostlin musí obvykle přijít do kontaktu a následně zahubit dostatečně velkou část populace škůdců či původců onemocnění rostlin anebo jiným způsobem dosáhnout téhož tak, aby nedocházelo k překročení prahu ekonomické škodlivosti. Úspěšnost této metody je závislá pouze na účinnosti uvolněného kontrolního agens, nikoli na jeho potomstvu, popř. nové generaci infekčních částic. Přesto se v praxi mohou vyskytnout případy tzv. reziduálního účinku, a to především tehdy, dochází-li alespoň k omezenému namnožení uvolněného kontrolního agens.

Podpora a konzervace přirozených antagonistů

Změna životního prostředí nebo stávajících postupů za účelem ochrany a navýšení populací specifických (konkrétních) přírodních antagonistů, či jiných organismů, s cílem snížit negativní vliv původců onemocnění a škůdců rostlin.

Základní odlišností strategie podpory a konzervace přirozených antagonistů od předchozích strategií biologické ochrany rostlin spočívá v cílené ochraně užitečných organismů a poskytování zdrojů, které jsou pro ně z hlediska údržnosti a efektivnosti v prostředí nezbytné, a nikoli tedy v záměrné introdukci vlastního biologického kontrolního agens do prostředí. Z těchto důvodů je požadováno limitované a selektivní použití pesticidů, stejně tak jako poskytování vhodných útočišť v blízkosti, či přímo v pěstovaných kulturách plodin, které zajistí přechod užitečných organismů mezi plodinami, anebo dokonce zajišťují vhodný (příhodný) zdroj potravy a úkryt.

2.3 Entomopatogenní houby v ochraně rostlin před škůdci (a patogeny)

Entomopatogenní houby, stejně tak jako ostatní přirození antagonisté hmyzu, mohou být použity v rámci všech čtyř strategií biologické ochrany rostlin (viz výše) (Shah, Pell 2003). Ačkoli nejvíce efektivní strategií z hlediska nákladů na ochranu rostlin je permanentní introdukce (známá také jako klasická biologická ochrana), která je postavena na vyvolání nákazy v populacích škůdců, ve kterých se obvykle nevyskytuje a poskytuje dlouhodobou či stálou ochranu (Charnley, Collins 2007). Největší důraz v souvislosti s aplikací entomopatogenních hub byl kladen na rozvoj strategie inundativní biologické ochrany (Goettel, Hajek 2001), přičemž aplikace je obdobná jako u pesticidů (Jaronski 2010). Pro určení, zda bylo využití entomopatogenních hub v ochraně rostlin úspěšné, je nutné hodnotit jednotlivé případy individuálně a přímé srovnávání s chemickou ochranou bývá obvykle nevhodné (Shah, Pell 2003). Použití samotných pesticidů se často řídí „chemickým paradigmatem“, tzn. provedení zásahu až v případě, kdy dojde k dosažení, či překročení prahu škodlivosti. Tato „hasící“ filozofie není vhodně aplikovatelná na entomopatogenní houby, které mají „pomalý“ mechanismus účinku. Nejlepšího využití „mykoinsekticidů“ je dosaženo preventivními aplikacemi zaměřenými na počáteční příznaky a/nebo první výskyt škodlivých organismů (Jaronski 2010).

Pro budoucí zvýšené využití entomopatogenních hub v ochraně rostlin je třeba: (i) zvýšení virulence a rychlosti usmrcení hostitele, (ii) zlepšení účinnosti v náročných/nepříznivých podmínkách prostředí (nízká vlhkost a teplota), (iii) efektivní masová produkce, (iv) vhodné formulace zajišťující snadnou aplikaci, dlouhodobou životnost a perzistenci v prostředí, (v) včlenění do integrovaných systémů a lepší porozumění jejich interakcím s prostředím a ostatními komponenty IOR, (vi) zhodnocení přínosu pro životní prostředí a (vii) přijetí této koncepce ochrany rostlin, založené na entomopatogenních houbách, širokou veřejností a pěstiteli (Lacey et al. 2001).

Jedním z velkých projektů v ochraně před škodlivým hmyzem byl projekt LUBILOSA (francouzský akronym LUtte BIologique contre les LOcustes et SAuteriaux - biologická ochrana před sarančaty a kobyilkami), který byl spuštěn v roce 1989 na základě původního konceptu vyvinutého Priorem a Greatheadem (1989) (LUBILOSA 1999a), v reakci na obrovskou míru využívání pesticidů mezi lety 1986–1989 při katastrofálním přemnožení sarančat a kobylek v oblasti Sahelu (LUBILOSA 1999b). Pro příklad, v tomto období bylo na ošetření 10 mil. hektarů utraceno 200 mil. USD za 15 mil. litrů širokého spektra insekticidů s účinnými látkami fenitrothion a malathion (Symmons 1992). Hlavním výstupem tohoto projektu je preparát, registrovaný v Jihoafrické Republice pod komerčním označením Green Muscle®, na bázi spor entomopatogenní houby *M. anisopliae* var. *acridum* (kmen IMI330189) formulovaných v oleji a aplikovatelných formou ULV (Ultra Low Volume) (LUBILOSA 1999b). Projekt LUBILOSA byl realizován na území států: Jižní Afrika, Benin, Niger, Mali, Čad, Súdán, Mauritanie, Burkina Faso, Pobřeží slonoviny, Gambie, Ghana a Senegal. I přesto, že polní testy prováděné v izolátorech přinášely vědecky hodnotné výsledky (LUBILOSA 1999a), testování účinnosti v polních podmínkách se ukázalo jako problematické, z důvodu časté migrace dospělců a nymf (Lomer et al. 1997), a proto bylo přistoupeno k ošetření rozsáhlé plochy. Výsledky po ošetření 800 ha pozemků jasně ukázaly reálnou účinnost přípravku Green Muscle®. Mrtví jedinci byli pozorováni zhruba 10 dnů po

aplikaci a byli nacházeni v průběhu celé sezóny. Na ošetřených plochách nedocházelo k opětovnému nárůstu populace, bylo zde pozorováno mnohem menší množství snůšek a dokonce se zde infekce vyvíjejících se nymf objevovala i následující sezónu. Oproti tomu na plochách (také 800 ha) ošetřených fenitrothionem sice došlo k rychlému usmrcení škůdce, nicméně následně docházelo k opětovnému rychlému osidlování (LUBILOSA 1999a). Asi po 16 dnech byly počty jedinců v populaci na plochách ošetřených přípravkem Green Muscle® nižší zhruba o 95 % oproti: (i) pozemkům ošetřeným fenitrothionem, kde došlo ke kompletnímu znovuosídlení, (ii) neošetřeným kontrolním pozemkům (Langewald et al. 1999). V průběhu času tedy *Metarhizium* poskytovalo lepší ochranu než fenitrothion. Jedna aplikace *Metarhizia* by v podstatě mohla zajistit celosezónní ochranu, zatímco při aplikaci fenitrothionu by k dosažení stejné úrovně ochrany bylo nutné opětovné ošetření (LUBILOSA 1999a). Program LUBILOSA byl oficiálně ukončen 31. prosince 2002 (LUBILOSA 2013).

Dalším příkladem využití entomopatogenních hub v ochraně rostlin je aplikace *Isaria fumosorosea* (dříve *Paecilomyces fumosoroseus*) proti molícím (*Bemisia tabaci*, *Bemisia argentifolii* a *Trialeurodes vaporariorum*). Osborne a Landa (1994) porovnávali účinnost *I. fumosorosea* (PFR 97), coby komponentu IOR, s konvenční ochranou proti molici *B. tabaci* v pěstebním systému ibišků a poinsetií. Konvenční způsob ochrany zahrnoval 1–2 aplikace insekticidů týdně (Azatin, Nicotine Sulphate, Orthene, Plant Fume, Tame, Thiodan), kdy 22 aplikací insekticidů bylo provedeno v pěstebním cyklu ibišků (146 dní) a 18 aplikací v pěstebním cyklu poisentií (100 dní). IOR zahrnovala využití suspenze spor *I. fumosorosea* ($1,0 \times 10^7$ spor/ml), kdy bylo provedeno pět mandatorních ošetření: (i) namáčení řízků, (ii) namáčení květníků s řízků, (iii) ošetření rostlin po přemístění z množárny do produkčního skleníku, (iv) druhé ošetření rostlin po 5–7 dnech po prvním ošetření, (v) třetí ošetření rostlin po 5–7 dnech po druhém ošetření a dodatečná ošetření, která byla prováděna, pokud bylo dosaženo počtu 1 dospělce/rostlinu. V pěstebním cyklu ibišků, při konvenčním způsobu ošetření, počet živých dospělců dosáhl průměrné hodnoty 0,08 jedinců/rostlinu, při mandatorním ošetření suspenzí spor *I. fumosorosea* s jedním dodatečným ošetřením bylo pozorováno průměrně 0,45 živých dospělců/rostlinu. Obdobných výsledků bylo dosaženo také v pěstebním cyklu poinsetií, kdy se při konvenčním způsobu ošetření v porostu vyskytovalo 0,45 živých dospělců/rostlinu, zatímco u rostlin ošetřovaných suspenzí spor *I. fumosorosea* bylo dosaženo max. prům. hodnoty 0,96 živých dospělců/rostlinu bezprostředně po přemístění z množárny do produkčního skleníku. Tři následná mandatorní a jedno dodatečné ošetření však indukovaly výrazné snížení počtu dospělců, kdy na konci pěstebního cyklu bylo průměrně pozorováno 0,08 živých dospělců/rostlinu. Výsledky tohoto pokusu jasně prokázaly srovnatelnou účinnost IOR v pěstebním systému ibišků a poinsetií proti *B. tabaci* založené na využití entomopatogenní houby *I. fumosorosea* s konvenčním způsobem ochrany, při výrazně nižší intenzitě ošetření s naprostým vyloučením insekticidů. Dobrých výsledků dosáhl také Wraight et al. (2000) v malých polních pokusech, kde byla opakovaně aplikována vysoká dávka konidií *I. fumosorosea* 5×10^{13} v 180 l/ha do porostů okurek a melounu Cantaloupe v 4–5denních intervalech, kde bylo dosaženo > 90% mortality třetích a čtvrtých nymf molice *B. argentifolii*.

Výsledky Kima et al. (2007, 2008) demonstrovaly potenciální duální účinnost kmenů entomopatogenní houby rodu *Lecanicillium*, jako vhodného kontrolního agens v ochraně proti mšicím a padlí. Následně prokázaly dobrou účinnost komerčního preparátu Vertalec

(založeného na bázi blastospor entomopatogenní houby *Lecanicillium longisporum*) v ochraně okurek proti mšici *Aphis gossypii* a padlí *Sphaerotheca fuliginea* ve skleníkových podmínkách. Ošetřením rostlin přípravkem Vertalec (2×10^6 blastospor/ml) po 1, 4 a 7 dnech po infestaci rostlin jedinci *A. gossypii* a sporami *S. fuliginea*, bylo na sledovaných listech dosaženo kompletní eliminace populace mšic během 16 dnů od první aplikace přípravku a zároveň bylo dosaženo výrazného snížení počtu kolonií padlí na listech 10. a 15. den od infestace houbou *S. fuliginea* ve srovnání s kontrolní variantou (rostliny ošetřené vodou) (Kim et al. 2010).

Existuje mnoho důvodů, proč jsou porosty skleníkových plodin považovány za vhodné cíle pro aplikace „mykoinsekticidů“: (i) entomopatogenní houby vyžadují k maximální účinnosti specifické podmínky, především vlhkost a teplotu, kdy tyto dva abiotické faktory jsou v uzavřených pěstebních systémech do značné míry snadno regulovatelné, (ii) sklo zabraňuje pronikání UV záření, které má letální účinky na spory aplikované do porostů, (iii) rezidua toxických pesticidů mají mnohem vyšší perzistenci v podmínkách uzavřených pěstebních systémů než v polních podmínkách, přičemž mnoho řezaných květín a plodů musí být sklizeno denně, čímž jsou pracovníci vystavováni zvýšenému riziku, což vytváří vysokou poptávku po využívání bezpečnějších pesticidů, které nepotřebují dlouhé intervaly mezi opětovnými vstupy do porostů a ochranné lhůty, (iv) intenzivní používání chemických insekticidů v produkčních porostech plodin a systémech předpěstování plodin přispívá k rychlému rozvoji rezistence v populacích škůdců a z tohoto důvodu jsou vyžadována alternativní biologická kontrolní agens, (v) podmínky skleníkového prostředí podporují obecně využití alternativních biologických kontrolních agens (makro, mikro) v ochraně rostlin a existuje zde vysoký potenciál v integraci využití makrobioagens s „mykoinsekticidy“, (vi) tyto pěstební systémy mají obecně vyšší hodnotu než systémy polního pěstování plodin, jelikož vytvářejí potenciál k maximalizaci účinnosti „mykoinsekticidů“ a v neposledním případě (vii) se zde nabízí také využití specifických systémů zavlažování k aplikaci „mykoinsekticidů“. Navzdory těmto výhodám se využití „mykoinsekticidů“ ve skleníkové produkci rostlin (plodin) rozvíjí pomalu. Důvodů tohoto stavu je více, např. pomalejší účinnost či inkompatibilita s fungicidy (Lacey et al. 2008; Wraight et al. 2007).

Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* byla s úspěchem odzkoušena v přírodních podmínkách jako kontrolní agens vhodné k šíření infekce mezi dospělci v populaci lýkožrouta *Ips typographus* (Kreutz 2001). V polním pokusu, ve kterém byli dospělci lákáni do izolátoru prostřednictvím modifikovaného feromonového lapače sloužícího ke kontaminaci jedinců sporami *B. bassiana* (použit komerční preparát Boverol[®]), byla zaznamenána redukce 52,8 % v délce matečných chodeb a 98,3 % v počtu kukelných komůrek, ve srovnání s kontrolní (neošetřenou) variantou. Délka matečných chodeb dosahovala průměrně 3,3 cm, oproti 7,0 cm v kontrolní variantě. Ve variantě, kde byli dospělci kontaminováni sporami *B. bassiana*, nebyly nalezeny larvy, kukly ani dospělci nové generace (bylo dosaženo 100% redukce oproti kontrolní variantě). Mortalita dospělců dosahovala 84 % (z toho 78 % zjevně infikovaných jedinců) oproti 50 % (z toho 14 % zjevně infikovaných jedinců) v kontrolní variantě (Kreutz et al. 2004a).

Výhody a nevýhody využití entomopatogenních hub jako „mykoinsekticidů“ v ochraně rostlin (upraveno podle Khan et al. 2012)	
VÝHODY	1. „Mykoinsekticidy“ mají obecně vysokou specifickou a obecně nevykazují (nebo jen v minimální míře) negativní dopady na přirozené antagonisty.
	2. Obecně nemají negativní dopad na životní prostředí a zdraví lidí.
	3. Žádné nebo velice nízké riziko vzniku rezistence díky specifickému mechanismu účinku entomopatogenních hub.
	4. Produkce sekundárních metabolitů předurčuje entomopatogenní houby k dalšímu biotechnologickému výzkumu.
	5. Některé entomopatogenní houby mají schopnost endofytického růstu, a mohou potenciálně sehrávat důležitou roli v aktivaci obranných reakcí rostlin.
	6. Perzistence entomopatogenních hub v prostředí může poskytovat dlouhodobý supresivní účinek vůči cílovým škodlivým organismům.
NEVÝHODY	1. Pomalejší účinnost a z toho plynoucí delší časový interval k usmrcení cílového organismu, ve srovnání s chemickou ochranou (řádově dny až týdny u „mykoinsekticidů“ oproti hodinám u chemické ochrany).
	2. Potřeba specifických podmínek pro úspěšnou infekci a rozvoj nákazy v populaci cílového organismu (tj. vlhkost, teplota, světelné podmínky).
	3. V některých případech nemusí „mykoinsekticidy“ pokrývat v rámci svého hostitelského spektra všechny dané cílové organismy, proto je potřeba dalších prostředků k docílení ochrany.
	4. „Mykoinsekticidy“ obecně mají oproti chemickým prostředkům na ochranu rostlin kratší trvanlivost a vyžadují specifické zacházení (např. uchovávání v chladu).
	5. Potřeba optimalizace aplikace „mykoinsekticidů“ k zajištění dlouhodobé ochrany před cílovými škodlivými organismy.
	6. Potenciální negativní dopady na životní prostředí a zdraví lidí (např. potenciální alergenita, toxigenita k necílovým organismům, patogenita k necílovým organismům).

2.4 Životní cyklus entomopatogenních hub

Entomopatogenní houby jsou unikátní organismy schopné napadat své hostitele přímo přes exoskelet, a proto nemusí být přijímány s potravou. Tato jejich specifická schopnost jim umožňuje infikovat také vajíčka a kukly hostitele, tudíž stádia nepřijímající potravu. Místo infekce je často lokalizováno mezi částmi ústního ústrojí, intersegmentálními záhyby nebo na spirakulách, tedy v místech s vyšší vlhkostí podporující klíčivost spor a menší sklerotizací kutikuly umožňující snazší penetraci (Hajek, St Ledger 1994; Zimmermann 2007a).

Životní/infekční cyklus entomopatogenních hub lze obecně rozdělit do následujících fází: (i) přichycení spor na povrch kutikuly hostitele, (ii) klíčení spor, (iii) penetrace kutikuly, (iv) překonání imunitních obranných reakcí hostitele, (v) proliferace a formování blastospor (tzv. kvasinkám podobné buňky) a hyf (parazitická fáze vývojového cyklu) uvnitř těla hostitele, (vi) externí růst na usmrceném hostiteli a tvorba nových spor (saprofytická fáze vývojového cyklu) (Zimmermann 2007a).

Přichycení spor entomopatogenních hub na povrch hostitele představuje iniciační fázi životního cyklu. Při kontaktu s hostitelem se spory přednostně váží na povrch kutikuly. Tyto

procesy mohou zahrnovat specifické mechanismy (např. funkce glykoproteinu), nebo mechanismy pasivní a nespecifické (např. elektrostatické a hydrofobní síly) (Fargues 1984), které byly prokázány u *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *N. rileyi* (Boucias et al. 1988). U těchto hub je přichycení ke kutikule hmyzího hostitele zprostředkováno hydrofobními interakcemi mezi kutikulou a „dobře-organizovanými fasciemi tyčinek“ v konidiích. Tyto tyčinky jsou tvořeny hydrofobními typy proteinů ve vzdušných strukturách (Kershaw, Talbot 1998). To potvrdil i Bidochka et al. (1995), který prokázal u *B. bassiana* přítomnost hydrofobních typů proteinů pouze u vzdušných konidií, nikoli u blastospor.

Klíčení spor a vznik nákazy závisí na mnoha faktorech, např. přítomnosti vhodného hostitele, resp. vývojového stadia, a některých faktorech prostředí (vlhkost, teplota). Klíčivost spor je dále ovlivněna některými kutikulárními lipidy, mastnými kyselinami s krátkým řetězcem, aldehydy, vosky, estery, ketony a alkoholy, které mohou mít antimikrobiální vlastnosti. Nicméně kutikula může být také pokryta sloučeninami, jako jsou volné aminokyseliny či peptidy, čili substancemi důležitými k rozpoznání vhodného hostitele, jež mohou spouštět mechanismy potřebné pro uchycení a následné klíčení spor. Obecně platí, že konidie *B. bassiana* začínají klíčit po 10 hodinách a je z větší části dokončeno do 20 hodin při teplotě 20–25 °C (Zimmermann 2007a).

Klíčení spor začíná tvorbou penetrující hyfy (Boucias, Pendland 1991), nebo hyfy a apresoria, jež vytváří „penetrující kolík“, jímž za pomoci mechanického tlaku/enzymatické aktivity proniká přes kutikulu (Zacharuk 1970a; Zacharuk 1970b). Jako klíčový prvek umožňující vznik patogenního vztahu k hostiteli se u *M. anisopliae* a *B. bassiana* jeví tvorba apresoria, přičemž objasnění podnětů vyvolávajících tvorbu apresoria stojí v popředí porozumění patogennímu procesu (Clarkson, Charnley 1996).

Produkce kutikulu-degradujících enzymů lipáz, proteáz a chitináz, je dalším z klíčových determinantů infekčního procesu, usnadňujícím penetraci a poskytujícím snadný zdroj živin (Charnley 1984). Tyto enzymy jsou produkovány postupně ve sledu tak, jak se setkávají s jednotlivými substráty (Smith et al. 1981).

Hmyz není pasivní v odezvě na infekci a může na ni reagovat od okamžiku přichycení spor na povrch kutikuly a pokusu o penetraci (Inglis et al. 2001) kombinací humorálních (fenoloxidázy, lecitiny, antimikrobiální peptidy, reaktivní formy kyslíku, inhibitory proteáz) a/nebo buněčných obranných mechanismů (fagocytóza, enkapsulace) (Bidochka et al. 1997; Gillespie et al. 2000). Aktivace vrozených obranných mechanismů následuje po rozpoznání napadení prostřednictvím změny vlastností bazální membrány a látek asociovaných s buněčnou stěnou patogena (Gunnarson 1988). Ve velkém množství případů jsou entomopatogenní houby schopny překonat obranné reakce hostitele pokračujícím růstem i poté, kdy došlo k jejich fagocytóze a jejich schopnost šíření v organismu byla potlačena (Hung et al. 1993).

Po úspěšné penetraci a průniku do těla hostitele začíná houba pučením produkovat tenkostěnná tělíška (blastospory) postrádající klasicky utvářenou buněčnou stěnu, ale mající na plazmatické membráně tenkou fibrilární vrstvu. Tato tělíška jsou poté pasivně distribuována hemolymfou po těle hostitele, což patogenovi umožňuje napadat ostatní tělní orgány (Zimmermann 2007a).

Smrt hostitele, již je zakončena parazitická fáze infekčního cyklu, může nastat (za příznivých podmínek během 3–7 dnů) vlivem kombinace několika faktorů zahrnujících

vyčerpání živin z hemolymfy a tukového tělesa (fyziologické vyhladovění), fyzikální zabránění cirkulace hemolymfy, napadení tělních orgánů či vliv účinku toxinů (Boucias, Pendland 1998; Inglis et al. 2001). Například Ansari et al. (2007) prokázali vysokou účinnost dvou kmenů *M. anisopliae* (V275 a ERL700) na půdní stádía třásněnky *Frankliniella occidentalis*, kdy dosáhly 85–96% mortality po 11 dnech od inokulace. Landa et al. (1994) ve svém standardním testu (FDGI) prokázal, že entomopatogenní houba *I. fumosorosea* (kmen PFR97) je schopna na čtvrtém nymfálním stádiu molice *B. argentifolii* realizovat celý životní cyklus během 5 dnů.

Po uhynutí hostitele nastává saprofytická fáze životního cyklu, kdy dochází k růstu houby uvnitř těla usmrceného hostitele, jeho mumifikaci a jsou-li příznivé podmínky (především optimální vlhkost a teplota), dochází k externímu růstu mycelia, na kterém se vytvářejí nové generace spor, kterými může docházet k šíření nákazy do prostředí.

Entomopatogenní houby v průběhu svého životního cyklu produkují široké spektrum sloučenin s biologickou aktivitou vůči ostatním organismům, převážně produkty sekundárního metabolismu. Tyto metabolity mají rozličnou biologickou funkci odvislou od houbou osídlené ekologické niky. Některé metabolity mohou mít antibiotickou účinnost proti antagonistickým mikroorganismům, či mohou bránit růstu saprotrofních mikroorganismů na usmrceném hostiteli, a tím vytvářet vhodné podmínky pro přežívání entomopatogenní houby. Některé bioaktivní metabolity jsou také důležitými determinanty patogenicity (Strasser et al. 2000), zatímco jiné mají antifidantní/repelentní vlastnosti, které pravděpodobně odrazují mykofágní organismy (Vey et al. 2001). Další pohled nabízejí Calvo et al. (2002), kteří rozdělili sekundární metabolity dle jejich funkce do tří skupin: (i) metabolity aktivující sporulaci, (ii) pigmenty potřebné k tvorbě spor a (iii) toxické metabolity produkované v průběhu životního cyklu (mykotoxiny). Fakt, že entomopatogenní houby přemohou/usmrtní hostitele před rozsáhlou invazí do tělních orgánů podporuje tvrzení, že sekundární metabolity jsou zodpovědné za usmrcení hostitele (Butt 2002).

Nejvíce studovanými druhy entomopatogenních hub, co se sekundárních metabolitů týče, jsou *B. bassiana* a *M. anisopliae*. Méně sledovanými druhy, avšak z pohledu komerční produkce důležitými, jsou *I. fumosorosea*, *L. lecanii* (dříve *Verticillium lecanii*), *Aschersonia* spp., *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium flavoviride* a druhy rodu *Hirsutella* (Vey et al. 2001; Butt 2002). Hlavní skupinou sekundárních metabolitů produkovaných entomopatogenní hubou *M. anisopliae* jsou destruxiny, dále pak swainsonin a cytochalasin. U hub rodu *Beauveria* byla prokázána tvorba beauvericinu, bassianolidu, beauverilidů, bassiacridinu, bassianinu, tenellinu, oosporeinu a oxalických kyselin (Vey et al. 2001; Zimmermann 2007a,b).

Na rozdíl od *B. bassiana* a *M. anisopliae* není u *I. fumosorosea* mnoho informací o produkci metabolitů/toxinů (Zimmermann 2008). Bemardini et al. (1975) jako první produkt sekundárního metabolismu objevil beauvericin a následně Jegorov et al. (1994) identifikoval dva beauverolidy (L, La).

2.5 Epizoozie způsobené entomopatogenními houbami

Epizoozie entomopatogenních hub v populacích hmyzu mohou být vyvolány v polních podmínkách a mohou sehrávat klíčovou roli v přirozené regulaci hmyzích škůdců. Epizoozie

je výsledkem složité interakce mezi hostitelem, patogenem a prostředím v čase (tzv. tetraada nákazy). Přičemž u mnoha druhů entomopatogenních hub je známo poměrně málo o faktorech zodpovědných za vznik a přetrvávání nákazy. K vyvolání nákazy je nezbytné určité (prahové) množství inokula, zatímco v ochraně rostlin jsme často zaměřeni pouze na použití velkého množství virulentních propagulí proti cílovému škůdci (hostiteli). Častým výsledkem takového přístupu je nedostatečné potlačení škůdců, jelikož prahové množství inokula není statickým prvkem, ale je ovlivněno všemi faktory „tetraady“ onemocnění (Inglis et al. 2001).

Infekce (epizoocie) způsobené entomopatogenními houbami jsou jednou z pozorovaných příčin kolapsu přemnožených populací hmyzu. Patologie hmyzu definuje epizoocii jako neobvykle velký počet případů napadení v populaci hostitele, avšak epizoocie se vyskytují sporadicky, jsou v daném místě omezené časově a charakterizované náhlou změnou prevalence. Entomopatogenní houby jsou neustále přítomné v populacích hostitelského hmyzu, nicméně pokud se hustota hostitelské populace nachází v normálu, epizoocie se vyskytují jen zřídka (enzootická fáze nákazy). Nicméně v průběhu přemnožení hmyzu se mohou entomopatogenní houby namnožit ve velké míře a šířit se v prostředí, čímž mohou významně přispět ke snížení populace (Fuxa, Tanada 1987).

Je velice obtížné spolehlivě předpovědět výskyt nákazy a iniciovat stejné faktory v různých systémech interakce patogen-hostitel pro její rozvoj v populacích škodlivého hmyzu (Augustyniuk-Kram, Kram 2012).

Příkladem přírodní epizoocie je napadení housenek *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) entomopatogenní houbou *N. rileyi* (Farlow) Samson v Mexiku. Tato nákaza byla nalezena v porostu kukuřice bez závlahy (29 °C, 86% RH), kdy infikované housenky byly pokryté bělavým, později zelenošedým myceliem. Nejvíce infikovaných housenek se vyskytovalo v červenci a srpnu, kdy bylo nalezeno 6,0, resp. 4,1 infikovaných housenek na 1m² (Ríos Velasco et al. 2010).

Townsend et al. (1995) pozorovali mezi lety 1993 a 1995 nákazu houbou *Beauveria* sp. na larvách *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) v pastvinách nedaleko Karapira na Novém Zélandu, přičemž během jara roku 1993 došlo až k 30% mortalitě v populaci, zatímco epizoocie pozorovaná v roce 1994 nedaleko Matangi vedla k 99% mortalitě v populaci. Na obou lokalitách byly příznaky nákazy pozorovány nejčastěji u třetího larválního instaru během jara. Zatímco epizoocie nedaleko lokality Karpiro byla způsobena entomopatogenní houbou *B. brongniartii*, nedaleko lokality Matangi vyvolal epizoocii kmen entomopatogenní houby *B. bassiana*.

První epizoocie entomopatogenní houbou *I. fumosorosea* na molici *B. tabaci* na Kubě (oblast Jižní Havana) byla pozorována v dubnu roku 1990 po období vydatných dešťů. Obdobně byly epizoocie pozorovány i v následujících letech (1991 a 1992), vždy v období s vysokou vzdušnou vlhkostí. Mortalita nymfálních stádií se pohybovala v rozmezí 70–80 %, přičemž se tento druh entomopatogenní houby na *B. tabaci* spontánně objevil také v některých sklenících Institutu ochrany rostlin v Havaně (Castineiras 1995).

Existuje nepochybně mnoho izolátů a/nebo druhů hub, jenž hrají doposud neznámou a/nebo nepochopenou roli v regulaci populací škodlivých organismů, a to z prostého důvodu, jelikož systémy, ve kterých se etablojí, nejsou dostatečně prostudovány nebo jsou považovány za nedůležité, co se našeho současného poznání o jejich ekologii týče (Pell et al. 2010). Víme mnohé o vlivu klíčových environmentálních faktorů, tj. vlhkosti, teplotě a UV záření ve

fyloplánu, dále pak o vlivu vlhkosti, teploty a dalších jednotlivých charakteristik půdního prostředí, jenž mohou ovlivnit úspěšnost účinnosti entomopatogenních hub. Tyto proměnné vytvářejí navzájem komplexní, dynamické vlivy a stávající soubor našich znalostí je prozatím jen začátek našeho pochopení (Jaronski 2010).

2.6 Biotesty

Využití biotestů za účelem posouzení účinnosti entomopatogenních hub na hmyzí hostitele má v podstatě neomezené možnosti. Tato skutečnost v kombinaci s faktem, že se jedná o množství entomopatogenních hub, společně s velkým spektrem jejich hostitelských druhů hmyzu znamená, že obecně zde nejsou standardizované metody biotestů, co se entomopatogenních hub jako celku týče. V důsledku této skutečnosti musí být biotesty přizpůsobeny potřebám hostitele, patogena a zvolenému cíli, za jehož účelem jsou testy prováděny. Biotesty musejí být opakovatelné a spolehlivé a mohou být prováděny za účelem kvantifikace vztahu hostitel-patogen (přesné určení patogenity a/nebo virulence, především ale pak virulence) a vlivu biotických a abiotických faktorů na tento interakční komplex (Burges, Thompson 1971; Butt, Goettel 2000). Biotesty entomopatogenních hub se využívají ve velké míře k: (i) determinaci virulence, (ii) srovnání virulence mezi jednotlivými izoláty, (iii) determinaci spektra hostitelů, (iv) determinaci epizootického potenciálu a (v) studiím vlivu biotických a abiotických faktorů (vliv vývojového stádia, hostitelské rostliny, teploty, vlhkosti, formulace přípravku). Cíle biotestu musejí být jasně definovány ještě před přijetím samotného postupu a ačkoli tyto postupy musejí být navrženy s důrazem na co nejvyšší účinnost, musejí být navrženy také tak, aby poskytovaly smysluplné výstupy (Butt, Goettel 2000). Variabilita výsledků může být způsobena kumulativní změnou jednotlivých komponent testu a z tohoto důvodu je nutné detailně standardizovat každou jednotlivou složku testu, především pak pokud je test ve fázi vývoje (Burges, Thompson 1971). Volba vývojového stádia hostitele, infekčních částic, metod formulace a inokulace, podmínek inkubace, metod posouzení úmrtnosti, designu biotestu a statistické analýzy, musí být pečlivě zvážena (Butt, Goettel 2000).

2.6.1 Inokulace

Aplikace přesné dávky kontrolního agens je nezbytná pro následné přesné a opakovatelné výsledky biotestů. A zatímco u většiny ostatních patogenních organismů je vyžadována inokulace *per os*, u mitosporických entomopatogenních hub je potřeba inokulace ve většině případů přes integument, avšak při těchto metodách aplikace může být obtížné dosáhnout přesnosti v závislosti na druhu a velikosti hostitele při požadavku ošetření velkého množství jedinců. Z těchto důvodů byly vyvinuty metody, jež by měly aplikaci zjednodušit a poskytovat opakovatelné výsledky, i přesto, že v některých případech není známa přesná hladina dávky bioagens. Velice nepřesným metodám, ke kterým např. patří možnost nechat jedince daného hostitele pohybovat se po povrchu vysporulované kultury entomopatogenní houby, poskytují pouze přibližné výsledky, kterým je třeba se vyhnout (Gottel, Inglis 1997). Zvolený způsob inokulace je ovlivněn především formou vlastního inokula, velikostí a druhem hostitele. Bez ohledu na zvolenou metodu ošetření je nebytně nutné determinovat

životaschopnost infekčních částic bioagens (ať už se jedná pouze o částice samotné a/nebo formulované), v co nejkratší době před vlastní aplikací, jelikož v opačném případě by nemuselo být již zjištěné, zda je nedostatečná účinnost způsobena např. nízkou životaschopností infekčních částic (Butt, Goettel 2000).

2.6.2 Inkubace a posouzení mortality

Po procesu inokulace musí být hostitel inkubován, nejlépe pak v prostředí řízených podmínek (teplota, fotoperioda a vlhkost). Výběrem vhodné inkubační arény, režimu krmení a metody inkubace je ovlivněna úspěšnost samotného biotestu a tyto jednotlivé prvky budou odlišné dle potřeb zvoleného hostitele. Obecnou platnost má fakt, že podmínky v inkubační aréně by měly být příznivé pro zajištění přežití neošetřených jedinců. V kontrolní variantě by měla hodnota mortality jedinců dosahovat maximálně 10 % (Gottel, Inglis 1997), 15–20% mortality jedinců v kontrolní variantě je obecně považována za „podezřelou“ a hodnoty vyšší než 20 % musí být interpretovány s opatrností (Butt, Goettel 2000). Hodnocení úmrtnosti je obecně prováděno každý den a vzhledem k (relativně) pomalé účinnosti většiny entomopatogenních hub musí být prováděno po dobu alespoň dvou týdnů od inokulace (Gottel, Inglis 1997), nicméně tato doba je opět závislá na několika faktorech (vlhkost, teplota, virulence kmene entomopatogenní houby, citlivost hostitele/vývojového stádia atd.). Mrtví jedinci by měli být odstraněni před objevením sporulace na povrchu kadaveru z důvodu možného přenesení nákazy na ostatní živé jedince. Pro ověření, zda byl jedinec usmrcen následkem inokulace daným druhem/kmenem entomopatogenní houby, jsou kadavery inkubovány v podmínkách vysoké vzdušné vlhkosti a dojde-li následně k externímu růstu mycelia daného druhu/kmene entomopatogenní houby, je takovýto jedinec považován za usmrceného v důsledku aplikace daného agens (Gottel, Inglis 1997).

Metody inokulace využívané v biotestech entomopatogenních hub (upraveno podle Gottel, Inglis 1997).

Aplikace injektací

Tento způsob aplikace je nejčastěji využíván pro potřeby studia imunologických reakcí. Množství aplikovaného inokula je závislé na velikosti hmyzího hostitele, kdy by měly být přednostně aplikovány nízké objemy tak, aby se co nejvíce zabránilo narušení fyziologických procesů. Dávka je vstříknuta přímo do hemocelu přes intersegmentální membránu. Vzhledem k tomu, že kutikula sehrává významnou roli v infekčním procesu entomopatogenních hub, jsou aplikace injektací jen málokdy využívány k porovnávání vlastního fenoménu virulence (např. Vilcinskas a Mařha (1997) využili metodu injektace k vpravení 10 µl suspenze blastospor *B. bassiana* do hemocelu larev *Galleria mellonella* s cílem ověřit účinek imunohumorálních reakcí).

Aplikace per os

Tato aplikační metoda je velice podobná aplikaci injektací, nicméně zde se jedná o tzv. mikroinjektaci a inokulum je vpraveno ústním otvorem do ústní dutiny a/nebo střeva. Nicméně tento způsob aplikace je náročný z důvodu možného poškození střevní stěny.

1/2

Alternativní metodou je vpravení inokula do návnady či zdroje potravy, nicméně při takovéto aplikaci je prakticky nemožné zabránit povrchové kontaminaci hostitele. Z tohoto důvodu závěry týkající se nákazy vzniklé po *per os* inokulaci by měly být podpořeny histologickými výstupy (např. Allee et al. (1990) inokulovali metodou *per os* 21 dní staré larvy mandelinky *Leptinotarsa decemlineata*, kdy larvám byla podána potrava v podobě extraktu z bramborových listů smíchaná s 1, 4 či 8 mg konidií/ml entomopatogenní houby *B. bassiana*. K zamezení povrchové kontaminace byly larvy krmeny 5-10 min. skrze díru v parafilmu).

Aplikace namáčením

Ačkoli při tomto způsobu nemůže být dávka infekčních částic, již je hostitel ošetřen, přesně stanovena (částice ulpěle na hostiteli), je tento způsob hojně využíván v biotestech mitosporických hub. Hmyzí hostitel je ponořen do suspenze o dané koncentraci infekčních částic po přesně stanovený časový interval (např. Kreutz et al. (2004b) v laboratorním testu účinnosti *B. bassiana* proti dospělcům *I. typographus* namáčel jedince v suspenzi po dobu 3 s). Dávka je pak obvykle vyjadřována jako počet infekčních částic na 1 ml suspenze.

Aplikace postřikem

Jeden z nejběžnějších způsobů inokulace, kdy jsou infekční částice naneseny přímo na hostitele. V dnešní době jsou již komerčně dostupná experimentální zařízení, z nichž je v souvislosti s aplikacemi entomopatogenních hub nejčastěji využívána Potterova věž.

Aplikace „kapkou“

U větších druhů hmyzu může být aplikace provedena prostřednictvím kapky o známé dávce infekčních částic na povrch těla hostitele, kdy není problém aplikovat kapky o objemu nižším než 0,5 μ l. Nicméně mohou nastat problémy při použití vodních suspenzí, kdy je obtížné přesné umístění kapky na povrch hydrofobní kutikuly hmyzu. V takových případech je vhodné umístění kapky na těch tělních částech, kde by mohla být absorbována kapilárními pohyby. (Tento způsob aplikace inokula použili např. Prior et al. (1995), kdy aplikovali 2–5 μ l kapku konidiální suspenze entomopatogenních hub formulovaných v rostlinném oleji pod štít předohrudi dospělců *Schistocerca gregaria*). Dávka je pak obvykle vyjadřována jako počet infekčních částic na jedince.

Nepřímé metody aplikace

Nepřímé metody mohou být takové metody, kdy se inokulum přeneso na hostitele prostřednictvím druhotného substrátu. Nejběžnějším způsobem je ošetření substrátu a následné přenesení hostitele na povrch nebo do tohoto substrátu (např. půda), kde dojde k vlastní inokulaci při pouhém pohybu hostitele či při přijímání potravy. Metody ošetření substrátu jsou v podstatě stejné, tak jak byly popsány výše (např. namáčení, nastříkání).

2.7 „Bezpečnost“ entomopatogenních hub

Vývoj bezpečných alternativ k pesticidům spočívá např. právě v produktech na bázi entomopatogenních hub, které se těší vyššímu zájmu veřejnosti, nicméně již jejich samotná registrace je velkou překážkou v komercializaci těchto produktů. Proces registrace je zdoluhavý a nákladný, přičemž pravidla a obecné zásady byly do značné míry vyvinuty primárně pro pesticidy (Butt et al. 2001). Bezpečné používání jakéhokoli mikrobiálního kontrolního agens přímo souvisí s jeho hostitelským spektrem (Goettel 1995). Zodpovědné použití entomopatogenních hub v biologické ochraně musí být nutně podmíněno znalostí jejich účinku na necílové organismy. Za nezbytnou a základní je považována znalost hostitelské specifity v polních podmínkách, tzv. ekologické spektrum hostitelů (naneštěstí faktory determinující hostitelskou specifitu se pravděpodobně odlišují v rámci jednotlivých taxonomických skupin entomopatogenních hub a obecně jsou špatně chápány). Na druhou stranu laboratorní hostitelská specifita, tzv. fyziologické spektrum hostitelů, zahrnuje širší hostitelské spektrum ve srovnání se specifitou patogena v polních podmínkách, avšak i přesto mohou poskytovat pouze omezené poznání, co se nepřímých účinků entomopatogenních hub týče. Nynější rozhodování o bezpečnosti entomopatogenních hub je obecně založeno na laboratorních studiích, ačkoli ekologické spektrum hostitelů může být přesně determinováno až po jejich introdukci do prostředí (Hajek, Butler 2000). Vysoce specifické entomopatogenní houby jako *Pandora neoaphidis*, jež je svým hostitelským spektrem omezena pouze na mšice, představují zdánlivě minimální hrozbu ohledně negativních dopadů na necílové organismy, zatímco entomopatogenní houby s širokým hostitelským spektrem jako *B. bassiana* (potenciálně může infikovat více než 700 druhů), zdánlivě představují větší riziko (Goettel 1995).

Postupně byly identifikovány čtyři potenciální nežádoucí účinky jako bezpečnostní problémy související obecně s využitím mikroorganismů (včetně entomopatogenních hub) v rámci biologické ochrany rostlin: (i) přesun (vytlačení) necílových organismů v rámci konkurence entomopatogenních hub, (ii) alergenita, (iii) toxicita k necílovým organismům a (iv) patogenita k necílovým organismům (Cook et al. 1996). Dokonce i když jsou splněny veškeré regulační požadavky a výsledný produkt nevykazuje žádné negativní účinky na necílové organismy v polních pokusech, tak nelze říci, že je výsledný produkt naprosto bezpečný k necílovým organismům. Pouze dlouhodobým a obecně širokým využitím jsme schopni kompletního zhodnocení účinků na necílové organismy (Vestergaard et al. 2003). Jeden z primárně „skrytých“ účinků, který by měl být brán v úvahu jako potenciální riziko, by mohl vyvstat po vyčerpání populace cílového hostitele jako zdroje potravy (Goettel, Hajek 2001).

Navzdory mnoha potenciálním nebezpečím, kterými entomopatogenní houby disponují, jsou mnohé druhy bezpečně masově vyráběny a využívány v ochraně rostlin před škodlivými organismy, bez jakýchkoli zjevných negativních dopadů na zdraví či životní prostředí (Goettel et al. 2001).

2.8 Stručná charakteristika vybraných druhů entomopatogenních hub

2.8.1 *Beauveria bassiana* (Balsamo-Criv.) Vuillemin

Agostino Bassi di Lordi, italský vědec, poprvé pozoroval nákazu *B. bassiana* na larvách bource *Bombyx mori* a započal s prvními experimenty (1807), kterým se věnoval po dobu následujících 30 let. Tato nákaza, známá také jako bílá muskardina (v Itálii označovaná *mal del sengo*, *calcinaccio*, *calcinetto* či *calcino*), která chronicky postihovala chovy bource ve Francii a Itálii v 18. a 19. století, se vyznačovala rychlým usmrcením a mumifikací napadené larvy, která byla za podmínek vysoké vzdušné vlhkosti na povrchu pokryta bílým prášným myceliem. Následně se v roce 1835 začal studiem této entomopatogenní houby zabývat italský přírodovědec Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, který tuto nákazu pojmenoval na počest Bassiho *Botrytis bassiana*. V roce 1911 se studiem *B. bassiana* zabýval Beauverie a v roce 1912 Vuillemin, který na jeho počest vytvořil nový rod *Beauveria* (Rhener 2005; Zimmermann 2007a).

B. bassiana je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, jejíž hostitelské spektrum zabírá více než 700 druhů hmyzu (Goettel et al. 1990; Inglis et al. 2001) z řádů Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae, Embioptera (Zimmermann 2007a). *B. bassiana* ve výskytu preferuje přirozená stanoviště, především pak lesní prostředí, ačkoli byla často zaznamenána také na jiných stanovištích (Medo, Cagán 2011). Životní cyklus probíhá především v půdním prostředí, nicméně byla nezdávka nalezena také na infikovaných jedincích mimo půdní niku (Meyling et al. 2011).

Kolonie na bramborodextrozovém agaru dosahují po 10 dnech kultivace ve 23 °C průměrně 15–32 mm, počáteční bílé zbarvení často přechází v žluto-bílé. Vegetativní hyfy jsou hyalinní, hladké a větvené. Jednotlivé konidiogenní buňky kulovitého až baňkovitého tvaru s dobře vyvinutou rachis jsou obvykle v hustých klastrech po 5 a více. Konidie jsou blastické hyalinní kulovité až široce eliptické, nikoli však eliptické, o velikosti 2–3 × 2–2,5 μm (Mycobank 2013a,b).

Dle Farii a Wraighta (2007) tvořil podíl bioeparátů formulovaných na bázi *B. bassiana* v době vydání publikace 33,9 % z celkového počtu mykoinsekticidů a mykoakaricidů, což bylo celkově 58 produktů, z nichž aktivních v té době bylo 45.

2.8.2 *Beauveria caledonica* Bissett & Widden

Tento druh entomopatogenní houby byl původně izolován z půdy ve Skotsku (Glare et al. 2008). Mycelium se vyznačuje bílou až oranžovobílou barvou. Hyfy jsou hyalinní, hladké. Konidiofory jsou „subclavatozního“ (kyjovitého) až krátce cylindrického tvaru. Elipsoidní konidiogenní buňky se vytvářejí laterálně na hyfách. *B. caledonica* vytváří konidie cylindrického, mírně zakřiveného tvaru, uprostřed někdy zúžené, o velikosti 2,6–4,2 × 1,6–2,3 μm (Anonym 2013; Rehner et al. 2006), k čemuž došli také Rhener a Bucklet (2005), kdy izoláty ARSEF 2567 a 1567 produkovaly konidie o velikosti 3,7–5,2 × 1,9–2,3 μm. Glare et al. (2008) zjistili, že *B. caledonica* je v laboratorních biotestech vysoce patogenní vůči dospělcům *Hylurgus ligniperda* (Curculionidae: Scolytinae) a larvám *Tenebrio molitor*

(Coleoptera: Tenebrionidae) a Reay et al. (2008) došli k závěru, že *B. caledonica* je obecně asociovaná s přirozeným prostředím kůrovcovitých brouků, když tento druh entomopatogenní houby odizolovali z uhynulých jedinců, půdy, kůry a “podkorní niky”, avšak nikoli z živých jedinců. Obecný závěr pak zní, že *B. caledonica* by mohla potenciálně sehrávat důležitou roli v biologické ochraně proti kůrovcovitým broukům.

2.8.3 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

První zmínky o rodu *Metarhizium* pocházejí z pozdních 70. let 19. stol., kdy Metschnikoff našel a popsal nákazu na larvách *Anisoplia austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae) na Ukrajině a použil název *Entomophthora anisopliae*, který později změnil na *Isaria destructor*. Tato nákaza zvaná též „zelená muskardina“, byla podle tvorby „krusty“ (povlaku) zelených konidií na povrchu infikovaného hostitele později (v roce 1883) Sorokinem přeznačena do nového rodu *Metarhizium* (Roberts, St Ledger 2004; Zimmermann 2007b).

Rod *Metarhizium* je definován na základě uspořádání válcovitých, směrem k vrcholu se zužujících fialid, nesoucích řetízky úzce válcovitých hyalinních spor, které jsou obecně zelené, vytvářející kompaktní sloupce (Mycobank 2013c; Zimmermann 2007b).

Obecně byly izoláty rodu *Metarhizium* získány z půdních vzorků a infikovaného hmyzu od Arktidy po tropické oblasti, čili vyskytuje se na všech kontinentech kromě Antarktidy, nicméně výskyt byl potvrzen také v blízkosti Antarktického kruhu (Roddam, Rath 1997; Zimmermann 2007b). V podmínkách mírného klimatu je nejvyšší četnost výskytu ve vzorcích odebraných z půd trvalých travních porostů (Rodrigues et al. 2005) a zemědělsky obhospodařovaných pozemků (Meyling et al. 2011; Schneider et al. 2012). Jelikož je výskyt obecně nejběžnější v pravidelně „narušovaném“ (zemědělsky obhospodařovaném) půdním prostředí, použili Meyling a Eilenberg (2007) pro *M. anisopliae* označení „agricultural species“, k čemuž ještě přispívá fakt, že *M. anisopliae* je obecně považováno za tolerantní k pesticidům (Klingen, Haukeland 2006). Životní cyklus *M. anisopliae* probíhá převážně v půdním prostředí (Meyling et al. 2011), kde se za vhodných podmínek mohou rozvíjet epizoozie vedoucí k rychlému poklesu četnosti jedinců hostitelských populací (Pell et al. 2010). Hostitelské spektrum *M. anisopliae* představuje více než 200 druhů hmyzu, přičemž se jedná o řády: Coleoptera, Dermaptera, Diptera, Isoptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonaptera a Symphyla (Roberts a St Ledger 2004; Zimmermann 2007b). Faria a Wraight (2007) podali přehled produktů na ochranu rostlin formulovaných na bázi *M. anisopliae*, kdy dohledali 58 produktů (což tvořilo 33,9 % z počtu všech „mykoinsekticidů a mykoakaricidů“), a z čehož bylo 44 těchto produktů v té době aktivních.

2.8.4 *Isaria fumosorosea* Wize

Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* (dříve *Paecilomyces fumosoroseus*), jež byla poprvé popsána v roce 1904 na infikované larvě nosatce *Cleonus punctiventris*, je v dnešní době dobře známým druhem s celosvětovým rozšířením v různorodých klimatických podmínkách (od tropického přes subtropické až po mírné pásmo) a širokým spektrem hostitelů, což z tohoto druhu dělá potenciální agens uplatnitelné v biologické ochraně (Lacey et al. 1996;

Zimmermann 2008). Byla izolována z mnoha druhů bezobratlých (převážně z řádu Lepidoptera), ze vzduchu, rostlin a dále také z půdy (Zimmermann 2008), přičemž nejčastěji je zjištěna v půdních vzorcích odebraných z tzv. „agrárních valů“ (Medo, Cagáň 2011; Meyling, Eilenberg 2006).

Kolonie na malt agaru rostou středně rychle a dosahují průměru asi 4 cm do 14 dnů v teplotě 25 °C. Vegetativní hyfy jsou hladké, hyalinní. Konidiální struktury jsou většinou komplexní – vztyčené konidiofory sestávající z přeslenitých větví nesoucích přesleny po 4–6 v bazální části kulovitých až elipsoidních fialidách, zužujících se do dlouhého zřetelného krčku. Konidie jsou cylindrické až vřetenovité o velikost 3–4 × 1–2 μm (Mycobank 2013d).

Mnohé studie poukazují na velký potenciál a možnost uplatnění *I. fumosorosea* v biologické ochraně plodin, především před molicí *B. argentifolii* (Vidal et al. 1997; Vidal et al. 1998a; Wraight et al. 1998) a molícím obecně. U *I. fumosorosea* byl rovněž potvrzen statut mykoparazita vůči padlí *S. fuliginea* (Kavková, Čurn 2005).

Dle Farii a Wraighta (2007) tvořil, v době vypracování přehledu, podíl produktů na bázi *I. fumosorosea* 5,8 % z celkového počtu všech „mykoinsekticidů a mykoakaricidů“ (což bylo 10 produktů, z nichž bylo v té době 7 aktivních). V současnosti patří k nejznámějším a nejpoužívanějším produktům formulovaným na bázi blastospor *I. fumosorosea* přípravek s obchodním názvem „PFR-97TM“ firmy Certis USA, jenž je v Evropě distribuován pod obchodním názvem PreFeRal[®] a přípravek „No-FlyTM“ firmy Natural Industries, Inc.

2.9 Teplota, vlhkost, sluneční záření – hlavní abiotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

2.9.1 Teplota

Šíření a přežívání jakéhokoli mikroorganismu v prostředí je silně ovlivněno nejen biotickými, ale i několika abiotickými faktory, z nichž nejdůležitější jsou teplota, vlhkost a sluneční záření. Teplota ovlivňuje entomopatogenní organismus různými způsoby – ovlivněním jeho klíčivosti, růstu a životaschopnosti na a v hostitelském organismu a v prostředí (Zimmermann 2007a).

Optimální teplota se pro většinu entomopatogenních hyfomycet pohybuje v rozmezí 20 až 25 °C. V teplotě vyšší než 30 °C je vegetativní růst většiny taxonů inhibován a růst obvykle ustává v teplotě řádově 37 °C (Inglis et al. 2001). Jedná se však o záležitost související s kmenem, protože ačkoli např. některé kmeny *M. anisopliae* vykázaly silnou redukci růstu v teplotě 32 °C, jiné rostly i v teplotě 35 °C (Ment et al. 2011). Zimmermann (2007b) dále uvádí, že se vyskytují i izoláty schopné růst ve 36, resp. 38 °C. U jiných kmenů *M. anisopliae* 48hodinová inkubace ve 37 °C významně prodloužila dobu klíčení a ve 40 °C dramaticky snížila klíčivost až na 0,5–2 % i přesto, že konidie byly následně přesunuty do optimální teploty 25 °C (Ment et al. 2011). Mnoho izolátů *B. bassiana* a *M. anisopliae* vykazuje zpoždění obnovy normálního růstu po vystavení krátké periodě v teplotách nad jejich obvyklé prahové hodnoty (Fernandes et al. 2008; Jaronski 2010).

I. fumosorosea obecně preferuje vyšší teploty ve srovnání s *I. farinosa*, ale jsou zde silné rozdíly mezi jednotlivými kmeny (Zimmermann 2008). Houba *M. anisopliae* měla nejširší rozmezí teplot pro růst a nejvyšší optimum (30 °C). *B. bassiana* a *I. farinosa* rostly

v užším rozmezí teplot (5–30 °C) a optimum pro růst bylo 25, resp. 20 °C. Růst *B. bassiana* a *I. farinosa* téměř ustal ve 37 °C, zatímco druh *M. anisopliae* (izolát V90) byl překvapivě schopen růst i ve 40 °C (Hallsworth, Magan 1999), kde i slabě sporuloval (Arthurs a Thomas 2001). To, že houba *M. anisopliae* roste hůře ve vyšších teplotách, neznamená, že nesnese krátkodobé teplotní šoky až 40 °C, tudíž není souvislost mezi optimální teplotou a horní hranicí, kterou je izolát schopen snést (Ment et al. 2011). Okamžik termální smrti u termotolerantnějších izolátů *B. bassiana* může nastat až ve 46 °C po 6 hodinách, méně než 20 % konidií těchto izolátů zůstalo životaschopných po vystavení 47 °C po dobu 2 hodin (Fernandes et al. 2008). Důležitou roli v rozdílné teplotní toleranci může hrát i tloušťka buněčné stěny, která je tlustší u konidií *M. anisopliae* než u konidií *B. bassiana* (Rangel et al. 2008). Termotolerance může být částečně navyšována např. přidavkem kyseliny salicylové do živného média nebo snížením obsahu karbohydrátů. Vyšší koncentrace kys. salicylové však může narušit mechanismus tolerance k teplotnímu stresu (Rangel et al. 2012).

Při hodnocení nízkých teplot vykázala v 10 °C nejrychlejší růst houba *V. lecanii*, naopak nejpomalejší *M. anisopliae*, která vykázala i celkově nejpomalejší růst v 10 °C mezi 5 testovanými druhy entomopatogenních hub (Yeo et al. 2003). *M. anisopliae* v 10 °C již ani nesporeluje (Arthurs, Thomas 2001) a vykazuje klíčivost méně než 5 % a pomalý růst i v 15 °C. Při hodnocení vlivu teploty byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými izoláty u klíčivosti, myceliálního růstu a citlivosti cílového organismu k houbové infekci (Dimbi et al. 2004). Izoláty *Metarhizium* spp. byly v chladu obecně méně aktivní ve srovnání se standardním izolátem *B. bassiana* (Fernandes et al. 2008).

Okolní teplota ovlivňuje rovněž stupeň infekce a čas potřebný k usmrcení hmyzu ošetřeného entomopatogenními hyfomycetami (Inglis et al. 2001). V porovnání s nadzemními stanovišti není přežívání konidií v půdě ovlivněno v takové míře, protože toto prostředí poskytuje ochranu před extrémě prostředí (McCoy et al. 1992). Při optimální teplotě může koncentrace kolonií v půdě prudce vzrůst (Ekesi et al. 2003). Jak shrnuje Jaronski (2010), v určitých regionech vystoupí teplota půdy jen málokdy nad 15 °C, naopak v tropických a subtropických oblastech je teplota půdy obvykle optimální pro růst entomopatogena. Teplotní tolerance entomopatogenních hub však musí odrážet nejen teplotu půdy v regionu a daném období, ale také teplotu ve specifické půdní oblasti a čase použití

Teplotní omezení u entomopatogenních hyfomycet se však netýkají pouze působení okolních teplot v prostředí, ale mohou se zhoršovat rovněž chováním hostitelského organismu (např. termoregulace) (Inglis et al. 2001). Většina, ne-li všechny entomopatogenní houby, synchronizují svůj životní cyklus se stádií hmyzích hostitelů a podmínkami prostředí (Shah, Pell 2003). Larvy vystavené teplotnímu šoku např. zvýší hormonální aktivitu jako reakci na následnou infekci (Jaronski 2010). Vysoké teploty mohou rovněž inaktivovat entomopatogena před kontaktem se škodlivým hmyzem nebo mohou redukovat nebo zrychlovat růst uvnitř hmyzu v závislosti na teplotních požadavcích entomopatogena a hostitelského hmyzu. Naopak nízké teploty mohou redukovat nebo zastavit klíčivost a růst, což poškodí nebo zpomalí úspěšnost infekce, např. proti půdnímu hmyzu (Zimmermann 2007a). Musíme proto brát v úvahu nejen virulenci k cílovému hmyzu, ale rovněž stav houby v podmínkách prostředí, ve kterém se vyskytuje. Teplota a chlad jsou dva velmi významné faktory prostředí, které omezují používání entomopatogenních hub jako agens pro biologickou ochranu proti hmyzu (Fernandes et al. 2008). Ment et al. (2011) pozorovali vývoj houby *M. anisopliae* na

kadaveru klíštěte pouze při inkubaci ve 25 °C a nikoli ve 32 nebo 35 °C. Dimbi et al. (2004) zjistili nejvyšší účinnost *M. anisopliae* na cílového škůdce ve 30 °C.

Při používání hub proti vnějším parazitům zvířat může být teplota povrchu těla zvířete limitujícím faktorem pro úspěšný vývoj bioagens, protože na těle zvířete jsou zóny s různou teplotou (Polar et al. 2005). Teplota povrchu těla zvířete se běžně pohybuje v rozmezí 37–41 °C. Při těchto teplotách ztrácí kmeny méně adaptované na teplotní šoky patogenitu již po 6 hodinách (Ment et al. 2011). Při pokusu prováděném se dvěma kmeny *M. anisopliae* v teplotách povrchu těla skotu, byla mezi izoláty prokazatelná odlišnost ve vývoji (Polar et al. 2005).

Citlivost k teplotě je někdy dávána do souvislosti s původním výskytem kmene. U houby *B. bassiana* nebyla pozorována žádná souvislost mezi tolerancí k vysokým teplotám a zeměpisnou šířkou původního výskytu izolátů, ale obecně izoláty sebrané daleko od rovníku měly vyšší relativní klíčivost v chladných podmínkách než izoláty z blízkosti rovníku (Fernandes et al. 2008). Závislost mezi původní klimatickou oblastí, z níž izolát pochází a jeho schopností růst ve vysokých teplotách neprokázali ani Uma Devi et al. (2005), jejichž izoláty jak z mírné, tak tropické oblasti, vykazovaly normální růst v teplotních cyklech zahrnujících i vysoké teploty. Např. izolát *B. bassiana* ARSEF 2860, který po dobu 8 h přežil v teplotě 42 °C je z Idaho, USA. I přesto, že tento stát je v mírném pásmu, letní teploty pravidelně dosahují 32–38 °C na zemědělských plochách. To potvrzují i Yeo et al. (2003), kteří vyzdvihují důležitost klimatických rozdílů mezi ročními obdobími na jednom místě, které s velkou pravděpodobností mohou vytvářet selekční tlak na houby. Izolát odebraný v mírném klimatu během horkého léta může mít teplotní profil blízký tropickému izolátu, v porovnání s izolátem sebraným na tomtéž místě během studeného jarního počasí. Z toho důvodu by se neměl zbytečně vysoký důraz klást na místo nálezu, ale na teplotní charakteristiku samotného konkrétního izolátu (Yeo et al. 2003). Přesto by souvislost se zeměpisnou šířkou původního výskytu izolátů *B. bassiana* mohla být sledována u aktivity v chladu, ale už nikoli u tolerance k vysokým teplotám (Fernandes et al. 2008).

2.9.2 Vlhkost

Vlhkost je velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje účinnost a přežívání entomopatogenů v prostředí. Při posuzování vlivu vlhkosti v polních podmínkách musíme rozlišovat i mezi makro a mikroklimatem na listech nebo povrchu hmyzu (Zimmermann 2007a). V přirozeném prostředí je dostupnost vody kritickým parametrem určujícím klíčivost spor, růst a infekci. Většina entomopatogenních hub vyžaduje minimálně 95% relativní vlhkost na povrchu hmyzu, aby se objevilo klíčení, tvorba klíčících hyf a infekce (Hallsworth, Magan 1999). Vysokou vlhkost vyžadují houby ke konidiogenezi na kadaveru hostitele usmrceného mykózou a k produkci konidií, která může ovlivnit horizontální šíření patogena (Inglis et al. 2001). Výtěžnost konidií může být redukována periodickou expozicí k nízké vlhkosti a lze předpokládat, že sporulace je závislá nejenom na vystavení příznivým podmínkám, ale i na střídání příznivých a nepříznivých podmínek (Arthurs, Thomas 2001).

Různé houby, respektive kmeny, reagují na vlhkostní podmínky různě. Zatímco Zimmermann (2008) uvádí, že *I. farinosa* je hydrofilní houba, která je schopna infikovat hostitele i při 100% vlhkosti, Hallsworth a Magan (1999) zjistili, že růst tohoto druhu byl

rychlejší při mírně redukované dostupnosti vody. V případě izolátu *I. fumosorosea* pocházejícího z Evropy, který zkoumali Bouamama et al. (2010a), byla zjištěna lepší adaptace na mírné klima než na vlhké subtropické klima či aridní podmínky, což provázelo rapidní pokles klíčivosti konidií v podmínkách simulujících vlhké subtropické podnebí. Vysoká vlhkost je obecně nezbytná i pro klíčení *M. anisopliae* (Zimmermann 2007b), ačkoli kmen zkoumaný Hallsworthem a Maganem (1999) vykázal rychlejší růst při snížené dostupnosti vody. *B. bassiana* rostla nejrychleji při maximální vodní aktivitě a jejím snížením došlo ke zpomalení růstu (Hallsworth, Magan 1999).

Lepší schopnost přežití ve vysoké vlhkosti prostředí se však nemusí promítnout do vysoké úmrtnosti stádií hostitele, v porovnání s mortalitou v suché půdě, což naznačuje možnost existence fyziologických faktorů, které omezují infekčnost konidií v půdě nasycené vodou (Ekesi et al. 2003), navíc působení různých vlhkostních poměrů může ovlivnit i mortalitu cílového organismu (Bouamama et al. 2010b).

Předpoklad dostatku vody při klíčení vedl k obecnému přesvědčení, že vlhkostní podmínky jsou nezbytné pro účinné použití hub v rámci biologické ochrany proti hmyzu. To může platit pro určité taxony hub proti určitým hmyzím škůdcům, ale neplatí to obecně pro všechny houby za všech okolností. Množství studií ukázalo, že sucho během nebo bezprostředně po aplikaci houbových propagulí je méně škodlivé, než se původně myslelo (Inglis et al. 2001). Fargues et al. (2003) zjistili, že účinnost mykoinsekticidů na bázi *B. bassiana* a *L. lecanii* byla srovnatelná, ať už byly použity ve vlhkém nebo mírně suchém okolním středomořském klimatu simulovaném ve skleníku. Thompson et al. (2006) uvádějí, že vyšší míra zavlažování zlepšovala životnost konidií v travním porostu přibližně o 8–12 %. Závlaha, stejně jako déšť, neovlivňuje přímo konidie prostřednictvím vlhkosti, ale zprostředkovávají jejich vertikální pohyb do vrstev chráněných před faktory limitujícími životnost, jako je teplota a UV záření. Rozmístění konidií v půdě má pak přirozeně vliv na účinnost mykopatogena použitého v biologické ochraně. Např. vysoká koncentrace konidií na nebo blízko povrchu půdy je nezbytná pro infikování neonatálních larev vstupujících do půdy z hostitelských rostlin (McCoy et al. 1992).

2.9.3 Kombinace teploty a vlhkosti

Působení teploty a vlhkosti je ve velmi blízké vzájemné korelaci. Vlhkost v kombinaci s teplotou může ovlivnit životnost a perzistenci houbových spor (Zimmermann 2007a). Při hodnocení vlivu konstantní nebo proměnlivé teploty a vlhkosti na klíčivost, CFU a virulenci konidií byl prokázán mnohem rychlejší negativní vliv v simulovaných podmínkách aridního a subtropického klimatu než v mírném klimatu (Bouamama et al. 2010a). Po 72 hodinách v teplotě 35 a 40 °C a vlhkosti 75 a 86 % došlo k poklesu klíčivosti, zatímco při vlhkosti 13–53 % RH byla klíčivost na vysoké úrovni (Bouamama et al. 2010b).

Každý druh (resp. kmen) má svou optimální teplotu pro růst, ve které jsou požadavky na přístupnost vody přibližně stejné. Přesto se projevuje mezidruhová variabilita v růstu na médiích s regulovanou vodní aktivitou (Hallsworth, Magan 1999). Variabilitu v reakcích izolátů na vysokou teplotu a nízkou dostupnost vody pozorovali i Uma Devi et al. (2005). Efekt kombinace dvou abiotických stresů – vysoké teploty a nízké dostupnosti vody – inhiboval izoláty, které mohly dobře snášet vliv samostatně působících stresorů. Nepříznivé

účinky kombinace obou stresorů lze snížit např. dodáním vody při vysoké teplotě v polních podmínkách (Uma Devi et al. 2005). Ve 25 °C byl příjem vody rychlejší z přímého zdroje než z atmosféry (Arthurs, Thomas 2001).

Půdní teplota a vlhkost patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující reakci hostitelského hmyzu na infekci entomopatogenní houbou (McCoy et al. 1992). Ačkoli byla sporulace pozorována i na kadaverech inkubovaných v suchých podmínkách a méně příznivých teplotách, produkce konidií zde byla prokazatelně nižší, s nízkou externí sporulací. Konidie asociované s takovýmito kadavery by měly téměř určitě nízkou efektivitu v polních podmínkách. Navíc byly vzniklé konidie světlé a tenkostěnné (Arthurs, Thomas 2001). Klíčivost je zároveň ovlivňována i složkami kutikuly hostitelského hmyzu. Proto je těžké používat výsledky *in vitro* testů pro přesné předpovídání interakcí mezi hostitelským organismem a patogenem v *in vivo* podmínkách (Yeo et al. 2003).

2.9.4 Sluneční záření

Sluneční záření, speciálně UV-B (290–330 nm) a UV-A (330–400 nm), je nejškodlivějším faktorem prostředí ovlivňujícím perzistenci houbových insekticidů (Zimmermann 2007a). Konidie, hyfová tělíska a hyfy všech taxonů hyfomycet jsou vysoce citlivé k účinkům slunečního záření, zvláště dávkám UV-B ve viditelném spektru (285–315 nm). Přesto byly zaznamenány rozdíly v citlivosti k ozáření mezi taxony a kmeny v rámci druhů (Inglis et al. 2001). Nejškodlivější je ozáření nejkratšími vlnovými délkami, tzn. UV-B (280–320 a 295–320 nm), se jeví jako nejškodlivější část přirozeného záření, ačkoli UV-A (320–400 nm) mělo rovněž škodlivé účinky (Fargues et al. 1997), což se projevuje v mnohem výraznějším snížení životnosti konidií po ozáření UV-B spektrem (Braga et al. 2001c). Infračervené záření bylo méně škodlivé (Fargues et al. 1997). Při hodnocení je třeba brát v úvahu fenotypové charakteristiky kvantitativních vlastností, jako je případ tolerance k slunečnímu záření, které mají komplexní genetickou základnu a jsou obvykle silně ovlivňovány prostředím (Rangel et al. 2004), i pigmentaci konidií (Zimmermann 2007b). Konidie vykazují odlišné reakce na vlnovou délku (klíčivost, přežívání a infektivita).

Projevuje se i vliv ozáření na následné vlastnosti. Kolonie pocházející z ozářených konidií měly obecně delší vývoj a vyšší heterogenitu jak ve tvaru, tak ve velikosti. Po ozáření došlo rovněž ke zpoždění klíčení. Zdá se, že konidie potřebují dlouhou časovou periodu, aby se zotavily z účinků ozáření UV-B předtím, než zahájí proces klíčení (Braga et al. 2001a). Prodleva v klíčivosti byla přímo úměrná dávce záření a nebyla závislá na míře tolerance k záření, kterou vykazovaly některé kmeny. Např. kmen, který vykazoval nejvyšší toleranci k UV-B záření vykázal největší prodlevu v klíčivosti po ozáření (Braga et al. 2001b).

Vliv UV záření v prostředí lze rozdělit na přímý a nepřímý. Přímý vliv se projeví např. redukcí onemocnění rostlin, protože UV-B záření zabíjí spory patogenní houby. V případě, že záření např. změní chemismus hostitelské rostliny a ta je pak více rezistentní k infekci, hovoříme o nepřímém vlivu, protože může dojít k oddělení od UV záření v čase i místě (Paul, Gwynn-Jones 2003). U konidií vyprodukovaných houbami vystavenými v průběhu myceliálního růstu subletálnímu stresu vyvolanému jiným stresorem než UV-B a teplem, může vzniknout zvýšená tolerance právě k UV-B záření a teplu. Nejvyšší zvýšení tolerance k UV-B záření vyvolá živinový a osmotický stres, ovšem za současného výrazného snížení

výtěžnosti konidií (Rangel et al. 2008). Tolerance k UV se liší v průběhu klíčení v čase, což odráží fyziologický stav buněk a různé stádium buněčného cyklu (Braga et al. 2001a). Citlivost konidií závisí jak na složení spektra, tak na intenzitě v nejkratších vlnových délkách (Fargues et al. 1997). Tolerance k určitému spektru slunečního záření se může lišit od tolerance k celému spektru, protože kmeny např. odolné vůči UV-B mohou být senzitivnější k UV-A (Braga et al. 2001c).

Rychlé ničení infekčních propagulí solárním zářením je považováno mnohými za hlavní překážku v úspěšném zavádění entomopatogenů proti hmyzím škůdcům na polních plodinách (Inglis et al. 2001). I v polních podmínkách působí negativně zvláště složka UV-B (Fernandes et al. 2007). UV záření a teplota vážně redukuje životaschopnost konidií *M. anisopliae* a tvoří tak důležitou překážku v jeho úspěšném využívání v zemědělství (Rangel et al. 2008). Rápidní inaktivace konidií po několika hodinách přímého vystavení ozáření, které je snadno dosažitelné v přírodě, ukazuje, že konidie rodu *Metarhizium* nejsou plně adaptovány na vzdušné prostředí (Braga et al. 2001b). Ovšem životnost preparátu lze zvýšit vhodnou formulací, která je např. vyšší v oleji než v jílu, později v kombinaci olej+jíl a olej+optický „rozjasňovač“ (Thompson et al. 2006). Konidie mohou také lépe přežívat na spodních nebo zastíněných částech listů. Jaronski (2010) uvádí, že na spodní straně listů klesala životnost o 9–11 % za den, kdežto na vrchní straně o 47 % za den.

UV-B záření nejenom ničí celou řadu organismů, ale je rovněž využitelné v mnoha ekologických procesech, ve kterých slouží mikrobům, rostlinám a živočichům jako zdroj informací o jejich životním prostředí. U mnoha hub má sluneční UV záření fotomorfogenický efekt, který u mnoha druhů zahrnuje indukci sporulace (Paul, Gwynn-Jones 2003). Během klíčení konidií, které byly na kutikule hostitelského hmyzu vystaveny působení slunečního záření, bylo prokázáno, že ačkoli došlo k přechodnému zvýšení UV-B tolerance tím, že konidie zvýšily svou metabolickou aktivitu do 6. až 8. hodiny klíčení, UV sensitivity se ihned po přesunu na živinový substrát vrátila k hodnotám srovnatelným s neozářenými konidiami (Braga et al. 2001a).

Účinek slunečního záření na konidie mohou ovlivnit podmínky kultivace. Růstový substrát a živiny, na kterých jsou konidie produkovány, ovlivňují toleranci konidií *M. anisopliae* k UV-B záření a rychlost klíčení. Např. konidie kultivované na hmyzím kadaveru byly prokazatelně citlivější k UV-B záření než konidie produkované na PDAY (PDA+Yeast extract) a prokazatelně pomaleji klíčily, ovšem nejrychlejší klíčení a nejvyšší toleranci k UV-B vykazaly konidie získané na Czapek's and Emerson's YpSs agaru a rýži (Rangel et al. 2004). Další testy však ukázaly, že tolerance konidií *M. anisopliae* produkováných na umělé živné půdě nebo hmyzích kadaverech se nelišila. Silná selekce na jeden faktor, tj. UV-B stres, vede k dominanci vysoce adaptovaných specialistů s nízkou fenotypovou plasticitou k tomuto faktoru (Rangel et al. 2005).

Určitou roli může hrát i zeměpisná šířka, kdy izoláty *B. bassiana* z nižší zeměpisné šířky vykazaly prokazatelně vyšší toleranci k UV-B než izoláty z vyšší zeměpisné šířky v rozmezí 0–22 °. Ovšem u izolátů ze zeměpisné šířky nad 22 ° nebyl prokázán vliv zeměpisné šířky původního výskytu. Analýza rovněž neprokázala korelaci mezi typem hostitele a tolerancí k UV-B (Fernandes et al. 2007). V nadmořských výškách, kde byly kmeny *M. anisopliae* vystaveny po určitou fázi jejich životního cyklu UV-B záření, se objevuje alespoň minimální selekce na adaptaci k UV-B (Braga et al. 2001b).

3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo ověřit „univerzální“ uplatnitelnost hodnocení vývoje nákazy entomopatogenních hub na vybraném cílovém hostitelském druhu hmyzu za použití stupnice FDI. Tato stupnice nám dává možnost podrobnějšího hodnocení nákazy ve smyslu rozlišení jednotlivých fází vývoje patogena (v tomto případě tedy entomopatogenní houby). V práci šlo o to, zda stupnice může nalézt své opodstatnitelné využití v hodnocení vývoje nákazy obecně a zároveň komplexně, tzn. u jednotlivých rodů entomopatogenních hub, v rámci hodnocení vývoje nákazy na různých druzích hostitelů, a v neposlední řadě také při hodnocení vývoje nákazy vyvolané rozdílnými typy spor entomopatogenních hub. Tato myšlenka/hlavní cíl práce, byla ověřována v rámci pěti dílčích studií.

Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Hlavním cílem této studie bylo prosté porovnání účinnosti izolátů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *B. caledonica* získaných v rámci monitoringu na území Národního parku Šumava na typově zvoleném cílovém hostiteli, a sice na larvách potemníka moučného (*T. molitor*). Jednalo se především o vzájemné porovnání jednotlivých izolátů daného druhu entomopatogenní houby a zároveň o porovnání izolátů v rámci obou testovaných druhů entomopatogenních hub.

Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor*

Porovnání dvou rozdílných typů spor s cílem zjistit, zda je či není mezi morfologicky odlišnými typy spor rozdíl co do schopnosti vyvolat onemocnění a pokud ano, tak jaký. Snahou bylo tedy zjistit, zda není jeden z typů spor schopen vyvolat rychlejší rozvoj nákazy v daných podmínkách inkubace za dané koncentrace spor.

Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů vybraných druhů entomopatogenních hub získaných odizolováním z komerčních biopreparátů, na bezkřídlé partenogenetické samičky *Myzus persicae*

Cílem této studie bylo ověření využití čistých izolátů na jejichž základě jsou postaveny komerční preparáty Botanigard ES (*B. bassiana*), Mycotal (*L. muscarium*), PreFeRal®WG (*I. fumosorosea*), v účinnosti na samičky *M. persicae* v laboratorních podmínkách.

Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd obhospodařovaných konvenčním způsobem zemědělství

Tato studie byla komplexně zaměřena na hodnocení vybraných vlastností testovaných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* (klíčivost, radiální růst na umělém živném médiu, hodnocení účinnosti na larvy *T. molitor*) v rozdílných teplotách. Výběr kmenů byl proveden na základě morfologických odlišností středových kultur na PDA. Primárním cílem bylo najít vhodný izolát pro budoucí potenciální užití v rámci biologické ochrany rostlin proti půdním škůdcům, resp. stádiím škůdců prodávajícím část svého vývoje v půdním prostředí.

Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejich pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

V této studii bylo snahou zjistit, zda mnohonásobné pasážování (padesátinásobné) vybraných izolátů *I. fumosorosea* přes dva hostitele ze třídy *Insecta* (*B. tabaci*, *A. gossypii*), jednoho zástupce třídy *Arachnoidea* (*T. urticae*), umělé živné medium – PDA a přirozený živný substrát – otruby, nějakým způsobem ovlivňuje účinnost ve srovnání s účinností původních izolátů. Konečná účinnost byla testována na larvách *G. mellonella*.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Izoláty entomopatogenních hub používané v jednotlivých studiích

Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

V této studii byly používány izoláty *B. bassiana* a *B. caledonica*, jež jsou vypsány v tabulce 4.1 (*B. bassiana*) a 4.2 (*B. caledonica*). Tabulky obsahují základní údaje vztahující se k odběrům těchto izolátů, jako jsou: datum izolace, GPS souřadnice a nadmořská výška lokality, kde byly nalezeny a také zdroj, ze kterého byly jednotlivé izoláty získány.

Tabulka 4.1 (část A): Základní údaje k původu jednotlivých izolátů entomopatogenní houby *B. bassiana* testovaných ve studii 1

Kód izolátu	Datum odběru vzorků	GPS	Nadmořská výška (m. n. m.)	Zdroj
I101	2004	48° 58' 26", 13° 33' 43"	1178	imago <i>I. typographus</i>
NP 0003	11.6.2008	48° 58' 40", 13° 32' 59"	1280	imago <i>I. typographus</i>
NP 0004	30.6.2008	49° 07' 24", 13° 15' 51"	969	imago <i>I. typographus</i>
NP 0005	3.7.2008	48° 54' 47", 13° 41' 46"	887	imago <i>I. typographus</i>
NP 0006	3.7.2008	48° 57' 53", 13° 38' 06"	992	imago <i>I. typographus</i>
NP 0007	30.6.2008	49° 06' 15", 13° 20' 07"	1183	imago <i>I. typographus</i>
NP 0008	1.7.2008	49° 03' 43", 13° 26' 03"	1073	imago <i>I. typographus</i>
NP 0009	3.7.2008	48° 55' 30", 13° 40' 11"	906	imago <i>I. typographus</i>
NP 0010	19.6.2008	49° 03' 48", 13° 23' 44"	1309	imago <i>I. typographus</i>
NP 0020	5.6.2008	49° 02' 52", 13° 24' 06"	1200	imago <i>I. typographus</i>
NP 0022	5.6.2008	49° 06' 19", 13° 20' 07"	1094	imago <i>I. typographus</i>
NP 0026	8.7.2008	48° 51' 14", 13° 54' 49"	743	imago <i>I. typographus</i>
NP 0027	5.6.2008	48° 58' 54", 13° 27' 16"	1228	imago <i>I. typographus</i>
NP 0028	9.7.2008	48° 44' 57", 13° 55' 11"	1155	imago <i>I. typographus</i>
NP 0029	10.7.2008	48° 58' 54", 13° 27' 16"	1231	imago <i>I. typographus</i>
NP 0030	10.7.2008	48° 58' 47", 13° 28' 45"	1260	imago <i>I. typographus</i>
NP 0031	5.6.2008	49° 06' 19", 13° 20' 07"	1094	*kúra-TBM
NP 0068	16.6.2009	48° 57' 33", 13° 29' 20"	1144	*kúra-TBM
NP 0083	4.9.2008	48° 58' 26", 13° 33' 43"	1178	imago <i>I. typographus</i>
NP 0097	16.6.2009	49° 00' 22", 13° 30' 03"	1024	*kúra-TBM
NP 0103	4.9.2008	48° 58' 39", 13° 32' 47"	1290	imago <i>I. typographus</i>
NP 0122	22.4.2009	49° 01' 28", 13° 33' 50"	1085	imago <i>I. typographus</i>
NP 0123	22.4.2009	49° 04' 26", 13° 34' 46"	1145	imago <i>I. typographus</i>
NP 0124	9.6.2009	48° 47' 41", 13° 54' 43"	777	imago <i>I. typographus</i>
NP 0125	10.6.2009	48° 50' 44", 13° 45' 57"	858	imago <i>I. typographus</i>
NP 0133	9.6.2009	48° 47' 56", 13° 54' 48"	882	imago <i>I. typographus</i>
NP 0137	26.8.2009	49° 07' 38", 13° 16' 42"	1102	imago <i>I. typographus</i>

Tabulka 4.1 (část B): Základní údaje k původu jednotlivých izolátů entomopatogenní houby *B. bassiana* testovaných ve studii 1

Kód izolátu	Datum odběru vzorků	GPS	Nadmořská výška (m. n. m.)	Zdroj
NP 0138	16.6.2009	48° 57' 33", 13° 29' 20"	1144	imago <i>I. typographus</i>
NP 0139	16.6.2009	49° 00' 22", 13° 30' 03"	1024	imago <i>I. typographus</i>
NP 0140	16.6.2009	49° 03' 04", 13° 30' 56"	1031	imago <i>I. typographus</i>
NP 0141	17.6.2009	49° 06' 02", 13° 31' 14"	961	imago <i>I. typographus</i>
NP 0142	17.6.2009	49° 05' 52", 13° 26' 08"	899	imago <i>I. typographus</i>
NP 0158	9.6.2009	48° 47' 56", 13° 54' 48"	882	*kúra-TBM
NP 0159	10.6.2009	48° 57' 35", 13° 39' 20"	972	*kúra-TBM
NP 0161	9.6.2009	48° 47' 08", 13° 51' 45"	1061	*kúra-TBM
NP 0182	30.7.2009	49° 07' 17", 13° 14' 25"	810	imago <i>I. typographus</i>
NP 0185	30.7.2009	49° 00' 50", 13° 17' 23"	1192	imago <i>I. typographus</i>
NP 0218	8.9.2009	49° 07' 29", 13° 55' 35"	1256	imago <i>I. typographus</i>
NP 0238	13.9.2009	49° 04' 39", 13° 21' 47"	920	imago <i>I. typographus</i>
NP 0241	3.6.2010	49° 03' 35", 13° 26' 06"	1161	imago <i>I. typographus</i>

* kúra-TBM (*Tenebrio bait method*)**Tabulka 4.2 (část A):** Základní údaje k původu jednotlivých izolátů entomopatogenní houby *B. caledonica* testovaných ve studii 1

Kód izolátu	Datum odběru vzorků	GPS	Nadmořská výška (m. n. m.)	Zdroj
NP0013	30.6.2008	49° 07' 25", 13° 15' 51"	969	imago <i>I. typographus</i>
NP0039	10.7.2008	48° 58' 48", 13° 28' 45"	1260	imago <i>I. typographus</i>
NP0065	9.7.2008	48° 44' 57", 13° 55' 12"	1155	imago <i>I. typographus</i>
NP0107	4.9.2008	48° 58' 40", 13° 32' 48"	1290	imago <i>I. typographus</i>
NP0131	10.6.2009	48° 50' 44", 13° 45' 58"	858	imago <i>I. typographus</i>
NP0145	17.6.2009	49° 06' 03", 13° 31' 15"	961	imago <i>I. typographus</i>
NP0155	9.6.2009	48° 52' 15", 13° 50' 54"	805	kúra-TBM
NP0156	9.6.2009	48° 43' 41", 13° 57' 17"	1057	kúra-TBM
NP0162	9.6.2009	48° 49' 08", 13° 52' 27"	916	kúra-TBM
NP0163	9.6.2009	48° 53' 37", 13° 47' 30"	890	kúra-TBM
NP0164	10.6.2009	48° 50' 44", 13° 45' 58"	858	kúra-TBM
NP0165	16.6.2009	49° 02' 60", 13° 30' 57"	1047	kúra-TBM
NP0179	16.6.2009	48° 57' 19", 13° 36' 18"	1038	kúra-TBM
NP0180	17.6.2009	49° 06' 03", 13° 31' 15"	961	kúra-TBM
NP0188	30.7.2009	49° 08' 20", 13° 17' 24"	1192	imago <i>I. typographus</i>
NP0192	26.8.2009	49° 04' 40", 13° 21' 48"	920	imago <i>I. typographus</i>
NP0210	26.8.2009	49° 09' 34", 13° 16' 48"	987	kúra-TBM
NP0216	8.9.2009	49° 07' 30", 13° 55' 35"	1256	imago <i>I. typographus</i>
NP0227	9.9.2009	48° 58' 26", 13° 33' 44"	1177	imago <i>I. typographus</i>
NP0230	26.8.2009	49° 04' 40", 13° 21' 48"	920	kúra-TBM

Tabulka 4.2 (část B): Základní údaje k původu jednotlivých izolátů entomopatogenní houby *B. caledonica* testovaných ve studii 1

Kód izolátu	Datum odběru vzorků	GPS	Nadmořská výška (m. n. m.)	Zdroj
NP0232	26.8.2009	49° 07' 39", 13° 16' 42"	1102	kůra-TBM
NP0235	26.8.2009	49° 06' 26", 13° 21' 06"	1207	kůra-TBM
NP0242	3.6.2010	49° 03' 36", 13° 26' 08"	1159	imago <i>I. typographus</i>

* kůra-TBM (*Tenebrio bait method*)**Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor***

Pro potřeby této studie byl používán izolát entomopatogenní houby *B. bassiana* s označením I101, viz tabulka 3.1.

Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů vybraných druhů entomopatogenních hub získaných odizolováním z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky *Myzus persicae*

V této studii byly získány čisté kultury entomopatogenních hub, na jejichž bázi jsou postaveny komerční biopreparáty Botanigard ES (*B. bassiana*), Mycotal (*L. muscarium*) a PreFeRal®WG (*I. fumosorosea*).

Tabulka 4.3: Základní údaje komerčních preparátů, z nichž byly získány čisté izoláty

Název preparátu	Druh EH	Výrobce	Zdroj izolátu (organismus)
Botanigard ES	<i>Beauveria bassiana</i>	BioWorks, Inc	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>
Mycotal	<i>Lecanicillium muscarium</i>	Koppert Biological Systems	molice (blíže nespecifikováno)
PreFeRal®WG	<i>Isaria fumosorosea</i>	Biobest Belgium N.V.	<i>Phenacoccus solani</i>

Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd obhospodařovaných konvenčním způsobem zemědělství

V tabulce č. 4.4 je uveden popis lokalit, ze kterých byly v průběhu monitoringu v letech 2010 a 2011 získány jednotlivé izoláty houby *M. anisopliae*. Jsou uváděny přesné souřadnice GPS, nadmořská výška a plodiny ve dvou vegetačních obdobích před uskutečněním odběru. Odběr půdy byl proveden z hloubky cca 20 cm. V laboratoři byl připraven půdní výluh (20 g půdy + 100 ml 0,05% roztoku Tween 80), ze kterého byl po důkladné homogenizaci odebrán 1 ml suspenze, který byl nainokulován na selektivní médium PDA + dodine (Chase et al. 1986).

Izoláty byly následně přečištěny přes PDA a uloženy do mykologické sbírky na Katedře rostlinné výroby a agroekologie ZF JU v Českých Budějovicích.

Tabulka 4.4: Základní charakteristiky lokalit odběru půdních vzorků (pozemky obhospodařované konvenčním způsobem), ze kterých byly získány jednotlivé izoláty entomopatogenní houby *M. anisopliae* pro potřeby studie 4

Číslo lokality	Kód izolátu	Výměra (ha)	GPS	Nadmořská výška (m.n.m.)	Plodina	
					2010	2011
2	110102	10,36	48° 47' 58", 14° 50' 07"	481	žito	pšenice
5	110105	12,20	49° 03' 43", 15° 06' 03"	613	jetel	jetel
6	110106	10,75	49° 04' 20", 15° 01' 56"	530	pšenice	mák
8	110108	104,97	48° 56' 06", 15° 30' 52"	486	jetel	jetel
10	110110	17,72	49° 02' 50", 13° 57' 06"	565	oves	pšenice
11	110111	10,03	49° 05' 31", 14° 02' 18"	474	oves	pšenice
12	110112	13,30	49° 03' 07", 14° 53' 14"	445	pšenice	tritikale
13	110113	7,01	49° 05' 30", 14° 50' 11"	422	pšenice	ječmen

Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejích pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

V této studii byly hodnoceny dva izoláty *I. fumosorosea* (dva morfologicky odlišné monosporové izoláty přípravku Preferal), které vykazují odlišné morfologické znaky, pasážovány přes 3 druhy hostitelských organismů (2 zástupce třídy *Insecta*, 1 zástupce třídy *Arachnoidea*) *B. tabaci*, *A. gossypii* a *T. urticae*, přes živný substrát, kterým byly otruby, a dále přes umělé živné medium PDA.

Tabulka 4.5: Označení jednotlivých pasáží původních izolátů entomopatogenní houby *I. fumosorosea*

Substrát/živná půda	Kód pasáže	
	Původní izolát 172	Původní izolát 173
otruby	H ₅	H ₃₀
<i>Bemisia tabaci</i>	H ₁₀	H ₃₅
<i>Aphis gossypii</i>	H ₁₅	H ₄₀
<i>Tetranychus urticae</i>	H ₂₀	H ₄₅
PDA	H ₂₅	H ₅₀

4.2 Pěstování kultur a příprava suspenze

Pro získání konidií byly kultury všech izolátů testovaných v jednotlivých studiích této práce kultivovány na umělém živném médiu PDA (Potatoe Dextrose Agar, 24 g/l PDB, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie a 16 g/l agaru, Dr. Kulich Pharma s. r. o., Hradec

Králové) v podobě separačních čar či plošné kultury. Podrobný postup pro jednotlivé studie je zpřesněn v úvodu dané experimentální části. Kultury inkubované v podobě separačních čar byly kultivovány po dobu 14 dnů, zatímco plošné kultury po dobu 7 dnů, v obou případech bez přístupu světla a v teplotě 20 °C. Pro potřeby přípravy blastospor byla použita submerzní kultivace, kde jako standardní živné médium bylo použito PDB (Potatoe Dextrose Broth, 24 g/l PDB, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie). Kultivace probíhala po dobu 7 dnů bez přístupu světla a v teplotě 20 °C.

4.3 Standardní test klíčivosti

Test klíčivosti spor v jednotlivých studiích je nedílnou součástí, jejímž prostřednictvím jsme schopni určit vitalitu spor a jejich vhodnost pro využití v následných testech. Klíčivost spor se hodnotí standardním laboratorním testem, kdy se na mikroskopické podložní sklíčko nejprve nanese slabá vrstva 2% agaru (pro rody *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicilium*) či PDA (pro rod *Metarhizium*). Dva druhy agarů se používají z důvodu, že potřeba živin pro klíčení spor je u různých rodů odlišná. Po zaschnutí agaru se na jeho povrch nanese pomocí 1 μl inokulační kličky několik kapek finální suspenze o koncentraci 1×10^6 spor v 1 ml. Po zaschnutí kapek ve flow boxu se sklíčko přeneso do Petriho misky (90mm), do níž se předtím umístí filtrační papír navlhčený 0,5 ml sterilní destilované vody. Inkubace probíhá při teplotě 20 °C a vitalita spor je hodnocena po uplynutí zvolené časové periody, zpravidla po 24, resp. 48 hodinách. Za klíčivé se považují ty spory, jež nabobtnaly a jejichž kličky dosahují velikosti alespoň poloviny matečné nenabobtnalé spory. Procentuální klíčivost se hodnotí u 100 náhodně vybraných spor pro každé opakování pomocí světelného mikroskopu při 400 násobném celkovém zvětšení.

Procentuální hodnotu klíčivosti můžeme doplnit o index vývoje spor GI (Growth Index). Tento index nám dává možnost přiřadit každé ze 100 náhodně vybraných spor určitou hodnotu, a tím tak vyjádřit, v jakém stupni vývoje se spora právě nachází. Tato stupnice GI se skládá ze 7 indexů od 0 do 3 (hodnoceno po 0,5 stupních), kdy 0 se přiřazuje sporám, které nevykazují žádné známky vývoje, zatímco 3 označuje spory, na jejichž hyfálních vláčkách jsou již pozorovatelné konidiofory s 3 a více viditelnými konidii.

Tabulka 4.6: Indexová stupnice používaná pro hodnocení vývoje spor entomopatogenních hub (Growth index, GI).



0	Na konidii nejsou patrné žádné morfologické změny, konidie ve vzorku mají uniformní tvar
0,5	Konidie je zřetelně protáhlejší Jednostranný klíček v poměru přibližně 1:0,5
1,0	Velikost klíčku je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie
1,5	Klíček je 2–3× delší než matečná konidie Na matečné konidii jsou zřejmé 2 kratší kličky
2,0	Klíček je více než 3× tak dlouhý jako matečná konidie Sekundární větvení Dva dlouhé kličky
2,5	Na hyfách jsou zjištěny konidiofory bez nových konidií nebo s 1–2 konidii
3,0	V hodnoceném vzorku jsou zjištěny konidiofory, na kterých jsou vytvořené nové konidie, více než 3 na konidioforu Plně sporulující konidiofor

4.4 Standardní laboratorní biotest vývoje nákazy na hostiteli




Stupnice FDI (Fungus Development Index), jež v této práci tvoří nedílnou součást standardního laboratorního testu, nám poskytuje unikátní možnost vyhodnotit nákazu entomopatogenní houbou nejen z hlediska „pouhé“ mortality testovaného hostitele či zjevně identifikovatelných příznaků infekce na povrchu těla hostitele. Díky této stupnici, která odlišuje jednotlivé fáze vývoje houby, máme jedinečnou možnost sledovat nákazu hostitele v rozdílných fázích od počátečních příznaků v podobě melanizačních skvrn, přes mortalitu, až k viditelným příznakům v podobě utváření morfologických struktur typických pro konkrétní druh entomopatogenní houby. Odlišnost použití stupnice FDI v porovnání se stanovením mortality nebo počtu zjevně infikovaných jedinců spočívá v možnosti rozlišit jednotlivé fáze vývoje houby a nejvíce pak právě možnosti rozčlenit zjevné příznaky infekce do jednotlivých rozdílných fází. Tato možnost rozdělit jednotlivé stupně infekce nám dává příležitost dalšího, dalo by se říci vyššího, stupně pro porovnání testovaných izolátů jednotlivých druhů entomopatogenních hub.

Stupnice FDI je postavena tak, že průběh nákazy daného izolátu entomopatogenní houby rozčlení do 7 fází vývoje onemocnění, kde každé z těchto fází pro daného hostitele a vývojové stádium (např. larva) je přiřazen konkrétní index (viz tabulka 4.7). Nejnižší index, tedy 0, označuje stav, kde nejsou pozorovány žádné změny ve vitalitě hostitele, naopak nejvyšším indexem, tedy 3, je označována konečná fáze nákazy, kde mycelium na povrch těla hostitelského druhu je plně vysporulováno. Stěžejním indexem získaným hodnocením vývoje nákazy je index 1,5, kterým je vyjádřen prvotní příznak zjevné infekce v podobě jednotlivých hyf na povrchu těla hostitele.

Tabulka 4.7 (část A): Stupnice využívaná pro hodnocení vývoje nákazy entomopatogenních hub na daném hostiteli, Fungus development index – FDI (zde je pro názornost jako hostitelský organismus použita larva *T. molitor* v jednotlivých stupních vývoje nákazy entomopatogenní houbou *B. bassiana*)

<p>FDI 0</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Index vyjadřující nepřítomnost jakýchkoli příznaků nákazy 	
<p>FDI 0,5</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Index vyjadřující přítomnost melanizačních skvrn viditelných na povrchu těla hostitele 	
<p>FDI 1,0</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Index vyjadřující smrt hostitele 	
<p>FDI 1,5</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Index, jímž je vyjádřen první zjevný růst jednotlivých vláken mycelia na povrchu těla hostitele 	

Tabulka 4.7 (část B): Stupnice využívaná pro hodnocení vývoje nákazy entomopatogenních hub na daném hostiteli, Fungus development index – FDI (zde je pro názornost jako hostitelský organismus použita larva *T. molitor* v jednotlivých stupních vývoje nákazy entomopatogenní houbou *B. bassiana*)

<p>FDI 2,0</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Index vyjadřující tvorbu kompaktního mycelia na povrchu těla hostitele	
<p>FDI 2,5</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Index vyjadřující sporulaci (tvorbu nových spor - konidií) na povrchu mycelia	
<p>FDI 3,0</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Index vyjadřující plně vysporulované mycelium na povrchu těla hostitele	

4.5 Hodnocení mortality a infekce na cílovém hostiteli

V průběhu jednotlivých studií jsou testy na zvolených hostitelských druzích hmyzu, resp. jejich vývojových stádiích, vyhodnocovány zároveň z pohledu mortality, která je chápána jako **mortalita kumulovaná**, kdy tento termín v sobě zahrnuje nejen případy, kdy se jedná pouze o mrtvé jedince bez zjevných příznaků infekce, ale současně také jedince nesoucí zjevné příznaky nákazy, tj. jedince, na jejichž povrchu těla jsou přítomné morfologické struktury odpovídající přítomnosti patogena.

Další součástí je hodnocení prováděné z pohledu **infekce**, kdy jsou do tohoto parametru zahrnuty pouze případy, kdy jsou na povrchu těla hostitele přítomné zjevné morfologické struktury patogena, ale není brán zřetel na to, jaké příznaky jsou pozorovány, jde pouze o přítomnost entomopatogenní houby na povrchu těla hostitele.

4.5.1 Postup biotestu na larvách *T. molitor* a *G. mellonella*

Účinnost jednotlivých izolátů se hodnotí na larvách *T. molitor*, či *G. mellonella*. Jako inkubační aréna slouží destička určená pro kultivaci tkáňových kultur o objemu jedné komůrky 6,5 ml, na jejíž dno se umístí sterilní filtrační papír (2×2 cm), který se navlhčí 0,150 ml sterilní destilované vody. Larvy o stejné velikosti (± 2 cm) se povrchově sterilují v 0,05% NaClO a následně okamžitě 3× opláchnou čistou sterilní destilovanou vodou a dají na sterilní filtrační papír k oschnutí. Následně se larvy individuálně ponořují na 2–3 vteřiny do finální suspenze o dané koncentraci spor (viz jednotlivé studie). Ošetřené larvy se po jedné umístí do připravených komůrek v inkubační aréně. Pro každou variantu (izolát) se připraví 25 larev ve 3 opakováních. Pro potřeby kontrolní varianty se larvy ponoří na 2–3 vteřiny do roztoku 0,05% Tweenu 80 (opět připraveno 25 larev ve 3 opakováních). Následně se inkubační arény přemístí do igelitového sáčku z důvodu zamezení vysychání. Inkubace probíhá v teplotě 20 °C, bez přístupu světla. Účinnost jednotlivých izolátů na larvy se hodnotí každý den po dobu celého testu pomocí binokulárního mikroskopu, kdy se rozlišují živé, mrtvé (kumulovaná mortalita) a zjevně infikované larvy.

4.5.2 Postup biotestu na bezkřídlých partenogenetických samičkách *M. persicae*

K posouzení průběhu nákazy bylo použito standardního laboratorního testu, viz výše, kdy tento test byl modifikován pro potřeby hodnocení průběhu infekce na vybraném cílovém hostiteli (dospělec *M. persicae*), tato modifikace spočívala v zúžení indexové stupnice FDI, kdy nebyl používán index 0,5 z důvodu nemožné identifikace melanizačních skvrn na povrchu těla hostitele. Na spodní stranu vyzrálého listu papriky seté se den před vlastním ošetřením vloží cca 35 bezkřídlých partenogenetických samiček mšice broskvoňové. Samičky se umísťují přednostně na středovou žílu listu (samičky zde setrvávají mnohem lépe a nerozlézají se tak, jako když jsou umístěny na jinou část listové čepele – subjektivní pozorování). List se samičkami se položí svrchní stranou do Petriho misky (90 mm), která obsahuje vrstvu 2% agaru. Po 24 hodinách se list vyjme z Petriho misky a ošetří suspenzí konidií daných izolátů pomocí ručního tlakového postřikovače a následně se list uloží do flow boxu k oschnutí. Po oschnutí se zkoriguje koncový počet samiček na listu, kde se ponechá

pouze 25 samiček (připraví se 3 opakování). Kontrolní varianta se připraví stejným postupem, viz výše, pouze s tím rozdílem, že pro ošetření se použije 0,05% roztoku TWEEN 80, opět se připraví 3 opakování po 25 jedincích. Inkubace probíhá v 25 °C v podmínkách bez přístupu světla. Účinnost se hodnotí ve vybrané dny v průběhu testu.

4.6 Radiální růst a sporulace na umělém živném mediu (PDA)

Pomocí 1 μ l inokulační kličky se nanese jedna kapka finální suspenze o koncentraci 1×10^6 spor/ml do středu Petriho misky obsahující umělé živné medium (v našem případě PDA). Po zaschnutí kapky se Petriho misky uzavřou do igelitového sáčku, který slouží jako prevence proti vysychání v průběhu inkubace. Kultivace probíhá v dané teplotě, bez přístupu světla, po dobu tří týdnů. Pro každý izolát se posléze hodnotí určený počet opakování, kdy se velikost jednotlivých kultur vypočítá ze dvou na sebe kolmých průměrů. Následně se každá z kultur homogenizuje v 100 ml destilované vody, aby bylo možné zjistit konečnou výtěžnost spor. Koncentrace spor se spočítá pomocí "Neubauerovy počítací komůrky".

4.7 Statistická analýza

Data vyjádřená v hodnotách procent byla normalizována pomocí arcsinové transformace, zatímco hodnoty sporulace středových kultur byly normalizovány za využití logaritmické transformace $\log_{10}(x + 1)$. Údaje týkající se radiálního růstu normalizovány nebyly. Výše uvedené údaje byly následně podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru pro statistickou analýzu (StatSoft Inc. 2007). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Tukeyho testu ($P < 0,05$). Co se týká hodnot FDI, jimiž byl hodnocen vývoj nákazy, a hodnot GI, jimiž byl hodnocen vývoj spor, byly tyto hodnoty podrobeny porovnání za využití neparametrického testu, a to sice Kruskal-Wallisově ANOVĚ ($P < 0,05$) s následným vícenásobným porovnáním průměrných hodnot ke zjištění rozdílů mezi jednotlivými testovanými variantami.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*)

5.1.1 Metodický postup

Kultivace, příprava suspenze

- Konidie byly získány kultivací jednotlivých izolátů v podobě separačních čar na PDA v 90mm Petriho miskách při teplotě 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 14 dnů.
- Suspenze konidií byla následně připravena smytím spor z povrchu plně vysporulované kultury pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^6 konidií/ml, pomocí "Neubauerovy počítací komůrky".

Hodnocení klíčivosti

- K posouzení klíčivosti bylo opět použito standardního laboratorního testu klíčivosti, viz metodika, kdy byla pro každou variantu (izolát) připravena 3 opakování, kde pro každé opakování bylo hodnoceno 100 spor (3×100 spor).

Účinnost na larvy potměníka moučného (*T. molitor*)

- K posouzení průběhu nákazy bylo použito standardního laboratorního testu, viz metodika.
- Inkubace probíhala při 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 10 dnů.
- Pro každý izolát byla připravena 3 opakování po 25 jedincích (celkem 75 jedinců na izolát).
- Hodnocení probíhalo každý den po dobu následujících 10 dnů od založení testu.

5.1.2 Výsledky

*Klíčivost a vývoj konidií izolátů *B. bassiana* stanovený pomocí indexové stupnice GI*

Klíčivost spor 40 izolátů houby *B. bassiana* se po 24 hodinách pohybovala v rozmezí 91,33–99,67 % a mezi jednotlivými hodnotami nebyly zjištěny statisticky prokazatelné odlišnosti ($F=1,0351$, $df=39, 80$, $P=0,43782$). Hodnoty vývoje spor stanovené pomocí indexové stupnice GI byly zjištěny v rozmezí 1,82–1,98, s výjimkou izolátů NP0083 a NP0097, které dosáhly hodnoty GI 1,04, resp. 1,18. V tomto hodnocení byly zjištěny prokazatelné odlišnosti izolátů NP0083 a NP0097, které vykazovaly nejnižší hodnoty a lišily se od všech ostatních izolátů. Ostatní hodnoty nebyly statisticky odlišné ($H_{(39, N=11700)}=2617,580$, $P=0,000$).

Mortalita a infekce larev T. molitor po inokulaci suspenzí konidií izolátů B. bassiana

Mortalita larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií testovaných izolátů entomopatogenní houby *B. bassiana* se začala objevovat 3. den od zahájení biotestu, a to pouze v omezené míře u 7 izolátů (NP0138 16,67 %; I101 12,5 %; NP0008 a NP0027 8,33 %; NP0005, NP0083 a NP0182 4,17 %), kde rozdíly mezi hodnotami nebyly statisticky průkazné ($F=1,4455$, $df=40, 41$, $P=0,12219$). Znamená to, že 17,5 % izolátů z celkového počtu 40 testovaných izolátů bylo schopno vyvolat mortalitu jedinců již 3. den. Od 4. dne (včetně) hodnocení již byly rozdíly mezi jednotlivými izoláty výraznější a v následujících dnech i statisticky průkazné, nicméně pouze do 7. dne, kdy již nebyly zjištěny rozdíly mezi testovanými izoláty (viz statistické vyhodnocení pod jednotlivými grafy). Čtvrtý den byla prokazatelně nejvyšší mortalita larev zjištěna po ošetření suspenzí konidií izolátu NP0138 (79,17 %), a dále pak izolát NP0027 způsobil 66,67% mortalitu larev. U dalších 26 izolátů se hodnoty mortality pohybovaly v rozmezí 4,17–50 %, mortalita larev nebyla zaznamenána po ošetření suspenzí konidií u 12 izolátů. Čili 4. den 30 % testovaných izolátů stále nevyvolalo mortalitu larev. U infekce larev, stejně jako v případě mortality, byla opět prokazatelně nejvyšší hodnota dosažena izolátem NP0138 (75 %), a dále pak izolátem NP0027 (62,50 %), ovšem na rozdíl od mortality byly nulové hodnoty zjištěny u 23 izolátů. V případě ostatních testovaných izolátů se hodnoty infekce larev pohybovaly v rozmezí 4,17–50 %.

V polovině hodnocení (5. den) byla po ošetření suspenzí konidií izolátů I101, NP0008, NP0027 a NP0138 zjištěna 100% mortalita larev *T. molitor*. Ostatní hodnoty mortality larev se víceméně rozdělily do dvou skupin 54,17–87,50 % (8 izolátů) a 0–45,8 % (27 izolátů). Pouze u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu NP0133 nebyla zjištěna žádná mortalita. U infekce byla situace obdobná, hodnoty sice byly o něco nižší, nicméně průběh víceméně kopíroval průběh mortality. Pouze 6 izolátů (NP0003, NP0004, NP0097, NP0133, NP0140 a NP0238) nevyvolalo žádné příznaky infekce larev. Stoprocentní infekce byla zjištěna po ošetření larev suspenzí konidií izolátů I101, NP0027 a NP0138. U 23 izolátů se infekce projevila u 4,17–45,83 % larev, u zbylých 8 izolátů byly hodnoty 50–83,33 %.

Šestý den hodnocení již všechny izoláty, včetně izolátu NP0133, způsobilily mortalitu larev. Bylo zjištěno 5 izolátů, které způsobilily 100% mortalitu larev *T. molitor* (k předchozím čtyřem přibyl izolát NP0068). Nejnižší hodnoty mortality larev byly vyvolány izolátem NP0097 (20,83 %) a dále pak izoláty NP0004 a NP0140 (29,17 %). Izoláty NP0005, NP0123, NP0133 a NP0137 způsobilily shodně 45,83% mortalitu larev, u zbylých izolátů (28) byly hodnoty mortality larev pozorovány v rozmezí 50–95,83 %. Hodnoty infekce byly méně vyrovnané, izoláty NP0003, NP0133 a NP0238 dosud nevyvolaly pozorovatelné známky infekce, naopak u 4 izolátů byla infekce 100% (I101, NP0008, NP0027 a NP0138). Zbývající hodnoty byly v širokém rozmezí a jednoduše by se daly opět rozdělit, a to sice na izoláty s hodnotou infekce larev mezi 4,17 a 45,83 % (17 izolátů) a izoláty s hodnotou infekce mezi 50 a 91,67 % (16 izolátů).

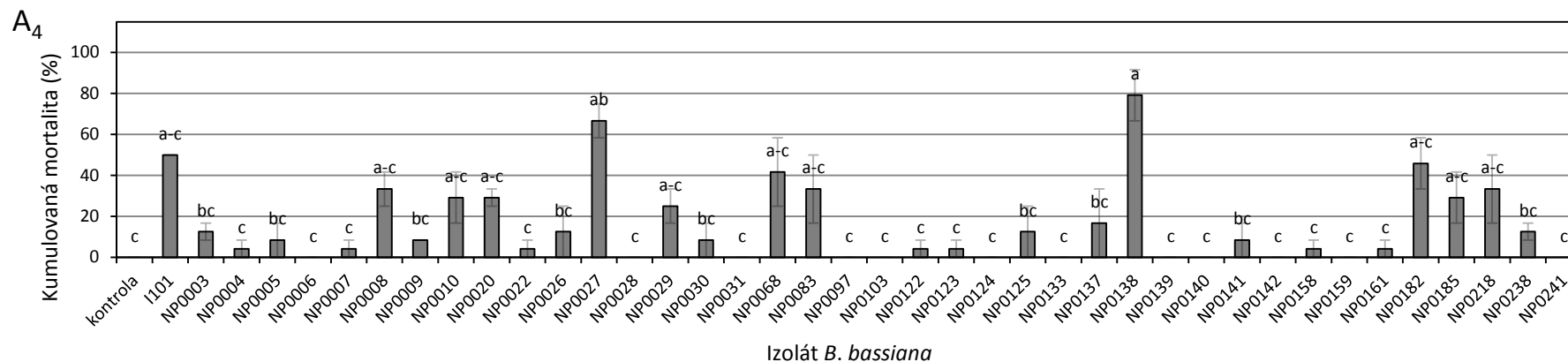
Od sedmého dne až do konce hodnocení se již mezi hodnotami mortality nevyskytly statisticky prokazatelné odlišnosti. Sedmý den se hodnoty pohybovaly v rámci rozmezí 54,17–100 %, nejnižší hodnota byla zjištěna po ošetření suspenzí konidií izolátu NP0133. U 12 izolátů byla zjištěna 100% mortalita larev. Infekce larev byla pozorována již pro všechny testované izoláty, kde u 7 izolátů byly pozorovány zjevné znaky infekce u 100 %

případů. Infekce larev v rozmezí 33,33–45,83 % byla pozorována u 7 z testovaných izolátů. Zbylé izoláty (26) způsobily infekci larev v rozmezí 50–95,83 %.

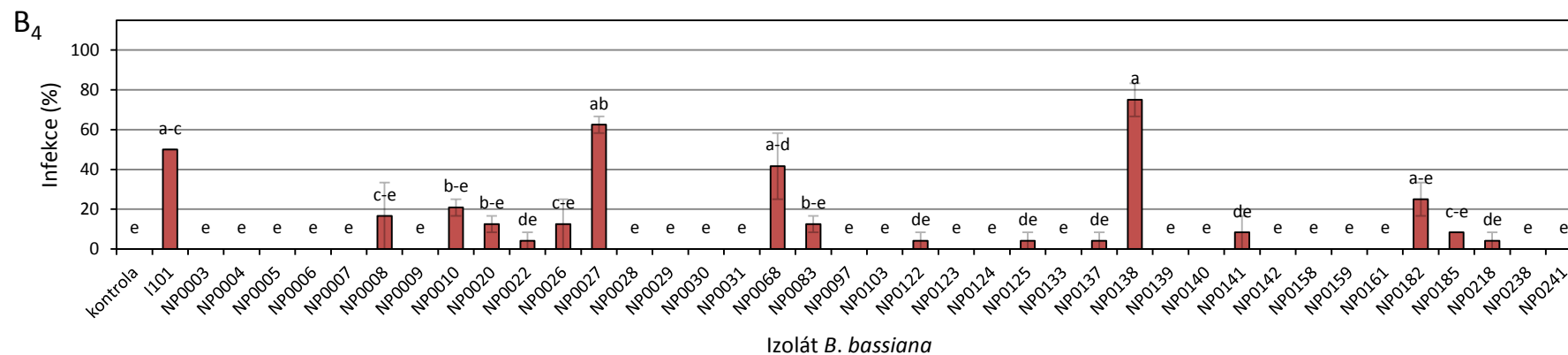
Osmý den hodnocení byla mortalita vyvolaná izoláty *B. bassiana* již u více než poloviny testovaných izolátů (22 izolátů) 100%. U zbylých izolátů byla zjištěna hodnota mortality larev v rozmezí 79,17–95,83 %. Devátý a 10. den pak hodnota mortality kolísala shodně v rozmezí 87,5–100 %, kdy 9. den hodnoty mortality 100 % dosáhlo 25 izolátů a 10. den pak 28 z testovaných izolátů. Statisticky odlišná byla pouze hodnota mortality v kontrolní variantě. Hodnoty infekce byly 8. den, dle daného izolátu, nižší než hodnoty mortality a pohybovaly se v rozmezí 62,5–100 %, kdy 13 izolátů dosáhlo 100% mortality larev. Devátý a 10. den se zjištěná infekce larev pohybovala v rozmezí 83,3–100 %, kde 9. den 21 izolátů a 10. den 24 izolátů dosáhlo 100% infekce larev a mezi hodnotami nebyly statisticky prokazatelné odlišnosti.

Mortalita larev v kontrolní variantě byla poprvé pozorována 9. den a to v 4,17 % případů, stejná hodnota byla zjištěna také následující den. V průběhu celého hodnocení nebyly zaznamenány jakékoli příznaky infekce larev v kontrolní variantě.

Grafy 5.1: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 4. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace při 20 °C; (mortalita: graf A₄, infekce: graf B₄)

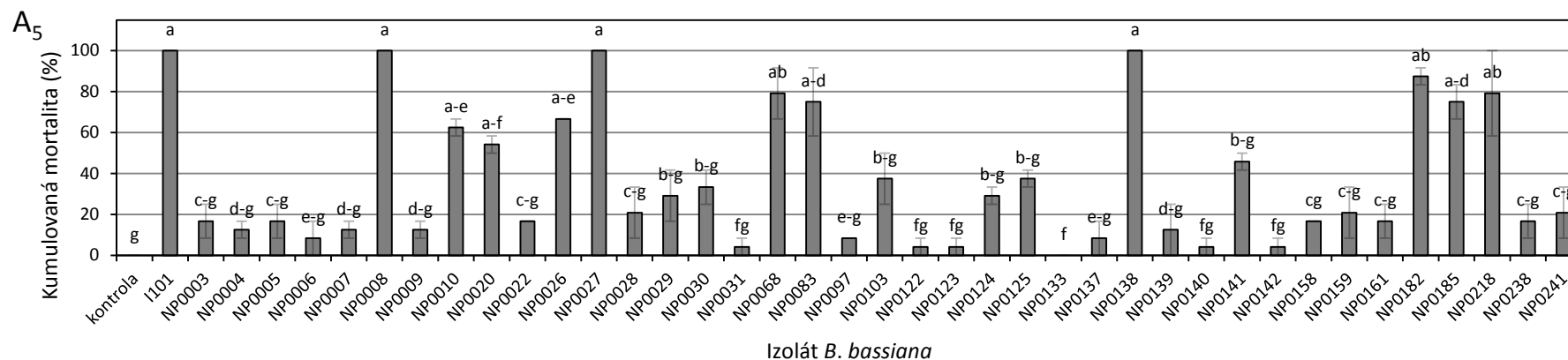


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=5,0527$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

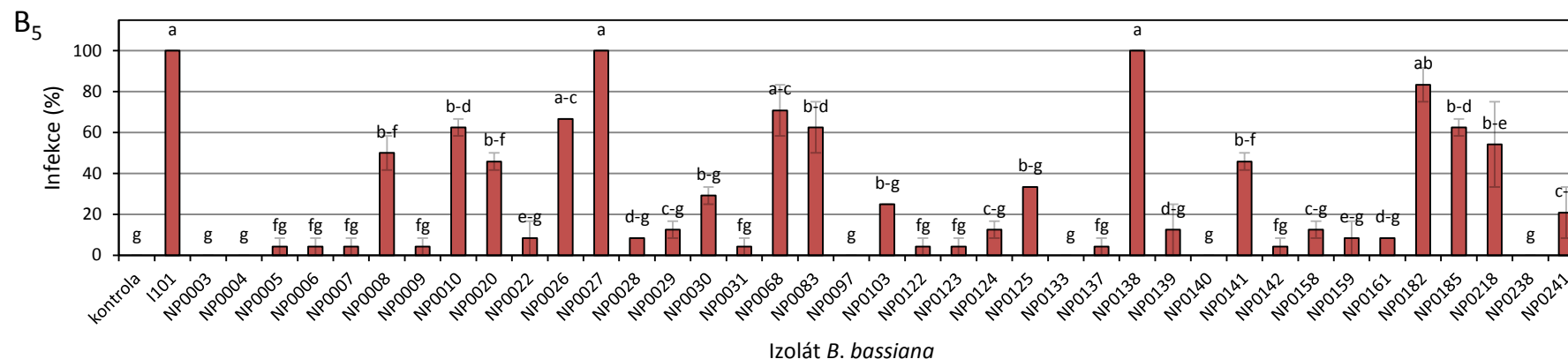


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=8,1978$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

Grafy 5.2: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 5. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace při 20 °C; (mortalita: graf A₅, infekce: graf B₅)

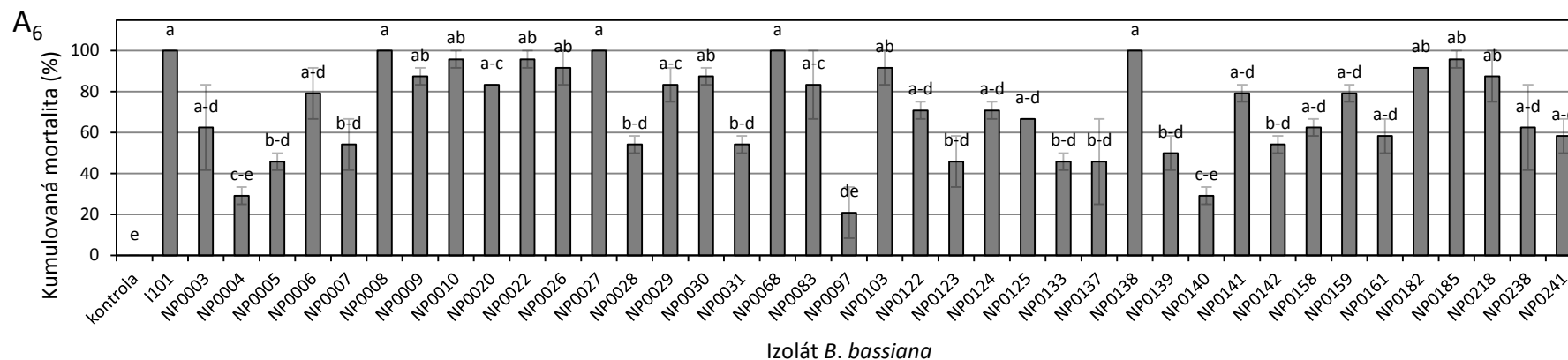


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=12,677$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

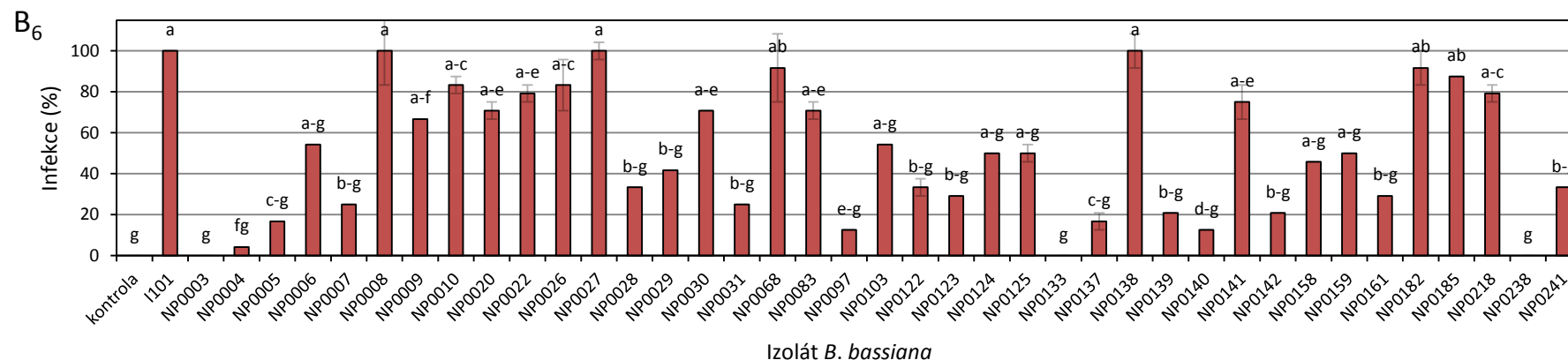


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=17,201$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

Grafy 5.3: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 6. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace při 20 °C; (mortalita: graf A₆, infekce: graf B₆)

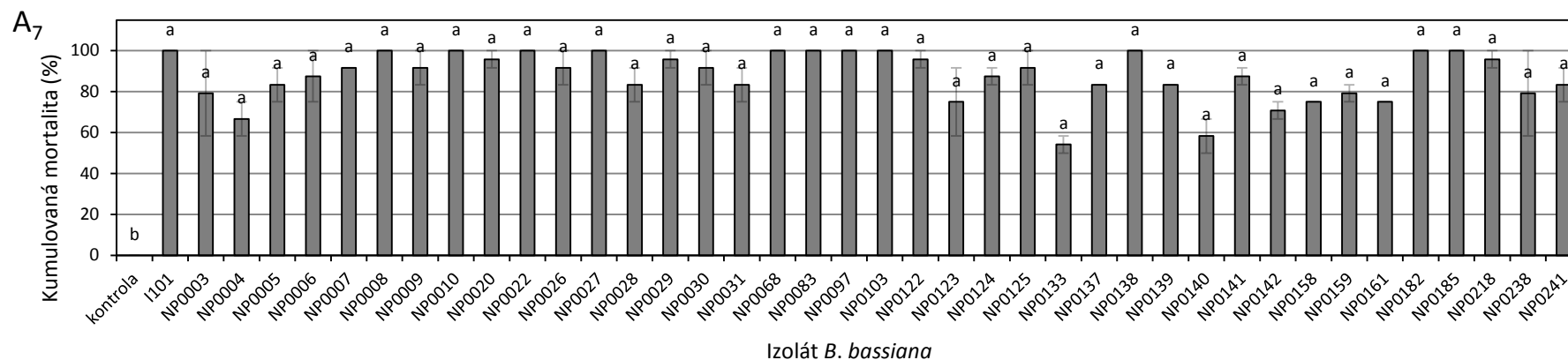


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=8,1924$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

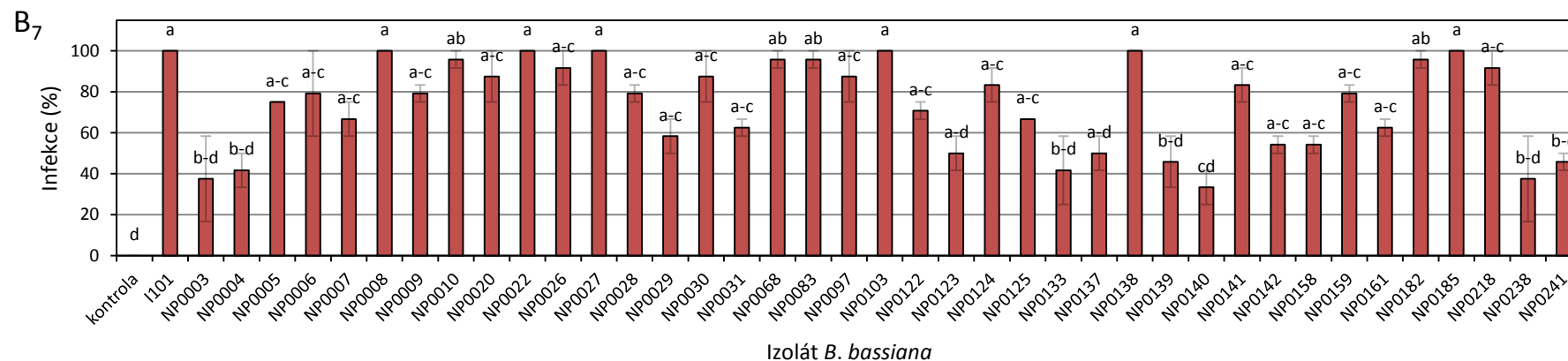


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=10,355$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

Grafy 5.4: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 7. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace při 20 °C; (mortalita: graf A₇, infekce: graf B₇)

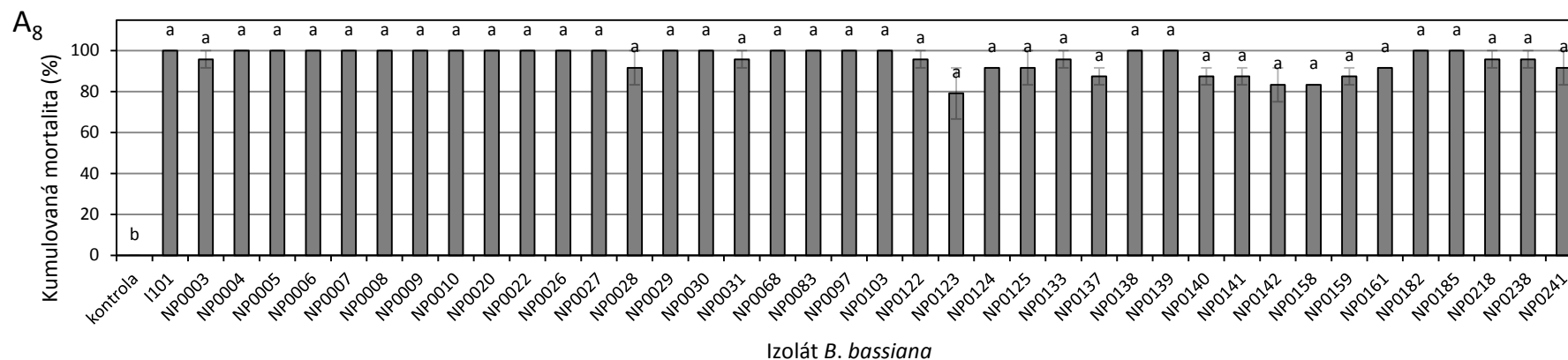


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=5,2629$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

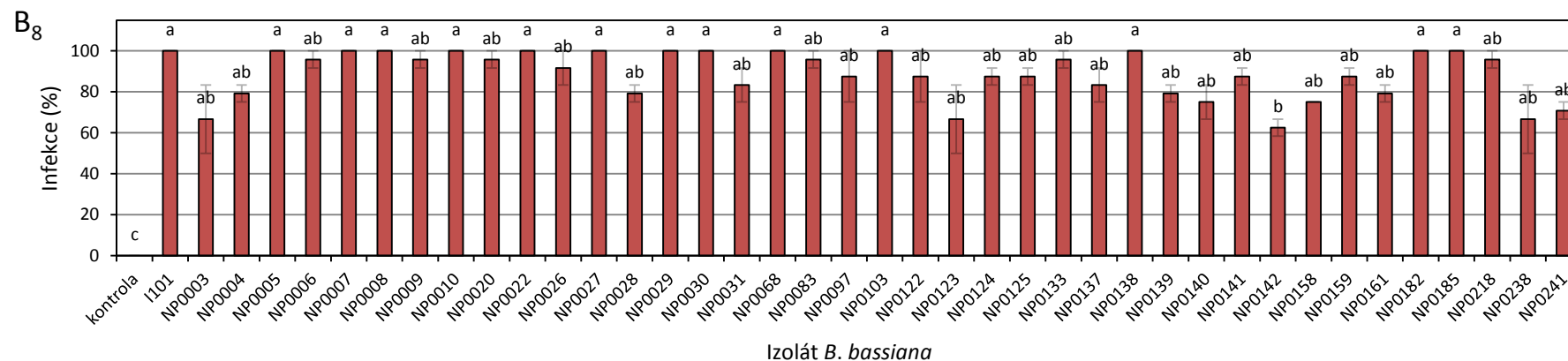


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=7,2402$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

Grafy 5.5: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 8. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace při 20 °C; (mortalita: graf A₈, infekce: graf B₈)

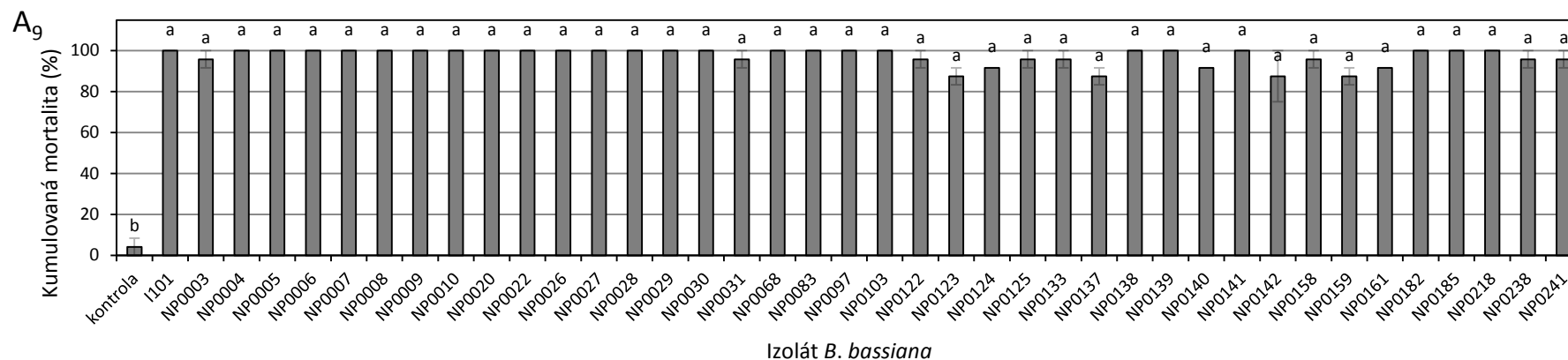


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=9,5977$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

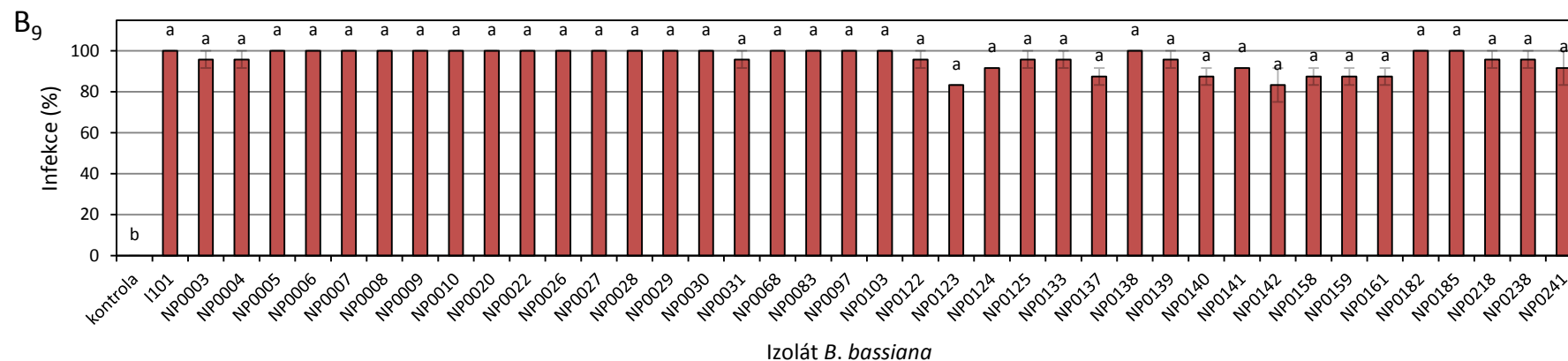


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=8,0320$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

Grafy 5.6: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 9. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace při 20 °C; (mortalita: graf A₉, infekce: graf B₉)

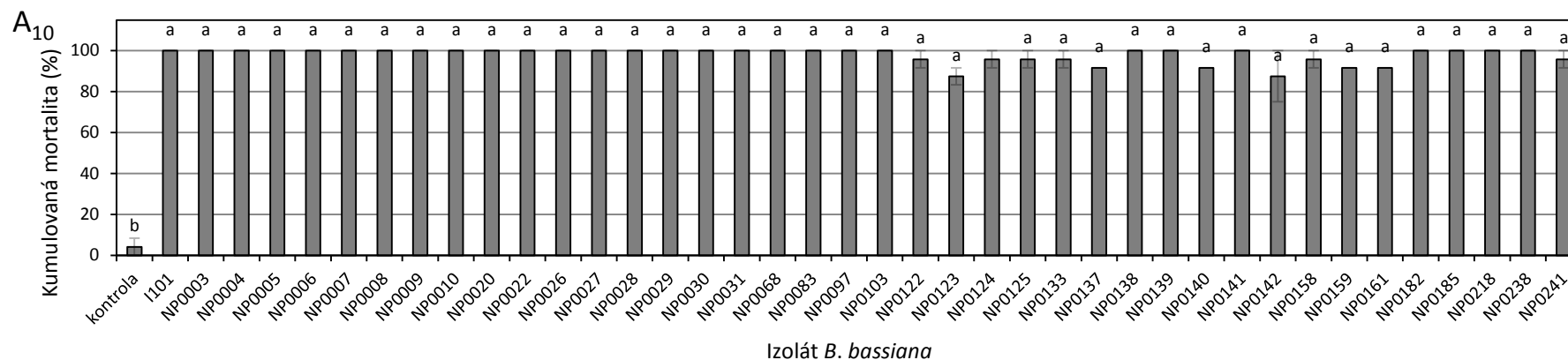


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=8,7793$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

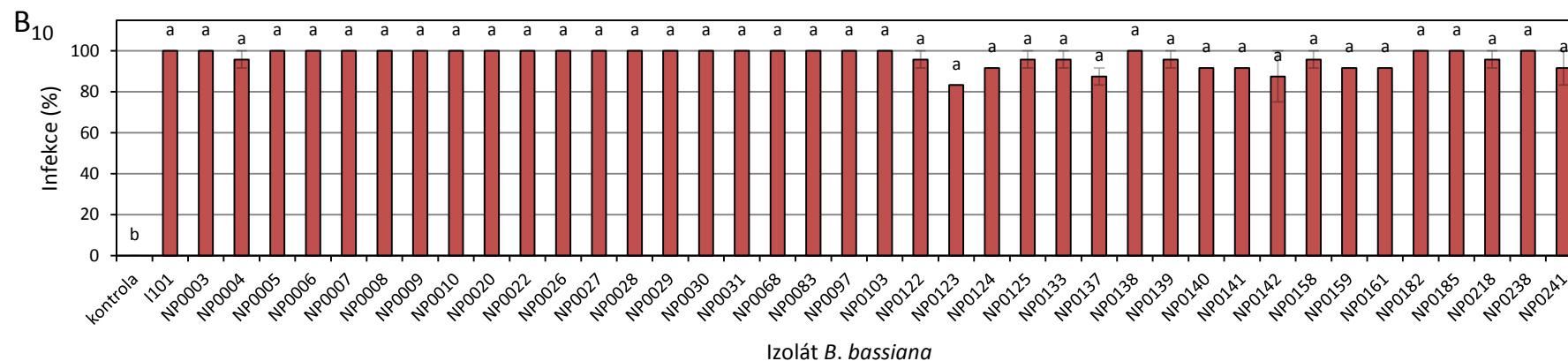


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=10,931$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

Grafy 5.7: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 10. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace při 20 °C; (mortalita: graf A₁₀, infekce: graf B₁₀)



*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=10,530$, $df=40, 41$, $P=0,00000$



* Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=10,659$, $df=40, 41$, $P=0,00000$

Vývoj nákazy testovaných izolátů B. bassiana na larvách T. molitor vyjádřený stupnicí FDI

Z hodnocení nákazy pomocí stupnice FDI zjistíme, že první známky nákazy, tedy melanizační skvrny viditelné na kutikule hostitele, se objevily, i když jen v relativně malé míře, již v prvním dni hodnocení u 25 testovaných izolátů, přičemž bylo dosaženo průměrné hodnoty indexu vývoje nákazy v rozmezí 0,02–0,25. Z izolátů, které první den hodnocení nevykazovaly příznaky nákazy na larvách, byly první melanizační skvrny pozorovány 2. den, pouze u izolátů NP0097 a NP0133 byly poprvé zjištěny až 3. den. Druhý den hodnocení nedosáhl žádný z testovaných izolátů průměrné hodnoty indexu 0,50, pouze izolát NP0027 se k této hodnotě značně přiblížil, když nákaza larev dosáhla průměrné hodnoty indexu 0,46. U zbylých izolátů byly zjištěny průměrné hodnoty indexu pohybující se od 0,02 do 0,35. Třetí den bylo hodnocením zjištěno, že 10 izolátů dosáhlo min. průměrné hodnoty indexu 0,50. Nejvyšší průměrné hodnoty indexu byly zjištěny u izolátů NP0027 a NP0138 (0,58). Pro zbylé izoláty byla průměrná hodnota indexu v rozmezí 0,08–0,48. Jak bylo uvedeno výše, v tento den byly pozorovány příznaky nákazy v určitém počtu případů u všech testovaných izolátů. Čtvrtý den se 3 z testovaných izolátů výrazně odlišily od zbylých izolátů, když byla zjištěna průměrná hodnota indexu 1,00 či vyšší (I101 – 1,00; NP0027 – 1,23; NP0138 – 1,31). Z ostatních izolátů 23 dosáhlo průměrné hodnoty 0,50–0,92, zbylých 14 izolátů stále nedosáhlo průměrné hodnoty 0,50.

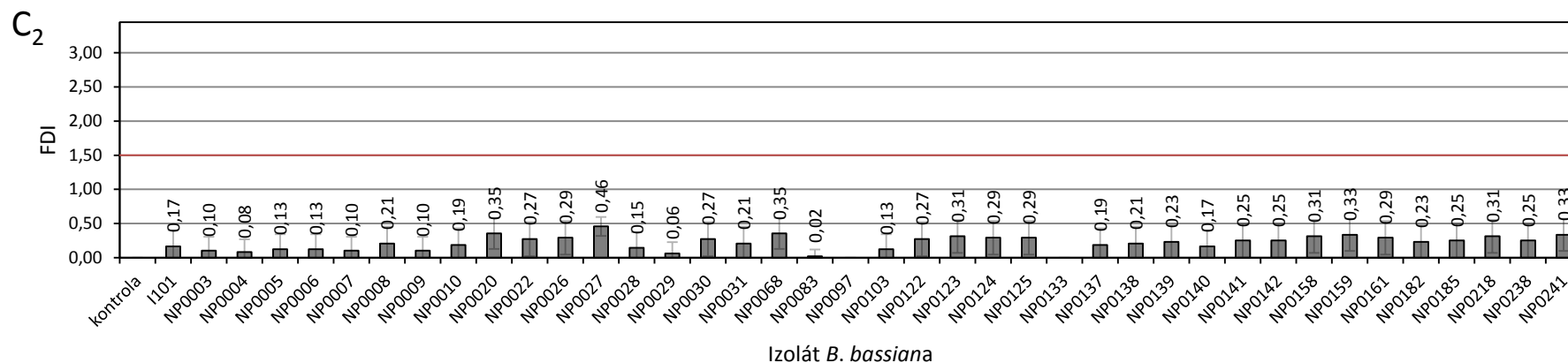
Pátý den byl nejrychlejší vývoj nákazy zaznamenán po ošetření larev izoláty NP0027 a NP0138, konkrétně průměrné hodnoty indexu 1,85, resp. 1,96. Dále izoláty I101 a NP0238 dosáhly průměrné hodnoty 1,63, resp. 1,69, a překročily hodnotu indexu 1,50, což je průměrná hodnota vyjadřující průběh nákazy, kdy lze pozorovat první myceliální vlákna na povrchu těla hostitele. Dále 9 izolátů dosáhlo průměrné hodnoty indexu 1,04–1,42, a u zbylých izolátů byla průměrná hodnota indexu v rozmezí 0,50–0,98. Následující 6. den přesáhlo 7 izolátů průměrný index 2,00, přičemž izolát NP0027 dosáhl průměrné hodnoty indexu 2,50 (pozorovatelné konidie na myceliu). Z ostatních izolátů 8 dosáhlo hodnoty indexu 1,54–1,79, 12 izolátů dosáhlo hodnoty indexu v rozmezí 1,02–1,48, u zbylých izolátů pak stále ještě index nedosáhl hodnoty 1,00 (nicméně nebyl u žádného z testovaných izolátů nižší než 0,50). Sedmý den 12 izolátů dosáhlo hodnoty indexu vyšší než 2,00 (2,08–2,5), z toho ale pouze izolát NP0027 a izolát NP0138 průměrné hodnoty 2,50. Ze zbylých izolátů byla u 10 zjištěna hodnota v rozmezí 1,54–1,98, u ostatních pak hodnota indexu v rozmezí 1,04–1,44, pouze izolát NP0133 dosáhl hodnoty indexu nižší než 1,00 (0,98). Osmý den pouze 3 izoláty (I101, NP0027, NP0138) dosáhly hodnoty indexu 2,50, 13 izolátů pak hodnoty v rozmezí 2,13–2,48, u zbytku testovaných izolátů byla pozorována (kromě izolátů NP0003, NP0028) hodnota indexu v rozmezí 1,50–1,94. Osm z testovaných izolátů 9. den dosáhlo indexu FDI 2,50. Pro 19 izolátů byla zjištěna průměrná hodnota indexu v rozmezí 2,04–2,48. Zbylé indexy pro testované izoláty byly vyšší než 1,50, nicméně nedosahovaly hodnoty 2,00.

V průběhu celého hodnocení nebylo dosaženo průměrné hodnoty indexu 3,00, 17 z testovaných izolátů dosáhlo hodnoty indexu 2,50–2,69 (nejvyšší hodnota byla zjištěna u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu NP0008). U zbylých izolátů, s výjimkou izolátu NP0004 (hodnota indexu 1,94), byly hodnoty indexu v rozmezí 2,00–2,46. V kontrolní variantě byly první příznaky nákazy pozorovány 9. den, kdy hodnota indexu byla 0,04

a zůstala stejná až do 10. dne hodnocení. Byla zde zjištěna mortalita 1 larvy z celkového počtu 24 larev.

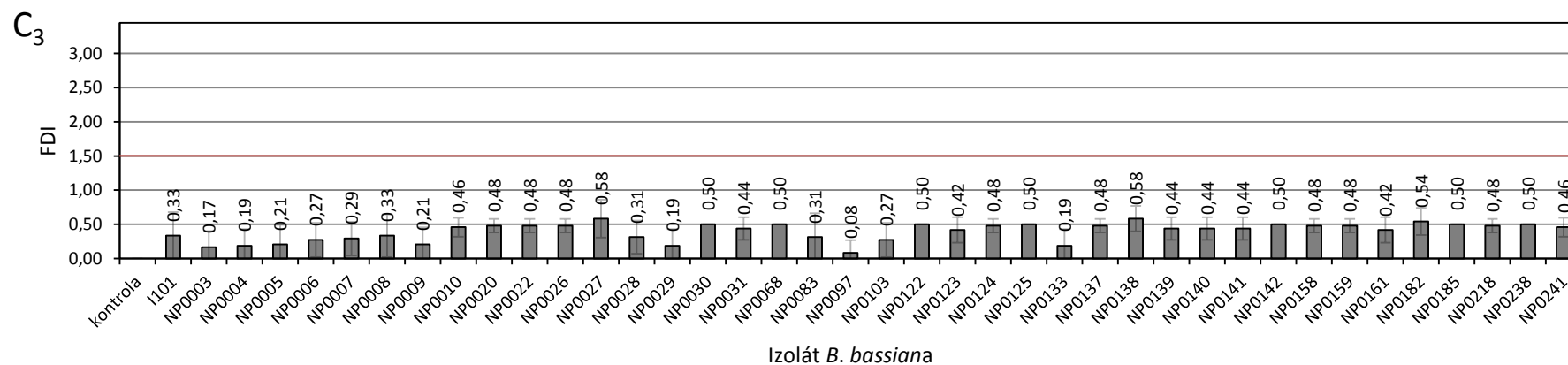
Pokud se znovu podíváme na hodnocení vývoje nákazy dle stupnice FDI, z hlediska dosažení „kritické“ hodnoty 1,50, pak zjistíme následující: první izoláty (I101, NP0027, NP00138 a NP0238) dosáhly hodnoty indexu 1,50 mezi 4. a 5. dnem zatímco izolát NP0028 dosáhl této hodnoty nejpozději, a to sice mezi 8. a 9. dnem. Z ostatních izolátů, které byly testovány, jich 12 dosáhlo námi sledovanou hodnotu mezi 5. a 6. dnem, 6 izolátů pak mezi 6. a 7. dnem a zbylých 17 z testovaných izolátů dosáhlo hodnoty indexu 1,50 mezi 7. a 8. dnem.

Graf 5.8: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 2. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



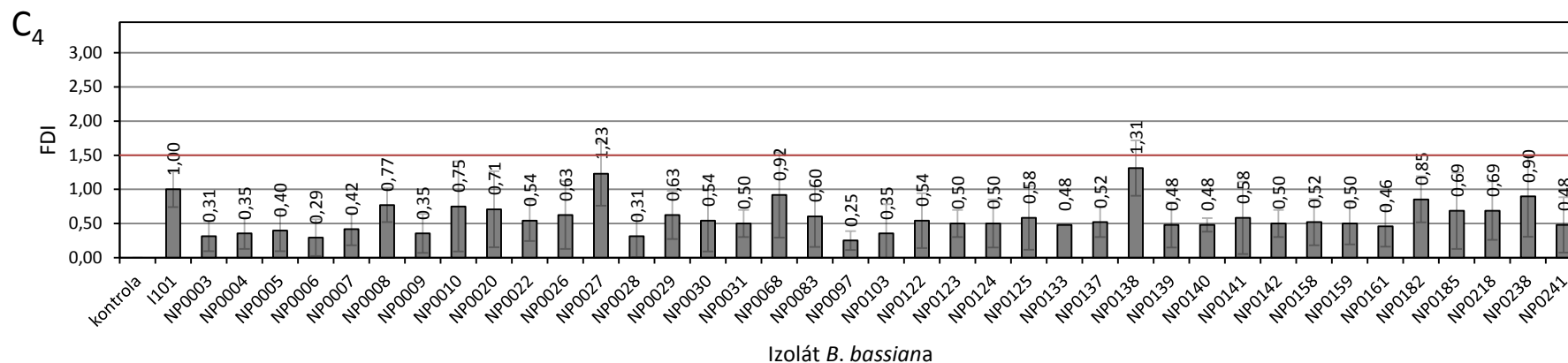
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=189,4073$, $P=0,000$

Graf 5.9: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 3. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



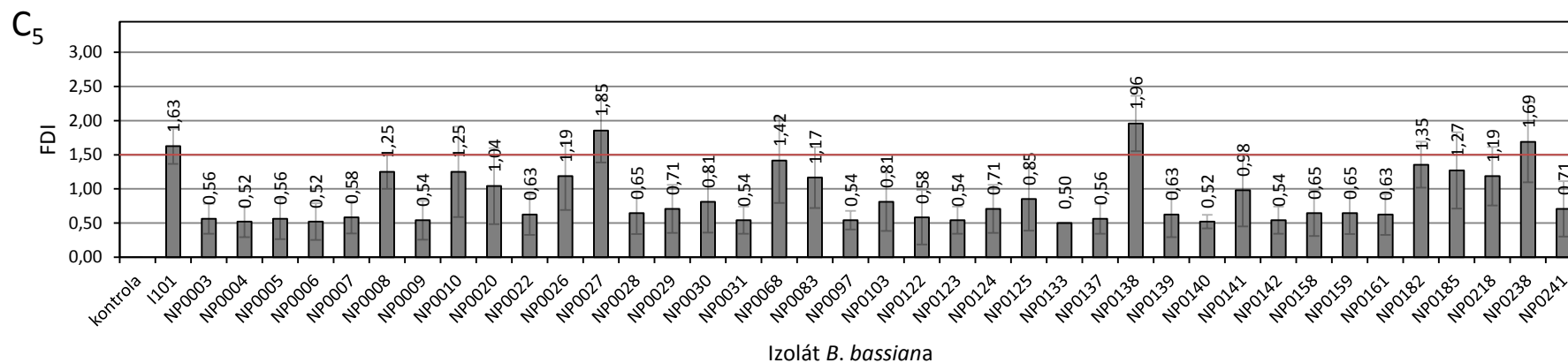
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=380,7734$, $P=0,000$

Graf 5.10: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 4. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



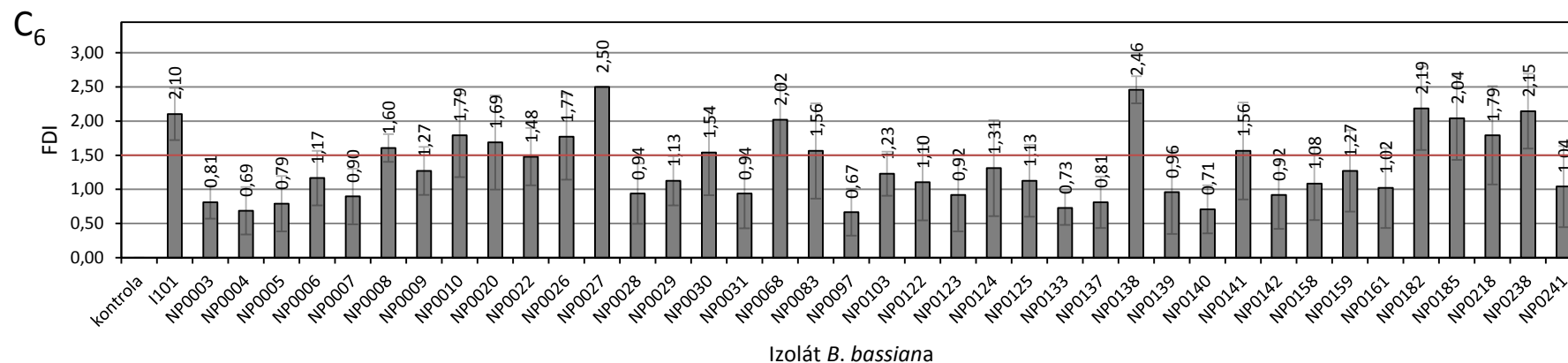
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=402,8833$, $P=0,000$

Graf 5.11: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 5. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



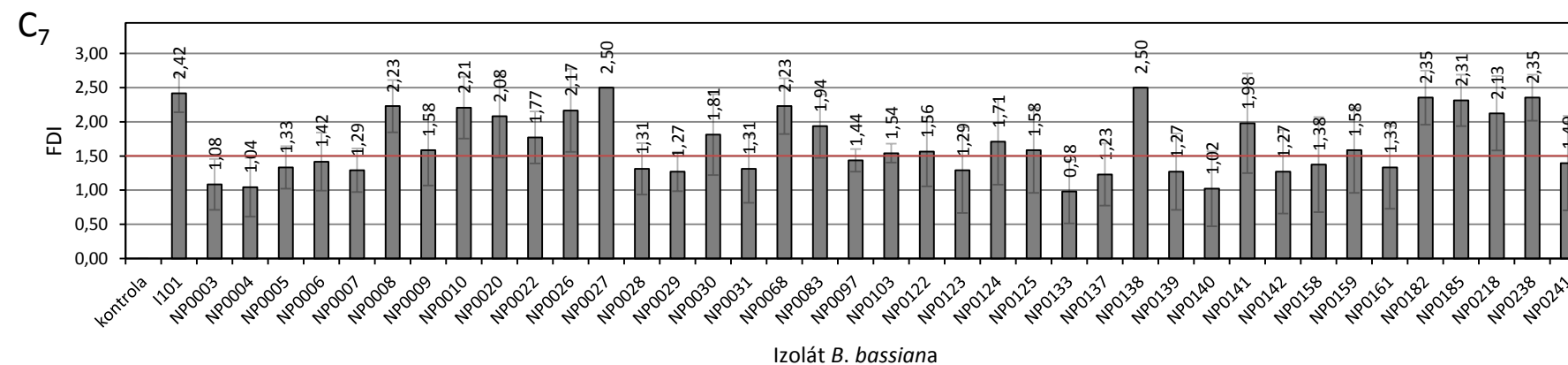
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=555,1102$, $P=0,000$

Graf 5.12: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 6. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



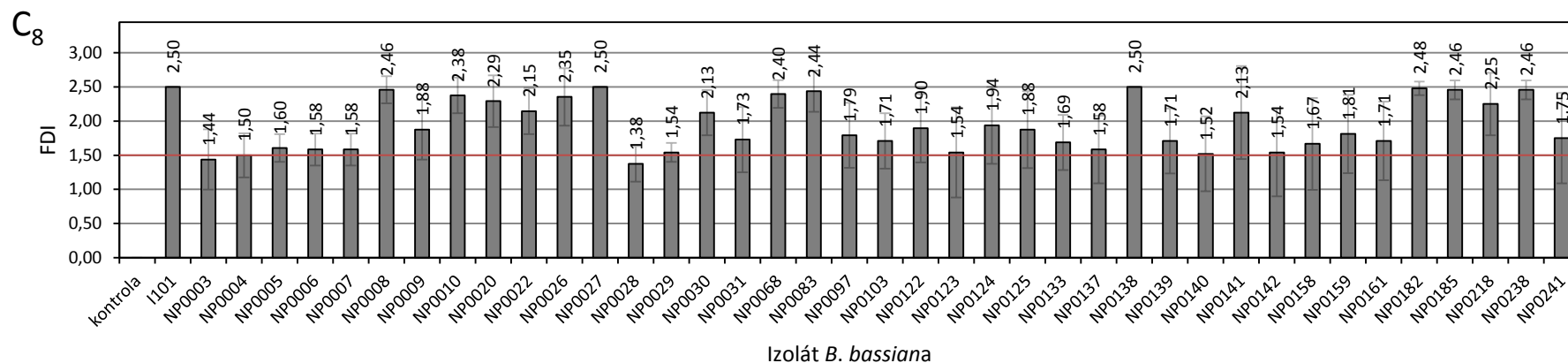
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=512,2916$, $P=0,000$

Graf 5.13: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 7. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



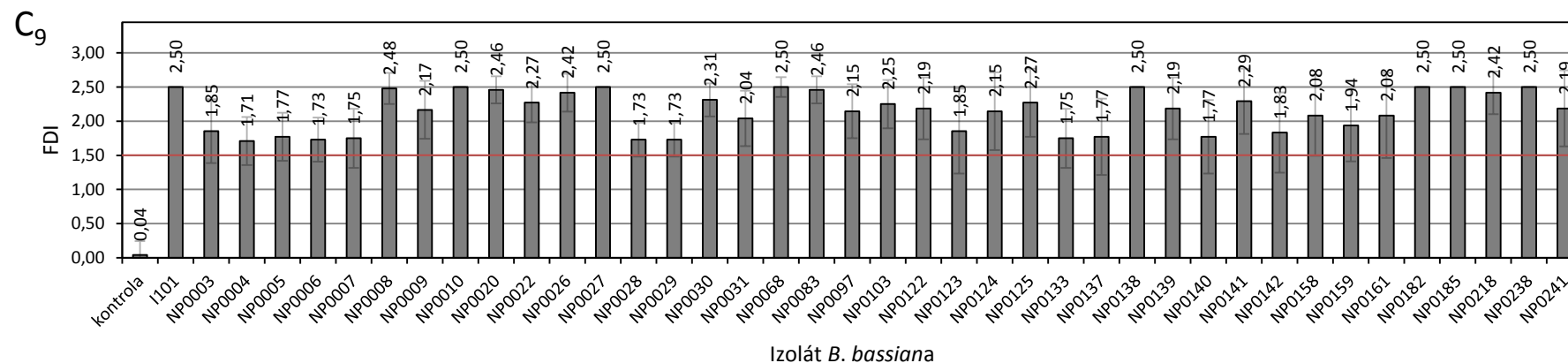
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=517,8535$, $P=0,000$

Graf 5.14: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 8. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



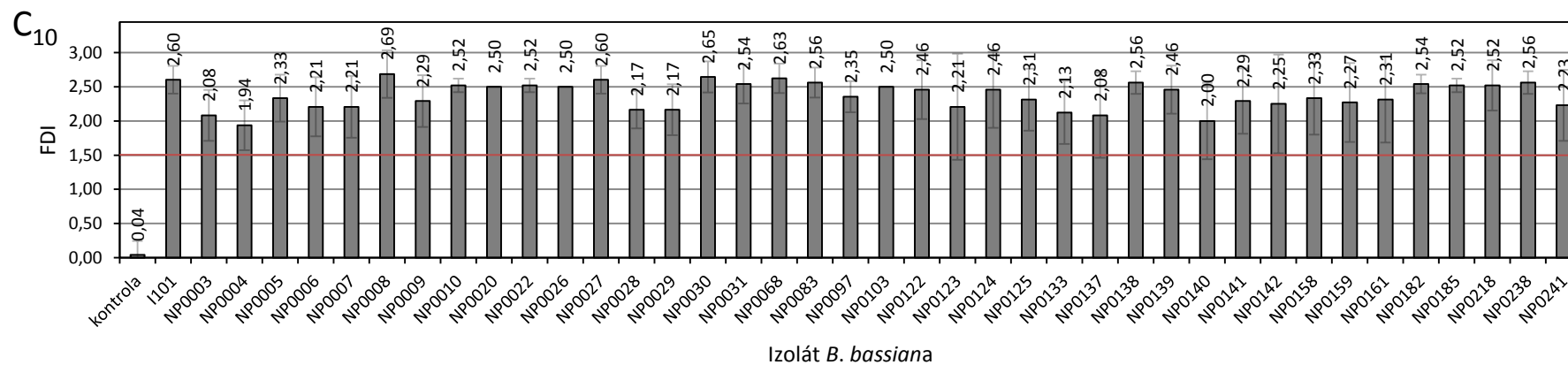
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=555,2113$, $P=0,000$

Graf 5.15: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 9. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=504,1438$, $P=0,000$

Graf 5.16: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 10. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C

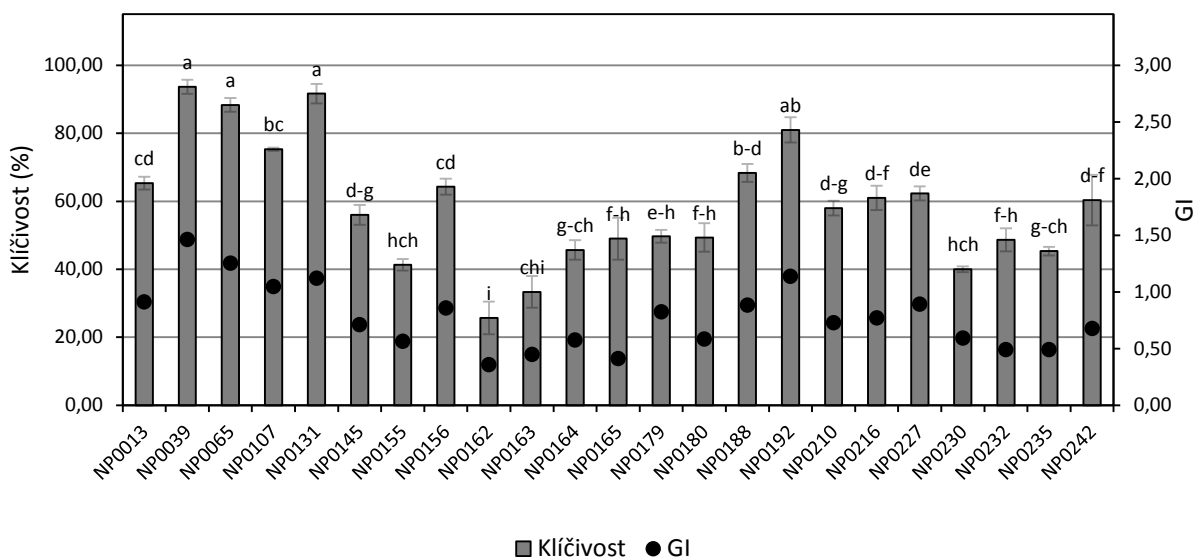


* $P < 0,05$ (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(40, N=984)}=365,8909$, $P=0,000$

Klíčivost a vývoj konidií *B. caledonica* stanovený pomocí indexové stupnice GI

Klíčivost konidií byla stanovena po 24 hodinách pomocí standardního laboratorního testu klíčivosti, kdy statistickou analýzou byly zjištěny prokazatelné rozdíly ($F=58,261$, df 22, 46, $P=0,0000$) v klíčivosti testovaných izolátů, kde nejvyšší hodnoty klíčivosti byly pozorovány u izolátů NP0039, NP0131, a to sice 93,67 %, resp. 91,67 %. U deseti izolátů byla pak hodnota klíčivosti vyšší než 50 %, a to v rozmezí 56–81 %, u zbylých 11 izolátů pak v rozmezí 25,67–49,67 %. Co se hodnoty indexu GI týče pak i v tomto případě byly zaznamenány statisticky významné odlišnosti ($H_{(22, N=6900)}=915,6265$, $P=0,000$), kde nejvyšší hodnoty indexu bylo dosaženo u konidií izolátu NP0039 (1,46) a nejnižší pak u konidií izolátu NP0162 (0,36). Pouze 5 z testovaných izolátů dosáhlo ve vývoji spor dle GI hodnoty vyšší než 1,00 a 13 izolátů pak hodnoty vyšší než 0,50, zároveň ne však hodnoty 1,00.

Graf 5.17: Hodnoty klíčivosti a GI spor *B. caledonica* po inkubaci v teplotě 20 °C po dobu 24 hodin



Tabulka 5.1: Vícenásobné porovnání průměrného pořadí hodnot GI testovaných izolátů *B. caledonica*, pomocí Kruskal-Wallisova testu, jež byly stanoveny po 24 hodinách inkubace suspenze o koncentraci 1×10^6 spor/ml v teplotě 20 °C

Izolát <i>B. caledonica</i>	Izolát <i>B. caledonica</i>																							
	NP0013	NP0039	NP0065	NP0107	NP0131	NP0145	NP0155	NP0156	NP0162	NP0163	NP0164	NP0165	NP0179	NP0180	NP0188	NP0192	NP0210	NP0216	NP0227	NP0230	NP0232	NP0235	NP0242	
NP0013		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0039	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0065	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0107	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0131	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0145	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0155	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0156	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0162	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0163	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0164	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0165	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0179	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0180	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0188	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***	***
NP0192	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***	***
NP0210	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***	***
NP0216	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***	***
NP0227	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***	***
NP0230	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***
NP0232	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***	***
NP0235	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***	***
NP0242	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***		***

Kruskal-Wallisův test: ($H_{(22, N=6900)}=915,6265, P=0,000$); *** Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Mortalita a infekce larev T. molitor po inokulaci suspenzí konidií izolátů B. caledonica

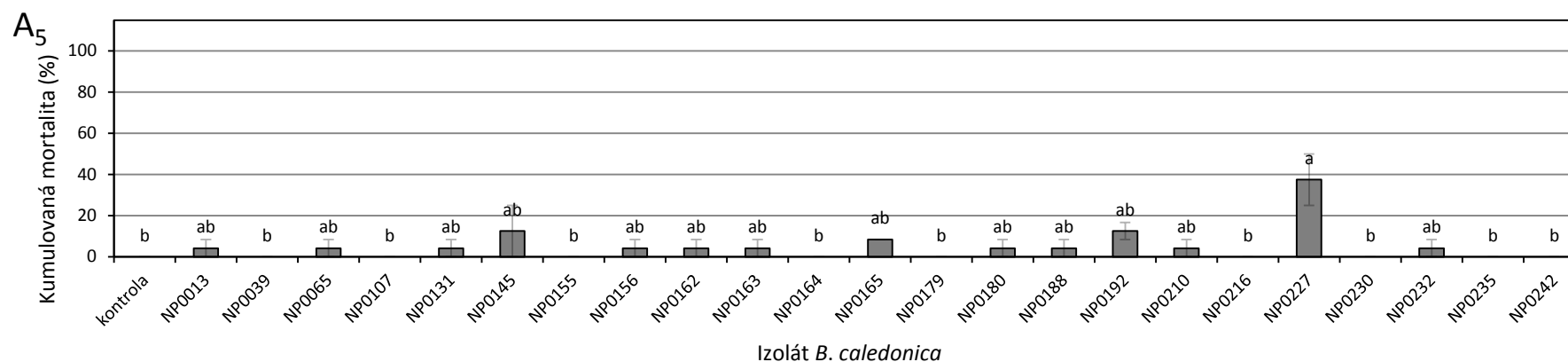
Stejně jako hodnocení účinnosti izolátů *B. bassiana* na larvách *T. molitor*, byla hodnocena i účinnost izolátů houby *B. caledonica*. První příznaky mortality larev byly pozorovány 3. den po ošetření izoláty NP0131 (4,17 %), NP0192 (8,33 %) a NP00227 (4,17 %), u ostatních izolátů nebyla mortalita larev pozorována. Čtvrtý den byla mortalita larev zjištěna u 7 izolátů (k izolátům z předchozího dne přibyly izoláty NP0065, NP0165, NP0188 a NP0210), přičemž nejvyšší hodnoty bylo dosaženo po ošetření larev suspenzí konidií izolátu NP0227 (20,83 %), u ostatních izolátů byla zjištěna hodnota mortality larev 4,17 %, pouze izolát NP0192 způsobil 8,33% mortalitu larev. Zjevné příznaky infekce byly zjištěny při hodnocení larev 4. den, a sice u izolátů NP0131 (4,17 %) a NP0227 (12,50 %). Pátý den byla při hodnocení pozorována mortalita larev u 14 izolátů, kde prokazatelně nejvyšší hodnota byla způsobena ošetřením larev izolátem NP0227 (37,50 %) ($F=1,8586$, $df=23,24$, $P=0,06934$). U ostatních 13 izolátů se hodnota mortality larev pohybovala v rozmezí 4,17–12,50 % (statisticky srovnatelné hodnoty) a u zbylých 9 se mortalita neprojevila vůbec (NP0039, NP0107, NP0155, NP0164, NP0179, NP0216, NP0230, NP0235 a NP0242). Co se infekce larev týče, příznaky zjevné infekce byly zjištěny pouze u 3 následujících izolátů: NP0131 (4,17 %), NP 0191 (4,17 %) a NP0227 (20,88 %), ovšem hodnoty nebyly statisticky odlišné ($F=0,93494$, $df=23,24$, $P=0,56289$).

V následujícím hodnocení (6. den) byla mortalita larev pozorována u 21 izolátů, kde prokazatelně nejvyšší hodnota byla způsobena izolátem NP0242 (66,67 %), u zbylých izolátů se hodnota mortality pohybovala v rozmezí 4,17–45,83 % (hodnoty byly statisticky srovnatelné $F=2,3945$, $df=23,24$, $P=0,01918$). Pouze u larev ošetřených suspenzí konidií izolátů NP0039 a NP0107 nebyla mortalita pozorována. Hodnoty infekce larev zůstávaly nízké, a rovněž počet izolátů, pro které mohly být hodnoty infekce stanoveny, byl nízký (8 izolátů). Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo po ošetření larev suspenzí konidií izolátu NP0227 (29,17 %), izolát NP0145 pak způsobil infekci u 8,33 % larev, u 6 dalších izolátů bylo dosaženo hodnoty 4,17 % (NP0013, NP0131, NP0164, NP0165, NP0192 a NP0230). Mezi všemi hodnotami nebyly zjištěny statistické odlišnosti ($F=1,5778$, $df=23,24$, $P=0,13708$).

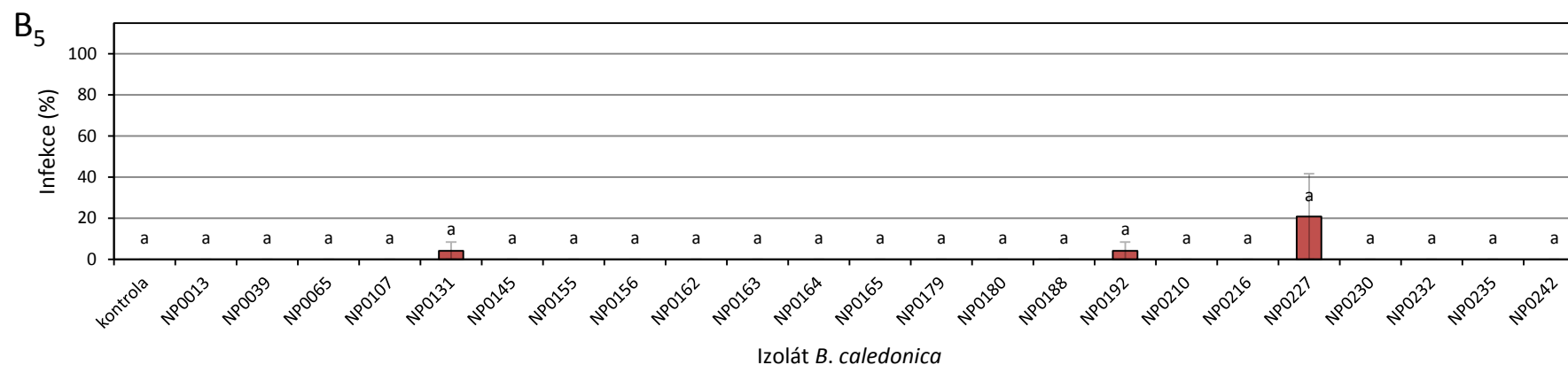
Sedmý den byla mortalita larev pozorována u všech testovaných izolátů, přičemž 13 izolátů dosáhlo hodnoty v rozmezí 12,50–45,83 %, u zbylých izolátů byla hodnota mortality larev zjištěna v rozmezí 50–91,67 %, kdy nejvyšší hodnota byla zjištěna u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu NP0145. Infekce byla pozorována pro všechny izoláty, až na larvy ošetřené suspenzí konidií izolátu NP0179, kdy nejvyšší hodnota byla zjištěna pro izolát NP0227, a to 54,17 %, zatímco u zbylých izolátů se rozmezí hodnot pohybovalo od 4,17 % do 29,17 %. Osmý den dosáhl jako první a současně jediný izolát NP0145 100% mortality larev, pro 5 izolátů byla hodnota mortality larev zjištěna v rozmezí 20,83–45,83 %, u zbylých 17 izolátů se pak hodnota mortality larev pohybovala mezi 50 a 95,83 %. Infekce larev byla pozorována pro všechny testované izoláty, nicméně nejvyšší hodnoty bylo dosaženo u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu NP0227 (62,50 %), následně pouze u 4 izolátů byla hodnota infekce 50 % a vyšší, pro zbylé izoláty byla hodnota infekce 4,17–45,83%. Předposlední den testu (9. den) byla 100% mortalita larev pozorována pro 3 izoláty (k izolátu NP0145 přibyly izoláty NP0230 a NP0242), u ostatních izolátů (až na izoláty

NP0131 a NP0156, které vyvolaly mortalitu 29,17 %, resp. 45,83 %), se hodnota mortality larev pohybovala v rozmezí 54,17–95,83 %. Desátý den byl počet izolátů dosáhnuvších 100% mortality larev shodný s předchozím dnem, taktéž hodnota pro izolát NP0131 se nezměnila, pouze interval hodnot mortality larev u zbývajících testovaných izolátů dosáhl vyšší spodní hranice, a to 70,83 %. Mortalita larev v kontrolní variantě byla pozorována od 9. dne, kdy bylo zjištěno 4,17 % mrtvých jedinců. Následný kontrolní den (10. den) se hodnota mortality larev zvýšila na 8,33 %. Hodnota infekce larev byla 9. den u 9 izolátů v rozmezí 29,17–45,83 %, u zbývajících izolátů pak v rozmezí 50–87,5 %, kde nejvyšší hodnota byla pozorována pro izolát NP0227. Desátý den již u larev ošetřených suspenzemi konidií 2 izolátů (NP0230, NP0242) bylo dosaženo 100% infekce larev, u zbylých izolátů (s výjimkou izolátů NP0039, NP0131 a NP0156) se hodnota infekce pohybovala v rozmezí 50–91,67 %.

Grafy 5.18: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 5. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C; (mortalita: graf A₅, infekce: graf B₅)

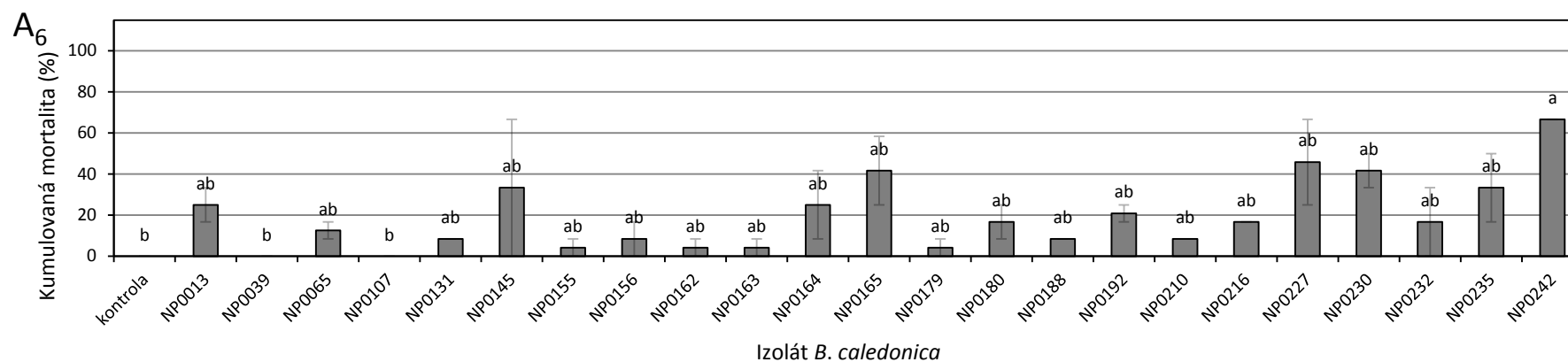


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=1,8586$, $df=23, 24$, $P=0,06934$

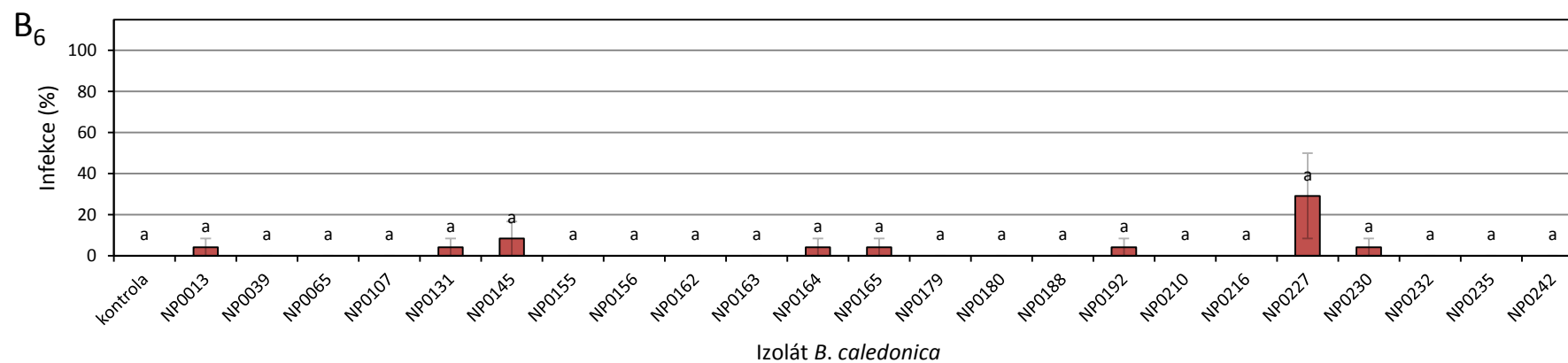


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=0,93494$, $df=23, 24$, $P=0,56289$

Grafy 5.19: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 6. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C; (mortalita: graf A₆, infekce: graf B₆)

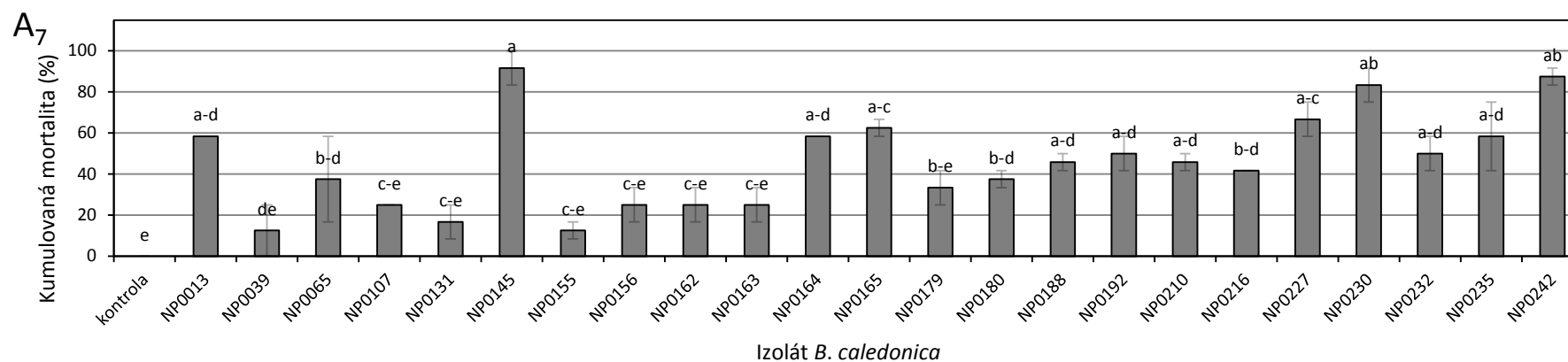


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=2,3945$, $df=23, 24$, $P=0,01918$

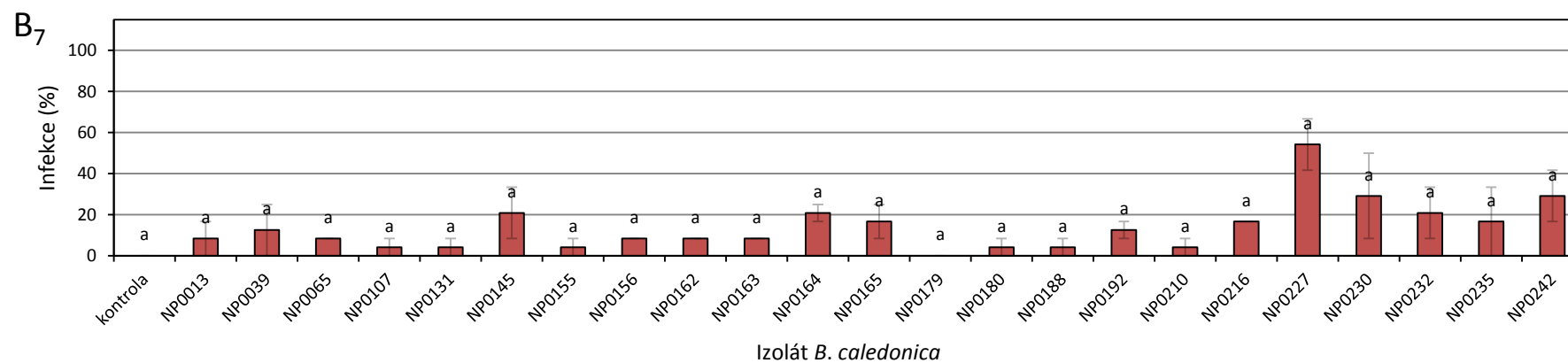


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=1,5778$, $df=23, 24$, $P=0,13708$

Grafy 5.20: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 7. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C; (mortalita: graf A₇, infekce: graf B₇)

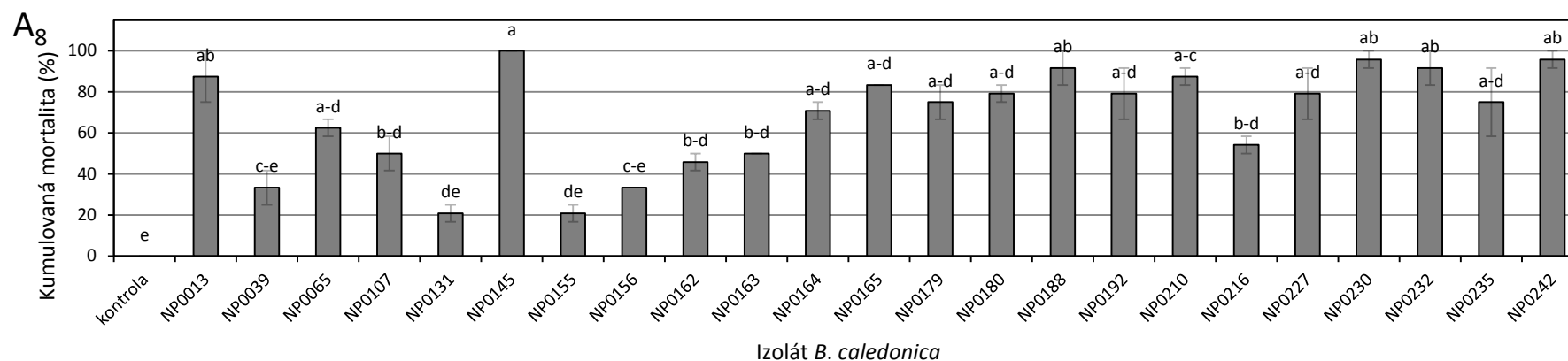


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=7,6799$, $df=23, 24$, $P=0,00000$

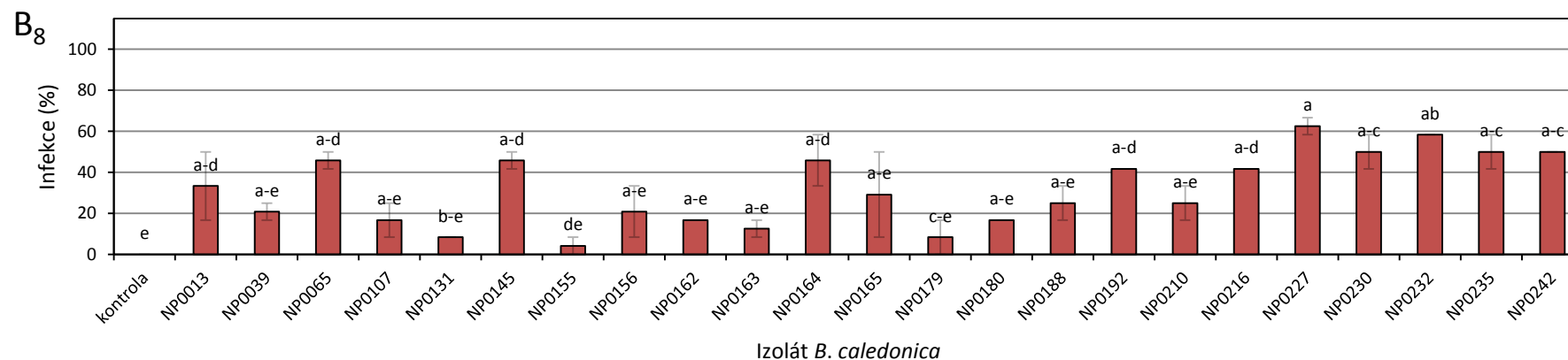


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=1,7407$, $df=23, 24$, $P=0,09238$

Grafy 5.21: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 8. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C; (mortalita: graf A₈, infekce: graf B₈)

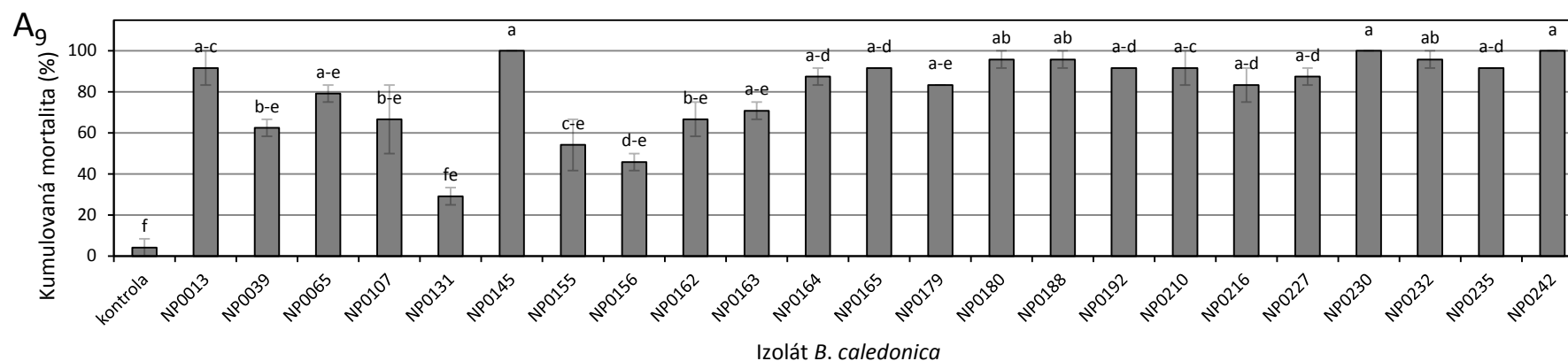


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=9,8755$, $df=23, 24$, $P=0,00000$

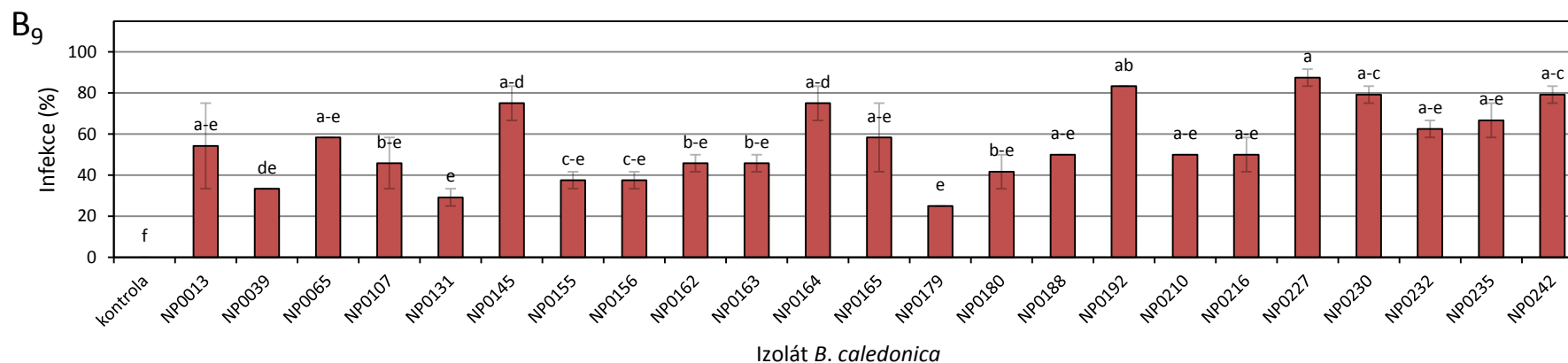


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=5,2756$, $df=23, 24$, $P=0,00007$

Grafy 5.22: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 9. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C; (mortalita: graf A₉, infekce: graf B₉)

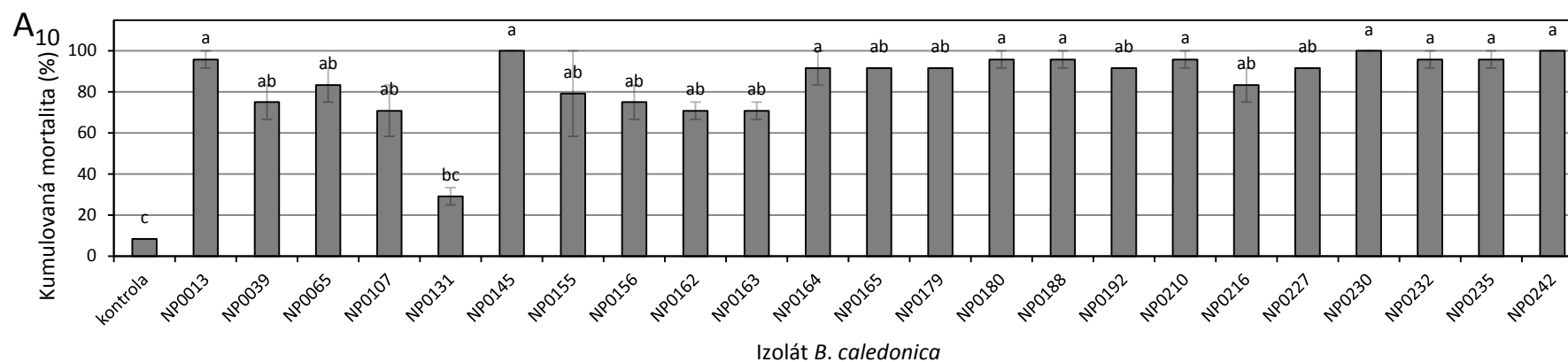


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=12,242$, $df=23, 24$, $P=0,00000$

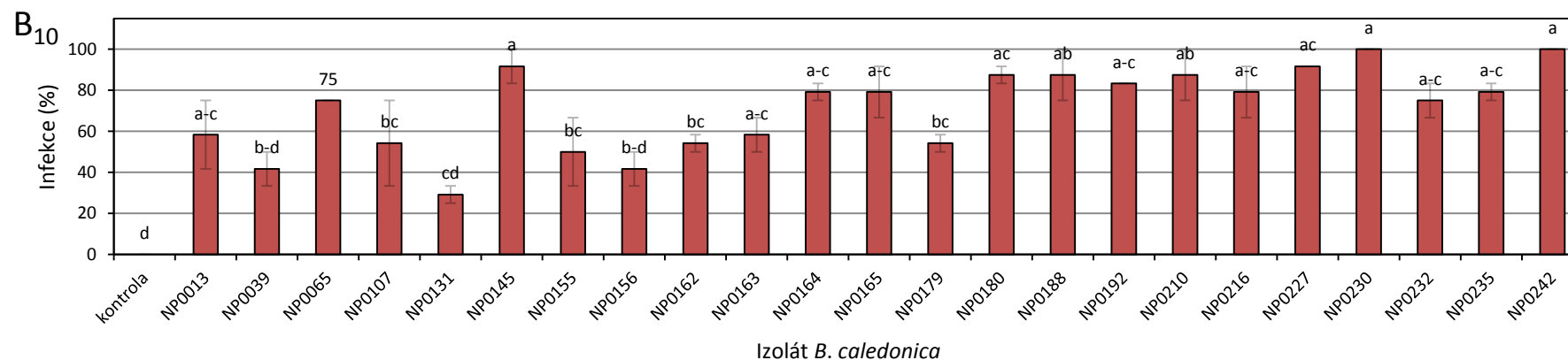


*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=10,222$, $df=23, 24$, $P=0,00000$

Grafy 5.23: Porovnání kumulované mortality a infekce larev *T. molitor* 10. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C; (mortalita: graf A₁₀, infekce: graf B₁₀)



*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=7,1824$, $df=23, 24$, $P=0,00000$



*Hodnoty označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test). Vyhodnocení: $F=7,3167$, $df=23, 24$, $P=0,00000$

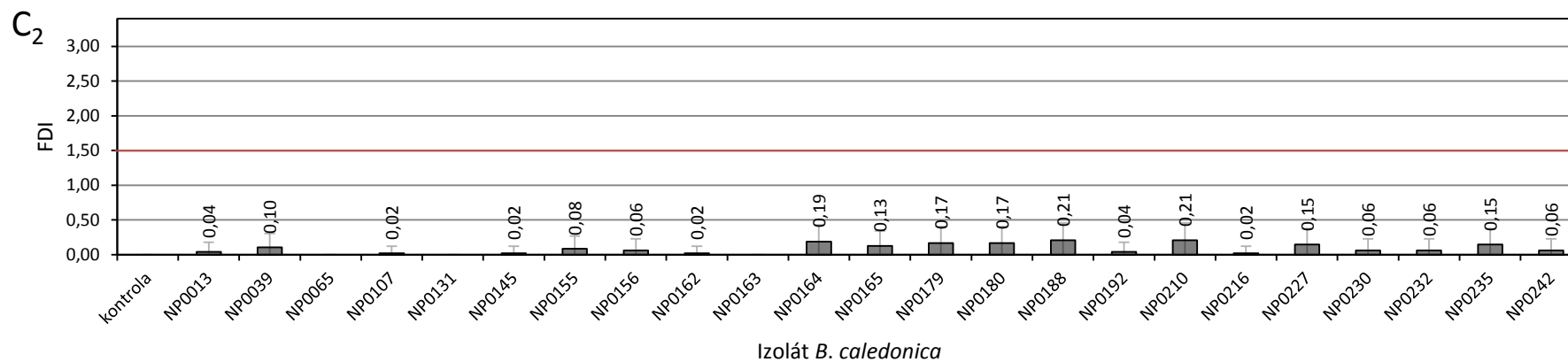
Hodnocení vývoje nákazy B. caledonica na larvách T. molitor za využití stupnice FDI

Analogickým způsobem, jako byla vyhodnocována nákaza pohledem na její stupeň vývoje dle stupnice FDI pro izoláty *B. bassiana*, byla vyhodnocena také nákaza, respektive její rozvoj, pro testované izoláty *B. caledonica*.

První příznaky rozvoje onemocnění po inokulaci larev byly zjištěny 2. den v podobě melanizačních skvrn, které byly pozorovány téměř u všech testovaných izolátů s výjimkou izolátů NP0065, NP0131 a NP0163 (u těchto izolátů, byly první melanizační skvrny pozorovány až 3. den hodnocení). Druhý den se index vývoje nákazy u izolátů pohyboval v rozmezí 0,02–0,21. Třetí den ani jeden z testovaných izolátů nedosáhl průměrné hodnoty indexu 0,50, nejvyšší hodnoty indexu byly zjištěny u larev ošetřených suspenzí konidií izolátů NP0179, NP0180, NP0230 a NP0242 (0,35). Nicméně již 4. den dosáhly hodnoty indexu 0,50 izoláty NP0230 a NP0242 a izolát NP0227 dokonce hodnoty indexu 0,56. Zatímco hodnoty indexu ostatních testovaných izolátů se pohybovaly v rozmezí 0,23–0,46. Pátý den již 8 izolátů dosáhlo hodnoty indexu 0,50 a vyšší, nejvyšší hodnota indexu byla zjištěna u izolátu NP0227 (0,77). U zbylých izolátů se hodnota indexu pohybovala stále pod průměrnou hodnotou 0,50, konkrétně v rozmezí 0,31–0,48. Šestý den 16 z celkového počtu testovaných izolátů dosáhlo hranice hodnoty indexu rovné 0,50 a vyšší, nicméně stále nebylo ani v jednom případě dosaženo hodnoty indexu 1,00. Nejvíce se této hodnotě přiblížil izolát NP0227, u kterého byl zjištěn index 0,90. U zbylých 7 izolátů se hodnota indexu rozvoje nákazy pohybovala v rozmezí 0,42–0,48. Sedmý den hodnocení byly pozorovány 4 izoláty, jež vyvolaly nákazu larev převyšující dle stupnice FDI hodnotu indexu 1,00 (NP0145 – 1,08, NP0227 – 1,15, NP0230 – 1,06 a NP0242 – 1,08). Ostatní zbylé izoláty sice u vývoje nákazy překročily hranici indexu 0,50, nicméně ne vyšší než 0,90. Osmý den sice vzrostl počet izolátů, které dosáhly hranice hodnoty indexu 1,00 a vyšší, ze 4 na 15, hodnoty indexu 1,50 však u žádného z nich dosaženo nebylo, pouze izolát NP0164 se k této hranici značně přiblížil, u larev byla zjištěna hodnota indexu 1,44. Osm zbylých izolátů vykazovalo rozvoj nákazy na larvách v rozmezí hodnot 0,63–0,92. Z hodnocení 9. dne pak zjistíme, že u 4 z testovaných izolátů dosáhl index rozvoje nákazy hodnoty o málo více než 1,50 (1,52–1,56). Pouze 4 izoláty (NP0039, NP0131, NP0155 a NP0156) nedosáhly indexu rozvoje nákazy 1,00, u zbylých 15 izolátů se pak hodnota indexu pohybovala v rozmezí 1,04–1,48. Poslední den hodnocení (10. den) byla zjištěna průměrná hodnota indexu rozvoje nákazy pro 14 z testovaných izolátů vyšší než 1,50, nicméně nejvyšší průměrné hodnoty indexu dosáhl izolát NP0230 (1,88), ze zbylých izolátů pouze izolát NP0131 nepřekročil hodnotu indexu 1,00, a byl tedy, co se vývoje nákazy týká, nejméně efektivní. U ostatních osmi izolátů se hodnota indexu pohybovala v rozmezí 1,13–1,46. V kontrolní variantě bylo dosaženo na konci hodnocení indexu dle stupnice FDI 0,08.

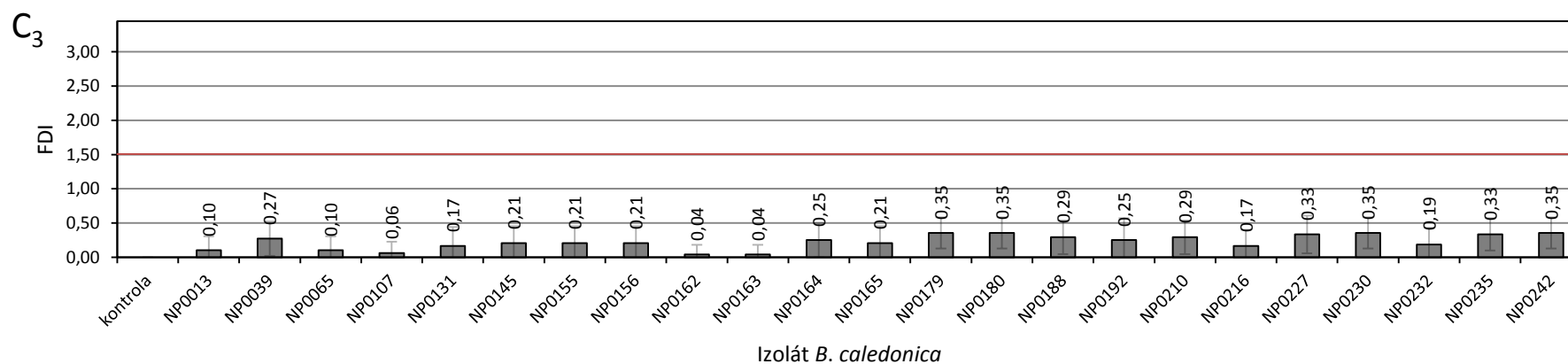
Z pohledu dosažení tzv. „kritické“ hodnoty dle stupnice FDI, tj. indexu 1,50, bylo této hodnoty dosaženo pouze u 14 z celkem 23 testovaných izolátů, z toho pro izoláty NP0164, NP0227, NP0230 a NP0242 mezi 8. a 9. dnem, u zbylých 10 izolátů pak mezi dnem 9 a 10.

Graf 5.24: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 2. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



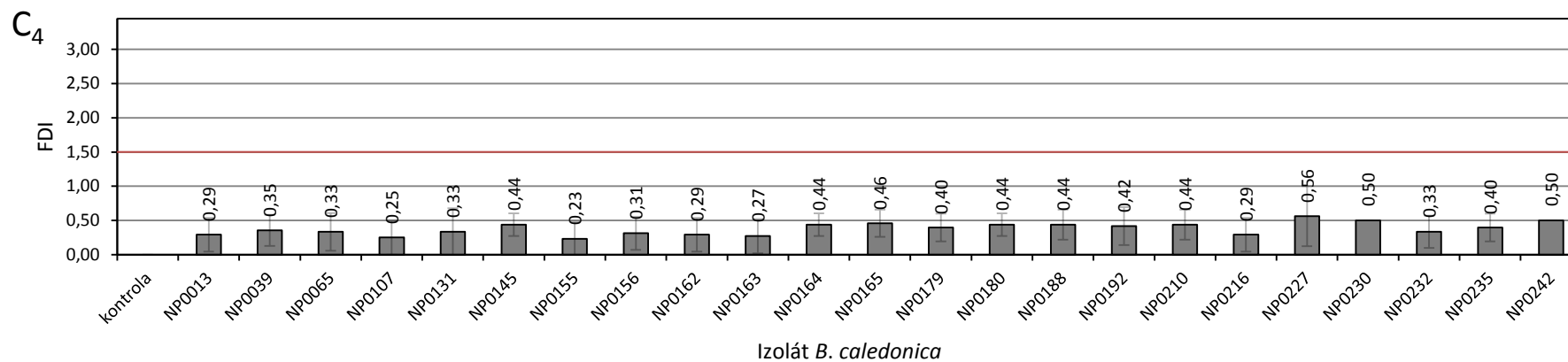
* $P < 0,05$ (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=79,74241$, $P=0,0000$

Graf 5.25: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 3. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



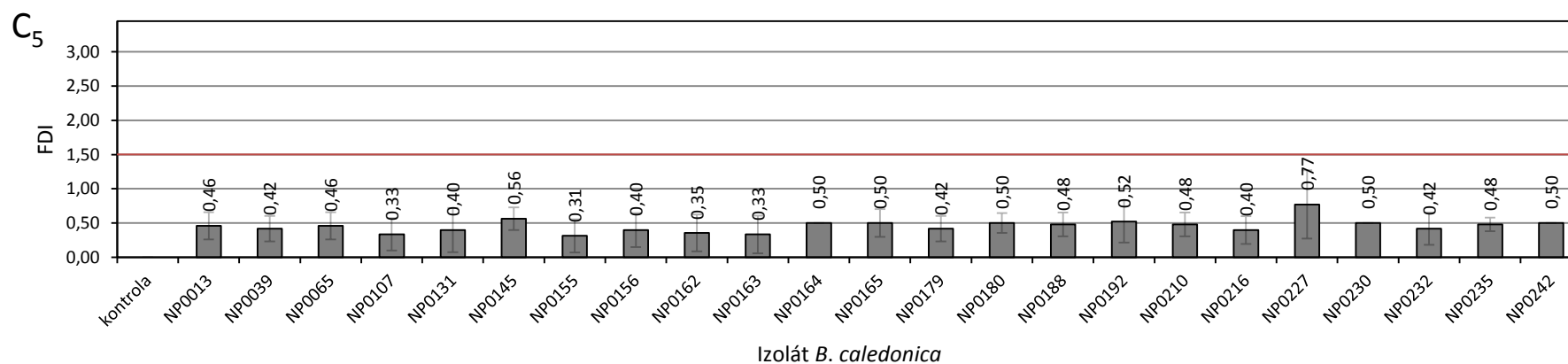
* $P < 0,05$ (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=104,9544$, $P=0,0000$

Graf 5.26: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 4. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



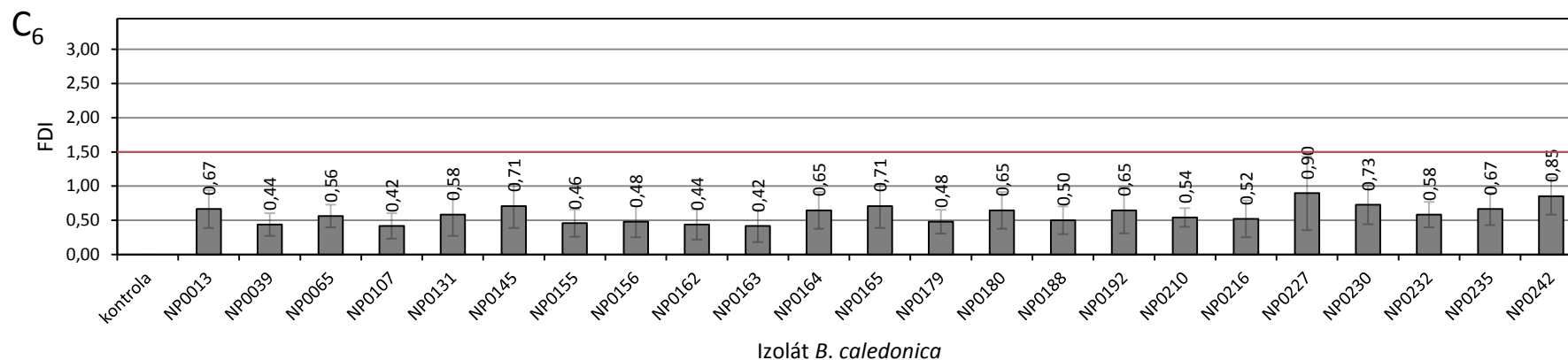
* $P < 0,05$ (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=106,6933$, $P=0,0000$

Graf 5.27: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 5. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



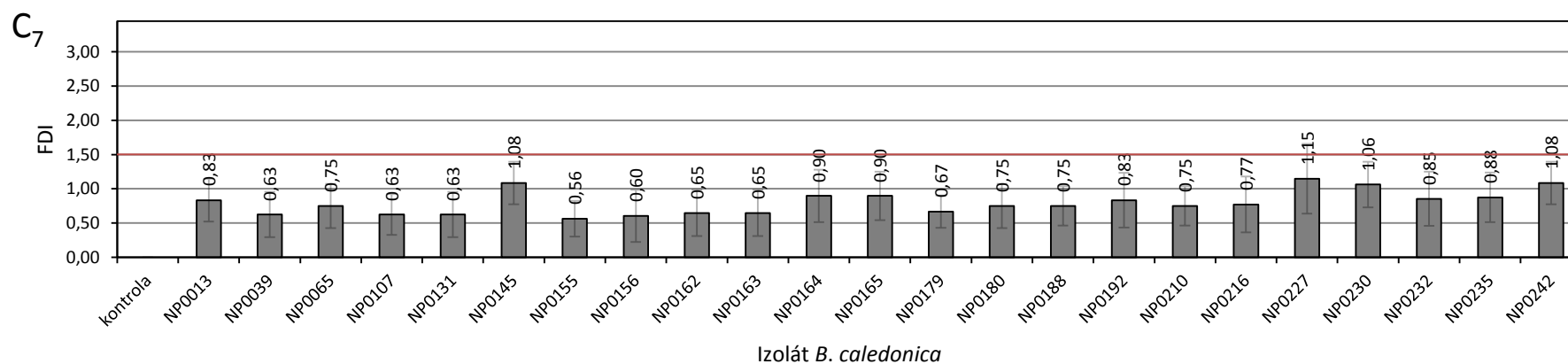
* $P < 0,05$ (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=134,4085$, $P=0,0000$

Graf 5.28: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 6. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



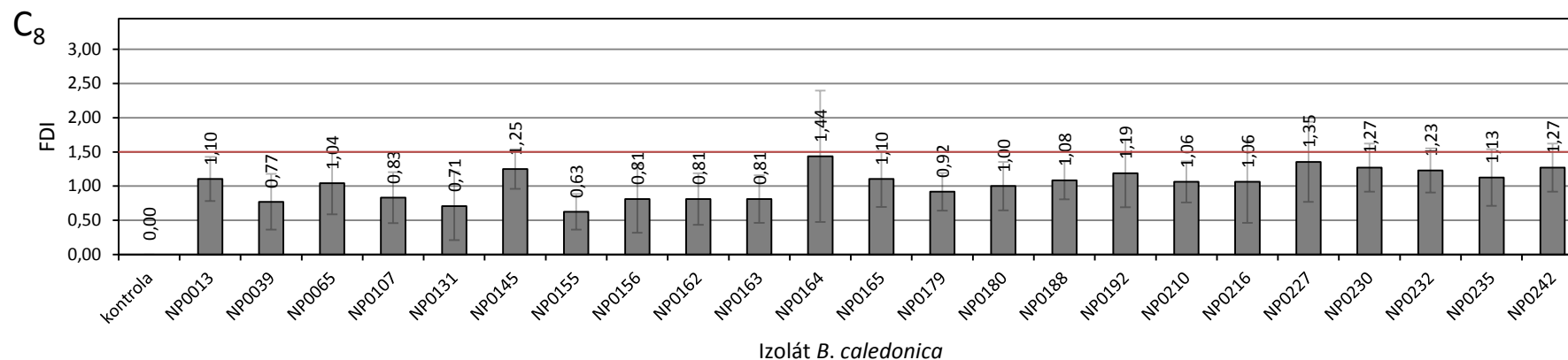
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=170,9994$, P=0,000

Graf 5.29: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 7. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



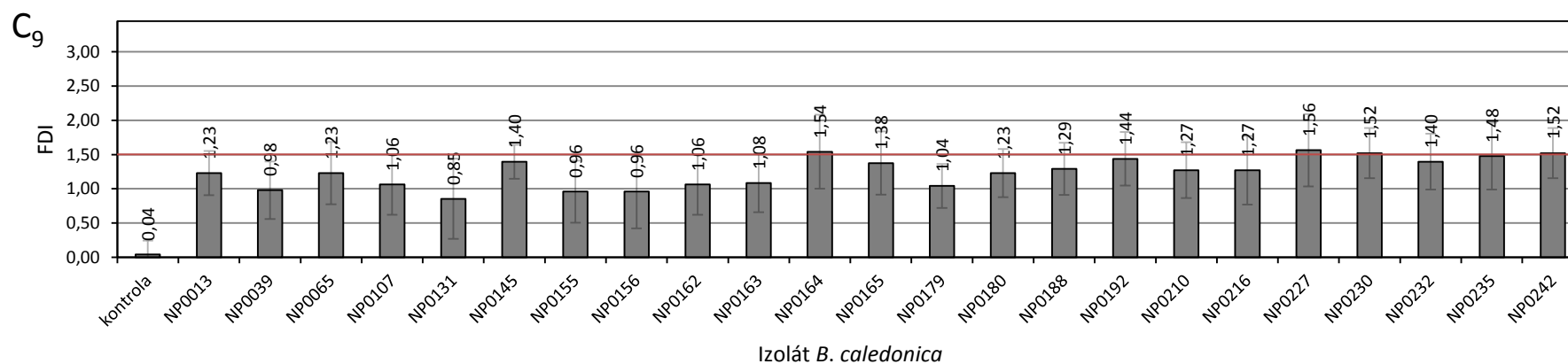
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=163,2167$, P=0,000

Graf 5.30: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 8. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



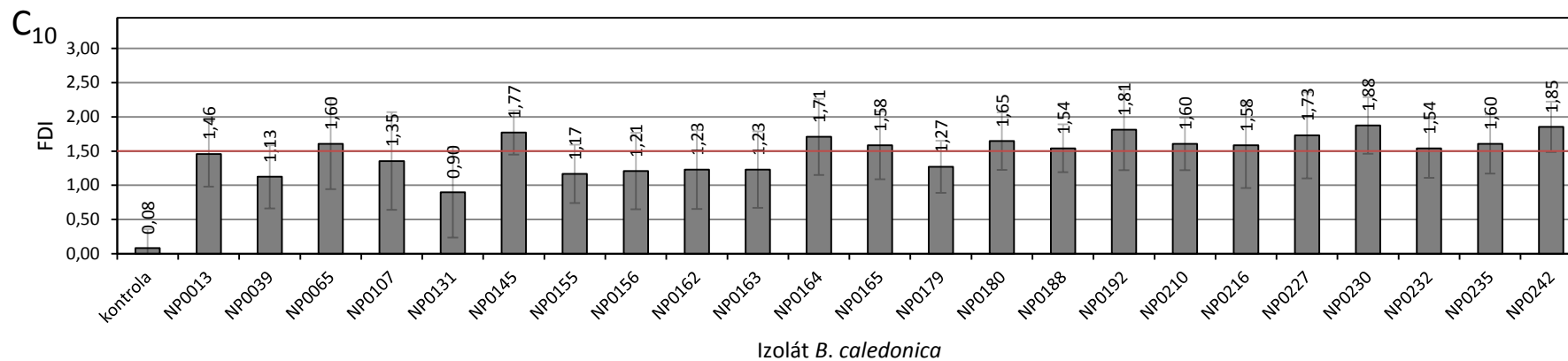
*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=167,9400$, P=0,000

Graf 5.31: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 9. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



*P<0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=148,31613$, P=0,000

Graf 5.32: Porovnání hodnot FDI u larev *T. molitor* 10. den po ošetření suspenzí konidií daných izolátů *B. caledonica* o koncentraci 1×10^6 konidií/ml, inkubace v teplotě 20 °C



* $P < 0,05$ (ANOVA, Kruskal-Wallisův test). Vyhodnocení: $H_{(23, N=600)}=155,8409$, $P=0,000$

5.2 Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor*

5.2.1 Metodický postup

Kultivace, příprava suspenze

- Konidie byly získány pomocí plošné kultivace kultury na PDA v 90mm Petriho miskách při teplotě 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 7 dnů.
- Suspenze konidií byla následně připravena smytím spor z povrchu plně vysporulované kultury pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 konidií/ml, pomocí "Neubauerovy počítací komůrky".
- Blastospory byly získány pomocí submerzní kultivace v 1 litru kultivačního media PDB v 2000ml Erlenmeyerově baňce na orbitální třepačce při 100 otáčkách /min při teplotě 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 7 dnů, kdy do kultivačního media byly sterilně vneseny 2 terčíky (cca 2×2 cm) vyřízlé z 14denní plně vysporulované kultury.
- Následně byl obsah Erlenmeyerovy baňky rozdělen na 2 díly po 500 ml, kdy:
 - a) z prvního dílu byla opět připravena suspenze blastospor pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 konidií/ml, pomocí "Neubauerovy počítací komůrky";
 - b) druhý díl (500 ml) byl odstředěn a po odebrání natantu opět resuspendován v 1 litru sterilní destilované vody a znovu odstředěn. Takto byl celý postup zopakován celkem 3×. Následně byla opět připravena suspenze blastospor pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 konidií/ml. Tento postup byl zvolen z důvodu odstranění živin kultivačního media, které by mohly ovlivňovat následný průběh nákazy ve prospěch blastospor oproti konidiím.
- Byly tedy připraveny 3 varianty suspenzí: a) konidie, b) blastospory („nevymyté“), c) blastospory („vymyté“); suspenze všech tří variant byla adjustována na koncentraci 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 spor/ml.

Hodnocení klíčivosti

- K posouzení klíčivosti bylo použito standardního laboratorního testu klíčivosti, viz část Materiál a metodika, kdy byla pro každou variantu připravena 3 opakování, kde pro každé opakování bylo hodnoceno 100 spor (celkem 3×100 spor).
- Hodnocení probíhalo v intervalu 2 hodin po dobu následujících 24 hodin od založení testu.

Účinnost na larvy potměníka moučného (*T. molitor*)

- K posouzení průběhu nákazy bylo použito standardního laboratorního testu, který nám dovoluje nejen určit úroveň procentuální kumulované mortality a infekce, ale zároveň pomocí hodnotící stupnice FDI také „stupeň vývoje“ nákazy, viz Materiál a metodika.
- Inkubace probíhala při 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 10 dnů
- Pro každou z variant byla připravena 3 opakování po 25 jedincích (celkem 75 jedinců na variantu včetně varianty kontrolní)
- Hodnocení probíhalo každý den po dobu následujících 10 dnů od založení testu.

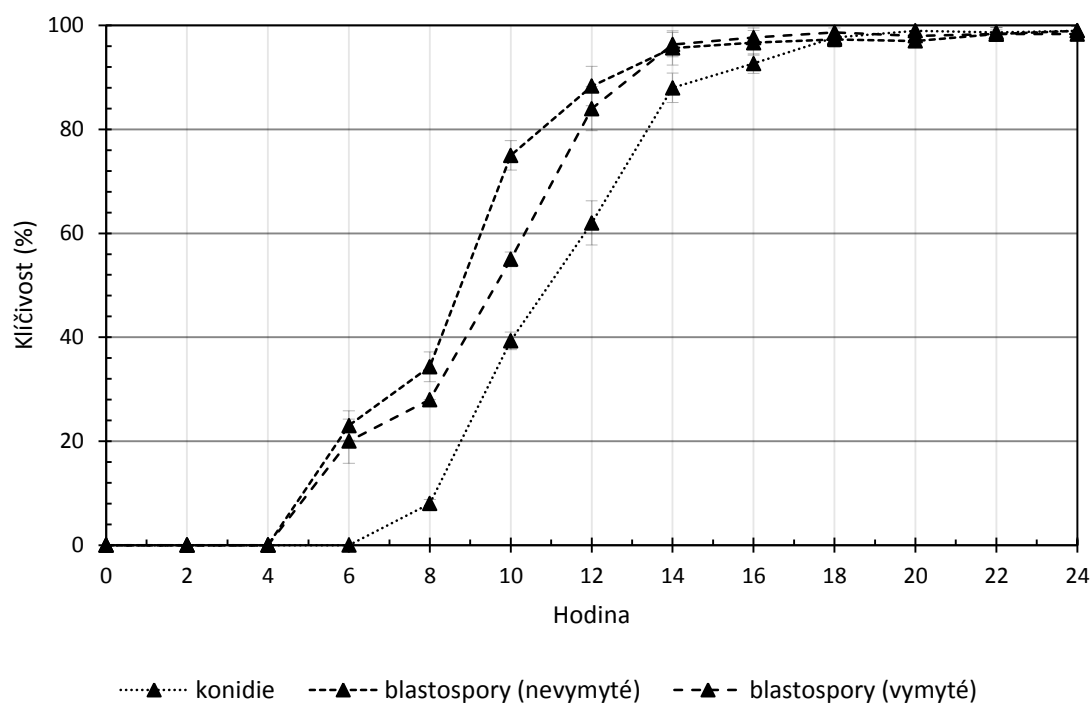
5.2.2 Výsledky

Hodnocení klíčivosti a vývoje spor

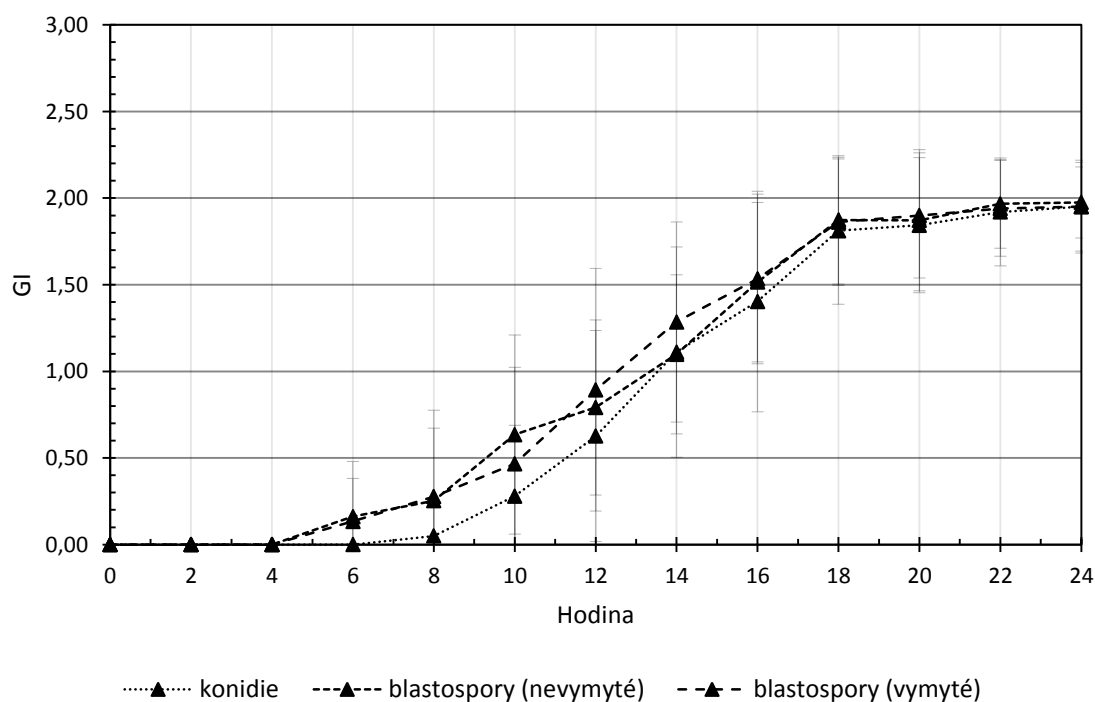
Při hodnocení klíčivosti bylo stanovováno procento klíčivých spor a stádium jejich vývoje pomocí stupnice GI. Z grafu 5.33. a 5.34. je patrné, že nejpomalejší vývoj vykazovaly konidie získané z povrchové kultury *B. bassiana*, kde byly klíčivé konidie pozorovány po 8 hodinách (8 %), zatímco klíčivé blastospory byly zaznamenány již po 6 hodinách v obou variantách. Ovšem statisticky prokazatelná odlišnost byla zaznamenána pouze v časovém rozmezí 6 až 12 hodin ($P < 0,05$). Po 6 hodinách tak bylo nejvyšší procento klíčivých spor (23 %) zaznamenáno u blastospor získaných z nevymyté submerzní kultury, statisticky prokazatelná odlišnost od ostatních dvou variant byla zjištěna pouze po 8 a 10 hodinách ($P < 0,05$), po 12 hodinách byly hodnoty získané u vymytých a nevymytých blastospor statisticky srovnatelné ($F = 20,669$; $df = 2, 6$; $P = 0,00204$) a v pozdějších hodnoceních došlo ke statistickému vyrovnání hodnot u všech tří testovaných variant. Po 24 hodinách bylo dosaženo 99% klíčivosti spor u konidií a nevymytých blastospor, u blastospor vymytých pak bylo dosaženo 98,33% klíčivosti.

U hodnocení stupně vývoje spor byly v rozmezí 6–14 hodin zjištěny prokazatelné rozdíly mezi konidiami a zbylými dvěma variantami, tzn. blastosporami vymytými a nevymytými ze submerze, kdy hodnoty vývoje konidií byly nižší než u obou variant blastospor (6 hodin: $H_{(2, N=900)} = 83,04522$, $P = 0,0000$; 8 hodin: $H_{(2, N=900)} = 59,67155$, $P = 0,0000$; 10 hodin: $H_{(2, N=900)} = 76,92573$, $P = 0,0000$; 12 hodin: $H_{(2, N=900)} = 16,74475$, $P = 0,0002$; 14 hodin: $H_{(2, N=900)} = 20,93448$, $P = 0,0000$). Po 16 hodinách již však nebyly pozorovány prokazatelné rozdíly. Průměrné hodnoty indexu GI byly na konci hodnocení srovnatelné, konidie dosáhly hodnoty GI 1,97, blastospory nevymyté a vymyté pak hodnoty indexu GI 1,98, resp. 1,95.

Grafy 5.33: Průběh klíčivosti daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 24hodinového testu



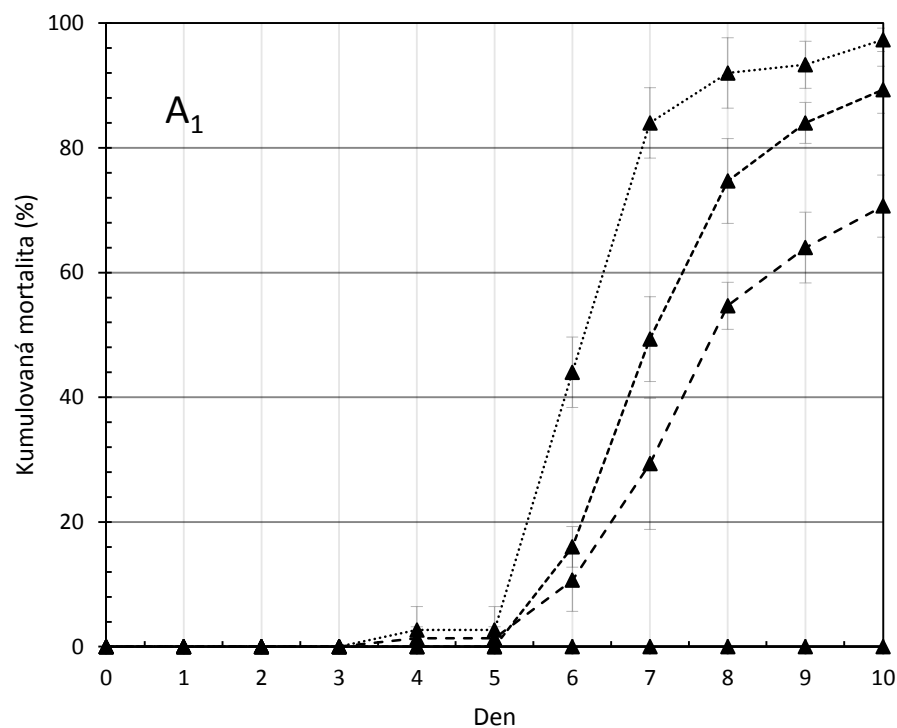
Grafy 5.34: Průběh GI daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 24hodinového testu



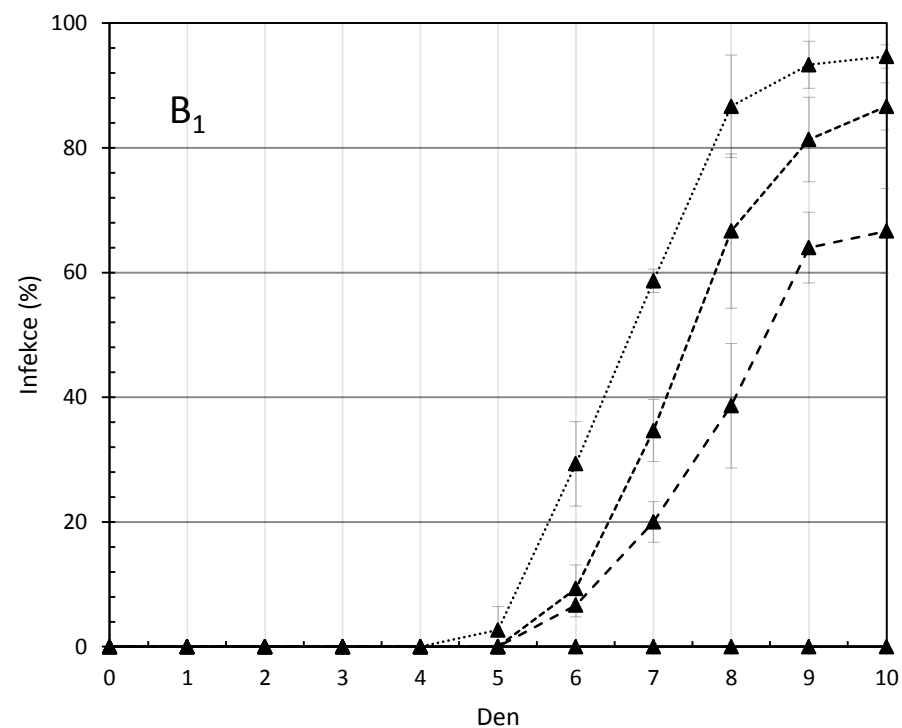
*Hodnocení účinnosti konidií a blastospor na larvy T. molitor**Koncentrace 1×10^5 spor/ml*

Vyhodnocování rozdílů v účinnosti na larvy *T. molitor* záleželo na použité koncentraci suspenze. Při provádění biotestu se suspenzemi o koncentraci 1×10^5 spor/ml byly zjištěny viditelné rozdíly mezi variantami ve vyvolané mortalitě hostitele, které byly v rozmezí mezi 6. a 10. dnem statisticky prokazatelné ($P < 0,05$). Stejná situace se týkala i zjevných příznaků infekce na povrchu hostitele, kde se rovněž od 6. dne vyskytovaly prokazatelné odlišnosti mezi jednotlivými variantami. První případy mortality byly pozorovány 4. den, kdy bylo dosaženo hodnoty 2,67 % mrtvých larev, jež byly ošetřeny suspenzí konidií, a hodnoty 1,33 % u larev ošetřených suspenzí blastospor vymytých z kultivačního media, nicméně nabyly zaznamenány žádné statistické rozdíly ($F=0,68647$; $df=3, 8$; $P=0,58510$). Larvy ošetřené blastosporami nevymytými z kultivačního media vykazovaly první případy mortality 6. den, kdy byla pozorována mortalita v 16 % případů, současně byly také pozorovány první statistické rozdíly mezi variantami, co se mortality larev týče ($F=53935$; $df=3, 8$; $P=0,00000$), kdy nejvyšších hodnot mortality bylo prokazatelně dosaženo u larev ošetřených suspenzí konidií, zatímco u larev ošetřených suspenzí blastospor statisticky prokazatelný rozdíl nebyl zjištěn. Příznaky infekce byly zaznamenány poprvé 5. den, kdy larvy ošetřené suspenzí konidií vykazovaly 2,67% mortalitu. Následující den (6. den) byly pozorovány první infikovaní jedinci také mezi larvami ošetřenými suspenzí blastospor, a to jak nevymytých, tak vymytých z kultivačního media, kde hodnota infekce dosáhla 9,33 %, resp. 6,67 %. Nejnižších hodnot v obou hodnocených ukazatelích dosahovaly v průběhu celého hodnocení larvy ošetřené suspenzí blastospor vymytých ze submerzního media, kde po 10denní inkubaci dosáhly hodnoty mortality 70,67 %, infekce pak 66,67 %, naopak nejvyšší hodnoty v průběhu celého 10denního hodnocení byly zjištěny u larev ošetřených suspenzí konidií, kdy na konci hodnocení bylo dosaženo 97,33% mortality, a infekce v 94,67 % případů. Blastospory, jež byly nevymyty z kultivačního media dosáhly po 10denním hodnocení mortality v 89,33 % případů, zjevné příznaky infekce byly pozorovány v 86,67 % případů. Hodnoty mortality u larev ošetřených suspenzí konidií byly 6. až 8. den statisticky prokazatelně nejvyšší, v posledních dvou dnech byly statisticky srovnatelné s hodnotami získanými ve variantě s nevymytými blastosporami. Stejně tak srovnáme-li procento zjevně infikovaných jedinců, tak prvních pět dnů nebyly zjevné rozdíly mezi variantami, 6. až 9. den bylo nejvíce infikovaných jedinců pozorováno u varianty, kdy byly larvy ošetřeny suspenzí konidií, poslední den byly hodnoty infekce larev u této varianty s konidii a varianty s nevymytými blastosporami statisticky shodné ($F=278,12$; $df=3, 8$; $P=0,0000$). U jedinců kontrolní varianty nebyly v průběhu testu zaznamenány případy mortality ani příznaky infekce.

Grafy 5.35: Průběh kumulované mortality (graf A₁) a infekce (graf B₁) vyvolané u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^5 spor/ml během 10denního biotestu



—▲— kontrola
 -▲- blastospory (nevymyté)
▲..... konidie
 -▲- blastospory (vymyté)



—▲— kontrola
 -▲- blastospory (nevymyté)
▲..... konidie
 -▲- blastospory (vymyté)

Tabulka 5.2: Vývoj nákazy dle stupnice FDI u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^5 spor/ml během 10denního biotestu (průměr \pm SD)

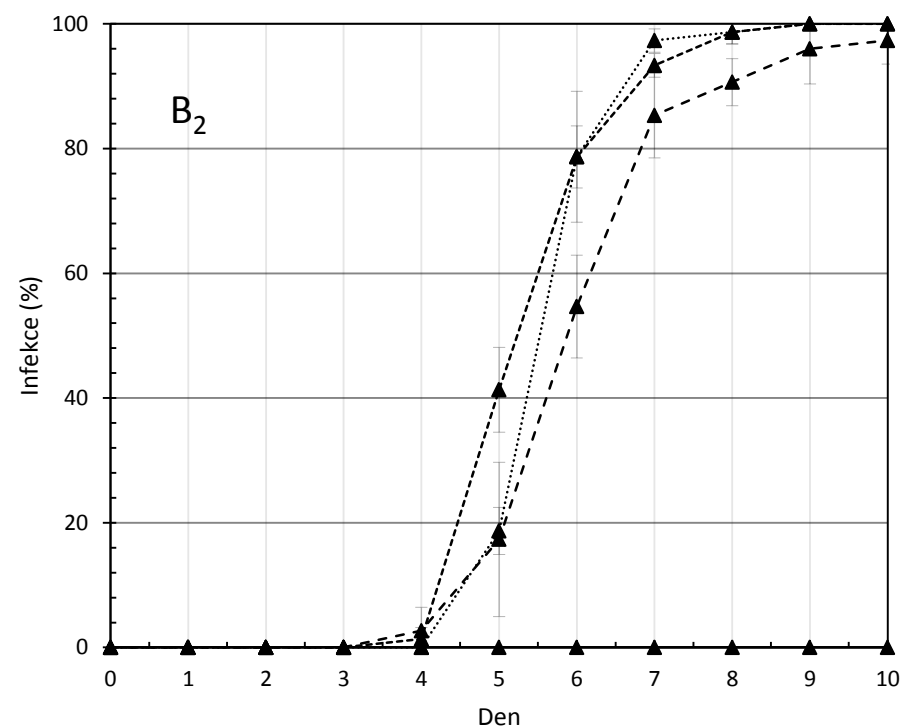
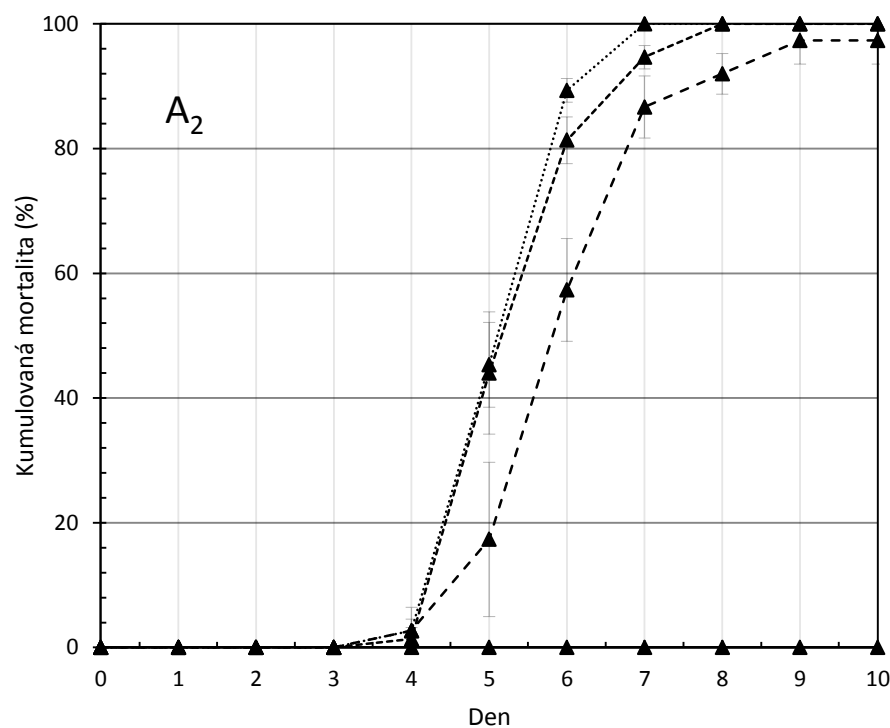
Den	Ošetření			
	kontrola	konidie	blastospor	
			nevymyté	vymyté
1.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
2.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
3.	0 \pm 0,00	0,04 \pm 0,14	0,12 \pm 0,21	0,05 \pm 0,15
4.	0 \pm 0,00	0,46 \pm 0,17	0,47 \pm 0,11	0,38 \pm 0,23
5.	0 \pm 0,00	0,53 \pm 0,16	0,50 \pm 0,00	0,49 \pm 0,10
6.	0 \pm 0,00	0,90 \pm 0,51	0,63 \pm 0,31	0,59 \pm 0,26
7.	0 \pm 0,00	1,35 \pm 0,57	0,98 \pm 0,58	0,80 \pm 0,53
8.	0 \pm 0,00	1,87 \pm 0,59	1,52 \pm 0,71	1,12 \pm 0,67
9.	0 \pm 0,00	2,07 \pm 0,53	1,75 \pm 0,64	1,36 \pm 0,72
10.	0 \pm 0,00	2,26 \pm 0,51	1,99 \pm 0,60	1,60 \pm 0,82

Z hlediska hodnocení vývoje nákazy dle stupnice FDI nebyly do 3. dne zjištěny prokazatelné rozdíly mezi variantami. Čtvrtý a 5. den nebyl statistickou analýzou prokázán rozdíl mezi variantami, odlišovala se pouze kontrolní varianta od ostatních variant. Následující kontrolní den (6. den) byly prokazatelné odlišnosti ($H_{(3, N=300)}=222,3445$ $P=0,000$) mezi variantou, kde bylo provedeno ošetření suspenzí konidií a variantou, kde jako infekční inokulum byla použita suspenze blastospor vymytých z kultivačního media, a dále opět rozdíly kontrolní varianty od zbylých variant ošetření. Sedmý den byly prokázány statistické odlišnosti varianty kde jako inokulum byla použita suspenze konidií od zbývajících variant a dále jen opět kontrolní varianta vykazovala odlišnosti od všech ostatních variant ($H_{(3, N=300)}=201,2314$, $P=0,000$). Od 8. dne byly prokazatelné odlišnosti mezi variantou, kde byly larvy ošetřeny suspenzí konidií a variantou s ošetřením larev suspenzí blastospor vymytých z kultivačního media, a také se odlišovala kontrolní varianta od všech zbylých variant ošetření larev. První příznaky vývoje nákazy (melanizační skvrny) dle stupnice FDI byly pozorovány shodně pro všechny testované varianty ošetření 3. den (viz tabulka 4.2). Nejvyšší hodnoty indexu (2,26) ve vývoji nákazy dle stupnice FDI bylo dosaženo po 10denní inkubaci u larev ošetřených suspenzí konidií, nejnižší (1,60) pak u larev ošetřených suspenzí vymytých blastospor, u larev ošetřených suspenzí nevymytých blastospor byl zjištěn index vývoje nákazy 1,99. Hodnota indexu 1,50 byla dosažena u larev ošetřených suspenzí konidií mezi 7. a 8. dnem, u larev ošetřených suspenzí blastospor nevymytých a vymytých ze submerzního media pak hodnota 1,52 byla dosažena 8. den, respektive mezi 9. a 10. dnem inkubace.

Koncentrace 1×10^6 spor/ml

U testované koncentrace 1×10^6 spor/ml již nebyly rozdíly tak markantní jako u předchozí koncentrace, přesto nejnižších hodnot v obou ukazatelích bylo dosahováno u varianty, kde byly larvy ošetřeny suspenzí blastospor vymytých z kultivačního media (soubor grafů 4.35). U mortality pozorované u larev *T. molitor* byly zjištěné hodnoty mírně vyšší u varianty používající konidie, ale rozdíl mezi mortalitou vyvolanou konidiami a nevymytými blastosporami nebyl v průběhu hodnocení statisticky prokazatelný ($P < 0.05$) (s výjimkou 7. dne). První mrtví jedinci byli pozorováni 4. den, kdy u larev ošetřených suspenzí konidií a blastospor vymytých z kultivačního media bylo pozorováno shodně 2,67 % mrtvých jedinců, zatímco u larev ošetřených suspenzí blastospor nevymytých hodnota mortality larev dosáhla 1,33 %. Zatímco konidie vyvolaly 100% mortalitu larev již 7. den, nevymyté blastospory způsobily 100% úmrtnost o den později, nicméně již 7. den byla mortalita 94,67 %. U vymytých blastospor nebylo dosaženo 100% mortality hostitele v průběhu celého 10denního testu (mortalita 97,33 % po 10denní inkubaci), ovšem v posledních dvou dnech již byly hodnoty statisticky srovnatelné s oběma zbylými variantami a nevykazovaly rozdíly ($F=260,10$; $df=3, 8$; $P=0,0000$). První příznaky infekce jedinců, byly pozorovány 4. den u larev ošetřených suspenzí blastospor nevymytých i vymytých, kde hodnota infikovaných jedinců dosáhla 1,33 %, resp. 2,67 %. Ve variantě, kde byly larvy ošetřeny suspenzí konidií, byly první příznaky pozorovány 5. den, kdy hodnota infekce dosáhla 18,67 %. Varianty ošetření larev konidiami a nevymytými blastosporami dosáhly 100% infekce 9. den, zatímco ve variantě ošetření larev blastosporami vymytými bylo dosaženo po 10denní inkubaci 97,33 % infikovaných jedinců. Při porovnání zjevně infikovaných jedinců byly hodnoty u varianty se vzdušnými konidiami a nevymytými blastosporami statisticky shodné v průběhu celého hodnocení, hodnoty získané u varianty s vymytými blastosporami se s předchozími dvěma statisticky vyrovnaly od 8. dne biotestu ($F=179,49$; $df=3, 8$; $P=0,0000$). V kontrolní variantě nebyl opět zaznamenán případ mortality ani příznaky infekce larev *T. molitor*.

Grafy 5.36: Průběh kumulované mortality (graf A₂) a infekce (graf B₂) vyvolané u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 10denního biotestu



—▲— kontrola ▲..... konidie
 ---▲--- blastospory (nevymyté) -▲- blastospory (vymyté)

—▲— kontrola ▲..... konidie
 ---▲--- blastospory (nevymyté) -▲- blastospory (vymyté)

Tabulka 5.3: Vývoj nákazy dle stupnice FDI u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 10denního biotestu (průměr \pm SD)

Den	Ošetření			
	kontrola	konidie	blastospor	
			nevymyté	vymyté
1.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
2.	0 \pm 0,00	0,13 \pm 0,20	0,10 \pm 0,20	0,11 \pm 0,21
3.	0 \pm 0,00	0,45 \pm 0,18	0,36 \pm 0,23	0,36 \pm 0,23
4.	0 \pm 0,00	0,55 \pm 0,12	0,50 \pm 0,14	0,54 \pm 0,20
5.	0 \pm 0,00	0,89 \pm 0,39	0,94 \pm 0,51	0,67 \pm 0,38
6.	0 \pm 0,00	1,51 \pm 0,46	1,53 \pm 0,65	1,23 \pm 0,72
7.	0 \pm 0,00	2,04 \pm 0,45	2,07 \pm 0,58	1,87 \pm 0,70
8.	0 \pm 0,00	2,32 \pm 0,34	2,36 \pm 0,34	2,18 \pm 0,61
9.	0 \pm 0,00	2,51 \pm 0,30	2,56 \pm 0,26	2,39 \pm 0,50
10.	0 \pm 0,00	2,84 \pm 0,39	2,75 \pm 0,25	2,59 \pm 0,50

Hodnoty vývoje nákazy dle stupnice FDI vykazovaly jen malé rozdíly v průběhu celého testu, pouze od 3. dne byla statistickou analýzou prokázána odlišnost kontrolní varianty od zbylých variant ošetření, zbylé varianty ošetření larev spory nevykazovaly mezi sebou navzájem žádné statistické odlišnosti. Vývoj nákazy po dobu 10denní inkubace probíhal s minimálními rozdíly u varianty, kde byly larvy ošetřeny suspenzí konidií a nevymytých blastospor, kdy na konci inkubace bylo dosaženo hodnoty FDI 2,84, resp. 2,75. Vývoj nákazy u larev ošetřených suspenzí vymytých blastospor probíhal s nepatrnými odlišnostmi obdobně se dvěma zbylými ošetřeními larev do 4. dne, od 4. dne byl pozorován pomalejší rozvoj nákazy, kde na konci inkubace bylo dosaženo hodnoty 2,59 na stupnici FDI. Melanizační skvrny byly pozorovány již 2. den u všech variant ošetření larev suspenzemi spor. Šestý den bylo dosaženo u varianty s ošetřením larev suspenzí konidií a nevymytých blastospor hodnoty 1,51, resp. 1,53, zatímco u varianty, kde byly larvy ošetřeny suspenzí vymytých blastospor, bylo hodnoty 1,50 dosaženo mezi 6. a 7. dnem. V kontrolní variantě nebyly pozorovány jakékoli známky související s rozvojem nákazy.

Koncentrace 1×10^7 spor/ml

V případě hodnocení rozdílů sledovaných charakteristik za použití suspenze o koncentraci 1×10^7 spor/ml byly pozorované rozdíly mezi variantami prakticky minimální. Mírně nižších hodnot tentokrát dosahovala varianta, kde byly larvy ošetřeny suspenzí konidií. Ovšem rozdíly byly velmi malé a statistická odlišnost byla zjištěna pouze 6. den biotestu ($F=478,69$; $df=3, 8$; $P=0,0000$), kdy vymyté blastospor vykazovaly 100% mortalitu, zatímco konidie vyvolaly 96% a nevymyté blastospor 97,33% mortalitu hostitele. V ostatních dnech byly hodnoty statisticky srovnatelné. První mrtví jedinci byli pozorováni 3. den, kdy bylo dosaženo u larev ošetřených suspenzí blastospor nevymytých a vymytých mortality 5,33 %, resp. 4,00 %, zatímco u larev ošetřených suspenzí konidií byla pozorována mortalita 1,33 % jedinců. S výsledky z vývoje mortality se statisticky shodují i výsledky infekce, kdy 6. den je

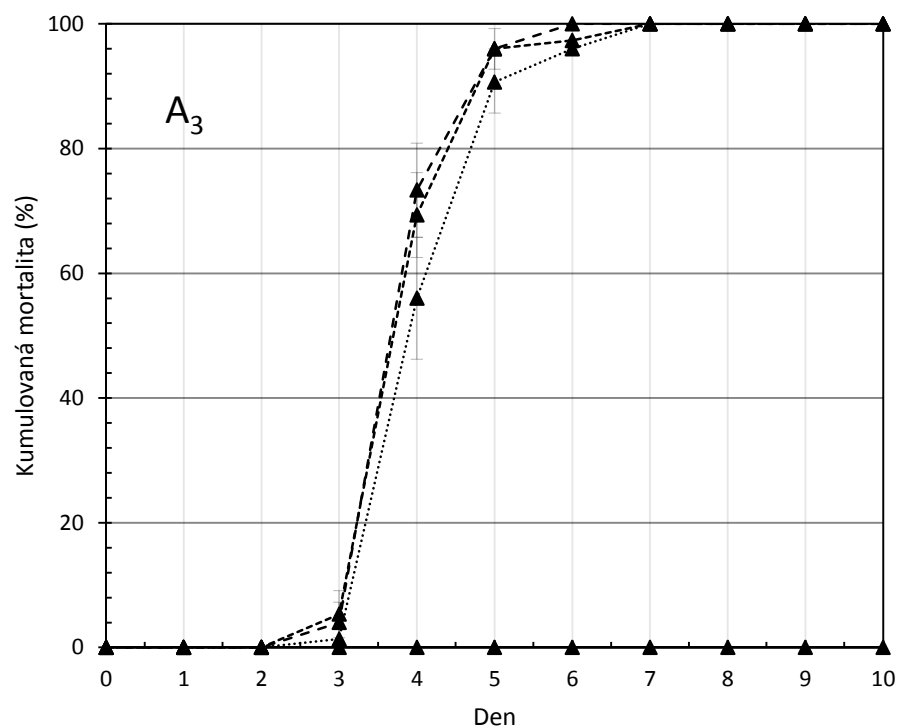
jediný, kdy byly zjištěny prokazatelné rozdíly mezi variantami ($F=478,69$; $df=3, 8$; $P=0,0000$), v ostatních dnech byly hodnoty srovnatelné. První infikovaní jedinci byli pozorováni 3. den, a to sice u varianty, kde byly larvy ošetřeny suspenzí konidií a vymytých blastospor, mortalita byla zjištěna u 1,33 % jedinců, mortalita larev ve variantě s ošetřením suspenzí nevymytých blastospor byla pozorována 4. den v 69,33 % případů.

Tabulka 5.4: Vývoj nákazy dle stupnice FDI u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^7 spor/ml během 10denního biotestu (průměr \pm SD)

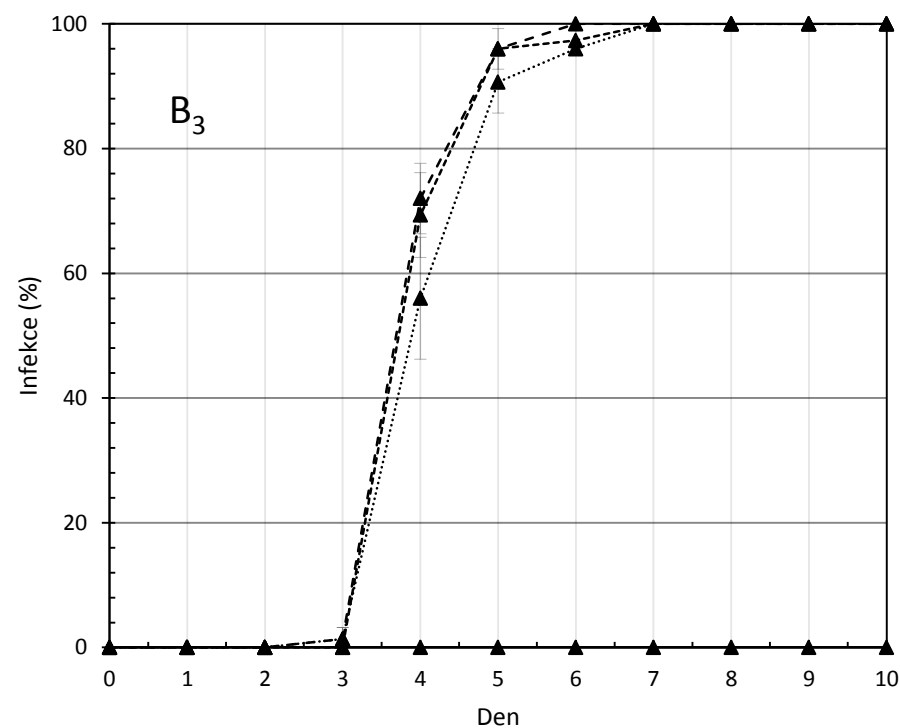
Den	Ošetření			
	kontrola	konidie	blastospor	
			nevymyté	vymyté
1.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
2.	0 \pm 0,00	0,21 \pm 0,25	0,17 \pm 0,24	0,15 \pm 0,23
3.	0 \pm 0,00	0,50 \pm 0,14	0,49 \pm 0,08	0,49 \pm 0,18
4.	0 \pm 0,00	1,05 \pm 0,51	1,23 \pm 0,52	1,23 \pm 0,44
5.	0 \pm 0,00	1,77 \pm 0,60	2,06 \pm 0,50	1,87 \pm 0,54
6.	0 \pm 0,00	2,24 \pm 0,49	2,35 \pm 0,42	2,33 \pm 0,36
7.	0 \pm 0,00	2,40 \pm 0,25	2,46 \pm 0,20	2,47 \pm 0,15
8.	0 \pm 0,00	2,60 \pm 0,20	2,58 \pm 0,18	2,58 \pm 0,18
9.	0 \pm 0,00	2,79 \pm 0,25	2,79 \pm 0,25	2,81 \pm 0,24
10.	0 \pm 0,00	2,87 \pm 0,22	2,86 \pm 0,23	2,87 \pm 0,22

Statistické hodnocení v celém průběhu testu neprokázalo rozdíl mezi larvami ošetřenými jednotlivými variantami spor z hlediska hodnocení vývoje nákazy dle stupnice FDI, od 2. dne byla prokázána statistická odlišnost hodnot kontrolní varianty od hodnot všech ostatních variant ošetření. Pokud porovnáme vývoj nákazy dle stupnice FDI, tak zjistíme, že po 10 dnech inkubace bylo dosaženo shodných hodnot 2,87 u varianty, kde pro ošetření larev byly použity suspenze konidií a blastospor vymytých z kultivačního media a hodnoty 2,86 u varianty, kde byly larvy ošetřeny suspenzí nevymytých blastospor. První melanizační skvrny byly zjištěny u všech testovaných variant, vyjma varianty kontrolní, opět již 2. den. Indexu 1,50 bylo u všech tří variant dosaženo mezi 4. a 5. dnem.

Grafy 5.37: Průběh kumulované mortality (graf A₃) a infekce (graf B₃) vyvolané u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^7 spor/ml během 10denního biotestu



—▲— kontrola ▲..... konidie
 ---▲--- blastospory (nevymyté) -▲- blastospory (vymyté)



—▲— kontrola ▲..... konidie
 ---▲--- blastospory (nevymyté) -▲- blastospory (vymyté)

5.3 Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů vybraných druhů entomopatogenních hub získaných odizolováním z komerčních biopreparátů, na bezkřídle partenogenetické samičky *Myzus persicae*

5.3.1 Metodický postup

Kultivace, příprava suspenze

- Z komerčních preparátů Botanigard (*B. bassiana*), Mycotal (*L. lecanii*), Preferal (*I. fumosorosea*) byly odizolovány čisté kultury daných izolátů na živné půdě PDA.
- Konidie jednotlivých izolátů byly získány pomocí kultivace v podobě separačních čar na PDA v 90mm Petriho miskách při teplotě 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 14 dnů.
- Suspenze konidií byla následně připravena smytím spor z povrchu plně vysporulované kultury pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^6 konidií/ml, pomocí "Neubauerovy počítací komůrky".

Hodnocení klíčivosti

- K posouzení klíčivosti bylo použito standardního laboratorního testu klíčivosti, viz Materiál a metodika, kdy byla pro každou variantu připravena 3 opakování a v každém opakování bylo hodnoceno 100 spor (3×100 spor).

Účinnost na bezkřídle partenogenetické samičky mšice broskvoňové (*M. persicae*)

- K posouzení průběhu nákazy byl použit standardní laboratorní test, viz výše, který byl modifikován pro potřeby hodnocení průběhu infekce na vybraném cílovém hostiteli (dospělec *M. persicae*), tato modifikace spočívala v zúžení indexové stupnice FDI, kdy byl odebrán index 0,5 z důvodu komplikované identifikace melanizačních skvrn na povrchu těla hostitele.
- Na spodní stranu vyzrálého listu papriky seté bylo den před vlastním ošetřením vloženo cca 35 bezkřídlych partenogenetických samiček mšice broskvoňové. Samičky byly umístěny přednostně na středovou žílu listu (samičky zde setrvaly daleko lépe a nerozlézaly se tak, jako když byly umístěny na jinou část listové čepele – subjektivní pozorování).
- List se samičkami byl položen vrchní stranou na 2% vodní agar do Petriho misky (90 mm).
- Po 24 hodinách byl list vyjmut z Petriho misky a pomocí ručního tlakového postřikovače ošetřen suspenzí konidií daných izolátů.
- Následně byl list uložen do flow boxu k oschnutí.
- Po oschnutí byl zkorigován koncový počet samiček na listu, kdy bylo ponecháno přesně 25 samiček.
- Pro každou variantu (Botanigard, Mycotal, Preferal) byla připravena 3 opakování po 25 jedincích (celkem 75 jedinců na variantu).
- Kontrolní varianta byla připravena stejným postupem, viz výše, jen s tím rozdílem, že pro ošetření byl použit 0,05% roztok TWEEN 80, opět byla připravena 3 opakování po 25 jedincích.

- Inkubace probíhala v 25 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 10 dnů.
- Hodnocení probíhalo 2., 4., 7. a 10. den od založení testu.

5.3.2 Výsledky

Klíčivost a vývoj konidií

Hodnocení klíčivosti a GI jednotlivých izolátů získaných z preparátů bylo provedeno po 24 hodinách, kdy nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi danými izoláty ($P > 0,05$) jak v případě hodnocení klíčivosti, tak v hodnocení GI. Hodnoty klíčivosti se pohybovaly v rozmezí 97,67–99,00 %, hodnoty GI pak v rozmezí 1,89 až 1,94.

Tabulka 5.5: Hodnoty klíčivosti a GI testovaných izolátů komerčních přípravků stanovené po 24hodinové inkubaci v teplotě 25 °C

Izolát	Klíčivost (%)	GI
Izolát přípravku Botanigard ES	99,00±0,82	1,94±0,27
Izolát přípravku Mycotal	97,67±1,70	1,89±0,36
Izolát přípravku Preferal®WG	98,33±1,25	1,92±0,33

Účinnost na bezkřídlé partenogenetické samičky *M. persicae*

Účinnost byla sledována 2., 4., 7. a 10. den biotestu. Druhý den od ošetření byl zjištěn statisticky významný rozdíl v mortalitě samiček *M. persicae* ($F=76,213$; $df=3, 8$; $P=0,00000$), kde po ošetření bylo dosaženo úmrtnosti 37,33 % při použití izolátu přípravku Mycotal, 32,00 % při ošetření izolátem přípravku Botanigard a 20,00 % u varianty izolátu přípravku Preferal, zatímco v kontrolní variantě úmrtnost samiček *M. persicae* zaznamenána nebyla. Infekce samiček 2. den od ošetření byla pozorována jen u varianty, u které byl použit izolát přípravku Botanigard (6,67 %), kdy byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($F=82,330$; $df=3, 8$; $P=0,00000$) od variant zbylých testovaných izolátů, včetně kontrolního ošetření, u kterých infekce pozorována nebyla.

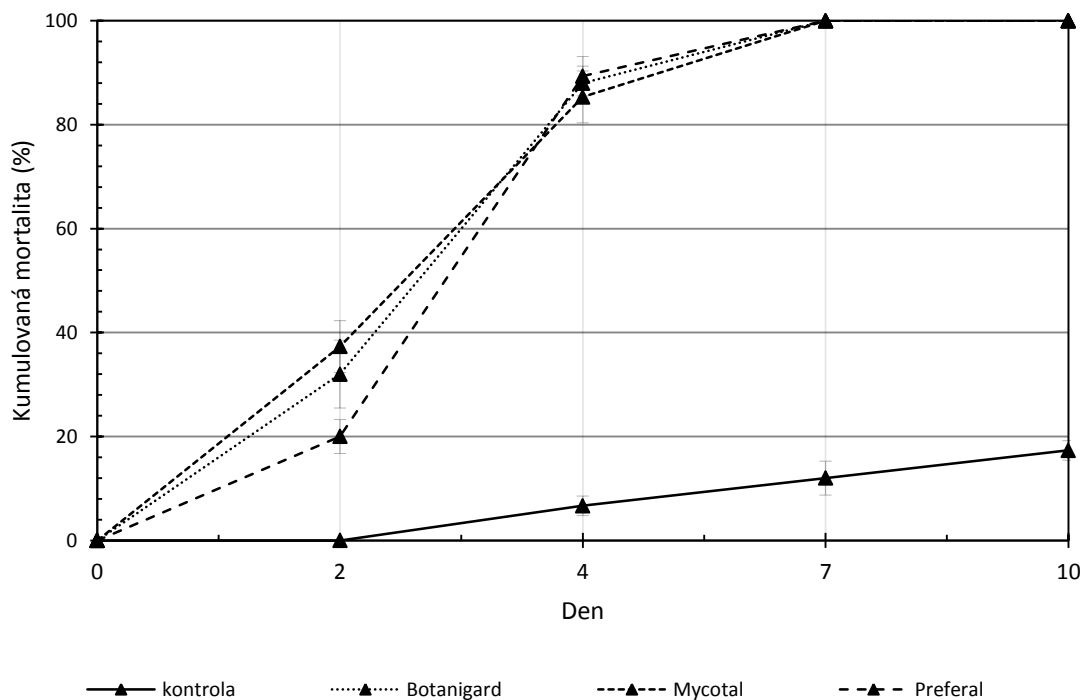
Následující kontrolní den, tedy 4. den od ošetření, byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($F=139,28$; $df=3, 8$; $P=0,00000$) v hodnotách mortality po ošetření izoláty daných přípravků od kontrolní varianty, nicméně mezi hodnotami u jednotlivých izolátů statistický rozdíl zjištěn nebyl. Hodnoty mortality samiček způsobené jednotlivými izoláty se pohybovaly v rozmezí 88,00–89,33 %, zatímco u kontrolní varianty bylo dosaženo 6,67% mortality samiček *M. persicae*. V hodnotách infekce byl statisticky významný rozdíl ($F=199,14$; $df=3, 8$; $P=0,00000$) zjištěn pouze mezi hodnotami získanými danými izoláty od kontrolní varianty, přičemž hodnoty vyvolané infekce byly v rozmezí 66,67–77,33 % (mezi těmito hodnotami statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl), zatímco u kontrolní varianty nebyla infekce pozorována.

Sedmý den od založení testu bylo po ošetření všemi testovanými izoláty komerčních přípravků dosaženo 100% mortality samiček, zatímco v kontrolní variantě hodnota mortality samiček dosáhla 12 %. Byl zde tedy zjištěn statisticky významný rozdíl ($F=1145,6$; $df=3, 8$;

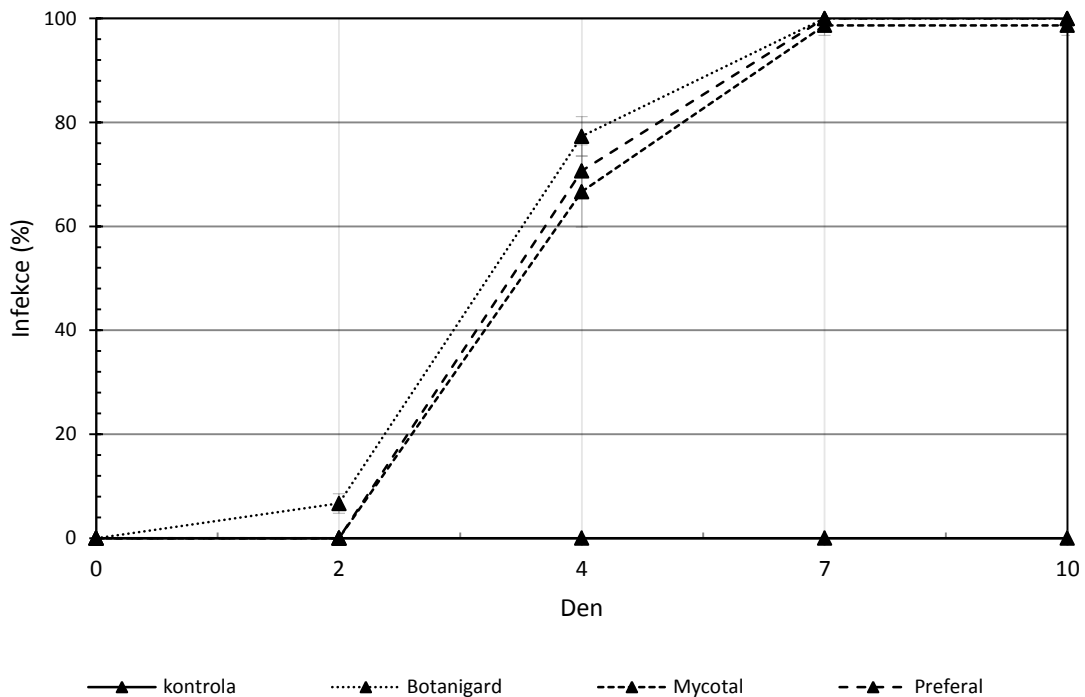
$P=0,00000$) pouze mezi všemi hodnotami mortality vyvolané izoláty od hodnoty mortality v kontrolní variantě. Infekce samic *M. persicae* byla pozorována v rozpětí hodnot 98,67–100 % u variant všech izolátů daných přípravků, zatímco ve variantě kontrolní nebyly pozorovány žádné nakažené samičky. Statisticky významný rozdíl ($F=533,10$; $df=3, 8$; $P=0,00000$) byl opět zjištěn pouze mezi skupinou všech izolátů a kontrolní variantou.

Poslední kontrolní den (10. den), byla zaznamenána pouze změna hodnoty mortality v kontrolní variantě, kdy byla zjištěna 17,33% mortality samic *M. persicae*, jelikož však již 7. den bylo dosaženo 100% mortality po aplikaci všech izolátů daných přípravků, byl zde opět pouze statisticky významný rozdíl ($F=4318,3$; $df=3, 8$; $P=0,00000$) mezi izoláty testovaných přípravků a kontrolní variantou. Co se hodnot infekce samic týče, nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi variantami, byly pozorovány naprosto stejné hodnoty jako 7. den od počátku testu.

Graf 5.38: Porovnání průběhu mortality neokřídlených partenogenetických samic *M. persicae* po ošetření suspenzí izolátů získaných z komerčních preparátů Botanigard, Mycotol a Preferal o koncentraci 1×10^6 konidií/ml; inkubace v 25 °C, po dobu 10 dnů



Graf 5.39: Porovnání průběhu infekce neokřídlených partenogenetických samiček *M. persicae* po ošetření suspenzí izolátů získaných z komerčních preparátů Botanigard, Mycotal a Preferal o koncentraci 1×10^6 konidií/ml; inkubace v 25 °C, po dobu 10 dnů

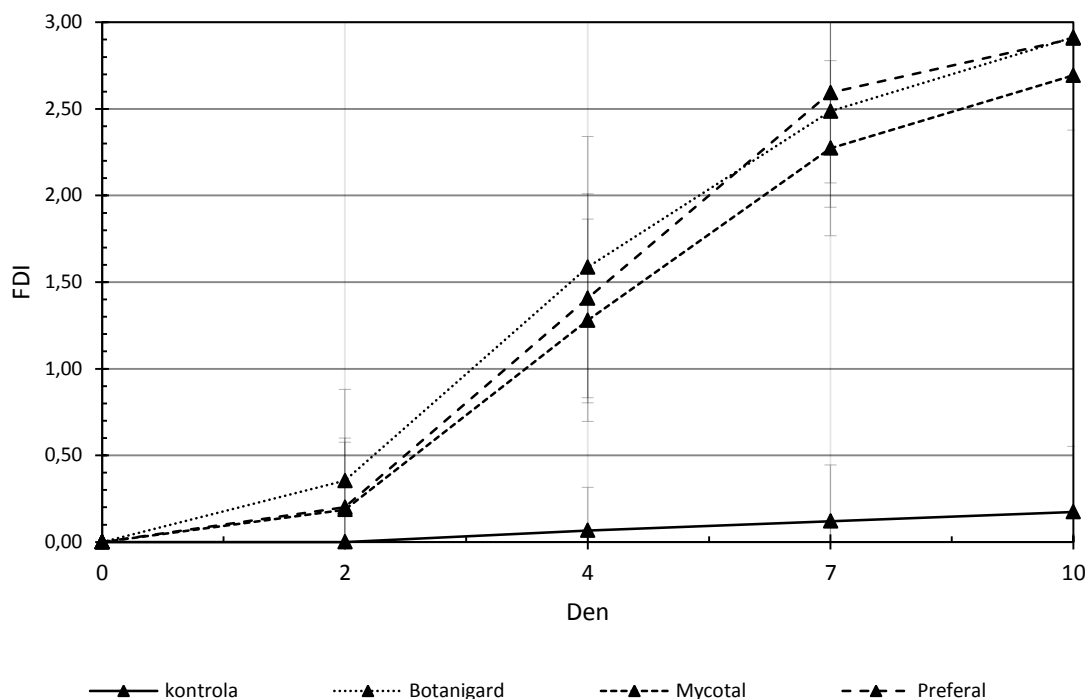


Vývoj nákazy u bezkřídleých partenogenetických samiček M. persicae vyjádřený pomocí stupnice FDI po ošetření čistých izolátů získaných z komerčních biopreparátů

První kontrolní den, tedy 2. den od založení biotestu dosáhl vývoj nákazy stanovený pomocí stupnice FDI následujících hodnot: izolát přípravku Botanigard dosáhl indexu 0,35; izoláty přípravků Preferal a Mycotal dosáhly indexu 0,2; respektive 0,19. V kontrolní variantě nebyla pozorována úmrtnost, či projev infekce, index FDI byl tedy roven 0. Statisticky významný rozdíl ($H_{(3, N=300)}=27,70826$; $P=0,000$) byl zjištěn pouze u izolátu přípravku Botanigard, který se významně odlišoval od zbylých dvou izolátů i kontrolní varianty.

Čtvrtý den od ošetření dosáhly hodnoty vývoje nákazy u daných izolátů dle stupnice FDI indexů 1,59 (Botanigard), 1,41 (Preferal) a 1,28 (Mycotal), zatímco u kontrolní varianty bylo dosaženo hodnoty indexu FDI 0,07. Statistickou analýzou byla prokázána statisticky významná odlišnost ($H_{(3, N=300)}=140,4450$; $P=0,000$) kontrolní varianty od testovaných izolátů, tzn., že se statisticky významně odlišovaly všechny izoláty přípravků od kontrolní varianty, nicméně izoláty samotné se mezi sebou významně nelišily.

Graf 5.40: Vyjádření vývoje nákazy pomocí stupnice FDI u neokřídlených partenogenetických samic *M. persicae* po ošetření suspenzí izolátů získaných z komerčních preparátů Botanigard, Mycotal a Preferal o koncentraci 1×10^6 konidií/ml v průběhu 10denního biotestu; inkubace probíhala v 25 °C



Třetí kontrolní den, tedy 7. den od založení pokusu, byly zjištěny následující hodnoty FDI u daných izolátů, a to sice 2,59 (Preferal), 2,49 (Botanigard) a 2,27 (Mycotal), v kontrolní variantě byla stanovena hodnota indexu FDI 0,12. Statistická analýza ukázala statisticky významný rozdíl ($H_{(3, N=300)}=185,3540$; $P=0,000$) kontrolní varianty od jednotlivých izolátů, dále pak byl zjištěn rozdíl mezi izoláty přípravku Mycotal a Preferal, jiné rozdíly zjištěny nebyly.

Poslední kontrolní den (10. den) dosáhla hodnota indexu FDI u izolátů přípravků Botanigard a Preferal shodné hodnoty 2,91, u izolátu přípravku Mycotal bylo dosaženo hodnoty FDI 2,69, zatímco v kontrolní variantě bylo dosaženo hodnoty indexu vývoje nákazy dle stupnice FDI 0,17. Statistická analýza prokázala statisticky významný rozdíl ($H_{(3, N=300)}=218,6094$; $P=0,000$) jak mezi kontrolní variantou a jednotlivými izoláty, tak současně i významné rozdíly mezi samotnými izoláty, pouze v případě izolátů přípravku Botanigard a Preferal statisticky významný rozdíl prokázán nebyl.

5.4 Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd obhospodařovaných konvenčním způsobem zemědělství

5.4.1 Metodický postup

Kultivace, příprava suspenze

- Konidie testovaných izolátů byly získány pomocí plošné kultivace kultury na PDA v 90mm Petriho miskách při teplotě 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 14 dnů.
- Suspenze konidií byla následně připravena smytím spor z povrchu plně vysporulované kultury pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^6 konidií/ml, pomocí „Neubauerovy počítací komůrky“.

Hodnocení klíčivosti

- K posouzení klíčivosti bylo použito standardního laboratorního testu klíčivosti, viz Materiál a metodika, kdy byla pro každou variantu (tzn. izolát) připravena 3 opakování a v každém opakování bylo hodnoceno 100 spor (3×100 spor).
- Hodnocení bylo provedeno po 24 hodinách od založení testu.

Kultivace na umělém živném substrátu – středové kultury

- Kultivace středových kultur probíhala na umělém živném mediu PDA, postup viz část Materiál a metodika.
- Pro každý izolát byla vyhodnocena 4 opakování.
- Kultivace probíhala při teplotě 10; 15 a 20 °C po dobu 3 týdnů bez přístupu světla.
- Kultury byly vyhodnoceny: a) zjištěním průměru kultury (tzn. změření 2 na sebe kolmých rozměrů, ze kterých byl vypočítán průměr kultury); b) kultura byla homogenizována ve sterilní destilované vodě se smáčedlem (0,05% Tween 80), a poté byla stanovena koncentrace pomocí počítací komůrky a následně vypočítána výtěžnost konidií na kulturu.

Účinnost na larvy potěmniky moučného (*T. molitor*)

- K posouzení průběhu nákazy bylo použito standardního laboratorního testu, který nám dovoluje nejen určit úroveň procentuální kumulované mortality a infekce, ale zároveň pomocí hodnotící stupnice FDI také „stupeň vývoje“ nákazy, viz Materiál a metodika.
- Inkubace probíhala při teplotě 10; 15 a 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 10 dnů.
- Pro každou z variant/izolátů byla připravena 3 opakování po 25 jedincích (celkem 75 jedinců na variantu včetně varianty kontrolní).
- Hodnocení probíhalo každý den po dobu následujících 10 dnů od založení testu.

5.4.2 Výsledky

V následující kapitole jsou shrnuty výsledky hodnocení vlastností houby *M. anisopliae*. Bylo hodnoceno celkem 8 izolátů získaných v průběhu monitoringu prováděného na zemědělských půdách obhospodařovaných konvenčním způsobem. Cílem práce bylo zjistit, zda je možné do určité míry předvídat odlišnosti v kvalitativních vlastnostech na základě odlišností v morfologii středových kultur. Testy byly prováděné se záměrem ohodnotit a vybrat indigenní izoláty houby *M. anisopliae*, které by byly vhodné pro opětovnou aplikaci v rámci biologické ochrany v jejich původním prostředí. Pro porovnání byl společně s našimi izoláty hodnocen kmen F 52, který tvoří účinnou složku preparátu Bio1020.

Hodnocení klíčivosti a vývoje spor

Jako základní kvalitativní parametr byla hodnocena klíčivost spor po 24 a 48 hodinách. Klíčivost byla sledována ve všech 3 testovaných teplotách, tzn. 10, 15 a 20 °C. Z tabulky 4.6 je zřejmé, že po 24 hodinách nebyly zjištěny klíčivé spory u žádného z izolátů kultivovaných v 10 °C, v této teplotě došlo k oddálení klíčivosti, která byla zjištěna až po 48 hodinách. Hodnoty u jednotlivých izolátů byly vyrovnané, statisticky prokazatelně horší klíčivost byla zjištěna u izolátů s označením 110108 a 110111, nejvyšší hodnota klíčivosti 44,67 % byla zjištěna u izolátu 110112 ($F=72,549$; $df=8, 18$; $P=0,0000$). Při hodnocení klíčivosti v 15 °C vykazovaly hodnoty po 24 hodinách výrazné statistické odlišnosti ($F=56,301$; $df=8, 18$; $P=0,0000$) z důvodu rozptylu hodnot 5,33 % (110108) – 46,67 % (110112). Po 48 hodinách v této teplotě dosáhly prokazatelně nejnižších hodnot izoláty 110108 (65,67 %) a 110111 (73,67 %), u ostatních variant se pohybovala klíčivost v rozmezí 90,67–98,67 % ($F=31,188$; $df=8, 18$; $P=0,0000$). Ve 20 °C byla již po 24 hodinách klíčivost spor 67–100 %, nejnižší hodnoty byly zjištěny opět u izolátů 110108 a 110111, 100% klíčivosti dosáhly izoláty F 52 a 110110 ($F=15,876$; $df=8, 18$; $P=0,0000$). Po 48 hodinách byla klíčivost 95,33–100 %, izoláty 110108 a 110111 dosáhly prokazatelně nižších hodnot než ostatní izoláty ($F=42,133$; $df=8, 18$; $P=0,0000$).

Index vývoje spor (tabulka 5.7.) vykazoval nejvyšší statistické odlišnosti mezi jednotlivými izoláty při hodnocení v 15 °C po 24 i 48 hodinách (prokazatelně nižší hodnoty po 24 hodinách dosáhly izoláty 110105, 110106, 110108 a 110111 – $H_{(8, N=2700)}=323,3349$, $P=0,000$; po 48 hodinách pak izoláty 110106, 110108 a 110111 – $H_{(8, N=2700)}=1470,280$, $P=0,000$). Naopak nejvyrovnanější vývoj byl zaznamenán ve 20 °C. Po 24 hodinách byl GI prokazatelně nižší u izolátů 110108 (0,64) a 110111 (0,70) ($H_{(8, N=2700)}=1947,369$, $P=0,000$), po 48 hodinách byl index vývoje (GI) v této teplotě prokazatelně nejnižší u izolátu 110111 (1,59), u ostatních izolátů byla hodnota GI 1,84–2,00 ($H_{(8, N=2700)}=1173,354$, $P=0,000$). Stejně tak i v teplotě 10 °C byly po 48 hodinách nejnižší hodnoty zjištěny u izolátů 110108 a 110111 ($H_{(8, N=2700)}=190,7543$, $P=0,000$).

Tabulka 5.6: Klíčivost jednotlivých izolátů po 24 a 48hodinové periodě v daných teplotách (průměr %±SD)

Kód izolátu	24 hodin			48 hodin		
	10 °C	15 °C	20 °C	10 °C	15 °C	20 °C
F52	0±0,00	42,33±4,50 a	100±0,00 a	39,67±1,89 a	94,33±1,70 ab	100±0,00 a
110102	0±0,00	36,67±2,87 a	99,33±0,94 a	41,33±2,05 a	95,67±1,25 ab	100±0,00 a
110105	0±0,00	16,33±3,40 bc	98,33±1,70 a	38,33±3,68 a	97,00±1,63 ab	100±0,00 a
110106	0±0,00	19,67±3,09 b	98,00±2,16 a	37,67±2,49 a	90,67±1,70 b	100±0,00 a
110108	0±0,00	5,33±2,62 d	67,00±5,10 c	8,67±2,05 b	65,67±1,25 c	95,33±2,05 b
110110	0±0,00	43,33±2,05 a	100±0,00 a	42,33±3,09 a	98,67±0,94 a	100±0,00 a
110111	0±0,00	10,00±1,63 cd	81,67±4,64 bc	12,33±1,24 b	73,67±4,78 c	95,67±1,25 b
110112	0±0,00	46,67±2,87 a	95,33±3,86 ab	44,67±2,05 a	93,67±1,25 ab	100±0,00 a
110113	0±0,00	44,00±3,27 a	99,00±1,41 a	43,00±2,45 a	98,33±1,25 a	100±0,00 a

*Hodnoty ve stejném sloupci označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test).

Tabulka 5.7: Index vývoje jednotlivých izolátů po 24 a 48hodinové periodě v daných teplotách (průměr %±SD)

Kód izolátu	24 hodin			48 hodin		
	10 °C	15 °C	20 °C	10 °C	15 °C	20 °C
F52	0±0,00	0,28±0,36	1,99±0,10	0,21±0,30	1,73±0,56	2,00±0,00
110102	0±0,00	0,18±0,24	1,99±0,16	0,24±0,30	1,71±0,50	2,00±0,00
110105	0±0,00	0,08±0,18	1,89±0,32	0,22±0,30	1,84±0,45	2,00±0,00
110106	0±0,00	0,10±0,20	1,93±0,31	0,22±0,30	1,01±0,50	2,00±0,00
110108	0±0,00	0,03±0,11	0,64±0,61	0,05±0,16	0,41±0,39	1,84±0,47
110110	0±0,00	0,29±0,39	1,97±0,26	0,23±0,29	1,77±0,45	2,00±0,00
110111	0±0,00	0,05±0,15	0,70±0,51	0,07±0,20	0,50±0,47	1,59±0,54
110112	0±0,00	0,24±0,25	1,81±0,50	0,25±0,30	1,55±0,65	2,00±0,00
110113	0±0,00	0,30±0,31	1,95±0,27	0,32±0,36	1,87±0,37	2,00±0,00

Tabulka 5.8: Vícenásobné porovnání průměrného pořadí hodnot GI, stanovených při hodnocení konidií 24 a 48 hodin od založení testu klíčivosti daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v jednotlivých teplotách

Kód izolátu	10 °C ^{a, d}									15 °C ^{b, e}									20 °C ^{c, f}										
	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113		
24 hodin																													
F 52	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110102	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	
110105	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110106	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110108	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110110	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110111	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110112	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110113	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
48 hodin																													
F 52	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110102	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110105	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110106	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110108	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110110	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110111	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110112	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		
110113	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		

Hodnocení po 24 hodinách: ^aKruskal-Wallisův test: $H_{(8, N=2700)}=0,000000$, $P=1,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(8, N=2700)}=323,3349$, $P=0,000$; ^cKruskal-Wallisův test: $H_{(8, N=2700)}=1947,369$, $P=0,000$

Hodnocení po 48 hodinách: ^dKruskal-Wallisův test: $H_{(8, N=2700)}=190,7543$, $P=0,000$; ^eKruskal-Wallisův test: $H_{(8, N=2700)}=1470,280$, $P=0,000$; ^fKruskal-Wallisův test: $H_{(8, N=2700)}=1173,354$, $P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl variantami; **** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Radiální růst středových kultur a výtěžnost spor

Radiální růst středových kultur byl rovněž hodnocen ve všech třech teplotách. Mezi jednotlivými izoláty byly statisticky prokazatelné odlišnosti (tabulka 5.9.). V 10 °C byly nejmenší středové kultury vytvořené u izolátů 110111 a 110108 (průměr kultury 3,25 mm), naopak největší kultury tvořil kmen F 52 (průměr kultury 11,63 mm) ($F=432,21$; $df=8, 63$; $P=0,0000$). S rostoucí teplotou rostla i velikost kultur. V 15 °C se rozmezí průměru jednotlivých kultur pohybovalo od 14,75 mm (izolát 110111) do 31,13 mm (kmen F 52). Mezi jednotlivými hodnotami byly prokazatelné statistické odlišnosti ($F=475,16$; $df=8, 63$; $P=0,0000$). Statisticky rozdílné hodnoty byly i ve 20 °C ($F=193,77$; $df=8, 63$; $P=0,0000$), nejmenší průměr kultur byl stejně jako v 15 °C naměřen u izolátu 110111 (32,38 mm) a největší u izolátu 110106 a kmene F 52 (50,00 a 49,63 mm).

Výtěžnost spor v 10 °C nebyla u šesti vzorků hodnotitelná z důvodu nedostatečné sporulace kultur (tzn. sporulace pod rozlišovací možnosti hemacytometru). Mezi třemi hodnocenými izoláty byly prokazatelné odlišnosti ($F=17464$; $df=8,27$; $P=0,0000$). Rovněž v dalších dvou teplotách byly hodnoty statisticky odlišné. V 15 °C byla nejnižší hodnota výtěžnosti zjištěna u izolátů 110111 a 110110 ($4,28$ a $4,23 \times 10^7$ spor/kulturu) a nejvyšší u izolátu 110112 ($4,43 \times 10^8$ spor/kulturu) ($F=2050,5$; $df=8, 27$; $P=0,0000$). Stejně jako v předchozí teplotě byla i ve 20 °C nejnižší výtěžnost zjištěna u izolátů 110111 a 110110 ($1,20$ a $1,28 \times 10^8$ spor/kulturu) a nejvyšší u izolátů 110112 a 110106 ($1,88$ a $1,58 \times 10^9$ spor/kulturu) ($F=600,34$; $df=8,27$; $P=0,0000$).

Tabulka 5.9: Radiální růst a sporulace jednotlivých izolátů po 3týdenní kultivaci na živné půdě PDA (průměr $\% \pm SD$)

Kód izolátu	10 °C		15 °C		20 °C	
	Počet spor na kulturu	Velikost kultury (mm)	Počet spor na kulturu	Velikost kultury (mm)	Počet spor na kulturu	Velikost kultury (mm)
F 52	$5,23 \pm 0,33 \times 10^6$ a	$11,63 \pm 0,48$ a	$2,66 \pm 0,11 \times 10^8$ c	$31,13 \pm 0,78$ a	$1,24 \pm 0,09 \times 10^9$ b	$49,63 \pm 1,49$ a
110102	$2,16 \pm 0,23 \times 10^5$ b	$10,88 \pm 0,33$ b	$2,63 \pm 0,10 \times 10^8$ c	$24,88 \pm 0,78$ b	$1,16 \pm 0,10 \times 10^9$ b	$44,25 \pm 1,79$ d
110105	$0 \pm 0,00$ d	$9,50 \pm 0,50$ c	$3,36 \pm 0,14 \times 10^8$ b	$22,50 \pm 0,50$ c	$3,89 \pm 0,45 \times 10^8$ d	$46,25 \pm 0,66$ bc
110106	$0 \pm 0,00$ d	$9,13 \pm 0,33$ cd	$3,53 \pm 0,16 \times 10^8$ b	$25,00 \pm 1,00$ b	$1,58 \pm 0,02 \times 10^9$ a	$50,00 \pm 0,50$ a
110108	$0 \pm 0,00$ d	$3,25 \pm 0,43$ e	$6,63 \pm 0,27 \times 10^7$ d	$15,88 \pm 0,60$ e	$3,01 \pm 0,21 \times 10^8$ e	$37,00 \pm 1,12$ e
110110	$0 \pm 0,00$ d	$11,00 \pm 0,00$ ab	$4,23 \pm 0,10 \times 10^7$ f	$22,63 \pm 0,48$ c	$1,28 \pm 0,09 \times 10^8$ f	$44,75 \pm 1,30$ cd
110111	$0 \pm 0,00$ d	$3,25 \pm 0,43$ e	$4,28 \pm 0,16 \times 10^7$ f	$14,75 \pm 0,66$ e	$1,20 \pm 0,06 \times 10^8$ f	$32,38 \pm 0,48$ f
110112	$6,00 \pm 1,54 \times 10^4$ c	$8,75 \pm 0,43$ d	$4,43 \pm 0,18 \times 10^8$ a	$30,38 \pm 0,48$ a	$1,88 \pm 0,09 \times 10^9$ a	$47,00 \pm 0,50$ bc
110113	$0 \pm 0,00$ d	$9,75 \pm 0,43$ c	$5,47 \pm 0,18 \times 10^7$ e	$19,13 \pm 0,78$ d	$6,60 \pm 0,58 \times 10^8$ c	$37,88 \pm 1,62$ e

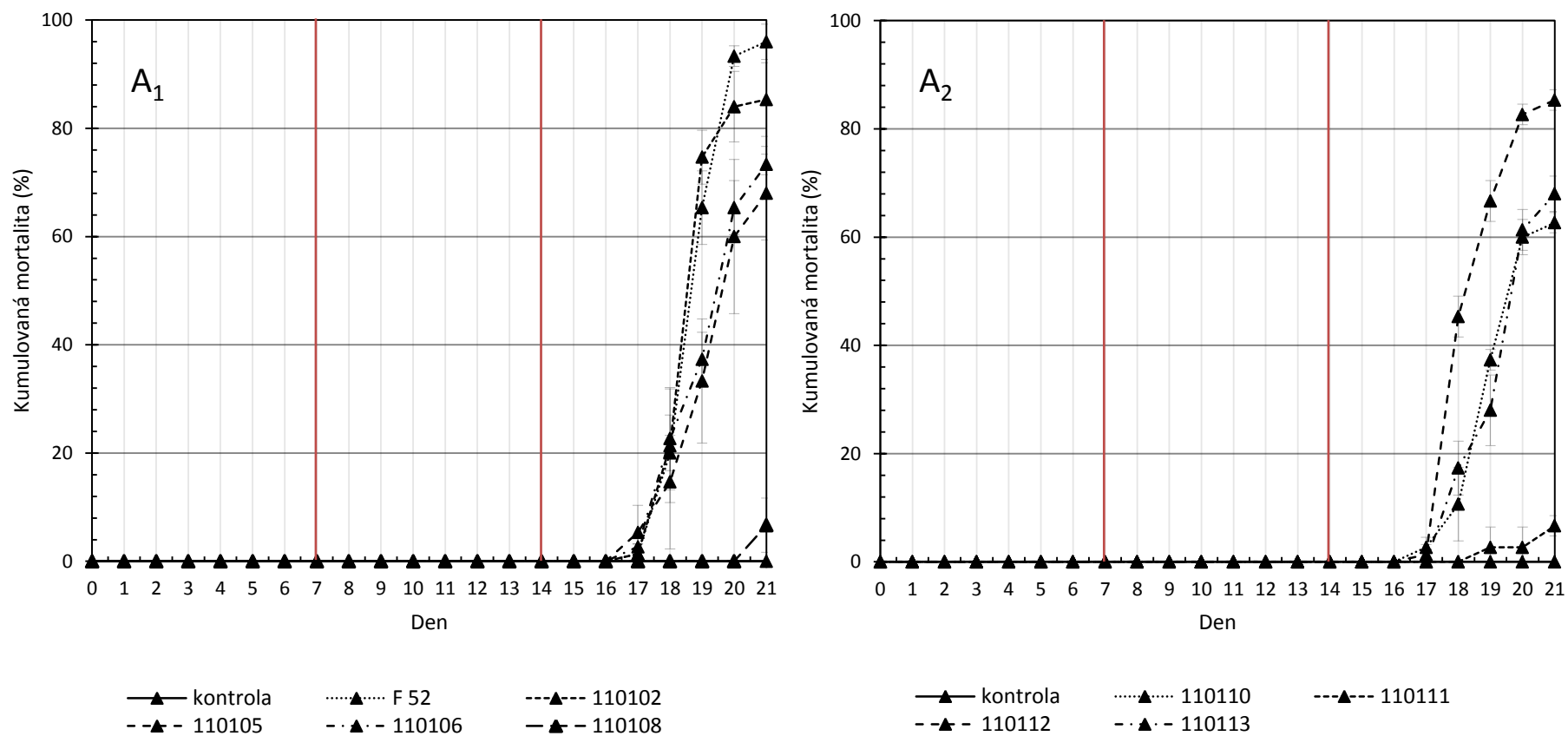
* Hodnoty ve stejném sloupci označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, $P < 0,05$ (ANOVA, Tukeyho test).

Mortalita, infekce a vývoj houby na larvách T. molitor

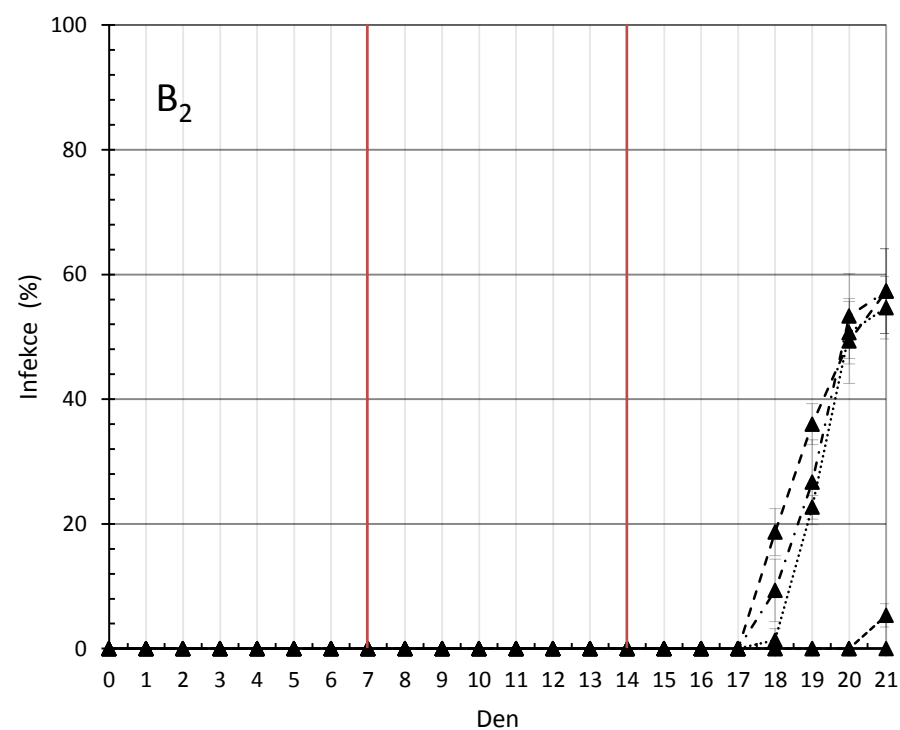
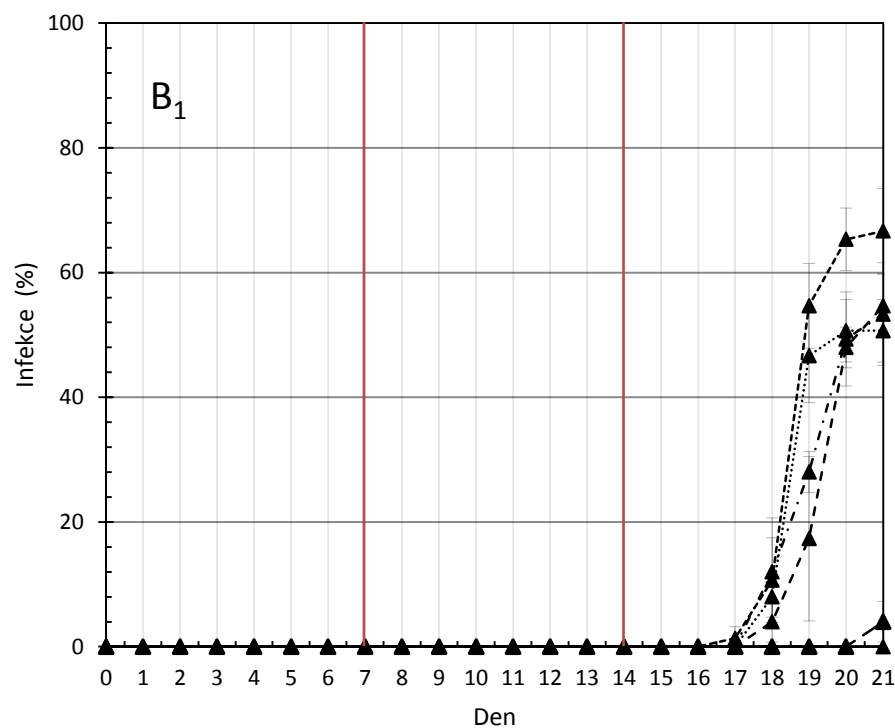
Hodnocení probíhalo denně po dobu 21 dnů. Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno po 7, 14 a 21 dnech. V 10 °C (grafy 5.41.) byly první známky mortality pozorovány 17. den, kdy, s výjimkou izolátů 110108, 110111 a 110113, byly zaznamenány hodnoty v rozmezí 1,33–5,33 % mrtvých jedinců, a rozdíly týkající se vyvolané kumulované mortality v následující dny byly mezi jednotlivými izoláty velmi výrazné. Izolát 110108 způsobil první mortalitu jedinců 18. den (17,33 %), u izolátu 110111 byli první mrtví jedinci pozorováni 19. den (2,67 %) a až 21. den byli zjištěni mrtví jedinci (6,67 %) po ošetření larev suspenzí konidií izolátu 110108. Po 21 dnech byly nejvyšší hodnoty mortality vyvolané kmenem F 52 (96 %) a byly statisticky shodné s mortalitou způsobenou izoláty 110102 a 110112 (85,33 %). Prokazatelně nejnižší mortalitu způsobila inokulace sporami izolátů 110108 a 110111, pouhých 6,67 % ($F=75,686$; $df=9, 20$; $P=0,0000$). Co se týká vyvolané infekce (grafy 5.42.) na larvách *T. molitor*, byl průběh obdobný jako průběh mortality. Stejně jako u hodnot mortality byli první infikovaní jedinci zaznamenáni 17. den (1,33 %), avšak pouze u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu 110102. U zbylých izolátů, s výjimkou izolátů 110108 a 110111, byli zaznamenáni první infikovaní jedinci 18. den, kdy se hodnota infekce pohybovala v rozmezí 4–18,67 %. Izoláty 110108 a 110111 způsobily první viditelné známky infekce jedinců (4 %, resp. 5,33 %) až 21. den. U většiny izolátů (kromě izolátů 110108 a 110111) nebyly po 21 dnech inkubace zjištěny rozdíly mezi počtem zjevně infikovaných jedinců. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 50,67–66,67 % ($F=55 437$; $df=9, 20$; $P=0,0000$). Prokazatelně nižší hodnoty dosáhl izolát 110108 a izolát 110111.

První, i když ojedinělé, známky onemocnění larev *T. molitor*, hodnoceno dle stupnice FDI, se objevily již po 4 dnech biotestu (grafy 5.43.), jednalo se o melanizační skvrny na povrchu larev ošetřených suspenzí konidií izolátu 110112. U ostatních izolátů, s výjimkou izolátů 110108 a 110111, byly první známky nákazy pozorovány 5. den. U izolátů 110108 a 110111 se první příznaky onemocnění objevily až 12. den. Sedmý den, opět s výjimkou izolátů 110108 a 110111, se vývoj nákazy larev, dle stupnice FDI, pohyboval v rozmezí hodnot 0,31–0,47, 14. den pak bylo dosaženo hodnot, již pro všechny testované izoláty, v rozmezí 0,02–0,50. Po ukončení biotestu (21. den) byl FDI u jednotlivých variant vyrovnáný, dosahoval hodnot 1,1–1,27. Pouze u izolátů 110108 a 110111 byly hodnoty FDI 0,27 a 0,29. Statistické hodnocení vývoje nákazy je znázorněno v tabulce 4.10. Průměrné „kritické“ hodnoty 1,50 ve vývoji nákazy, dle stupnice FDI po 21 dnech inkubace v 10 °C, nebylo dosaženo ani u jednoho z testovaných izolátů. V kontrolní variantě nebyly po celou dobu inkubace zaznamenány žádné známky mortality, a ani infekce larev.

Grafy 5.41: Grafické znázornění průběhu kumulované mortality, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu v 10 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (A₁; A₂)



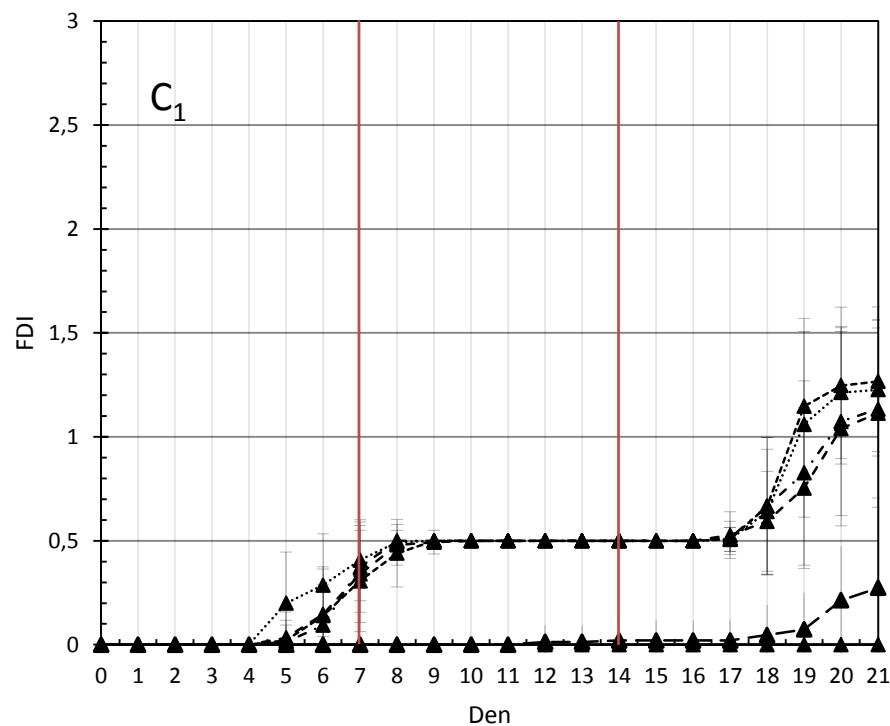
Grafy 5.42: Grafické znázornění průběhu infekce, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu v 10 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (B₁; B₂)



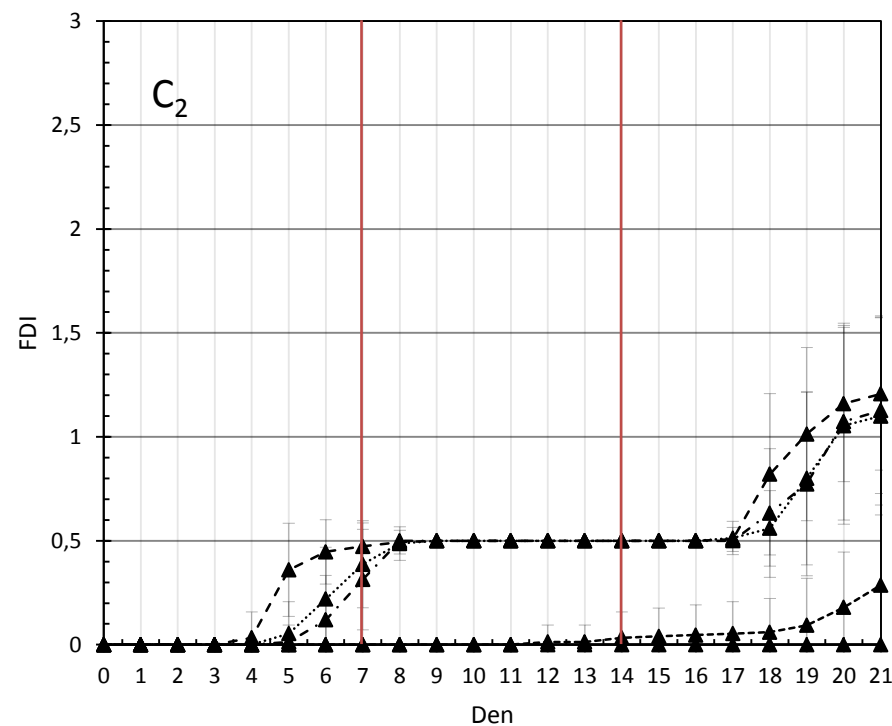
—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 -▲- 110105 -·▲- 110106 -▲- 110108

—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 -▲- 110112 -·▲- 110113

Grafy 5.43: Grafické znázornění vývoje FDI, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu v 10 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (C_1 ; C_2)



—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 -▲- 110105 -·▲- 110106 -▲- 110108

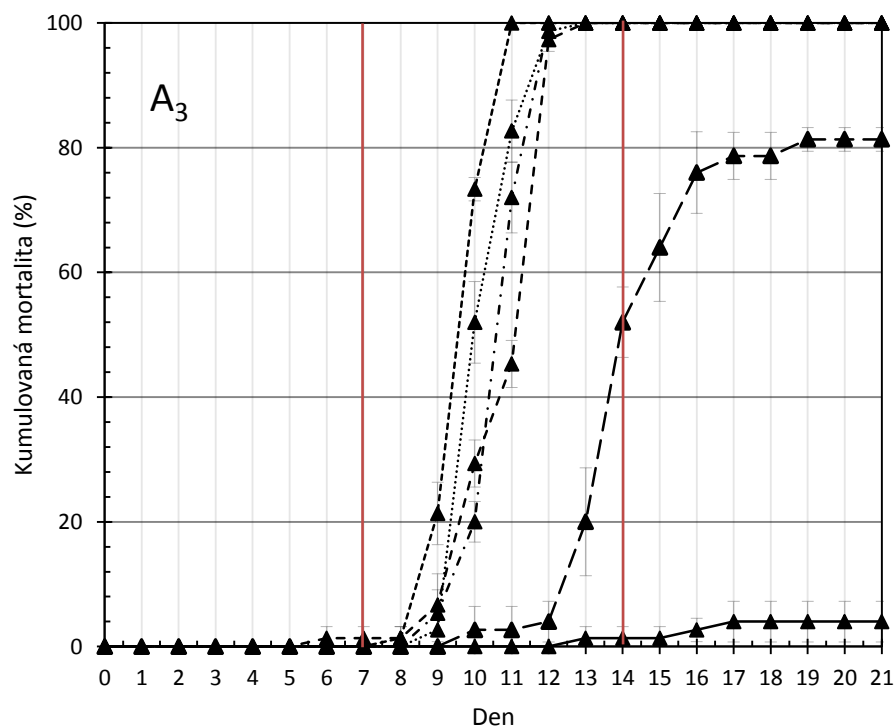


—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 -▲- 110112 -·▲- 110113

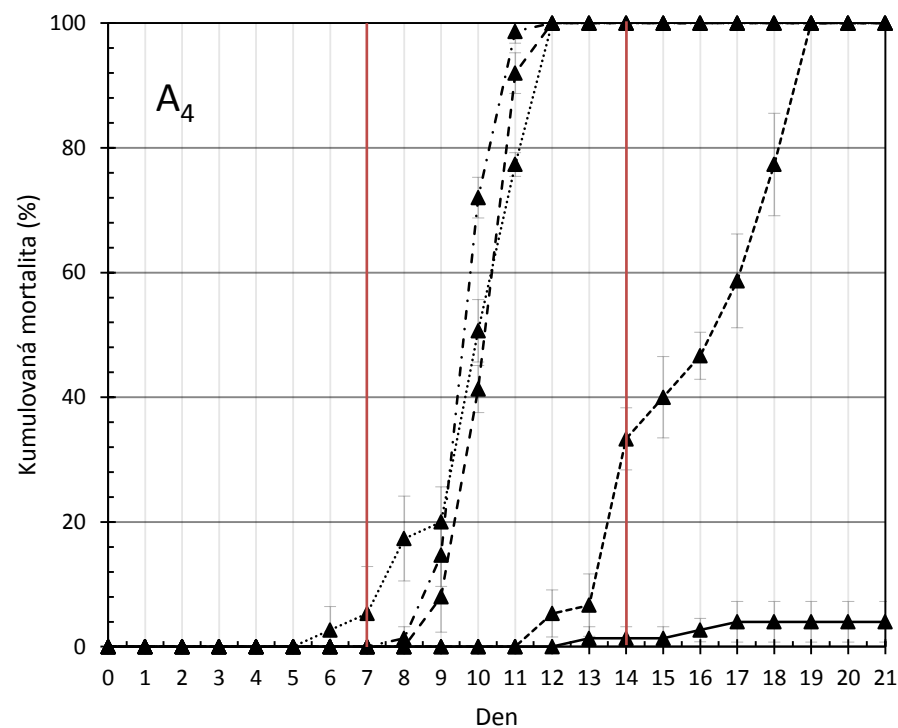
V 15 °C (grafy 5.44) se začala mortalita objevovat již 6. den biotestu, a to u izolátů 110105 a 110110, kdy bylo pozorováno 1,33 %, resp. 2,67 % mrtvých larev, u zbylých izolátů byly první známky mortality pozorovány od 8. do 12. dne. Nicméně již 11. den byla dosažena 100% mortalita larev po ošetření suspenzí konidií izolátu 110102. Po 12 dnech dosáhly téměř všechny izoláty 100% mortality (98,67 % pro F 52; 97,33 % pro 110105), výjimku tvořily varianty hodnotící účinnost spor izolátů 110108 a 110111 (4%, resp. 5,33% mortalita jedinců). Po 14 dnech vykazovaly izoláty 110108 a 110111 stále prokazatelně nižší hodnoty mortality larev ($F=402,93$; $df=9, 20$; $P=0,0000$), oproti všem ostatním izolátům, a to 52 a 33,33 %, zatímco hodnota mortality larev ostatních izolátů dosáhla shodně 100 %. Izolát 110111 vykázal 100% mortalitu larev 19. den, zatímco izolát 110108 po 21 dnech inkubace způsobil 81,33% mortalitu jedinců a významně se tak odlišoval od ostatních izolátů ($F=271,29$; $df=9, 20$; $P=0,0000$). V kontrolní variantě byly pozorovány první známky mortality jedinců 13. den (1,33 %), zatímco po 21denní inkubaci bylo dosaženo 4% mortality larev. První zjevně infikovaní jedinci (grafy 5.45.) se objevili u izolátu 110110 7. den biotestu, kdy byla pozorována 4% infekce larev. Pro izoláty (F 52, 110102, 110105, 110106, 110113) byly první příznaky mortality pozorovány 9. den v rozmezí 1,33–16 % případů, pro izolát 110112 pak v 32 % případů 10. den, pro izoláty 110108 a 110111 12., resp. 13. den, kdy mortalita larev byla zjištěna v 1,33 % případů. Po 14 dnech dosáhly hodnoty ukazatele 100 %, pouze u izolátů 110108 a 110111 byly hodnoty prokazatelně nižší (4 %, resp. 16 %, $F=305,79$; $df=9, 20$; $P=0,0000$). Již 12. den způsobil izoláty 110102, 110112 a 110113 100% mortalitu larev. Stejně jako po 14 dnech, tak i po 21 dnech biotestu byla hodnota nižší než 100 % pouze u variant ošetřených spory izolátů 110108 a 110111 a dosahovala shodně hodnoty 80 % ($F=321,00$; $df=9, 20$; $P=0,0000$). V kontrolní variantě nebyly zaznamenány žádné příznaky infekce.

Při hodnocení vývoje houby, za použití stupnice FDI, na larvách *T. molitor* (grafy 5.46.) byly u všech variant (mimo izolátů 110108 a 110111) zjištěny projevy v podobě melanizačních skvrn již po 4 dnech biotestu, první příznaky nákazy u izolátu 110108 a 110111 se objevily 8., resp. 9. den. Sedmý den se hodnoty vývoje nákazy pohybovaly z rozmezí 0,50–0,54. Čtrnáctý den byly hodnoty FDI nejnižší u izolátů 110108 a 110111 (0,84, resp. 0,69), u ostatních izolátů bylo dosaženo hodnoty ve vývoji nákazy 1,67–1,95. Po 21 dnech již mycelium na povrchu většiny larev sporulovalo, průměrné hodnoty FDI byly 2,52–2,88, hodnota FDI u izolátu 110108 dosáhla 1,66 a u izolátu 110111 pak 1,69. „Kritická“ hodnota 1,50 ve vývoji nákazy byla dosažena 12. den u larev ošetřených suspenzí konidií izolátů 110102, 110112 a 110113, izoláty F 52 a 110106 dosáhly tento den shodně „pouze“ hodnoty FDI 1,49. Ostatní izoláty dosáhly „kritické“ hodnoty 1,50 v následujících dnech: izolát 110105 mezi 12. a 13. dnem, izolát 110108 mezi 19. a 20. dnem, izolát 110110 mezi 11. a 12. dnem a izolát 110111 mezi 18. a 19. dnem.

Grafy 5.44: Grafické znázornění průběhu kumulované mortality, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu v 15 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (A₃; A₄)

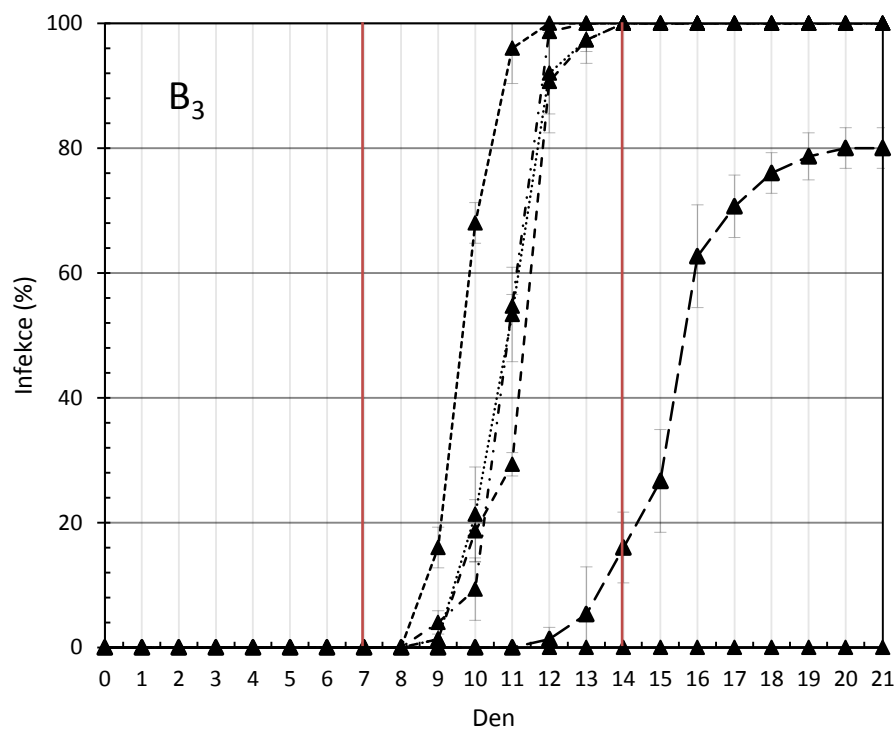


—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 -▲- 110105 -▲- 110106 -▲- 110108

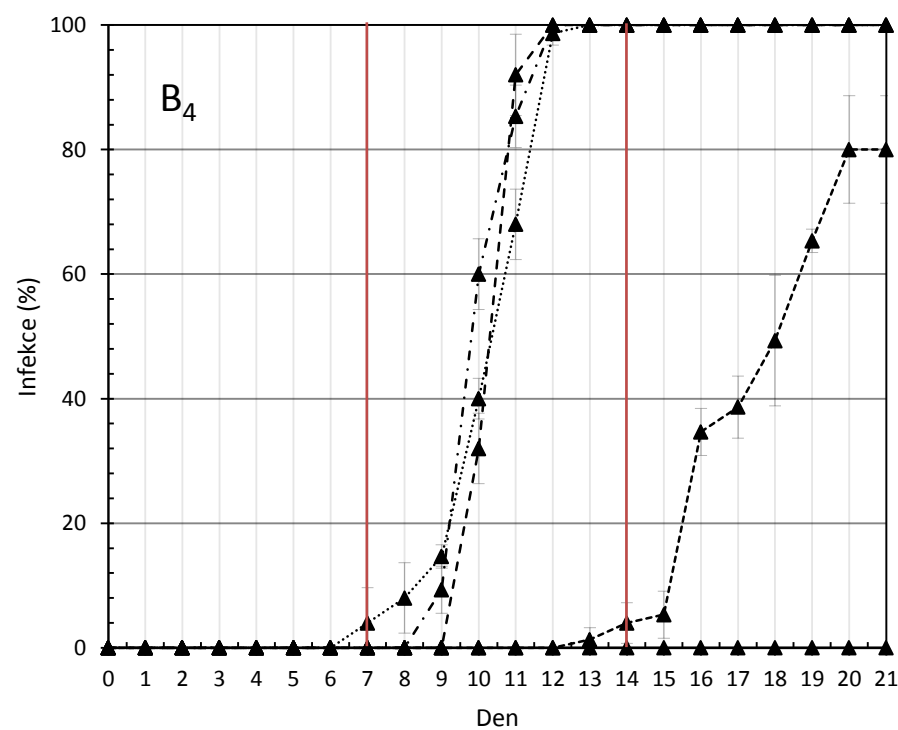


—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 -▲- 110112 -▲- 110113

Grafy 5.45: Grafické znázornění průběhu infekce, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu v 15 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (B₃; B₄)

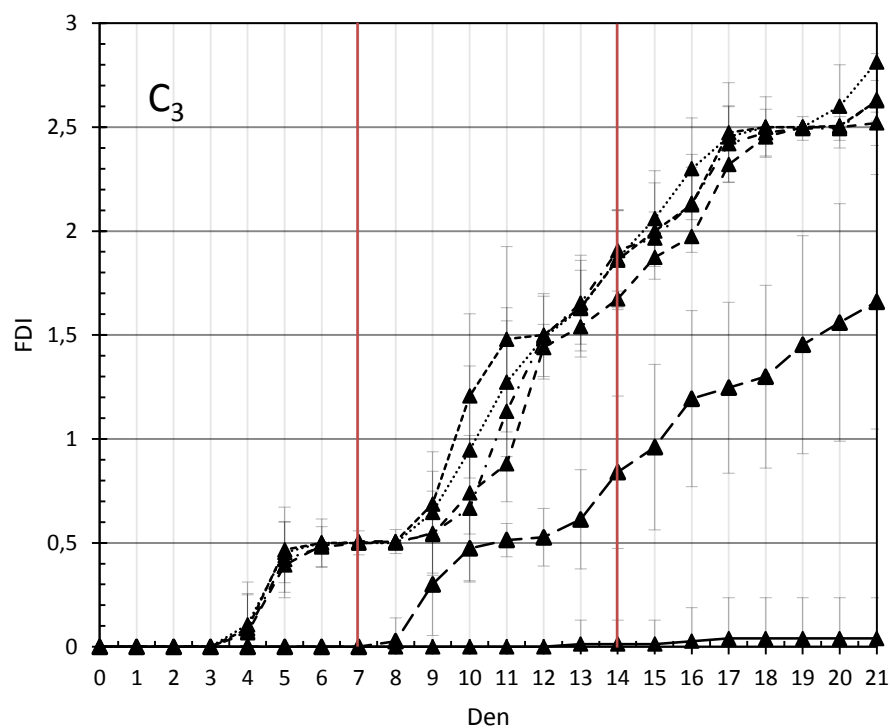


—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 -▲- 110105 -▲- 110106 -▲- 110108

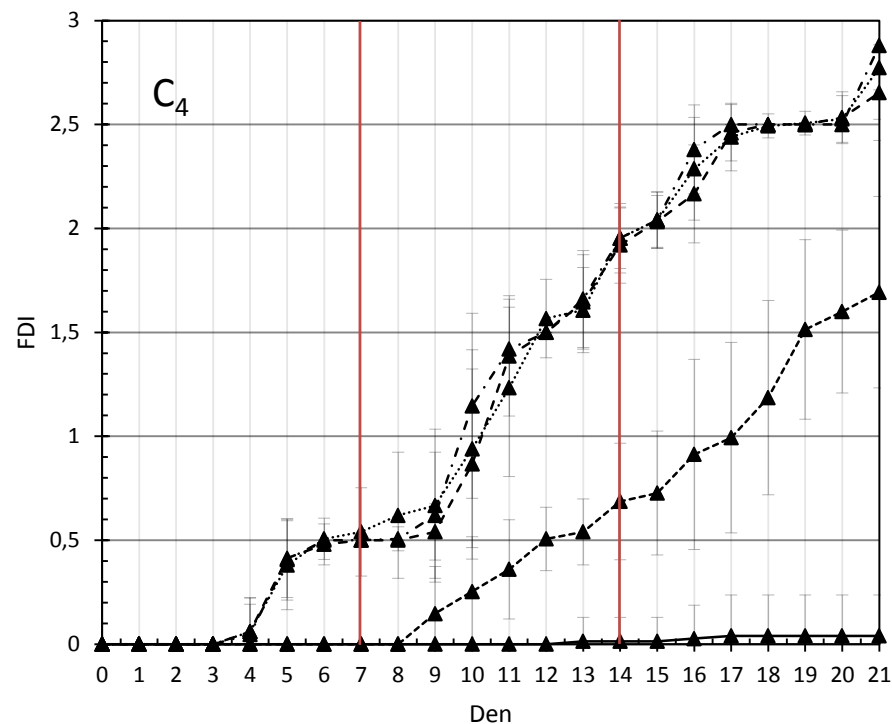


—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 -▲- 110112 -▲- 110113

Grafy 5.46: Grafické znázornění vývoje FDI, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu v 15 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (C_3 ; C_4)



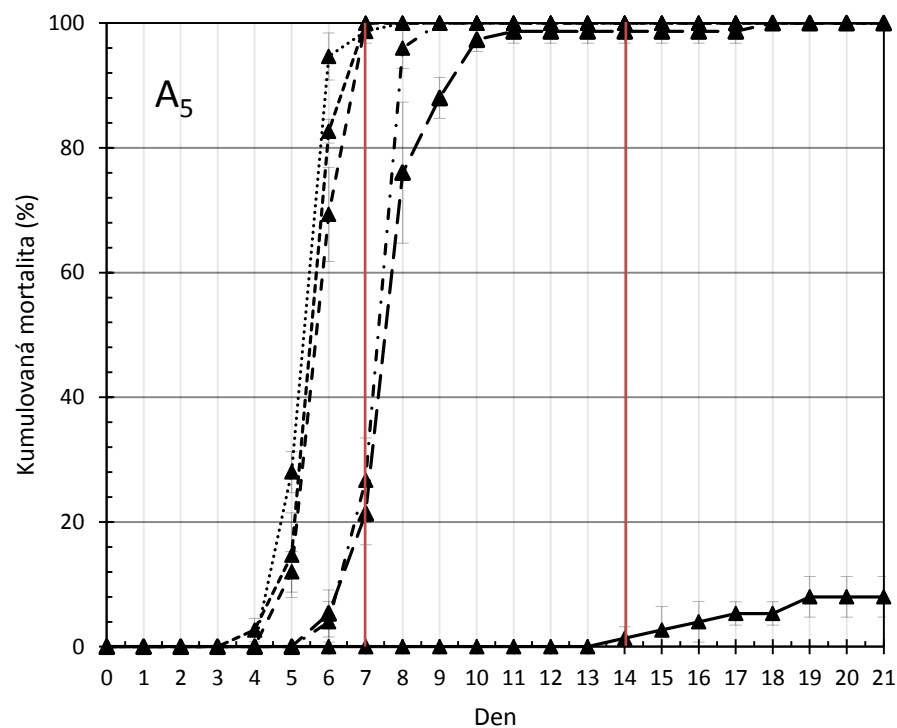
—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 - -▲- - 110105 - ·▲· - 110106 - ▲ - 110108



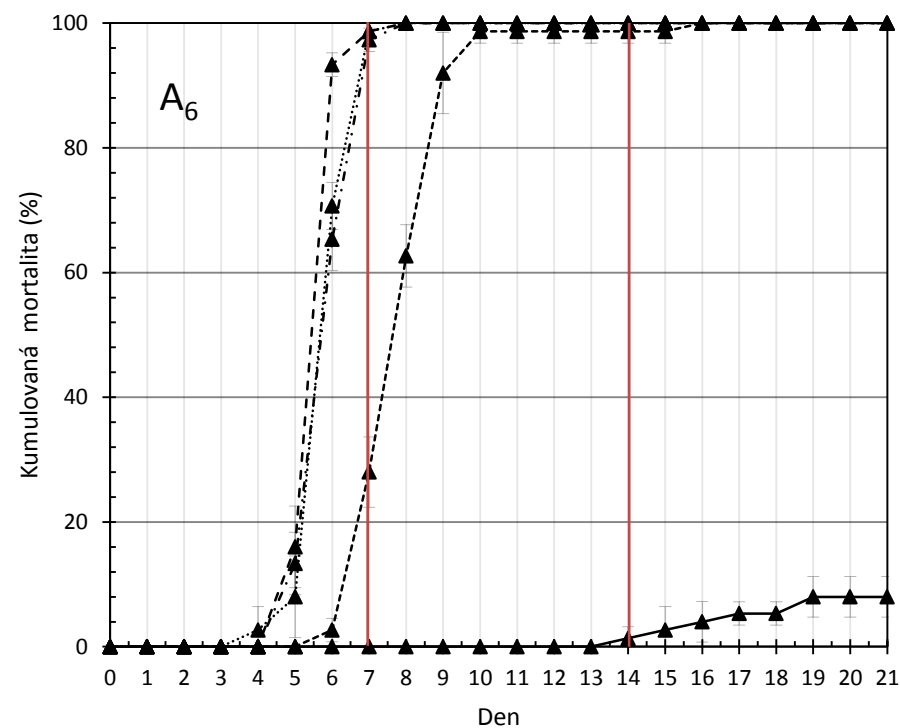
—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 - -▲- - 110112 - ·▲· - 110113

Mortalita (grafy 5.47) se začala objevovat 4. den biotestu u izolátů 110102 a 110110, kdy byla mortalita pozorována shodně v 2,67 % případů. Ostatní izoláty (vyjma izolátů 110106, 110108 a 110111) způsobily první příznaky mortality 5. den, kdy se mortalita pohybovala v rozmezí 8–28 % případů (včetně izolátů 110102 a 110110). Pro 110106, 110108 a 110111 byly první příznaky mortality pozorovány 6. den (2,67–5,33 %). Po 7 dnech byly hodnoty kumulované mortality prokazatelně odlišné ($F=145$; $df=9, 20$; $P=0,0000$) a pohybovaly se v rozmezí 21,33–100 %, kde 100% mortality larev bylo dosaženo po ošetření suspenzí konidií izolátů 110102 a 110105, izoláty F 52, 110110 a 110112 dosáhly shodně hodnoty mortality 98,67 %, izolát 110113 pak hodnoty 97,33 %. Pro zbylé izoláty byly hodnoty mortality pozorovány v rozmezí 21,33–28 %. Osmý den bylo u všech variant (s výjimkou izolátu 110108 a 110111) dosaženo hodnoty mortality téměř 100 %, pouze izolát 110106 vykazoval hodnotu nižší (96 %), izoláty 110108 a 110111 dosáhly 100% mortality jedinců 18., resp. 16. den. Ve srovnání provedeném po 14 a 21 dnech nebyly mezi jednotlivými variantami nalezeny prokazatelné rozdíly ($P>0,05$). V kontrolní variantě byly první známky mortality zjištěny 14. den (1,33 % případů), po 21 dnech dosáhla mortalita 8 %. První infikovaní jedinci byli pozorováni již 4. den u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu 110102 (2,67 %), v případě ostatních izolátů (opět jako v případě mortality vyjma izolátů 110106, 110108 a 110111) byly první příznaky infekce zjištěny 5. den, kdy se infekce pohybovala v rozmezí 5,33–25,33 % případů. Pro 110106, 110108 a 110111 byly první nálezy infikovaných jedinců pozorovány znovu 6. den (2,67–4 %). Stejně jako u mortality, i u množství zjevně infikovaných jedinců (grafy 5.48.) byly zjištěny prokazatelné rozdíly pouze po 7 dnech biotestu, kdy prokazatelně nižší počet byl zjištěn u izolátů 110106, 110108 a 110111 ($F=92051$; $df=9, 20$; $P=0,0000$). Osmý den byla infekce po použití izolátů F 52, 110102, 110105, 110112 a 110113 zjištěna u 100 % případů, pro izoláty 110106 a 110110 pak 96 %, resp. 98,67 % případů. Izoláty 110108 a 110111 pak, jako v případě mortality, 100% infekce dosáhly 18., resp. 16. den. V kontrolní variantě nebyly pozorovány žádné příznaky infekce. První známky nákazy (grafy 5.49) se začaly v podobě melanizačních skvrn objevovat již 2. den biotestu u všech izolátů, s výjimkou izolátů 110106 a 110111. Sedmý den již bylo u většiny variant patrné mycelium houby *M. anisopliae* (FDI 1,47–1,57), pouze u variant 110106, 110108 a 110111 byly hodnoty nižší (0,71–0,78). Čtrnáctý den pak byla pozorována většina kadaverů, na kterých bylo vysporulované mycelium (FDI 2,39–2,95). Posledním hodnocením (21. den) bylo zjištěno, že hodnoty FDI jsou vyrovnané, v rozmezí 2,9–3,00. Průměrné hodnoty FDI 3,00 bylo dosaženo 16. den u izolátů 110102 a 110105, u ostatních izolátů (vyjma izolátů 110108 a 110111) se pak hodnota FDI pohybovala v rozmezí 2,95–2,99. Statistické rozdíly ve vývoji houby *M. anisopliae* na povrchu larev *T. molitor* ve všech hodnocených teplotách jsou součástí tabulek 4.10, 4.11, 4.12. Kritická hodnota FDI 1,50 byla dosažena u izolátů F 52 a 110102 mezi 6. a 7. dnem, u izolátů 110105 a 110112 pak 7. den (izolát 110105 dosáhl hodnoty FDI „pouze“ 1,49), u izolátů 110110 a 110113 mezi 7. a 8. dnem, izolát 110106 pak mezi 8. a 9. dnem a izoláty 110108 a 110111 pak 9–10. den.

Grafy 5.47: Grafické znázornění průběhu kumulované mortality, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu ve 20 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (A₅; A₆)

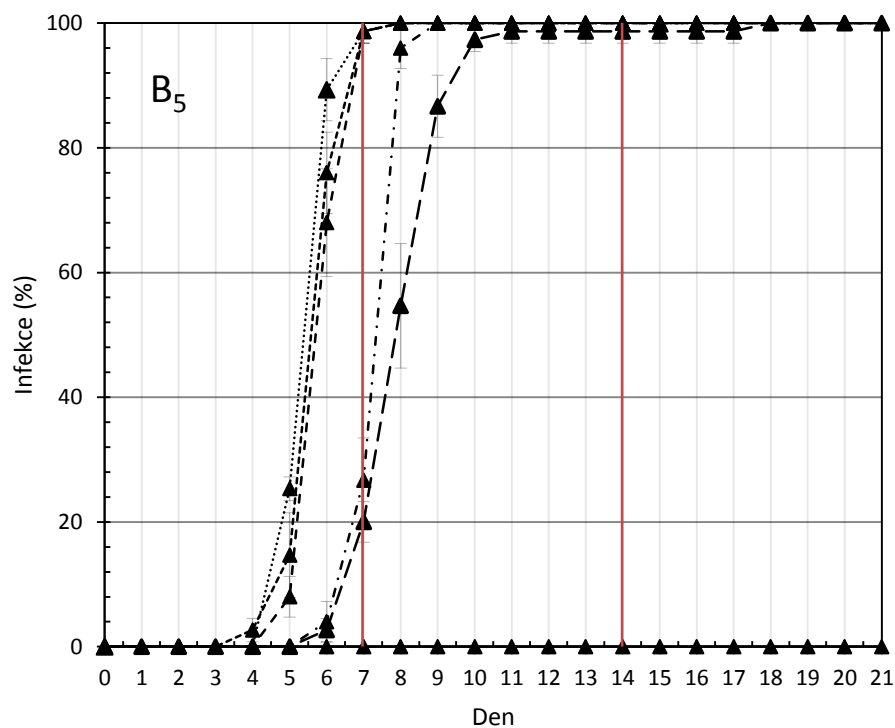


—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 -▲- 110105 -▲- 110106 —▲— 110108

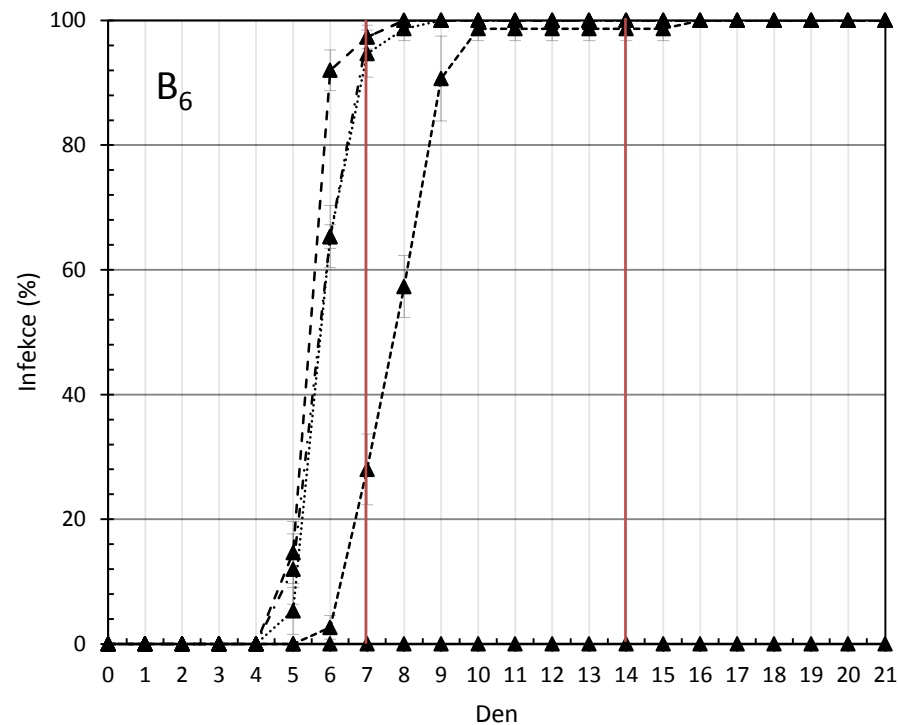


—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 -▲- 110112 -▲- 110113

Grafy 5.48: Grafické znázornění průběhu infekce, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu ve 20 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (B₅; B₆)

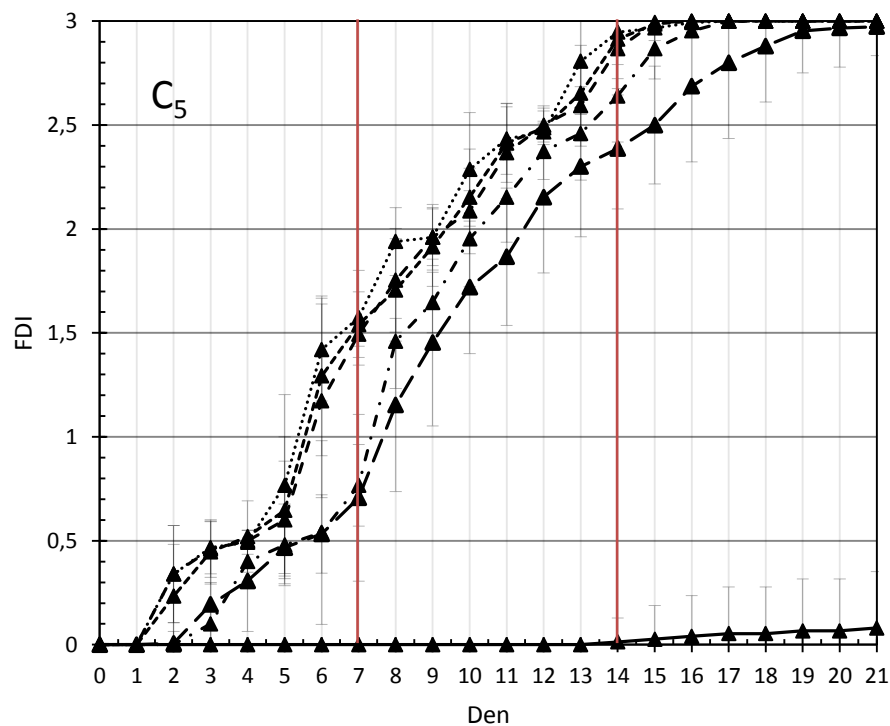


—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 - -▲- - 110105 - .▲- - 110106 -▲- 110108

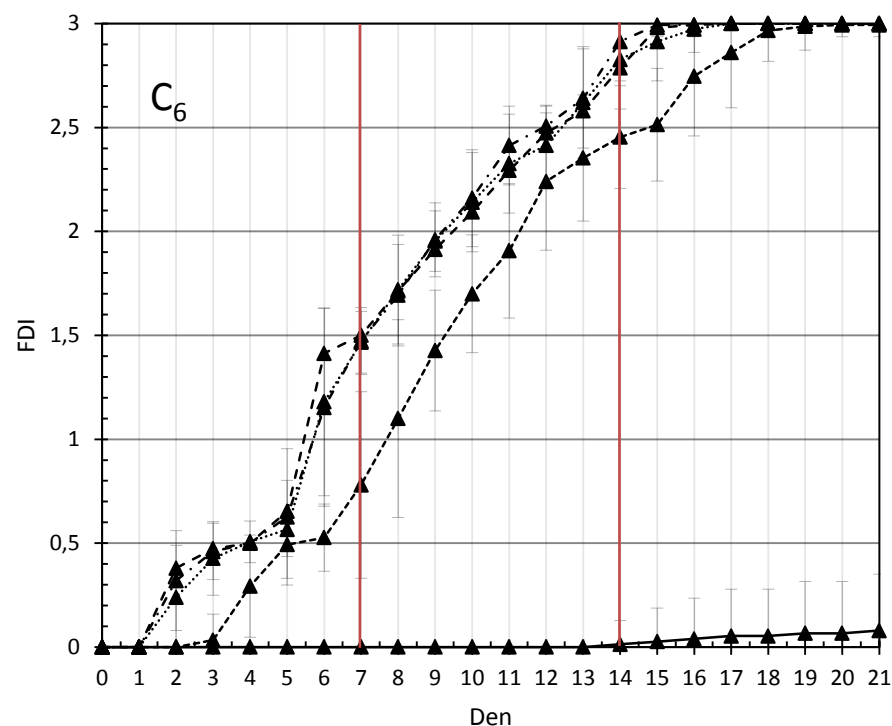


—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 - -▲- - 110112 - .▲- - 110113

Grafy 5.49: Grafické znázornění vývoje FDI, který byl sledován u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 21denního biotestu ve 20 °C. Vývoj je vyjádřen pomocí dvou grafů pro danou charakteristiku (C_5 ; C_6)



—▲— kontrola ▲..... F 52 ---▲--- 110102
 -▲- 110105 -▲- 110106 —▲— 110108



—▲— kontrola ▲..... 110110 ---▲--- 110111
 -▲- 110112 -▲- 110113

Tabulka 5.10: Vícenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *T. molitor* 7. den od ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v jednotlivých teplotách

Kód izolátu	10 °C ^a										15 °C ^b								20 °C ^c												
	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	
kontrola	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
F 52	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110102	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110105	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110106	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110108	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110110	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110111	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110112	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
110113	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=362,7366, P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=733,2200, P=0,000$; ^cKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=556,4093, P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Tabulka 5.11: Vícenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *T. molitor* 14. den od ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v jednotlivých teplotách

Kód izolátu	10 °C ^a									15 °C ^b									20 °C ^c												
	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	
kontrola	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
F 52	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****
110102	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****
110105	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****
110106	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****
110108	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****
110110	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****
110111	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****
110112	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****
110113	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=698,7549, P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=586,2233, P=0,000$; ^cKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=478,036 P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Tabulka 5.12: Vícenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *T. molitor* 21. den od ošetření suspenzí konidií daných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v jednotlivých teplotách

Kód izolátu	10 °C ^a										15 °C ^b										20 °C ^c										
	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	kontrola	F 52	110102	110105	110106	110108	110110	110111	110112	110113	
kontrola		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****
F 52	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****
110102	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****
110105	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****
110106	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****
110108	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****
110110	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****
110111	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****
110112	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****
110113	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=412,1397, P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=562,3144, P=0,000$; ^cKruskal-Wallisův test: $H_{(9, N=750)}=715,2713, P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; **** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

5.5 Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejich pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

5.5.1 Metodický postup

Izoláty/pasáže entomopatogenní houby *I. fumosorosea*

- Pro potřeby této studie byl odizolován kmen *I. fumosorosea* z komerčního produktu PFR-97, jenž sloužil jako referenční kmen.
- Ve studii byly porovnávány původní izoláty *I. fumosorosea* 172 a 173, které vykazovaly odlišnosti v morfologii.
- Dále byly porovnávány 50. pasáže původních izolátů (tj. 172 a 173), jež byly získány pasážováním přes rozličné živné substráty, resp. živná media (označení jednotlivých pasáží ve studii viz tabulka 5.13.). Celkem bylo provedeno 50 pasáží pro každou z variant, kdy byly konidie po konidiogenezi přenášeny z jedinců předešlé pasáže dotykem jedinců určených pro následné pasážování, v případě otrub a PDA byly konidie předešlé pasáže přeneseny inokulační kličkou na živný substrát/medium určený pro následnou pasáž.

Tabulka 5.13: Označení jednotlivých pasáží původních izolátů entomopatogenní houby *I. fumosorosea*

Substrát/živná půda	Kód pasáže	
	Původní izolát 172	Původní izolát 173
otruby	H ₅	H ₃₀
<i>B. tabaci</i>	H ₁₀	H ₃₅
<i>A. gossypii</i>	H ₁₅	H ₄₀
<i>T. urticae</i>	H ₂₀	H ₄₅
PDA	H ₂₅	H ₅₀

Kultivace, příprava suspenze

- Konidie byly získány kultivací v podobě separačních čar na PDA v 90mm Petriho miskách při teplotě 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 14 dnů.
- Suspenze konidií byla následně připravena smytím spor z povrchu plně vysporulované kultury pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^6 konidií/ml, pomocí "Neubauerovy počítací komůrky".

Hodnocení klíčivosti

- K posouzení klíčivosti byl použit standardní laboratorní test klíčivosti (viz část Materiál a metodika), kdy byla pro každou variantu (referenční kmen PFR-97/původní izolát/pasáž původního izolátu) připravena 3 opakování a v každém opakování bylo hodnoceno 100 spor (3x100 spor).

Účinnost na larvy zavíječe voskového (*G. mellonella*)

- K posouzení průběhu nákazy byl použit standardní laboratorní test (viz část Materiál a metodika).
- Inkubace probíhala v 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 10 dnů.
- Pro každou z variant byla připravena 3 opakování po 25 jedincích (celkem 75 jedinců na variantu včetně kontrolní varianty).
- Hodnocení probíhalo každý den po dobu následujících 10 dnů od založení testu.

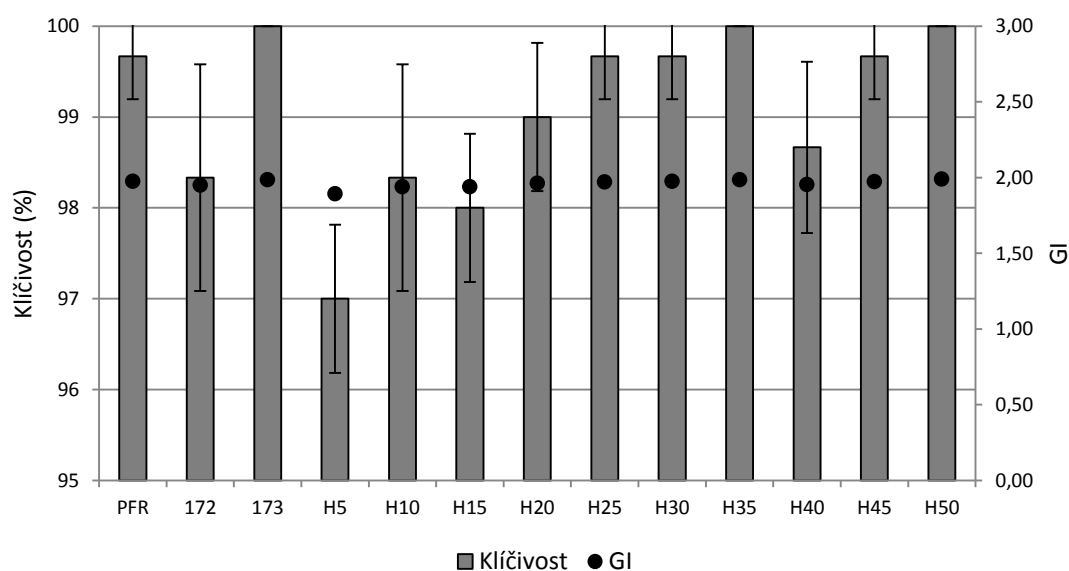
5.5.2 Výsledky

Ve studii byly hodnoceny dva původní izoláty houby *I. fumosorosea* označené čísly 172 a 173 a pasáže provedené přes 3 hostitelské druhy organismů (*B. tabaci* – H₁₀ a H₃₅; *A. gossypii* – H₁₅ a H₄₀; *T. urticae* – H₂₀ a H₄₅), 1 přírodní (otruby – H₅ a H₃₀) a 1 umělé živné medium (PDA – H₂₅ a H₅₀). Cílem studie bylo zjistit, zda několikanásobným pasážováním přes různá média dojde ke změně účinnosti původních izolátů a jejich pasáží. Jako referenční kmen byl v této studii použit čistý kmen izolovaný z komerčního biopreparátu PFR-97.

Klíčivost a vývoj spor

Klíčivost spor byla hodnocena po 24 hodinách u všech variant. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 97–100 % a mezi jednotlivými variantami nebyly zjištěny statistické odlišnosti ($P > 0,05$). Stejně tak ani u hodnot GI nebyly zjištěny prokazatelné odlišnosti ($P > 0,05$), zde se hodnoty pohybovaly v intervalu 1,89–1,99.

Graf 5.50: Klíčivost a vývoj spor houby *I. fumosorosea* hodnocené po 24 hodinách



Mortalita, infekce a FDI

Průběh mortality a infekce byl prakticky shodný. Jedinými výjimkami byl u původního izolátu 172 3. a 4. den od počátku biotestu, kdy mortalita 3. den byla 9,33 % a infekce 6,67 % a 4. den byla mortalita 64 % a infekce 61,33%. U původního izolátu 173 to pak bylo 3. den, kdy mortalita byla 24 % a infekce 18,67 %. Budeme-li hodnotit průběh mortality larev po ošetření suspenzí konidií původních testovaných izolátů a jejich 50. pasáží přes dané substráty, pak zjistíme, že první příznaky mortality larev byly shodně pro všechny varianty pozorovány 3. den, kdy nejvyšší hodnoty mortality larev (73,33 %) dosáhla kultura izolátu 172 získaná pasážováním přes otruby (H₅), čili hodnota značně převyšovala hodnoty mortality jak původních izolátů, tak všech ostatních pasáží. Původní izoláty 172 a 173 dosáhly 3. den 9,33 %, resp. 24 % mortality larev, přičemž průběh mortality byl nadále rychlejší u izolátu 173, který 5. den dosáhl hodnoty mortality larev 100 %, zatímco larvy po ošetření suspenzí spor izolátu 172 vykazovaly 93,33% mortalitu a až následujícího dne (6. den) byla pozorována 100% mortalita larev. Pokud se podíváme na průběh mortality larev ošetřených suspenzí konidií kultur získaných pasážováním přes *B. tabaci*, *A. gossypii* a *T. urticae*, pak zjistíme, že průběh mortality larev byl v případě kultur získaných pasážováním přes *B. tabaci* (H₁₀, H₃₅) a *A. gossypii* (H₁₅, H₄₀) pomalejší než mortalita larev zjištěná po ošetření suspenzí konidií původních izolátů 172 a 173. Mortalita larev u pasáže H₁₀ dosáhla 5. den 34,67 %, u pasáže H₁₅ pak 49,33 %. Průběh mortality larev byl až do konce hodnocení pomalejší u pasáže H₁₀, kde byla 10. den pozorována mortalita larev 88 % u pasáže H₁₀ a 94,67 % u pasáže H₁₅. Pokud se anlogicky podíváme na průběh mortality larev pro pasáže izolátu 173, pak zjistíme, že mortalita larev po ošetření suspenzí konidií pasáží H₃₅ dosáhla 5. den 82,67 %, u pasáže H₄₀ pak 57,33 %. Následný průběh mortality larev byl tedy také pomalejší, nicméně i přes tento fakt bylo dosaženo 100% mortality larev v případě pasáže H₃₅ 8. den, v případě pasáže H₄₀ pak 9. den. Oproti pasážím H₁₀ a H₁₅, kde byl rychlejší průběh mortality larev pozorován pro pasáž H₁₅ (pasážování přes *A. gossypii*), při srovnání pasáží H₃₅ a H₄₀, byl naopak rychlejší průběh pozorován pro pasáž H₃₅ (pasážování přes *B. tabaci*). Co se týká mortality larev ošetřených suspenzí konidií z kultur získaných pasážováním přes *T. urticae* (H₂₀, H₄₅), pak u pasáže H₂₀ bylo 5. den dosaženo hodnoty mortality larev 84 %, 100% mortalita larev byla následně pozorována 7. den. U pasáže H₄₅ byla zjištěna 98,67% mortalita larev již 4. a následně také 5. den, 100% mortality larev bylo dosaženo 6. den. Mortalita larev probíhala v obou případech (H₂₀, H₄₅) rychleji než u kultur obou původních izolátů získaných pasážováním přes *B. tabaci* a *A. gossypii*. Srovnáním hodnot mortality larev u kultur získaných pasážováním přes „neživé“ substráty (otruby, PDA) bylo zjištěno, že u kultur získaných pasážováním přes otruby (H₅, H₃₀) bylo vyšších hodnot mortality larev dosaženo pro pasáž H₅, kdy již 5. den byla pozorována 100% mortalita larev, zatímco u pasáže H₃₀ to bylo 68 % a 100% mortality larev bylo dosaženo 7. den. Hodnoty mortality larev u kultur obou původních izolátů získaných pasážováním přes PDA (H₂₅, H₅₀) dosahovaly shodně již 5. den 100 %. Jednoznačně nejrychlejší průběh mortality byl zjištěn u larev ošetřených suspenzí konidií kmene PFR-97, jenž sloužil v průběhu hodnocení jako referenční kmen. U referenčního kmene byla pozorována mortalita larev 94,67 % již 3. den, 100% mortality bylo dosaženo 5. den. V kontrolní variantě byly první známky mortality larev pozorovány 6. den, poslední den byla hodnocením zjištěna 14,67% mortalita larev.

Tabulka 5.15: Mortalita larev *G. mellonella* způsobená v 10denním biotestu po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	Den									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
kontrola	0±0,00	0±0,00	0±0,00 d	0±0,00 g	0±0,00 f	1,33±1,89 f	8,00±3,27 d	10,67±1,89 d	12,00±0,00 d	14,67±1,89 d
PFR-97	0±0,00	0±0,00	94,67±1,89 a	98,67±1,89 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
172	0±0,00	0±0,00	9,33±1,89 b-d	64,00±3,27 cd	93,33±1,89 b	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
173	0±0,00	0±0,00	24,00±9,80 b	84,00±3,27 bc	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₅	0±0,00	0±0,00	73,33±8,22 a	97,33±3,77 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₁₀	0±0,00	0±0,00	4,00±5,66 cd	12,00±3,27 f	34,67±1,89 e	57,33±1,89 e	77,33±3,77 c	80,00±6,53 c	88,00±3,27 c	88,00±3,27 c
H ₁₅	0±0,00	0±0,00	1,33±1,89 cd	33,33±1,89 ef	49,33±1,89 e	77,33±4,99 d	81,33±3,77 c	94,67±1,89 b	94,67±1,89 b	94,67±1,89 b
H ₂₀	0±0,00	0±0,00	9,33±6,80 b-d	58,67±4,99 de	84,00±6,53 bc	92,00±3,27 bc	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₂₅	0±0,00	0±0,00	29,33±6,80 b	96,00±4,99 ab	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₃₀	0±0,00	0±0,00	9,33±8,22 b-d	36,00±3,27 e	68,00±3,27 d	97,33±1,89 ab	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₃₅	0±0,00	0±0,00	6,67±3,77 cd	64,00±3,27 cd	82,67±4,99 c	86,67±4,99 cd	90,67±3,77 b	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₄₀	0±0,00	0±0,00	22,67±3,77 b	34,67±1,89 ef	57,33±1,89 de	64,00±3,27 e	88,00±3,27 bc	93,33±1,89 b	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₄₅	0±0,00	0±0,00	14,67±4,99 bc	98,67±1,89 a	98,67±1,89 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a
H ₅₀	0±0,00	0±0,00	6,67±1,89 cd	89,33±4,99 ab	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a	100±0,00 a

ANOVA, Tukeyho test $\alpha < 0,05$: 3. den (F=35985; df=13, 28; P=0,0000); 4. den (F=81131; df=13, 28; P=0,0000); 5. den (F=248,6; df= 13, 28; P =0,0000); 6. den (F=163,18; df=13, 28; P =0,000); 7. den (F=282,94; df=13, 28; P =0,0000); 8. den (F=345,57; df= 13, 28; P =0,0000); 9. den (F=728,00; df=13, 28; P =0,0000); 10. den (F=583,35; df=13, 28; P =0,0000)

Hodnocení vývoje nákazy za využití stupnice FDI

První příznaky nákazy dle stupnice FDI byly pozorovány u všech pasáží v rozmezí 0,11–0,45, zatímco oba původní izoláty, tj. izolát 172 a 173, dosáhly shodně průměrné hodnoty indexu 0,50. Druhý den hodnocení pak byla zjištěna průměrná hodnota indexu 0,50 zjištěna u všech variant. Podíváme-li se stejným způsobem na průběh nákazy jako na průběhu mortality nejprve na hodnocení vývoje nákazy u larev ošetřených suspenzí konidií kultur získaných pasážováním přes *B. tabaci*, *A. gossypii* a *T. urticae*, pak zjistíme, že průběh vývoje nákazy larev v případě kultur získaných pasážováním přes *B. tabaci* (H₁₀, H₃₅) a *A. gossypii* (H₁₅, H₄₀) dosáhl v případě pasáží H₁₀ a H₁₅ 5. den průměrné hodnoty indexu 0,90, resp. 1,15 oproti průměrné hodnotě indexu 1,73 u původního izolátu 172. Desátý den hodnocení pak dosáhly průměrné hodnoty indexu u pasáže H₁₀ hodnoty 2,43, u pasáže H₁₅ pak hodnoty 2,65, zatímco u původního izolátu bylo dosaženo průměrné hodnoty indexu 2,92. Pro pasáže H₃₅ a H₄₀ byly zjištěny průměrné hodnoty indexu 5. den 1,73, resp. 1,25, zatímco původní izolát 173 vykázal hodnotu indexu vývoje nákazy 2,12. Poslední den hodnocení, tedy 10. Den, bylo dosaženo shodných hodnot indexu v případě pasáže H₄₀ a původního izolátu 173, a to sice hodnoty 3,00, nicméně tato hodnota byla zjištěna v obou případech již předchozí, tedy 9. den hodnocení. V případě pasáže H₃₅ bylo dosaženo průměrné hodnoty indexu vývoje nákazy nižší oproti oběma předchozím uvedeným hodnotám, a to sice hodnoty 2,89. Co se týká pasáží H₂₀ a H₄₅, tedy pasáží přes *T. urticae*, byl zaznamenán vývoj nákazy od 4. dne hodnocení rychlejší, než v případě pasáží přes *B. tabaci* a *A. gossypii* obou původních izolátů. Pátý den hodnocení byly u pasáží H₂₀ a H₄₅ zjištěny průměrné hodnoty indexu vývoje nákazy 1,64, resp. 2,25. Devátý den byla pro pasáže H₂₀ a H₄₅ zjištěna hodnota indexu shodně 3,00.

Pokud se podíváme na průběh indexu vývoje nákazy v případech, kde jako medium pro pasážování bylo použito otrub, tedy pasáže H₅ a H₃₀, byla zjištěna 5. den průměrná hodnota indexu vývoje nákazy 2,41, resp. 1,39. Již 7. den dosáhla hodnota indexu vývoje nákazy u pasáže H₅ 3,00, zatímco hodnota indexu vývoje nákazy u pasáže H₃₀ dosáhla hodnoty 2,99 až 10. den hodnocení. V případě pasáží H₂₅ a H₅₀, kde jako kultivační medium bylo použito PDA, bylo 5. den hodnocení dosaženo hodnoty indexu vývoje nákazy 2,35, resp. 2,07. Zatímco pro pasáž H₂₅ byla zaznamenána hodnota indexu vývoje nákazy 3,00 již 8. den hodnocení, pak pro pasáž H₃₀ bylo dosaženo této stejné hodnoty den následující, tedy 9.

Co se týká průběhu nákazy pozorované u referenčního kmene PFR-97, byly první příznaky pozorovány již 1. den hodnocení, kdy index vývoje nákazy dosáhl hodnoty 0,50. Pátý den hodnocení pak byla zjištěna hodnota 2,56 a již 8. den pak hodnota indexu vývoje nákazy 3,00. V kontrolní variantě byly první příznaky (v tomto případě mortality) pozorovány 4. den, 5. den bylo pak dosaženo hodnoty indexu vývoje nákazy 0,03, a poslední den hodnocení pak hodnoty 0,25.

Pokud budeme porovnávat průběh nákazy prostým dosažením „kritické“ hodnoty FDI 1,50, pak v případě původních izolátů 172 a 173 bylo této hodnoty dosaženo mezi 4. a 5. dnem, resp. mezi 3. a 4. dnem hodnocení. V případě pasáží přes *B. tabaci* (H₁₀, H₃₅), *A. gossypii* (H₁₅, H₄₀) a *T. urticae* (H₂₀, H₄₅), bylo dosažení hodnoty 1,50 zjištěno mezi 6. a 7. dnem v případě pasáže H₁₀, mezi 5. a 6. dnem v případě pasáže H₁₅ a mezi 4. a 5. dnem v případě pasáže H₂₀. Co se týče pasáží původního izolátu 173, bylo dosažení kritické hodnoty 1,50 pozorováno mezi 4. a 5. dnem v případě pasáže H₃₅, mezi 3. a 4. dnem v případě

pasáže H₄₀ a mezi 3. a 4. dnem v případě pasáže H₅₀. U pasáží H₅ a H₃₀, tedy pasáží, kde jako medium pro pasážování sloužily otruby, byla hodnota indexu vývoje nákazy 1,50 dosažena mezi 3. a 4. dnem, resp. mezi 5. a 6. dnem. V případě pasáží kde jako medium pro pasážování sloužilo PDA, tedy pasáží H₂₅ a H₅₀, bylo hodnoty indexu vývoje 1,50 dosaženo shodně v obou případech mezi 3. a 4. dnem.

Tabulka 5.16: Vývoj nákazy na larvách *G. mellonella* v průběhu 10denního biotestu vyjádřený pomocí stupnice FDI po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	Den									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,08	0,03±0,12	0,09±0,21	0,16±0,31	0,20±0,34	0,21±0,35	0,25±0,38
PFR-97	0,50±0,00	0,50±0,00	1,45±0,22	1,95±0,20	2,56±0,26	2,95±0,15	2,99±0,08	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00
172	0,50±0,00	0,50±0,00	0,56±0,20	1,19±0,58	1,73±0,48	2,01±0,19	2,27±0,27	2,66±0,26	2,81±0,24	2,92±0,18
173	0,50±0,00	0,50±0,00	0,71±0,39	1,58±0,57	2,12±0,30	2,59±0,32	2,84±0,23	2,95±0,15	3,00±0,00	3,00±0,00
H ₅	0,45±0,15	0,50±0,00	1,25±0,46	1,87±0,32	2,41±0,21	2,83±0,24	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00
H ₁₀	0,19±0,24	0,50±0,00	0,54±0,20	0,62±0,32	0,90±0,57	1,30±0,74	1,69±0,71	2,07±0,86	2,41±0,84	2,43±0,83
H ₁₅	0,27±0,25	0,50±0,00	0,51±0,11	0,83±0,47	1,15±0,68	1,72±0,68	2,07±0,76	2,58±0,74	2,63±0,72	2,65±0,71
H ₂₀	0,11±0,20	0,50±0,00	0,59±0,28	1,12±0,53	1,64±0,57	2,11±0,61	2,63±0,41	2,96±0,14	3,00±0,00	3,00±0,00
H ₂₅	0,43±0,17	0,50±0,00	0,77±0,44	1,77±0,35	2,35±0,27	2,75±0,25	2,97±0,12	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00
H ₃₀	0,05±0,15	0,50±0,00	0,59±0,29	0,88±0,52	1,39±0,66	1,88±0,34	2,33±0,30	2,67±0,31	2,95±0,15	2,99±0,08
H ₃₅	0,37±0,22	0,50±0,00	0,57±0,25	1,21±0,56	1,73±0,65	1,95±0,69	2,34±0,69	2,69±0,51	2,81±0,47	2,89±0,30
H ₄₀	0,35±0,12	0,50±0,00	0,64±0,36	0,87±0,41	1,25±0,52	1,46±0,56	2,31±0,46	2,73±0,51	3,00±0,00	3,00±0,00
H ₄₅	0,21±0,25	0,50±0,00	0,65±0,35	1,75±0,33	2,25±0,37	2,69±0,34	2,83±0,27	2,98±0,10	3,00±0,00	3,00±0,00
H ₅₀	0,44±0,16	0,50±0,00	0,57±0,25	1,57±0,44	2,07±0,23	2,31±0,35	2,69±0,28	2,88±0,21	3,00±0,00	3,00±0,00

Tabulka 5.17: Vícenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *G. mellonella* 1. a 2. den po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	1. den ^a													2. den ^b														
	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀
kontrola	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
PFR-97	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
172	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
173	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₅	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₀	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₅	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****
H ₂₀	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****
H ₂₅	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****
H ₃₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****
H ₃₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****
H ₄₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****
H ₄₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****
H ₅₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=541,0076, P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=1049,0000, P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Tabulka 5.18: Vicenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *G. mellonella* 3. a 4. den po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	3. den ^a													4. den ^b														
	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀
kontrola	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
PFR-97	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
172	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
173	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₅	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₀	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₅	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****
H ₂₀	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****
H ₂₅	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****
H ₃₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****
H ₃₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****
H ₄₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****
H ₄₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****
H ₅₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=711,5906, P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=671,6871, P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Tabulka 5.19: Vicenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *G. mellonella* 5. a 6. den po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	5. den ^a													6. den ^b														
	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀
kontrola	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
PFR-97	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
172	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
173	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₅	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₀	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₅	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****
H ₂₀	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****
H ₂₅	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****
H ₃₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****
H ₃₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****
H ₄₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****
H ₄₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****
H ₅₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=728,7873$, $P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=780,8218$, $P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Tabulka 5.20: Vícenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *G. mellonella* 7. a 8. den po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	7. den ^a													8. den ^b														
	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀
kontrola	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
PFR-97	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
172	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
173	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₅	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₀	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₅	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****
H ₂₀	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****
H ₂₅	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****
H ₃₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****
H ₃₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****
H ₄₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****
H ₄₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****
H ₅₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=763,8638, P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=602,8000, P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

Tabulka 5.21: Vícenásobné porovnání průměrných hodnot FDI, které bylo stanoveno při hodnocení larev *G. mellonella* 9. a 10. den po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	9. den ^a													10. den ^b															
	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀	kontrola	PFR 97	172	173	H ₅	H ₁₀	H ₁₅	H ₂₀	H ₂₅	H ₃₀	H ₃₅	H ₄₀	H ₄₅	H ₅₀	
kontrola	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
PFR-97	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
172	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
173	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₅	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₀	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****
H ₁₅	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****
H ₂₀	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****
H ₂₅	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****
H ₃₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****
H ₃₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****
H ₄₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****
H ₄₅	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****
H ₅₀	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****		****

^aKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=639,7183, P=0,000$; ^bKruskal-Wallisův test: $H_{(13, N=1050)}=680,3638, P=0,000$

****Není signifikantní rozdíl mezi variantami; *** Je signifikantní rozdíl mezi variantami

6. DISKUSE

K tomu, aby byla nějaká metoda hodnocení prakticky využitelná, musí být opakovatelná a spolehlivá v určení patogenity, ale zejména virulence. V průběhu hodnocení může dojít k variabilitě zjištěných výsledků a z toho důvodu je důležitá detailní standardizace každé součásti hodnocení (Burges, Thompson 1971). Nicméně je zároveň důležité, aby byl standardní pokus přizpůsobivý a umožňoval hodnocení vlivů ekologických a biologických faktorů působících na virulenci patogena (Casadewall, Pirofski 2001). Z toho důvodu bylo v předkládané práci ověřováno univerzální použití stupnice hodnocení FDI, která byla testována s několika druhy entomopatogenních hub na třech druzích cílových organismů. Hodnocení zahrnovalo nejen účinnost izolátů na cílového škůdce, ale zejména jejich vývoj, životnost a potenciál pro další šíření. Standardizované metody musejí být dostatečně všestranné, aby dokázaly reagovat na různé hypotézy spojené s ekologií interakce hostitel – houba v rámci jednoho druhu i mezi různými druhy hostitelů (Hesketh et al. 2008).

Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

V průběhu plošného monitoringu prováděného v Národním parku Šumava bylo získáno velké množství izolátů hub *B. bassiana* a *B. caledonica*. Pro účely hodnocení jejich účinnosti bylo vybráno 40 izolátů druhu *B. bassiana* a 24 izolátů druhu *B. caledonica*, se kterými byly provedeny standardní testy. Jako cílový organismus pro hodnocení virulence a infekčnosti spor obou druhů hub rodu *Beauveria* byl vybrán potemník moučný (*T. molitor*), jehož larvy mají částečně sklerotizovanou kutikulu a jsou na nich dobře patrné změny související s vývojem houbové infekce.

Jako součást standardního postupu bylo před zahájením testu virulence provedeno hodnocení klíčivosti, jejíž hodnoty byly u druhu *B. bassiana* velmi vyrovnané a po 24 hodinách se pohybovaly v rozmezí 91,33–99,67 %. Na rozdíl od toho, u druhu *B. caledonica* byla klíčivost velmi rozkolísaná. Ty nejlepší izoláty dosáhly klíčivosti 91,67–93,67 %, naopak ty nejhorší dosahovaly klíčivosti pouze 25,67 %. Odlišnosti izolátů v rychlosti klíčení uvádějí i Talaei-Hassanloui et al. (2006), kteří zjistili, že doba potřebná pro vyklíčení poloviny spor *B. bassiana* GT_{50} se pohybovala v rozmezí 11 až 21 hodin. Stejně jako klíčivost, tak i vývoj spor byl pomalejší u druhu *B. caledonica*, kdy spory jednotlivých izolátů dosáhly hodnoty GI 0,36–1,46, na rozdíl od *B. bassiana*, u které byl vývoj spor téměř na úrovni hodnoty 2, což znamená, že již byly vytvořeny dlouhé klíční hyfy. Při hodnocení klíčivosti hraje roli řada faktorů. Houba *B. bassiana* má velmi široké rozmezí teplot vhodných pro růst, které se pohybuje od 23 do 28 °C (Jaronski 2010), optimum je uváděno kolem 25 °C (Inglis et al. 2001), kde je prokazatelně vyšší klíčivost než ve 20 °C (Talaei-Hassanloui et al. 2006). Přesto při hodnocení klíčivosti velmi záleží nejen na zvolené teplotě (Liu et al. 2003), ale i na izolátu houby (Kassa et al. 2003). Rychlá klíčivost spor a růst hyf jsou extrémně důležité pro úspěšnou infekci, protože vhodné podmínky nemusí trvat dlouho (Liu et al. 2003), přesto Talaei-Hassanloui et al. (2006) nezjistili mezi rychlostí klíčení a následnou

virulenci pozitivní korelaci, když se nejrychleji klíčící izolát *B. bassiana* nakonec projevil jako málo virulentní.

Virulence izolátů byla v této studii zásadním ukazatelem odlišností mezi hodnocenými druhy a izoláty. Zatímco Liu et al. (2003) zjistili, že u konidií různých izolátů *B. bassiana* jsou prokazatelné rozdíly ve velikosti a virulence s ní pozitivně koreluje, Talaei-Hassanloui et al. (2006) naopak uvádějí, že nebyla pozorována žádná korelace mezi velikostí konidií a virulencí houby *B. bassiana*, ale výrazný pozitivní vliv na virulenci měla schopnost izolátu okyselovat tekuté médium. Obecně je uváděno, že účinnost izolátu závisí rovněž na použité koncentraci inokula, která byla v našem případě 1×10^7 spor/ml, ovšem Wraight et al. (2009) zjistili, že u neúčinnějších izolátů se nedalo říci, že by korelace mezi účinností a LC_{50} byla trvale negativní nebo pozitivní a navíc se lišila v závislosti na použitém izolátu.

První částí hodnocení virulence bylo určení mortality larev. Ta se začala u obou druhů *B. bassiana* i *B. caledonica* objevovat 3. den od zahájení biotestu. U houby *B. bassiana* to bylo u 7 izolátů v rozmezí 4,17–16,67 %, kdy nejvyšší hodnoty bylo dosaženo s izolátem NP0138, u druhu *B. caledonica* u 3 izolátů v rozmezí 4,17–8,33 % (nejvyšší NP0192). Postup mortality larev byl značně rychlejší u druhu *B. bassiana*, kdy izoláty NP0138 a NP0027 způsobily mortalitu 79,17 % a 66,67 %, zatímco u druhu *B. caledonica* byla maximální hodnota u izolátu NP0227 pouhých 20,83 %. Zatímco u druhu *B. bassiana* byl po 5 dnech pouze jediný izolát (NP0133), který nevyvolal mortalitu na cílovém organismu a naopak 4 izoláty dosáhly 100% mortality larev (I101, NP0008, NP0027 a NP0138), u druhu *B. caledonica* byla mortalita vyvolána 14 izoláty a nejvyšší hodnota byla 37,5 % (NP0227) a 9 izolátů dosud nezpůsobilo žádnou mortalitu. Od 7. dne byla mortalita pozorována již u všech hodnocených izolátů obou druhů hub, u *B. bassiana* již nebyly zjištěny prokazatelné rozdíly mezi testovanými izoláty a hodnoty se pohybovaly v rozmezí 54,17–100 % (u 12 izolátů byla zjištěna 100% mortalita larev), u druhu *B. caledonica* to bylo 12,50–91,67 % (nejvyšší hodnota byla zjištěna u izolátu NP0145). Osmý den hodnocení byla mortalita vyvolaná izoláty *B. bassiana* již u více než poloviny testovaných izolátů (22 izolátů) 100%, nejnižší hodnota byla 79,17 %, 9. a 10. den byla mortalita 87,5–100 %. U druhu *B. caledonica* dosáhl 8. den 100% mortality izolát NP0145 a ostatní hodnoty byly v rozmezí 20,83–95,83 %, 9. a 10. den 100% mortalitu vykazovaly ještě izoláty NP0230 a NP0242 a u ostatních se rozmezí hodnot téměř nezměnilo (29,17–95,83 %). Hodnoty zjištěné s druhem *B. caledonica* více korespondují se zjištěními Santora et al. (2008), kteří aplikovali *B. bassiana* na dospělce potemníka stájového (*Alphitobius diaerinus*) a během 10 dnů dosáhli mortality 42–71 %. V účinnosti může hrát roli i různá vnímavost hostitele na infekci houbou *B. bassiana*, jak zjistili Quesada-Moraga et al. (2006) na nymfách molice bavlníkové (*B. tabaci*), kde bylo s koncentrací 1×10^7 spor/ml dosaženo mortality 3–78 % po 8 dnech, zatímco u molice skleníkové (*T. vaporariorum*) to bylo 40–85 %. Při aplikaci houby *B. bassiana* v polních podmínkách byla po dvou dnech po aplikaci a následné inkubaci v laboratoři zjištěna mykóza na 33–80 % dospělců a 36–53 % nymf klopušek *L. lineolaris*. Přestože v laboratoři byla u 1 izolátu vyšší patogenity, nebyly v polních pokusech zjištěny trvalé odlišnosti. V polních podmínkách se navíc může stát, že infekce nemusí vést až k mortalitě hostitele (Leland, McGuire 2006). V našich pokusech obecně vykazovaly rychlejší průběh mortality izoláty získané z dospělců lýkožrouta smrkového *Ips typographus* jak u druhu *B. bassiana*, tak u druhu *B. caledonica*, kde byl jedinou výjimkou izolát NP0230

získaný z kůry. Ale např. Talaei-Hassanloui et al. (2006) uvádějí, že u zápředníčka polního (*Plutella xylostella*) vyvolal nejvyšší virulenci izolát získaný z půdy, zatímco u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) se jednalo o izolát získaný z dospělé mýry.

Když se začíná projevovat infekce přirozenou cestou, vstupují v časné fázi penetrace přes integument hostitele enzymy degradující kutikulu, zatímco toxiny se začínají objevovat později, až když houba roste v hemolymfě (Fuguet, Vey 2004). Průběh infekce vykazoval víceméně stejnou tendenci jako průběh mortality, ovšem hodnoty byly nižší a u druhu *B. caledonica* se začala infekce, na rozdíl od mortality, objevovat až 4. den u 2 izolátů. U druhu *B. bassiana* vykazoval na počátku hodnocení prokazatelně nejvyšší hodnoty izolát NP0138 (75 %), a dále pak izolát NP0027 (62,50 %), ovšem na rozdíl od mortality byly nulové hodnoty zjištěny u 23 izolátů. V případě ostatních testovaných izolátů se hodnoty infekce larev pohybovaly v rozmezí 4,17–50 %. U *B. caledonica* byly hodnoty v rozmezí 4,17–12,5 %. 5. den bylo u *B. bassiana* 6 izolátů, které nevyvolaly žádnou infekci, naopak 3 (I101, NP0027 a NP0138) způsobily již 100% infekci larev, ostatní hodnoty se pohybovaly v rozmezí 4,17–83,33 %. U *B. caledonica* vyvolaly 3 izoláty infekci v rozmezí 4,17–20,88 %, nejvyšší hodnoty byly po 8 dnů dosahovány po aplikaci izolátu NP0227. Po 6 dnech 3 izoláty *B. bassiana* NP0003, NP0133 a NP0238 dosud nevyvolaly pozorovatelné známky infekce, naopak u 4 izolátů byla infekce 100% (I101, NP0008, NP0027 a NP0138). Ostatní hodnoty byly v rozmezí 4,17–91,67 %. U *B. caledonica* bylo pouze 8 izolátů, u kterých šlo určit zjevné příznaky infekce a hodnoty byly v rozmezí 4,17–29,17 %. 7. den byla infekce larev pozorována již pro všechny testované izoláty *B. bassiana* a 23 z 24 izolátů *B. caledonica*, kde u 7 izolátů *B. bassiana* byly pozorovány zjevné znaky infekce u 100 % případů, zatímco u *B. caledonica* se hodnoty pohybovaly mezi 4,17 a 54,17 %. Hodnoty infekce byly 8. den v rozmezí 62,5–100 %, kdy 13 izolátů dosáhlo 100% mortality larev, u *B. caledonica* v rozmezí 4,17–62,5 %. Devátý a 10. den se zjištěná infekce larev *B. bassiana* pohybovala v rozmezí 83,3–100 %, kde 9. den 21 izolátů a 10. den 24 izolátů dosáhlo 100% infekce larev. U larev ošetřených izoláty *B. caledonica* byla zjištěna 100% infekce po 10 dnech pouze u 2 izolátů (NP0230 a NP0242).

Pro podrobné hodnocení vývoje houby v larvách *T. molitor* a na jejich povrchu byla použita stupnice FDI, kterou vytvořili Osborne a Landa (1992). Jako první příznak infekce houbovým patogenem se začínají objevovat melanizační skvrny na kutikule hostitele, které se u našich izolátů *B. bassiana* projevily již v prvním dni hodnocení ve 25 případech, u izolátů *B. caledonica* pak 2. den u 21 izolátů. To odpovídá i zjištění Fuguet a Vey (2004), v jejichž pokusech se melanizace začala na larvách *G. mellonella* objevovat po 48–72 hodinách po inokulaci. Navíc zjistili, že většina izolátů způsobila rychlou a intenzivní melanizaci kutikuly a integumentu, ale například dva izoláty získané z *Ostrinia nubilalis* způsobily velmi slabou nebo vůbec žádnou melanizaci. Mezi izoláty *B. bassiana* se vyskytují prokazatelné odlišnosti ve vzorech a intenzitě melanizace. Podle zjištění Quesada-Moragy et al. (2006) produkovaly všechny izoláty *B. bassiana* neidentifikovatelný pigment, který barvil většinu infikovaných nymf *B. tabaci* a *T. vaporariorum* různě intenzivně do červena. Průběh vývoje nákazy v našem hodnocení byl rychlejší u *B. bassiana*, u které byl průměr FDI v prvních 4 dnech od 0,02 až po hodnotu 1 a vyšší dosaženou u 3 izolátů (I101 – 1,00; NP0027 – 1,23; NP0138 – 1,31), zatímco u *B. caledonica* to bylo od 0,02 po nejvyšší hodnotu 0,56 (NP0227). Pátý den byl nejrychlejší vývoj nákazy zaznamenán po ošetření izoláty *B. bassiana* NP0027 a NP0138,

konkrétně hodnoty indexu 1,85, resp. 1,96, tzn. že tělo hostitele bylo již pokryto hustou sítí mycelia, hostitel je usmrčen a houba zahajuje saprotrofní část vývoje (Zimmermann 2007a). Dále izoláty I101 a NP0238 dosáhly hodnoty 1,63, resp. 1,69, a překročily hodnotu indexu 1,50, což je průměrná hodnota vyjadřující průběh nákazy, kdy lze pozorovat první myceliální vlákna na povrchu těla hostitele, je nevratná a hmyz už se z infekce nedokáže zotavit (Landa et al. 1994). Zatímco 6. den u druhu *B. caledonica* dosáhlo 16 izolátů hodnoty FDI vyšší než 0,5, žádný z nich se nedostal na úroveň indexu 1,0. Na rozdíl od toho izoláty *B. bassiana* již 6. den vykazovalo 7 izolátů hodnoty vyšší než 2,0, izolát NP0027 dosáhl průměru 2,5, ostatní 0,5–2,5. U více než poloviny izolátů *B. bassiana* (22 izolátů) byla kritická hranice 1,5 překročena 7. den, 8. den to pak bylo již 38 izolátů. 9. den vykazovalo 27 izolátů sporující mycelium. V průběhu celého hodnocení nebylo dosaženo průměrné hodnoty indexu 3,00 (plná sporulace), 17 z testovaných izolátů dosáhlo hodnoty indexu 2,50–2,69 (nejvyšší hodnota byla zjištěna u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu NP0008). U *B. caledonica* byla hranice 1,5 dosažena 4 izoláty až 9. den, 10. den se pak jednalo celkem o 14 z celkových 24 izolátů. K růstu hyf a sporulaci houby *B. bassiana* dochází obvykle post mortem, mycelium rychle pokryje mrtvé tělo hostitele a rozšíří se několik mm po okolí (Quesada-Moraga et al. 2006). Saprophytickou fázi vývoje patogena ukončuje úplná sporulace vzniklého mycelia (Osborne, Landa 1992), což označuje index FDI 2,5–3,0. Množství spor nově vzniklých na kadaverech dospělců může být velmi odlišné a není přímo úměrné použité koncentraci inokula, což může být způsobeno individuálními charakteristikami každého izolátu a genetickou variabilitou entomopatogenních hub (Santoro et al. 2008). Izoláty *B. bassiana* se mohou v době sporulace chovat různě. Např. na termitech *Coptotermes formosanus* docházelo buď k celkově vysoké sporulaci, která se však objevila až po 11 dnech, nebo rychlé, ale zase nízké sporulaci vyskytující se po 2 až 3 dnech (Sun et al. 2002). Stejně tak izoláty více patogenické vůči klopouškám *Lygus lineolaris* následně vykazovaly nižší sporulaci na kadaverech (Leland et al. 2005). Izoláty, které nejsou schopné po usmrcení hostitele produkovat konidie, nejsou ani schopny udržet míru infekce (McGuire et al. 2005). V průběhu testů nebyla zjištěna pozitivní korelace mezi myceliálním růstem a virulencí. A ani původní hostitel, ze kterého byl izolát získán, není spolehlivý indikátor virulence specifického izolátu ke specifickému hostiteli (Talaie-Hassanloui et al. 2006).

Kvůli velkým rozdílům v hostitelské specifitě a variabilitě izolátů ve virulenci je identifikace vlastností, které mohou hrát důležitou roli v infektivitě a virulenci, cenná pro porozumění patogenitě a výběru izolátů vhodných pro biologickou ochranu (Talaie-Hassanloui et al. 2006). Velké rozdíly jsou patrné při pohledu na výsledky hodnocení jednotlivých izolátů 2 testovaných druhů entomopatogenních hub a můžeme snadno zjistit, že u izolátů *B. bassiana* jsme mohli obecně pozorovat mnohem rychlejší nástup mortality a zároveň i její průběh, to samé se týká také infekce larev a vývoj houbového patogena na jejich povrchu.

Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor*

Mitosporické houby jsou schopné masové produkce, obvykle jako povrchové kultury, ze kterých se získávají vzdušné konidie, ale také fermentace v tekutých médiích, kterou se získávají blastospory, nebo méně často i konidie (Goettel, Inglis 1997; Milner 1997). V následující studii byly porovnávány rozdíly mezi dvěma typy produkčních spor houby *B. bassiana* – vzdušnými konidiami a blastosporami. U blastospor byly navíc připraveny dvě varianty, kdy jedna byla pouze odebrána z kultivačního média a druhá byla důkladně vymyta, aby v suspenzi nezbyly žádné zbytky živného média. Produkci biomasy konidií, resp. blastospor, pomocí velkokapacitních biotechnologií umožňuje statut fakultativních parazitů, což je základní technologický předpoklad pro vývoj a tržní realizaci standardního biopreparátu (Landa 1998). Zatímco Vandenberg et al. (1998) vidí výhodu blastospor v tom, že mohou být produkovány ve velkých množstvích a mnohem rychleji než vzdušné konidie, Wraight et al. (2001) naopak považují produkci blastospor a dalších propagulí ze submerzní kultivace za méně efektivní než produkci vzdušných konidií.

Základním ukazatelem vitality je hodnocení klíčivosti, při němž vykazovaly blastospory rychlejší vývoj než konidie bez ohledu na to, zda byly po ukončení kultivace vymyté či nevymyté. Vandenberg et al. (1998) uvádí, že klíčivost čerstvých blastospor a konidií *I. fumosorosea* byla srovnatelná a nižších hodnot bylo dosaženo pouze u usušených blastospor. Na klíčivost blastospor mají ovšem výrazný vliv okolní podmínky, kdy např. vodní stres nebo nižší obsah proteinů snižuje klíčivost blastospor houby *M. anisopliae* až na 8 % oproti původním 89 % (Ypsilos, Magan 2005), konidie jsou díky svým silnějším stěnám odolnější a mají schopnost vydržet v širokém rozpětí podmínek prostředí (Daoust, Roberts 1983). V našich pokusech byla nejvyšší klíčivost po 6 hodinách zjištěna u nevymytých blastospor, po 12 hodinách již byly hodnoty u vymytých a nevymytých blastospor srovnatelné a po ukončení kultivace byly srovnatelné všechny hodnoty u všech testovaných variant 98,33–99 %. Stejně jako samotná klíčivost, byl i stanovený index vývoje (GI) na počátku hodnocení konidií nižší než u blastospor. Po 16 hodinách však byly hodnoty u obou typů spor srovnatelné a index po 24 hodinách se pohyboval v rozmezí 1,95–1,98. Účinnost houbových bioagens je vysoce závislá na rychlosti klíčení, zejména v nižší vlhkosti prostředí (<95%), kdy se klíčivost zpomaluje nebo se úplně zastaví. Proto je důležité produkovat spory ve vhodném médiu, které dokáže zvyšovat účinnost houby i v ne úplně optimálních podmínkách (Ypsilos, Magan 2005).

Při hodnocení virulence jednotlivých druhů spor byly zjištěny výrazné rozdíly mezi jednotlivými použitými koncentracemi – 1×10^5 spor/ml, 1×10^6 spor/ml a 1×10^7 spor/ml. Obecně se se zvyšující koncentrací zvyšuje i rychlost mortality (Hicks et al. 2001; Tefera, Pringle 2003b). Nejvíce patrné rozdíly mezi hodnocenými typy spor byly zjištěny při testování nejnižší koncentrace, směrem ke zvyšující se koncentraci se rozdíly zmenšovaly. Při vyšších koncentracích (1×10^7 a 1×10^8 spor/ml) se však výrazně zvyšují i odlišnosti mezi izoláty (Cherry et al. 2005). Ačkoli v morfologii blastospor mohou být velmi výrazné odlišnosti, nemají vliv na mortalitu hostitele, jak uvádí Vidal et al. (1998b) na houbě *I. fumosorosea*. První mrtví jedinci se začaly objevovat 4., resp. 3. den, kdy nerychlejší průběh mortality byl zaznamenán po aplikaci koncentrace 1×10^7 spor/ml, konkrétně nejvyšší

mortalitu u dvou nižších koncentrací vyvolaly vzdušné konidie, zatímco u nejvyšší koncentrace to byly oba typy blastospor. Ovšem mezi výsledky většinou nebyly zjištěny průkazné odlišnosti. Téměř shodnou účinnost konidií a blastospor houby *I. fumosorosea* na mšici zhoubnou (*Diuraphis noxia*) zjistili i Vandenberg et al. (1998), kdy ve svých pokusech testovali nejen čerstvé blastospor, ale i blastospor sušené vzduchem nebo mrazem a porovnávali je s konidiami. Konidie houby *B. bassiana* jsou schopné vyvolat vysokou mortalitu larev *Panolis flammea* (sosnokaz borový) i při nízké koncentraci (Hicks et al. 2001). Výrazný vliv použité koncentrace konidií *B. bassiana* na mortalitu lýkožrouta smrkového popisují i Kreutz et al. (2004b). Zatímco u nižších koncentrací dosahovaly námi hodnocené varianty, kde byly použity blastospor vymyté ze submerzní kultury, nižších hodnot, u nejvyšší koncentrace to byly konidie, které vykazovaly pomalejší vývoj. U koncentrace 1×10^5 spor/ml se nejnižší hodnoty mortality udržely až do konce biotestu u variant s vymytými blastosporami. Při použití koncentrace 1×10^6 spor/ml byly rozdíly v mortalitě pouze v termínu dosažení 100% mortality, kdy nejrychleji této hodnoty dosáhly konidie (7 dnů), následovaly nevymyté blastospor (8 dnů) a poslední byly vymyté blastospor, které sice nevyvolaly 100% mortalitu ani do ukončení hodnocení, nicméně hodnota 97,33 % byla 10. den srovnatelná se zbylými dvěma variantami. Při porovnání hodnot u nejvyšší koncentrace byly rozdíly velmi malé a statistická odlišnost byla zjištěna pouze 6. den biotestu, kdy vymyté blastospor vykazovaly 100% mortalitu, zatímco konidie vyvolaly 96% a nevymyté blastospor 97,33% mortalitu hostitele. V ostatních dnech byly hodnoty statisticky srovnatelné. Kim a Kim (2008) zjistili rozdíly mezi účinností blastospor a konidií použitých proti *A. gossypii* u několika druhů entomopatogenních hub, kdy v LT_{50} bylo nižších hodnot dosaženo po použití konidií (srovnání hub *L. attenuatum*, *B. bassiana* a *I. fumosorosea*), naopak při hodnocení mortality byly vyšší hodnoty pozorovány po použití blastospor druhů *I. tenuipes* a *I. fumosorosea* než po aplikaci konidií.

Podobně jako mortalita probíhala i infekce, která byla u koncentrace 1×10^5 spor/ml poprvé pozorována po aplikaci vzdušných konidií 5. den biotestu, naopak nejnižších hodnot bylo dosaženo v průběhu celého hodnocení u larev ošetřených suspenzí blastospor vymytých ze submerzního media, které po 10denní inkubaci dosáhly hodnoty infekce 66,67 %, na rozdíl od 94,67% infekce dosažené po použití konidií. Poslední den byly hodnoty infekce na larvách u varianty s konidiami a s nevymytými blastosporami statisticky shodné. Stejně tak u koncentrace 1×10^6 spor/ml bylo nejnižších hodnot v obou ukazatelích dosahováno u blastospor vymytých. První příznaky infekce byly pozorovány 4. den u larev ošetřených suspenzí blastospor a 5. den při použití suspenze konidií. Konečná infekce se projevila u 97,33–100 % jedinců. Hodnoty u varianty s vymytými blastosporami se s předchozími dvěma statisticky vyrovnaly od 8. dne biotestu. Nejvyšší koncentrace ukázala rozdíly v hodnotě vyvolané infekce pouze 6. den, v ostatních dnech byly hodnoty srovnatelné. První infikování jedinci byli pozorováni 3. den u varianty ošetřené suspenzí konidií a vymytých blastospor.

Prvním příznakem infekce je objevení melanizačních skrvn na povrchu hostitele (Osborne, Landa 1992; Hicks et al. 2001; Fuguet, Vey 2004). Co se týká hodnocení vývoje na larvách *T. molitor*, tak u nejnižší koncentrace byly první příznaky vývoje nákazy (melanizační skvrny) dle stupnice FDI pozorovány shodně pro všechny testované varianty ošetření 3. den. Nejvyšší hodnoty indexu (2,26) ve vývoji nákazy dle stupnice FDI bylo dosaženo u larev

ošetřených suspenzí konidií, nejnižší (1,60) pak u larev ošetřených suspenzí vymytých blastospor. Hodnota indexu 1,50 byla dosažena u larev ošetřených suspenzí konidií mezi 7. a 8. dnem, u larev ošetřených suspenzí blastospor nevymytých a vymytých ze submerzního média pak 8. den, respektive mezi 9. a 10. dnem inkubace. U koncentrace 1×10^6 spor/ml vykazovaly hodnoty FDI jen malé rozdíly v průběhu celého testu, minimální rozdíly byly zejména mezi variantou ošetřenou suspenzí konidií a nevymytých blastospor, kdy na konci inkubace bylo dosaženo hodnoty FDI 2,84, resp. 2,75. U larev ošetřených suspenzí vymytých blastospor byl od 4. dne pozorován pomalejší rozvoj nákazy, kde na konci inkubace bylo dosaženo hodnoty 2,59 na stupnici FDI. Melanizační skvrny byly pozorovány již 2. den u všech variant ošetření larev suspenzemi spor. Hodnoty min. 1,5 bylo dosaženo 6. den u varianty s ošetřením larev suspenzí konidií a nevymytých blastospor a mezi 6. a 7. dnem po ošetření larev suspenzí vymytých blastospor. V rámci nejvyšší koncentrace se neprojevil rozdíl mezi jednotlivými variantami. První melanizační skvrny byly zjištěny u všech testovaných variant již 2. den. Indexu 1,50 bylo u všech tří variant dosaženo mezi 4. a 5. dnem. Po 10 dnech inkubace bylo dosaženo shodných hodnot 2,87 u varianty, kde pro ošetření larev byly použity suspenze konidií a blastospor vymytých z kultivačního média a hodnoty 2,86 u varianty, kde byly larvy ošetřeny suspenzí nevymytých blastospor. V pokusech nebyl zjištěn průměrný index 3, tzn. plná sporulace. Na sporulaci má vliv i metoda ošetření, kdy přímý postřik a namáčení vede k následné průměrné nebo nízké sporulaci (Tefera, Pringle 2003b).

V průběhu hodnocení se ukázalo, že klíčivost různých typů spor houby *B. bassiana* je srovnatelná. V případě virulence se ukázala závislost na použité koncentraci, kde při nízkých koncentracích dominovaly vzdušné konidie, naopak ve vysoké koncentraci to byly blastospory. Blastospory, které byly vymyté z původní submerzní kultury vykazovaly ve všech hodnoceních mírně nižší hodnoty než zbylé dvě varianty. Je tedy možné, že když nevymyté blastospory čerpají živiny ze zbytků kultivačního média, které na nich ulpívá.

Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů vybraných druhů entomopatogenních hub získaných odizolováním z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky *Myzus persicae*

Mšice, stejně tak jako mnoho dalších zástupců hmyzu živících se rostlinnými šťávami, mohou negativně ovlivňovat hostitelské rostliny jedním či více z následujících bodů: odběrem živin, přenosem patogenů, exkrecí toxinů či v neposlední řadě také vylučováním medovice (Encyklopedia of Entomology). Z těchto důvodů je snaha o efektivní eliminaci výskytu mšic v pěstovaných kulturách, kdy za vhodných podmínek pro vznik nákazy mohou entomopatogenní houby sehrát významnou roli v zamezení růstu populací mšic. Nicméně nejúspěšnější zástupci houbových patogenů v přirozeném prostředí mšic jsou rodu Entomophthorales, jejich masová produkce a formulace je však velmi obtížná a z tohoto důvodu byla většina úsilí zaměřena na zástupce oddělení Ascomycota, a to sice anamorfní rody *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* a *Lecanicillium* (Sordariomycetes: Hypocreales) (Jandricic et al. 2014).

Mortalita se začala u ošetřených jedinců vyskytovat již druhý den po aplikaci, kdy nejvyšší byla pozorována po aplikaci přípravku Mycotal (37,33 %), naopak nejnižší po

aplikaci přípravku Preferal (20 %). Již sedmý den od zahájení biotestu bylo dosaženo 100% mortality mšic *M. persicae*, což naznačuje, že mitosporické houby jsou schopné efektivně snižovat jejich populaci, ačkoli Steinkraus (2006) uvádí, že zdaleka nejsou tak běžné jako houby rodu Entomophthorales. Ovšem Chen et al. (2008) popisují druh *B. bassiana* jako jeden ze tří nejčastěji izolovaných z různých druhů mšic odchylených v Číně, ostatní dva druhy patřily do rodu Entomophthorales. Vu et al. (2007) testovali kmeny rodu *Lecanicillium* v podmínkách 25 °C a vzdušné vlhkosti vyšší než 90 % a čtyři z nich způsobily mortalitu *M. persicae* vyšší než 76,9 % již po 4 dnech, kdy kmen 41185 způsobil dokonce 100% mortalitu, zatímco u ostatních 3 kmenů se hodnota mortality pohybovala v rozmezí 76,9–80 %. V našich testech se po 4 dnech kumulovaná mortalita pohybovala v rozmezí 88,00–89,33 % v rámci testovaných izolátů. Maketon et al. (2013) uvádějí, že účinnost houby *B. bassiana* se projevuje různě na různé druhy mšic. Ovšem i přes velké rozdíly se způsobená mortalita pohybovala v rozmezí 80–90 %. Mortalita mšic může být ovlivněna i způsobem jejich chovu, jak uvádí Hesketh et al. (2008) na příkladu mšice makové (*A. phabae*), u které byla zaznamenána nižší mortalita po aplikaci suspenze spor na jedince chované na skleníkových rostlinách než u jedinců z laboratorních chovů. A dále je možné ji ovlivnit i použitou koncentrací spor, kdy u řady druhů entomopatogenních hub dochází k poklesu LT_{50} v závislosti na zvyšující se koncentraci spor.

Ačkoli v našich hodnoceních byla účinnost všech testovaných druhů entomopatogenních hub srovnatelná, Vu et al. (2007) zjistili nejvyšší virulenci proti *M. persicae* u druhu *L. lecanii*, následovala *B. bassiana*, *I. fumosorosea* a *M. anisopliae* prokázalo nejpomalejší průběh infekce. Kim a Kim (2008) zase uvádějí, že nejrychleji vyvolal mortalitu mezi mšicemi *A. gossypii* druh *L. attenuatum*, následovaly spory *I. fumosorosea* a nejpomaleji působil druh *B. bassiana*. Účinnost hub se ovšem výrazně lišila podle hostitelského druhu mšic. Naopak Al-alawi a Obeidat (2014) zjistili nejvyšší virulenci na *M. persicae* u houby *B. bassiana*, konkrétně u izolátu GHA, který je účinnou složkou produktu Botanigard. Některé druhy entomopatogenních hub mohou působit zároveň na hmyzí a houbové škůdce, jako např. Vertalec[®], který úplně eliminoval populaci mšic *A. gossypii* na okurce v průběhu 16 dnů a zároveň poskytl i ochranu proti padlí okurkovému. Ovšem aplikace byla opakována po třech dnech, aby byly zasaženy i nové populace (Kim et al. 2010).

Infekce se při hodnocení 2. den po aplikaci projevila pouze po použití přípravku Botanigard (6,67 %), 4. den už však mezi hodnotami u jednotlivých izolátů nebyl zjištěn statistický rozdíl. Hodnoty infekce byly srovnatelné v rozmezí 66,67–77,33 %. Sedmý den byla pozorována již u 98,67–100 % samiček. Shodné hodnoty se udržely také poslední (10.) den hodnocení, oproti kontrolní variantě, kde byla pozorována mortalita 17,33 %. Roditakis et al. (2008) pozorovali chování mšic po ošetření houbovými patogeny a zjistili, že v počáteční fázi infekce houbou *L. longisporum* se mšice výrazně více pohybují než jedinci v kontrolní variantě, do 4. dne po ošetření se normálně rozmnožují, ale před usmrcením ustávají v pohybu a produkci medovice, až nakonec po 6 dnech dojde ke 100% mortalitě. Obecně je projevem infekce zpomalování exkrece.

Použitím stupnice FDI pak získáme přehled o vývoji jednotlivých druhů, který je hodnotitelný již 2. den, kdy je prokazatelně nejvyšší index dosažen s izolátem přípravku Botanigard (0,35), izoláty získané z přípravků Preferal a Mycotal vykazují hodnoty FDI 0,2,

respektive 0,19. Čtvrtý den od ošetření je již u izolátů z přípravku Botanigard pozorován růst mycelia na povrchu hostitele (FDI 1,59), ostatní dva přípravky zatím dosahují hodnot 1,41 (Preferal) a 1,28 (Mycotal). Sedmý den od založení pokusu se na myceliu, které pokrývá celý povrch hostitele, začínají objevovat nové konidie, které jsou u jednotlivých druhů charakterizovány indexy 2,59 (Preferal), 2,49 (Botanigard) a 2,27 (Mycotal). Poslední kontrolní den dosáhla hodnota indexu FDI u izolátů přípravků Botanigard a Preferal shodné hodnoty 2,91, u izolátu přípravku Mycotal bylo dosaženo hodnoty FDI 2,69, v obou případech je na většině hodnocených jedinců zjištěno sporulující mycelium. Průměrný denní růst hyf je mnohem vyšší u vysoce virulentních izolátů než u těch málo virulentních, stejně tak je mnohem vyšší i produkce spor (Al-alawi a Obeidat 2014). O šíření patogena rozhodují různé faktory, které ho ovlivňují a je možné je rozdělit do čtyř kategorií – faktory spojené s hostitelem, s patogenem, rostlinou a prostředím. Různé druhy patogenů mají rovněž různou strategii infekce, šíření a přežívání, proto je důležité je zkoumat a porozumět jim. Jedná se o aktivní nebo pasivní šíření konidií, velikost konidií, jejich tvar, počet, mechanismus přichycení a přežívání (Steinkraus 2006).

Můžeme shrnout, že všechny hodnocené izoláty vykazaly vysokou virulenci vůči cílovému škůdci a pomocí stupnice FDI bylo možno spolehlivě popsat vývoj houby na cílových jedincích.

Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd obhospodařovaných konvenčním způsobem zemědělství

Hodnocené izoláty *M. anisopliae* byly získány v rámci monitoringu prováděného na orných půdách obhospodařovaných v konvenčním systému zemědělství. Pro účely hodnocení bylo vybráno osm izolátů, které v porovnání s ostatními izoláty vykazaly odlišnosti v morfologii středových kultur. Při výběru izolátů se vycházelo z předpokladu, že by se mezi izoláty s odlišnou morfologií mohla vyskytovat variabilita i v dalších znacích, jak uvádí De Croos a Bidochka (1999) a Talaei-Hassanloui et al. (2006), kteří popsali odlišnosti jak v morfologii, tak zároveň i v kvalitativních charakteristikách mezi izoláty hub *M. anisopliae* a *B. bassiana*. Rozdíly v morfologické struktuře u sledovaných izolátů *M. anisopliae* pravděpodobně souvisí i s faktem, že tento druh je tvořen komplexem 9 taxonů (Bischoff et al. 2009; Kepler, Rehner 2013). Z toho vyplývá, že námi hodnocené izoláty mohou odpovídat jednomu nebo několika genetickým klastrům nebo druhům v rámci komplexu *M. anisopliae* a některé ekologické a biologické ukazatele, které byly zjištěny, mohou mít specifickou souvislost s jednotlivým taxonem nebo druhem. Nicméně se nám podařilo prokázat, že ačkoli byly u středových kultur pozorovány výrazné morfologické odlišnosti, pouze dva z devíti testovaných izolátů vykazaly významné odlišnosti hodnocených charakteristik.

Již mnohokrát bylo potvrzeno, že druh *M. anisopliae* roste v širokém rozmezí teplot, které se pohybuje mezi 5 až 40 °C (Hallsworth, Magan 1999) a optimální teplota pro růst je obecně uváděna v rozmezí mezi 20 a 25 °C (Dimbi et al. 2004; Zimmermann 2007b). Pro naše hodnocení byly z praktických důvodů vybrány 3 teploty, které souvisí s klimatem prostředí původního výskytu izolátů. Průměrná roční teplota v regionu Jižní Čechy, odkud izoláty pocházejí, se v posledních pěti letech pohybuje kolem 8 °C (ČHMI 2012). Získané

výsledky ukazují, že izoláty 110108 a 110111 měly v teplotě 10 °C velmi nízkou klíčivost i po 48 hodinách (méně než 12,5 %) a vyšších hodnot než ostatní izoláty nedosáhly ani v žádném z následujících hodnocení. Je tedy možné říci, že pro předpokládanou aplikaci do prostředí původního výskytu může být primární selekce spolehlivě provedena na základě klíčivosti spor v 10 °C. Je velice důležité respektovat původ izolátu, protože jak zjistili Fernandes et al. (2008), existují izoláty houby *M. anisopliae*, u kterých nebyla pozorována klíčivost ani po 15 dnech kultivace v teplotě 5 °C. De Croos a Bidochka (1999) objevili prokazatelné odlišnosti v chladové aktivitě mezi izoláty, kdy pouze některé z nich rostly v teplotě 8 °C, jeden izolát nerostl ani v teplotě 15 °C, ale zároveň všechny pozorované izoláty rostly v teplotě 22 °C, a na zvolené teplotě závisela rovněž produkce spor. Tefera a Pringle (2003a) pro změnu zjistili, že klíčivost konidií *M. anisopliae* byla ve velké míře inhibována v teplotě 15 °C. Pro naše účely byly vyšší teploty (15 a 20 °C) vhodné pro podrobnější výběr izolátu, který by mohl být potenciálně využitelný v biologické ochraně prováděné na cílovém území. Klíčivost zjištěná v teplotách 15 a 20 °C byla vyšší po 48 hodinách (s výjimkou dvou výše zmiňovaných izolátů 110108 a 110111 v teplotě 15 °C), ale vzhledem k vyrovnanosti hodnot nemůže být tento parametr využit jako kritérium pro účely výběru vhodného izolátu, minimálně v našem hodnocení.

Vitalita spor úzce souvisela s následujícími kritérii hodnocení, kterými byl radiální růst středových kultur a jejich sporulace. Druh *M. anisopliae* se může vyvíjet jednak díky rapidnímu růstu mycelia, ale i díky rychlé sporulaci, kdy mnohem výraznější vliv na provozovanou strategii má konkrétní izolát než druh houby (Sun et al. 2002). Jak bylo uvedeno výše, všechny izoláty zařazené do našeho hodnocení rostly v teplotě 10 °C, ale pouze některé v této teplotě také produkovaly spory. Naopak v teplotách 15 a 20 °C dosahovala sporulace kultur hodnot $4,23 \times 10^7$ – $1,88 \times 10^9$ spor/kulturu. Samotný růst, stejně jako sporulace, jsou velmi důležité ukazatele pro hodnocení a plánování komerční produkce, protože izoláty, které nejsou schopny růst a sporulovat, nemají téměř žádný praktický význam. Na základě výsledků byly jako nejvhodnější izoláty určené pro komerční použití vybrány izoláty 110102 a 110112. Přesto není možné ukončit výběr bez vyhodnocení patogenity izolátů, protože jak uvádí Rath et al. (1995a), ne všechny izoláty druhu *M. anisopliae* vykazují patogenitu nebo vysokou virulenci ke specifickému hostiteli. Patogenita spor je považována za klíčovou charakteristiku, která ukazuje na potenciál pro využití izolátů v praxi. Stejně jako v předchozích hodnoceních, i v hodnocení patogenity se mezi jednotlivými izoláty projeví větší či menší odlišnosti. Jak uvádí Ansari et al. (2009), v hodnocení účinnosti *M. anisopliae* na larvy *Agriotes lineatus* se projeví výrazné rozdíly mezi izoláty v regulovaných podmínkách (22 ± 1 °C; 60–70% RH) tři týdny po ošetření konidiovou suspenzí o koncentraci 10^8 spor/ml, kde pouze dva z 10 hodnocených izolátů *M. anisopliae* způsobily 90 a 100% kumulativní mortalitu larev *A. lineatus* a virulence zbývajících izolátů se pohybovala v rozmezí 10–70 %. V naší studii byla kumulativní mortalita larev *T. molitor* po třítýdenním hodnocení ve 20 °C 100 % bez ohledu na konkrétní izolát a stejně tak byla 100% kumulativní mortalita dosažena rovněž v 15 °C (s výjimkou izolátu 110108) i přesto, že použitá koncentrace suspenze byla 100× nižší než jakou použili Ansari et al. (2009). Největší rozdíly v účinnosti byly pozorovány v teplotě 10 °C, kde byly uspokojivé výsledky (více než 80% kumulativní mortalita) zjištěny pouze u 3 izolátů, včetně výše uváděných izolátů 110102 a 110112. Ačkoli hodnocené izoláty způsobovaly vysokou kumulovanou mortalitu i v nízkých

teplotách, je třeba brát v úvahu i zjištění, které uvádí Rath et al. (1995b), a to že v polních podmínkách může být účinnost na hostitelský organismus pomalejší. Sporulace v podmínkách *in vitro* může být až 232× vyšší než v podmínkách *in vivo* (Sun et al. 2002). Navíc je potřeba uvažovat i to, že přítomnost houby *M. anisopliae* v půdě je ovlivněna půdním složením, pH a množstvím organické hmoty (Quesada-Moraga et al. 2007), která může v příliš vysokém obsahu vést ke snížení výskytu houby *M. anisopliae* (Medo, Cagáň 2011). Bruck (2005) uvádí, že populace *M. anisopliae* velmi příznivě reagovala na mikroklima v rhizosféře a Hu a St. Leger (2002) zjistili, že faktory v rhizosféře mohou podporovat biologickou aktivitu a perzistenci druhu *M. anisopliae*.

Na závěr je možné shrnout, že výsledky získané v teplotách blízkých průměrné teplotě prostředí, odkud izolát pochází, mohou být zásadním ukazatelem pro primární selekci. Naše výsledky ukazují, že patogenita je spojena s vitalitou spor, ale dobrá klíčivost nutně neznamená dobrou účinnost na cílového hostitele. Je nezbytné kombinovat všechna prováděná hodnocení, aby bylo možno nalézt vhodný izolát. Zároveň jsou uváděná hodnocení velmi důležitá pro stanovení ekonomické efektivity, která je závislá na objemu produkce spor a radiálním růstu. Na základě uskutečněných hodnocení byly vybrány izoláty 110102 a 110112, které se jeví jako nejvhodnější pro potenciální využití v rámci biologické ochrany prováděné na území jejich původního výskytu.

Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejich pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

Cílem této studie bylo zjistit, zda se u houby *I. fumosorosea* projeví, ať již pozitivně nebo negativně, vliv dlouhodobé opakované pasáže přes dvě živná média a tři hostitele. Pro porovnání bylo společně s testem virulence na larvách *G. mellonella* provedeno hodnocení referenčního vzorku, kterým byl kmen PFR97 izolovaný z přípravku Preferal. Vliv opakovaného používání živných médií a hostitelských organismů je dlouho studovaným tématem, na které existuje řada pohledů i rozdílných výsledků získaných v průběhu dlouhodobého hodnocení. Podle Brownbridge et al. (2001) je možnost ztráty virulence obecně vysoce pravděpodobná. Jedná se o zásadní ukazatel při komercializaci kmenů, kdy houby prochází několika cykly kultivací pro získání nových konidií před zahájením masové produkce rozsáhlou fermentací. Kultivační médium má pravděpodobně i vliv na povrchové vlastnosti získaných konidií (Ibrahim et al. 2002), ale je velmi důležité udržet stálou kvalitu materiálu (Derakhshan et al. 2008). Pomocí některých médií je možné virulenci entomopatogenních hub dočasně zlepšit, ale obecně po *in vitro* kultivaci konidie inklinují ke ztrátě virulence (Butt et al. 2006).

Přesto, že Derakhshan et al. (2008) uvádí, že umělá živná média ovlivňují projevy entomopatogenních hub, my jsme při hodnocení klíčivosti 50. pasáží přes toto živné médium nezjistili žádné negativní ovlivnění, když klíčivost po 24 hodinách byla téměř 100 %. Stejně tak nebyla negativně ovlivněna ani virulence, což je patrné z toho, že již po 5 dnech biotestu byla mortalita vyvolaná u larev *G. mellonella* 100 %. Toto zjištění je v rozporu s výsledky Vandenberg a Cantona (2004), kteří došli k závěru, že při opakovaných kultivacích entomopatogenních mitosporických hub na umělých živných půdách dochází ke ztrátě

virulence pěstovaných kultur. V rámci druhu *B. bassiana* však existuje výrazná vnitrodruhová variabilita (Brownbridge et al. 2001) a některé izoláty si dokáží virulenci udržet i po opakované *in vitro* kultivaci (Inglis et al. 2001). Houba *B. bassiana* i po 15. pasáži přes SDA vykazala při koncentraci $2,5 \times 10^6$ a 4×10^7 spor/ml účinnost na dvoudenní larvy *Bemisia argentifolii* srovnatelnou se začátkem pasážování (Brownbridge et al. 2001). Kombinací trojnásobné kultivace na umělém živném médiu (PDA) a následné pasáže přes živého hostitele (*Uvarovistia zebra*) dosáhly houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* mírného, ale neprůkazného zvýšení virulence. Virulence je zásadně ovlivňována poměrem C:N v živném médiu, a to, že čtyřnásobným pasážováním nedošlo k oslabení kmene, by se mohlo lehce změnit po vícenásobném pasážování (Mohammadbigi 2013).

Substráty se škrobovým základem, jako jsou obiloviny a další jsou běžně používány pro produkci konidií mitosporických hub (Goettel, Roberts 1992; Feng et al. 1994; Grimm 2001) a houba *I. fumosorosea* na obilovinách dosahuje výtěžnosti až 1×10^9 spor/g substrátu (Sahayaraj, Namasivayam 2008). Houba *B. bassiana* po kultivaci na rýži dosahuje hodnot klíčivosti více než 80 % (Posada-Floréz 2008), v našem hodnocení byla klíčivost spor *I. fumosorosea* po 50. pasáži přes otruby vyšší než 95 % u obou izolátů. Stejně tak byly dosaženy i vysoké hodnoty mortality, přičemž vývoj mortality larev vykázal rychlejší průběh než při pasážování přes *B. tabaci* a *A. gossypii* a v začátcích hodnocení pasáže izolátu 172 výrazně převýšily hodnoty mortality dosažené s oběma původními izoláty.

Opačný názor panuje při pasážování přes živého hostitele, kdy obvykle dochází ke zvýšení účinnosti, jak to uvádí Adames et al. (2011), kterým se pasážování přes vnímavá klíšťata *Rhipicephalus microplus* podařilo mnohonásobně zvýšit účinnost houby *M. anisopliae* na tohoto škůdce rezistentního k akaricidům. Po sedmé pasáži přes vhodného hostitele došlo ke zvýšení inhibice ovipozice i při použití nízké koncentrace spor (1×10^4 konidií/ml) o 12 % v porovnání s testováním před započítáním pasážování. U zvyšující se koncentrace rostla i inhibice ovipozice a nejvyšší virulence byla zjištěna po použití 7. pasáže o koncentraci 1×10^8 konidií/ml (66,67 % oproti 37,38 % na počátku). V našem hodnocení vykazovaly spory *I. fumosorosea* pasážované přes tři živé hostitelské organismy klíčivost vyšší než 98 %. Co se týká virulence, tak průběh mortality byl pomalejší než u většiny ostatních substrátů, zejména pak při pasážování přes *B. tabaci* a *A. gossypii*. Pasážováním přes *T. urticae* nedošlo k výraznějšímu ovlivnění virulence spor *I. fumosorosea* na larvy *G. mellonella*. Přesto, že došlo ke zpomalení průběhu virulence, Adames et al. (2010) uvádí, že k jejímu obnovení nebo zvýšení obvykle dochází po jedné pasáži přes vhodného hostitele. Důvodem je pravděpodobně zlepšení adheze konidií ke kutikule hostitele, čímž dochází k rychlejšímu klíčení, což vede ke snazší invazi do hemocelu hostitele. S tím souhlasí i Song a Feng (2011), kteří zjistili, že po třetí pasáži přes kříse *Nilaparvata lugens* se 3-4násobně zvýšila účinnost houby *B. bassiana* na tohoto škůdce. Došlo tady k adaptaci na hostitelský organismus. Ovšem při dalších pasážích se účinnost již dále nezvyšovala. Je nutné uvést, že toto zjištění se týkalo pouze tří izolátů a mnoho dalších nevykázalo žádné zlepšení virulence vůči cílovému škůdci. Stejně tak spory *M. anisopliae* a *B. bassiana* začaly být virulentní až po pasážování přes vhodného hostitele (*Ocinara varians*, čeled' bourcovití), což vyústilo ve zvýšení mortality. V dřívějších pokusech pasážování přes jiného cílového škůdce (*C. ormosamus*) nevykázalo žádné změny ve virulenci v porovnání s izoláty kultivovanými na PDA (Hussain et al. 2010).

Srovnáním hodnot mortality larev *G. mellonella* u kultur získaných pasážováním přes „neživé“ substráty (otruby, PDA) bylo zjištěno, že u kultur získaných pasážováním přes otruby (H₅, H₃₀) bylo vyšších hodnot mortality larev dosaženo pro pasáž H₅, kdy již 5. den byla pozorována 100% mortalita larev, zatímco u pasáže H₃₀ to bylo 68 % a 100% mortality larev bylo dosaženo až 7. den. Hodnoty mortality larev u kultur obou původních izolátů získaných pasážováním přes PDA (H₂₅, H₅₀) dosahovaly shodně již 5. den 100 %. Jednoznačně nejrychlejší průběh mortality byl zjištěn u larev ošetřených suspenzí konidií kmene PFR97, jenž sloužil v průběhu hodnocení jako referenční kmen. U referenčního kmene byla pozorována mortalita larev 94,67 % již 3. den, tedy se jedná o první výskyt mortality larev, 100% mortality bylo dosaženo 5. den.

V in vivo pasážích nemusí vždy dojít přímo ke zvýšení infekivity, jako u houby *M. anisopliae*, u které nebyl po dvojnásobné pasáži přes hostitele zjištěn prokazatelný rozdíl mezi procentem vylíhlých jedinců *Phlebotomus papatasi* (Dvoukřídli: koutulovití), ale byl zjištěn výrazný rozdíl v porovnání s konidiami po desetinásobné inokulaci in vitro, při které konidie naopak svou virulenci ztratily. Lepší virulence se projevila v nižší LC₅₀. V těchto testech se prokázal i výrazný vliv teploty na průběh biotestu (26 a 31 °C) (Zayed et al. 2013). Na rozdíl od zvyšování mortality však in vivo pasážování přes *O. varians* nezpůsobilo žádné viditelné rozdíly v růstu a sporulaci mezi izoláty entomopatogenních hub (Hussain et al. 2010).

V rámci celého hodnocení má obrovský význam nejen porovnání mortality, ale i vývoje houby na kadaverech cílového hostitele, které je možné pomocí stupnice FDI hodnocené na larvách *G. mellonella*. Mortalita sice hovoří o přímo usmrcených jedincích, ale v případě, že je jedinec stále na živu, ale je u něj zjištěna infekce, můžeme pozorovat její vývoj a potenciální možnosti dalšího šíření. Kritickou hranicí je dosažení indexu 1,5, kdy je na povrchu hostitele, který je již zpravidla usmrcen, viditelné mycelium houby, které se dále vyvíjí. U referenčního kmene PFR97, byly první příznaky pozorovány již 1. den hodnocení, kdy index vývoje nákazy dosáhl hodnoty 0,50. Index 1,5 byl dosažen 3. den hodnocení a již 8. den dosáhl vývoj posledního stádia (index 3,00), kdy je již mycelium plně vysporulované a konidie se mohou volně šířit do okolí. U ostatních variant bylo kritické hodnoty v případě původních izolátů 172 a 173 dosaženo mezi 4. a 5. dnem, resp. mezi 3. a 4. dnem hodnocení. V případě pasáží přes *B. tabaci* (H₁₀, H₃₅), *A. gossypii* (H₁₅, H₄₀) a *T. urticae* (H₂₀, H₄₅), bylo dosažení hodnoty 1,50 zjištěno mezi 6. a 7. dnem v případě pasáže H₁₀, mezi 5. a 6. dnem v případě pasáže H₁₅ a mezi 4. a 5. dnem v případě pasáže H₂₀. Co se týče pasáží původního izolátu 173, bylo dosažení kritické hodnoty 1,50 pozorováno mezi 4. a 5. dnem v případě pasáže H₃₅, mezi 3. a 4. dnem v případě pasáže H₄₀ a mezi 3. a 4. dnem v případě pasáže H₅₀. U pasáží H₅ a H₃₀, tedy pasáží, kde jako medium pro pasážování sloužily otruby, byla hodnota indexu vývoje nákazy 1,50 dosažena mezi 3. a 4. dnem, resp. mezi 5. a 6. dnem. V případě pasáží kde jako medium pro pasážování sloužilo PDA, tedy pasáží H₂₅ a H₅₀, bylo hodnoty indexu vývoje 1,50 dosaženo shodně v obou případech mezi 3. a 4. dnem. Z výsledků je patrné, že k dosažení hodnoty 1,5 došlo v průběhu 3 dnů u všech testovaných variant.

7. ZÁVĚR

Hlavní cíl této práce, tedy ověření využitelnosti hodnocení vývoje nákazy entomopatogenních hub na cílovém hostitelském organismu za využití stupnice FDI, se podařilo úspěšně ověřit v rámci všech pěti studií, které byly za tímto účelem prováděny a jsou popsány v předkládané práci. Stupnice FDI se ukázala být využitelnou bez problémů pro všechny testované druhy entomopatogenních hub v jednotlivých studiích a dá se tedy téměř s jistotou předpokládat, že aplikovatelnost této stupnice bude reálná i pro další druhy a rody entomopatogenních hub. (Stupnice FDI by byla jistě využitelná pro hodnocení vývoje nákazy také u zástupců řádu Entomophthorales, např. pro nejznámější druh rodu *Entomophthora* – *Entomophthora muscae*).

Co se hostitelských organismů týče, byly v této práci v rámci jednotlivých studií využity tři modelové organismy, a to sice larvy *T. molitor* a *G. mellonella* a dále dospělci *M. persicae*. I z tohoto úhlu pohledu, tedy z pohledu aplikovatelnosti stupnice FDI na výše zmíněné hostitelské organismy, našla stupnice očekávané uplatnění, nicméně v případě studie, kdy byla zjišťována účinnost získaných čistých izolátů z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky *M. persicae*, musela být provedena korekce stupnice FDI, která spočívala v zúžení stupnice FDI ze 7indexové na stupnici s 6 indexy, kdy byl z hodnocení vyňat index 0,5, který vyjadřoval vývoj nákazy projevující se typickými melanizačními skvrnami na povrchu těla hostitelského organismu. Tento index byl v tomto konkrétním případě vynechán z hodnocení z důvodu nemožnosti relevantně tento projev nákazy na daném cílovém hostitelském organismu vyhodnotit. Dá se očekávat, že i v jiných případech testovaných hostitelských organismů bude docházet ke stejnému kroku jako v případě této studie, tedy právě k zúžení stupnice FDI spočívající ve vynechání indexu, jímž je vyjadřována přítomnost melanizačních skvrn na povrchu těla hostitelského organismu, tedy indexu 0,5, z hodnocení. (Např. obdobná situace může nastat při hodnocení účinnosti na plně sklerotizovaných dospělících *T. molitor*, kdy taktéž nejsme schopni relevantně pozorovat jakékoli melanizační skvrny, nicméně pokud bychom pozorovali nákazu u jedinců, kteří plné sklerotizace ještě nedosáhli, tedy v době, kdy brouk nedosáhl svého typického tmavého hnědočerného zbarvení, ale je ve vývojové fázi „světlého brouka“, můžeme u něho pozorovat zbarvení v rozmezí „bílé“ až po světle hnědé, tak v této době jsme schopni melanizační skvrny bez problémů pozorovat – osobní pozorování. Tato skutečnost se dá předpokládat i v jiných případech).

Závěrem lze tedy říci, že využitelnost stupnice FDI byla potvrzena a dá se očekávat její univerzální uplatnění napříč systémem entomopatogenních hub, i když v jistých případech jsme nuceni dle okolností tuto stupnici zúžit, nicméně ani tato úprava neznamená výraznější limitaci ve využití dané stupnice pro hodnocení vývoje nákazy daného rodu/druhu/kmene entomopatogenní houby pro daný hostitelský organismus. (Samozejmě uplatnitelnost se týká těch zástupců entomopatogenních hub s typickými projevy vývoje nákazy tak, jak jsou popsány v části Metodika). Předkládaná práce si klade za cíl představit další možnost hodnocení účinnosti entomopatogenních hub, kterou představuje stupnice FDI, která má díky své variabilitě a jednoznačnosti široké využití na řadě hostitelských organismů, jak je popsáno v jednotlivých prezentovaných studiích.

Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

V rámci této studie byla zjištěna variabilita průběhu nákazy v 10denním biotestu, a to jak mezi izoláty entomopatogenní houby *B. bassiana*, tak druhu *B. caledonica*, nicméně pokud pomineme nepoměr v počtu testovaných izolátů pro jednotlivé druhy testovaných entomopatogenních hub (40 izolátů u *B. bassiana* a 23 izolátů u *B. caledonica*), pak můžeme na základě dosažených výsledků jasně říci, že obecně výrazně pomalejší průběh nákazy byl pozorován u larev ošetřených suspenzí spor izolátů *B. caledonica* ve srovnání s průběhem nákazy na larvách po inokulaci suspenzí spor izolátů *B. bassiana*.

Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor*

Z výsledků získaných v této studii jasně vyplývá, že účinnost dvou testovaných typů spor se liší v závislosti na použité koncentraci. Zatímco při koncentraci 1×10^5 spor/ml se ukázal průběh nákazy dle stupnice FDI rychlejší po inokulaci larev suspenzí konidií oproti larvám inokulovaným suspenzí blastospor (ať již vymytých či nevymytých). V případě koncentrace 1×10^6 spor/ml byl trend vývoje nákazy obdobný jako v předchozím případě, nicméně rozdíly mezi jednotlivými variantami se snížily. V případě koncentrace 1×10^7 spor/ml byl vývoj nákazy po inokulaci larev obdobný pro všechny testované varianty.

Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů vybraných druhů entomopatogenních hub získaných odizolováním z komerčních biopreparátů, na bezkřídle partenogenetické samičky *Myzus persicae*

V optimálních podmínkách laboratorního testu výsledky jasně prokázaly obdobnou účinnost všech testovaných čistých izolátů komerčních přípravků na bázi entomopatogenních hub na bezkřídle partenogenetické samičky *M. persicae* a jejich potenciálně vhodné využití pro praxi.

Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd obhospodařovaných konvenčním způsobem zemědělství

Na základě kritérií, která byla sledována v laboratorních podmínkách (hodnocení klíčivosti, radiálního růstu, hodnocení účinnosti na larvy *T. molitor*) u testovaných izolátů v této studii, byl izolát 110102 a izolát 110112 s ohledem na dosažené hodnoty v jednotlivých kritériích vybrán jako nejvhodnější z dané skupiny testovaných izolátů k potenciálnímu využití v biologické ochraně rostlin před půdními škůdci, resp. před stádii, která svůj vývoj prodělávají právě v půdním prostředí.

Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejích pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

Výsledné hodnoty v průběhu této studie vykazovaly velkou variabilitu, nicméně pokud vezmeme v potaz konečné hodnoty, jež byly získány poslední den hodnocení, pak, pokud zobecníme získané výsledky, zjistíme, že pouze pasáže H₁₀ a H₁₅ (pasáže přes *B. tabaci* a *A. gossypii*) vykazovaly pomalejší vývoj nákazy dle stupnice FDI oproti hodnotám, jež byly získány po inokulaci larev konidiami původního izolátu, v tomto případě tedy izolátu 172. Dále pak již jen pasáž H₃₅ (pasáž přes *B. tabaci*) vykazovala mírně pomalejší vývoj nákazy oproti hodnotám dosaženým u původního izolátu 173. V ostatních případech, i přes značně variabilní průběh, bylo dosaženo obdobných hodnot jak v případě jednotlivých pasáží, tak současně i v případě původních izolátů.

8. SUMMARY

The main objective of the presented study was to verify the “universal“ application of the FDI (fungus development index) scale for evaluation of entomopathogenic fungi infection development on chosen target host insect. With this scale that distinguishes different phases of fungal development, we have a unique opportunity to observe the infection in the host organism in different phases starting from initial symptoms called melanization spots, through mortality, to the visible formation of morphological structures typical for one concrete species of entomopathogenic fungi. The task was to find legitimate use of the scale in assessment of development of the infection generally and comprehensively, i.e. for individual genera of entomopathogenic fungi in the frame of fungal development assessment on different host organisms, and not least also for assessment the evolution of the disease caused by different types of spores of entomopathogenic fungi. The FDI scale divides the infection process into 7 phases defined by indexes specific for each phase of disease on special host and its development stage (e.g. larva). The lowest index (0) describes the stage where no changes in host vitality are visible, on the other hand the highest index (3) expresses the final stage of the infection when mycelium on the host cadaver is fully sporulated. The crucial index observed during the fungal disease development is 1.5 which represents the first symptoms provably connected with the visible infection in form of single hyphae on the surface of the host body. This was also the main idea of the theses verified in five sub-studies described in this work.

Study no. 1: Evaluation of the efficacy of selected isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria caledonica* isolated during areal monitoring in the Šumava National Park on *Tenebrio molitor* larvae

The main objective of this study was to compare the efficacy of isolates of entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *B. caledonica* obtained during the monitoring in the Šumava National Park. The assessment proceeded on chosen target host that were *T. molitor* larvae. The task was to compare individual isolates within one species of entomopathogenic fungi and together to compare isolates between both of the above mentioned species. Big differences are apparent when looking at the results from individual isolates evaluation of the two tested species of entomopathogenic fungi (if we ignore the disparity in the number of isolates assessed within *B. bassiana* – 40 isolates and within *B. caledonica* – 24 isolates) we can find out, that *B. bassiana* isolates showed more rapid onset of mortality as well as its course. The same also applies to infection on larvae and development of fungal pathogen on their surface.

Study no. 2: Comparison of efficacy of two different types of spores of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on *Tenebrio molitor* larvae

Two considerably different types of spores of *B. bassiana* were compared to determine whether or not there is any variation in ability to cause disease between them and, if so, how. The aim was to find out whether one of these two types is able to cause faster development of the infection under set incubation conditions after application of concrete concentration of spores.

The results obtained in this study show that the efficacy of different types of spores is connected to applied concentration. When used concentration of 1×10^5 spores/ml it showed faster development of infection assessed according to FDI scale on *T. molitor* larvae induced by suspension of aerial conidia instead of suspension of blastospores (washed or not). In case of concentration 1×10^6 spores/ml the course of disease was similar to that one described previously, however the differences between varieties were reduced. The highest concentration of 1×10^7 spores/ml does not show significant differences between all used variants, all gained results were of similar values.

Study no. 3: Evaluation of efficacy of selected isolates of entomopathogenic fungi species isolated from commercial biopreparations on apterous parthenogenetic *Myzus persicae* females

The study was conducted in order to verify the use of pure isolates, on which basis commercial preparations Botanigard (*B. bassiana*), Mycotal (*L. muscarium*) and Preferal (*I. fumosorosea*) are produced, on *M. persicae* females under laboratory conditions.

Under optimal conditions of the laboratory bioassay the results clearly demonstrated similar efficacy of all tested pure isolates of commercial products based on entomopathogenic fungi on apterous parthenogenetic *M. persicae* female and their potentially suitable practical use.

Study no. 4: Evaluation of efficacy of indigenous isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* achieved from soil in conventional farming system

This study completely focuses on assessment of selected characteristics of evaluated isolates of entomopathogenic fungus *M. anisopliae* (germiantion, radial growth on artificial nutrient medium, evaluation of efficacy on *T. molitor* larvae) at different temperatures. The selection of the strains was based on morphological differences among central cultures incubated on PDA (Potato dextrose agar). The primary objective was to find the most suitable isolate for further potential use in biological control of plants against soil pests or pests realizing part of their lifecycle in the soil environment. Based on the results obtained at temperatures close to the average year temperature of the environment where the isolate originates from, this temperatures could be used as key indicator for the primary selection. Our results show, that the pathogenicity is connected to the spore vitality, but good germination does not necessarily mean good efficacy on the target host. It is important to combine all the presented evaluations in order to find the most suitable isolate. The declared evaluations are very important for the determination of economic efficiency, which is dependent on the amount of spore production and radial growth. On the base of realized evaluations two isolates 110102 and 110112 were chosen, because they seem to be the most suitable for potential use in biological protection applied in their original habitat.

Study no. 5: Assessment of the effectiveness of selected isolates of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* and its passages through the various nutrient substrates on wax moth larvae *Galleria mellonella*

The effort in this study was to determine, whether the multiple passaging (fifty times) of selected isolates of *I. fumosorosea* through two insect hosts (*Bemisia tabaci* and *Aphis gossypii*), one host from the class Arachnoidea (*Tetranychus urticae*), artificial nutrient medium – PDA and natural nutrient substrate – bran, somehow affects the efficacy in comparison with the original isolates. Final efficacy was evaluated on *G. mellonella* larvae.

The running values showed great variability during the evaluation, however, if the final results are taken into account, it is apparent, that only passages marked H₁₀ and H₁₅ (passages through *B. tabaci* and *A. gossypii*) showed slower infection development according to the FDI scale when compared to the values gained after original isolate application, in this case it was isolate 172. Furthermore only the H₃₅ passage (through *B. tabaci*) demonstrated slower disease development in comparison to the values of original isolate 173. In other cases, despite the highly variable course, the finally achieved values were similar in the case of individual passages as well as in the initial isolates.

The main objective of the presented work was to verify usability of the FDI scale for evaluation of the development of infection caused by entomopathogenic fungi on target organism, which was successfully declared in all 5 studies that have been carried out for this purpose in this work. The FDI scale proved to be usable without problems for all species of entomopathogenic fungi in the individual studies and it can be almost safely assume that the applicability of this scale will be suitable even for the species of entomopathogenic fungi that were not assessed in this work.

In individual studies were used three model host organisms that were *T. molitor* larvae, *G. mellonella* larvae and adults of *M. persicae*. Even from this point of view the FDI scale found expected application, however for assessment of efficacy of pure isolates obtained from commercial products on apterous parthenogenetic *M. persicae* female the scale had to be modified, because index 0.5 describing the very beginning of the infection in form of melanization spots is impossible to be relevantly applied on such a small organism. For this purpose only 6 indexes were used for this concrete assessment when 0.5 was excluded. It is expected that the scale could be further modified this way according to the special host organism, but the main indexes in range 1–2.5 remain stable and just the marginal indexes (0.5 and 3) could be excluded.

We can conclude, that the utility of the FDI scale was proved and its universal application among all entomopathogenic fungi is expected, although in certain circumstances we could be made to narrow it. Nevertheless this modification is not limiting for fully use of this scale for evaluation of the infection caused by concrete genus/species/strain of entomopathogenic fungi on concrete host organism.

9. SEZNAM LITERATURY

- Adames M, Fernández-Ruvalcaba M, Peña-Chora G, Hernández-Velázquez VM (2011) Effects of passages through a suitable host of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricide-susceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. J Insect Sci. Volume 11, article 21
- Al-alawi MS, Obeidat M (2014) Selection of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for management of *Myzus persicae* (Sultzar) (Hom.: Aphidae) based on virulence and growth related characteristics. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 9(1):94–100
- Allee LL, Goettel MS, Goldberg A, Whitney HS, Roberts DW (1990) Infection by *Beauveria bassiana* of *Leptinotarsa decemlineata* larvae as a consequence of fecal contamination of the integument following per os inoculation. Mycopathologia 111:17–24
- Anonym (2013) http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802230003. Dostupné 16. dubna 2013
- Ansari MA, Evans M, Butt TM (2009) Identification of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control. Crop Prot 28:269–272
- Ansari MA, Shah FA, Whittaker M, Prasad M, Butt TM (2007) Control of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) pupae with *Metarhizium anisopliae* in peat and peat alternative growing media. Biol Control 40:293–297
- Arthurs S, Thomas MB (2001) Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. J Invertebr Pathol 78:59–65
- Augustyniuk-Kram A, Kram KJ (2012) Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests. In: Blanco JA, Lo YH (eds) Forest ecosystems - more than just trees. In Tech, Šanghaj, Čína, pp 265–294
- Bailey A, Chandler D, Grant WP, Greaves J, Prince G, Tatchell M (2010) Biopesticides: pest management and regulation. CABI, Wallingford, Oxon, UK
- Bajwa WI, Kogan M (1997) Compendium of IPM definitions (CID). <http://www.ipmnet.org/ipmdefinitions/index.pdf>. Dostupné 12. dubna 2013
- Bernardini M, Carilli A, Pacioni G, Santurbano B (1975) Isolation of Beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. Phytochemistry 14:1865
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW (1995) The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. Mycol Res 99:403–406
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Roberts DW (1997) Mechanisms of deuteromycety fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. In: Goettel MS, Johnson DL (eds) Microbial control of grasshoppers and locusts. Mem Entoml Soc Can 171:213–224

- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101(4):512–530
- Bouamama N, Vidal C, Fargues J (2010a) Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the persistence of quiescent conidia of *Isaria fumosorosea*. *J Invertebr Pathol* 105:139–144
- Bouamama N, Vidal C, Fargues J (2010b) Effects of wetting on the persistence of quiescent conidia of *Isaria fumosorosea*. *Biol Control* 55:203–210
- Boucias DG, Pendland JC (1991) Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts. In: Cole GT, Hoch HC (eds) *The Fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp 101–127
- Boucias DG, Pendland JC (1998) Entomopathogenic Fungi: Fungi imperfecti. In: Boucias DG, Pendland JC (eds) *Principles of insect pathology*, Kluwer Academic Publisher, Boston, pp 321–364
- Boucias DG, Pendland JC, Latg'e JP (1988) Nonspecific factors involved in the attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl Environ Microbiol* 54:1795–1805
- Braga GUL, Flint SD, Messias CL, Anderson AJ, Roberts DW (2001a) Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 105:874–882
- Braga GUL, Flint SD, Miller ChD, Anderson AJ, Roberts DW (2001b) Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *J Invertebr Pathol* 78:98–108
- Braga GUL, Flint SD, Miller ChD, Anderson AJ, Roberts DW (2001c) Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem Photobiol* 74:734–739
- Brown PM, Thomas CE, Lombaert E, Jeffries DL, Estoup A, Handley LJJ (2011) The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. *BioControl* 56:623–641
- Brown PMJ, Adriaens T, Bathon H, Cuppen J, Goldarazena A, Hagg T, Kenis M, Klausnitzer BEM, Kovar I, Loomans AJM, Majerus MEN, Nedved O, Pedersen J, Rabitsch W, Roy HE, Ternois V, Zakharov IA, Roy DB (2008) *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. *BioControl* 53:5–21
- Brownbridge M, Costa S, Jaronski ST (2001) Effects of in Vitro Passage of *Beauveria bassiana* on Virulence to *Bemisia argentifolii*. *J Invertebr Pathol* 77:280–283
- Bruck DJ (2005) Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. *Biol Control* 32:155–163
- Burges HD, Thompson EM (1971) Standardization and assay of microbial insecticides. In: Burges HD, Hussey NW (eds) *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, London & New York, pp 591–622

- Butt TM (2002) Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: Mycota (Esser K, Bennett JW (eds) Springer, Berlin, pp 111–134
- Butt TM, Goettel MS (2000) Bioassays of Entomopathogenic Fungi. In: Navon A, Asher KRS (eds) Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 95–140
- Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) (2001) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI, Wallingford, Oxon, UK
- Butt TM, Wang C, Shah FA, Hall R (2006) Degeneration of entomogenous fungi. In: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds.) An Ecological and Societal Approach to Biological Control, Springer, pp. 213–226
- Caltagirone LE, Douthett RL (1989) The history of the vedalia beetle importation to California and its impact on the development of biological control. *Annu Rev Entomol* 34:1–16
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol R* 66:447–459
- Capinera JL (ed.) (2004) *Encyclopedia of entomology*, Dordrecht: Kluwer Academic
- Casadevall A, Pirofski L (2001) Host–pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis*. 184(3):337–344
- Castineiras A (1995) Natural enemies of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Cuba. *Fla Entomol* 78:538–540
- Castle SJ, Goodell PB, Palumbo JC (2009) Implementing principles of the integrated control concept 50 years later-current challenges in IPM for the arthropod pests. *Pest Manag Sci* 65:1263–1264
- Clarkson JM, Charnley AK (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* 4:197–203
- Cook RJ, Bruckart WL, Coulson JR, Goettel MS, Humber RA, Lumsden RD, Vaughn JL (1996) Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biol Control* 7:333–351
- ČHMI (2012) Územní teploty. Český hydrometeorologický ústav. http://portal.chmi.cz/portal/dt?portal_lang=en&nc=1&menu=JSPTabContainer/P3_0_Informace_pro_Vas/P3_9_Historicka_data/P3_9_1_Pocasi/P3_9_1_4_Uzemni_teploty&last=false. Dostupný 1 Prosince 2012
- Daoust RA, Roberts DW (1983) Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. *J Invertebr Pathol* 41(2):143–150
- De Bach P, Rosen D (1991) Biological control by natural enemies. CUP Archive
- De Croos JNA, Bidochka MJ (1999) Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol* 45:1055–1061
- Delfosse ES (2005) Risk and ethics in biological control. *Biol Control* 35:319–329

- Derakhshan A, Rabindra RJ, Ramanujam B (2008) Effect of storage conditions of formulations on viability of *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas and its virulence to *Brevicoryne brassicae* (L.). *J Biol Sci* 8(2):498–501
- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA, Mueke JM (2004) Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49:83–94
- Eilenberg J (2006) Concepts and visions of biological control. In: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds) *An Ecological and societal approach to biological control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–11
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol* 46:387–400
- Ekesi S, Maniania NK, Lux SA (2003) Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *J Invertebr Pathol* 83:157–167
- Fargues J (1984) Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Aist J, Roberts DW (eds) *Infection processes of fungi*. Rockefeller Foundation Study Center, Bellagio, Italy, pp 90–110
- Fargues J, Rougier M, Goujet R, Smits N, Coustere Ch, Itier B (1997) Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *J Invertebr Pathol* 69:70–78
- Fargues J, Vidal C, Smits N, Rougier M, Boulard T, Mermier M, Nicot P, Reich P, Jeannequin B, Ridray G, Lagier J (2003) Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biol Control* 28:320–331
- Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43:237–256
- Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci Technol* 4(1):3–34
- Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Moraes ÁML, Bittencourt VREP, Roberts DW (2007) Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. Isolates. *J Invertebr Pathol* 96:237–243
- Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Moraes ÁML, Bittencourt VREP, Roberts DW (2008) Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *J Invertebr Pathol* 98:69–78
- Fuguet R, Vey A (2004) Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: in vivo studies. *J Invertebr Pathol*. 85:152–167

-
- Fuxa JR, Tanada Y (1987) Epizootiology of insect diseases. Wiley-Interscience, New York
- Gillespie JP, Bailey AM, Cobb B, Vilcinskis A (2000) Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch of Insect Biochem* 44:49–68
- Glare TR, Reay SD, Nelson TL, Moore R (2008) *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycol Res* 112:352–360
- Goettel MS (1995) The utility of bioassays in the risk assessment of entomopathogenic fungi. In: Biotechnology risk assessment: USEPA/USDA/Environment Canada/Agriculture and Agri-Food Canada “Risk Assessment Methodologies.” Proceedings of the Biotechnology Risk Assessment Symposium, June 6-8, Pensacola, Florida, pp 2–8
- Goettel MS, Hajek AE (2001) Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. In: Wajnberg E, Scott JK, Quimby PC (eds) Evaluating indirect ecological effects of biological control. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 81–97
- Goettel MS, Hajek AE, Siegel JP, Evans HC (2001) Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 347–376
- Goettel MS, Inglis GD (1997) Fungi: hyphomycetes. In: Lacey L (ed) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, pp 213–249
- Goettel MS, Poprawski TJ, Vandenberg JD, Li Z, Roberts DW (1990) Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M, Lacey L, Davidson EW (eds) Safety of microbial insecticides. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 209–231
- Goettel MS, Roberts DW (1992) Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In Lomer CJ, Prior C (eds.) Biological control of locusts and grasshoppers. CAB International, Wallingford, UK, 230–238
- Gray ME, Ratcliffe ST, Rice ME (2009) The IPM paradigm: concepts, strategies and tactics. In: Radcliffe EB, Hutchison WD, Cancelado RE (eds) Integrated pest management: concepts, tactics, strategies and case studies. Cambridge University Press, New York, pp 1–13
- Grimm C (2001) Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Prot* 20(7):623–630.
- Gunnarson SGS (1988) Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. *J Invertebr Pathol* 52:9–17
- Hajek A, St Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu Rev Entomol* 39:293–322
- Hajek AE, Butler L (2000) Predicting the host range of entomopathogenic fungi. In: Follett, PA, Duan JJ (eds) Nontarget effects of biological control. Kluwer, Rotterdam, The Netherlands, pp 263–276
-

- Hallsworth JE, Magan N (1999) Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *J Invertebr Pathol* 74:261–266
- Hesketh H, Alderson PG, Pye BJ, Pell JK (2008) The development and multiple uses of a standardised bioassay method to select hypocrealean fungi for biological control of aphids. *Biol Control* 46:242–255
- Hicks BJ, Watt AD, Cosens D (2001) The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Forest Ecol Manag* 149: 275–281
- Hu G, St. Leger RJ (2002) Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl Environ Microbiol* 68:6383–6387
- Hung SY, Boucias DG, Vey AJ (1993) Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. *J Invertebr Pathol* 61:179–187
- Hussain A, Tian M-Y, He Y-R, Ruan L, Ahmed S (2010) In vitro and in vivo cuturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *J Food Agric Environ* 8(3 a 4):481–487
- Charnley AK (1984) Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. *Br Mycol Soc Symp* 6:229–270
- Charnley AK, Collins SA (2007) Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek CP, Druzhinina IS (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships* (2nd edition). Springer-Verlag, Berlin, pp 159–187
- Chen B, Li ZY, Feng MG (2008) Occurrence of entomopathogenic fungi in migratory alate aphids in Yunnan Province of China. *BioControl* 53:317–326
- Cherry AJ, Abalo P, Hell K (2005) A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research* 41:295–309
- Ibrahim L, Butt TM, Jenkinson P (2002) Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 106(6):705–715
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 23–69
- IOBC (2012) Internet book of biological control. Version 6. <http://www.iobc-global.org/download/IOBC%20InternetBookBiCoVersion6Spring2012.pdf>. Dostupné 12. dubna 2013

- Jandricic SE, Filotas M, Sanderson JP, Wraight SP (2014) Pathogenicity of conidia-based preparations of entomopathogenic fungi against the greenhouse pest aphids *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, and *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae). *J Invertebr Pathol* 118: 34–36
- Jaronski ST (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55:159–185
- Jegorov A, Sedmera P, Matha V, Šimek P, Zahradníčková H, Landa Z, Eyal J (1994) Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry* 37:1301–1303
- Kassa A, Stephan D, Vidal S, Zimmermann G (2003) Effect of temperature on spore germination and growth of entomopathogenic fungi isolated (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from Ethiopia.
- Kavková M, Čurn V (2005) *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia* 159:53–63
- Kepler RM, Rehner SA (2013) Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Mol Ecol* 13: 210–217
- Kershaw MJ, Talbot NJ (1998) Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet Biol* 23:18–33
- Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M, Qiu D (2012) Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding* 3:63–79
- Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR (2007) Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biol Control* 40:327–332
- Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR (2008) Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec® for simultaneous suppression of cotton aphid, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. *Biol Control* 45:404–409
- Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR (2010) Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec® against the cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea* in a greenhouse environment. *Crop Prot* 29:540–544
- Kim JJ, Kim KC (2008) Selection of a highly virulent isolate of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 11:1–4
- Klingen I, Haukeland S (2006) The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg J, Hokkanen, HMT (eds) *An Ecological and societal approach to biological control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 145–211
- Kogan M (1998) Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu Rev Entomol* 43:243–70

- Kreutz J (2001) Möglichkeiten einer biologischen Bekämpfung des Buchdruckers, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae), mit insektenpathogenen Pilzen in Kombination mit Pheromonfallen. Dissertation, Saarland University
- Kreutz J, Zimmermann G, Vaupel O (2004a) 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 Sci Techn* 14:837–848
- Kreutz J, Vaupel O, Zimmermann G (2004b) Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. *J Appl Entomol* 128(6):384–389
- Lacey LA, Fransen JJ, Carruthers R (1996) Global distribution of naturally occurring fungi of Bemisia, their biologies and use as biological control agents. In: Gerling D, Mayer R (eds) *Bemisia 1995: Taxonomy, biology, damage, and management*. Intercept, Andover, pp 401–433
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P (2001) Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol Control* 21:230–248
- Lacey LA, Wraight SP, Kirk AA (2008) Entomopathogenic fungi for control of Bemisia spp.: foreign exploration, research and implementation. In: Gould JK, Hoelmer K, Goolsby J (eds) *Classical biological control of Bemisia tabaci in the USA: A Review of interagency research and implementation*, vol. 4. *Progress in biological control* (Hokkanen H, (series ed) Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 33–69
- Landa Z, Osborne L, López F, Eyal J (1994) A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biol Control* 4:341–350
- Landa Z (1998) Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *Agro* 10:7–12
- Langewald J, Ouambama Z, Mamadou A, Peveling R, Stolz I, Bateman R, Attignon S, Blanford S, Arthurs S, Lomer C (1999) Comparison of an organophosphate insecticide with a mycoinsecticide for the control of *Oedaleus senegalensis* Krauss (Orthoptera: Acrididae) and other Sahelian grasshoppers in the field at operational scale. *Biocontrol Sci Techn* 9:199–21
- Leland JE, McGuire MR (2006) Effects of different *Beauveria bassiana* isolates on field populations of *Lygus lineolaris* in pigweed (*Amaranthus* spp.). *Biol Control* 39: 272–281
- Leland JE, McGuire MR, Grace JA, Jaronski ST, Ulloa M, Part Y-H, Plattner RD (2005) Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.) (Heteroptera: Miridae). *Biol Control* 35:104–114
- Liu H, Skinner M, Brownbridge M, Parker BL (2003) Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J Invertebr Pathol* 82:139–147
- Lomer CJ, Prior C, Kooyman C (1997) Development of *Metarhizium* spp. for the control of locusts and grasshoppers. *Mem Entoml Soc Can* 171:265–286

- LUBILOSA (1999a) Phase 3 final report. <http://www.lubilosa.org/Ph3rep.pdf>. Dostupné 12. dubna 2013
- LUBILOSA (1999b) Green Muscle user handbook. <http://www.lubilosa.org/Userhb.pdf>. Dostupné 12. dubna 2013
- LUBILOSA (2013) Lastes news. <http://www.lubilosa.org/>. Dostupné 12. dubna 2013
- Maketon M, Chakanya N, Prem-udomkit K, Maketon C (2013) Interaction Between Entomopathogenic Fungi and Some Aphid Species in Thailand. *Gesunde Pflanzen* 65:93–105
- McCoy CW, Storey GK, Tigano-Milano MS (1992) Environmental factors affecting entomopathogenic fungi in the soil. *Pesq Agropec Bras* 27:107–111
- McGuire MR, Ulloa M, Park YH, Hudson N (2005) Biological and molecular characteristics of *Beauveria bassiana* isolates from California *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) populations. *Biol Control* 33(3):307–314
- Medo J, Cagán E (2011) Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biol Control* 59: 200–208
- Ment D, Iraki N, Gindin G, Rot A, Glazer I, Abu-Jreis R, Samish M (2011) Thermal limitations of *Metarhizium anisopliae* efficacy selection for application on warm-blooded vertebrates. *BioControl* 56:81–89
- Meyling NV, Eilenberg J (2006) Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agr Ecosyst Environ* 113:336–341
- Meyling NV, Eilenberg J (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control* 43:145–155
- Meyling NV, Thorup-Kristensen K, Eilenberg J (2011) Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. *Biol Control* 59:180–186
- Milner RJ (1997) Prospects for biopesticides for Aphid control. *Entomophaga* 42(1/2):227–239
- Mohammadbigi A (2013) Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Int J Aric Crop Sci* 6(16):1147–1152
- Mycobank (2013a) <http://www.mycobank.org/BioLomics.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=52074&Fields=All>. Dostupné 15. dubna 2013
- Mycobank (2013b) <http://www.mycobank.org/BioLomics.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=14937&Fields=All>. Dostupné 15. dubna 2013
- Mycobank (2013c) <http://www.mycobank.org/BioLomics.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=14955&Fields=All>. Dostupné 15. dubna 2013

- Mycobank (2013d) <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=1468261600000063&Rec=8118&Fields=All>. Dostupné 15. dubna 2013
- Norris RF, Caswell-Chen EP, Kogan M (2003) Concepts in Integrated Pest Management. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall
- Orr D (2009) Biological control and integrated pest management. In: Peshin R, Dhawan AK (eds) Integrated pest management: innovation-development. Springer, Science+Business Media BV, Dordrecht, pp 207–239
- Osborne LS, Landa Z (1992) Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomol 75(4):456–471
- Osborne LS, Landa Z (1994) Utilization of the entomogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. IOBC WPRS Bulletin 17:201–206
- Paul ND, Gwynn-Jones D (2003) Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. Trends Ecol Evol 18:48–55
- Pell JK, Hannam JJ, Steinkraus DC (2010) Conservation biological control using fungal entomopathogens. BioControl 55:187–198
- Perkins JH (1982) Insects, Experts, and the Insecticide Crisis: The quest for new pest management strategies. Plenum Press, New York
- Polar P, de Muro MA, Kairo MTK, Moore D, Pegram R., John S-A, Roach-Benn Ch (2005) Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. Vet Parasitol 134:159–167
- Posada-Flórez FJ (2008) Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. J Insect Sci. 8. Article 41.
- Prior C, Carey M, Abraham YJ, Moore D, Bateman RP (1995) Development of a bioassay method for the selection of entomopathogenic fungi virulent to the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). J Appl Entomol 119:567–573
- Prior C, Greathead DJ (1989) Biological control of locusts: the potential for the exploitation of pathogens. FAO Plant Protection Bulletin 37:37–48
- Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Álvarez C (2007) Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycol Res 111: 947–966
- Quesada-Moraga E, Maranhao EAA, Valverde-García P, Santiago-Álvarez C (2006) Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. Biol Control 36:274–287
- Rajinder P, Bandral RS, Zhang WJ, Wilson L, Dhawan AK (2009) Integrated pest management: a global overview of history, programs and adoption. In: Rajinder P,

- Dhawan A (eds) Integrated pest management: innovation-development process (Vol. 1). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–50
- Rangel DEN, Anderson AJ, Roberts DW (2008) Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol Res* 112:1362–1372
- Rangel DEN, Braga GUL, Anderson AJ, Roberts DW (2005) Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *J Invertebr Pathol* 90:55–58
- Rangel DEN, Braga GUL, Flint SD, Anderson AJ, Roberts DW (2004) Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *J Invertebr Pathol* 87:77–83
- Rangel DEN, Fernandes ÉKK, Anderson AJ, Roberts DW (2012) Culture of *Metarhizium robertsii* on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance. *Fungal Biology* 116:438–442
- Rath AC, Guy PL, Webb WR (1995a) *Metarhizium* spore surface antigens are correlated with pathogenicity. *Mycol Res* 100 (1): 57–62
- Rath AC, Anderson GC, Worledge D, Koen TB (1995b) The effect of low temperatures on the virulence of *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) to the subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. *J Invertebr Pathol* 65:186–192
- Reay SD, Brownbridge M, Cummings NJ, Nelson TL, Souffre B, Lignon C, Glare TR (2008) Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. *Biol Control* 46:484–494
- Rehner SA (2005) Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: Vega FE, Blackwell M (eds) *Insect fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press, pp 3–27
- Rehner SA, Aquino de Muro M, Bischoff JF (2006) Description and phylogenetic placement of *Beauveria malawiensis* sp. nov. (Clavicipitaceae, Hypocreales). *Mycotaxon* 98:137–145
- Rehner SA, Buckley E (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98
- Ríos Velasco R, Cerna Chávez E, Peña SS, Gallegos Morales G (2010) Natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson infecting *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila México. *J Res Lepidoptera* 43:7–8
- Roberts DW, St Leger RJ (2004) *Metarhizium* spp. cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* 54:1–70
- Roddam LF, Rath AC (1997) Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. *J Inverte Pathol* 69:285–288

- Rodrigues S, Peveling R, Nagel P, Keller S (2005) The natural distribution of the entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* in different regions and habitat types in Switzerland. IOBC WPRS Bulletin 28:185–188
- Roy H, Wajnberg E (2008) From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. BioControl 53:1–4
- Sahayaraj K, Namasivayam R (2008) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African J of Biotechnol 7(12): 1907–1910
- Santoro PH, Neves PMOJ, Alexandre TM, Sartori D, Alves LFA, Fungaro MHP (2008) Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. J Invertebr Pathol 97:83–90
- Shah PA, Pell JK (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl Microbiol Biotech 61:413–423
- Schneider S, Widmer F, Jacot K, Kölliker R, Enkerli J (2012) Spatial distribution of *Metarhizium clade 1* in agricultural landscapes with arable land and different semi-natural habitats. Appl Soil Ecol 52:20–28
- 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 (2013) <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32009L0128:CS:NOT>. Dostupné 7. února 2013
- Smith RF, van den Bosch R (1967) Integrated control. In: Kilgore WW, Douth RL (eds) Pest control: biological, physical, and selected chemical methods. Academic Press, New York, pp 295–340
- Smith RJ, Pehrul S, Guala EA (1981) Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm. J Invertebr Pathol 38:335–344
- Soares AO, Borges I, Borges PAV, Labrie G, Lucas E (2008) *Harmonia axyridis*: what will stop the invader? Biocontrol 53:127–145
- Song T-T, Feng M-G (2011) In vivo passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). J Invertebr Pathol 106:211–216
- Steinkraus DC (2006) Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. J Invertebr Pathol 92: 125–131
- Stern VM, Smith RF, van den Bosch R, Hagen KS (1959) The integrated control concept. Hilgardia 29:81–101
- Strasser H, Vey A, Butt TM (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 Sci Techn 10:717–735
- Sun J, Fuxa JR, Henderson G (2002) Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. J Invertebr Pathol 81: 78–85

- Symmons P (1992) Strategies to combat the desert locust. *Crop Prot* 11:206–212
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel M, Mozaffari J (2006) Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Sci Techn* 16:525–534
- Tefera T, Pringle KL (2003a) Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. *Biocontrol Sci Techn* 13:699–704
- Tefera T, Pringle KL (2003b) Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Invertebr Pathol* 84: 90–95. Doi:10.1016/j.jip.2003.08.001
- Thompson SR, Brandenburg RL, Arends JJ (2006) Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. *Biol Control* 39:401–407
- Townsend RJ, Glare TR, Willoughby BE (1995) The fungi *Beauveria* spp. causes grass grub population collapse in some Waikato pastures. Proceedings of the 48th New Zealand plant protection conference, 48:237–241
- Uma Devi K, Sridevi V, Mohan ChM, Padmavathi J (2005) Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *J Invertebr Pathol* 88:181–189
- van Driesche RG, Bellows TS Jr (1996) *Biological control*. Chapman & Hall, New York
- van Lenteren JC (2000) A greenhouse without pesticides: fact of fantasy? *Crop Prot* 19:375–384
- van Lenteren JC, Babendreier D, Bigler F, Burgio G, Hokkanen H, Kuske S, Loomans A, Menzler-Hokkanen I, van Rijn P, Thomas M, Tommassini M, Zeng QQ (2003) Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *BioControl* 48:3–38
- van Lenteren JC, Loomans AJ, Babendreier D, Bigler F (2008) *Harmonia axyridis*: an environmental risk assessment for Northwest Europe. *BioControl* 53:37–54
- Vandenberg JD, Jackson MA, Lacey LA (1998) Relative Efficacy of Blastospores and Aerial Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the Russian Wheat Aphid. *J Invertebr Pathol* 72:181–183
- Vestergaard S, Cherry A, Keller S, Goettel M (2003) Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen HMT, Hajek AE (eds) *Environmental impacts of microbial insecticides*. Kluwer, Dordrecht, pp 35–62
- Vey A, Hoagland R, Butt TM (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 311–346

- Vidal C, Lacey LA, Fargues J (1997) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *J Econ Entomol* 90:765–772
- Vidal C, Osborne LS, Lacey LA, Fargues J (1998a) Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses. *Biol Control* 12:91–199
- Vidal C, Fargues J, Lacey LA, Jackson MA (1998b) Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia* 143:33–46
- Vilcinskas A, Matha V (1997) Effect of the entomopathogen *Beauveria bassiana* on the humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae. *Eur J Entomol* 94:461–472
- Vu VH, Hong SI, Kim K (2007) Selection of Entomopathogenic Fungi for Aphid Control. *J Biosci Bioeng* 104(6): 498–505
- Wraight SP, Carruthers RI, Bradley CA, Jaronski ST, Lacey LA, Wood P, Galaini Wraight S (1998) Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J Invertebr Pathol* 71:217–226
- Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S (2000) Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol Control* 17:203–217
- Wraight SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST, Vandenberg JD (2009) Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *J Invertebr Pathol* 103:186–199
- Wraight SP, Ugine TA, Filotas MJ, Sanderson JP (2007) Biological control in greenhouses using entomopathogenic fungi. *Biological Control Symposium Proceedings*
- Wraight SP, Jackson MA, de Kock SL (2001) Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds). *Fungi as biocontrol agents, progress, problems and potential*, 253–287
- Yeo H, Pell JK, Alderson PG, Clark SJ, Pye BJ (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag Sci* 59:156–165
- Ypsilos IK, Magan N (2005) Characterisation of optimum cultural environmental conditions for the production of high numbers of *Metarhizium anisopliae* blastospores with enhanced ecological fitness. *Biocontrol Sci Technol* 15(7):683–699
- Zacharuk RY (1970a) Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* (Coleoptera) II. Conidial germ tubes and appressoria. *J Invertebr Pathol* 15:81–91

- Zacharuk RY (1970b) Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* (Coleoptera) III. Penetration of the host integument. *J Invertebr Pathol* 15:372–396
- Zayed A, Soliman MM, El-Shazly MM (2013) Infectivity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) Under Laboratory Conditions. *J Med Entomol* 50(4):796–803
- Zimmermann G (2007a) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Techn* 17:553–596
- Zimmermann G (2007b) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Techn* 17:879–920
- Zimmermann G (2008) The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocont Sci Techn* 18:865–901

10. PŘÍLOHY

Grafický list 1: Inkubační aréna s larvami *T. molitor* 6 dnů od inokulace suspenzí spor izolátu I101 entomopatogenní houby *B. bassiana* o koncentraci 1×10^6 spor/ml (v detailu pak viditelné kompaktní mycelium pokrývající ve třech případech povrch larvy)



Grafický list 2: Inkubační aréna s larvami *T. molitor* 10 dnů od inokulace suspenzí spor izolátu F52 entomopatogenní houby *M. anisopliae* 1×10^6 spor/ml (v detailu jsou pak již zřetelně viditelná ložiska nově se utvářejících konidií—zeleně se zbarvující plochy na myceliu)



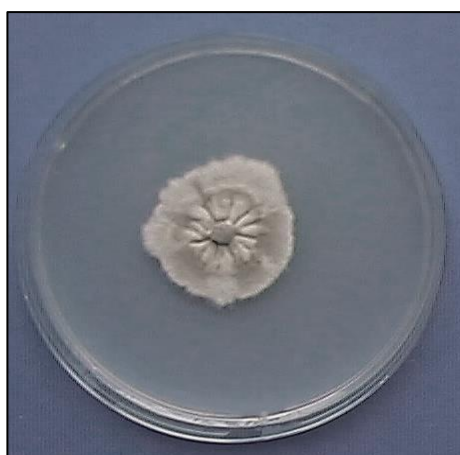
Grafický list 3 (část A): Středové kultury původních izolátů *I. fumosorosea* 172 a 173 a jejich 50. pasáží přes jednotlivé živné substráty po 21 dnech kultivace na PDA v 25 °C



Původní izolát I. fumosorosea 172



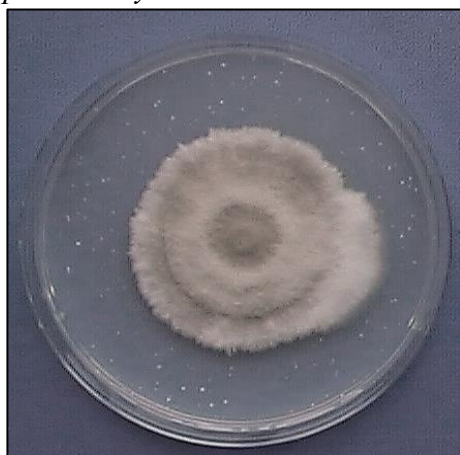
Původní izolát I. fumosorosea 173



Původní izolát 172 po 50. pasáži přes otruby



Původní izolát 173 po 50. pasáži přes otruby



Původní izolát 172 po 50. pasáži přes B. tabaci



Původní izolát 173 po 50. pasáži přes B. tabaci

Grafický list 3 (část B): Středové kultury původních izolátů *I. fumosorosea* 172 a 173 a jejich 50. pasáží přes jednotlivé živné substráty po 21 dnech kultivace na PDA v 25 °C



Původní izolát 172 po 50. pasáži přes A. gossypii



Původní izolát 173 po 50. pasáži přes A. gossypii



Původní izolát 172 po 50. pasáži přes T. urticae



Původní izolát 173 po 50. pasáži přes T. urticae



Původní izolát 172 po 50. pasáži přes PDA



Původní izolát 173 po 50. pasáži přes PDA

Grafický list 4 (část A): Středové kultury vybraných izolátů *B. bassiana* po 21 dnech kultivace na PDA v 25 °C (variabilita v morfotypu kultury)



Izolát B. bassiana NP0003



Izolát B. bassiana NP0004



Izolát B. bassiana NP0005



Izolát B. bassiana NP0027



Izolát B. bassiana NP0028



Izolát B. bassiana NP0030

Grafický list 4 (část B): Středové kultury vybraných izolátů *B. bassiana* po 21 dnech kultivace na PDA v 25 °C (variabilita v morfotypu kultury)



Izolát B. bassiana NP0068



Izolát B. bassiana NP0097



Izolát B. bassiana NP0133



Izolát B. bassiana NP0161



Izolát B. bassiana NP0185



Izolát B. bassiana NP0218

Grafický list 5: Středové kultury vybraných izolátů *B. caledonica* po 21 dnech kultivace na PDA v 25 °C (variabilita v morfortypu kultury)



Izolát B. caledonica NP0013



Izolát B. caledonica NP0107



Izolát B. caledonica NP0145



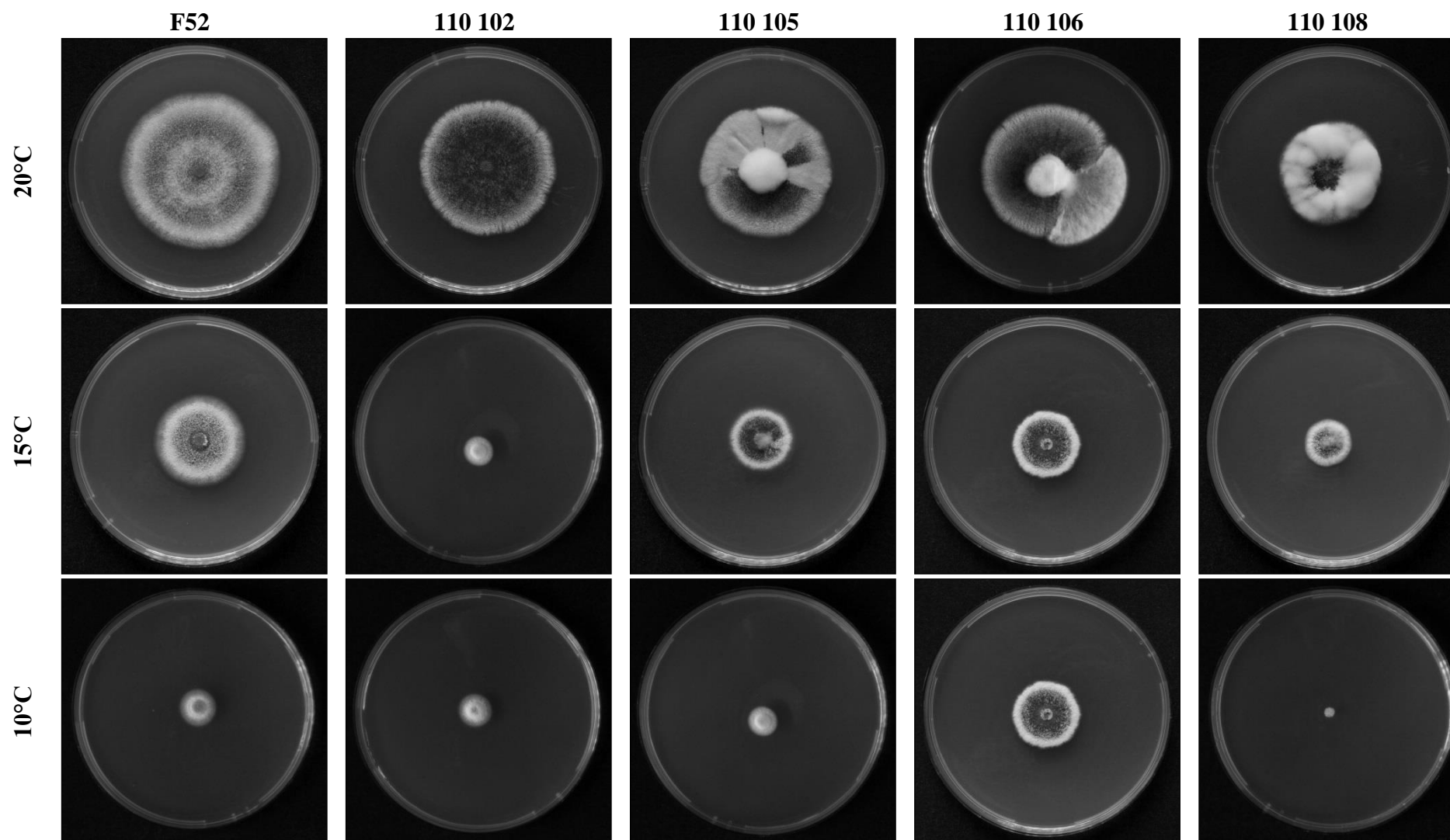
Izolát B. caledonica NP0156



Izolát B. caledonica NP0216



Izolát B. caledonica NP0227

Grafický list 6 (část A): Středové kultury izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* po 21denní kultivaci v jednotlivých teplotách na PDA

Grafický list 6 (část B): Středové kultury izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* po 21denní kultivaci v jednotlivých teplotách na PDA