

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agropodnikání

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vzájemná kompatibilita entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*
s dalšími druhy entomopatogenních hub

Vedoucí diplomové práce

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Autor

Bc. Šárka Oušková

České Budějovice
Duben 2016

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Šárka OUŠKOVÁ**
Osobní číslo: **Z14595**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Agropodnikání**
Název tématu: **Vzájemná kompatibilita entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* s dalšími druhy entomopatogenních hub**
Zadávající katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Cíl diplomové práce je zaměřen na studium vlivu vzájemné kompatibility entomopatogenních druhů hub s důrazem na jejich kolonizaci prostředí a produkci spor. Účinnost kombinace entomopatogenních hub bude sledována na vybraných druzích hostitelů s cílem stanovit optimální podmínky pro vyvolání nákazy hostitelů v laboratorních podmínkách.


- 1) Hodnocení základních růstových parametrů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* v kombinaci s dalšími druhy entomopatogenních hub na různých druzích umělých živných půd.
- 2) Vliv teploty na růst a vývoj entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* v kombinaci s *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Lecanicillium attenuatum*.
- 3) Účinnost kombinace entomopatogenních druhů hub na vybrané hmyzí hostitele.
- 4) Testování kompatibility entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* s vybranými druhy mykoparazitických hub (*Coniothyrium minitans*, *Clonostachys rosea f. catenulata*, popřípadě *Trichoderma virens*).
- 5) Vypracování strategie biologické ochrany rostlin při použití entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* v kombinaci s jinými druhy užitečných druhů hub.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

Bailey A., et al., 2010: Biopesticides. CAB International Cambridge.
Butt T.M., Goettel M.S. 2000: Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.
Esser K., Lemke P.A. 2002: The Mycota XI.-Agricultural Applications. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp 388.
Goettel M.S., Inglis G.D., Wraight S.P. 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.): Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, 255-282.
Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001: Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.
Weiser J., 1966: Nemoci hmyzu. Nakladatelství Akademia.
Články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB, BA, ZR.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 9. března 2015
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2016


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 9. března 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným stanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 18. 4. 2016

.....

Bc. Šárka Oušková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za cenné připomínky, odborné rady, vstřícnost a všestrannou pomoc při zpracování diplomové práce. Dále děkuji Ing. Janě Kročákové za pomoc a cenné rady. Poděkování patří i Olze Divišové za technickou asistenci a pomoc při vyhodnocování pokusů.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na hodnocení kompatibility entomopatogenní houby *I. fumosorosea* s vybranými druhy entomopatogenních a mykoparazitických hub v různých teplotách. Z druhů vláknitých hub byly vybrány kmeny druhů *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. muscarium*, *C. minitans* a *C. rosea* f. *catenulata*. Bylo zjištěno, že kombinace houby *I. fumosorosea* s druhem *L. muscarium* se v prostředí nijak neomezují při všech testovaných teplotách (15, 23 a 25 °C). U ostatních druhů bylo prokázáno určité ovlivnění růstu a produkce spor v kombinaci s houbou *I. fumosorosea*. Při testování účinnosti vybraných druhů vláknitých hub na larvách *T. molitor*, vykázaly nejvyšší účinnost druhy *I. fumosorosea*, *B. bassiana* a *M. anisopliae*. Nejmenší účinnost vykazoval druh *L. muscarium*. U mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* nebyla zaznamenána přímá účinnost na larvách *T. molitor*. U tohoto druhu bylo zjištěno, že není schopen infikovat zdravé jedince, ale napadá oslabené jedince nebo roste saprotrofně na mrtvých jedincích.

Klíčová slova: *Isaria fumosorosea*, entomopatogenní houby, kompatibility, účinnost, radiální růst, produkce spor

ABSTRACT

This thesis is focused on evaluation of the compatibility of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* with different species of entomopathogenic fungi and mycoparasitic fungi at different temperatures. The strains of species *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium muscarium*, *Coniothyrium minitans* and *Clonostachys rosea* f. *catenulata* were selected for experiments base on compatibility. The results showed that combination of *I. fumosorosea* with species *L. muscarium* is compatible. The species do not limit to each other in the environment at all temperatures (15, 23 and 25 °C). On the other side, fungus *I. fumosorosea* in combination with other species have affected their growth and spore production. The efficacy of entomopathogenic fungi against larvae *Tenebrio molitor* was evaluated. The most effective species against larvae were species *I. fumosorosea*, *B. bassiana* and *M. anisopliae*. On the contrary, the smallest effective was observed after infection larvae by *L. muscarium*. Mycoparasitic fungus *C. rosea* f. *catenulata* was not able to directly infect larvae of *T. molitor*. This species did not infect healthy larvae. However it is able to infect weakened individuals or is growing as saprotrophs on the cadavers.

Key words: *Isaria fumosorosea*, entomopathogenic fungi, compatibility, efficacy, radial growth, spore production

1.	ÚVOD	8
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1	Integrovaná ochrana rostlin	10
2.2	Biologická ochrana rostlin	11
2.2.1	Principy biologické ochrany rostlin	11
2.2.2	Strategie využití přirozených nepřátel	12
2.2.3	Kategorie přirozených nepřátel	13
2.3	Charakteristika entomopatogenních hub	16
2.3.1	Vývojový cyklus.....	17
2.3.2	Podmínky pro vývoj nákaz entomopatogenních hub	19
2.3.3	Faktory ovlivňující vývoj a účinnost entomopatogenních hub	19
2.4	Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub	22
2.4.1	Houby rodu <i>Isaria</i> a <i>Paecilomyces</i>	22
2.4.2	Houby rodu <i>Beauveria</i> (Vuillemin)	23
2.4.3	Houby rodu <i>Lecanicillium</i> spp.	24
2.4.4	Houby rodu <i>Metarhizium</i>	25
2.5	Vybrané druhy mykoparazitických hub	26
2.5.1	Druh <i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	26
2.5.2	Druh <i>Coniothyrium minitans</i>	27
2.6	Kultivace vláknitých hub	27
2.7	Biopreparáty na bázi vybraných entomopatogenních hub	28
2.8	Trh mikrobiálních pesticidů	31
2.8.1	Evropský trh mikrobiálních pesticidů v Evropě	31
2.8.2	Trh mikrobiálních pesticidů v Nizozemsku	31
3.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	33
4.	MATERIÁL A METODIKA	34

4.1	Kmeny entomopatogenních hub používané v pokusech	34
4.2	Kultivační média	35
4.3	Populace potemníka moučného <i>Tenebrio molitor</i>	37
4.4	Imobilizace hub do alginátových pelet	37
4.5	Kultivace matečných kultur hub a příprava suspenzí	38
4.6	<i>In vitro</i> testy	38
4.7	<i>In vivo</i> testy	40
4.8	Statistická analýza	41
4.9	Využívaná technika při pokusech	41
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	42
5.1	Vliv umělé živné půdy na růst a výtěžnost spor středových kultur různých druhů vláknitých hub	42
5.2	Kompatibilita mezi entomopatogenní houbou <i>I. fumosorosea</i> a vybranými druhy entomopatogenních a mykoparazitických hub	45
5.2.1	Vliv entomopatogenní houby <i>I. fumosorosea</i> na růst a vývoj dalších entomopatogenních a mykoparazitických hub v jejich vzájemné interakci při 25 °C ..	45
5.2.2	Vliv entomopatogenní houby <i>I. fumosorosea</i> na růst a vývoj dalších entomopatogenních a mykoparazitických hub v jejich vzájemné interakci při 23 °C ..	53
5.2.3	Vliv entomopatogenní houby <i>I. fumosorosea</i> na růst a vývoj dalších entomopatogenních a mykoparazitických hub v jejich vzájemné interakci při 15 °C ..	59
5.3	Vliv entomopatogenních hub a mykoparazitické houby <i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i> na larvách potemníka moučného <i>T. molitor</i>	66
5.4	Strategie biologické ochrany rostlin při použití entomopatogenní houby <i>I. fumosorosea</i> v kombinaci s jinými druhy užitečných druhů hub	68
6.	DISKUZE	71
7.	ZÁVĚRY	75
8.	POUŽITÁ LITERATURA	77
9.	PŘÍLOHY	82

1. ÚVOD

Konvenční systém hospodaření obnáší celou řadu negativních jevů spočívajících v aplikaci syntetických pesticidů, které jsou používány k regulaci škodlivých činitelů. Opakované používání pesticidů má mnohdy za následek znečišťování životního prostředí, hromadění reziduí v půdě, vodě, v živočišných organismech, rostlinách, ale i postihnutí celé řady necílových organismů a ohrožení zdraví lidí. Tyto negativní vlivy se mohou eliminovat například vývojem účinných látek, díky němuž mohou být prohloubeny znalosti o jejich účincích a tím tak zamezit vzniku možných rizik, nebo snížit rizika na minimum. Vývoj účinných látek je však dlouhodobý a především finančně náročný.

Používání konvenčních chemických pesticidů v ochraně rostlin před škodlivými činiteli neustále převažuje. Využívání pesticidů je však velmi problematické z hlediska ochrany životního prostředí. Nepříznivý dopad spočívá v neustále zvyšující se rezistenci hmyzu k insekticidům, což způsobuje neustálou potřebu navyšování dávek nebo přechod na další mnohem účinnější přípravky. Jedním z řešení je výzkum a vývoj nových ochranných prostředků, které jsou založeny na ovlivnění fyziologických pochodů škodlivých organismů nebo na využívání přirozených nepřátel. Biologické prostředky využívají antagonistických vztahů mezi organismy, které potlačují populace škodlivých organismů bez jakéhokoliv narušení přírodní rovnováhy, čímž udržují stabilitu ekosystémů. Patogenní mikroorganismy na rozdíl od konvenčních insekticidů nezpůsobují pro životní prostředí žádnou ekologickou zátěž a pro člověka a necílové organismy nepředstavují žádné riziko.

V posledních letech se dostaly do podvědomí alternativní metody ochrany rostlin, které jsou využívány v rámci integrované ochrany rostlin. Integrovaná ochrana rostlin využívá všech dostupných metod k regulaci populací škodlivých organismů s ohledem na ekonomické, ekologické, hygienické a toxikologické požadavky. Cílem integrované ochrany rostlin je udržení populací škodlivých organismů na přijatelné úrovni (pod prahem škodlivosti). Důležité je dodržováním určitých zásad, jako je například správný oseední postup, vhodné pěstitelské postupy, zamezení šíření škodlivých činitelů a jejich monitoring, podpora a ochrana užitečných organismů a využití antirezistentních strategií. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zastává důležitou úlohu z hlediska sledování a vyhodnocování výskytu četností škodlivých organismů, které přispívají k lepší informovanosti zemědělců.

Velmi důležitou složkou integrované ochrany rostlin je biologická ochrana, která využívá přirozených nepřátel (parazitů, parazitoidů a predátorů) k regulaci populací

škodlivých činitelů. V posledních letech se uplatňují i biologické přípravky na bázi patogenních mikroorganismů (entomopatogenní bakterie, viry, houby a hlístice).

Diplomová práce se zabývá kompatibilitou vybraných druhů entomopatogenních a mykoparazitických hub. U entomopatogenních hub byla sledována kompatibilita mezi houbou *Isaria fumosorosea* v kombinaci s druhy *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Lecanicillium muscarium*. Zároveň byl sledován vliv mykoparazitických hub *Coniothyrium minutans* a *Clonostachys rosea* f. *catenulata* na růst a vývoj entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v jejich vzájemné kombinaci. Všechny testované druhy se vyznačují širokým hostitelským okruhem. Sledován byl jak růst a vývoj jednotlivých druhů, tak i produkce spor hub na různých živných médiích nebo v jejich vzájemné interakci. V práci je sledována i účinnost výše zmíněných druhů vláknitých hub na larvách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) a celková mortalita larev napadených jednotlivými druhy hub.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Integrovaná ochrana rostlin

Přirozenější způsob ochrany rostlin, který upřednostňuje snižování závislosti na pesticidech. Systém preferující mírnější alternativy ochrany rostlin. Celý systém spočívá v účinné ochraně proti škůdcům, chorobám a plevelům, zajišťující kvalitní produkci zemědělských produktů a stabilní výnos. Důležité je snížení možných nebezpečí způsobené vlivem pesticidních přípravků ať už na zdraví lidí nebo životního prostředí. Jedná se o soubor chemických, biologických, fyzikálních a agrotechnických postupů, které se vzájemně doplňují. Z dlouhodobého hlediska dochází pomocí těchto postupů k regulaci populací škodlivých činitelů s ohledem na ekonomickou situaci a bez jakýchkoliv vedlejších nežádoucích ekologických a toxikologických vlivů (Anonym 1).

Velice důležitou roli v IOR hraje monitoring plodin, vhodný zásah a ekonomické aspekty pro zvolení správné aplikace ochrany rostlin na odlišné škodlivé činitele. V případě, kde nelze zvolit jiný způsob regulace populací škodlivých organismů než pesticidy, měli by být použité takové pesticidní prostředky, které vykazují vysokou účinnost na daný škodlivý organismus a mají minimální dopady na lidské zdraví, životní prostředí i necílové organismy. Pesticidy by měly být poslední možností regulace výskytu škodlivých činitelů. Základem je využití všech preventivních opatření. Spojení prostředí a dynamiky populací škodlivých činitelů představuje strategii, kde se využívají všechny možné dostupné regulační způsoby, včetně chemických, fyzikálních a biologických, jejichž cílem je udržení populační hustoty škodlivých činitelů pod hodnotami působících ekonomické škody (Pell *et al.* 2002).

Je známo několik desítek definic integrované ochrany rostlin, z nichž například FAO definuje IOR jako systém snižující četnosti populací škodlivých organismů se záměrem udržet tyto populace na určité tolerované hranici při využívání přirozených metod regulace s ohledem na ekonomické, ekologické, toxikologické i hygienické požadavky. Definice se liší jak v hlavních cílech, tak i v obecných formulacích (Landa 2002).

K potlačení výskytu škodlivých činitelů nebo i jejich úplnému zamezení přispívá například používání certifikovaného osiva, tolerantních, odolných odrůd, střídání plodin, vyvážené hnojení, zavlažování a odvodňování i hygienické opatření zajištěné pravidelnou údržbou strojů a zařízení (Anonym 1).

V roce 2009 byla přijata členy Evropské unie směrnice 2009/128/ES, která je součástí národní legislativy. Směrnice stanovuje rámec pro činnost Společenství za účelem docílit

udržitelného používání pesticidů. Dále je součástí novely zákona o rostlinolékařství č. 199/2012 Sb §5, kam spadá i platná vyhláška č. 205/2012 o obecných zásadách integrované ochrany rostlin, kde je věnován ve vyhlášce odstavec 3 problematice zásad IOR. Zde je IOR definována jako: „Opatření IOR udržují aplikaci přípravků a ostatních způsobů ochrany rostlin na úrovních, které lze z ekologického a hospodářského hlediska odůvodnit, přičemž důraz je kladen zejména na růst zdravých rostlin při minimálním poškození zemědělských i lesních ekosystémů.“

V novele jsou formulovány povinnosti Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu a povinnosti profesionálních uživatelů přípravků na ochranu rostlin. Ministerstvo zemědělství připravilo k zajištění udržitelného používání pesticidů návrh Národního akčního plánu v souladu s požadavky směrnice. Cílem Národního akčního plánu je minimalizovat nebezpečí vzniklá z používání pesticidních přípravků v oblasti ochrany zdraví lidí, životního prostředí, vod, zlepšení používání přípravků bez omezení zemědělské produkce a kvality rostlinných produktů. Dodržování zásad IOR je platné pro všechny profesionální uživatele od 1. 1. 2014 (Anonym 2).

2.2 Biologická ochrana rostlin

Biologická ochrana cíleně využívá k potlačení populací škodlivých činitelů živé organismy. Jde o ochranu prováděnou biologickými prostředky. Biologická ochrana využívá přirozených nepřátel. Jedná se o organismy nepříznivě ovlivňující životy jiných organismů. V přírodě se populace živých organismů snižují pomocí predátorů, parazitoidů, parazitů a dalších mikroorganismů. Biologická ochrana nemá za cíl úplné vymýcení populací škodlivých organismů, ale pouze regulovat jejich četnosti na přijatelnou úroveň pod práh škodlivosti (Landa 2002). V ekosystému existuje určitá rovnováha mezi hostitelem, vnějším prostředím a patogenem. Úspěch biologické ochrany spočívá ve výběru vhodného přípravku proti škodlivým činitelům v určitém prostředí. Důležité je správné vystižení doby aplikace, provedení aplikace vhodnou aplikační technikou, odhadnout stupeň poškození porostu a výběr správné strategie v boji proti škodlivým organismům (Van Driesche, Heinz 2004).

2.2.1 Principy biologické ochrany rostlin

Výběrem vhodných biologických agens dochází k minimalizaci poměrně nízkých škodlivých účinků biologické ochrany na necílové organismy i životní prostředí. U každého

druhu entomopatogenních hub je potřeba vzít v úvahu podmínky pro jejich využití v závislosti na konkrétní situaci. Aplikace biopreparátů ve sklenících je nejjednodušší metodou a nedochází k rozšíření patogena do okolního prostředí. Při použití biopreparátů v polních podmínkách je důležité zhodnotit i možnost nepříznivého šíření patogenního organismu. Aplikace přípravků se provádí různými způsoby. Prvním možným způsobem jsou postřiky suspenzí spor rozpuštěných ve vodě. Dalším způsobem jsou například aplikace do půdy nebo použití práškového koncentráту spor dané houby. Práškové koncentráty jsou ukládány ve sběrných částech feromonových lapačů. U dospělých jedinců nedochází k uvěznění, takže specifické lapače mohou opustit, ale infekce se může rozšiřovat do okolního prostředí díky kontaminaci jejich povrchu těla (Navrátilová 2013).

2.2.2 Strategie využití přirozených nepřátel

Biologická ochrana využívá dvou strategií. První strategie spočívá v úmyslném dovozu přirozených nepřátel z odlišných zemědělských oblastí. Tato strategie je nazývána jako strategie inokulativní. Druhá strategie se zabývá umělým rozmnožováním přirozených nepřátel, kteří jsou následně vypuštěni do porostů napadených škodlivými organismy. Tato strategie je nazývána strategií inundativní.

Inokulativní introdukce

Parazit, predátor, parazitoid či patogenní mikroorganismus je cíleně nasazován v malém množství do nové oblasti, kde došlo k nárůstu výskytu škodlivých činitelů. Eventuelně je nasazován do oblastí dřívějšího výskytu. Inundativní strategie má za cíl přizpůsobení intodukovaného druhu novému prostředí, jeho uchycení, rozšíření a především namnožení (Van Driesche, Heinz 2004).

Například populace odolných, dravých roztočů *Typhlodromus pyri* byli nasazeny do ovocných sadů proti svluškám. Inokulativní introdukce se vyznačuje výrazně ekologickým charakterem. Podíl technologických prvků je na minimální úrovni, které jsou potřebné pro nízkokapacitní chovy, využití biotechnologií pro nasazení malého počtu jedinců a odběr bioagens v oblasti jejich přirozeného výskytu (Pultar 2003).

Inokulativní introdukce vyžaduje podporu od národních a mezinárodních organizací, včetně karanténních zařízení (Landa 2002).

V biologické ochraně existuje ještě sezonní inokulativní introdukce, která se využívá k ochraně rostlin pěstovaných ve skleníkách. Mezi nejčastější skleníkové škůdce patří například molice skleníková a molice bavlníková, proti kterým se nasazuje parazitická vosička *Encarsia formosa*, dále sviluška chmelová, mšice a třásněnky. Hlavním cílem je dosáhnout ochranného účinku téměř okamžitě, aby regulace populací škodlivých činitelů byla co největší. Přirozené nepřátele získáváme sběrem nebo produkcí masových chovů. Takto získaní přirození nepřátelé jsou následně během pěstitelské sezóny postupně nasazovány do porostů (Landa 2002).

Inundativní introdukce

Principem inundativní introdukce je jednorázové vysazování velkého počtu přirozených nepřátel v době zvýšeného výskytu populací škodlivých činitelů. Cílem je posílit populace, které již existují. Používá se především proti škůdcům jednoletých plodin. Parazitická vosička *Trichogramma evanescens* je často využívána a nasazována proti populacím zavíječe kukuřičného. Hlavními aspekty inundativní introdukce jsou početné chovy predátorů a parazitoidů, biotechnologická produkce mikroorganismů a dostupnost biopreparátů (Bale *et al.* 2008).

2.2.3 Kategorie přirozených nepřátel

Přirození nepřátelé jsou organismy, které nepříznivě ovlivňují životy jiných organismů. Dělí se na dvě skupiny. Do první skupiny se řadí makroorganismy, jako jsou paraziti, predátoři a parazitoidi. Druhá skupina přirozených nepřátel zahrnuje různé druhy mikroorganismů, například bakterie, houby, viry a hlístice (Hajek 2004).

První skupina přirozených nepřátel

Makroorganismy

Makroorganismy patří do první skupiny přirozených nepřátel. Jsou to živé organismy. Do této skupiny patří paraziti, predátoři a parazitoidi. Parazitoidi jako jediní z této skupiny nezabíjejí svého hostitele (Landa 2002).

Predátoři

Predátor je organismus konzumující jiné organismy a na své hostitele je vázán pouze potravně. Napadá značný počet druhů kořistí, u kterých nerozlišuje vývojová stádia. Kořisti jsou usmrceny ihned po napadení. Živí se i potravou rostlinného původu. Během jejich života dochází k usmrcení několika hostitelů. Predátoři vyhledávají kořist prostřednictvím pachu produktů, které jsou vylučovány kořistmi (například medovice). Vyskytují se jak v podzemních, tak i nadzemních částech rostliny.

Významnými predátory jsou například draví roztoči *Amblyseius californicus* a *Typhlodromus pyri* proti svluškám, dále *Amblyseius degenerans* a *Amblyseius cucumeris* proti třásněnkám. Proti mšicím se využívá zlatoočko *Chrysoperla carnea* a proti červcům jsou významnými predátory sluněčka *Cryptolaemus montrouzieri* a *Hippodamia convergens* (Hajek 2004).

Paraziti

Paraziti jsou organismy žijící buď na povrchu těla jiného organismu (ektoparazit) nebo oslabují tělo hostitele zevnitř (endoparazit). To znamená, že hostitel není usmrcen okamžitě. Živiny jsou přijímány z těla hostitele, které postupně poškozuje.

Parazitoidi

Parazitoid je organismus, který je vázán na tělo hostitele nejen potravně, ale i částí svého vývojového cyklu. Hostitelé jsou tedy usmrcováni larválním vývojem, který probíhá uvnitř těla hostitele. Larvy jsou živeny tělními tekutinami a tkáněmi hostitele, zatímco dospělí parazitoid se živí rostlinnou potravou. Během vývoje je vždy usmrcen pouze jeden hostitel (Honěk *et al.* 2008).

Druhá skupina přirozených nepřátel

Mikroorganismy

Mikroorganismy se uplatňují v biologické ochraně rostlin proti škodlivým organismům. Jsou schopné vyvolat hromadné onemocnění škodlivých organismů a způsobit jejich následný úhyn. Jedná se o specifické organismy, jako jsou například bakterie, viry, houby a háďata. Mikroorganismy jsou dobře viditelné pouze pod mikroskopem. Pro efektivní

aplikaci v boji proti škůdcům jsou mikroorganismy účelově izolovány a technologicky množeny (Landa 2002; Tichá 2001).

Entomopatogenní bakterie

Do současné doby bylo odizolováno více jak 90 druhů entomopatogenních bakterií, které jsou schopné vyvolat infekční onemocnění. Jedná se o jednobuněčné organismy postrádající chloroplasty a mitochondrie. Čeleď *Bacillaceae*, zejména rody *Bacillus* a *Clostridium*, patří mezi nejvýznamnější v biologické ochraně. Infekce hostitele je způsobena požitím potravy, která byla infikovaná bakteriemi. Bakterie parazitují na epitelu střeva. Některé druhy entomopatogenních bakterií usmrtí hostitele během poměrně krátké doby z důvodu poškození stěny střeva produkcí toxinů. Jiným druhům naopak trvá někdy až měsíc než svého hostitele usmrtí (Hajek 2004).

Mezi nejznámější bakterie patří *Bacillus thuringiensis*. Tato bakterie je obsažena v preparátu BIOBIT XL, který je snadno mísitelný s celou řadou fungicidních přípravků a pomocných látek. Preparát je určen proti škodlivým housenkám motýlů. Hlavní předností preparátu je nulová toxicita k necílovým organismům. Aplikace přípravku se provádí běžnými postřikovači v období líhnutí housenek. Bakterie poškozují funkci trávicího ústrojí, díky čemuž housenky přestávají přijímat potravu a zhruba po 3 dnech dochází k jejich úmrtí (Anonym 3).

Entomopatogenní viry

Entomopatogenní viry jsou obligátní parazité, jejichž reprodukce závisí na hostitelském organismu. Reprodukce virů probíhá nitrobuněčně. Čeleď *Baculoviridae*, do níž náleží dva velmi významné rody *Granulovirus* a *Nucleopolyhedrus* jsou nejvýznamnějšími v biologické ochraně. Nejčastěji jsou napadány larvy hostitele. Hostitel se infikuje požitím potravy, která je napadená virem. Viry způsobují poškození trávicího traktu a tělní obsah hostitele se postupně mění v tekutý sekret. Hostitele je usmrcen v rozmezí 5 - 8 dnů. Virus je přenášen napadenými či mrtvými larvami (Bailey *et al.* 2010).

Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby se vyznačují širokým hostitelským okruhem. Mají schopnost aktivně pronikat přes kutikulu hostitele a tím vyvolat infekční onemocnění. Infekce může proběhnout na všech vývojových stádiích hmyzu. V biologické ochraně jsou

entomopatogenní houby často vyhledávané z důvodu efektivního snižování populací škodlivých činitelů (Landa 2002).

Entomopatogenní hlístice

Entomopatogenní hlístice patří mezi obligátní organismy, které mají 4 vývojová stádia. Infekční onemocnění však vyvolává pouze třetí vývojový stupeň. Je to dáno specifickými vlastnostmi larev třetího stupně. Larvy se dostávají do těla hostitele přes dýchací, ústní a pohlavní aparát. Hlístice obsahují v přední části zažívacího traktu bakterie rodu *Photorhabdus* a *Xenorhabdus*, které jsou po průniku vypuštěny do hemolymfy hostitele. Dochází k rychlému namnožení bakterií a usmrcení hostitele vlivem rozpadu vnitřních orgánů. Hlístice díky symbióze s bakteriemi dokončuje svůj vývoj uvnitř tělní dutiny hostitele (Landa 2002; Bailey *et al.* 2010).

Na bázi entomopatogenních hlístic jsou vyráběny biopreparáty firmou BIOCONT sídlící v Brně. Využívají se například hlístice *Heterorhabditis megidis* působící na larvy lakonosců nebo *Steinernema feltiae* s účinkem proti larvám smutnic (Anonym 4).

2.3 Charakteristika entomopatogenních hub

Entomopatogenní houby se vyznačují širokým hostitelským okruhem. Mají schopnost aktivně pronikat přes kutikulu hostitele a tím vyvolat infekční onemocnění. Infekce může proběhnout na všech vývojových stádiích hmyzu. V biologické ochraně jsou entomopatogenní houby často vyhledávané z důvodu efektivního snižování populací škodlivých činitelů (Landa 2002).

Představují velmi různorodou skupinu heterotrofních eukaryotických organismů, u nichž došlo během evolučního procesu k vytvoření celé řady adaptačních mechanismů, díky kterým se mohou přizpůsobit i velmi diverznímu prostředí. Entomopatogenní houby se mohou rozmnožovat buď pohlavně či nepohlavně. (Inglis *et al.* 2001). Jedná se o mikroorganismy nejčastěji asociované s hmyzem, které patří do polyfyletické skupiny organismů, vytvářejících významné symbiotické vztahy s cévnatými rostlinami a živočichy v ekosystému. Růst entomopatogenních hub na povrchu těl různých hostitelů je narozdíl od ostatních skupin entomopatogenních mikroorganismů snadno vizuálně patrný, jelikož mají schopnost pronikat do hostitele přímo přes kutikulu a/nebo k pronikání do hostitele využívají přirozených otvorů (Bruns *et al.* 1991). V současnosti je známo více jak 750 druhů hub, které

mohou vyvolat onemocnění u mnoha druhů hmyzu. Entomopatogenní houby mohou parazitovat na zástupcích všech řádů hmyzu a napadat všechna jejich vývojová stádia. Nejčastěji parazitují na larvách a kuklách. Dospělci a vajíčka hmyzu jsou houbami infikováni jen zřídka. Nejčastější výskyt byl zaznamenán na družících z řádů rovnokřídlých (*Orthoptera*), ploštíc (*Hemiptera*), stejnokřídlých (*Homoptera*), třásnokřídlých (*Thysanoptera*), motýlů (*Lepidoptera*), brouků (*Coleoptera*) a dvoukřídlých (*Diptera*). Růst a vývoj entomopatogenních hub je výrazně ovlivňován zejména abiotickými faktory, především relativní vzdušnou vlhkostí a teplotou (Nielsen *et al.* 2007). Obecně u houbových nákaz hmyzu v porovnání s ostatními entomopatogenními mikroorganismy hraje důležitou úlohu stav hostitele, vliv vnějšího prostředí a dávka houbového inokula. Entomopatogenní houby mezi sebou zahrnují jak vysoce specifické druhy (jeden hostitel, či vývojové stadium), tak i méně specifické (celá řada rodů, druhů, čeledí hmyzu). Specifickým druhem jsou například houby rodu *Aschersonia*, které mají schopnost infikovat molice nebo červce. Mezi polyfágní druhy lze zařadit houbu *Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Lecanicillium muscarium* (Weiser 1966).

2.3.1 Vývojový cyklus

Základním předpokladem vzniku infekce a její průběh je ovlivňován mnoha aspekty, a to především vlastnostmi patogena a hostitele. Houbové onemocnění vzniká přichycením konidií na povrchu těla hostitele. Ve většině případů dochází k pronikání houbových vláken přes kutikulu hmyzu. Dalším možným způsobem je pronikání infekce přes ústní ústrojí hostitele, odkud se spory dostávají do zažívacího traktu hmyzu. Třetím místem vzniku onemocnění houbovými sporami jsou stigmata hmyzu a posledním způsobem je vstup infekce do těla přes pohlavní aparát hmyzu.

Houbové onemocnění vzniká po přichycení konidií k povrchu těla hostitele. K přichycení ke kutikule hmyzu dochází díky hydrofobnosti konidií. Některé druhy hub mají pro tento proces konidie vybaveny adhezivními látkami, díky nimž vytvářejí při prvním kontaktu pevnou vazbu s kutikulou hostitele. Kutikula hmyzu obsahuje látky důležité pro identifikaci jednotlivých druhů hub. Jedná se především o volné aminokyseliny a peptidy, které způsobují přichycení a klíčení konidií. Stupeň klíčení a úspěšnou infekci ovlivňuje řada faktorů, kromě vnímavého hostitele, jeho stádia a virulenci kmene, například ještě faktory životního prostředí, jako jsou relativní vzdušná vlhkost a optimální teplota. Primární

přilnavost konidií může probíhat buď vzájemným působením mezi dvěma hydrofobními povrchy (kutikula hmyzu a konidie), nebo prostřednictvím elektrostatických sil a molekulárních interakcí, které jsou přítomny na povrchu kutikuly hmyzu i konidií. Houby se začínají vyvíjet v místě dotyku (Samson *et al.* 1988). Konidie jsou ve fázi klíčení dobře energeticky vybaveny. Využívají své zásobní látky a proto nepotřebují získávat žádné externí živiny. Limitujícími faktory pro klíčení konidií jsou především teplota a relativní vzdušná vlhkost. V důsledku vysoké relativní vzdušné vlhkosti, kdy konidie přijímají vodu, dochází k jejich nabobtnání. Postupně dochází k pronikání primárního klíčku a tvorbě penetrační struktury (např. apresorium) na špičce klíčku. Apresorium je útvar polštářkovitého tvaru, který produkuje enzymy změkčující chitinový povrch a umožňuje tak narušení kutikuly hostitele. Z apresoria se následně začne vytvářet penetrační hrot, díky kterému dochází k průniku houbového onemocnění do útrob těla hmyzu. Houby pronikají zejména přes tenčí, nesklerotizované části pokožky, jako jsou spoje mezi jednotlivými segmenty (Zimmermann 2007).

Po proniknutí penetračního hrotu do těla hmyzu dochází k tvorbě invazivních hyf, které velmi rychle kolonizují tělní dutinu. Hyfová tělíska se postupně množí pučením v hemocelu uvnitř tělní dutiny. Houbový organismus však musí nejdříve překonat imunitní obranné látky hostitele po proniknutí do jeho těla. S těmito imunitními obrannými látkami se patogen vyrovnává pomocí produkce toxinů a dalších sekundárních metabolitů. Kombinací těchto dějů, jako je invaze patogena do tělní dutiny hostitele a její destrukce dochází k usmrcení hostitele. Smrt hostitele tak ukončuje parazitickou fázi patogena a začíná fáze saprotrfí. Smrt hostitele je zapříčiněna působením kombinací sekundárních metabolitů, využitím tkání, fyzickým bráněním, cirkulací hemolymfy a poškozením orgánů (Inglis *et al.* 2001). Po usmrcení hostitele dochází bezprostředně k prorůstání houbového mycelia na povrch těla usmrceného jedince za vhodných podmínek. Následně se na vzdušném myceliu začínají vytvářet fruktifikační orgány typické pro daný druh. Saprotrfí fáze patogena je zakončena úplnou sporulací, která se projevuje tvorbou nových „sekundárních“ konidií. Takto nově vyprodukované konidie si jsou schopny udržet vitalitu po dlouhou dobu (až několik měsíců) díky dormantnímu stavu, ve kterém se nacházejí. Šíření a přilnavost konidií k povrchu těla vhodného jedince ukončuje dočasnou dormanci konidií. Patogen se může šířit různými způsoby, ať už přímým kontaktem zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo konidiami šířených pasivně pomocí vody či proudění vzduchu (Osborne, Landa 1992).

2.3.2 Podmínky pro vývoj nález entomopatogenních hub

K nejčastějším výskytům přirozených epizootií dochází během vlhkých podmínek. Účinnost entomopatogenních hub je ovlivněna virulentností kmenů populace hmyzu, přítomností patogenních druhů, vnímavostí stádia v populaci a na vhodných podmínkách prostředí. Důležitá je zejména relativní vzdušná vlhkost a teplota. V případě houbového onemocnění u půdních škůdců je dalším důležitým faktorem i půdní struktura vedle teploty a relativní vzdušné vlhkosti. Entomopatogenní houby mohou být velice důležitým přirozeným činitelem v populacích škůdců hospodářských plodin a vhodným prostředkem například k vymýcení populací mšic, třásněnek, larev dvoukřídlého hmyzu škodících na kořenech a housenek (Coombs, Coombs 2003).

Nejkritičtější fází vývojového cyklu představuje klíčení konidií. Konidie ve fázi klíčení potřebují relativní vzdušnou vlhkost nad 90 % a teplotu v rozmezí 20 – 30 °C. Nároky na relativní vzdušnou vlhkost nejsou tak vysoké pouze při průniku patogena do těla hostitele. Spory některých entomopatogenních hub zvládají přežít krátkodobě i teploty vyšší kolem 40 – 45 °C a jiné druhy naopak i dlouhodobé zmrazení (Tanada, Kaya 1993).

2.3.3 Faktory ovlivňující vývoj a účinnost entomopatogenních hub

Účinnost a průběh infekce hmyzu, způsobených entomopatogenními houbami nejvýrazněji ovlivňují faktory biotické a abiotické. Mezi faktory biotické patří fyziologické podmínky hostitele, patogena a hostitelská rostlina. Mezi faktory abiotické patří relativní vzdušná vlhkost, teplota, sluneční záření a půda. Všechny tyto faktory ovlivňují klíčení konidií, pronikání hyf přes kutikulu hostitele, prorůstání houby na povrch těla hostitele i následující šíření hub do prostředí (Drummond *et al.* 1987; Inglis *et al.* 2001).

Biotické faktory

Patogen

Patogenita je určitá schopnost patogena vyvolat onemocnění v závislosti na celé řadě faktorů. Mezi tyto faktory patří například fyziologie houby (produkce enzymů a toxinů), fyziologie hostitele (obránné mechanismy) a životní prostředí. Patogenita hub je založena na vztahu hostitel – patogen a jejich vzájemné kompatibilitě. Kompatibilita je ovlivněna schopností patogena rozpoznat daného hostitele a překonat jeho obranné mechanismy. Entomopatogenní houby mají široké spektrum hostitelů. Tyto spektra se však liší v závislosti

na jednotlivých druzích hub. Velice důležitá je kompatibilita virulentních kmenů hub s cílovým hostitelem. V opačném případě nedochází k infekci populace hmyzu. Například *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* mají široký hostitelský okruh z mnoha řádů členovců a *Aschersonia aleyrodinis* má schopnost vyvolat infekci jen u některých druhů molíc (Inglis *et al.* 2001).

Hostitel

Propuknutí infekce houbového onemocnění u populací hmyzu ovlivňuje celá řada faktorů. Do těchto faktorů patří jak fyziologické, tak i morfologické faktory. Jedná se například o výživu škůdce, genetické založení, vývojové stadium, hustotu populace a tlak vnějšího prostředí. Všechny tyto faktory mohou vytvořit určitý tlak na populace hmyzu a podpořit tak rozvoj infekce houbového onemocnění díky větší náchylnosti populací hmyzu. Každá etapa vývojového cyklu hmyzu je různě náchylná k infekci. Z tohoto důvodu jsou larvy a kukly hmyzu nejčastěji infikovaným stadiem (Feng *et al.* 1985).

Hostitelská rostlina

Rostliny produkují celou škálu chemických látek, pomocí kterých mají schopnost ovlivňovat náchylnost škůdců k houbovému onemocnění či působit na životnost konidií. Závisí to na biologické aktivitě, na koncentraci chemických látek a jejich charakteru. Hostitelské rostliny díky růstu, morfologii a produkci chemických látek mohou přímo či nepřímo ovlivňovat účinnost entomopatogenních hub (Butt 2002).

Abiotické faktory

Teplota

Teplota patří mezi jeden z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících vývojový cyklus a účinnost entomopatogenních hub. Optimální teplotní podmínky se liší podle druhu entomopatogenních hub. Většině druhů hub vyhovuje teplotní rozmezí 20 °C – 25 °C, ale k infekci může docházet i při teplotách nižších 15 °C nebo vyšších. Při teplotách nad 30 °C dochází k postupnému zpomalení růstu a při teplotách nad 37 °C k jeho úplnému zastavení. Pro houby přežívající v půdě je optimální teplota závislá na kmenech entomopatogenních hub, na druhu a typu půdy a v neposlední řadě i na přítomnosti přirozených nepřátel (Inglis *et al.* 2001). Byla provedena studie na odlišných izolátech *I. fumosorosea* proti molici *B. argentifolii*, kde byl posuzován vliv teplot na jejich účinnost a rychlost růstu. Izoláty

pocházely ze dvou odlišných oblastí (z jihu USA a oblasti západní Asie). V USA byly izoláty odebrány z vlhké i suché subtropické oblasti a v západní Asii z vlhké tropické oblasti. Vývoj izolátů probíhal v poměrně širokém teplotním rozmezí od 8 °C – 35 °C. Izoláty vykazaly ideální růst při teplotách 25 °C – 28 °C. Indické kmeny vykazaly nejlepší odolnost vůči vysokým teplotám (Vidal *et al.* 1997).

Vlhkost

Pro klíčení konidií entomopatogenních hub je důležitým a nezbytným faktorem relativní vzdušná vlhkost. Vlhkost podporuje růst entomopatogenních hub, ovlivňuje rozvoj houbového onemocnění v populacích hmyzu a má vliv na odolnost hub a jejich přežívání (Hall 1981). Většina entomopatogenních hub potřebuje pro klíčení konidií a růst mycelia relativní vzdušnou vlhkost nad 90%. V případě nepříznivých podmínek jsou entomopatogenní houby schopny vytvořit uvnitř těla hostitele pouze houbové mycelium a saprotrofní fázi vývoje dokončit až za příznivých podmínek (Drummond *et al.* 1987). Vývoj entomopatogenních hub lze cíleně podpořit v určité míře například olejovými substancemi přidaných do kapalného prostředí konidií. Olej zvyšuje přilnavost hub k tělu napadeného hostitele a podporuje klíčení konidií (Butt 2002).

Sluneční záření

Podstatným faktorem pro většinu entomopatogenních hub je sluneční záření. Sluneční záření působí na přežívání konidií a jejich uvolňování. Vlivem slunečního záření může docházet k poškození konidií především ultrafialovým zářením. Ultrafialové záření je škodlivější než infračervené a viditelné záření (hlavně paprsky UVB spektra, 285 – 320nm), které působí škodlivě na chromozomální strukturu DNA všech mikroorganismů. (Ignoffo, Garcia 1978). Oproti tomu přirozené sluneční záření pozitivně ovlivňuje odolnost entomopatogenních hub. Důležitým faktorem je i pigmentace konidií. Méně pigmentované konidie vykazaly nižší odolnost vůči slunečnímu záření než konidie s vyšším obsahem pigmentu. Citlivost entomopatogenních hub na sluneční záření je odlišná podle druhu. Mezi nejméně odolné houby proti slunečnímu záření patří *B. bassiana* a *I. fumosorosea*. Mnohem vyšší odolnost prokázaly konidie *M. flavoviridae* (Ignoffo 1992).

2.4 Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub

2.4.1 Houby rodu *Isaria* a *Paecilomyces*

Entomopatogenní houby *I. fumosorosea*, *I. javanica*, *I. farinosa* a *I. tenuipes* jsou nejvýznamnějšími druhy rodu *Isaria*. Zařazují se do říše hub – oddělení pravých hub s formou pohlavního rozmnožování nebo pomocného oddělení hub nedokonalých s formou nepohlavního rozmnožování. Dříve tyto druhy patřily do rodu *Paecilomyces*, ale na základě fylogenetických studií a posuzovaných polyfyletických vztahů, byly tyto druhy přeřazeny do nového rodu *Isaria* (Luangsa-Ard *et al.* 2004). Jedná se o polyfágní, akarifágní a nematofágní druh entomopatogenní houby, která má široké hostitelské spektrum. Vyvolává nákazy na zástupcích mnoha řádů hmyzu, jako jsou například rovnokřídlí (*Orthoptera*), polokřídlí (*Hemiptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), brouci (*Coleoptera*), dvoukřídlí (*Diptera*) a motýli (*Lepidoptera*). Izoláty *I. fumosorosea* lze získat z napadených těl hmyzu, vzduchu, vody, půdy, rostlin i dalších hub. Vyskytuje se teda v zemědělských i nezemědělských půdách i v nadzemních částech rostlin (Zimmermann 2008). Tato houba je schopna vyvolat houbové onemocnění u více než 40 druhů hmyzu. Nejčastějšími hostiteli houby *I. fumosorosea* i *I. farinosa* jsou různé druhy mšic, molice, červců a třásněnek. V Číně, v oblasti Pekingu byl v roce 1983 zaznamenán první výskyt entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v populaci molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum*. Tento vysoce virulentní kmen prokázal velice silné epizoozie, které poškodili molici skleníkovou. Další významný výskyt přirozené epizoozie byl zaznamenán na Floridě v populaci molice tabákové *Bemisia tabaci* (Osborne *et al.* 1990). Tento odizolovaný kmen dostal označení Apopka 97 podle místa zachycení a odizolování. Na bázi kmene Apopka 97 jsou v současné době vyráběny komerční biopreparáty (Faria, Wright 2007).

Isaria fumosorosea se vyznačuje tím, že na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách vytváří bílé vatovité mycelium, které se postupně mění z bílé barvy do narůžovělého až šedofialového odstínu. V závislosti na stupni vývoje kultury dochází ke změně odstínu barvy houbového mycelia. Veliké množství konidií pokrývá celý povrch těla infikovaného hostitele a dochází k přeměně vatovitého mycelia na prašné. (Landa 2002). *I. fumosorosea* tvoří na hyfách přeslenovitě uspořádané konidiofory, které jsou vzpřímené 100 μm dlouhé, v průměru 1,0 – 2,5 μm. Postupně se na každém konidioforu vytváří 3 – 6 fialid (konidiogenních buněk). Fialidy mají lahvicovitý tvar a výrazný krček o průměru 0,5 μm. Pučením se z fialid vytváří konidie oválného tvaru, které jsou průhledné až mírně narůžovělé. Velikost konidií se pohybuje kolem 2,5 – 4,0 x 1,4 – 2,2 μm. Mladší konidie postupně

odsouvají starší konidie do tvořících se řetízků. Řetízek může obsahovat více než 50 konidií (Osborne, Landa 1992).

V příznivých podmínkách se mohou objevit první příznaky onemocnění u napadeného hostitele způsobené houbou *Isaria fumosorosea* od 48 do 72 hodin. K úplné sporulaci může docházet 5. – 7. den od začátku infekce. Pro vývoj entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* je důležitá optimální teplota 20 až 30 °C, přičemž 25 °C je nejvhodnější a při teplotách nad 30 °C dochází ke zpomalení až úplnému zastavení růstu a vývoje houby. Pro celý proces klíčení a uchycení konidií je podstatná relativní vzdušná vlhkost nad 95 % po dobu 10 – 12 hodin (Vidal *et al.* 1997).

Isaria fumosorosea má infekční cyklus ve srovnání s jinými druhy entomopatogenních hub podstatně rychlejší. Například s druhem *Lecanicillium muscarium* má *Isaria fumosorosea* dobu infekčního cyklu kratší o 1 – 3 dny a druh *Aschersonia aleyrodis* má dobu infekčního cyklu delší o 4 – 7 dní (Landa, Jiranová 1988).

2.4.2 Houby rodu *Beauveria* (Vuillemin)

Mezi nejvýznamnější druhy rodu *Beauveria* patří *B. bassiana*, *B. tenella*, *B. brongniartii*. Jedná se široce polyfágní druhy hub běžně se vyskytující v půdě, kde způsobují onemocnění půdního hmyzu. Parazutují na stádiích hmyzu, která v půdě pouze přezimují nebo běžně žijí. *Beauveria bassiana* má schopnost vyvolat onemocnění na zástupcích z řádů rovnokřídlých (*Orthoptera*), brouků (*Coleoptera*) a motýlů (*Lepidoptera*) (Humber 1997). Nákazy způsobené druhy rodu *Beauveria* jsou označovány jako „bílé muskardiny“ z důvodů porůstání nakaženého jedince hustě bílým mycelium (Weiser 1966).

Beauveria bassiana má bílé, postupně světle žluté až načervenalé kolonie. Na vzdušném myceliu se utvářejí konidiogenní buňky s kulatou či lahvicovitou bazální částí. Na každé konidiogenní buňce se utváří rachys (apikální část), kde jsou konidie uspořádané v cik-cak formaci (Zimmermann 2007). Nepřehrádkované konidie se nacházejí na každém zubu rachysu. Konidie jsou velké 2 – 3 x 2 – 2,5 μm. Jsou kulovitého až elipsoidního tvaru. Konidie s konidiofory vytvářejí při plné sporulaci bílé shluky podobající se bavlněným míčkům (Humber 1977).

Celá řada faktorů, jako jsou relativní vzdušná vlhkost, optimální teplota, vývojové stadium, vnímavost hostitele i kutikulární lipidy mají vliv na rozvoj infekčního onemocnění

a klíčení konidií. Optimální teplota pro růst *B. bassiana* je 23 – 26 °C a relativní vzdušná vlhkost 80 – 100 %. Při teplotě 50 °C spory hynou za pouhých 10 minut (Zimmermann 2007).

Infekci způsobují konidie klíčením po přichycení ke kutikule hmyzu. Houby se dostávají do těla nejčastěji přes méně sklerotizované části těla hostitele. Dalšími možnostmi pronikání houby do těla hostitele jsou přes ústní otvor a střevo, přes stigmata hmyzu a pohlavní orgány. Počátek houbového onemocnění vzniká v místě kontaktu, kdy dojde k nabobtnání spory a vypuštění klíčku, který pronikne do těla hostitele (Weiser 1966). Houba *Beauveria bassiana* produkuje sekundární metabolit nazývaný beauvericin, který oslabuje imunitní systém hostitele. Uvnitř těla napadeného hostitele dochází k tvorbě oválných blastospor, které vytvářejí husté mycelium. To způsobuje postupnou mumifikaci těla. V konečné fázi dochází k prorůstání hyfových vláken na povrch těla hostitele, kde se utváří vzdušné mycelium s novými konidiami (Landa *et al.* 2007).

2.4.3 Houby rodu *Lecanicillium* spp.

Lecanicillium spp., dříve známé pod názvem *Verticillium lecanii*, jsou velmi rozšířené entomopatogenní houby. Do rodu *Lecanicillium* spp. je zahrnuto 15 druhů, z nichž nejvýznamnější je *Lecanicillium lecanii*. Houby rodu *Lecanicillium* mají široké spektrum hostitelů, jako jsou háďátka, bezobratlí, rostliny i houby. Nejčastěji však parazitují na mšicích, červcích a molících spadajících do řádu stejnořídlých. Kmeny *Lecanicillium lecanii* s většími sporami vyvolávají infekční onemocnění u molíc, zatímco kmeny s malými sporami způsobují infekci převážně mšic. Jedná se o široce polyfágní druh patogena, který má schopnost se živit i odumřelými organickými materiály (Hall 1976).

Pro klíčení spor a růst mycelia je důležitá optimální teplota 15 – 25 °C a relativní vzdušná vlhkost 85 – 90 %. Konidie drží při sobě díky mucilagenní hmotě. Mucilagenní hmota zvyšuje schopnost konidií přichytit se lépe k tělu hostitele. Nejsnáze se infikují nymfy nižších instarů. K infekčnímu onemocnění hmyzu dochází hyfami, které pronikají přes kutikulu napadeného jedince. Uvnitř těla dochází k poškození vnitřních orgánů a následnému usmrcení hostitele. *Lecanicillium lecanii* vytváří bílé až krémové mycelium. Konidiofory mají podlouhlý, úzký, lahvicovitý tvar a vytvářejí se na vzdušném myceliu. Konidiofory mají přeslenovité uspořádání, jsou tvořeny postupně a mohou proti sobě vyrůstat i 2, 3 až 4 konidiofory z jednoho místa. Nově vytvořené konidie odsouvají starší konidie do shluků.

Shluky konidií jsou v konečné fázi sporulace pokryty mucilagenní hmotou udržující kompaktní tvar konečného útvaru (Hall 1985).

Entomopatogenní houby rodu *Lecanicillium* spp. během vývojového cyklu produkují kyselinu dipikolinovou a bassianolide, což jsou insekticidní toxiny. Tyto druhy hub mají mykoparazitický status. Jsou schopny parazitovat dokonce i na padlí a rzích (Kavková, Čurn 2005).

2.4.4 Houby rodu *Metarhizium*

Do rodu *Metarhizium* náleží 5 druhů hub: *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, *M. album*, *M. brunneum* a *M. guizhouense*. U rodu *Metarhizium* známe pouze anamorfní stádia. Vyjimka je jen u druhu *M. taii*, který má telemorfu. Kmeny *M. anisopliae* však ztratili schopnost pohlavní reprodukce (Driver *et al.* 2000).

Entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae* byla poprvé odizolována z vrubounovitého brouka *Anisoplia austriaca* (listokaz pšeničný) a podle toho dostala pojmenování. Rod *Metarhizium* se nachází jak v zemědělských tak i nezemědělských půdách a v lesních ekosystémech mírného pásma. Jedná se o široce polyfágní druh houby. Houba *M. anisopliae* vyvolává houbové onemocnění u více než stovky druhů hmyzu z různých řádů. Nejčastěji parazituje na řádech hmyzu polokřídlých, rovnokřídlých, dvoukřídlých, brouků, blanokřídlých a motýlů. Výskyt *M. anisopliae* je téměř po celém světě včetně mírného pásu i tropů.

Infekční onemocnění je způsobené přímým průnikem přes kutikulu hostitele nebo prostřednictvím střev. Nákazy způsobené houbami rodu *Metarhizium* jsou označovány jako „zelené muskardiny“. Produkují toxiny nazývané destruxiny, které mají insekticidní účinky. Infikovaní jedinci porůstají tmavě zeleným, hustým myceliem. Infekční onemocnění je lehce rozpoznatelné během několika dní po smrti napadeného jedince. Tělo hostitele je zprvu pokryto myceliem bílé barvy, které se postupně zbarvuje do barvy zelené podle stupně sporulace (Weiser 1966).

Optimální teplota pro růst a vývoj mycelia houby *M. anisopliae* je 20 – 25 °C. Konidiofory jsou bohatě větvené v kompaktních shlucích. Konidie válcovitého tvaru jsou tvořené v řetízkách a jejich velikost dosahuje až 9 µm. Jsou jednobuněčné, vejčité či cylindrické (Humber 1977).

2.5 Vybrané druhy mykoparazitických hub

Mykoparazitické houby se řadí k přirozeným nepřátelům fytopatogenních hub, které způsobují různá onemocnění rostlin. Jejich aktivita se projevuje pouze v těsné asociaci mykoparazita a hostitele (Okrouhlá 1993). Mykoparazitické houby byly poprvé popsány roku 1800 mykology, kteří se zabývali studiem chorob rostlin (Veselá 1986). V současnosti je známo kolem 1000 – 2000 druhů mykoparazitických hub, které mají schopnost napadat až 2500 druhů jiných hub (Prokinová 1996). Zájem o působení patogenů a mikroorganismů vzrostl až v posledních letech, kdy došlo k nárůstu používání chemických pesticidů.

Mykoparazitické houby se rozdělují na dva druhy. Prvním druhem jsou parazité napadající půdní patogen, především z rodu *Pythium*, *Fusarium* a *Rhizoctonia*. Dalším druhem jsou parazité napadající patogeny na nadzemních částech rostlin (například *Ampelomyces quisqualis* parazitující na patogenu způsobující padlí travní). Některé druhy mykoparazitických hub mají příznivý vliv na růst a vývoj rostlin (Sejketov 1982).

2.5.1 Druh *Clonostachys rosea* f. *catenulata*

Clonostachys rosea f. *catenulata* je saprotrofní houba vláknitého charakteru. Vyskytuje se přirozeně v půdě a nebo na patogenech na rostlinných zbytcích. Vyznačuje se produkcí gliotoxinu s fungistatickými účinky a enzymů chitinázy a 1,3 - glutanázy. Pomocí enzymu chitinázy je potlačen růst hub *Fusarium* spp. a 1,3 – glutanáza silně potlačuje růst hub *Pythium* spp. i *Fusarium* spp.. Nejvyšší účinnost byla prokázána proti listovým chorobám, u skleníkové zeleniny a bylin.

Optimální teplota pro růst houby *Clonostachys rosea* f. *catulata* je 25 – 28 °C. Minimální teploty pro sporulaci jsou v rozmezí 4 – 8 °C a maximum pro spoulení houby je 29 °C. Houba *Clonostachys rosea* f. *catenulata* se rozmnožuje nepohlavně konidiiemi nebo pohlavně pomocí askospor. Dále produkuje dva typy konidioforů. Konidiofory jsou bohatě větvené, nesoucí štíhlé, podlouhlé fialidy. Konidiofory obou typů nesou konidie jednobuněčné, elipsovité, zelené barvy a asymetrického tvaru. Konidie jsou velké 5 – 7 x 3 – 4 μm (Šmíd 2011).

2.5.2 Druh *Coniothyrium minitans*

Houba *Coniothyrium minitans* je úzce specializovaný mykoparazit, který infikuje a degraduje sklerocia hub z oddělení Ascomycota, rodu *Sclerotinia*. *C. minitans* má schopnost parazitovat sklerocia fytopatogenních druhů hub *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* a *S. cepivorum*, není však schopna infikovat sklerocia hub náležejících do oddělení *Basidiomycota* (Gerlagh *et al.* 1996). Gerlagh *et al.* (1996) prokázal, že houba *C. minitans* je schopna infikovat i sklerocia houby *Botrytis cinerea*.

Poprvé byla popsána v roce 1947 v Kalifornii. Houba zpočátku vytváří slabé, chomáčkované mycelium světlé barvy, které se stává postupně hustější, zrnitější díky tvorbě pyknid. Ke konci sporulace dochází ke změně barvy na tmavě hnědou až černou. Houbové mycelium vytváří obrovské množství pyknid. Ty jsou rozmístěné volně mezi hyfami a uspořádané do řetízků. Pyknidy se skládají z několika vrstev. Mají hladký povrch a kulatý až oválný tvar o průměru 150 -600 μm .

Rozpoznání hostitele podporuje lektin, který je obsažen v hydrofobních pyknosporách *C. minitans*. Povrch pyknospor je tedy velice důležitý z hlediska časného rozpoznání infekčního onemocnění vyvolaného houbou *C. minitans*. Pyknospory jsou uvolňovány do půdy a okolí z degradovaných sklerocií. Může se šířit i růstem mycelia v půdě. Houba *C. minitans* má schopnost přežít teplotu půdy pod 0 °C, tudíž snadno přežívá v půdě během zimního období. Houba *C. minitans* může přežít v půdě i několik let. Uvádí se neschopnost houby růst v neobdělávaných půdách, kde není schopna se žít z organického materiálu (Smith *et al.* 1999).

Mykoparazitická houba *C. minitans* proniká do hostitele pomocí penetračních hrotů, které se utvářejí na vrcholových částech hyf. Přímo přes pigmentovanou vrstvu a nebo nepřímo v místě poškození sklerocia. Optimální podmínky pro parazitaci sklerocií představují teploty v rozmezí 5 – 25 °C a relativní vzdušná vlhkost nad 95 %. Při teplotách nad 30 °C dochází k pozastavení růstu mycelia. Houba přijímá živiny z rozpadlých hyf houby *S. sclerotinia* nebo z rozpadlého sklerocia. Následně se začínají utvářet pyknidy, ze kterých se v mucilaginózní hmotě uvolňují pyknospory (Bennet *et al.* 2006).

2.6 Kultivace vláknitých hub

Vláknité houby lze poměrně jednoduše pěstovat v čistých kulturách na definovaných živných půdách, které mohou mít tekutý nebo pevný charakter. Houby mají výbornou

schopnost růst velmi dobře na levných a jednoduchých médiích. Je to dáno tím, že řada entomopatogenních hub patřících do řádu Hyfomycetes jsou fakultativními patogeny. Díky širokému hostitelskému okruhu a schopnosti růstu na zmíněných médiích se stávají entomopatogenní houby výbornými kandidáty pro komerční využití (Goettel, Inglis 1997).

Důležitým předpokladem pro tržní realizaci a vývoj biopreparátů představují velkokapacitní biotechnologie. Biotechnologie zajišťují prostřednictvím fakultativních parazitů produkci blastospor a konidií, což jsou jednotky vyvolávající infekční onemocnění. Konidie jsou velmi podobné blastosporám. Liší se pouze šířkou stěny, kterou mají konidie silnější. Pro produkci blastospor, mycelia a v menší míře i konidií se využívá submerzní kultivace (kultivace v tekuté živné půdě). Pro výrobu vhodného biopreparátu je potřebný vysoce virulentní kmen. V případě produkce velkého množství konidií, je možné využít i levnějších přirozených substrátů. Mezi levnější substráty patří například kroupy, rýže, obiloviny či otruby (Butt 2002; Goettel, Inglis 1997).

2.7 Biopreparáty na bázi vybraných entomopatogenních hub

Standardní biopreparáty podléhají složitému procesu hodnocení, ve kterém musí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií. Garance druhu a kmene patogena, podíl aktivních a doplňkových složek v biopreparátu a maximální přípustná kontaminace patří mezi klíčové parametry kvality. Mezi kvantitativní kritéria patří počet infekčních jednotek, klíčivost konidií a počet kolonie tvořících jednotek (Anonym 5).

Biopreparáty na bázi houby *Isaria fumosorosea*

PreFeRal® WG a PreFeRal™

Společnost Certis USA LLC vyrábí mykoinsekticidní přípravky pod obchodním názvem PreFeRal® WG a PreFeRal™. Každý přípravek je distribuován jinou společností. První přípravek PreFeRal® WG distribuuje společnost Biobest Belgium N. V. po celé Evropě. Druhý přípravek PreFeRal™ je distribuován společností SePro po USA (Faria, Wraight 2007).

Přípravky PreFeRal jsou biologickými insekticidy, které obsahují 20 % aktivní složky druhu *Isaria fumosorosea* kmen Apopka 97 a 80 % přípravku tvoří inertní složka obsahující smáčedla, nutriční složku, a UV protektanty, které podporují růst a vývoj entomopatogenních hub. Přípravky se používají pro snižování populací zejména molic, ale obecně vykazují

vysokou účinnost proti skleníkovým škůdcům. Kmen Apopka 97 je vysoce virulentní kmen, který může vyvolat infekční onemocnění u všech vývojových stádií.

Přípravek PreFeRal[®] WG obsahuje minimálně CFU („kolonie tvořící jednotky) 2×10^9 životaschopných spor v 1 gramu přípravku a druhý přípravek PreFeRal[™] obsahuje minimálně CFU 1×10^9 životaschopných spor v 1 gramu přípravku. Přípravky se využívají k ochraně rajčat, okurek nebo okrasných rostlin proti škodlivým činitelům. Přípravky PreFeRal[®] WG i PreFeRal[™] nabývají nejvyšší účinnosti při relativní vzdušné vlhkosti ve skleníku nad 80 % a teplotě 20 – 28 °C po dobu minimálně 12 hodin denně. Aplikace těchto přípravků zajišťuje pokrytí nejen vrchní strany listů, ale i spodních stran.

Při aplikaci přípravků je klíčovým faktorem dostatečné množství vody a pH vody v rozmezí pH 4 až pH 7. Na sazenice se doporučuje aplikovat přípravek rozpuštěný v 1 000 litrech. ha^{-1} a na vzrostlé rostliny je doporučené množství 2 000 – 3 000 litrů. ha^{-1} . Objem vody se liší podle růstové fáze pěstovaných rostlin. Aplikace se provádí v pozdních odpoledních hodinách při prvním náznaku výskytu škodlivých činitelů. Fungicidní přípravky se mohou aplikovat minimálně 7 dní po aplikaci přípravků PreFeRal, aby nechocházelo ke snižování jejich účinnosti (Anonym 6).

NoFly[™] WP

Mykoinsekticidní přípravek koncipován na bázi kmene FE 9901. Přípravek vyrábí španělská společnost Futureco Bioscience pod obchodním názvem NoFly[™] WP. Biopreparát se skládá z 18 % aktivní složky a 82 % tvoří složka inertní, která obsahuje UV protektanty, smáčedla a nutriční složku pro podporu růstu a vývoje houbového mycelia. V 1 gramu přípravku je obsaženo minimálně 2×10^9 CFU („kolonie tvořící jednotky“). NoFly[™] WP je určen pro ochranu rostlin proti třásněnkám, molicím, červcům a mšicím. Přípravek je účinný proti všem fázím vývojového cyklu hmyzu a nevykazuje žádné negativní účinky na užitečný hmyz.

Biopreparáty na bázi houby *Metarhizium anisopliae*

Met52 EC

Biopreparát je používán jako účinný bioinsekticid vyrobený na základě emulgovaného koncentrátu. Využívá se jak v integrované, tak i biologické ochraně rostlin. Přípravek se využívá zejména proti molicím, roztočům a třásněnkám škodícím na skleníkové zelenině,

jako jsou rajčata, papriky, cukety a další. Díky spórám suspendovaných v emulgovaném oleji je přípravek vhodný na postřik půdy (Anonym 7).

BIO-Blast

Mykoinsekticidní přípravek na bázi kmene SEF1 vyráběný firmou EcoScience Corporation sídlící v USA. Přípravek vhodný pro použití jak v zemědělství, tak i v domácnosti. Výrobek je zaměřen na likvidaci švábů, termitů a much. Infikovaní jedinci roznáší nákazu díky spórám uchycených na jejich těle dále do hnízda. K usmrcení jedinců dochází během 4 až 10 dnů (Quarles 1995).

Biopreparáty na bázi houby *Beauveria bassiana*

Mycotrol O[®]

Biologický insekticid vyroben na bázi kmene Gha se využívá pro snižování populací širokého spektra hmyzu. Nejčastěji napadá larvální stadia molic, trásněnek, mer, červců, brouků a mšic. Přípravek slouží pro ochranu skleníkových rostlin a vykazuje vysokou účinnost i proti velmi rezistentním kmenům, díky většímu počtu životaschopných spor. Spory uchycené na těle hostitele produkují enzymy, které rozpouštějí kutikulu hmyzu a dochází tak k proniknutí do těla a začínajícímu růstu mycelia. Správná aplikace přípravku se může účinností rovnat i chemickým insekticidům (Anonym 8).

Biopreparáty na bázi mykoparazitické houby *Coniothyrium minitans*

Contans[®] WG

Fungicidní postřikový přípravek obsahující spory parazitické houby *Coniothyrium minitans* využívaný k ochraně rostlin. Aplikuje se zejména na slunečnice, řepku olejku, zeleninu, okrasné rostliny, tabák, léčivé a aromatické rostliny proti napadení hlízečkou menší (*Sclerotinia minor*) nebo hlízečkou obecnou (*Sclerotinia sclerotiorum*). Spory houby *C. minitans* paraziují na sklerociích škodlivých činitelů a v poměrně krátké době jsou rozkládány. Provádí se jak podzimní, tak i jarní aplikace přípravku (Anonym 9).

2.8 Trh mikrobiálních pesticidů

2.8.1 Evropský trh mikrobiálních pesticidů v Evropě

V roce 2000 dosahoval prodej biopreparátů, který zahrnoval mikroorganismy, makroorganismy i feromony, částky ve výši 97 milionů dolarů, což činí 2 % z celkového evropského trhu s pesticidy. Každoroční nárůst prodeje je odhadován na 11,7 %. V roce 2007 to znamenalo obrat ve výši 210 milionů dolarů. Obrovský nárůst prodeje byl zaznamenán u produktů na bázi entomopatogenních hlístic a entomopatogenních virů (bakulovirů). V roce 2004 dosahoval prodej v Evropě 31 milionů dolarů. V tomto prodeji byly zahrnuty biopreparáty na bázi hub, bakterií i virů. Podle výsledků prodeje bylo v roce 2005 docíleno částky 135 milionů dolarů (Ravensberg 2010). Lisansky (1997) dokonce tvrdí, že vysoký potenciál prodeje neustále vzrůstá a v roce 2015 by mohlo být dosaženo prodeje ve výši 200 milionů dolarů. Španělsko, Francie a Itálie patří k největším individuálním evropským trhům s biopesticidy

2.8.2 Trh mikrobiálních pesticidů v Nizozemsku

Údaje o použití přípravků na ochranu rostlin poskytuje sdružení agrochemických společností se sídlem v Nizozemsku. Informace zahrnují množství spotřebovaných účinných látek v kg.

V Nizozemsku se roční prodej biologických pesticidů pohybuje ve výši 5 – 6 milionů €. Celkový prodej pesticidů je odhadován na 330 milionů €. V posledních letech dochází k úbytku využívání entomopatogenních bakterií v důsledku vývoje nových chemických přípravků. Nizozemsko se řadí na 4. – 5. místo na evropském trhu s biopesticidy (Nefyto 2008).

Silné a slabé stránky využití biopesticidů

Silné a slabé stránky patří na seznam faktorů určujících úspěch či neúspěch použití biopesticidů. Úspěšné použití biopesticidů závisí jak na produktu, tak i na podmínkách prostředí při aplikaci na cílové škodlivé organismy. Na SWOT analýzu (slabé, silné stránky, příležitosti, ohrožení) jsou odkazovány vnitřní a vnější faktory. Poskytuje větší přehled o produktu a více informací, které zvyšují šanci pro dosažení úspěchu. SWOT analýza slouží

k identifikování vnitřních a vnějších faktorů daných produktů, které mají kladný či záporný vliv na úspěšné použití. Každý výrobek by měl mít sestaven samostatnou SWOT analýzu.

Biopesticidy mají řadu silných stránek, díky kterým je možné je využívat v běžné praxi. Obsahují i řadu nedostatků, které mohou být postupně přeměňovány ve stránky silné. Příkladem jsou užší hostitelská spektra, která zabezpečují bezpečné používání. Díky těmto vlatnostem je možná kombinace s přirozenými nepřáteli (Ravensberg 2010).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle diplomové práce jsou shrnuty v následujících pěti bodech.

1. Hodnocení základních růstových parametrů entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *Clonostachys rosea* f. *catenulata* na různých druzích umělých živných půd.
2. Vliv teploty na růst a vývoj entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* v kombinaci s entomopatogenními houbami *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Lecanicillium muscarium*.
3. Vliv teploty na růst a vývoj entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* v kombinaci s mykoparazitickými druhy hub *Coniothyrium minitans* a *Clonostachys rosea* f. *catenulata*.
4. Účinnost entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *Clonostachys rosea* f. *catenulata* na larvách potěmníka moučného *Tenebrio molitor*.
5. Vypracování strategie biologické ochrany rostlin při použití entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* v kombinaci s jinými druhy užitečných druhů hub.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Kmeny entomopatogenních hub používané v pokusech

V pokusech bylo testováno 6 vybraných kmenů entomopatogenních a mykoparazitických hub. Vybranými druhy entomopatogenních hub byly *Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* a mykoparazitické houby *Clonostachys rosea* f. *catenulata* a *Coniothyrium minitans*. Používané kmeny entomopatogenních hub pocházely z mykologické sbírky katedry speciální produkce rostlinné, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Kmeny jednotlivých druhů hub jsou dlouhodobě uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C ve formě alginátových pelet s biomasou příslušného kmene.

Isaria fumosorosea

V pokusech byl výhradně použit kmen PFR Apopka 97, který byl poprvé odizolován v roce 1987 na Floridě. Referenční kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 20874. Kmen PFR Apopka 97 je účinnou složkou biopreparátu PFR97™ 20 % WDG firmy Certis Llc. USA. Tento kmen je i v Evropě, Belgii pod obchodním názvem PreFeRal™ a PreFeRal® WG. Kmen byl reizolován z biopreparátu a jako čistá kultura byl používán v pokusech.

Beauveria bassiana

Kmen entomopatogenní houby Bba I101 byl odizolován z dospělé líkožrouta smrkového v roce 2004 na lokalitě Prameny Vltavy, Národní park Šumava. Izolace kmene z dospělé líkožrouta smrkového *Ips typographus* byla provedena pomocí metody selektivní živné půdy na bázi fungicidní složky dodine. Čistá kultura kmene byla imobilizována do alginátových pelet, které jsou uchovány ve sbírce.

Lecanicillium muscarium

Kmen entomopatogenní houby *Lecanicillium muscarium* I9 byl odizolován z dospělců líkožroutů smrkových odchycených pomocí feromonových lapačů na území Národního parku Šumava a CHKO Šumava. Kmen je uchováván ve formě alginátových pelet v mykologické sbírce.

Metarhizium anisopliae

Entomopatogenní houba *M. anisopliae* kmen F-52 je účinnou složkou biopreparátu Met52. Pro experimentální účely byl kmen reizolován z biopreparátu v roce 2009. Referenční typový kmen F-52 je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 90448.

Clonostachys rosea f. *catenulata*

Kmen mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* J 1446 je na trhu součástí biopreparátu PrestopMix finské firmy Verdena. Kmen byl reizolován z tohoto přípravku a pro pokusy byla používána čistá kultura kmene.

Coniothyrium minitans

Kmen mykoparazitické houby *C. minitans* byl odizolovaný z půdy pomocí metody prekolonizace (Precolonization plate technique) za využití mycelia a sklerocií fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum*. Kmen byl čištěn pomocí živné půdy PDA a jako čistá kultura je uchováván v mykologické sbírce.

4.2 Kultivační média

V pokusu zaměřeného na vliv živné půdy na růst, vývoj a produkci spor byly použity tři druhy živných půd. Živné půdy byly připravovány z polotovarů od firmy (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie). Z polotovarů bylo médium připraveno tak, že se příslušné množství média uvedeného na obale přidalo do předepsaného množství destilované vody. Živná půda se po důkladném promíchání vložila do autoklávu a při 121 °C se sterilovala po dobu 15 minut. Po vychladnutí na 60 °C se média rozlévala ve flow-boxu (Biohazard Flow box, Schoeller Instruments) do sterilních plastových Petriho misek o průměru 90 mm. Po vychladnutí médií byly Petriho misky uloženy do plastových sáčků do doby, než byly použity pro vlastní pokus.

PDA (Potato Dextrose Agar)

Bramborová půda je univerzální médium, které se skládá z bramborové infuse a dextrózy, která podporuje růst hub. Agar je přidáván jako ztužující látka. Do média se přidává určité množství sterilní kyseliny vinné nebo antibiotika, díky kterým dochází ke snížení pH média a dochází k inhibici množení bakterií. Z polotovaru je připravené médium tak, že se 39 g rozpustí v litru destilované vody.

Složky živné půdy PDA	g. l ⁻¹
Bramborová infuze od 200 g	4,0 = (4 g odpovídají 200 g infuzi z brambor)
Dextróza	20,0
Agar	15,0
Ph	5,6 ± 0,2 při 25°C

CDA (Czapek Dox Agar)

Živná půda CDA je semi-syntetické medium, které se běžně používá pro kultivaci hub a acidofilních organismů. Médium obsahuje dusičnan sodný, který je zdrojem dusíku a sacharózy, která je jediným sacharidem poskytujícím uhlík a energii. Médium obsahuje různé soli, které jsou důležité pro růst a vývoj mikroorganismů. Z polotovaru je připravené médium tak, že se 49 g přípravku smíchá s jedním litrem destilované vody.

Složky živné půdy CDA	g. l ⁻¹
dusičnan sodný	2,0
chlorid sodný	0,5
glycerfosfát hořečnatý	0,5
síran železnatý	0,01
síran draselný	0,35
Sacharóza	30,0
Agar	12,0
pH	6,8 ± 0,2 při 25 °C

SDA (Sabouraud Dextrose Agar)

Živná půda SDA je určena pro kultivaci hub, kvasinek a plísní. Mykologické peptony poskytují dusíkaté sloučeniny a dextróza slouží jako zdroj energie. Vysoký obsah dextrózy a nízké pH podporuje růst hub. Z polotovaru je připravené médium tak, že se 65 g rozpustí v litru destilované vody.

Složky živné půdy SDA	g. l ⁻¹
Dextróza	40,0
Mykologický pepton	10,0
Agar	15,0
pH	5,6 ± 0,2

4.3 Populace potemníka moučného *Tenebrio molitor*

V pokusech byla použita populace *T. molitor* udržovaná pomocí kontinuálního chovu udržovaného v konstantních podmínkách (termostat, 25±1°C, fotoperioda 16/8). V pokusu zaměřeného na účinnost entomopatogenních hub a houby *C. rosea* f. *catenulata* na larvy byly použity synchronizované larvy stejného instaru. Larvy byly z chovu vybírány těsně před založením pokusu.

4.4 Imobilizace hub do alginátových pelet

Všechny druhy hub použité v diplomové práci jsou dlouhodobě uchovávány ve formě suchých alginátových pelet ve sbírce na katedře speciální produkce rostlinné ZF JU v Českých Budějovicích.

Alginátové pelety tvořila suspenze konidií hub/kmenů ve 2 % alginátu sodném (firma Sigma-Aldrich s.r.o.) doplněná jemně mletými sterilními pšeničnými otrubami. Připravená směs každého kmene byla nakapávána do sterilního roztoku chloridu vápenatého (0,25M CaCl₂). V roztoku CaCl₂ se tvořily pelety, které byly v roztoku ponechány po dobu 90 minut, aby došlo k jejich důkladnému vytvrzení. Po 90 minutách byly pelety slity a následně sušeny pomocí aktivního proudu vzduchu ve flow-boxu. Po důkladném vysušení se alginátové pelety vložily do plastových lahviček a do doby použití byly uloženy v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Vitalita biomasy hub imobilizované v suchých peletách je ověřována tak, že se suché pelety umístí do sterilní vlhké komůrky na povrch vlhkého filtračního papíru. Pelety při vysoké vlhkosti poutají vodu (dochází k nabobtnání) a po 5 – 7 dnech dochází na povrchu pelet ke sporulaci kmenů hub. Konidie se z vysporulovaných pelet přenášejí pomocí inokulační kličky na povrch standardního živného media PDA („Potato Dextrose Agar”).

4.5 Kultivace matečných kultur hub a příprava suspenzí

Entomopatogenní a mykoparazitické houby byly kultivovány na živné půdě PDA ve formě separačních čar pomocí jednorázové, sterilní inokulační kličky. Petriho misky s jednotlivými druhy hub byly následně uloženy do termostatu a kultivovány po dobu 10-14 dní při teplotě $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$. Takto získané kultury jednotlivých kmenů byly využívány pro experimentální účely.

Suspenze jednotlivých druhů hub/kmenů byly získány smytím plně vysporulovaných kultur sterilním roztokem 0,05 % Tween 80. Získané suspenze byly následně přefiltrovány přes sterilní gázu, aby byly získané homogenní suspenze spor bez shluků mycelia kmenů. U každé suspenze houby/kmene byl spočítán titr pomocí počítací komůrky – hemocytometru (Neubauerova vylepšená komůrka). Titr byl po usazení spor v hemocytometru počítán pomocí optického mikroskopu. Finální koncentrace spor byla zjištěna na základě výpočtu při použití průměrů z dvou opakování (dolní a horní počítací pole komůrky). U většiny pokusů byly základní suspenze spor adjustovány ředěním na titr $1,00 \times 10^7$ nebo $1,00 \times 10^6$ v 1 ml. U jednotlivých pokusů budou uvedeny použité koncentrace spor v 1 ml.

4.6 *In vitro* testy

Radiální růst a výtěžnost spor

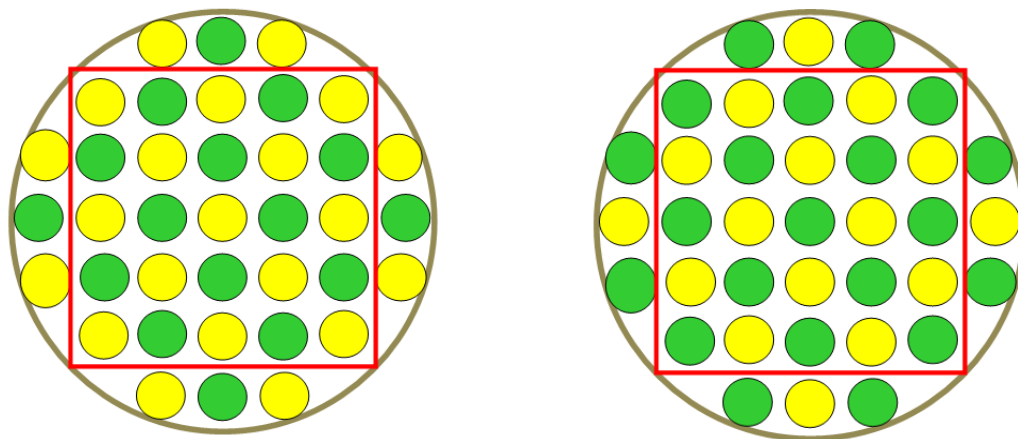
U vybraných kmenů jednotlivých druhů entomopatogenních hub byl sledován radiální růst a produkce spor. Pro hodnocení růstu středových kultur byly připraveny suspenze jednotlivých kmenů o titru $1,00 \times 10^6$ spor 1 ml. V rámci těchto *in vitro* testů byly založeny dva hlavní experimenty.

První experiment byl založen na zaznamenání růstu a produkce spor středových kultur na různých živných půdách po 21 dnech. Na střed každé agarové plotny (PDA, SDA a CDA) byla nanesena suspenze testovaného kmene ve formě kapky pomocí sterilní 1 μl inokulační kličky. Pro každý kmen a každou živnou půdu bylo připraveno 8 opakování. Po zaschnutí kapek byly Petriho misky vloženy v plastových sáčcích do termostatu temperovaného na $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ a misky byly kultivovány po dobu 21 dní. Radiální růst byl hodnocen po 7, 14 a 21 dnech tak, že u jednotlivých kmenů každé středové kultury byly měřeny dva na sebe kolmé průměry. Následně byla u každé varianty spočítána průměrná hodnota a následně ze zjištěných průměrů byla vypočítána plocha kultury. Výtěžnost spor jednotlivých kmenů byla stanovena tak, že se středová kultura po 21 dnech kultivace vyřízla z živného média a s adekvátním množstvím vody byla homogenizována pomocí mixeru.

V získané suspenzi byla spočítána produkce spor pomocí počítačící komůrky - hemocytometru (Neubauerova vylepšená komůrka). Ze získaných číselných údajů byla vypočítána průměrná hodnota množství spor a po přepočtu plochy jedné středové kultury byla vypočítána produkce spor na mm^2 . Pomocí tohoto údaje lze porovnávat produkci spor u jednotlivých kmenů jednotlivých druhů entomopatogenních hub resp. mykoparazitické houby.

Druhý experiment byl založen na kompatibilitě entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* s vybranými dalšími druhy entomopatogenních hub (*B. bassiana*, *M. anisopliae* a *L. muscarium*) a mykoparazitických hub (*C. rosea* f. *catenulata* a *C. minitans*). Získaná suspenze kmene PFR 97 houby *I. fumosorosea* byla vždy s každým druhem/kmenem houby inokulována střídavě pomocí sterilní inokulační kličky na plotnu živné půdy PDA s pomocí předem připravené předlohy. Pro každou dvojici byly připraveny dvě varianty po dvou opakování (první variantu „dvojici“ tvořily misky, kde byl na střed misky inokulován kmen PFR 97 a druhou variantu „dvojici“ tvořily misky, kde byl na střed inokulován jiný kmen jiné houby, viz. schéma). Po zaschnutí kapek byla jednotlivá opakování pro každou kombinaci hub vložena do plastových sáčků a kultivována v různých teplotách 15 °C, 23 °C a 25 °C. Hodnocení probíhalo po 7 a 10 dnech u variant, které byly kultivovány ve 23 °C a 25 °C a po 14 a 21 dnech u variant, které byly kultivovány v 15 °C. U každé varianty se z každé misky počítal radiální růst narostlých kolonií jednotlivých druhů uvnitř čtverce znázorněného ve schématu. U každé kolonie houby byly opět měřeny dva na sebe kolmé průměry, tj. pro jeden kmen byl z jedné sady měřen radiální růst u 13 kolonií a z druhé sady 12 kolonií a naopak tomu bylo u druhého kmene v rámci kompatibility. Ze zjištěných hodnot byla spočítána průměrná hodnota na jednu kolonii, a následně byla stanovena plocha kolonie na mm^2 .

Předloha pro nanášení suspenzí hub střídavě ve formě kapek



Výtěžnost spor byla hodnocena tak, že se jednotlivé kolonie jedné houby/kmene opět vyřízly (13 kolonií resp. 12 kolonií) a homogenizovaly se v mixéru s adekvátním množstvím vody. Výtěžnost druhé houby v kombinaci byla stanovena taktéž. Pomocí počítačích komůrek byl stanoven titr v 1 ml a následně byl stanoven průměrný počet spor na 1 kolonii. Výtěžnost spor byla následně vydělena plochou kultury a tak byla získána produkce spor jednotlivých druhů/kmenů hub na mm² kolonie pro daný druh/kmen z připravených interakcí a různých podmínek kultivace. Hodnota produkce spor na mm² umožňuje zjistit vliv entomopatogenní houby *I. fumosorosea* na růst a vývoj ostatních druhů hub v jejich vzájemné interakci.

4.7 In vivo testy

Standardní laboratorní biotest na larvách potměníka moučného

Standardní laboratorní biotest se hodnotí na základě FDGI stupnice (Fungus Development and Growth Index). V pokusu se v několika denních intervalech hodnotí průběh vývoje nákazy a mortalita testovaných jedinců. Stupnice FDGI rozlišuje jednotlivé fáze vývoje houby a průběh nákazy rozděluje do 7 fází vývoje onemocnění. Každá fáze vývoje onemocnění je označena příslušným indexem (viz. tabulka).

Na začátku pokusu byly připraveny sterilní destičky, kdy každá destička obsahovala 12 komůrek. Na dno každé komůrky byly vloženy 2 sterilní filtrační papírky o rozměru 2 x 2 cm navlhčené 0,15 ml sterilní destilovanou vodou. Takto připravené vlhké komůrky byly připraveny pro každou variantu testovaných druhů/kmenů hub.

V pokusu byla sledována účinnost entomopatogenních hub na larvy potměníka moučného *T. molitor*. Larvy byly získány z laboratorního chovu. Před vlastním pokusem byly larvy povrchově sterilovány 1 % roztokem Sava a následně třikrát propláchnuty v destilované vodě a umístěny na sterilní filtrační papír. Larvy byly namáčeny po dobu 3 sekund do suspenzí hub o standardním titru $1,00 \times 10^7$ spor v 1 ml. Všechny larvy byly po namočení v daných suspenzích osušeny na filtračním papíru před následným uložením do vlhkých komůrek. Po odstranění přebytečné suspenze byly larvy umístěny jednotlivě do připravených komůrek. Pro každou variantu byly založeny 3 komůrky (3x12). V kontrolní variantě byly larvy namáčeny po dobu 3 sekund ve sterilním roztoku 0,05% Tween 80 a následně vloženy do vlhkých komůrek. Komůrky naplněné larvami byly vloženy do igelitových sáčků a uloženy do termostatu vytemperovaného na požadovanou teplotu 25 ± 1 °C. Hodnocení průběhu vývoje onemocnění u larev bylo prováděno pomocí světelného mikroskopu 4., 5., 6.

a 11. den. V pokusech byla hodnocena mortalita larev, jedinci usmrcení bez příznaku houbového napadení a jedinci se zjevnými příznaky houbové infekce. Všechny larvy byly ohodnoceny příslušným indexem FDGI a následně byl spočítán průměrný index na jednu larvu.

Tabulka 1: Hodnotící indexová stupnie biotestu FDGI

0	nepřítomnost jakýchkoli příznaků nákazy
0,5	přítomnost melanizačních skvrn viditelných na povrchu těla hostitele
1,0	index vyjadřující smrt hostitele
1,5	první zjevný růst jednotlivých vláken mycelia na těle hostitele
2,0	tvorba kompaktního mycelia na povrchu těla hostitele
2,5	sporulace (tvorba nových spor) na povrchu těla hostitele
3,0	plně vysporulované mycelium na povrchu těla hostitele

4.8 Statistická analýza

Data z pokusu zaměřeného na produkci spor vláknitých druhů hub na různých živných půdách a zároveň data zaměřená na radiální růst a výtěžnost spor jednotlivých druhů entomopatogenních a mykoparazitických hub v kombinaci s druhem *Isaria fumosorosea* byla podrobena analýze rozptylu (ANOVA). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Tukeyho testu ($P < 0,05$). Dále byly použity popisné statistiky pro hodnocení průměrů a směrodatných odchylek. Statistické analýzy byly hodnoceny pomocí softwaru pro Statistika 12 (StatSoft Inc.).

4.9 Využívaná technika při pokusech

Pro potřebu sterilních podmínek byl využíván flow-box BIOHAZARD (KRD firma). Při tvorbě originální fotodokumentace byl použit digitální fotoaparát Canon EOS 300D Digital a při vyhodnocování pokusů byl použit světelný mikroskop a binokulární mikroskop značky Olympus.

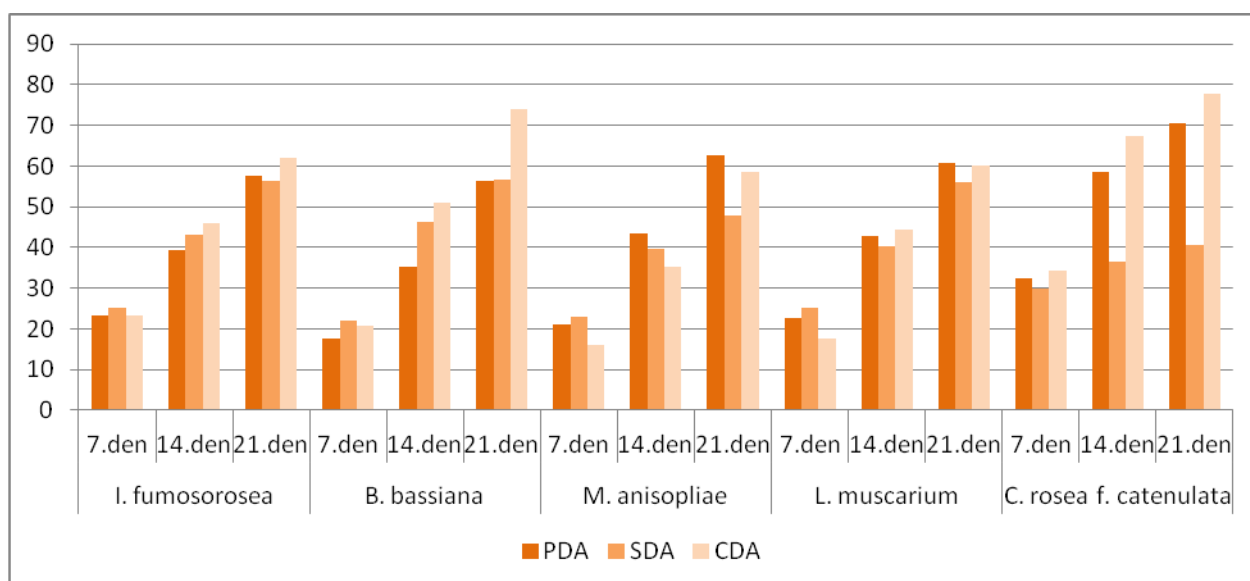
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

5.1 Vliv umělé živné půdy na růst a výtěžnost spor středových kultur různých druhů vláknitých hub

Základní údaje k pokusu:

- suspenze kmenů vláknitých hub o standardním titru $1,00 \times 10^7$ v 1 ml byla nanesena pomocí inokulační kličky ve formě kapky do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA, SDA a CDA v 6 opakováních pro každou variantu
- po zaschnutí kapky byly Petriho misky vloženy v plastických sáčcích do termostátů, které byly vytemperovány na 25 °C
- u středových kultur byl hodnocen radiální růst po 7, 14 a 21 dnech
- výtěžnost spor kmenů byla hodnocena po 21 dnech

Graf 1: Porovnání radiálního růstu středových kultur entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* na různých živných půdách v čase (7., 14., 21. den; 25 °C)



Po 7 dnech na živné půdě PDA vytvořila největší středovou kulturu houba *C. rosea* f. *catenulata*, ostatní druhy hub vytvořily ve srovnání poloviční nebo ještě menší kultury. Na živné půdě SDA a CDA byl zaznamenán obdobný trend. Nicméně, značné rozdíly byly zaznamenány u jednotlivých druhů kultivovaných na různých médiích. Houba *I. fumosorosea* vytvářela na všech typech médií přibližně stejné kultury. Druhy *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *L. muscarium* tvořily největší kultury na živné půdě SDA, zatímco druh *C. rosea* f. *catenulata* tvoří největší kulturu na CDA.

Tabulka 2: Porovnání vlivu živných půd na plochu kultury vybraných druhů entomopatogenních druhů hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* (7., 14., 21. den inkubace, 25±1 °C).

	PDA			SDA			CDA		
	7. den	14. den	21. den	7. den	14. den	21. den	7. den	14. den	21. den
<i>I. fumosorosea</i>	427,61	1225,42	2619,35	494,15	1463,48	2485,05	427,61	1661,90	3019,07
	±17,40	±31,02	±65,10	±19,46	±102,97	±194,37	±17,40	±41,72	±68,87
<i>B. bassiana</i>	247,45	980,53	2492,42	377,26	1680,01	2514,59	340,88	2042,82	4310,53
	±11,90	±111,81	±186,88	±9,33	±52,81	±76,70	±31,74	±72,70	±183,17
<i>M. anisopliae</i>	346,36	1491,87	3084,34	418,49	1240,98	1809,56	203,16	975,91	2687,83
	±19,05	±51,85	±101,72	±17,91	±67,08	±74,62	±12,49	±40,34	±128,93
<i>L. muscarium</i>	403,52	1446,58	2906,52	504,05	1272,39	2455,68	247,45	1555,28	2835,29
	±16,66	±43,18	±65,75	±18,88	±54,05	±43,27	±16,64	±34,95	±96,27
<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i>	829,58	2680,17	3903,62	702,94	1051,13	1298,87	916,84	3578,47	4737,60
	±39,51	±153,14	±55,37	±44,53	±54,64	±47,89	±36,80	±92,05	±76,20

Po 14 dnech vytvořila ze všech sledovaných druhů největší kulturu opět mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata*. Tento druh rostl nejlépe na živné půdě CDA, kde plocha kultury dosáhla 3578,47 mm². Na živné půdě PDA vytvořila houba kulturu o 25 % menší a na SDA až o 70 % menší kulturu. Druh *L. muscarium* rostl téměř shodně na živné půdě PDA a CDA. Druh *B. bassiana* vytvořil nejmenší kulturu na živné půdě PDA, ve srovnání s kulturou na SDA. Největší kolonie *B. bassiana* byla zaznamenána na CDA.

Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* vytvořila po 21 dnech největší kolonie na živné půdě CDA (3019,07 mm²). Růst středových kultur tohoto druhu byl na dalších živných půdách ve stejný den hodnocení vyrovnaný (PDA 2619 mm²) a (SDA 2485,05 mm²). Obdobné výsledky byly po 21 dnech dosaženy u houby *B. bassiana*. Druhy *M. anisopliae* a *L. muscarium* vytvořily větší středové kultury na živném médiu PDA oproti oběma druhům hub (*I. fumosorosea* a *B. bassiana*). Na médiu PDA houba *M. anisopliae* zformovala kulturu o velikosti 3084,34 mm² oproti živnému médiu SDA, kde kolonie dosahovaly velikosti pouhých 1809,56 mm². Jediná houba *L. muscarium* měla růst kolonií na všech živných médiích poměrně vyrovnaný. Na půdě PDA houba vytvořila kolonie o velikosti 2906,52 mm², na CDA 2835,29 mm² a na půdě SDA kolonie o něco menší (2455,68 mm²). Mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* vykázala největší růst kolonií na živném médiu CDA. Na této živné půdě dosahovaly kolonie velikosti 4737,60 mm², oproti živné půdě SDA, kde se velikost kolonií pohybovala okolo 1298,87 mm².

Tabulka 3: Výtěžnost spor středových kultur vláknitých hub kultivovaných na různých umělých živných půdách

	PDA		SDA		CDA		
	Průměr± smodch	Tukey HSD	Průměr± smodch	Tukey HSD	Průměr± smodch	Tukey HSD	
<i>I. fumosorosea</i>	5,05±0,47E+05	Bd	2,31±0,12E+05	Cd	1,21±0,04E+06	Aa	F = 191,40; df =2,3; p = 0,0007
<i>B. bassiana</i>	6,08±0,10E+06	Aa	5,12±0,65E+06	Ab	1,53±0,00E+05	Bc	F = 70,20; df =2,3; p = 0,0030
<i>M. anisopliae</i>	3,31±0,18E+06	Bb	4,28±0,17E+06	Aa	2,65±0,11E+05	Cc	F = 221,85; df =2,3; p = 0,0006
<i>L. muscarium</i>	1,25±0,08E+06	Bc	1,86±0,09E+06	Ac	4,85±0,21E+05	Cb	F = 96,58; df =2,3; p = 0,0019
<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i>	1,24±0,01E+06	Ac	5,00±0,00E+02	Bd	1,14±0,05E+05	Cd	F = 332,86; df =2,3; p = 0,0003
	F = 230,83; df =4,5; p = 0,0000***		F = 434,34; df =4,5; p = 0,0000		F = 458,73; df =4,5; p = 0,0000		

A,B,C.. průměry v řádce se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Houba *I. fumosorosea* (kmen PFR 97) dosáhla největší produkce spor na 1 mm² po 21 dnech na živné půdě CDA (1,21 x 10⁶), což odpovídalo i velikosti středové kultury na tomto médiu (3019,07 mm²). Produkce spor u tohoto druhu byla statisticky průkazná (F = 191,40; df =2,3; p = 0,0007). Výtěžnosti druhů *M. anisopliae* a *L. muscarium* jsou vyrovnané a statisticky průkazné na všech typech živných půd (*M. anisopliae* F = 221,85; df =2,3; p = 0,0006 a *L. muscarium* F = 96,58; df =2,3; p = 0,0019). Druh *B. bassiana* kmen I 101 vykázal největší produkci spor 6,08 x 10⁶ na 1 mm² na půdě PDA, na které dosáhla houba plochy kultury jen 2492,42 mm² (F = 70,20; df =2,3; p = 0,0030). Naopak, nejmenší produkce byla zaznamenána na živné půdě CDA, kde výtěžnost byla pouze 1,53 x 10⁵ spor na 1 mm², zatímco kultura dosáhla plochy o velikosti 4310,53 mm². Druh *L. muscarium* kmen I9 vyprodukoval největší množství spor na půdě SDA (1,86 x 10⁶ na mm²). I u tohoto druhu byl zaznamenán průkazný rozdíl v tvorbě spor na testovaných médiích (F = 96,58; df =2,3; p = 0,0019). Produkce na této živné půdě, tj. PDA, vykazovala v produkci všech vláknitých hub statisticky průkazné rozdíly (F = 230,83; df =4,5; p = 0,0000). Mykoparazitická houba *Clonostachys rosea* f. *catenulata* vyprodukovala nejvíce spor na živné půdě PDA (1,24 x 10⁶ na mm²), zatímco radiální růst byl nejvíce podpořen na živném médiu CDA (4737,60 mm²). Opět byl zaznamenán statisticky průkazný vliv živné půdy na tvorbu spor po 21 dnech inkubace (F = 332,86; df =2,3; p = 0,0003).

Produkce spor na živné půdě SDA byla největší u druhu *B. bassiana* kmene I101 ($4,28 \times 10^6$ spor na 1 mm^2) oproti ostatním druhům hub ($F = 434,34$; $df = 4,5$; $p = 0,0000$). Při hodnocení živné půdy PDA bylo zjištěno, že největší produkci spor vyprodukovala opět houba *B. bassiana*. Ostatní druhy hub produkovaly spory v rozmezí od $5,05 \times 10^5$ až $3,31 \times 10^6$ spor na mm^2 kultury. Na živné půdě CDA vyprodukoval kmen PFR 97 entomopatogenní houby *I. fumosorosea* největší množství spor, ostatní druhy vykazovaly menší produkci o polovinu nebo o celý řád. Výsledky jsou statisticky průkazné jak u živné půdy PDA ($F = 609,6$; $df = 5,6$; $p = 0,0000$), tak i u živné půdy CDA ($F = 458,73$; $df = 4,5$; $p = 0,0000$).

5.2 Kompatibilita mezi entomopatogenní houbou *I. fumosorosea* a vybranými druhy entomopatogenních a mykoparazitických hub

Cílem testu bylo zjistit kompatibilitu různých druhů entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub ve vzájemné interakci s druhem *Isaria fumosorosea*. Účelem výzkumu je zjistit, zda lze z praktického hlediska v rámci biologické ochrany rostlin aplikovat houbu *I. fumosorosea* v “tank mixu“ s jiným druhem entomopatogenních nebo mykoparazitických druhů, aniž by se vzájemně v prostředí nepříznivě ovlivňovaly.

5.2.1 Vliv entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na růst a vývoj dalších entomopatogenních a mykoparazitických hub v jejich vzájemné interakci při 25 °C

Základní údaje k pokusu:

- Suspenze spor kmenů PFR 97 (*I. fumosorosea*) x I101 (*B. bassiana*), I9 (*L. muscarium*), BIO 1020 (*M. anisopliae*), Prestop (*C. rosea* f. *catenulata*) a *C. minitans* o standardním titru $1,00 \times 10^6$ v 1 ml
- dvojice hub byly střídavě nanášeny na plotnu živné půdy PDA s pomocí předem připravené předlohy.
- Po zaschnutí kapek byly Petriho misky uloženy v sáčcích do termostatu a kultivovány při teplotě 25 °C
- Hodnocení radiálního růstu a výtěžnosti spor bylo provedeno po 7 a 10 dnech
- Pro každou dvojici byly připraveny 2 varianty, každá měla dvě opakování

Isaria fumosorosea versus *Beauveria bassiana*

Tabulka 4: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *B. bassiana* (hodnocení 7., 10. den, teplota 25°C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey
Ifr*	102,35±10,62	c	106,91±14,42	b	Ifr*	6,96±0,28E+05	b	1,82±0,09E+06	b
Bba	110,46±12,62	b	111,90±11,77	b	Bba	1,29±0,06E+06	a	3,24±0,16E+06	a
Ifr+Bba	158,59±11,84	a	162,26±14,11	a	Ifr+Bba	6,37±0,37E+05	b	1,38±0,30E+06	b
Bba+Ifr	36,10±5,39	d	37,70±7,76	c	Bba+Ifr	1,85±0,46E+05	c	1,04±0,10E+06	b
	F= 1127,75; df=3,96; p=0,0000***		F= 847,38; df=3,96; p=0,0000			F= 105,062; df=3,4; p=0,0003		F= 28,7044; df=3,4; p=0,0036	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* vytvořila po 7 dnech v kontrolní variantě kolonie o velikosti 102,35 mm² (hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub). V kontrolní variantě vytvořila houba *B. bassiana* kultury o ploše 110,46 mm². Ve vzájemné interakci, kdy byly oba druhy hub střídavě kultivovány na povrch živné půdy PDA, došlo k významným rozdílům. Houba *I. fumosorosea* měla negativní vliv na růst kolonií houby *B. bassiana*. Kolonie *B. bassiana* byly veliké v průměru pouze 36,10 mm², zatímco *I. fumosorosea* vytvořila kolonie o velikosti 158,59 mm². Jak je patrné, houba *I. fumosorosea* vytvořila v interakci daleko větší kolonie než v kontrolní variantě, což je dáno tím, že měla větší prostor pro svůj růst. Po 10 dnech byly velikosti kolonií obdobné a trend zachován. Došlo k minimálnímu nárůstu kolonií a to pouze o několik mm. Tento jev je daný tím, že kolonie se již po 7 dnech téměř dotýkaly a neměly již prostor pro svůj růst. Největší rozdíl byl zaznamenán opět v interakci houby *I. fumosorosea* s druhem *B. bassiana*, kde potlačením druhé jmenované houby měla *I. fumosorosea* větší prostor pro svůj růst.

Po 7 dnech vyprodukovala houba *I. fumosorosea* v kontrolní variantě 6,96 x 10⁵ spor na 1 mm² a houba *B. bassiana* 1,29 x 10⁶ spor na 1 mm². Ve vzájemné interakci byla produkce houby *I. fumosorosea* téměř shodná s kontrolní variantou i přesto, že tvořila v interakci s *B. bassiana* větší kolonie, zatímco houba *B. bassiana* kvůli potlačení svého růstu vytvořila v kombinaci s *I. fumosorosea* o řád menší množství spor, než v kontrolní variantě. Po 10 dnech došlo k nárůstu počtu spor u všech testovaných variant. V kontrolních variantách došlo ke dvojnásobnému množství spor na mm². Stejný jev nastal i u produkce spor houby

I. fumosorosea kultivované v interakci s *B. bassiana*. U této kombinace *I. fumosorosea* versus *B. bassiana* došlo ke stimulaci produkce spor na 1 mm². Druh *B. bassiana* vyprodukoval o řád více spor než ve stejné variantě po 7 dnech hodnocení.

Isaria fumosorosea versus *Metarhizium anisopliae*

Tabulka 5: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *M. anisopliae* (hodnocení 7., 10. den, teplota 25°C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey
Ifr*	102,35±10,62	b	106,91±14,42	b	Ifr*	6,96±0,28E+05	b	1,82±0,09E+06	b
Man	78,66±17,34	c	84,01±10,80	c	Man	2,14±0,05E+06	a	2,60±0,07E+06	a
Ifr+Man	193,49±17,46	a	196,44±17,31	a	Ifr+Man	3,01±0,34E+05	c	1,10±0,08E+06	c
Man+Ifr	18,11±3,34	d	20,42±3,58	d	Man+Ifr	6,69±0,46E+04	d	4,40±0,22E+05	d
	F= 1423,42; df=3,96; p=0,0000***		F= 1633,50; df=3,96; p=0,0000			F= 780,155; df=3,4; p=0,0000		F= 182,065; df=3,4; p=0,0001	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c... průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Houba *M. anisopliae* vytvořila v kontrolní variantě plochu o velikosti 78,66 mm². Houba *I. fumosorosea* vytvořila v kontrolní variantě kolonii o ploše 102,35 mm². Ve vzájemné interakci obou druhů hub došlo ze strany kultur *I. fumosorosea* (193,49 mm²) k velmi výraznému potlačení růstu kolonií houby *M. anisopliae* (18,11 mm²). Tento jev může být způsoben rychlou kolonizací prostředí houbou *I. fumosorosea* nebo případnou produkcí sekundárních metabolitů vylučovaných houbou *I. fumosorosea* do média a tím došlo k ovlivnění růstu druhu *M. anisopliae*. Obdobné velikosti kultury byly zaznamenány 10. den. Největší rozdíl v nárůstu kolonií byl zaznamenán u kontrolní varianty *M. anisopliae*.

Kolonie *I. fumosorosea* vyprodukovaly v kontrolní variantě 6,96 x 10⁵ spor na 1 mm². Kontrolní varianta *M. anisopliae* měla produkci daleko větší, tj. 2,14 x 10⁶ spor na 1 mm². V kombinaci hub *I. fumosorosea* a *M. anisopliae* byly zjištěny výrazné rozdíly v produkci spor u obou druhů. Houba *I. fumosorosea* vyprodukovala v kombinaci s *M. anisopliae* po 7 dnech 3,01 x 10⁵ spor na 1 mm². Naopak houba *M. anisopliae* v kombinaci s *I. fumosorosea* vykazala produkci spor nižší až o 96 % (6,69 x 10⁴ spor na 1 mm²) ve srovnání s kontrolní variantou.

Isaria fumosorosea versus *Lecanicillium muscarium*

Tabulka 6: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *L. muscarium* (hodnocení 7., 10. den, teplota 25 °C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey
Ifr*	102,35±10,62	a	106,91±14,42	a	Ifr*	6,96±0,28E+05	b	1,82±0,09E+06	c
Lmu	90,27±11,43	b	92,25±10,63	b	Lmu	2,53±0,11E+06	a	4,54±0,24E+06	b
Ifr+Lmu	108,13±19,20	a	112,23±10,89	a	Ifr+Lmu	9,27±0,37E+05	b	1,60±0,13E+06	c
Lmu+Ifr	92,72±5,72	b	98,08±10,30	b	Lmu+Ifr	2,04±0,13E+06	a	5,79±0,00E+06	a
	F= 21,13; df=3,96; p=0,0000***		F= 28,58; df=3,96; p=0,0000			F= 96,247; df=3,4; p=0,0003		F= 210,858; df=3,4; p=0,0001	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Velikost kolonií *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je 102,35 mm² a *L. muscarium* v kontrolní variantě 90,27 mm². V interakci obou druhů hub nedocházelo k ovlivnění růstu kolonií. Obě houby vytvořily ve vzájemné kombinaci téměř stejné kultury jako v kontrolních variantách. Tento trend si oba druhy hub zachovaly i v čase. Z hlediska výtěžnosti jsou výsledky obdobné.

Houba *I. fumosorosea* vyprodukovala po 7 dnech v interakci s *L. muscarium* větší množství spor než v kontrolní variantě, nicméně navýšení produkce bylo pouze o třetinu. Houba *L. muscarium* vyprodukovala v kombinaci s *I. fumosorosea* menší počet spor než v kontrolní variantě, nicméně množství bylo téměř srovnatelné. Po 10 dnech vyprodukovala houba *I. fumosorosea* o něco více spor v kontrolní variantě (1,82 x 10⁶ spor na 1 mm²) než v interakci s houbou *L. muscarium* (1,60 x 10⁶ spor na 1 mm²). Oproti 7. dni vyprodukovala houba *L. muscarium* 10. den větší počet spor v interakci s *I. fumosorosea* (5,79 x 10⁶ spor na 1 mm²) než v kontrolní variantě, kde výtěžnost spor byla pouze 4,54 x 10⁶ spor na 1 mm². Tyto dva druhy hub se vzájemně negativně neomezují jak v růstu, tak v produkci spor.

Isaria fumosorosea versus *Coniothyrium minitans*

Tabulka 7: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *C. minitans* (hodnocení 7., 10. den, teplota 25 °C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		
Ifr*	102,35±10,62	b	106,91±14,42	b	Ifr*	6,96±E+05	a	1,82±0,09E+06	a		
Cmi	37,07±6,98	c	58,83±10,46	c	Cmi	0,00±0,00	b	6,57±0,00E+05	b		
Ifr+Cmi	164,42±11,35	a	194,23±22,29	a	Ifr+Cmi	3,23±E+05	b	7,23±0,15E+05	b		
Cmi+Ifr	19,21±1,68	d	21,05±3,53	d	Cmi+Ifr	0,00±0,00	b	2,68±0,10E+03	c		
		F=2932,44; df=3,96; p=0,0000***		F= 1325,25; df=3,96; p=0,0000				F= 558,376; df=3,4; p=0,0000		F= 273,149; df=3,4; p=0,0000	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c... průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* vytvořila v kontrolní variantě kolonie o velikosti 102,35 mm² v 7 dnech. Mykoparazitická houba *C. minitans* vytvořila kolonie o ploše 37,07 mm². V kombinaci těchto dvou hub došlo ze strany druhu *I. fumosorosea* k výraznému nárůstu kolonií o 61 % (164,42 mm²) oproti kontrolní variantě, čímž došlo k silnému potlačení růstu kolonií houby *C. minitans* (19,21 mm²). Při hodnocení v 10 dnech nedošlo u entomopatogenní houby *I. fumosorosea* k žádným velkým změnám v kontrolní variantě, zatímco houba *C. minitans* vytvořila kolonie o 21 mm² větší než v kontrolní variantě. V kombinaci obou druhů hub nedošlo k žádným velkým změnám oproti hodnocení po 7 dnech. Růst kolonií *C. minitans* byl potlačen houbou *I. fumosorosea* i v 10 dnech, kde *I. fumosorosea* v kombinaci vytvořila kolonie o ploše 194,23 mm², což je o 29 mm² více než v 7 dnech hodnocení.

Produkce spor houby *I. fumosorosea* byla v 7 dnech 6,96 x 10⁵ na 1 mm² v kontrolní variantě, zatímco produkce spor houby *C. minitans* nebyla zjištěna z důvodu nemožnosti vyhodnocení, kvůli nízké sporulaci houby při teplotě 25 °C. V kombinaci obou druhů byla vyhodnocena pouze produkce spor druhu *I. fumosorosea*, která činila 3,23 x 10⁵ spor na 1 mm². V 10 dnech vyprodukovala v kontrolní variantě houba *I. fumosorosea* 1,82 x 10⁶ spor na 1 mm², což je o 161 % více spor než v 7 dnech. Druh *C. minitans* vyprodukoval 6,57 x 10⁵ spor na 1 mm² v kontrolní variantě. V kombinaci *I. fumosorosea* vyprodukovala 7,23 x 10⁵ spor na 1 mm², zatímco houba *C. minitans* pouze 2,68 x 10³, což je až o dva řády méně než v kontrolní variantě.

Isaria fumosorosea versus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*

Velikost kolonií houby *I. fumosorosea* byly v kontrolní variantě 102,35 mm² a druh *C. rosea* f. *catenulata* vytvořil kolonie o ploše 82,03 mm² v 7 dnech hodnocení. V interakci se velikost kultur houby *I. fumosorosea* příliš nelišila (110,07 mm²) oproti kontrolní variantě, zatímco druh *C. rosea* f. *catenulata* vytvořil kolonie o 41 mm² větší než v kontrolní variantě. Po 10 dnech byly velikosti kolonií obdobné jak v kontrolních variantách, tak i v interakci obou druhů. Tyto dva druhy se vzájemně nijak neovlivňují a aplikace těchto dvou druhů může mít příznivé účinky.

Tabulka 8: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *C. rosea* f. *catenulata* (hodnocení 7., 10. den, teplota 25 °C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey
Ifr	102,35±10,62	c	106,91±14,42	c	Ifr	6,96±0,28E+05	a	1,82±0,09E+06	a
Clo	82,03±10,08	d	88,45±13,68	d	Clo	2,36±0,04E+03	c	9,72±0,49E+05	b
Ifr+Clo	110,07±12,21	b	114,13±11,32	b	Ifr+Clo	4,06±0,15E+05	b	7,93±0,65E+05	b
Clo+Ifr	123,04±12,73	a	127,52±15,08	a	Clo+Ifr	7,40±0,16E+03	c	1,48±0,34E+05	c
F=109,92; df=3,96; p=0,0000***				F= 69,25; df=3,96; p=0,0000		F= 454,780; df=3,4; p=0,0000		F= 119,9911; df=3,4; p=0,0002	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Druh *I. fumosorosea* vyprodukoval v kontrolní variantě 6,96 x 10⁵ spor na 1 mm² a houba *C. rosea* f. *catenulata* 2,36 x 10³ spor na 1 mm² v 7 dnech. V kombinaci obou hub byly produkce spor na přibližně stejné úrovni. Výrazné rozdíly v produkci spor nastaly až po 10 dnech hodnocení. V 10 dnech se produkce spor houby *I. fumosorosea* v kontrolní variantě zvýšila o celý řád na 1,82 x 10⁶ spor na 1 mm² a produkce *C. rosea* f. *catenulata* až o dva řády na 9,72 x 10⁵ spor na 1 mm² oproti hodnocení v 7 dnech. V interakci byly produkce spor obou druhů hub o něco nižší než v kontrolních variantách.

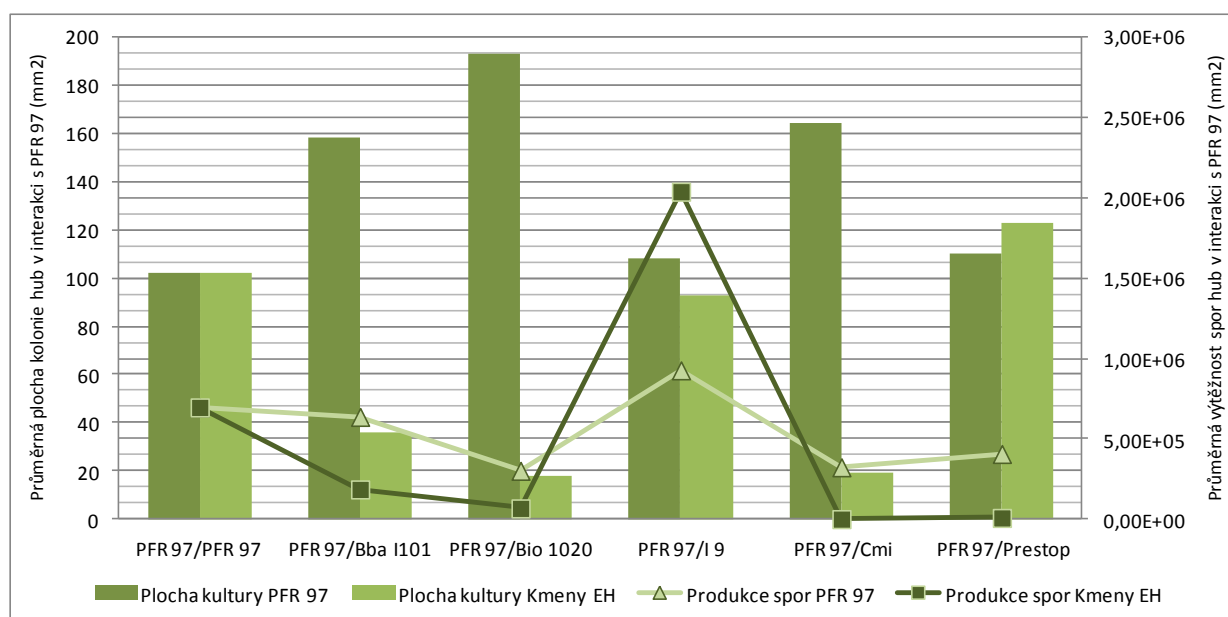
Porovnání růstu kolonií a produkce spor entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* po kultivaci při 25 °C

V grafu byl sledován vliv houby *I. fumosorosea* na růst, vývoj a produkci spor různých druhů vláknitých hub ve vzájemné interakci. První sloupec v grafu znázorňuje velikost

kolonií a produkci spor *I. fumosorosea*. Druhý sloupec znázorňuje velikost a produkci spor jednotlivých druhů hub v interakci s *I. fumosorosea*.

U všech druhů vláknitých hub je patrné, že je houba *I. fumosorosea* více či méně ovlivňovala nejen ve velikosti kolonií, ale i v produkci spor. Výrazný vliv sledovaných parametrů byl zaznamenán u druhů *M. anisopliae*, *B. bassiana* a *C. minutans*. U těchto druhů byl výrazně potlačen růst zřejmě v důsledku toho, že houba *I. fumosorosea* kolonizovala rychleji prostředí, popřípadě produkovala nežádoucí sekundární metabolity, které potlačily jejich růst.

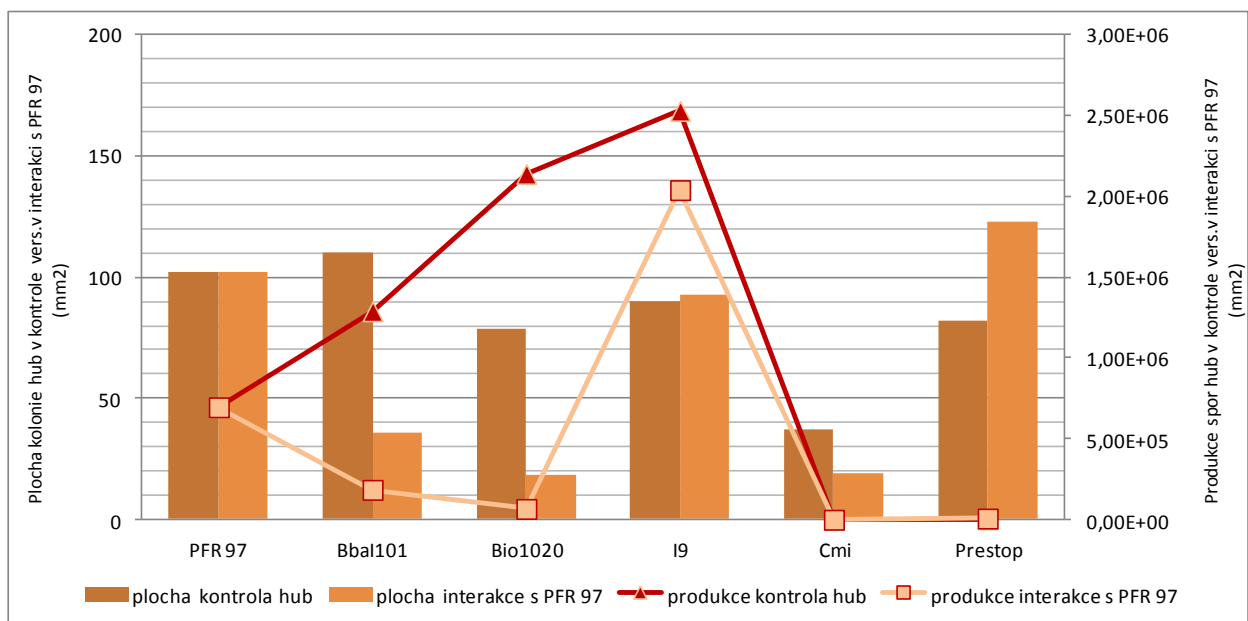
Graf 2: Porovnání plochy kultury a produkce spor v mm² entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* (7. den, 25 °C)



Z důvodu pomalejšího růstu a vývoje všechny zmíněné druhy produkovaly daleko méně spor než houba *I. fumosorosea*. Konkrétně, druh *I. fumosorosea* vytvořil největší kolonie v kombinaci s houbou *M. anisopliae*, kde díky rychlé kolonizaci prostředí potlačil znatelně růst houby *M. anisopliae*. Tento poznatek se projevil i ve výtěžnosti spor, kde druh *I. fumosorosea* vykázal o něco nižší produkci spor oproti kontrolní variantě, zatímco produkce spor u druhu *M. anisopliae* byla nižší až o 96 %. V kombinaci s houbou *B. bassiana* vytvořila houba *I. fumosorosea* oproti kontrolní variantě podstatně větší kolonie, což mělo za následek opět potlačení růstu houby *B. bassiana*, díky rychlé kolonizaci prostředí. Výtěžnost spor se u druhu *I. fumosorosea* pohybovala na stejné úrovni, zatímco u druhu *B. bassiana* byla zaznamenána výtěžnost spor výrazně nižší, stejně jako u druhu *M. anisopliae* a *C. minutans*.

U druhů *L. muscarium* a *C. rosea* f. *catenulata* nedošlo k tak výrazným rozdílům. Houba *I. fumosorosea* nikterak neovlivnila růst a vývoj houby *L. muscarium*. Obě houby vytvořily ve vzájemné kombinaci téměř stejné kultury. Druh *L. muscarium* naopak vyprodukoval větší množství spor ve vzájemné interakci s *I. fumosorosea*. Z grafu je patrné, že mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* vytvořila ve vzájemné interakci větší kolonie než *I. fumosorosea*, nicméně produkce spor byla ve prospěch kmene PFR 97 druhu *I. fumosorosea*.

Graf 3: Porovnání plochy kultury a produkce spor v mm² entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v kontrolní variantě versus v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* (7. den, 25 °C)



V grafu je znázorněn znatelný rozdíl v růstu a produkci spor jednotlivých druhů hub v interakci s houbou *I. fumosorosea*. První sloupec ukazuje produkci jednotlivých druhů hub v kontrolní variantě, to znamená, že byl každý druh podle šablony kultivován na Petriho misku samostatně. Z kontrolních misek bylo patrné, že sám sebe druh neovlivňuje a všechny narostlé kolonie na Petriho misce jsou rovnoměrně narostlé. Druhý sloupec vykazuje růst jednotlivých druhů hub ve vzájemné kombinaci s *I. fumosorosea*. U těchto kmenů již vlivem tohoto druhu dochází k negativnímu nebo pozitivnímu ovlivnění jejich růstu potažmo produkce spor. Zajímavá kombinace je *I. fumosorosea* a *L. muscarium*, kde *L. muscarium* vykázal vysokou produkci spor nejen ve své kontrolní variantě, ale i v interakci s *I. fumosorosea*. Nicméně, v kontrolní variantě vyprodukoval kmen I9 houby *L. muscarium* více spor. Výrazný rozdíl v produkci spor byl zaznamenán u kmene BIO 1020, kde

v kontrolní variantě vyprodukoval téměř o dva řády více spor než v interakci. Podobné výsledky byly zjištěny u kmene I101 houby *B. bassiana*. U mykoparazitických hub jsou produkce jak v kontrolních variantách, tak i v interakcích téměř identické, i přesto, že jsou zaznamenány rozdíly ve velikosti kultur.

5.2.2 Vliv entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na růst a vývoj dalších entomopatogenních a mykoparazitických hub v jejich vzájemné interakci při 23 °C

Základní údaje k pokusu:

- Suspenze spor kmenů PFR 97 (*I. fumosorosea*) x I101 (*B. bassiana*), I9 (*L. lecanii*), BIO 1020 (*M. anisopliae*) a Prestop (*C. rosea* f. *catenulata*) o standardním titru $1,00 \times 10^6$ v 1 ml
- dvojice hub byly střídavě nanášeny na plotnu živné půdy PDA s pomocí předem připravené předlohy.
- Po zaschnutí kapek byly Petriho misky uloženy v sáčcích do termostatu a kultivovány při teplotě 23 °C
- Hodnocení radiálního růstu a výtěžnosti spor bylo provedeno po 7 a 10 dnech
- Pro každou dvojici byly připraveny 2 varianty, každá měla dvě opakování

Po 7 dnech vyprodukovaly kolonie *I. fumosorosea* $3,70 \times 10^5$ spor na 1 mm^2 v kontrolní variantě. Kontrolní varianta *B. bassiana* měla produkci spor větší ($1,12 \times 10^6$ na 1 mm^2). V kombinaci byla produkce spor houby *I. fumosorosea* o něco nižší než v kontrolní variantě, zatímco kolonie *B. bassiana* vyprodukovaly více spor oproti kontrolní variantě i přesto, že růst kolonií byl znatelně potlačen. Po 10 dnech došlo k nárůstu spor v obou kontrolních variantách. Výrazný pokles produkce spor byl zaznamenán u kolonií *B. bassiana*, kdy výtěžnost byla pouze $6,44 \times 10^5$ spor na 1 mm^2 oproti kontrolní variantě.

Isaria fumosorosea versus *Beauveria bassiana*

Tabulka 9: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *B. bassiana* (hodnocení 7., 10. den, teplota 23 °C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey
Ifr*	108,92±11,34	c	115,22±10,26	c	Ifr*	3,70±0,13E+05	c	1,02±0,02E+06	b
Bba	153,26±19,17	b	159,53±13,07	b	Bba	1,12±0,05E+06	b	2,89±0,08E+06	a
Ifr+Bba	162,62±11,88	a	165,91±14,87	a	Ifr+Bba	1,76±0,21E+05	c	7,42±0,38E+05	c
Bba+Ifr	43,94±6,24	d	48,88±4,59	d	Bba+Ifr	1,93±0,27E+06	a	6,44±0,06E+05	c
F= 850,36; df=3,196; p=0,0000***				F= 1100,43; df=3,196; p=0,0000		F= 34,0547; df=3,4; p=0,0026		F= 538,065; df=3,4; p=0,0000	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c... průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Isaria fumosorosea versus *Metarhizium anisopliae*

Tabulka 10: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *M. anisopliae* (hodnocení 7., 10. den, teplota 23°C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey
Ifr*	108,92±11,34	b	115,22±10,26	b	Ifr*	3,70±0,13E+05	b	1,02±0,02E+06	b
Man	83,97±10,64	c	84,93±10,70	c	Man	1,20±0,03E+06	a	2,13±0,13E+06	a
Ifr+Man	162,17±11,76	a	166,39±15,32	a	Ifr+Man	1,31±0,08E+05	c	5,52±0,81E+05	c
Man+Ifr	17,94±3,02	d	19,34±3,59	d	Man+Ifr	2,76±1,10E+04	d	2,37±0,11E+04	d
F= 1804,50; df=3,196; p=0,0000***				F= 1583,05; df=3,196; p=0,0000		F= 902,630; df=3,4; p=0,0000		F= 141,8494; df=3,4; p=0,0002	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c... průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Po 7 dnech *I. fumosorosea* vytvořila kolonie o velikosti 108,92 mm² v kontrolní variantě a houba *M. anisopliae* kultury o ploše 83,97 mm². V kombinaci obou druhů vytvořila *I. fumosorosea* kolonie o 53 mm² větší. Houba *I. fumosorosea* využila dostatečného prostoru pro svůj růst, čímž způsobila potlačení růstu kolonií druhu *M. anisopliae*, který tak vytvořil kultury o velikosti pouhých 17,94 mm². Po 10 dnech byly hodnoty růstu téměř srovnatelné.

Kolonie *I. fumosorosea* vyprodukovaly po 7 dnech hodnocení v kontrolní variantě 3,70 x 10⁵ spor na 1 mm². Produkce spor houby *M. anisopliae* byla podstatně vyšší. V interakci obou druhů byla výtěžnost druhu *I. fumosorosea* o něco nižší (1,31 x 10⁵ spor na

1 mm²) ve srovnání s kontrolní variantou. Znatelný rozdíl byl zaznamenán v produkci druhu *M. anisopliae*, který v kombinaci dosáhl výtěžnosti jen 2,76 x 10⁴ spor na 1 mm². Houba *I. fumosorosea* díky silné kolonizaci prostředí potlačila nejen růst kolonií, ale nepříznivě ovlivnila i produkci spor *M. anisopliae*. Po 10 dnech došlo v kontrolních variantách k nárůstu výtěžností u obou druhů testovaných hub. V kombinaci byla opět zaznamenána o něco nižší produkce spor *M. anisopliae* oproti hodnocení v 7 dnech.

Isaria fumosorosea versus *Lecanicillium muscarium*

Tabulka 11: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *L. muscarium* (hodnocení 7., 10. den, teplota 23 °C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey
Ifr*	108,92±11,34	b	115,22±10,26	b	Ifr*	3,70±0,13E+05	b	1,02±0,02E+06	c
Lmu	91,07±7,04	c	97,07±11,00	c	Lmu	3,64±0,17E+06	a	5,32±0,09E+06	a
Ifr+Lmu	127,16±15,99	a	137,55±12,62	a	Ifr+Lmu	5,31±0,03E+05	b	6,21±0,74E+05	c
Lmu+Ifr	111,15±11,47	b	114,23±13,07	b	Lmu+Ifr	3,18±0,54E+06	a	3,50±0,32E+06	b
	F= 153,35; df=3,196; p=0,0000***		F= 45,97; df=3,196; p=0,0000			F= 37,6203; df=3,4; p=0,0022		F= 165,1037; df=3,4; p=0,0001	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Druh *I. fumosorosea* po 7 dnech vytvořil v kontrolní variantě kolonie o velikosti 108,92 mm². Kolonie *L. muscarium* dosáhly plochy 91,07 mm² v kontrolní variantě. V kombinaci došlo k nárůstu kolonií obou testovaných druhů. Houba *I. fumosorosea* v kombinaci vytvořila kolonie o 18 mm² větší než v kontrolní variantě a druh *L. muscarium* kultury o 20 mm² větší oproti kontrolní variantě. Po 10 dnech oba druhy rostly rovnoměrně jak v kontrolních variantách, tak i v kombinacích. Tyto dva druhy se vzájemně nijak neovlivňují. Aplikace těchto dvou hub je příznivá především proti škůdcům škodících zejména na listech, kdy *L. muscarium* je schopna infikovat mšice a *I. fumosorosea* je schopna potlačit navíc i populace svilušek.

Po 7 dnech vyprodukovala houba *I. fumosorosea* 3,70 x 10⁵ spor na 1 mm² a druh *L. muscarium* 3,64 x 10⁶ spor na 1 mm² v kontrolní variantě. Ve vzájemné interakci byla produkce houby *I. fumosorosea* vyšší (5,31 x 10⁵ spor na 1 mm²) a kolonie *L. muscarium* měly produkci naopak nižší (3,18 x 10⁶ spor na 1 mm²) oproti kontrolní variantě. Po 10 dnech

hodnocení byly výtěžnosti v kombinaci obdobné, jen o něco vyšší než v 7 dnech a jediná změna nastala u druhu *I. fumosorosea*, která měla produkci spor v 10 dnech $1,02 \times 10^6$ spor na 1 mm^2 , což je výtěžnost nižší než v 7 dnech.

Isaria fumosorosea versus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*

V kontrolní variantě vytvořila *I. fumosorosea* kolonie o velikosti $108,92 \text{ mm}^2$ a druh *C. rosea* f. *catenulata* kultury velké $117,21 \text{ mm}^2$ v 7 dnech. V kombinaci se *I. fumosorosea* rozrostla natolik, že vytvořila kolonie o velikosti $176,51 \text{ mm}^2$ a způsobila tím potlačení růstu kolonií *C. rosea* f. *catenulata*, která vytvořila kolonie o ploše pouhých $73,72 \text{ mm}^2$. Po 10 dnech byly hodnoty obdobné.

Tabulka 12: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *C. rosea* f. *catenulata* (hodnocení 7., 10. den, teplota 23 °C)

	7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		7.den	HSD Tukey	10.den	HSD Tukey		
Ifr*	108,92±11,34	c	115,22±10,26	c	Ifr*	3,70±0,13E+05	a	1,02±0,02E+06	a		
Clo	117,21±12,07	b	123,13±14,37	b	Clo	9,26±0,74E+02	c	6,87±0,26E+04	c		
Ifr+Clo	176,51±13,72	a	178,03±16,33	a	Ifr+Clo	2,41±0,35E+05	b	5,89±0,18E+05	b		
Clo+Ifr	73,72±11,10	d	88,00±12,03	d	Clo+Ifr	1,31±0,05E+03	c	3,41±0,08E+04	c		
F= 609,48; df=3,196; p=0,0000***				F= 386,50; df=3,196; p=0,0000				F= 99,3065; df=3,4; p=0,0003		F= 1230,078; df=3,4; p=0,0000	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

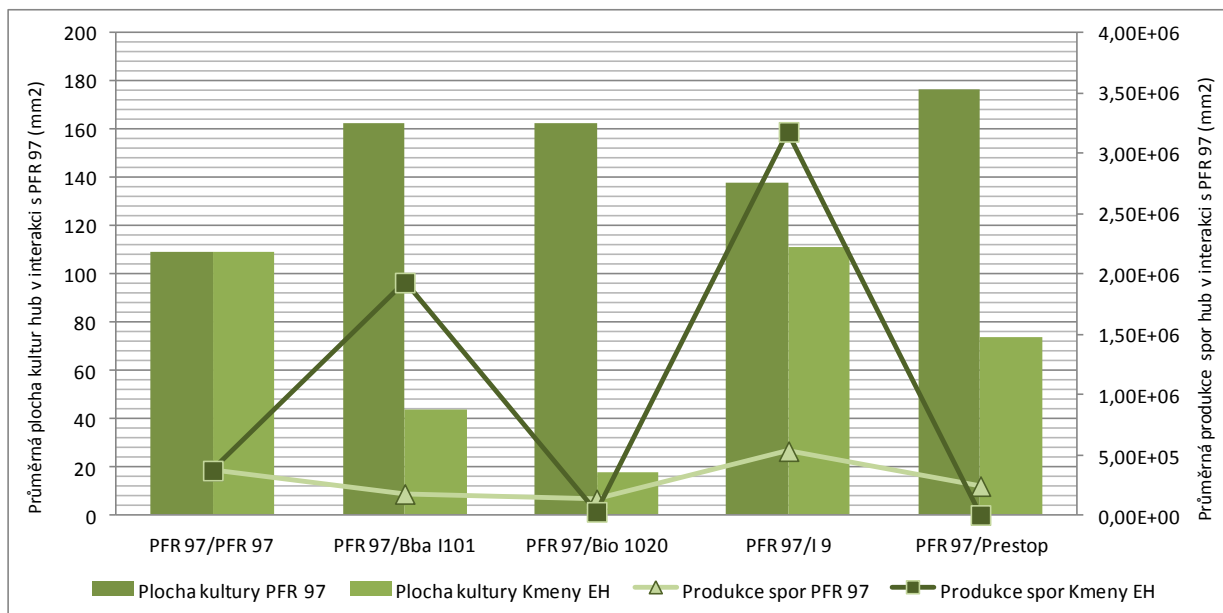
** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

V kontrolní variantě po 7 dnech vyprodukovala houba *I. fumosorosea* $3,70 \times 10^5$ spor na 1 mm^2 a druh *C. rosea* f. *catenulata* jen $9,26 \times 10^2$ spor na 1 mm^2 . V kombinaci obou druhů byla výtěžnost *I. fumosorosea* téměř srovnatelná, zatímco druh *C. rosea* f. *catenulata* měla výtěžnost o něco vyšší ($1,31 \times 10^3$ spor na 1 mm^2) než v kontrolní variantě. Po 10 dnech byla v kontrolních variantách produkce spor vyšší u obou druhů, kdy *I. fumosorosea* vyprodukovala $1,02 \times 10^6$ spor na 1 mm^2 a druh *C. rosea* f. *catenulata* měla výtěžnost $6,87 \times 10^4$ spor na 1 mm^2 , což je až o dva řády více než v 7 dnech hodnocení. V kombinaci se zvýšila produkce spor především u houby *C. rosea* f. *catenulata*, která vyprodukovala $3,41 \times 10^4$ spor na 1 mm^2 , zatímco produkce spor *I. fumosorosea* byla srovnatelná.

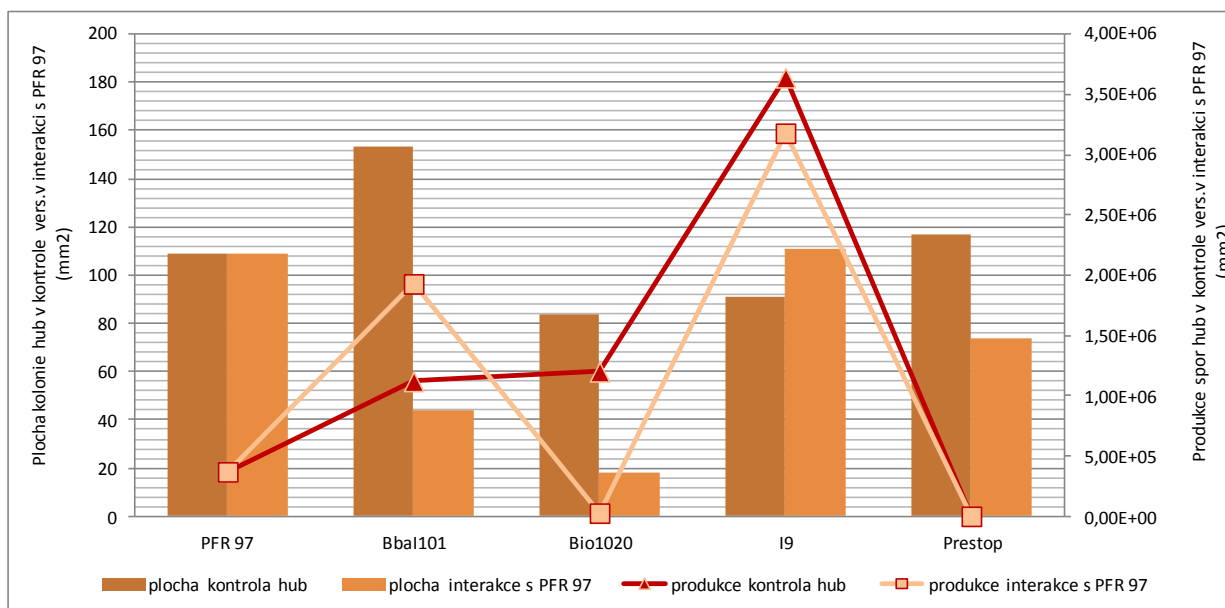
Porovnání růstu kolonií a produkce spor entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* po kultivaci při 23 °C

Graf 4: Porovnání plochy kultury a produkce spor v mm² entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* (7. den, 23 °C)



Při kultivaci hub ve 23 °C nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v růstu kolonií u vláknitých hub. Rozdíl ve velikosti kolonií byl zaznamenán pouze u kombinace *I. fumosorosea* versus *C. rosea* f. *catenulata*. Druh *I. fumosorosea* vytvořil více než dvojnásobně větší kolonie. Obdobné výsledky byly i v produkci hub. Rozdíl byl zaznamenán u kombinace *I. fumosorosea* versus *B. bassiana*, kde druh *B. bassiana* vyprodukoval více spor při kultivaci v této teplotě než při 25 °C. Produkce spor houby *I. fumosorosea* byla o něco nižší než v kontrolní variantě. U kombinace houby *I. fumosorosea* a druhu *L. muscarium* nedošlo opět k výraznému ovlivnění.

Graf 5: Porovnání plochy kultury a produkce spor v mm² entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v kontrolní variantě versus v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* (7. den, 23 °C)



Při porovnání kontrolních variant jednotlivých druhů hub s variantami ve vzájemné interakci s *I. fumosorosea* při 23 °C byly zaznamenány stejné výsledky jako u 25 °C. K rozdílům došlo opět u kombinace *I. fumosorosea* versus *C. rosea* f. *catenulata*. Houba *B. bassiana* v kombinaci s houbou *I. fumosorosea* vytvořila mnohem menší kolonie, ale tento poznatek neměl žádný vliv na produkci spor. V kombinaci *I. fumosorosea* s houbou *M. anisopliae* bylo taktéž zaznamenáno potlačení růstu houby *M. anisopliae*, ale ve srovnání s *B. bassiana* byla ovlivněna produkce spor. Produkce *M. anisopliae* byla až o dva řády nižší než v kontrolní variantě. Růst kolonií houby *L. muscarium* v interakci s houbou *I. fumosorosea* byl srovnatelný a oba druhy hub se vzájemně výrazně neovlivňují. Produkce *L. muscarium* z obou variant, jak kontrole, tak v interakci byly téměř vyrovnané. Mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* vytvořila v kombinaci s houbou *I. fumosorosea* menší kolonie oproti kontrolní variantě.

5.2.3 Vliv entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na růst a vývoj dalších entomopatogenních a mykoparazitických hub v jejich vzájemné interakci při 15 °C

Základní údaje k pokusu:

- Suspenze spor kmenů PFR 97 (*I. fumosorosea*) x I101 (*B. bassiana*), I9 (*L. lecanii*), BIO 1020 (*M. anisopliae*), Prestop (*C. rosea* f. *catenulata*) a *C. minitans* o standardním titru $1,00 \times 10^6$ v 1 ml
- dvojice hub byly střídavě nanášeny na plotnu živné půdy PDA s pomocí předem připravené předlohy.
- Po zaschnutí kapek byly Petriho misky uloženy v sáčcích do termostatu a kultivovány při teplotě 15 °C
- Hodnocení radiálního růstu a výtěžnosti spor bylo provedeno po 14 a 21 dnech
- Pro každou dvojici byly připraveny 2 varianty, každá měla dvě opakování

Isaria fumosorosea versus *Beauveria bassiana*

Tabulka 13: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *B. bassiana* (hodnocení 14., 21. den, teplota 15 °C)

	14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey		14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey
Ifr*	70,78±7,46	c	74,66±6,55	c	Ifr*	4,76±0,13E+06	a	9,21±0,50E+06	a
Bba	108,86±10,15	a	109,85±6,94	b	Bba	5,14±0,20E+05	c	3,26±0,29E+06	b
Ifr+Bba	97,36±9,67	b	117,87±9,91	a	Ifr+Bba	4,23±0,07E+06	b	4,07±0,11E+06	b
Bba+Ifr	57,77±7,23	d	59,41±7,44	d	Bba+Ifr	6,62±0,13E+05	c	3,96±0,06E+06	b
	F= 355,81; df=3,196; p=0,0000***		F= 625,41; df=3,196; p=0,0000			F= 897,775; df=3,4; p=0,0000		F= 87,287; df=3,4; p=0,0004	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c... průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea* vytvořila po 14 dnech hodnocení v kontrolní variantě kolonie o velikosti 70,78 mm² (hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub) a druh *B. bassiana* kolonie o ploše 108,86 mm². V kombinaci těchto druhů došlo k nárůstu kolonií *I. fumosorosea*, která vytvořila kultury o velikosti 97,36 mm², čímž došlo ke kolonizaci prostředí a potlačení růstu

houby *B. bassiana* (57,77 mm²). Houba *I. fumosorosea* má nepříznivý vliv na růst kolonií *B. bassiana*. Po 21 dnech byly velikosti kolonií v kontrolních variantách obdobné. Rozdíl byl znatelný pouze v kombinaci, kde *I. fumosorosea* vytvořila kultury větší o 43 mm² oproti kontrolní variantě. Plocha kultury kontrolních kolonií i kolonií hub ve vzájemné interakci je statisticky průkazná (viz. tabulka).

Kolonie *I. fumosorosea* vyprodukovaly v kontrolní variantě po 14 dnech hodnocení 4,76 x 10⁶ spor na 1 mm² a kolonie *B. bassiana* 5,14 x 10⁵ spor na 1 mm². V kombinaci byla výtěžnost houby *I. fumosorosa* snížena o 12 % oproti kontrolní variantě, zatímco druh *B. bassiana* vyprodukoval v kombinaci o 29 % více spor na 1 mm² než v kontrolní variantě. Po 21 dnech hodnocení byla výtěžnost spor houby *I. fumosorosea* v kombinaci o 56 % nižší oproti kontrolní variantě, zatímco *B. bassiana* vyprodukovala v kombinaci o 17 % více spor než v kontrolní variantě. I přesto, že u kmene I 101 houby *B. bassiana* byl znatelně potlačen růst kolonií, díky rychlé kolonizaci prostředí houbou *I. fumosorosea*, tak tento poznatek nemá vliv na produkci spor díky stimulaci produkce obou druhů hub. Výtěžnost spor u kontrolních kolonií i kolonií hub ve vzájemné interakci je statisticky průkazná (viz. tabulka).

Isaria fumosorosea versus *Metarhizium anisopliae*

Tabulka 14: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *M. anisopliae* (hodnocení 14., 21. den, teplota 15°C)

	14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey		14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey
Ifr*	70,78±7,46	b	74,66±6,55	b	Ifr*	4,76±0,13E+06	a	9,21±0,50E+06	a
Man	61,81±6,14	c	67,39±9,35	c	Man	1,02±0,04E+06	c	2,23±0,06E+06	c
Ifr+Man	104,52±11,06	a	117,09±9,47	a	Ifr+Man	3,20±0,20E+06	b	6,91±0,55E+06	b
Man+Ifr	10,76±3,20	d	12,72±2,83	d	Man+Ifr	1,68±0,22E+04	d	3,00±0,25E+05	c
	F= 1304,46; df=3,196; p=0,0000***		F= 1579,89; df=3,196; p=0,0000			F= 305,829; df=3,4; p=0,0000		F= 121,0319; df=3,4; p=0,0002	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, α=0,05; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Druh *I. fumosorosea* vytvořil v kontrolní variantě po 14 dnech hodnocení kolonie o ploše 70,78 mm² a houba *M. anisopliae* kolonie o velikosti 61,81 mm². V kombinaci obou druhů hub došlo k nárůstu kultur *I. fumosorosea* až na velikost 104,52 mm². Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* silně kolonizovala prostředí a tím potlačila růst kolonií houby *M. anisopliae*, která vytvořila kolonie o velikosti pouhých 10,76 mm². Po 21 dnech hodnocení

nedošlo v kontrolních variantách k žádným velkým změnám. Oba druhy rostly rovnoměrně. Pouze v kombinaci obou druhů byl zaznamenán další nárůst kolonií *I. fumosorosea* až na 117,09 mm², což jsou kultury větší o 56 % oproti kontrolní variantě.

Kolonie *I. fumosorosea* vyprodukovaly v kontrolní variantě po 14 dnech 4,76 x 10⁶ spor na 1 mm² a druh *M. anisopliae* dosáhl výtěžnosti 1,02 x 10⁶ spor na 1 mm². V kombinaci obou druhů byla produkce spor *I. fumosorosea* na srovnatelné úrovni s kontrolní variantou, zatímco *M. anisopliae* vyprodukoval jen 1,68 x 10⁴ spor na 1 mm². Nižší produkce spor *M. anisopliae* byla zapříčiněna silnou kolonizací prostředí druhem *I. fumosorosea*. Po 21 dnech vyprodukovaly oba dva druhy v kontrolních variantách dvojnásobné množství spor na 1 mm² oproti hodnocení po 14 dnech. Druh *I. fumosorosea* silnou kolonizací prostředí potlačil nejen růst kolonií *M. anisopliae*, ale tento efekt byl prokázán i u výtěžnosti spor, kde *M. anisopliae* vyprodukovalo o 87 % méně spor než v kontrolní variantě.

Isaria fumosorosea versus *Lecanicillium muscarium*

Tabulka 15: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *L. muscarium* (hodnocení 14., 21. den, teplota 15 °C)

	14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey		14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey
Ifr*	70,78±7,46	c	74,66±6,55	c	Ifr*	4,76±0,13E+06	a	9,21±0,50E+06	a
Lmu	82,50±7,04	b	86,25±10,85	b	Lmu	7,29±0,36E+05	c	1,33±0,05E+06	c
Ifr+Lmu	66,90±6,18	d	68,16±7,89	d	Ifr+Lmu	3,86±0,09E+06	b	5,77±0,13E+06	b
Lmu+Ifr	93,45±6,97	a	108,82±9,41	a	Lmu+Ifr	6,45±0,27E+05	c	9,94±0,35E+05	c
	F= 147,49; df=3,196; p=0,0000***		F= 201,22; df=3,196; p=0,0000			F= 648,537; df=3,4; p=0,0000		F= 226,283; df=3,4; p=0,0001	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c... průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, α=0,05; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* vytvořila v kontrolní variantě kultury o velikosti 70,78 mm² a druh *L. muscarium* kolonie o ploše 82,50 mm² po 14 dnech hodnocení. V interakci byly kolonie *I. fumosorosea* o něco málo menší (66,90 mm²) než v kontrolní variantě a naopak *L. muscarium* vytvořilo kultury o něco větší ve srovnání s kontrolní variantou. Po 21 dnech nedošlo v kontrolních variantách k žádným velkým změnám. Oba druhy rostly rovnoměrně v rozmezí několika málo milimetrů. Pouze

v kombinaci houba *L. muscarium* vytvořila kolonie o 22 mm² větší než v kontrolní variantě. Druh *L. muscarium* kmen I9 mírně potlačil růst kmene PFR 97 houby *I. fumosorosea*.

Produkce spor houby *I. fumosorosea* byla v kontrolní variantě po 14 dnech 4,76 x 10⁶ na 1 mm² druh *L. muscarium* vyprodukoval 7,29 x 10⁵ spor na 1 mm². V kombinaci houba *I. fumosorosea* měla výtěžnost o něco málo nižší (3,86 x 10⁶ spor na 1 mm²) než v kontrolní variantě. Obdobně na tom byl i druh *L. muscarium*, který v kombinaci vyprodukoval také o něco méně spor (6,45 x 10⁵ na 1 mm²) oproti kontrolní variantě. Po 21 dnech hodnocení byla zaznamenána u houby *I. fumosorosea* produkce spor v kontrolní variantě větší o téměř 50 % oproti hodnocení ve 14 dnech. V kombinaci obou druhů hub nebyl tak velký rozdíl v produkci spor. Obdobně na tom byla výtěžnost houby *L. muscarium*.

Isaria fumosorosea versus *Coniothyrium minitans*

Tabulka 16: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *C. minitans* (hodnocení 14., 21. den, teplota 15 °C)

	14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey		14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey
Ifr*	70,78±7,46	b	74,66±6,55	b	Ifr*	4,76±0,13E+06	a	9,21±0,50E+06	a
Cmi	65,77±6,53	c	66,73±8,18	c	Cmi	5,35±0,06E+05	c	1,31±0,05E+06	c
Ifr+Cmi	150,64±10,92	a	157,71±12,09	a	Ifr+Cmi	2,34±0,13E+06	b	3,04±0,06E+06	b
Cmi+Ifr	57,30±8,20	d	59,44±7,98	d	Cmi+Ifr	6,10±0,56E+05	c	1,05±0,11E+06	c
	F= 1295,45; df=3,196; p=0,0000***		F= 1286,40; df=3,196; p=0,0000			F= 425,767; df=3,4; p=0,0000		F= 216,6247; df=3,4; p=0,0001	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, α=0,05; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

Kolonie houby *I. fumosorosea* vyprodukovaly v kontrolní variantě 4,76 x 10⁶ spor na 1 mm² po 14 dnech hodnocení a druh *C. minitans* 5,35 x 10⁵ spor na 1 mm². V interakci byla produkce spor houby *I. fumosorosea* o něco nižší (2,34 x 10⁶ spor na 1 mm²) než v kontrolní variantě a naopak kolonie houby *C. minitans* vyprodukovaly v kombinaci více spor (6,10 x 10⁵ na 1 mm²) oproti kontrolní variantě. Po 21 dnech houba *I. fumosorosea* měla produkci spor oproti kontrolní variantě podstatně nižší (3,04 x 10⁶ na 1 mm²). Výtěžnost druhu *C. minitans* byla v kombinaci srovnatelná s kontrolní variantou. V kombinaci obou druhů dochází ze strany houby *I. fumosorosea* k mírnému potlačení růstu kultur druhu *C. minitans*. Tento jev však neměl vliv na produkci spor houby *C. minitans*.

V kontrolní variantě vytvořila po 14 dnech hodnocení houba *I. fumosorosea* kolonie o velikosti 70,78 mm² a druh *C. minitans* kultury o ploše 65,77 mm². V kombinaci obou druhů vytvořila *I. fumosorosea* kolonie o 113 % větší (150,64 mm²) než v kontrolní variantě a houba *C. minitans* vytvořila o 8 mm² menší kultury oproti kontrolní variantě. Kolonie *I. fumosorosea* se rozrostly natolik, že pro kolonie *C. minitans* to mělo nepříznivý vliv, co se týče nedostatku prostoru pro svůj růst. Při hodnocení po 21 dnech byl růst kolonií v kontrolních variantách i v kombinacích poměrně srovnatelný.

Isaria fumosorosea versus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*

Tabulka 17: Hodnocení růstu a produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s houbou *C. rosea* f. *catenulata* (hodnocení 14., 21. den, teplota 15 °C)

	14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey		14.den	HSD Tukey	21.den	HSD Tukey
Ifr*	70,78±7,46	c	74,66±6,55	c	Ifr*	4,76±0,13E+06	b	9,21±0,50E+06	a
Clo	89,43±7,81	b	93,48±7,79	b	Clo	2,08±0,17E+05	c	1,28±0,05E+06	c
Ifr+Clo	64,58±5,34	d	71,74±8,39	c	Ifr+Clo	5,67±,017E+06	a	4,98±0,01E+06	b
Clo+Ifr	149,46±13,97	a	153,31±12,38	a	Clo+Ifr	9,46±0,89E+04	c	4,33±0,06E+05	c
	F= 864,38; df=3,196; p=0,0000***		F= 861,75; df=3,196; p=0,0000			F= 771,690; df=3,4; p=0,0000		F= 255,099; df=3,4; p=0,0001	

* hodnota *I. fumosorosea* v kontrolní variantě je stejná pro všechny testované druhy hub

** a,b,c.. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

*** výpočet analýzy rozptylu, dávající informaci o průkaznosti mezi sledovanými parametry

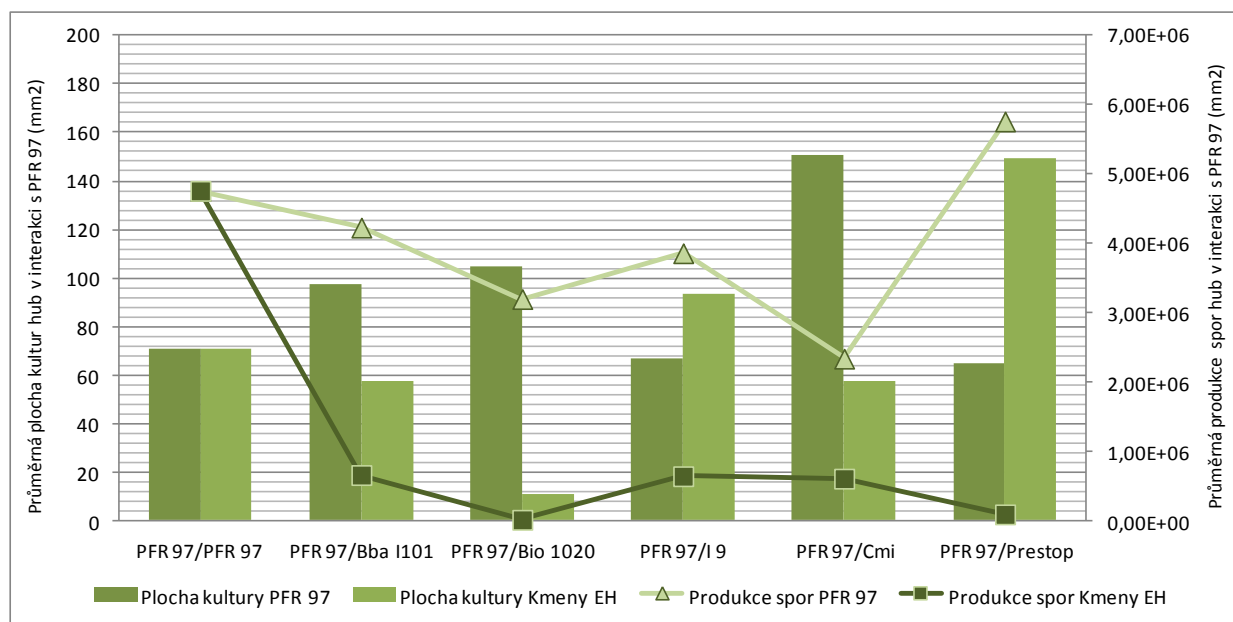
Entomopatogenní houba *C. rosea* f. *catenulata* vytvořila v kontrolní variantě kultury o ploše 89,43 mm² a kolonie druhu *I. fumosorosea* dosáhly velikosti 70,78 mm² po 14 dnech hodnocení. V kombinaci obou druhů se znatelně rozrostly kolonie houby *C. rosea* f. *catenulata*, která vytvořila kolonie velké 149,46 mm², čímž byl potlačen růst kultur houby *I. fumosorosea*, která tak vytvořila kolonie o 6 mm² menší oproti kontrolní variantě. Po 21 dnech byly hodnoty obdobné.

Houba *I. fumosorosea* vyprodukovala v kontrolní variantě po 14 dnech 4,76 x 10⁶ spor na 1 mm² a druh *C. rosea* f. *catenulata* 2,08 x 10⁵ spor na 1 mm². Výťažnost houby *I. fumosorosea* byla v kombinaci o něco málo větší (5,67 x 10⁶ spor na 1 mm²) oproti kontrolní variantě, zatímco druh *C. rosea* f. *catenulata* vyprodukoval v interakci méně spor (9,46 x 10⁴ na 1 mm²) než v kontrolní variantě. Po 21 dnech hodnocení byla produkce spor houby *I. fumosorosea* téměř o 50 % nižší než v kontrolní variantě. Druh *C. rosea* f. *catenulata*

dosáhl produkce jen $4,33 \times 10^5$ spor na 1 mm^2 , což je o necelý řád méně než byla zjištěna výtěžnost v kontrolní variantě ($1,28 \times 10^6$ spor na 1 mm^2).

Porovnání růstu kolonií a produkce spor entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* po kultivaci při 15 °C

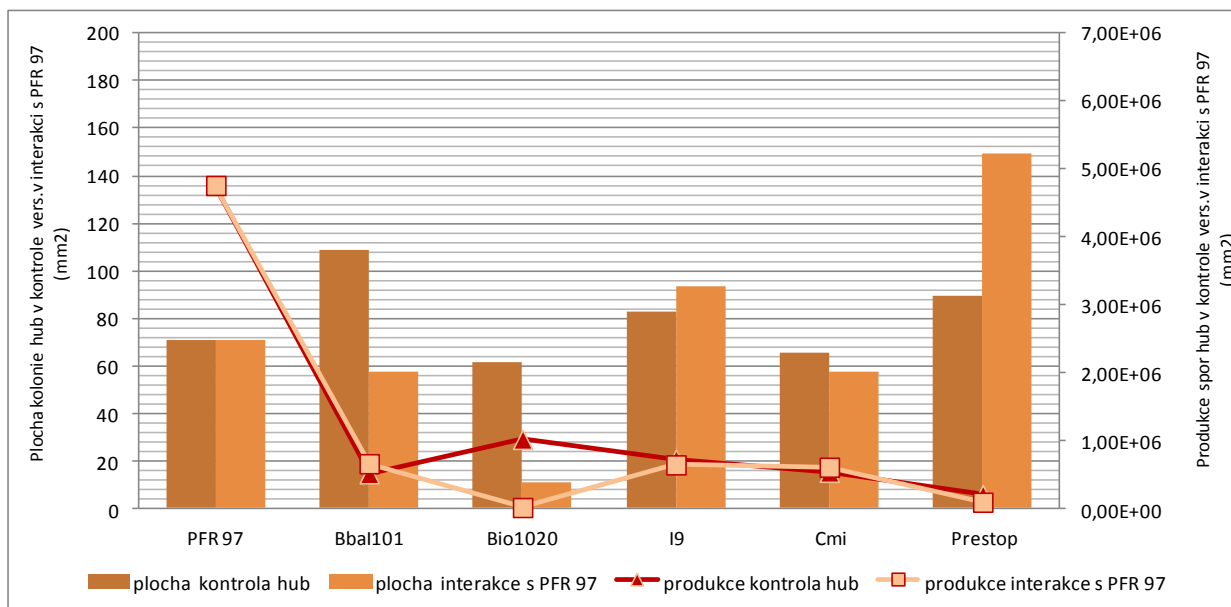
Graf 6: Porovnání plochy kultury a produkce spor v mm^2 entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v interakci s houbou *I. fumosorosea* (14. den, 15 °C)



Při kultivaci hub ve vzájemné interakci při 15 °C byl zaznamenán růst ve prospěch houby *I. fumosorosea* v kombinaci s *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *C. minitans*. Naopak, v kombinaci s *L. muscarium* a *C. rosea* f. *catenulata* v růstu zaostávala, nicméně velikost kolonií byla srovnatelná s kontrolní variantou. Produkce spor u *I. fumosorosea* byla výrazná a to v kombinaci se všemi ostatními druhy hub. Houba *B. bassiana* a *C. minitans* vytvořily v kombinaci s *I. fumosorosea* srovnatelně velké kolonie a vyprodukovaly téměř stejné množství spor. Srovnatelné množství spor vyprodukovala i houba *L. muscarium* i přesto, že měla výrazně větší kolonie než *B. bassiana* a *C. minitans*. Nejmenší kolonie vytvořila houba *M. anisopliae* v kombinaci s *I. fumosorosea* a zároveň vyprodukovala i velmi nízký počet spor. Mírné potlačení růstu kolonií houby *I. fumosorosea* bylo zaznamenáno ze strany *C. rosea* f. *catenulata*. Tato mykoparazitická houba vytvořila v kombinaci mnohem větší kolonie než *I. fumosorosea*. Druh *C. rosea* f. *catenulata* vyprodukoval v interakci výrazně

malé množství spor. Výtěžnost houby *I. fumosorosea* byla v kombinaci s *C. rosea* f. *catenulata* o něco málo větší než v kontrolní variantě.

Graf 7: Porovnání plochy kultury a produkce spor v mm² entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub v kontrolní variantě versus v interakci s houbou *Isaria fumosorosea* (14. den, 15 °C)



Při kultivaci hub v 15 °C byly zaznamenány rozdíly v růstu vláknitých hub v kontrolní variantě versus vzájemné interakci s *I. fumosorosea*. V produkci spor takové rozdíly nebyly patrné. Rozdíl v obou variantách byl zaznamenán pouze u *M. anisopliae*, kde byla větší produkce zaznamenána v kontrolní variantě, což bylo dáno i velikostí kultur. Houba *M. anisopliae* vytvořila v kombinaci s druhem *I. fumosorosea* podstatně menší kultury oproti kontrolní variantě. Růst kultur *B. bassiana* byl ze strany houby *I. fumosorosea* ztlačněn ve srovnání s kontrolní variantou. Rozdíl ve velikosti kultur se však nikterak neprojevil na výtěžnosti spor houby *B. basisana*.

Velikost kolonií houby *L. muscarium* v kontrolní variantě byla téměř srovnatelná jako kolonie v kombinaci s *I. fumosorosea*. Obdobný poznatek byl zaznamenán u mykoparazitické houby *C. minitans*. Druh *C. rosea* f. *catenulata* sice v kombinaci s houbou *I. fumosorosea* vytvořil podstatně větší kolonie oproti kontrolní variantě, ale produkce spor byly na srovnatelné úrovni.

5.3 Vliv entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* na larvách potměníka moučného *T. molitor*

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit účinnost entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* na larvy potměníka moučného *T. molitor* s cílem zaznamenat mortalitu v populaci larev a zároveň zaznamenat index vývoje patogena na jeho hostiteli.

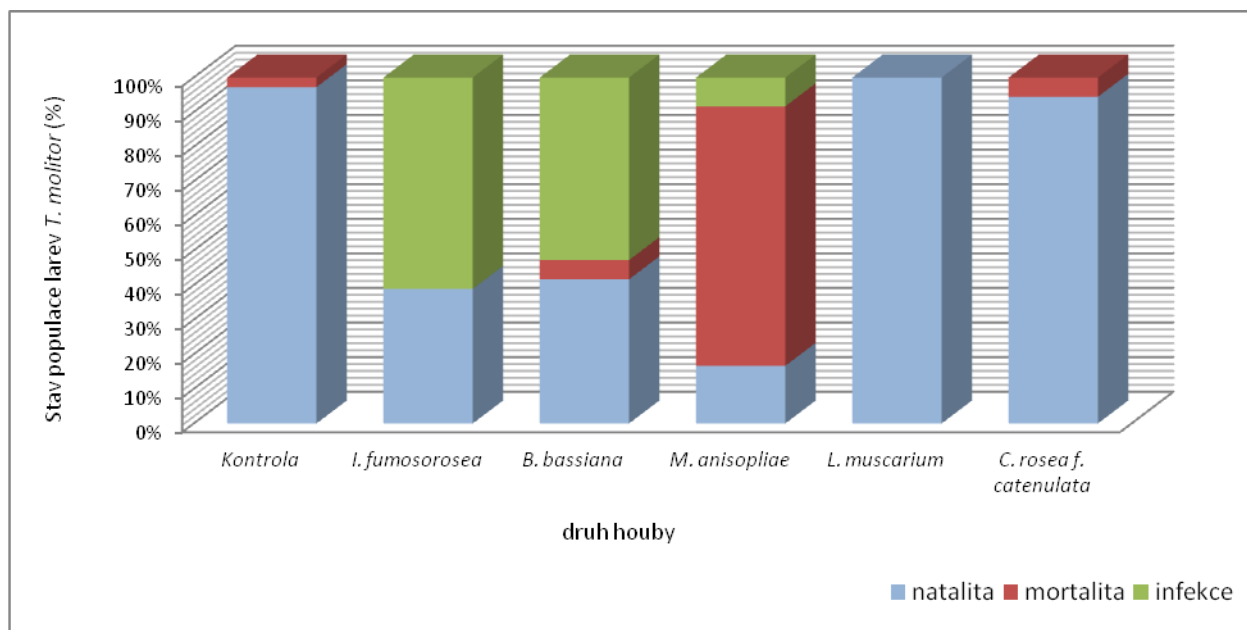
Tabulka 18: Účinnost entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* na larvy *T. molitor* (kumulovaná mortalita %)

	4. den		5. den		6. den		11. den	
	průměr± smodch	mortalita %	průměr± smodch	mortalita %	průměr± smodch	mortalita %	průměr± smodch	mortalita %
Kontrola	0,03±0,13	2,78	0,03±0,13	2,78	0,06±0,26	2,78	0,06±0,26	2,78
<i>I. fumosorosea</i>	1,14±0,07	61,10	1,82±0,14	94,45	2,56±0,18	94,45	3,00±0,00	100
<i>B. bassiana</i>	0,83±0,72	58,33	1,47±0,29	97,22	2,00±0,37	100	2,83±0,37	100
<i>M. anisopliae</i>	0,93±0,23	83,33	1,49±0,12	100	2,00±0,13	100	2,89±0,04	100
<i>L. muscarium</i>	0,00±0,00	0,00	0,01±0,07	0,00	0,04±0,10	0,00	0,82±0,04	41,67
<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i>	0,06±0,13	5,56	0,11±0,26	5,56	0,14±0,33	5,56	0,19±0,17	8,33

V kontrolní variantě byla dosažena mortalita larev ve výši 2,78 % ve všech dnech hodnocení. V průběhu biotestu byla nalezena pouze jedna mrtvá larva. Houba *I. fumosorosea* kmen PFR 97 způsobil už ve čtvrtém dni hodnocení poměrně vysokou úmrtnost larev (61,10 %). V pátém a šestém dni hodnocení došlo k navýšení kumulované mortality na 94,44 %. Po 11 dnech byla zaznamenána u kmene PFR 97 už 100 % kumulovaná mortalita v populaci larev. Larvy ošetřené kmenem I 101 houby *B. bassiana* vykázaly po 4 dnech kumulovanou mortalitu 58,33 %, následující den se kumulovaná mortalita navýšila téměř o 40 %. Po 6 dnech došlo již ke 100 % mortalitě larev *T. molitor*. Entomopatogenní houba *M. anisopliae* kmen Bio 1020 byl vysoce účinný na larvy *T. molitor*. Tento kmen vykázal významné napadení larev už ve čtvrtém dni hodnocení, kdy kumulovaná mortalita dosáhla již 83,33 %. Ke 100 % kumulované mortality došlo již po 5 dnech biotestu. Houba *L. muscarium* kmen I9 v prvních třech po sobě jdoucích dnech biotestu nevykázal žádnou účinnost na larvy potměníka moučného. Nicméně, po 11 dnech způsobil kmen I9 mortalitu téměř u poloviny ošetřených larev *T. molitor* (41,67 %). Mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata*

vykázala nízkou mortalitu larev ve všech hodnocených dnech. V prvních dnech hodnocení způsobila houba *C. rosea* f. *catenulata* kumulovanou mortalitu 5,56 % a v posledním 11. dni hodnocení byla zaznamenána pouze o necelé 3 % větší kumulovaná mortalita (8,33 %).

Graf 8: Vliv entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* na stav populace potemníka moučného *T. molitor* po 4 dnech biotestu

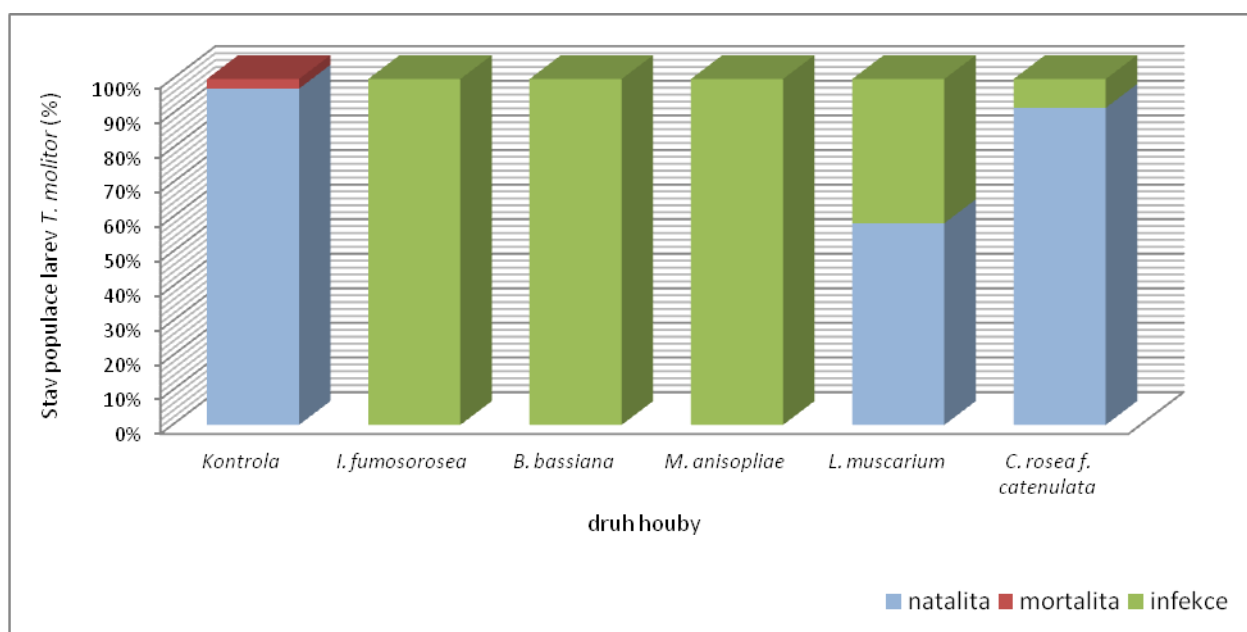


Ve 4. dni hodnocení vykázala nejvyšší účinnost na larvách *T. molitor* houba *M. anisopliae*, kde byla zjištěna kumulovaná mortalita larev ve výši 83,33 %. V rámci kumulované mortality bylo v populaci larev zaznamenáno 75 % mrtvých a 8,33 % infikovaných jedinců, kteří byly porostlí již vlákny entomopatogenní houby *M. anisopliae*. V populaci larev infikovaných houbou *I. fumosorosea* se po 4 dnech objevila infekce již na více než 60 % larev. Na povrchu infikovaných jedinců byl už zaznamenán růst mycelia. Obdobný průběh vykazoval i druh *B. bassiana* kmen I101, kde převažovaly v rámci kumulované mortality též infikovaní jedinci (52,78 %). V populaci po ošetření *B. bassiana* bylo pouze 5,55% mrtvých jedinců. Oproti předcházejícím druhům houba *L. muscarium* nevykázala žádnou účinnost na larvách *T. molitor* a mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* vykázala velmi nízkou mortalitu larev ve všech hodnocených dnech srovnatelnou s kontrolní variantou.

Po 11 dnech od založení biotestu vykázaly druhy *I. fumosorosea*, *B. bassiana* a *M. anisopliae* 100 % kumulovanou mortalitu larev *T. molitor*. Na všech larvách byla

zaznamenána zjevná infekce. Všechny tyto druhy hub byly na povrchu larev plně vysporulovány. Účinnost entomopatogenní houby *L. muscarium* byla zaznamenána téměř u poloviny ošetřených larev *T. molitor* (41,67 %) a u všech larev byl zaznamenán růst patogena na jejich těle. Oproti předcházejícím testovaným druhům entomopatogenních hub vykazala mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* po 11 dnech velmi nízkou účinnost. Kumulovaná mortalita larev naočkovaných mykoparazitickým druhem dosáhla pouhých 8,33 %, kde byli infikováni pouze 3 jedinci.

Graf 9: Vliv entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* na stav populace potměníka moučného *T. molitor* po 11 dnech biotestu



5.4 Strategie biologické ochrany rostlin při použití entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* v kombinaci s jinými druhy užitečných druhů hub

Biopreparáty na bázi hub mohou být použity v rámci dvou strategií. První použití, tzv. „inokulativní strategie“, by bylo ve skleníkových podmínkách proti hmyzím škůdcům, kteří jsou schopni se v daném prostředí velmi množit. V tomto prostředí by byla využita kombinace houby *I. fumosorosea* s druhem *L. muscarium*. Jak je známo houba *I. fumosorosea* má status mykoparazita. Z tohoto důvodu lze doporučit kombinaci houby *I. fumosorosea* s mykoparazitickými druhy hub pro pestitele, kteří pěstují zeleninu a okrasné květiny v půdním substrátu ve skleníku. Druhá „inundativní strategie“ by spočívala v kombinaci

biopreparátů na bázi vláknitých druhů hub v polních podmínkách, zejména proti půdním škůdcům a patogenům rostlin.

Pro praktické aplikace v rámci jednotlivých strategií lze doporučit nebo nedoporučit níže uvedené kombinace:

***I. fumosorosea* x *L. muscarium*:** Aplikace těchto dvou hub v „tank-mixu“ je příznivá. Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* a *L. muscarium* se nijak neomezují v prostoru ani produkci spor, naopak by mohly společně navýšit účinnost proti některým škůdcům nadzemních částí rostlin. Tato kombinace však není vhodná pro aplikace do půdního prostředí. Zejména pak druh *L. muscarium*, který není primárně půdním druhem.

***I. fumosorosea* x *C. rosea* f. *catenulata*:** Kombinace těchto druhů hub by byla vhodná pro aplikaci do půdy a to zejména proti půdním škůdcům a původcům onemocnění rostlin. Síla této kombinace spočívá v tom, že by při jedné aplikaci byly vneseny do prostředí dva druhy s rozdílnou účinností, tj. kombinace entomopatogenního druhu s mykoparazitickým druhem. Efektivní by byla aplikace v teplejších oblastech nebo do prostředí skleníků, z důvodu, že se tyto druhy hub neomezují při teplotě 25 °C. V chladnějších oblastech by došlo k lepší kolonizaci prostředí houbou *C. rosea* f. *catenulata*, ale její rychlý růst by nikterak neovlivňoval produkci spor *I. fumosorosea*.

***I. fumosorosea* x *C. minitans*:** Aplikace této kombinace velmi závisí na teplotě prostředí. Houba *I. fumosorosea* silně potlačuje růst kolonií *C. minitans* potažmo i produkci spor při 25 °C. Naopak, v nižších teplotách houba *C. minitans* rychleji roste v kombinaci s *I. fumosorosea* a produkuje daleko více spor než ve vyšších teplotách. I v kontrolní variantě je prokázáno, že houba *C. minitans* preferuje pro svůj růst, vývoj i produkci spor nižší teploty. Opět tato kombinace spor je doporučena do půdního prostředí.

***I. fumosorosea* x *M. anisopliae*:** Houba *I. fumosorosea* silně potlačila růst kolonií *M. anisopliae*, které se promítlo i ve snížené produkci spor. Houba *M. anisopliae* v kombinaci s houbou *I. fumosorosea* se není schopna v prostředí rozrůstat a tím kolonizovat půdní prostředí. Nicméně, aplikace samotného druhu *M. anisopliae* má značný vliv na účinnost proti půdním škůdcům. V přírodě se v půdě tento druh běžně vyskytuje.

***I. fumosorosea* x *B. bassiana*:** Kombinace těchto druhů může ovlivňovat růst a vývoj druhu *B. bassiana*. Houba se bude schopna po aplikaci v prostředí uchytit, ale adaptace bude

pozvolná a kolonizace prostředí bude pomalejší. Nicméně, je schopna produkovat relativně vyšší množství spor, což může v případě výskytu půdních druhů škůdců vést k přirozené epizootii v populaci škůdců.

6. DISKUZE

Entomopatogenní houby mají značný potenciál v účinném potlačení populací škodlivých organismů. Nicméně jejich aplikace může být snadno ovlivněna různými abiotickými faktory (teplota, sluneční záření, vlhkost) a biotickými faktory (patogen, hostitel, hostitelská rostlina). Přirozeně se vyskytuje kolem 750 druhů hub, které mohou infikovat hmyz nebo roztoče a desítky druhů mykoparazitických hub, které parazitují na původcích onemocnění rostlin.

Insekticidní přípravky jsou používány z důvodu rychlého potlačení populací škodlivých činitelů, ale tím dochází ke znečišťování životního prostředí a postupné rezistenci hmyzích škůdců (Quintela, McCoy 1998). Hmyz je stejně jako jiné organismy náchylný k různým onemocněním způsobených viry, bakteriemi, houbami, mikrosporidiiemi, popřípadě hlísticemi. Tyto entomopatogenní mikroorganismy jsou využívány v biologické ochraně rostlin proti hmyzím škůdcům a jsou neustále intenzivně zkoumány. Na základě studií jsou rozvíjeny různé strategie použití užitečných mikroorganismů proti škůdcům (Ramanujam *et al.* 2014). Například byly zahájeny studie, kde byly použity kombinace entomopatogenních hub společně s letální dávkou chemických insekticidů. Tím se měla zvýšit účinnost a rychlost potlačení populací škodlivých organismů. Kombinace houbových patogenů a vybraných insekticidů prokázaly zvýšenou účinnost, což by mohlo vést ke snižování dávek insekticidů, tam kde jsou používány samostatně. Použití kombinace hub a insekticidů by tak mohlo vést k zachování početnějších populací přirozených nepřátel, minimalizaci znečištění životního prostředí i ke snížení možnosti navození rezistence u škodlivých organismů (Boman 1980). V biologické ochraně rostlin existuje mnoho přípravků na bázi entomopatogenních resp. mykoparazitických organismů proti škodlivým činitelům, nicméně však není známo mnoho poznatků o jejich vzájemné interakci.

Jedním z cílů této práce bylo posuzování jednotlivých druhů entomopatogenních hub v kombinaci s entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea*. S houbou *I. fumosorosea* byly testovány druhy *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium muscarium* a *Clonostachys rosea* f. *catenulata* a *Coniothyrium minitans*. Testováním jednotlivých kombinací vznikla možnost posouzení růstu a produkce spor hodnocených druhů ve vzájemné interakci při teplotách 15, 23, a 25 °C. Všechny tyto druhy se řadí mezi nejvýznamnější houbové patogeny, na jejichž bázi jsou vyráběny biopreparáty proti hmyzím škůdcům nebo proti původcům onemocnění rostlin. V roce 2000 dosahoval prodej biopreparátů, který

zahrnoval mikroorganismy, makroorganismy i feromony, částky ve výši 97 milionů dolarů. Podle výsledků prodeje bylo v roce 2005 docíleno částky 135 milionů dolarů a každoroční nárůst prodeje je odhadován na 11,7 % (Ravensberg 2010). Lisansky (1997) dokonce tvrdí, že vysoký potenciál prodeje neustále vzrůstá a v roce 2016 by mohlo být dosaženo prodeje ve výši až 200 milionů dolarů. Biopreparáty mají řadu silných stránek, díky kterým je možné je využívat v běžné praxi. Obsahují i řadu nedostatků, které mohou být postupně přeměňovány ve stránky silné. Příkladem jsou užší hostitelská spektra, která zabezpečují bezpečné používání. Díky těmto vlastnostem je možná kombinace s přirozenými nepřáteli (Ravensberg 2010).

V rámci testování jednotlivých druhů hub bylo zjištěno, že *M. anisopliae* má velmi dobrou schopnost setrvat v půdním prostředí (Greenfield *et al.* 2016). V kombinaci houby *I. fumosorosea* s druhem *M. anisopliae* však došlo k silnému potlačení růstu i produkce spor ze strany *I. fumosorosea*. Z toho vyplývá, že druh *M. anisopliae* v kombinaci s houbou *I. fumosorosea* se není schopen v prostředí rozrůstat. V testu kompatibility dopadla houba *M. anisopliae* nejhůře ze všech testovaných druhů vláknitých hub. Naopak nejlépe se prokázala kombinace houby *I. fumosorosea* s druhem *L. muscarium*, kde nedošlo k vzájemnému ovlivnění. Aplikace těchto dvou hub je příznivá zejména proti škůdcům škodících zejména na listech, kdy houba *L. muscarium* je schopna infikovat nejen molice, červce, ale zejména pak mšice (Kim *et al.* 2010, Ganassi *et al.* 2010) a *I. fumosorosea* je schopna potlačit vedle všech skleníkových škůdců i populace svilušek (Kim *et al.* 2008; Fiedler, Sosnowska 2007).

Bitsadze (2015) testoval potenciál mykoparazitické houby *C. minitans*. Závěrem jeho studie bylo, že druh *C. minitans* vykazuje nejvyšší účinnost při teplotním rozmezí 15 - 23 °C a se zvyšující se teplotou účinnost této houby klesá. Tento poznatek byl potvrzen i v diplomové práci. Při testování mykoparazitické houby *C. minitans* ve vzájemné interakci s druhem *I. fumosorosea* bylo zjištěno, že aplikace této kombinace velmi závisí na teplotě prostředí. Houba *I. fumosorosea* silně potlačuje růst kolonií *C. minitans* potažmo i produkci spor při 25 °C. Naopak, v nižších teplotách houba *C. minitans* rychleji roste v kombinaci s *I. fumosorosea* a produkuje daleko více spor než ve vyšších teplotách. I v kontrolní variantě je prokázáno, že houba *C. minitans* preferuje pro svůj růst, vývoj i produkci spor nižší teploty.

Dalším cílem této diplomové práce bylo posouzení účinnosti vybraných druhů vláknitých hub na larvách potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*). Z výsledků zaměřených na účinnost těchto druhů hub vyplývá, že nejlepším druhem pro infekci larev *Tenebrio*

molitor jsou druhy *M. anisopliae*, *B. bassiana* a *I. fumosorosea*. Průběh mortality byl srovnatelný v čase a k výrazné mortalitě larev vlivem těchto druhů docházelo již po 4 dnech. Lee *et al.* (2016) tento fakt potvrdili, když prováděli studie účinnosti druhu *B. bassiana* též na larvách *T. molitor* při teplotě 25 °C, kde houba *B. bassiana* způsobila 95 % mortalitu larev po 5 dnech hodnocení. Naopak, entomopatogenní houba *L. muscarium* byla téměř neúčinná v prvních dnech experimentu. Po 11 dnech došlo k mortalitě dosahující téměř 42 %. Mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* nevykázala žádnou účinnost na larvách *T. molitor*. Naopak, prokázala velmi dobrou schopnost napadat oslabené nebo již mrtvé jedince a přijímat z nich živiny potřebné pro svůj růst a vývoj. Hodnocení účinnosti mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* bylo záměrně testováno, protože při izolaci entomopatogenních hub z půdních vzorků, které byly realizovány na Katedře speciální produkce rostlinné, byly izolovány 4 kmeny (ústní sdělení). Tyto kmeny byly izolovány z půdních vzorků pomocí metody „Tenebrio bait method“, která využívá larvy *T. molitor* jako živou návnadu. Vzhledem k této skutečnosti, bylo záměrem ověřit, zda mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* nemá status i houby entomopatogenní. Z výsledků biotestu vyplývá, že houba není schopna infikovat primárně larvy *T. molitor*, ale je schopna velmi dobře kolonizovat mrtvé larvy, což ukazuje na její velmi dobrou saprotrofní schopnost. Sun a Liu (2008) zaznamenali též schopnost houby infikovat zraněný či oslabený hmyz. Ze studií prováděné v Číně na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), byla zjištěna velmi vysoká účinnost mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata*. U tohoto druhu byla zjištěna mortalita larev ve výši 73,3 %, zatímco na larvách potemníka moučného tento druh vykázal mortalitu pouhých 8,33 %.

Posledním cílem této práce bylo posouzení vlivu umělé živné půdy na růst a výtěžnost spor středových kultur vybraných druhů vláknitých hub, kdy v rámci živných půd byl testován radiální růst a produkce spor na PDA (Potato dextrose agar), SDA (Sabouraud dextrose agar) a CDA (Czapek dox agar). Na jednotlivých živných půdách se vybrané druhy vláknitých hub chovaly rozdílně. Na živné půdě CDA vytvořily největší kolonie houby *I. fumosorosea*, *B. bassiana* a *C. rosea* f. *catenulata*. Houby *M. anisopliae* a *L. muscarium* vytvořily největší kolonie na živné půdě PDA. Velikost středových kultur může předurčit, jak rychle mohou jednotlivé druhy hub v přirozených podmínkách kolonizovat prostředí. Nejenže houba *I. fumosorosea* vytvořila největší středové kultury na živné půdě CDA, ale vyprodukovala na ní i největší množství spor. Druh *B. bassiana* a *C. rosea* f. *catenulata* vyprodukovaly největší počet spor na živné půdě PDA a druhy *M. anisopliae* a *L. muscarium*

na živné půdě SDA. Ukazatel výtěžnosti nám může napovědět, jak jsou důležité nutriční zdroje v přírodě pro sekundární produkci spor.

Shrnutím výsledků dosažených v diplomové práci lze navýšit účinnost a rychlost potlačení škodlivých organismů vlivem kombinací entomopatogenních hub nebo kombinací entomopatogenní houby *I. fumosorosea* s mykoparazitickými druhy hub. Výsledky mohou mít i praktické doporučení, které spočívá v možnosti aplikace biopreparátů na bázi hub v „tank-mix“, což by pomohlo v regulaci četnosti více druhů škodlivých organismů. Nicméně, ne všechny varianty zkoumané v diplomové práci mají pozitivní efekt.

7. ZÁVĚRY

✓ **Kompatibilita mezi entomopatogenní houbou *I. fumosorosea* a vybranými druhy entomopatogenních a mykoparazitických hub**

Nejlépe dopadla kombinace druhu *I. fumosorosea* x *L. muscarium*, ve všech testovaných teplotách, kde se prokázalo, že se tyto dva druhy nijak neomezují v prostoru ani produkci spor. Aplikace těchto dvou hub je příznivá. U kmene I 101 houby *B. bassiana* byl znatelně potlačen růst houby díky rychlé kolonizaci prostředí houbou *I. fumosorosea*. Tento poznatek však nemá vliv na produkci spor z důvodu stimulace produkce obou druhů hub. Aplikace kombinace *I. fumosorosea* x *B. bassiana* je možná, ale musí se brát v potaz, že kolonie *B. bassiana* se sice budou v prostředí vyskytovat, ale nebudou mít takovou schopnost kolonizovat dané prostředí. Houba *I. fumosorosea* potlačuje i druh *M. anisopliae*, tato suprese se promítá i v produkci spor *M. anisopliae*. Druh *M. anisopliae* v kombinaci s *I. fumosorosea* není schopen v prostředí působit. Kombinace *I. fumosorosea* x *C. minitans* se nedoporučuje. Houba *Isaria fumosorosea* potlačuje nejen růst kolonií *C. minitans* ale i produkci spor při teplotě 25 °C. Pro růst a produkci spor houby *C. minitans* je příznivější teplota 15 °C. Při teplotě 15 °C vykazuje *C. minitans* v kombinaci s *I. fumosorosea* vyšší produkci spor i velikost kolonií. Aplikace kombinace *I. fumosorosea* x *C. rosea* f. *catenulata* by mohla mít příznivý efekt. Houby se nijak neomezují při teplotě 25 °C. Při této teplotě k žádnému potlačení mezi danými druhy hub nedošlo. Výsledky dosažené ve 23 °C byly téměř identické s teplotou 25 °C.

✓ **Vliv umělé živné půdy na růst a výtěžnost spor středových kultur různých druhů vláknitých hub**

Na různých živných půdách se vybrané druhy vláknitých hub chovaly rozdílně. Na živné půdě CDA vytvořily největší kolonie houby *I. fumosorosea*, *B. bassiana* a *C. rosea* f. *catenulata*. Houby *M. anisopliae* a *L. muscarium* vytvořily největší kolonie na živné půdě PDA. Velikost středových kultur může předurčit, jak rychle mohou jednotlivé druhy hub v přirozených podmínkách kolonizovat prostředí. Nejenže houba *I. fumosorosea* vytvořila největší středové kultury na živné půdě CDA, ale vyprodukovala na ní i největší množství spor. Druh *B. bassiana* a *C. rosea* f. *catenulata* vyprodukovaly největší počet spor na živné půdě PDA a druhy *M. anisopliae* a *L. muscarium* na živné půdě SDA.

Ukazatel výtěžnosti nám může napovědět, jak jsou důležité nutriční zdroje v přírodě pro sekundární produkci spor.

✓ **Vliv entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* na larvách potěmníka moučného *T. molitor***

Z výsledků zaměřeného na účinnost vybraných druhů vláknitých hub vyplývá, že nejlepším druhem pro infekci larev *Tenebrio molitor* je druh *M. anisopliae*, *B. bassiana* a *I. fumosorosea*. Průběh mortality byl srovnatelný v čase a k výrazné mortalitě larev vlivem těchto druhů docházelo již po 4 dnech. Naopak, entomopatogenní houba *L. muscarium* byla téměř neúčinná v prvních dnech experimentu. Po 11 dnech došlo k mortalitě dosahující téměř 42 %. Mykoparazitická houba *C. rosea* f. *catenulata* nevykázala žádnou účinnost na larvách *T. molitor*. Naopak, prokázala velmi dobrou saprotrofní schopnost napadat oslabené nebo již mrtvé jedince.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- Bailey A., Chandler D., Grant W.P., Greaves J., Prince G., Tatchell M. (2010): Biopesticides: pest management and regulation. *CAB International, Wallingford, UK*, pp. 88-90.
- Bale J.S., van Lenteren J.C., Bigler F. (2008): Biological Control and Sustainable Food Production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363: pp. 761-776.
- Bennett A.J., Leifert C., Whipps J.M. (2006): Survival of *Coniothyrium minitans* associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1): pp. 164-172.
- Bitsadze N., Siebold M., Koopmann B., Tiedemann A.V., Parker B.L., Kim J.S. (2016): Single and combined colonization of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia by the fungal mycoparasites *Coniothyrium minitans* and *Microsphaeropsis ochracea*. *Biological Control*, (80), pp. 40-48.
- Boman H.G. (1980): Insect responses to microbial infections: *Microbial Control of Pest and Plant Diseases, 1970–1980*, Academic Press, New York, pp. 769–784.
- Bruns T.D., White T.J., Taylor J.W. (1991): Fungal molecular systematic. *Annual Review of Exil. Syst.*, 22: pp. 525-564.
- Butt T.M. (2002): Use of Entomopathogenous Fungi or the Control of Insect Pests. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): *The Mycota XI.-Agricultural Applications*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 111-134.
- Cooms J., Cooms R.F. (2003): A dictionary of biological control and integrated pest management. 3rd edition. CPLPress. Newbury. UK, pp. 310.
- Driver F., Milner R.J., Trueman J.W.H. (2000): A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104: pp. 134-150.
- Drummond J., Heale J.B., Gillespie A.T. (1987): Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecani* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*, 111: pp. 193-201.
- Faria M.R., Wraight S.P. (2007): Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. – *Biological Control*, 43: pp. 237 – 256.
- Feng Z., Carruthers R.I., Roberts D.W., Robson D.S. (1985): Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* on the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 46: pp. 259-264.
- Fiedler Z., Sosnowska D. (2007): Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *Biocontrol*, (4), pp. 547-558.
- Gannasi S., Grazioso P., Moretti A., Sabatiny M.A. (2010): Effects of the fungus *Lecanicillium lecanii* on survival and reproduction of the aphid *Schizaphis graminum*. *Biocontrol*, (2), pp. 299-312.
- Gerlagh M., Whipps J.M., Budge S.P., Goossen van de Geijn H.M. (1996): Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*,

- Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology*, 10, pp. 787–793.
- Goettel M.S., Inglis G.D. (1997): Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic press. San Diego, USA, pp. 213–249.
- Greenfield M., Gómez-Jiménez M.I., Ortiz V., Vega F.E., Kramer M., Parsa S. (2016): *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, (80), pp. 40-48.
- Hajek A. (2004): Natural enemies: an introduction to biological control. *Cambridge university press, UK*, pp. 378.
- Hall R.A. (1976): A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27: pp. 41-48.
- Hall R.A. (1981): The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges H.D. (Ed.): *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, pp. 483-498.
- Hall R.A. (1985): Whitefly control with fungi. In: Hussey, N.W., Scopes, N. (Eds). *Biological test control-the greenhouse experience*. Cornell University Press. Ithaca. New York, pp. 116– 118.
- Honěk A., Lukáš J., Martinková Z., Pultar O., Řezáč M. (2008): Význam predátorů a parazitoidů v integrovaných systémech ochrany rostlin. *Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně*, pp. 64.
- Humber R.A. (1997): Fungi: Identification. In: Lacey L.A. (Ed.): *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, London, pp. 153-185.
- Ignoffo C.M. (1992): Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida entomol.* 75(4): pp. 516-525.
- Ignoffo C.M., Garcia C. (1978): UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. *Environ. Entomol.*, 7 (2): pp. 270-272.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. (2001): Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): *Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential*. *CAB International*, Wallingford, UK, pp. 23-69.
- Kavková M., Čurn V. (2005): *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia*, 159: pp. 53-63.
- Kim J.J., Goettel M.S., Gillespie D.R. (2010): Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec® against the cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea* in a greenhouse environment. *Crop protection*, (6), pp. 540-544.
- Kim J.S., Jong Y., Sang Ch. (2008): Insecticidal activity of *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 as a multi-targeting biological control agent against the greenhouse whitefly and the two-spotted spider mite. *International Journal of Industrial Entomology* (17), pp. 181-187.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): *Trvalo*

- udržateľné technológie v záhradníctve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, pp. 225-280.
- Landa Z., Jiranová R. (1988): A laboratory improvement of entomopathogenic fungi and use of selected strains in IPM programme for greenhouse cucumbers. *Annual Report Agric. University, České Budějovice*, pp. 95.
- Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O. (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, pp. 646-647.
- Lee S.J., Kim S.H., Nai Y.S., Je Y.H., Parker B.L., Kim J.S. (2016): Management of entomopathogenic fungi in cultures of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biological Control*, (80), pp. 40-48.
- Lisanski S.G. (1997): Microbial biopesticides. In: H.F. Evans (ed), Microbial insecticides: novelty or necessity? BCPC Symposium Proceedings No. 68, Coventry, April 16-18, 1997. BCPC, Farnham. pp. 3-10.
- Luangsa-Ard J.J., Hywel-Jones N.L., Samson R.A. (2004): The Polyphyletic Nature of *Paecilomyces* Sensu Lato Based on 18S-generated rDNA Phylogeny. *Mycologia*, 96: pp. 773-780.
- Navrátilová M. (2013): Kategorizace základních metod BO, strategie. Biologická ochrana rostlin proti lýkožroutu smrkovému [online] [vid. 3. leden 2016]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1801
- Nefyto (2008): Samenvatting van de afzet (per actieve stof) van gewasbeschermingsmiddelen, www.nefyto.nl. Cited June 14.
- Nielsen CH., Jensen A. B., Eilenberg J. (2007): Survival of entomophthoralean fungi infecting aphids and higher flies during unfavorable conditions and implications for conservation biological control. – In: Ekesi S. & Manianina N. K. (ed.): Use of entomopathogenic fungi in biological pest management, *Research Signpost*, India, pp. 13-18.
- Okrouhlá M. (1993): Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha, pp. 5-38.
- Osborne L.S., Landa Z. (1992): Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomology*, 75 (4): pp. 456-471.
- Osborne L.S., Storey G.K., McCoy C.W., Walter J.F. (1990): Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Proc. 5th Int. Colloquium on Invertebrate Pathology and Biological Control, Adelaide, Australia, pp. 386-390.
- Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E., Steinkraus D.C. (2002): Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In: T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds), Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. *CAB International Wallingford*, pp. 71-153.
- Prokinová, E., (1996): Biologická ochrana proti houbovým chorobám rostlin. ÚZPI, Rostlinná výroba, pp. 7-12.
- Pultar (2003): Základní metodiky použití biologické ochrany rostlin v temperovaných prostorech. In: Honěk A., Martinková Z., Stejskal V. (Eds.): Predátoři a parazitoidi

- v biologické ochraně polních kultur, skleníků a skladovaných komodit. VURV, Praha-Ruzyně, pp. 18-36.
- Quarles W. (1995): New technologies for termite control. *IPM Practitioner*, 17(5/6): pp. 1-9.
- Quintela E.D., McCoy C.W. (1998): Synergistic effect of imidacloprid and two entomogenous fungi on behavior and survival of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *Journal of Econ. Entomol.*, 91(1): pp. 110-122.
- Ramanujam B., Rangeshwaran R., Sivakmar G., Mohan M., Yandigeri M.S. (2014): Management of insect pests by microorganisms. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, (80), pp. 455-471.
- Ravensberg W. (2010): The development of microbial pest control products for control of arthropods: a critical evaluation and a roadmap to Access. PhD Thesis Wageningen University, Wageningen, NL, pp. 348.
- Samson R.A., Evans H.C., Latge J.P. (1988): Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 187.
- Sejketov, G.Š. (1982): *Griby roda Trichoderma ich ispolzovanie v praktike*. nauka Kazachskoj SSSR, Alma-Ata, pp. 248.
- Sun B., Liu X. (2008): Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied soil ecology*, (39), pp. 100-108.
- Šmíd J. (2011): Stanovení suprese vybraných původců onemocnění rostlin pomocí mykoparazitických hub. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v ČB, Zemědělská fakulta, pp. 13-25.
- Smith, S.N., Armstrong, R.A., Barker, M., Bird, R.A., Chohan, R., Hartell, N.A., Whipps, J.M., (1999): Determination of *Coniothyrium minitans* conidial and germling lectin avidity by flow cytometry and digital microscopy. *Mycological Research*, 103 (12): pp. 1533-1539.
- Tanada Y., Kaya H.K. (1993): Fungal infections. In: Tanada Y., Kaya H.K. (Eds.): *Insect pathology*. *Academica Press Inc. California and Academica Press Limited London*, pp. 319-387.
- Tichá, K. (2001): Biologická ochrana rostlin. *Grada Publishing*. Praha, pp. 87.
- Van Driesche R.G., Heinz K.M. (2004): Biological control as a component of IPM systems. In: Heinz, K.M., Driesche, R.G., Parrella, M.P. (Eds.): *Biocontrol in protected culture*. Ball Publishing, Singapore: pp. 171-184.
- Veselá D. (1986): Biologická ochrana proti chorobám kořenů vzházejících rostlin. Sborník ref. z 1. Sem. „Biotechnologie v integrované ochraně rostlin— – Mykopreparáty československé výroby a jejich využití v ochraně polních kultur.“, 18.9. 1986, VÚRV Praha-Ruzyně.
- Vidal C., Fargues J., Lacey L.A. (1997): Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: pp. 18-26.
- Weiser J. (1966): Nemoci hmyzu, Academia, Praha, pp. 232 – 324.
- Zimmermann G. (2007): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. – *Biocontrol Science and Technology*, 17: pp. 553–596.

Zimmermann G. (2008): The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosorosea*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Sci. Tech.*, 18 (9): pp. 865-90.

Seznam anonymních zdrojů

Anonym 1: [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z:

<http://www.agromanual.cz/cz/atlas/vykladovy-slovník/integrovaná-ochrana-rostlin.html?asort=>

Anonym 2: [online]. [cit. 2016-02-12]. Dostupné z:

<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/integrovaná-ochrana-rostlin/>

Anonym 3: [online]. [cit. 2016-03-25]. Dostupné z:

http://www.biocont.cz/cz/eshop/biobit-xl_i7.htm

Anonym 4: [online]. [cit. 2016-03-20]. Dostupné z:

<http://www.biocont.cz/cz/eshop/heterorhabditis-i11.htm>

Anonym 5: [online]. [cit. 2016-03-21]. Dostupné z:

http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1830&typ=html

Anonym 6: Anonym 4: [online]. [cit. 2016-03-18]. Dostupné z:

<http://www.biobest.be/producten/161/3/0/0/>

Anonym 7: [online]. [cit. 2016-03-18]. Dostupné z:

http://www.bioag.novozymes.com/en/products/unitedstates/biocontrol/met52/Documents/12022_Met52%20EC1L_label_2_FINAL_Apr2_12.pdf.

Anonym 8: [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z:

<http://greenearthagandturf.com/botanigard-insect-control-mycoinsecticide.shtml>

Anonym 9: [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z:

<http://agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid/contans-wg>

9. PŘÍLOHY

Grafický list 1: Vliv entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na růst a vývoj mykoparazitické houby *Coniothyrium minitans* ve vzájemné interakci



Kontrolní varianta entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* při kultivaci v 15°C



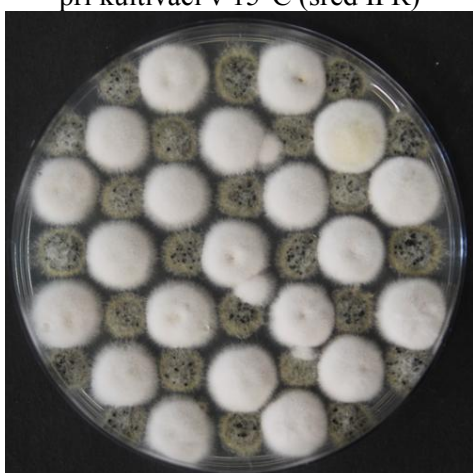
Kontrolní varianta mykoparazitické houby *Coniothyrium minitans* při kultivaci v 15°C



Interakce mezi *I. fumosorosea* a *C. minitans* při kultivaci v 15°C (sřed IFR)



Interakce mezi *C. minitans* a *I. fumosorosea* při kultivaci v 15°C (sřed CMI)

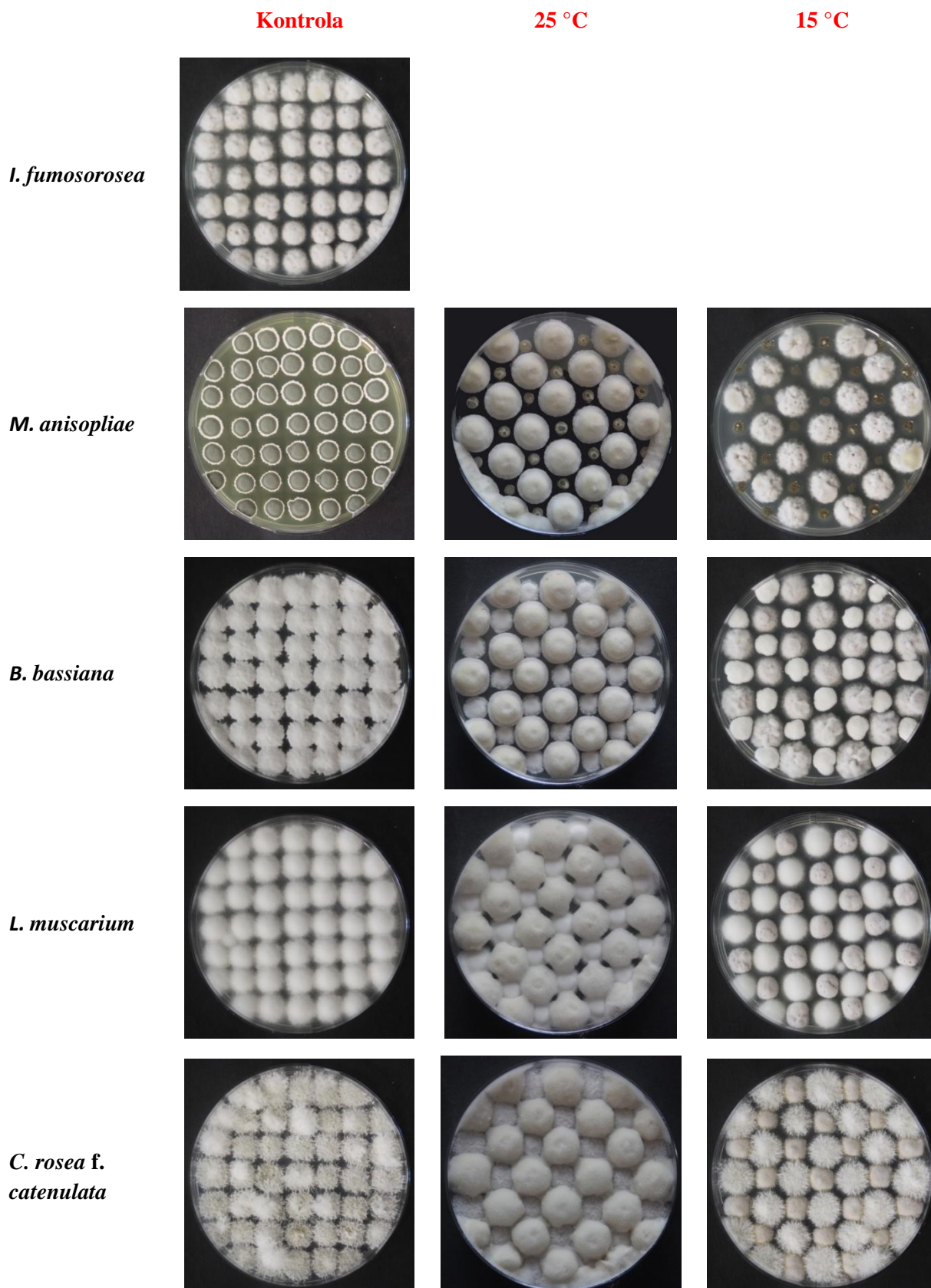


Interakce mezi *I. fumosorosea* a *C. minitans* při kultivaci v 25°C (sřed IFR)



Interakce mezi *C. minitans* a *I. fumosorosea* při kultivaci v 25°C (sřed CMI)

Grafický list 2: Vliv entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na růst a vývoj vláknitých hub ve vzájemné interakci



Grafický list 31: Vliv živné půdy na růst středových kultur entomopatogenních hub a mykoparazitické houby *Clonostachys rosea* f. *catenulata* po 21 dnech kultivace

