

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta



Téma diplomové práce

VYUŽITÍ ENTOMOPATOGENNÍCH HUB V BIOLOGICKÉ OCHRANĚ
PROTI MOLICI SKLENÍKOVÉ *TRIALEURODES VAPORARIORUM* A
MOLICI BAVLNÍKOVÉ *BEMISIA TABACI*

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.

Katedra rostlinné výroby

ZF JU České Budějovice

Autorka diplomové práce:

Dana Navrátilová

Obor: Všeobecné zemědělství

Profilace: Rostlinolékařství

ZF JU České Budějovice

České Budějovice

Duben 2007

P r o h l a š u j i, že jsem diplomovou práci na téma „Využití entomopatogenních hub v biologické ochraně proti molici skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* a molici bavlníkové *Bemisia tabaci*“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v diplomové práci a v seznamu literatury.

.....
Dana Navrátilová

Duben 2007

Děkuji svému školiteli prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za odborné vedení, pomoc a cenné rady, které mně poskytl v průběhu zpracování diplomové práce.

Dále děkuji pracovnícům Katedry rostlinné výroby Olze Divišové a Marii Nýdlové za nezištnou pomoc při zakládání pokusů a vytvoření vhodných pracovních podmínek.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, babičce a rodině Vejsadových za morální a finanční zázemí, které mi poskytli v průběhu studia.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 Integrovaná a biologická ochrana rostlin	3
2.2 Entomopatogenní houby	3
2.2.1 Taxonomie entomopatogenních hub	4
2.2.2 Přehled nejvýznamnějších entomopatogenních hub	6
2.2.3 Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub	7
2.2.4 Vývojový cyklus entomopatogenních hub	10
2.2.4.1 Vliv prostředí na vývoj entomopatogenních hub	13
2.2.5 Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub	14
2.2.5.1 Charakteristika hub rodu <i>Beauveria</i>	14
2.2.5.2 Charakteristika hub rodu <i>Metarhizium</i>	16
2.2.5.3 Charakteristika hub rodu <i>Paecilomyces</i>	17
2.2.5.4 Charakteristika hub rodu <i>Lecanicillium</i>	18
2.2.5.5 Charakteristika hub rodu <i>Aschersonia</i>	20
2.3 Charakteristika molic <i>Bemisia tabaci</i> a <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	21
2.3.1 Význam molic	21
2.3.2 Morfologie, bionomie a význam molice skleníkové (<i>T.vaporariorum</i>)	22
2.3.3 Morfologie, bionomie a význam molice bavlníkové (<i>B.tabaci</i>)	24
2.3.4 Diagnostika <i>Bemisia tabaci</i> a <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	28
2.3.5 Biologická ochrana proti molicím	29
3. MATERIÁL A METODIKA	32
3.1 Druhy entomopatogenních hub použité v pokusech	32
3.2 Postup přípravy konidiové suspenze	33
3.3 Populace molic používané v pokusech	34
3.4 Hostitelské rostliny používané v pokusech	34
3.5 <i>In vitro</i> testy	34
3.6 <i>In vivo</i> testy	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	38
5. DISKUZE A ZÁVĚRY	64
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
7. PŘÍLOHY	71

1. ÚVOD

Zemědělství je z hlediska trvalé udržitelnosti a ekologické únosnosti odvětvím nejen důležitým, ale i složitým. Na jedné straně má tisíce let dlouhou tradici, jejíž základní a samozřejmou součástí byla právě idea trvalé udržitelnosti. Na druhé straně však moderní světové zemědělství prastaré tradice opustilo a díky tomu až dosud drží krok s obrovskou populační explozí a v zásadě dokáže uživit nesmírně rychle rostoucí lidstvo. To vše vedlo ke zvýšené spotřebě pesticidních přípravků a s tím i větší zatížení prostředí chemickými látkami. Rostou však obavy o budoucnost, o to, zda tento úspěch „uživit planetu“ je skutečně trvale udržitelný, zda nehrozí vážný kolaps ve světovém měřítku. Znepokojení vzbuzují především předpovědi dalšího růstu počtu lidí na Zemi, který už překonal hranici šesti miliard.

Cílem moderního udržitelného zemědělství není jen produkce potravin, případně dalších produktů, které najdou své uplatnění na trhu, i když je to jistě cíl základní. Můžeme k tomu dodat, že preference spotřebitelů stále výrazněji ovlivňují trh co do rostoucích nároků na příznivou skladbu a kvalitu potravin včetně rostoucího zájmu o bioprodukty a jiné zaručeně nezávadné a biologicky hodnotné potraviny.

Jedním z prostředků jak toho dosáhnout je zavádění integrované a biologické ochrany rostlin do systému pěstování rostlin. Integrovaná ochrana rostlin je uváděna jako racionální uplatňování kombinace biologických, biotechnologických, chemických a pěstitelských opatření, při němž je použití chemických přípravků na ochranu rostlin omezeno na minimum nezbytné pro udržení výskytu škodlivých organismů na úrovni, kdy nezpůsobují hospodářsky nepřijatelné škody nebo ztráty.

Cílem biologické a integrované ochrany rostlin tedy není úplné vyhubení škůdce, ale pouze regulace populační hustoty. Škůdce je chápán jako druh, který je škodlivý až do určité populační hustoty, zatímco při nižší populační hustotě je chápán jako druh, který přispívá k ekologické stabilitě ekosystému.

V dnešní době se již uplatňuje využití celé řady přípravků na bázi mikroorganismů (účinnou složkou jsou houby, bakterie, viry, viroidy a další) a makroorganismů (predátoři, parazité a parazitoidi) a nejvhodnějším prostředím, kde je lze uplatnit je skleníky. Zde dochází v důsledku specifických podmínek (malé výkyvy v teplotních a vlhkostních podmínkách, velká hustota rostlin) k častému rozvoji populací škůdců a chorob.

Jedním z nejvýznamnějších škůdců ve skleníku je molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum*) a molice bavlníková (*B. tabaci*), jež se stávají rezistentní vůči používání mnohých pesticidních přípravků.

Tato diplomová práce se zabývá využitím jednotlivých kmenů entomopatogenních hub v systému biologické ochrany rostlin proti těmto škůdcům. Cílem je zjistit základní vývojové a růstové charakteristiky vybraných druhů entomopatogenních hub a porovnání jejich účinnosti v kompletním systému „rostlina – škůdce – patogen“. Všechny pokusy a výsledky jsou zpracovány do tabulek a grafů. Součástí diplomové práce je i fotodokumentace postupu při zakládání a vyhodnocování pokusů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Integrovaná a biologická ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin (IOR) představuje strategii, ve které jsou v socioekonomickém kontextu farmářského systému, spojení prostředí a populační dynamiky škůdců, využívány všechny dostupné regulační postupy, s cílem udržení populační hustoty škodlivých činitelů pod hladinou způsobující ekonomické poškození (Pell *et al.* 2001).

Biologickou ochranu je možno definovat velmi úzce jako „Záměrné využívání přirozených nepřátel s cílem regulovat populace škůdců, chorob a plevelných rostlin“ až velmi široce, kdy spolu s přirozenými nepřáteli a antagonisty jsou do kategorie biologický zahrnovány i metody agrotechnické, bioracionální a genetické (Landa 2002).

2.2 Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby, jsou houby, které parazitují na hmyzu. Jsou užitečnou komponentou mnoha programů integrované ochrany rostlin, protože jsou úzce specializované na určitý druh hostitele a náklady na jejich produkci nejsou vysoké. Zároveň působí na široký okruh skleníkových škůdců a nezatěžují zdraví lidí (Brownbridge *et al.* 1994).

Nicméně preparáty na bázi entomopatogenních hub nejsou dostatečně komerčně dosažitelné, nebo nejsou označené jako použitelné ve skleníku. Využití biopreparátů na bázi entomopatogenních hub je často doporučováno v kombinaci s konvenčními insekticidy nebo insekticidními regulátory růstu hmyzu (Sanderson 1996).

Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na družících patřících do řádů plošnice (*Hemiptera*), rovnokřídli (*Orthoptera*), třásnokřídli (*Thysanoptera*), stejnokřídli (*Homoptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídli (*Diptera*). Entomopatogenní houby mohou napadat všechna vývojová stádia hmyzu, nicméně nejčastěji se vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu. Některé druhy entomopatogenních hub mohou parazitovat na širokém sortimentu hostitelů patřících do zcela odlišných řádů hmyzu a mohou infikovat i různá vývojová stádia téhož hostitele (např. *Paecilomyces fumosoroseus*). Jiné druhy entomopatogenních hub naopak vykazují podstatně užší patogenitu s účinností omezenou na úroveň hmyzích řádů (např. houba *Nomuraea rileyi* parazitující výhradně na larvách motýlů) (Landa 1994).

2.2.1 Taxonomie entomopatogenních hub

Vyšší taxony hub prošly celou řadou revizí. Ještě v uplynulém období byly nejčastěji a obecně používány následující vyšší taxony: Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes a Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) (Gäuman 1964). Z několika odlišných revizí se pro klasifikaci entomopatogenních hub nejvíce ujal upravený klasifikační systém Ainswortha (Ainsworth 1973).

V tomto klasifikačním systému jsou nejvyššími taxony Myxomycota a Eumycota. V Myxomycota jsou zastoupeny houby vytvářející plasmodiální formy. V Eumycota jsou zastoupeny houby, které zpravidla vytváří mycelium a netvoří formy plazmodiální.

Všechny entomopatogenní houby patří do Eumycota, kdy jsou zastoupeny v podkmenech: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina a Deuteromycotina. Většina entomopatogenních hub je pak zastoupena v Zygomycotina (Zygomycetes: Entomophthorales), v Ascomycotina (Pyrenomycetes: Spheariales, Laboulbeniomycetes) a v Daeteromycotina (Hyphomycetes: Monililes) (McCoy *et al.* 1988, Samson *et al.* 1988)(viz tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled klasifikace entomopatogenních hub (1. část, upraveno podle McCoy *et al.* 1988, Samson *et al.* 1988)

Subphylum	Classis	Ordo	Genus
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	Coclomycidium Myiophagus
	Chytridiomycetes	Blastocladales	Coelomomyces
	Oomycetes	Legnidiales	Legnidium
	Oomycetes	Saprolegniales	Leptolegnia Couchia
Zygomycotina	Zygomycetes	Mucorales	Sporodiniella
	Zygomycetes	Entomophthorales	Conidibolus* Entomophaga* Entomophthora* Erynia* Massospora Meristacrium Neozygites*

Tabulka 1, pokračování

Subpylum	Classis	Ordo	Genus
Deuteromycotina	Hyphomycetes	Moniliales	Akanthomyces Aspergillus* Beauveria* Culicinomyces Engyodontium Fusarium Gibellula Hirsutella* Hymenostilbe Metarhizium* Nomuraea* Paecilomyces* Paraisaria Pleurodemospora Polycephalomyces Pseudogibellula Sorosporella Sporothrix Stilbella Tilachlidium Tolypocladium* Verticillium*
	Coelomycetes		Aschersonia* Tetranacrium
Mycelia sterilia			Aegerita*
Basidiomycotina	Phragmo-basidiomycetes	Septobasidiales	Filobasidiella Septobasidium Uredinella

(* zvýrazněný tisk) Rody se zastoupením druhů významných v biologické ochraně rostlin

2.2.2 Přehled nejvýznamnějších entomopatogenních hub

V Deuteromycotina je zastoupena převážná část rodů a druhů entomopatogenních hub, které mají praktický nebo potencionální význam v biologické ochraně rostlin. S ohledem na praktické využití jsou jednoznačně nejvýznamnější skupinou Deuteromycet druhy patřící do třídy Hyphomycetes, řádu Moniliales (viz tabulka 2). Nákazy vyvolané těmito houbami se obecně nazývají „muskardiny“.

Druhou nejvýznamnější skupinou entomopatogenních hub tvoří druhy patřící do řádu Entomophthorales (Zygomycotina: Zygomycetes). V porovnání s předchozí skupinou jde o obligátní patogeny hmyzu a jejich praktické využití naráží na problém umělých kultivací. Většinu druhů patřících do Entomophthorales nelze kultivovat běžnými kultivačními metodami. Entomopatogenní houby z řádu Entomophthorales se proto prosazují jako přirozeně se vyskytující bioagens, které vyvolávají spontánní epizootie v populacích škůdců (Landa 1994).

Tabulka 2: Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub (Hyphomycetes, Moniliales)

Genus	Species	Obecná charakteristika
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. versicolor</i>	včela medonosná komáři z rodu <i>Culex</i>
<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i> <i>B. brongniartii</i> <i>B. tenella</i>	široce polyfágní entomopatogenní druhy <i>Orthoptera</i> , <i>Hemiptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> , <i>Hymenoptera</i> , <i>Diptera</i>
<i>Hirsutella</i>	<i>H. thompsonii</i>	akarifágní houba, <i>Tetranychus urticae</i> , <i>Phyllocoptruta oleivora</i>
<i>Metarhizium</i>	<i>M. anisopliae</i> <i>M. flavoviridae</i>	široce polyfágní entomopatogenní houby <i>Orthoptera</i> , <i>Hemiptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> , <i>Diptera</i>
<i>Nomuraea</i>	<i>N. rileyi</i> <i>N. atypicola</i>	housenky <i>Lepidoptera</i>
<i>Paecilomyces</i>	<i>P. fumoroseus</i> <i>P. farinosus</i> <i>P. lilacinus</i> <i>P. variotii</i>	široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy, <i>Orthoptera</i> , <i>Thysanoptera</i> , <i>Homoptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> , <i>Diptera</i> roztoči <i>Tetranychidae</i> , hád'átka <i>Globodera</i> , <i>Heterodera</i>
<i>Tolypocladium</i>	<i>T. cylindrosporium</i>	<i>Culicidae</i>
<i>Verticillium</i> (= <i>Lecanicillium</i>)	<i>V. lecanii</i> <i>V. fusisporum</i>	Široce polyfágní entomopatogenní druh <i>Thysanoptera</i> , <i>Homoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Diptera</i>

(zvýrazněný tisk – komerční biopreparáty nebo jejich vývoj)

(Landa 1994)

2.2.3 Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Účinnou složku většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří konidie nebo blastospory. Konidie jsou produkovány formou povrchových kultivací na tekutých živných půdách nebo na pevných přirozených substrátech a biotechnologie jejich produkce imituje přirozený cyklus, při kterém je zprvu vytvořena povrchová myceliální biomasa a na konci cyklu se na vzdušném myceliu tvoří konidie.

Blastospory entomopatogenních hub jsou produkovány ve fermentačních biotechnologiích (submerzní kultivace v tekuté živné půdě) a využívají fenoménu změny morfologické formy patogena po proniknutí do semi-aerobních podmínek tělní dutiny (Landa 1998).

Přes určité zásadní odlišnosti jsou však biopreparáty na bázi konidií nebo blastospor stejné v tom, že obsahují konkrétní počet vitálních a virulentních infekčních jednotek schopných přímo vyvolat infekci, které jsou doplněny o inertní nebo nutritivní složky. Nejčastěji jsou takovéto biopreparáty finalizovány do formy smáčivých, ve vodě rozpustných prášků (WP) nebo granulí (WDG), v poslední době se již objevují i olejové suspenzní koncentráty (Kessey 2000). K aplikaci lze použít standardní aplikační techniku. Při aplikaci je třeba respektovat "kontaktní účinek" preparátů (nutnost adheze konidií/blastospor na povrch těla cílového druhu hostitele). Při ošetření nadzemních částí rostlin je nutné pečlivě ošetřit niky, ve kterých se vyskytuje cílový druh škůdce.

Standardní biopreparáty na bázi entomopatogenních hub musejí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií a podléhají kompletnímu registračnímu procesu. Mezi klíčové parametry kvalitativní povahy patří garance druhu a kmene patogena; specifikace podílu aktivní a doplňkové složky v biopreparátu a maximální přípustná kontaminace (zastoupení cizorodých biotických příměsí, např. bakterií, v 1 g/ml přípravku). Mezi hlavní kvantitativní parametry houbových biopreparátů patří:

- počet infekčních jednotek - tzv. titr konidií (blastospor). Titr infekčních jednotek se zpravidla pohybuje v rozmezí od $1,0 \times 10^9$ - $1,0 \times 10^{10}$ konidií/blastospor v 1 g/ml biopreparátu
- klíčivost konidií (blastospor) - garantovaná vitalita konidií nebo blastospor udávaná v %
- počet kolonie tvořících jednotek (CFU - Colony Forming Units) - specifický údaj kvalitativní povahy, udávající z kolika jednotek patogena přítomných v 1 g/ml biopreparátu se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie.

Zvláštní skupinu houbových biopreparátů představují přípravky, jejichž aktivní složku tvoří buď neinfekční formy biomasy hub nebo infekční jednotky imobilizované v organických nebo anorganických nosičích.

Tyto formulace byly cíleně vyvinuty pro účely půdních aplikací. V podstatě jsou známé dvě základní (a v principu značně podobné) verze těchto formulací:

- biopreparáty na bázi myceliových granulí - patogen je finalizován do formy sušených myceliových fragmentů, které po aplikaci do půdy jímají vodu a postupně regenerují do standardní formy mycelia, na kterém se tvoří konidie, které mohou infikovat hmyzího hostitele
- biopreparáty na bázi alginátových pelet - smíšená biomasa (mycelium, blastospor, konidie) patogena je spolu s nutritivní složkou imobilizována do drobných pelet, které po aplikaci do půdy jímají vodu, imobilizovaná houba regeneruje a s využitím živin, které jsou součástí pelety, realizuje kompletní saprofytický cyklus, jehož výsledkem je tvorba nové generace konidií.

Při aplikaci půdních formulací je do půdy zaváděna neinfekční forma (alginátová nebo myceliová peleta), u které musí nejdříve proběhnout celý vývojový cyklus, v průběhu kterého se vytvoří spory. V půdním profilu se tak vytvoří soustava "přirozených infekčních zón", která způsobuje dlouhodobý infekční tlak na populace škůdců. Takto formulované biopreparáty jsou aplikovány buď celoplošně (při některých agrotechnických operacích), častěji však v přesných dávkách přímo do okolí chráněné rostliny (při seti nebo sázení) a jako příměs do pěstebních substrátů (rychlení sazenic a pěstování okrasných květin) (Landa 1998).

Standardní biopreparáty na bázi entomopatogenních hub musí splňovat řadu kvalitativních kritérií a podléhají standardnímu registračnímu procesu. Producenti biopreparátů na bázi entomopatogenních hub garantují nejen druh a kmen patogena, na jehož bázi je přípravek konstruován, ale i složení, množství a životnost infekčních jednotek patogena v přípravku.

Z velkoplošného průzkumu, který byl v uplynulých čtyřech letech na území ČR realizován, byla získána široká škála kmenů mnoha druhů entomopatogenních hub, z nichž významnou skupinu tvoří kmeny entomopatogenních hub získané ze vzorků odebraných na ekologických farmách v regionu jižní Čechy.

Čisté kultury těchto hub jsou uchovány ve sbírce mikroorganismů ZF JU v Českých Budějovicích a charakterizovány s ohledem na jejich možné využití pro výrobu preparátů (Landa 1998).

Počet biopreparátů na bázi entomopatogenních hub registrovaných v zahraničí (viz tabulka 3) rok od roku stoupá.

Tabulka 3: Příklady biopreparátů na bázi hub (Landa 1998)

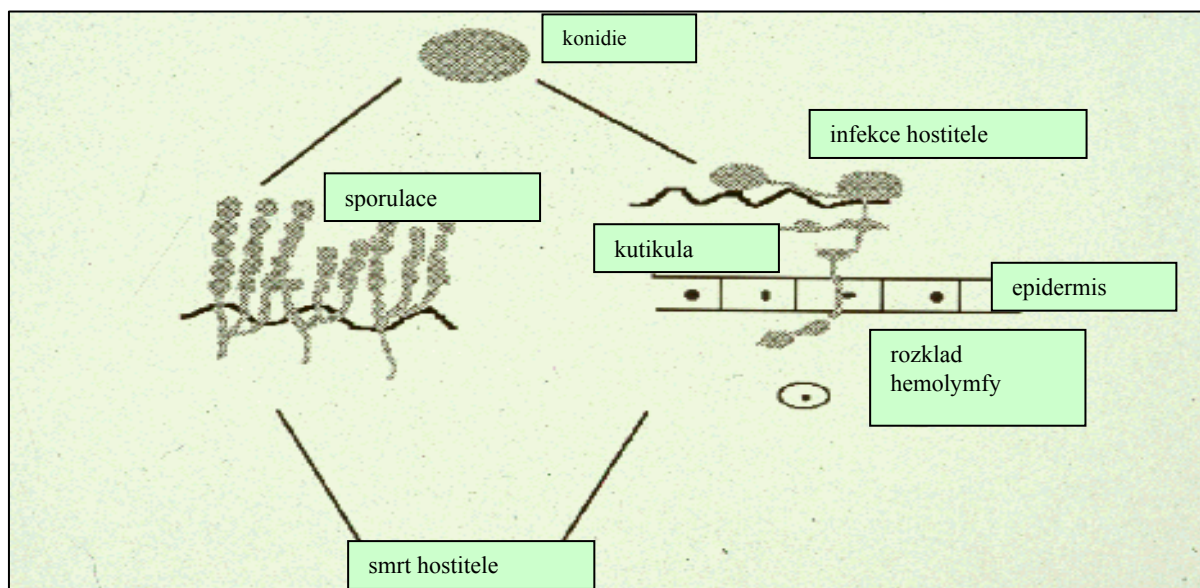
Druh	Obchodní název	Výrobce	Cílové druhy škůdců	Aplikace
<i>Beauveria bassiana</i>	Naturalis- L™ Naturalis- H&M™ Naturalis- T&O™ Ostrinil™ Mycotrol™ Mycotrol- Botanigard22WP™	Troy Biosciences Troy Biosciences Troy Biosciences Natural Plant Protection Mycotech Mycotech Mycotech	škůdci vyskytující se v půdě: krtonožky, chrousti, chroustci, larvy nosatcovitých brouků a další škůdci nadzemních částí rostlin: molice, zavíječ kukuřičný, saranče stěhovavá, mandelinka bramborová	půdní formulace: mycelinové granule, alginátové pelety, WDG suspenní formulace: WP, WDG, (zálivka, postřik, ponořování sazenic apod.)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bay Bio 1020™ Bio - Blast™ Bio - Path™	Bayer AG EcoScience EcoScience	škůdci vyskytující se v půdě: krtonožky, chrousti, chroustci, larvy nosatcovitých brouků švábi (Bio-Path)	půdní formulace: mycelinové granule, ve vodě rozpustné granule, obsahující konidie návnada: adhezni prášek s konidiami
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Pfr 97™20%wdg Preferal	Certis Biobest N. V.	škůdci ve sklenicích: molice, mšice, třásněnky, suprese svilušky, chmelové, mykoparazitismus na padlí okurkovém a rzi	granule rozpustné ve vodě: foliární aplikace suspenze blastospor získaných rozpuštěním granulí ve vodě
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Vertalec™ Mycotal™	Koppert B. V. Koppert B. V.	škůdci ve sklenicích: molice (Mycotal™), mšice (Vertalec™), částečná suprese populací třásněnek a červců	smáčlivý prášek: aplikace suspenze blastospor (Vertalec™) nebo konidií (Mycotal™) získané rozpuštěním smáčlivého prášku

2.2.4 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Hlavní fáze generalizovaného vývojového cyklu vláknitých entomopatogenních hub lze definovat následujícím způsobem (Obrázek 1):

1. Přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele
2. Pronikání patogena do tělní dutiny, interní proliferace a vytváření povrchové myceliální sítě (*parazitická fáze vývojového cyklu*)
3. Externí sporulace a tvorba konidií nové generace (*saprofytická fáze vývojového cyklu*)

Obrázek 1: Vývoj entomopatogenních hub (Charnley 2002)



Houbové onemocnění zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie. Mechanizmy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem jsou procesy převážně nahodilé. Z abiotických faktorů se na šíření infekčních propagulí hub v prostředí nejčastěji podílí voda a vzduch (vítr, déšť, pohyb vody v půdě, vodní páry).

Mezi běžné mechanismy vzniku houbových epizootií v populacích hmyzu patří kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými tzv. autodisseminace, při které dochází k šíření konidií uvnitř populace v souvislosti se specifickými vnitropopulačními procesy.

Jsou to například kontaminace při kopulaci nebo kontaminace vajíček při jejich kladení. Sporadicky dochází k šíření mykóz i prostřednictvím biotických vektorů (např. roztoči, háďátka, jiné druhy hmyzu), nicméně i tyto mechanismy se při šíření hub v některých případech významně uplatňují (Landa 1998).

Jedním z příkladů je šíření hub z rodu *Aschersonia* v populacích molice prostřednictvím mykofágních roztočů z rodu *Acalvolia* (Landa, Osborne 1992).

Vlastní proces adheze konidie k povrchu hostitele je procesem pasivním, ve kterém sehrává klíčovou úlohu povrchová struktura konidií. Jakmile se přichytí konidie na tělo hostitele, tak následné klíčení a počáteční růst na povrchu hostitele není závislé na externím příjmu živin, protože patogen využívá svoje zásobní látky (Samson, Rombach 1985). Klíčení konidií převážně závisí na vnějších biotických faktorech zejména pak na relativní vzdušné vlhkosti a teplotě, méně pak na světelných podmínkách a na externích živinách (Boucias *et al.* 1988). Konidie některých druhů hub jsou pro fázi přichycení k tělu hostitele vybaveny adhezivními substancemi, pomocí kterých vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu (např. houby *Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii* aj.). Jiné druhy entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* aj.) produkují suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem.

Primární adheze takovýchto konidií je zajištěna buď přímou interakcí mezi dvěma hydrofobními povrchy (konidie *vers.* kutikula hmyzu) nebo prostřednictvím elektrostatických sil, případně i molekulární interakcí mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikuly hostitele (např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny, steroly, polární lipidy aj.) (Landa 1998).

V první fázi dochází k výraznému zvětšení klíčící konidie (bobtnání), které je doprovázeno komplexní přestavbou stěny konidie a následnou tvorbou primárního klíčku. Od určité fáze naklíčení je další vývoj patogena závislý na externím příjmu živin.

Houba začíná přijímat látky, které jsou zprvu součástí kutikuly, následně pak absorbuje živiny i z vnitřních orgánů a tkání hostitele. Za tímto účelem proniká přímou penetrací nebo prostřednictvím přirozených otvorů do tělní dutiny napadeného hostitele. Při přímé penetraci kutikulou uplatňují houby kombinaci biochemických a fyzikálně mechanických prvků. V první fázi penetrace jsou v oblasti apresoria pronikající hyfy produkovány kutikulu degradující enzymy (lipázy, chitinázy, proteázy). Koncová špička invazní hyfy tlakem proniká narušenou kutikulou hostitele a invazuje do tělní dutiny. Častým místem penetrace jsou méně sklerotizované části na povrchu těla. Kromě přímé penetrace kutikulou, využívají entomopatogenní houby k pronikání do tělní dutiny i přirozené otvory. Běžným místem pronikání jsou dýchací otvory a řitní nebo ústní otvor.

Po penetraci invazní hyfy do tělní dutiny hostitele nastupuje vlastní parazitická fáze vývoje patogena. V této fázi vývojového cyklu patogen rychle kolonizuje hemocel hostitele a využívá látky vázané v tělních tkáních (Samson *et al.* 1988).

Pro tuto fázi vývojového cyklu je typický přechod vláknitých forem hub na rychle se dělicí a pomnožující tělíska - tzv. *hyfová* resp. *kvasničná tělíska* tzv. „*yeast like body*“, *blastospory*. Tato tělíska se rychle namnožují (dělení pučením, exponenciální růst titru v hemolymfě) a ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele, který je v této fázi vývoje mykózy již usmrcen (Landa 1998).

Kromě formování uvedených typů tělísek je pro tuto fázi vývoje entomopatogenních hub typická i zvýšená produkce různých primárních a sekundárních metabolitů. Obecnou funkcí metabolitů je uvolňování a účast v procesu využívání živin z tkání hostitele (primární metabolity), potlačení imunitních reakcí hostitele a vytváření prostředí nevhodného pro kolonizaci napadeného hostitele jinými druhy patogenních nebo saprofytických mikroorganismů (sekundární metabolity) (McCoy *et al.* 1988. Tanada, Kaya 1993).

Mumifikaci hostitele končí druhá, parazitická fáze vývojového cyklu a nastupuje finální fáze - tvorba povrchového mycelia a sporulace (saprofytický vývoj patogena na usmrceném hostiteli). Pro tuto fázi vývoje jsou opět typické vláknité struktury. Patogen prorůstá na povrch usmrceného hostitele a postupně vytváří hustou myceliální síť, která porůstá celý povrch těla. Na vzdušném myceliu se postupně vytváří konidiofory, na kterých se ve finální fázi vývojového cyklu formují nové konidie. Konidie si v přirozeně dormantním stavu udržují vitalitu po dobu několika týdnů až měsíců. Dočasná dormance konidií je ukončena šířením a adhezí konidií na povrchu těla nového vhodného hostitele.

V optimálních podmínkách (např. teplé mikroklima skleníků a foliových krytů) může být celý vývojový cyklus realizován v průběhu 3-5 dnů, v běžných podmínkách vegetačního období mírného pásma probíhá v rozmezí od 7-21 dnů. Kritické fáze vývojového cyklu představují adheze a klíčení konidií.

Klíčovým faktorem prostředí je vlhkost. Klíčení konidií zpravidla vyžaduje relativní vlhkost vzduchu vyšší než 90%, a i ostatní fáze vývoje probíhají nejrychleji při vyšších vlhkostech. Pouze v období od proniknutí patogena do tělní dutiny do opětovného prorůstání mycelia na povrch těla nejsou nároky na vysokou vlhkost v okolním prostředí tak vysoké. Teplotní tolerance entomopatogenních hub je poměrně vysoká. Délka vývojového cyklu probíhá v úzké korelaci s okolní teplotou.

Většina druhů entomopatogenních hub je dokonale adaptována i na dlouhotrvající nízké teploty a přežívá i dlouhodobé zmrazení. Ostatní abiotické faktory svým významem nedosahují relevance vlhkosti a teploty. Na základě uvedených údajů je možné definovat charakter optimálních a potenciálních nik. V soustavě odlišných agroekosystémů se pro využití biopreparátů na bázi entomopatogenních hub jako nejvhodnější jeví skleníky (ochrana sazenic, rychlené zeleniny a okrasných květin), závlahové technologie pěstování různých plodin a kultur a aplikace do půdy (Landa 1998).

2.2.4.1 Vliv prostředí na vývoj entomopatogenních hub

Vnější prostředí má na průběh infekce a vývoj patogena velmi výrazný vliv. V pořadí klesající relevance se nejvýrazněji uplatňují vlhkost a teplota, menší význam mají ostatní fenomény prostředí (složení a pohyb vzduchu, světlo a fotoperioda). Faktory prostředí ovlivňují zejména šíření konidií, klíčení konidií, penetraci invazní hyfy kutikulou a sporulaci. Vývoj entomopatogenních hub ve fázi kolonizace tělní dutiny je abiotickými faktory ovlivňován méně výrazně (Tanada, Kaya 1993). Optimální teplotní zóna aktivity většiny entomopatogenních deuteromycet se pohybuje v rozmezí 20 - 30°C. Klíčení konidií probíhá nejrychleji při teplotách okolo 25°C. Konidie deuteromycet v dormantním stavu však snadno přežívají i dlouhodobé zmrazení a krátkodobě i teploty v rozmezí 45 - 55°C (McCoy *et al.* 1988). Klíčovým faktorem prostředí je vlhkost. Většina konidií entomopatogenních deuteromycet klíčí pouze při r.v.v. vyšší než 90 %, ale přímé smočení konidií ve vodě může klíčivost inhibovat. Obdobně i v období sporulace výrazně stoupají nároky na vysokou r.v.v. a většina entomopatogenních hub dobře sporuluje pouze při r.v.v. nad 90 % (např. Hall 1981; McCoy 1981).

V případě nevhodných vlhkostních poměrů v prostředí vytváří většina entomopatogenních hub uvnitř těla infikovaného hostitele rezistentní hyfy a saprofytickou fázi vývoje kompletizuje až při vhodných podmínkách. Nižší r.v.v. je v řadě případů výhodná pro fázi šíření konidií, zejména pak u těch druhů hub, které produkují konidie s hydrofobním povrchem bez mucilagenního pokryvu (např. *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus* a jiné druhy hub) (Gottwald, Tedders 1982). V souhrnu interakcí "patogen - % r.v.v." se více prosazuje vliv mikroklimatu než hodnoty zjištěné v makroklimatickém okruhu. Příkladem jsou odlišné poměry na povrchu listu v místě přímé interakce "patogen - hostitel" než obecné hodnoty naměřené v okolním prostředí. V porovnání s ostatními faktory prostředí je vlhkost jednoznačně faktorem nejvýznamnějším.

Přímý vliv světla na průběh infekce a vývoj entomopatogenních hub není doposud podrobně znám. Světlo negativně ovlivňuje životnost konidií v prostředí zejména podílem paprsků UV spektra. Krátké ultrafialové paprsky mají výraznou fungicidní účinnost a ovlivňují životnost konidií v průběhu jejich šíření v prostředí, fázi vzniku nákazy a také klíčivost konidií. V některých případech bylo prokázáno, že světlo indukuje výrazně vyšší produkci konidií a také produkci některých doprovodných substancí (např. *A. aleyrodis*, viz podrobněji dále) (Landa *et al.* 1989; Osborne, Landa 1992). Orientace hyf v myceliu, postavení konidioforů a orientace nových konidií jsou vlivem světla silně ovlivněny (McCoy *et al.* 1988; Tanada, Kaya 1993).

2.2.5 Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub

2.2.5.1 Charakteristika hub rodu *Beauveria*

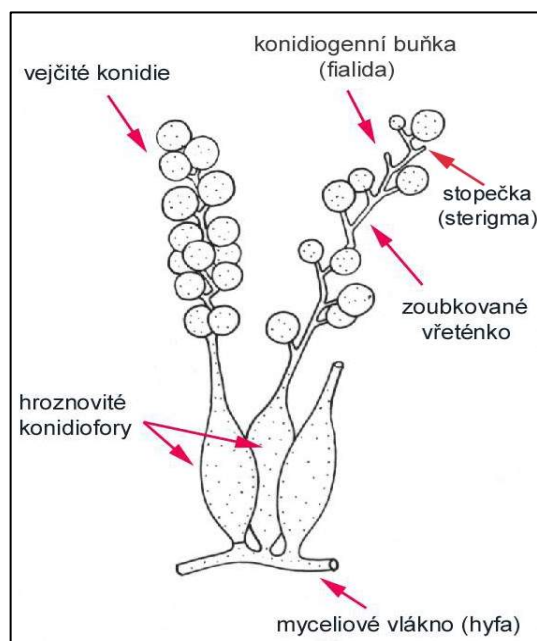
Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Beauveria*



Mycelium je bílé nebo krémově zbarvené. Konidiofory hroznovité, na bázi cibulovité. Konidiogenní buňky (fialidy) jsou dlouhé, zubovité formované, z nich vyrůstají sterigmata, na nichž se tvoří jednotlivé konidie. Konidie mají tvar vejčitý a jsou jednobuněčné.

Nejvýznamnější zástupci *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. tenella* reprezentují převážně široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která se vyskytují v půdě (např. při přezimování).

V sortimentu hostitelů jsou zastoupeni zástupci z řádů rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoho dalších druhů), larvy a kukly motýlů a dvoukřídlého hmyzu. V poslední době byly izolovány i kmeny *B. bassiana*, které vykazují vysokou virulenci na různých druzích stejnokřídlého hmyzu (např. na molících a mšicích). V ČR byly registrovány biopreparáty Boverol a Boverosil. V zahraničí je k dispozici řada biopreparátů na bázi *B. bassiana* a *B. brongniartii*, které jsou používány zejména v lesnictví a okrasném zahradnictví proti larvám vrubounovitých a nosatcovitých brouků nebo proti širokému sortimentu škůdců rychlené zeleniny a okrasných květin (např. přípravek MYCOTROL firmy Mycotek).

Přirozené epizootie způsobené touto houbou v populacích molíc prakticky nejsou známy, pouze v ojedinělých případech je patogen zjištěn na spontánně infikovaných molících (Fransen 1990). *B. bassiana* je typickým představitelem entomopatogenní mykoflóry půdy a její výskyt na škůdcích kolonizujících výhradně nadzemní části rostlin (molice, mšice) je velmi řídký. Nicméně v pokusech (Landa, Jiranová 1989) bylo prokázáno, že jednorázová aplikace suspenze konidií *B. bassiana* může iniciovat nákazu larev a dospělců na úrovni, kterou lze označit za regulační zásah. Avidzba (1983) použil biopreparát na bázi *B. bassiana* proti molici *Dialeurodes citri* v rámci široce koncipovaného PIO a prokázal vysokou účinnost tohoto biopreparátu proti uvedenému druhu molice. Borisov & Vinokurova (1983) použili s úspěchem houbu *Beauveria bassiana* proti molici skleníkové na okurkách. V pokusech použili kmen *B. bassiana*, který byl pasážován přes tohoto cílového hostitele a teprve následně nakultivován za účelem získat dostatečné množství infekčních propagulí pro pokusy. Kromě samotné účinnosti *B. bassiana* na molici skleníkovou tak prokázali možnost zvýšit účinnost patogena umělou manipulací formou selekce přes přirozeného hostitele. Mezi nejvýznamnější druhy rodu *Beauveria* patří :

B. bassiana – konidie globoidního až subgloboidního tvaru, konidiogenní struktury tvoří husté shluky

B. brongniartii – konidie podlouhlé vejčité až cylindrické, konidiogenní struktury štíhlé, tvoří řídké hrozny

B. globurifera – vejčité konidie

B. velata – konidie kulovité až elipsoidní, lehce ornamentované, pokryté želatinovou vrstvou

B. amorpha – konidie cylindrické, často jednostraně zploštělé.

2.2.5.2 Charakteristika hub rodu *Metarhizium*

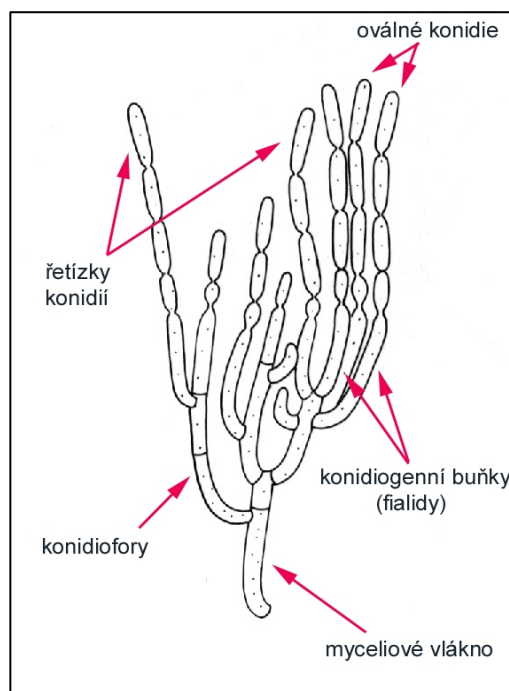
Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Metarhizium*



Mycelium je zprvu bílé, později se mění na zelené „muskardiny“. Konidiofory se větví, tvoří útvary podobné hustým mnohoramenným svícům. Konidiové buňky (fialidy) jsou krátké a tvoří se v blocích. Konidie jsou dlouhé, tyčinkovité až hranolovité, tvoří kompaktní sloupce (řetízky) a jsou přimknuty k sobě, na obou koncích zaoblené; zelenošedé až olivově zelené.

M. anisopliae, *M. flavoviridae* reprezentují široce polyfágní houby, které jsou převážně vázány na půdní hmyz (rovnokřídlí - *Orthoptera*, brouci - *Coleoptera* a dvoukřídlí - *Diptera*). Nákazy vyvolané metarhizii jsou označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem.

Tyto houby se běžně vyskytují v půdách oblasti mírného pásma, subtropů a tropů. Podobně jako *B. bassiana* jsou běžnou složkou půd na celém území ČR, kde působí jako přirození regulátoři v populacích půdního hmyzu. Biopreparáty na bázi metarhizií jsou velkoplošně aplikovány zejména v zemích Jižní Ameriky (Brazílie, Argentina, Kolumbie). K nejvýznamnějším druhům rodu *Metarhizium* patří *M. anisopliae*, *M. album*, *M. brunneum* a *M. glutinosum*.

2.2.5.3 Charakteristika hub rodu *Paecilomyces*

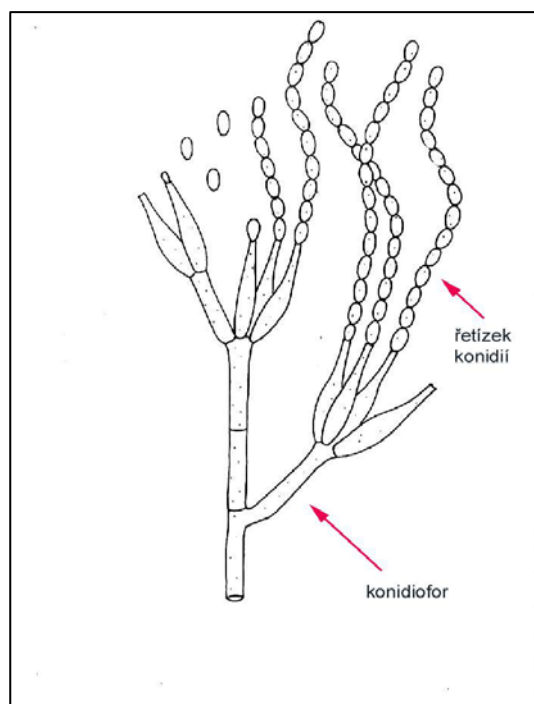
Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Paecilomyces*



Mycelium je vzdušné, vatovité, zprvu bílé, později mění barvu od odstínů narůžovělé, nafialovělé až šedofialové barvy, změna barvy přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Konidiofory jsou na hyfách umístěny přeslenovitě. Na jednom konidioforu je přítomno 3-6 konidiogenních buněk (fialid). Konidie jsou oválné, hydrofobní; na konci fialid se oddělují postupně, nejmladší konidie je vždy v kontaktu s fialidou a odtlačuje starší konidie dál do tvořícího se řetízku.

Druhy *P. fumosoroseus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus* a *P. variotii*, reprezentují široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích z mnoha řádů hmyzu (*Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), fytofágních roztočích (např. sviluškovití - *Tetranychidae*) a některých druhích háďátek (cystotvorná háďátka z rodů *Globodera*, *Heterodera*). K nejvýznamnějším zástupcům rodu *Paecilomyces* patří široce polyfágní *P. fumosoroseus* (dále též PFR).

PFR je kosmopolitní široce polyfágní houbový patogen. Většina záznamů se týká izolace PFR z různých druhů hmyzích hostitelů .

PFR vykazuje nejen status entomopatogenní a akarifágní houby, ale za určitých okolností vykazuje i statut mykoparazita. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na rzích a na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového. Tento druh je již využíván v praktické ochraně rostlin. Americká firma Thermo Trilogy Corporation vyrábí a distribuuje biopreparát „PFR 97 WDG - Apopka“, který je pod obchodním názvem PREFERAL distribuován také belgickou firmou BIOBEST v Evropě.

Tento preparát je používán v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin proti širokému sortimentu škůdců (mšice, molice, červci, třásněnky..a další). V ČR je pokusně používán v ochraně jehličnanů proti kůrovcům z rodu *Ips* (např. *I. Typographus*) a v ochraně brambor proti mandelince bramborové.

První záznam o asociaci PFR s molicemi pochází z Číny z roku 1983 z oblasti Peking, kde bylo PFR zjištěno jako patogen přirozeně se vyskytující v populacích molice skleníkové *T. vaporariorum* ve sklenících, kde působil velmi silné spontánní epizootie, které dočasně zcela zdecimovaly populace tohoto škůdce. Tento kmen byl odizolován a jako vysoce virulentní vůči molici skleníkové byl označen jako „subspecies beijingensis“, tedy jako *P. fumosoroseus* var. *beijingensis* (Fang *et al.* 1983). Druhým případem přirozené epizootie způsobené *P. fumosoroseus* v populacích molice je periodický výskyt *P. fumosoroseus* v populacích molice tabákové *Bemisia tabaci* na Floridě (Osborne *et al.* 1990). Odizolovaný kmen byl označen jako PFR 97- kmen Apopka (Apopka- oblast na Floridě, kde byl kmen PFR 97 poprvé zachycen a odizolován) (Osborne, Landa 1992; Bolckmans *et al.* 1995; Lacey *et al.* 2000). Molice *T. vaporariorum* a *B. tabaci* patří mezi velmi senzitivní hostitele, na kterých může *P. fumosoroseus* prodělavat vývoj na všech vývojových stádiích , včetně vajíček a dospělců (Landa *et al.* 1994). K dalším významným zástupcům hub rodu *Paecilomyces* patří *P. farinosus*, *P. lilacinus* a *P. variotii*.

2.2.5.4 Charakteristika hub rodu *Lecanicillium*

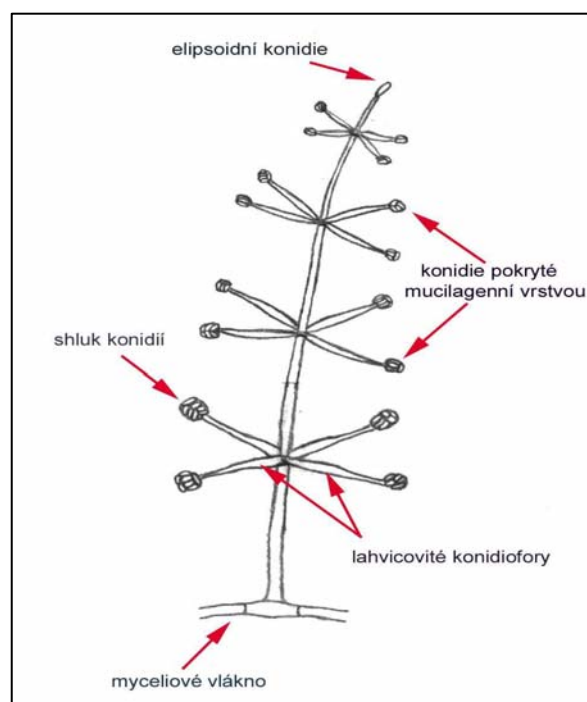
Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Lecanicillium*



Mycelium je vzdušné, bílé. Konidiofory jsou dlouhé, úzké, lahvicovité; na myceliu jsou umístěny v přeslenech a vyrůstají protilehle 2,3 až 4. Konidie mají elipsoidní tvar; tvoří se postupně a vždy nová, mladší odtlačuje dříve vytvořenou, tvoří shluky podobné kuličkám, které jsou pokryty mucilagenní hmotou.

Lecanicillium lecanii (Zimmerman) (Deuteromycotina, Hyphomycetes), dříve *Verticillium lecanii* (Zimmermann), je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, který byl poprvé popsán po izolaci z červce *Coccus viridis* (Hall 1976; 1981). V minulosti byl tento patogen evidován pod různými jmény (např. *Cephalosporium lecanii*, *C. aphidicola*) (Samson & Rombach 1985). *L. lecanii* je velmi dobře známá polyfágní entomopatogenní houba. Spontánní epizootie způsobené tímto patogenem jsou nejčastěji zaznamenávány v populacích hmyzu řádu *Homoptera*, zvláště pak v populacích různých druhů mšic, molic a červců. U těchto hostitelů napadá patogen všechna vývojová stádia kromě vajíček (molice), která jsou infikována jen výjimečně (Hall 1976).

Méně časté jsou záznamy týkající se výskytu *L. lecanii* v populacích hostitelů patřících do jiných řádů hmyzu, nicméně v sortimentu hostitelů patogena byly zaznamenáni zástupci řádů *Orthoptera*, *Heteroptera*, *Thysanoptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera* a *Hymenoptera*, z nichž zejména některé druhy třásněnek patří k velmi běžným hostitelům (včetně klíčových škůdců skleníkových plodin - *Thrips tabaci* a *Frankliniella occidentalis*). Také u těchto hostitelů napadá *L. lecanii* přednostně larvy, méně pak dospělé, případně kukly. V případě třásněnek byly zaznamenány infekce na všech vývojových stádiích s výjimkou vajíček, která jsou chráněna parenchymem listů hostitelských rostlin (Hall 1980; McCoy *et al.* 1988).

Obdobně jako u *Metarhizium anisopliae* i v případě *L. lecanii* bylo zjištěno, že v závislosti na hostitelském druhu vytváří morfologicky odlišné kmeny, které jsou charakterizovány jako kmeny s "velkými konidiosporami" (izolovány převážně z mšic) a kmeny s "malými konidiosporami" (izolovány z molic) (Hall 1985). Tato skutečnost se odráží i v nabídce biopreparátů na bázi *L. lecanii*, které jsou již k dispozici jako registrované biopreparáty (viz. dále).

Spektrum parazitismu *L. lecanii* však není omezeno pouze na hmyz. Spontánní epizootie způsobené *L. lecanii* byly zjištěny i v populacích některých druhů roztočů (např. na zástupcích svilušek *Tetranychidae* a vlnovníků z čeledi *Eryophidae*) (Gams 1971; Kanagaratnam *et al.* 1981). Kromě parazitické asociace s uvedenými skupinami členovců bylo zjištěno, že se *L. lecanii* vyskytuje i jako ektoparazit na některých druzích fytopatogenních hub. Příkladem této ektoparazitické formy vývoje *L. lecanii* je výskyt na uredosporách různých druhů rží (např. *Uromyces dianthi*, *U. appendiculatus*, *Puccinia graminis* aj.) (Hall 1981; Deacon 1983).

V praktické biologické ochraně však zdaleka není takto široké parazitické spektrum využíváno. *L. lecanii* je záměrně využíváno pouze pro biologickou ochranu skleníkových plodin proti mšicím, molicím a třásněnkám a záznamy o pokusech zaměřených na využití *L. lecanii* proti jiným hostitelům jsou prozatím jen velmi sporadické.

V sortimentu dostupných biopreparátů mají již tradiční místo biopreparáty firmy KOPPERT (Nizozemí), které jsou známy pod obchodními názvy MYKOTAL (určen k ochraně skleníkových plodin proti molici skleníkové a molici bavlníkové), VERTALEC (kmen vysoce virulentní na různé druhy mšic) a TRIPTAL (kmen *L. lecanii* s vysokou účinností na hmyz třásnokřídlý, např. třásněnka zahradní *T. tabaci* a třásněnka západní *Frankliniella occidentalis*).

2.2.5.5 Charakteristika hub rodu *Aschersonia*

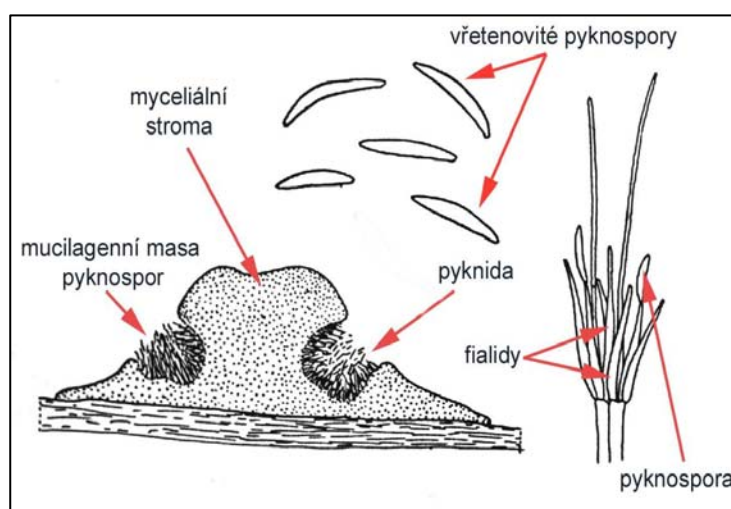
Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota*

Pomocná třída: *Coleomycetes*

Řád: *Sphaeropsidales*

Rod: *Aschersonia*



V rámci rodu je evidováno přes 50 druhů hub úzce specializovaných na červce a molice. Přirozený výskyt těchto hub je vázán na subtropické oblasti. V souvislosti s úzkou specializací jsou v rámci rodu *Aschersonia* odlišovány druhy, které parazitují výhradně na červcích (skupina *Lecaniicolae*) a druhy parazitující výhradně na molících (skupina *Aleyrodicolae*) (Procenko 1967; Fransen 1990).

Do skupiny *Aleyrodicolae* patří kromě nejrozšířenějšího druhu *A. Aleyrodis* Weberr i druhy *A. flava*, *A. goldiana*, *A. flavocitrina*, *A. placenta*, *A. viridis* a další. Z hlediska biologické ochrany proti molicím je jednoznačně nejvýznamnějším a nejstudovanějším druhem houba *A. aleyrodis*, která je běžnou součástí entomopatogenní mykoflóry v agroekosystémech citrusových sadů (Fransen 1990). Poprvé byla zjištěna a popsána na počátku století po izolaci z molice citrusové *Dialeurodes citri* v průběhu přirozené epizootie v citrusových sadech na Floridě (Fawcett 1908; Pech 1921).

Kromě molice citrusové byla následně zjištěna i na dalších druzích molic, z nichž mezi nejvýznamnější patří *T. vaporariorum*, *T. abutiloneus*, *B. tabaci*, *B. gifardii*, *D. citrifolii*, *Aleurocanthus woglumi* a *Tetraleurodes acaciae* (Fransen 1990).

Pyknostry *A. aleyrodis* jsou jednobuněčné, fusiformní, vřetenovitého tvaru, se zřetelnými inkluzemi v protoplazmě (3-5 inkluzních kapek uvnitř vyzrálých pyknostry) a jsou produkovány fialidami ve formě mucilagenní masy. Fialidy jsou uloženy v pyknidách, které se formují v hustém myceliálním stromatu na povrchu usmrceného hostitele (Samson, Rombach 1985). Běžnou součástí mucilagenní masy pyknostry je β -karoten, který způsobuje nejen typické zbarvení samotné masy pyknostry, ale je i příčinou načervenalého zbarvení infikovaných larev (Landa *et al.* 1989). Význam β -karotenu v mucilagenní mase pyknostry není doposud uspokojivě vysvětlen. Pravděpodobná úloha β -karotenu je v ochraně pyknostry proti negativním účinkům slunečního záření (Osborne, Landa 1992). K nejvýznamnějším druhům entomopatogenních hub rodu *Aschersonia* patří: *A. aleyrodis*, *A. placenta*, *A. goldiana* a další převážně tropické a subtropické druhy.

2.3 Charakteristika molic *Bemisia tabaci* (molice bavlníková) a *Trialeurodes vaporariorum* (molice skleníková)

2.3.1 Význam molic

Molice (*Homoptera*, *Aleyrodidae*) jsou v entomofauně fytofágních druhů škodících na zemědělsky významných plodinách pěstovaných v palearktické oblasti zastoupeny velmi sporadicky. Největší druhové zastoupení molic je registrováno v subtropických a tropických pásmech různých zoogeografických oblastí. Z těchto oblastí jsou některé druhy molic nahodile introdukovány do nových areálů rozšíření, ve kterých často a rychle získávají status klíčových škůdců (Bink-Moenen, Mound 1990). Klasickým příkladem introdukce molic do nového areálu (mírného pásma palearktické oblasti) je zavlečení molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* Westwood do Evropy. Tento škůdce byl poprvé do Evropy zavlečen na počátku minulého století (pravděpodobně na orchidejích z Chile do Velké Británie) a postupně se rozšířil nejen po celé Evropě, ale jako kosmopolitně rozšířený druh dnes patří mezi nejvýznamnější polyfágní škůdce skleníkových plodin (Vet *et al.* 1980). V teplejších oblastech jižní Evropy škodí molice skleníková i na plodinách pěstovaných v polních podmínkách.

Obdobným případem je i další polyfágní molice *Bemisia tabaci* Gennadius (molice bavlníková), která byla v 70. letech poprvé zjištěna na některých lokalitách jihovýchodního pobřeží USA (Florida), v krátké době se rozšířila až na západní pobřeží USA (Kalifornie) a dnes patří k nejvýznamnějším škůdcům devastujícím skleníkové a polní plodiny nejen na celém jihu USA, ale i v řadě dalších států USA (Lopez-Avila 1986, Osborne 1988). V Evropě byla *B. tabaci* poprvé zjištěna na konci 80. let ve sklenících v Nizozemí a Velké Británii a v krátké době se rozšířila po celé Evropě, včetně ČR. V současnosti je sice tento škůdce v ČR na seznamu karanténních škůdců, nicméně lze předpokládat jeho další šíření a stoupající význam. Zkušenosti z oblastí, kde je tento škůdce znám již delší dobu, jasně prokazují, že molice bavlníková předčí svým významem a škodlivostí i molici skleníkovou. V oblastech, kde její introdukce následovala až za molici skleníkovou, dokázala v krátké době obsadit i niky původně kolonizované molici skleníkovou, kterou v několika letech úplně vytěsnila (Lopez-Avila 1986; Byrne *et al.* 1990).

2.3.2 Morfologie, bionomie a význam molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*)

Molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum*, Westwood) (*Homoptera*, *Aleyrodidae*) je kosmopolitně rozšířený škůdce. Pochází pravděpodobně ze Střední Ameriky (Hnízdil 2006). Do Evropy byla zavlečena na počátku 20. století a postupně se rozšířila v rámci celé palearktické oblasti, kde se stala běžnou součástí entomofauny skleníkových agroekosystémů.

V polních podmínkách se jako škůdce prosazuje jen výjimečně. V nevytápěných sklenících nepřežimuje a její periodický výskyt podmiňují každoroční (re)introdukce na počátku nebo v průběhu vegetačního období (Vet *et al.*, 1980).

V posledních letech význam molice skleníkové roste a stává se jedním z nejvýznamnějších škůdců skleníkových kultur (Osborne, Landa 1992).

Molice skleníková je široce polyfágní druh. Dosud bylo popsáno více než 250 druhů hostitelských rostlin patřících do 11 čeledí (Vet *et al.* 1980). Je častým dominantním živočišným škůdcem v porostech skleníkových rajčat, okurek a paprik. Z okrasných rostlin dává přednost rodům *Azalea*, *Calceolaria*, *Euphorbia*, *Fuchsia*, *Pelargonium* a *Verbena* (Hnízdil 2006). Z běžného sortimentu rychlených rostlin patří mezi méně vhodné až nevhodné např.: salát, karafiáty a asparágus. Mezi důležité hostitele patří i převážná většina plevelných rostlin (ohniska přežívání molice skleníkové) (Bartoš a kol. 1990, Landa 1985).

Škody na rostlinách způsobují sáním všechna vývojová stádia, zejména na spodní straně listů. Napadené listy se odbarvují, žloutnou, deformují a následně opadávají (Muška 2006). Nejvýznamnější poškození rostlin souvisí s produkcí medovice. Tekuté výkaly jsou silně koncentrované, převážně glycidy obsahují roztoky, které vznikají v modifikovaném zažívacím traktu molice. Medovice je vylučována přes řitní otvor, který je u molice umístěn na hřbetní straně konce zadečku. Z populací molice, které se vyvíjejí a žijí na spodní straně listů, odkapává medovice na svrchní stranu listů v nižších patrech a pokrývá jejich povrch (Byrne *et al.* 1990 podle Landa 1994). Medovice negativně ovlivňuje transpiraci listů, způsobuje listové nekrózy (fyziologické popálení listů) a poskytuje vhodnou živnou půdu pro růst saprofytických čerň (např. *Cladosporium ssp.*), které negativně ovlivňuje fotosyntézu (Bartoš a kol. 1990). Přenáší také patogenní viry (např. mozaiku okurky). V některých případech mohou napadené rostliny odumírat (Muška 2006).

Vývoj molice je charakterizován jako neometabolie tvořící v rámci třídy *Insecta* přechod mezi proměnou dokonalou a nedokonalou (Landa 1994).

Molice skleníková je celým svým vývojem vázaná na nadzemní části hostitelských rostlin. Vývojový cyklus zahrnuje tři vývojová stádia: vajíčko, nymfa (4 larvální instary) a imágo.

Neoplozené samičky kladou haploidní vajíčka (po proběhnutí vývoje dávají vznik dospělcům samčího pohlaví). Oplozené samičky kladou jednak diploidní vajíčka (v potomstvu dospívají samičky), ale i haploidní vajíčka (dospívají samci) v sexuální indexu 0,55-0,6 (Bartoš a kol. 1990, Landa 1994). Průměrná plodnost samiček se pohybuje v rozmezí 120-160 vajíček (s maximem až 400), při průměrné denní snůšce 3-5 vajíček na jednu samičku s maximem až 10. Celkovou i denní snůšku ovlivňují nejvýrazněji teploty (spodní teplotní hranice pro kladení je 11 °C, optimální teploty 22-26 °C) a druh hostitele (Landa 1984, Stenseth 1985).

Vajíčka jsou světlá, žluto-zelená, eliptická, jsou uchycena stopkou do houbového parenchymu listu, na spodní stranu mladých listů do úplných nebo neúplných kroužků. Z vajíček, která postupně tmavnou, se líhne drobná, pohyblivá larva 1. instaru (tzv. „crawler“). Po krátkém ohledání listu se larva mění na sedentérní a na kolonizovaném místě probíhá celý další vývoj jedince až do stádia dospělé. Larvy 1.-3. instaru jsou oválné, ploché, nepohyblivé s jedinou barevněji výraznější zónou na abdomenu v místech, kde jsou lokalizovány mycetomy (dvě žluté až žlutozelené skvrny). Jejich detekce na povrchu listu je nesnadná. K výraznějším morfologickým odlišnostem dochází u larev 4. instaru, kdy jedinec dokončuje metamorfózu v dospělé.

Tento vývojový stupeň je někdy souhrnně označován jako „pupárium“, častěji je používáno dělení na tři podstupně: časná larva 4. instaru, střední larva 4. instaru a pozdní larva 4. instaru (Vet *et al.* 1980, Bartoš a kol. 1990, Landa 1994) . Všechna stádia nymfy mají žlutozelené zbarvení.

Časná larva 4. instaru je stejně jako mladší larvy plochá a přijímá potravu pomocí dlouze štětinovitého bodavě savého ústního ústrojí. Ve fázi střední a pozdní larvy 4. instaru končí kontakt s pletivem a nastupuje konečná fáze vývoje , ve které jedinec již potravu nepřijímá - počáteční fáze střední larvy 4. instaru. V této fázi dochází k výrazným morfologickým změnám. Ploché tělo se zvyšuje, tvoří se silná vosková schránka s druhově specifickými trichomy.

Ve fázi pozdní larvy 4. instaru se v hlavové části formujícího se dospělé objevují výrazné karmínově červeně zbarvené oči a přes voskový tělní povrch lze pozorovat formujícího se dospělé. Dospělci se líhnou hřbetním otvorem ve tvaru písmene T (Vet *et al.* 1980, Bartoš a kol. 1990, Landa 1994).

Imaga *T. vaporariorum* jsou 1,5-2,0 mm velká, mají nápadně bíle zbarvená křídla. Bílé zbarvení způsobuje jemný voskový povrch. Tělo dospělců je žlutavé a oči jsou červené. Křídla prvního a druhého páru jsou zhruba stejného tvaru a velikosti a v klidu jsou složena střechovitě (Landa 1986).

Délka vývoje je přímo závislá na průměrných teplotách, z části je ovlivněna i druhem hostitelské rostliny. Spodní teplotní hranice pro vývoj je 10 °C (vývoj 1. generace trvá při této teplotě 75-105 dní). Se zvyšující se teplotou dochází k výraznému zkrácení vývoje. V běžných skleníkových podmínkách (teplotní rozmezí 18-30 °C) realizuje molice skleníková v průměru 1,0-1,3 generace za měsíc (Bartoš a kol. 1990). Hostitelská rostlina nejvýrazněji ovlivňuje plodnost a přirozenou mortalitu škůdce v průběhu vývoje první generace (Landa 1985).

2.3.3 Morfologie, bionomie a význam molice bavlníkové (*Bemisia tabaci*)

Molice bavlníková (*Bemisia tabaci*, Gennadius 1889) (*Homoptera, Aleyrodidae*) je široký polyfág vyskytující se zejména v tropických a subtropických oblastech celého světa. Rod *Bemisia* celosvětově zahrnuje 37 druhů. Ve střední Evropě byli zjištěni pouze dva zástupci tohoto rodu: *Bemisia tabaci* (Gennadius 1889) a *Bemisia afer* (Priesner & Hosny, 1934).

B. tabaci byla v Česku poprvé determinována Jiřím Zahradníkem v roce 1988 na ibišku (*Hibiscus rosa-sinensis*). Orientační průzkum ÚKZÚZ v letech 1993 až 1995 zjistil výskyt *B. tabaci* ve více než 15 zahradnických podnicích v celé ČR mimo východočeskou oblast. Neevropské populace tohoto druhu je zakázáno zavlékat a rozšiřovat na území ČR a ostatních států Evropského společenství. Pro evropské populace se toto opatření vztahuje na území chráněných zón EU. Hlavní příčinou fyto-sanitárních opatření je, že tato molice přenáší celou řadu nebezpečných virů karanténního významu (např. Bean golden mosaic begomovirus, Cowpea mild mottle carlavirus, Lettuce infectious yellows closterovirus, Pepper mild tigre begomovirus, Squash leaf curl begomovirus, Euphorbia mosaic begomovirus, Tomato mottle begomovirus).

Druh byl poprvé nalezen a popsán na rostlinách tabáku v roce 1889 Gennadiem v Řecku jako *Aleurodes tabaci*. Od konce dvacátých let minulého století se začala kontinuálně šířit do všech oblastí subtropického a mírného pásma. V 80. letech minulého století se stala *B. tabaci* vážným kosmopolitním škůdcem a přenašečem nebezpečných virů (Březíková, Červená 2005). Evropská a středozevní organizace (EPPO) zařadila tuto molici do seznamu karanténních organizmů a doporučuje kontrolovat její výskyt v dováženém zboží rostlinného původu (Hnízdil 1994). Na rozdíl od molice skleníkové způsobuje *B. tabaci* v některých oblastech obrovské škody i na polních plodinách (Van Lenteren, Noldus 1990). V polních podmínkách vážně škodí v jihoevropských zemích, např. v Řecku, Portugalsku, Itálii.

B. tabaci je široce polyfágní savý škůdce. Její hostitelské spektrum zahrnuje více než 500 druhů rostlin ze 74 čeledí. Upřednostňuje hostitelské rostliny z čeledí *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae* a *Malvaceae*. Hostitelská rezistence nebyla prokázána. V současnosti se zahraniční šlechtitelé zabývají šlechtěním rezistentních odrůd vůči geminivirům, které *B. tabaci* přenáší. U mnoha hostitelských druhů byla při ovipozici (kladení vajíček) zjištěna určitá preference odrůd v závislosti na typu listů. Např. u sóji a bavlníku samičky preferují odrůdy s ochlupenými listy. U brukvovitých rostlin zase samičky upřednostňují odrůdy s listy lesklými a s tenčí voskovou vrstvou.

Na rostlinách škodí dospělci a nymfy sáním, následnou produkcí medovice a přenosem rostlinných virů. Listy poškozené sáním se vyznačují různým stupněm chlorózy. Později se u rostlin projevuje zakrslost, usychání a defoliace. Medovice znečišťují povrch listů a plodů a jsou živným médiem pro saprofytické černě. Černě porůstají velké asimilační plochy listů, tím snižují fotosyntézu a snižují tak požadovanou kvalitu produktů (Březíková, Červená 2005).

Nepříznivou vlastností *B. tabaci* je její schopnost přenášet asi 60 rostlinných virů napadajících kulturní rostliny (Hnízdil 1994). Rostlinné viry přenášené *B. tabaci* náleží do pěti taxonomických skupin (rody Begomovirus, Carlavirus, Closterovirus, Crinivirus, Ipomovirus). Z ekonomického hlediska jsou nejvýznamnější skupinou viry z rodu Begomovirus. Tyto viry přenáší *B. tabaci* perzistentně, cirkulativně a napropagativním způsobem. To znamená, že vektor si zanechává schopnost přenosu viru po celý život, přičemž virus cirkuluje celým tělem vektora a nemnoží se v něm (Hejsek 1999).

B. tabaci prodělavá tři vývojová stádia – vajíčko, čtyři nymfální instary, dospělec. Vývoj z vajíčka po dospělce trvá v závislosti na teplotě 17 – 65 dní.

Samičky kladou vajíčka na spodní stranu listů v počtu 50-400 kusů (průměr je 160 vajíček) ve tvaru celého nebo částečného kroužku. Za pět až sedm dní se z vajíček líhnou nymfy prvního instaru. Vývoj jednotlivých nymfálních stupňů probíhá v rozmezí jeden až čtyři dny (první instar), pět až osm dní (druhý až třetí instar) a šest až deset dní (čtvrtý instar). Dospělci žijí 10-15 dní při optimální teplotě prostředí. Při nižší teplotě a bez hostitele je imago schopno přežít i několik týdnů.

Vajíčko je oválného tvaru, o velikosti 0,2 x 0,1 mm, na bázi hruškovitě rozšířené s krátkou stopkou. Čerstvě nakladená vajíčka jsou bělavě žlutá, později tmavnou do světle vínové barvy (nikdy ne tak tmavá jako u *T. vaporariorum*). Nymfy prvního instaru (crawler) jsou oválné, ploché o velikosti 0,27 x 14 mm. Jsou pohyblivé. Mají dobře vyvinuté tři páry končetin, krátká tříčlanková tykadla, červené oči. Nymfy druhého až čtvrtého instaru jsou sedetěrní (přisedlé). Mají zakrnělé končetiny i tykadla, nefunkční oči. Vylučují voskové výpotky, které slouží k pevnému přilnutí k povrchu listu. Jsou ploché, oválné, krémově nažloutlé až nazelenalé barvy. Jednotlivé vývojové stupně se kromě velikosti výrazněji neodlišují (0,37 – 0,66 mm). Nymfa čtvrtého instaru je plochá, její dorsální část se postupně vyklenuje a dorůstá do pozdního čtvrtého instaru, který již nepřijímá potravu a je velikosti 0,87 x 0,63 mm. V této fázi se postupně nymfa metamorfozuje v imago. Pozdní čtvrtý instar, tzv. puparium (red-eyed nymphal instar) má krémově žluté zbarvení, více konvexní tvar, výrazně červené oči a přes voskovou vrstvu puparia lze zřetelně vidět prosvítajícího dospělce.

Morfologická stavba puparia (zejména počet a délka dorsálních štětín, velikost puparia, zbarvení a tvar těla) je značně variabilní v závislosti na typu listového povrchu hostitele. Puparia přisedlá na hladkém listovém povrchu mají menší nebo žádný počet kratších trnů na dorsální straně, zatímco při výskytu na drsném ochlupeném listovém povrchu mají vyvinuty dlouhé hřbetní trny (Březíková, Červená 2005).

Imago představuje okřídleného dospělého, který se líně šterbinou ve tvaru písmene T (Vet *et al.* 1980, Bartoš a kol. 1990, Landa 1994). Po vylíhnutí setrvávají prázdné exuvie spolu s živými puparií na listech a mohou dobře posloužit k determinaci. Tělo imaga má žluté zbarvení, dva páry blanitých křídel, které jsou pokryté vrstvou bílých voskových šupinek. Rozpětí křídel je 1,8 – 2,1 mm a v klidu jsou střechovitě složená. Tykadla mají sedm článků.

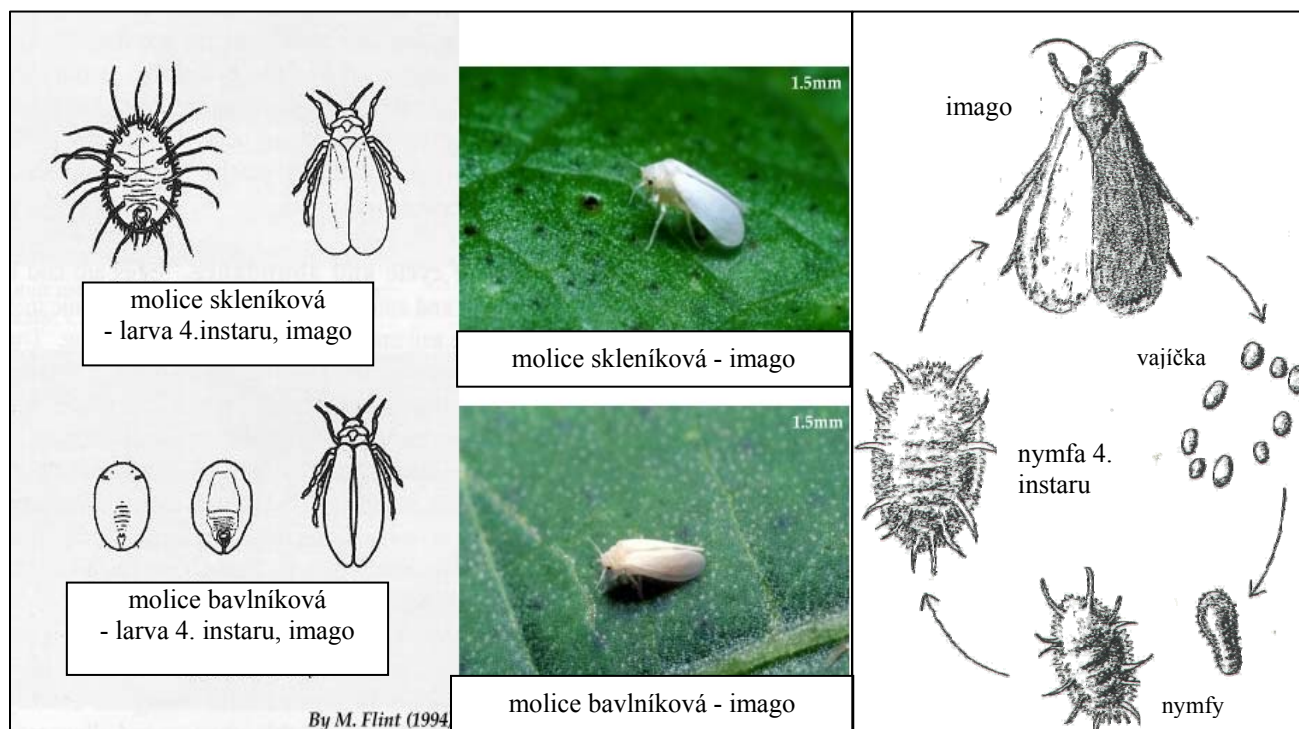
Vývoj z vajíčka po dospělého trvá v závislosti na teplotě 17 –65 dní. Ideální teplota pro vývoj *B. tabaci* je 27 °C. Spodní hraniční teplota je 11°C a horní 33°C. Ve skleníkových podmínkách je *B. tabaci* schopna vyprodukovat až 14 generací za rok (Jayma, Roland 2007).

Tabulka 4: Základní bionomické charakteristiky vybraných druhů molíc (upraveno podle Byrne, Bellows 1991)

Druh	Oblast	Generací za rok	Vývoj 1 generace (dní)	Délka života imág (dní)	Vajíčka/1 samičku	Vývoj od vajíčka po dospělého (dní)
<i>B. tabaci</i>	Arizona	14	12-32	10-15	50-400	17-65
<i>T.vaporariorum</i>	skleníky*	7- 15	21-30	9-15	5-319	22-93

*platí obecně pro všechny oblasti, ve kterých je využíváno pěstování rostlin ve sklenicích nebo foliových krytech

Obrázek 2: Vývojová stádia molíc (Anone, 2002; Moschetti 2003)



2.3.4 Diagnostika molice bavlníkové *Bemisia tabaci* a *Trialeurodes vaporariorum*

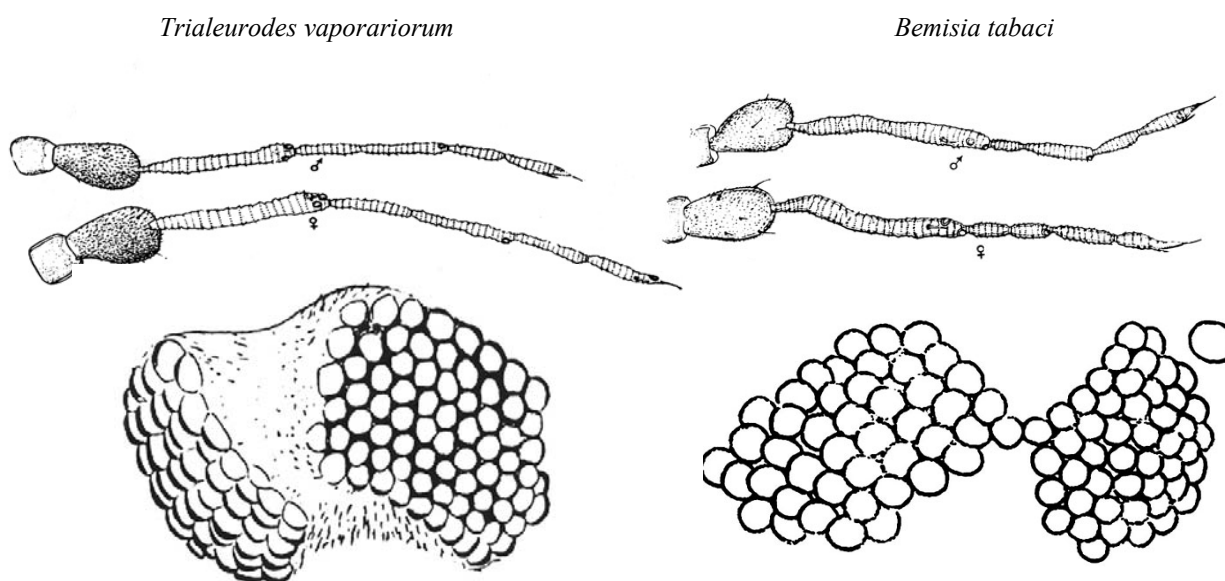
Všechna vývojová stádia *B. tabaci* (molice bavlníková) lze pomocí lupy morfologicky rozlišit od *T. vaporariorum* (molice skleníková). Puparium *B. tabaci* je plošší, má aerodynamický tvar (kopíruje list), jeho okraj svírá s listem ostrý úhel (naproti tomu puparium *T. vaporariorum* je více vyklenuté, z profilu má tvar „krabičky sardinek“, okraj vůči rovině listu je kolmý, viz obrázek 3).

Spolehlivá determinace se provádí nejčastěji na základě vnějších morfologických charakteristik nymf čtvrtého instaru a imag. Důležitými rozlišovacími znaky čtvrtého larválního stupně jsou tvar a zbarvení těla, přítomnost a počet hřbetních set, přítomnost submarginálních papil, složení a tvar análního aparátu. Dospělci se liší velikostí, skládáním a žilnatinou křídel. Využívá se zejména determinačních znaků na hlavě, končetinách a zadečku (Březíková, Červená 2005, viz obrázek 4).

Obrázek 3: Puparia *Trialeurodes vaporariorum* a *Bemisia tabaci*



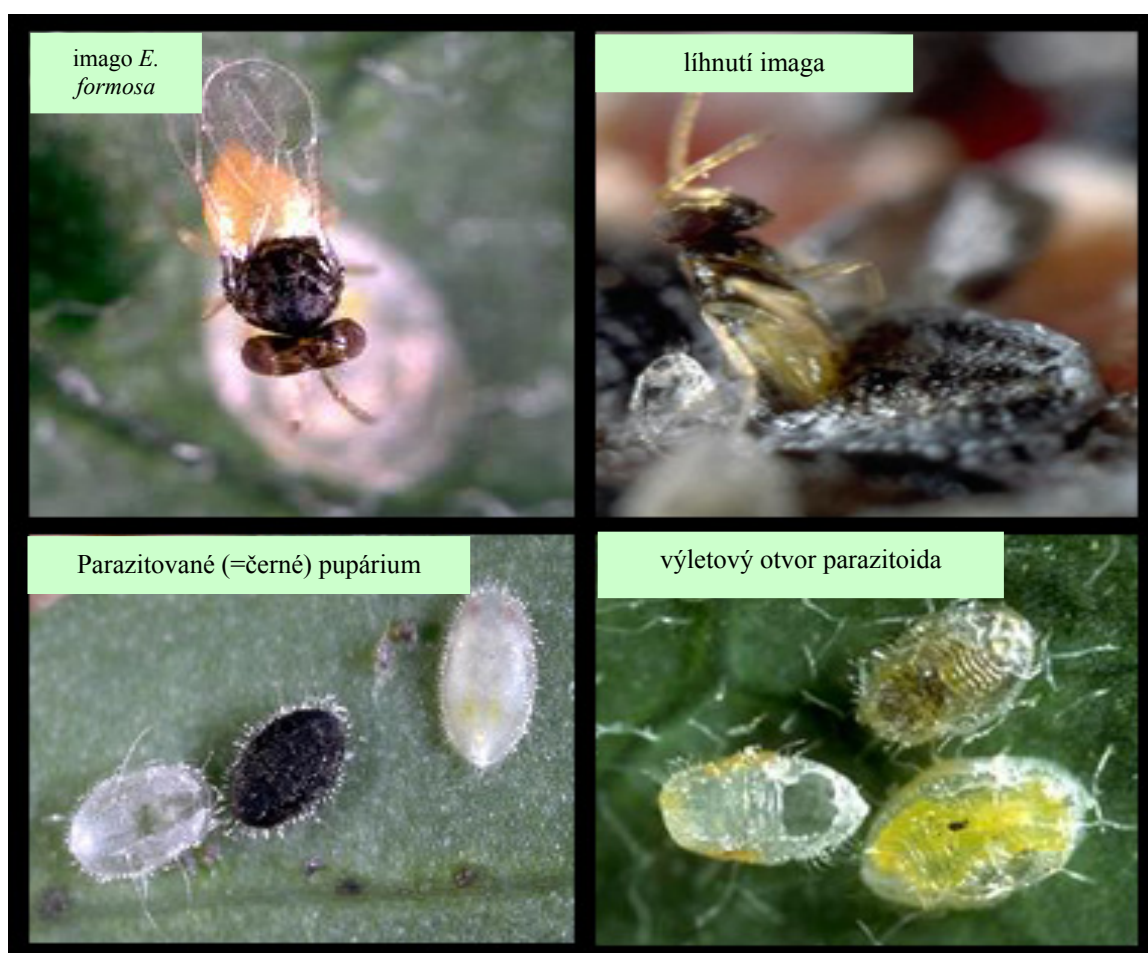
Obrázek 4: Rozlišovací znaky (tykadla, oči) *Trialeurodes vaporariorum* a *Bemisia tabaci*



2.3.5 Biologická ochrana proti molícím

Biologická ochrana proti molícím je možná několika způsoby. První z nich je pomocí parazitických vosiček (*Hymenoptera, Aphelinidae*), zejména druhy patřící do rodů *Encarsia* FOERSTER, *Eretmocerus* ASHMEAD. Z hlediska praktické ochrany rostlin je nejvýznamnějším druhem parazitoid *Encarsia formosa* Gahan (Bartoš a kol. 1990). Tato parazitická vosička pravděpodobně pochází ze stejných oblastí jako molice, proto je její vývojový cyklus dokonale přizpůsoben tomuto hostiteli. Samička vyhledává larvální stádia (preferuje třetí a časně čtvrté) molice, do kterých klade po jednom vajíčku. V těle molice pak probíhá vývoj až do stádia dospělého (Obrázek 5). Rozvoj tohoto parazitoida je závislý na věku hostitele a teplotě (optimum 23 °C) (Malais a Ravensberg 1991 podle Hryzová 1997).

Obrázek 5: Průběh parazitace molice parazitoidem *Encarsia formosa* (Regents 2000)



Další možností biologické ochrany jsou entomopatogenní houby. Entomopatogenní houby tvoří výlučnou, nicméně druhově velmi diverzní skupinu patogenů molice. Výlučnost této asociace je dána jak uniformní a konzervativní morfologií a bionomií molice, tak i odlišnostmi v epidemiologických cyklech jednotlivých skupin entomopatogenních mikroorganismů. Entomopatogenní houby jako jediné patogenní mikroorganismy (s výjimkou parazitických hád'átek, která však reprezentují odlišnou ekologickou niku) pronikají do těla hostitelů aktivně přes kutikulu. Výlučnost této formy primární kolonizace hostitele získává na významu v souvislosti se způsobem příjmu potravy hostitelem. Molice přijímají potravu pomocí bodavě savého ústního ústrojí přímo z pletiv listů, což de facto znemožňuje jejich infekci entomopatogenními viry a bakteriemi, u kterých převažuje perorální forma pronikání do hostitele. Kromě toho podporuje výlučnou asociaci hub s molicemi i produkce medovice, která sama o sobě slouží jako plnohodnotné živné médium a většina entomopatogenních deuteromycet, které se na molicích vyskytují, se může vyvíjet i na samotné medovici. Tento saprofytický způsob projevu entomopatogenních hub zvyšuje možnost primárního uchycení se hub v areálu shodném s výskytem populací molice. V mnoha případech byla v mrtvých larvách a dospělých molice zjištěna přítomnost bakterií, ale v žádném z případů nebyl prokázán přímý patogenní vztah vůči hostiteli (Fransen 1990).

Doposud bylo zaznamenáno 26 rodů hub, z nichž 8 bylo prokazatelně vázáno na molice na úrovni primárních patogenů. V ostatních případech nebyla patogenita spolehlivě prokázána (nález na mrtvém hostiteli). Sortiment entomopatogenních hub molice je nutné rozdělit na dvě skupiny. Prvou skupinu tvoří úzce specializované houby patřící do rodu *Aschersonia*. Druhá skupina pak zahrnuje všechny ostatní druhy/rody hub, jejichž výskyt byl doposud na molicích zaznamenán. Toto dělení nemá jiný než praktický účel a je použito s cílem zdůraznit význam unikátní asociace mezi molicemi a přísně selektivními entomopatogenními houbami z rodu *Aschersonia*. Stručný přehled zástupců obou skupin je uveden v následující tabulce 5.

Tabulka 5: Příklady druhů entomopatogenních hub zjištěných na molicích (Fransen 1990)

Rod / druh patogena	Rod / druh hostitele
<i>Acremonium sp.</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
<i>Aegeria webberi</i>	<i>Dialeurodes citri</i> , <i>D. citrifolii</i> <i>Aleurocanthus spiniferus</i> , <i>A. woglumi</i>
<i>Aphanocladium album</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Beauveria bassiana</i> (*)	<i>T. vaporariorum</i> , <i>D. citri</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Aleurodicus cocois</i>
<i>Cladosporium aphidis</i>	<i>Aleurochiton aceris</i>
<i>Erynia radicans</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
<i>Fusarium scripi</i> (<i>F. aleyrodis</i>)	<i>Dialeurodes sp.</i>
<i>Fusarium verticilloides</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Microcera sp.</i> (? <i>Fusarium</i>)	<i>D. citrifolii</i> , <i>D. citri</i>
<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	<i>D. citri</i>
<i>Paecilomyces farinosus</i> (*)	<i>B. tabaci</i>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (*)	<i>T. vaporariorum</i> , <i>B. tabaci</i>
<i>Sporotrichum sp.</i> (? <i>Beauveria</i>)	<i>D. citri</i>
<i>Trichothecium roseum</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Lecanicillium fusisporum</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Lecanicillium lecanii</i> (*)	<i>D. citri</i> , <i>B. tabaci</i> , <i>T. vaporariorum</i>

(*) - druhy hub, které již byly použity k cílené biologické ochraně proti molicím

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Druhy entomopatogenních hub používaných v pokusech

Pro účely pokusů byly používány kmeny z mykologické sbírky katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích. Všechny druhy/kmeny hub v této sbírce byly dlouhodobě uchovávány ve formě suchých alginátových pelet s biomasou partikulárního kmene zmrazené při teplotě -20 až -24 °C.

Druh patogena	Označení ve sbírce	Původ	Rok izolace
<i>Aschersonia aleyrodis</i>	Aal - NEW	Pístina	2001
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba 01	USA	2006
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba - Pk PŮV	Penčín (Přerov)	2005
<i>Beauveria brongniartii</i>	Bbr - M 092	USA	2006
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR 97 2B	Šumava	2006
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Lle - I 9	USA	2006

Při této formulaci je biomasa patogena (ať již konidie, mycelium, nebo blastospory získané submerzní kultivací) inkorporována spolu s aditivy do alginátových pelet. Alginátové pelety se získávají tak, že se připraví základní směs biomasy patogena s inertním nebo nutritivním aditivem, do kterého se přidá Na – alginát (sodná sůl kyseliny albinové). Směs s Na – alginátem se postupně nakapává do roztoku chloridu vápenatého, kde se tvoří kuličky, které se nechají vytvrdit po dobu 1 – 2 hodin. Vytvrzené „alginátové pelety“ umožňují dlouhodobé uchování kmenů hub v mykologických sbírkách.

Aktivace pelet jednotlivých kmenů byla prováděna v Petriho misce na povrchu 2% vodního agaru. Pelety exponované vysoké vlhkosti poutají vodu (bobtnají) a po 5-7 dnech jsou k dispozici konidie na povrchu zaktivizovaných pelet. Konidie získané z vysporulovaných pelet byly použity pro inokulaci na povrch standardních živných médií PDA (Potato Dextrose Agar) nebo SDA (Sabouraud Dextrose Aga), připravených ze standardních polotovarů fi. HIMEDIA. Vysterilizované médium bylo rozlito do sterilních plastických Petriho misek (průměr 90 mm). Po vychladnutí média byly na povrch inokulovány houby ve formě separačních čar. Petriho misky byly po inokulaci uloženy do termostatu, který byl temperován na 25 °C ± 1°C. Houby byly kultivovány po dobu 7-14 dnů. Čisté kultury testovaných hub byly následně použity k pokusům.

3.2 Postup přípravy konidiové suspenze

U přípravy konidiové suspenze byl ve všech případech použit stejný standardní postup.

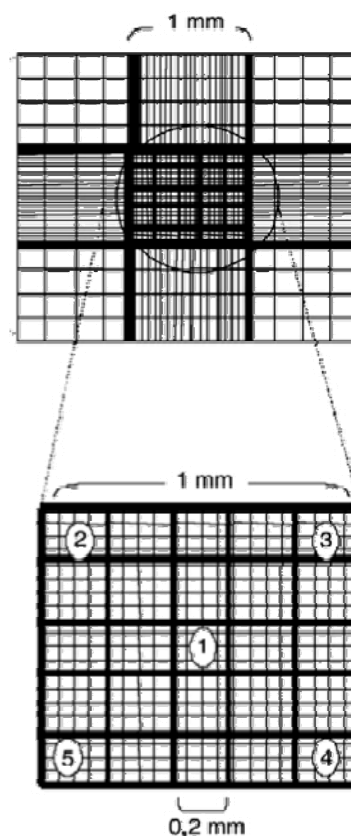
Povrch testované kultury jednotlivých kmenů hub byl přelit sterilním roztokem destilované vody s přídavkem detergentu 0,05% Tween 80 a pomocí sterilního inokulačního očka byla z povrchu kultur na PDA plotnách (petriho miska) smyta základní suspenze masy konidií.

Primární suspenze byla přelita do sterilní zkumavky a homogenizována třepáním na automatické laboratorní třepačce (Vertex). Po homogenizaci byl odebrán vzorek, u kterého byl pomocí standardní počítací komůrky (Neubauerova počítací komůrka, viz obrázek 6) stanoven základní titr (počet konidií v 1ml) nejčastěji $1,00 \times 10^7$ konidií v 1 ml suspenze.

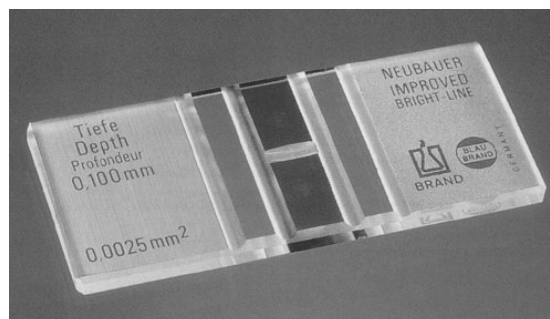
Tento postup byl použit při přípravě suspenze konidií pro účely *in vivo* a *in vitro* biotestů.

Obrázek 6: Neubauerova počítací komůrka

a) počítací pole konidií



b) celkový pohled



3.3 Populace molic používaných v pokusech

Molice bavlníková (*Bemisia tabaci*), molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum*)

V pokusech byly používány populace udržované pomocí kontinuálního chovu na různých hostitelských rostlinách, převážně okurce seté (*Cucumis sativus*), fazolu obecném (*Phaseolus vulgaris*) a ibišku (*Hibiscus rosa sinensis*).

Původní populace molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) byla v roce 1998 získána z produkčního chovu firmy Biocontrol Vodňany (Ing. J. Plíva). Populace molice bavlníkové (*Bemisia tabaci*) byla získána ze SZeŠ Mělník na rostlinách ibišku (*Hibiscus rosa-sinensis*). Z těchto zdrojů byly populace molic v případě potřeby i doplňovány. Chov molic je udržován v klimatizovaných místnostech KRV ZF JU ($24\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperioda 16/8).

3.4 Hostitelské rostliny používané v pokusech

V pokusech na molici skleníkovou byly použity rostliny fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*, různé odrůdy) a okurky seté (*Cucumis sativus*) kultivaru Superstar F₁ (SEMO Smržice, ČR, nemořená semena). Chov molice bavlníkové byl udržován na rostlinách poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), ibišku (*Hibiscus rosa-sinensis*) a okurky seté (*Cucumis sativus*). Semena okurky a fazolu byla předklíčována na vlhké buničité vatě v uzavřené plastické nádobě. Předklíčená semena byla přesázena do květníků (průměr 90mm) se substrátem. Ve stádiu děložních lístků byl rostlinám odstraněn vegetační vrchol. Rostliny byly pěstovány v klimatizované místnosti při teplotě 21°C a fotoperiodě 12/12.

3.5 *In vitro* testy

Hodnocení kvality konidiové suspenze

Standardní laboratorní test – GI (Germination Index, index klíčivosti). Cílem tohoto testu je zjistit procento klíčivosti a stupeň naklíčení příslušné populace konidií testovaných kmenů. Konidiová suspenze byla laboratorní kličkou nanášena ve formě kapek na povrch tenké vrstvy 2% vodního agaru, který byl nanášen na podložní sklíčko. Po zaschnutí kapek bylo sklíčko vloženo do vlhké komůrky (Petriho miska s vlhkým filtračním papírem na dně). Misky v plastickém sáčku byly uloženy do termostatu (teplota $25^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$). Hodnocení bylo prováděno pomocí světelného mikroskopu.

Hodnoceno bylo 100 konidií ve vzorku, přičemž ke každé konidii byl přiřazen příslušný index (0 až 3, v intervalu 0,5), který specifikuje stupeň naklíčení a vývoj patogena (Tabulka 6).

Z takto vyhodnoceného vzorku byl vypočítán průměrný index klíčivosti se směrodatnou odchylkou a následně procento klíčivosti (Hornák 1998). Vyhodnocováno bylo po 24, 48 a 72 hodinách.

Tabulka 6: Indexová stupnice na hodnocení klíčivosti konidiové suspenze (podle Bohatá 2005)

G _{INDEX}	Charakteristika
0	na konidiích nejsou zřejmé žádné morfologické změny
0,5	konidie jsou zřetelně protáhlejší, nabobtnalé; na konidii je zřetelný jednostranný klíček velikosti v poměru přibližně 1:0,5 k matečné konidii
1,0	velikost klíčku na konidii je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie
1,5	primární klíček je 2-3x delší než matečné konidie; na matečné konidii jsou zřejmé 2 kratší klíčky
2,0	klíček je více než 3x tak dlouhý jako matečné konidie; sekundární větvení na jednom z klíčků; na matečné konidii jsou dva dlouhé klíčky
2,5	počátek sporulace (hodnoceno v několika částech zorného pole, sporadický výskyt struktur spojených se sporulací)
3,0	plná sporulace (hodnoceno v několika částech zorného pole, pravidelný výskyt struktur spojených se sporulací)

3.6 *In vivo* biotesty

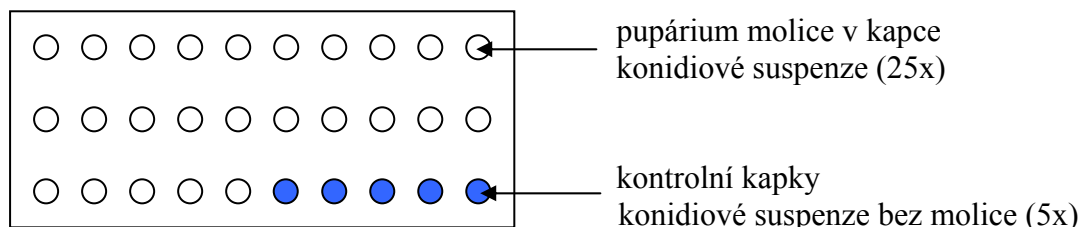
Biotest na nymfách 4. instaru molice skleníkové a bavlníkové (FDI test)

Nymfy molice 4. instaru se exponovaly testovanému vzorku patogena v podmínkách sterilní vlhké komůrky a následně byl průběžně vyhodnocován průběh vývoje patogena pomocí indexové stupnice charakterizující klíčové fáze vývoje entomopatogenních hub obecně.

Při tomto biotestu byly nymfy molice odebrány speciálně upravenou jehlou z povrchu spodní strany listů rostlin (okurka, fazol), přeneseny do kapky suspenze konidií (adjustované převážně na titer $1,00 \times 10^7$ spor/ml) na sterilním podložním sklíčku. Na každé sklíčko bylo umístěno 30 kapek (3 řady po 10 kapkách) a do 25 kapek byla umístěna vždy 1 nymfa molice (5 kapek zůstalo prázdných, sloužících jako kontrola na zachycení nežádoucích kontaminací, viz obrázek 7). Sklíčka s nymfami v kapkách byly uzavřeny do vlhké komůrky (Petriho miska s vlhkým filtračním papírem na dně) a celý komplet byl uložen do termostatu ($25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$).

V pravidelných intervalech (každých 24 hodin) byla sklíčka vyjmuta z vlhkých komůrek a každé pupárium individuálně vyhodnoceno pod světelným mikroskopem.

Obrázek 7: Podložní sklíčko s kapkami konidiové suspenze



Vývoj uvedených druhů entomopatogenních hub byl vyhodnocován ve 24 hodinových intervalech po dobu 3 dnů. Pro hodnocení byla využita speciálně navržená indexová stupnice (Landa *et al.* 1994, viz tabulka 7). Při hodnocení byl každé nymfě v jedné interakční zóně přidělen jeden příslušný index a průběh vývoje patogena na hostiteli byl vyhodnocován formou denních průměrných indexů vývoje (FDG index \pm SEM).

Tabulka 7: Indexová stupnice charakterizující klíčové fáze vývoje entomopatogenních hub na molicích

Fáze vývoje	FDG _{INDEX}	Charakteristika
Dormantní konidie (konidie bez zjevných změn)	0,0	- na konidiích nejsou zřejmé žádné morfologické změny; konidie ve vzorku mají uniformní tvar
Aktivizace konidií (patogen není přímo asociován s hostitelem)	0,5	- na konidiích v interakční zóně kapky jsou zřetelné změny (velikost, tvar...); v hodnocené populaci jsou přítomny naklíčené konidie, klíček je drobný, jednostranný, velikostí nepřesahuje velikost matečné konidie
	1,0	- průměrná velikost klíčku konidií klíčících v interakční zóně dosahuje velikosti matečné konidie
Tvorba mycelia (parazitická fáze vývojového cyklu)	1,5	- na povrchu nymf jsou přítomna hyfová vlákna, která jsou prokazatelně v přímém kontaktu s tělem hostitele
	2,0	- nymfa je porostlá hustým myceliem
Sporulace (saprofytická fáze vývojového cyklu)	2,5	- na myceliu jsou zjištěny morfologické struktury související s počátkem sporulace
	3,0	- na myceliu jsou zjištěny morfologické struktury související s plnou sporulací

Standardní laboratorní biotest v kompletním systému „rostlina – škůdce – patogen“

(Ponořovací metoda)

Pro hodnocení virulence vybraných druhů a kmenů entomopatogenních hub byl použit standardní laboratorní biotest využívající populaci molice skleníkové a bavlníkové v pozdních vývojových stádiích (L4). Oba druhy molic byly získány z udržovacího chovu KRV ZF JU. Pro přípravu populací molic byly používány rostliny okurky seté nebo fazolu obecného. Předpěstované rostliny byly na dobu 16–24 hodin umístěny do izolátorů, ve kterých byl udržovací chov molice skleníkové nebo bavlníkové. Po této expozici byly pomocí exhaustoru z povrchu rostlin odebráni dospělci a rostliny s vajíčky na listech byly přemístěny do nových prázdných izolátorů. V dalším průběhu byly na rostlinách se synchronizovanou populací molic ponechávány buď pouze děložní listy (fazol) nebo 2 pravé listy (okurka) a ostatní listy byly průběžně odstraňovány. Pro biotesty byly použity rostliny s molicemi ve vývojové fázi, která byla předem naplánována (např. ve fázi vajíček, L1-L3, nebo L4). V biotestech byly houby aplikovány namáčením rostlin do suspenze konidií adjustovaných na standardní titr $1,0 \times 10^7$ konidií/1 ml. Po namočení byly rostliny ponechány v laboratorním flow boxu do oschnutí a následně byly umístěny do izolátorů uzavřených PVC poklopem. Izolátory byly po celou dobu testu umístěny do klimatizované místnosti. Byla u nich udržována stálá vlhkost a popřípadě zaštipovány nově se tvořící listy rostlin. Pokusy byly vyhodnocovány 7.den po aplikaci patogena.

Při hodnocení byly listy z rostlin odstřiženy, nastříhány na krátké proužky a vyrovnány na plastickou podložku. Proužky ze všech listů každé z variant byly individuálně vyhodnoceny pomocí binokulárního mikroskopu. Každé z vyhodnocených larev byla přiřazena kategorie: a) živá, b) mrtvá, c) infikovaná, případně i d) vylíhlá. U vajíček se hodnotila kategorie a) živá, b) infikovaná.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

POKUS 1: Základní vývojové a růstové charakteristiky entomopatogenních hub *Pecilomyces fumosoroseus* 97 2B, *Beauveria brongniartii* M 092, *Beauveria bassiana* Pk PŮV, *Lecanicillium lecanii* I9

Základní údaje k pokusu:

- houby byly kultivovány na 14 dní na PDA jako celoplošná kultura
- konidie smyty přelitím kultur 0,05 % Tween 80 a základní suspenze byla adjustována na tít 1,0x10⁷ v ml
- připraveno podložní sklíčko s vrstvou 2% agaru na povrchu a na něj byla nanesena suspenze konidií ve formě kapek
- po zaschnutí suspenze byla sklíčka přemístěna do vlhké komůrky (Petriho miska s navlhčeným papírem), v plastickém sáčku vložena do termostatu ($\pm 25\text{ C}^\circ$)
- preparáty byly v pravidelných intervalech vyhodnocovány (24, 48 a 72 hod.)
- bylo hodnoceno 100 konidií ve vzorku a ke každé přiřazen příslušný index klíčivosti (viz metodika 3.5: Tabulka 6)
- z vyhodnoceného vzorku byl vypočítán průměrný index klíčivosti se směrodatnou odchylkou a procento naklíčených konidií (Tabulka 8 a-d)

Tabulka 8a: *Beauveria bassiana* Pk PŮV

GI po 24 hod.									
1,5	2	1,5	2	2	1,5	2	1,5	2	2
2	1,5	1,5	2	2	1,5	2	1,5	1,5	2
1,5	1	2	1,5	2	2	1,5	2	1,5	2
2	2	1	1,5	2	1,5	2	2	1,5	2
2	1	1,5	1,5	2	2	2	2	1,5	1,5
2	1,5	1,5	2	2	2	2	2	1	2
2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	1
2	2	1,5	2	2	2	1	2	1	2
1,5	2	1	1,5	1	2	1,5	2	2	2
1	2	1,5	2	1	2	1,5	2	2	2

Procento naklíčení: 100%

Průměrný index naklíčení: 1,73±0,34

Po 48 hod.: průměrný index naklíčení 3

Tabulka 8b: *Lecanicillium lecanii* I9

GI po 24 hod.										
2	2	2	2	2	2	2	1,5	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,5
2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	1,5	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1,5	1,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	1,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,5

Procento naklíčení: 100%

Průměrný index naklíčení: 1,96±0,14

Po 48 hod.: průměrný index naklíčení 2,5

Po 72 hod.: průměrný index naklíčení 3

Tabulka 8c: *Beauveria brongniartii* M 092

GI po 24 hod.										
1	1	1,5	1	1	0,5	1	0,5	1	1	1
1	1	1,5	0,5	0,5	1	1	0,5	1	1	1
0,5	1	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	1
1	1	1	1,5	0,5	0,5	1	1	1,5	1,5	0,5
0,5	1	1	1,5	0,5	0,5	1	1	1	1	0,5
1	1,5	1	1	1	0,5	0,5	1,5	1	1	1
0,5	1,5	0,5	1	1	1	1	1,5	0,5	0,5	0,5
1	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	0,5	0,5	1
1	0,5	1	1	1	1,5	1,5	1	0,5	0,5	0,5
1	0,5	1,5	1,5	0,5	1,5	1	1	1	1	0,5

Procento naklíčení: 100%;

Průměrný index naklíčení: 0,9±0,33

Po 48 hod.: průměrný index naklíčení 2,5

Po 72 hod.: průměrný index naklíčení 3

Tabulka 8d: *Paecilomyces fumosoroseus* 97 2B

GI po 24 hod.										
2	2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	1,5	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	1,5	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	1,5	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2

Procento naklíčení: 100%

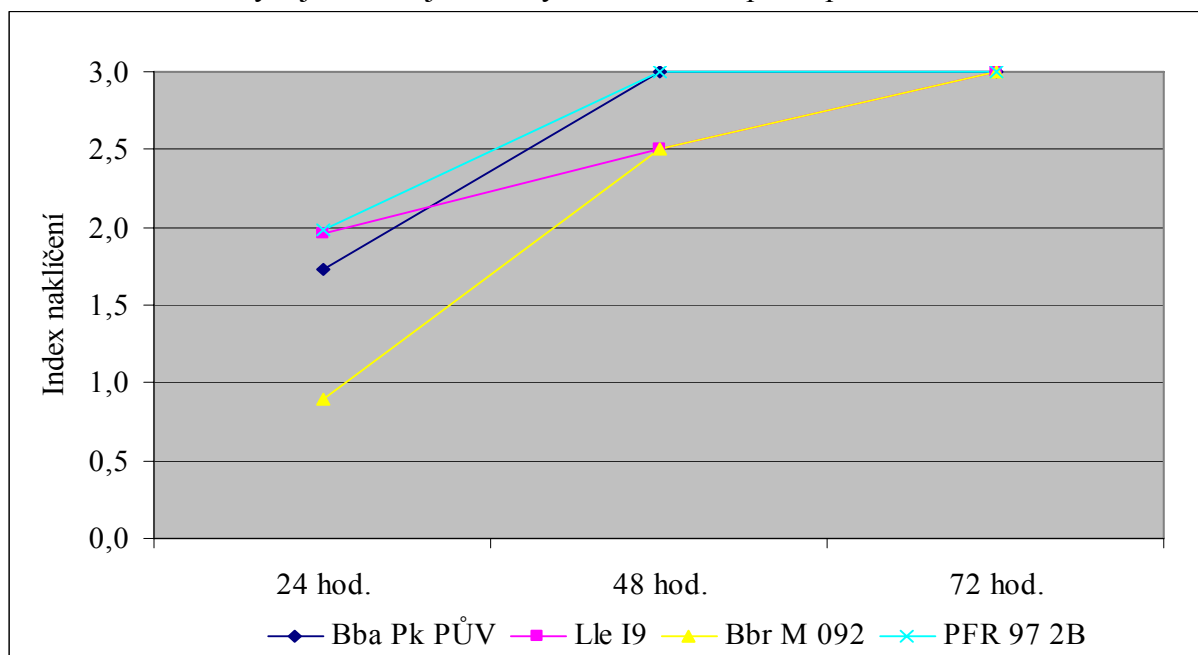
Průměrný index naklíčení: 1,98±0,1

Po 48 hod.: průměrný index naklíčení 3

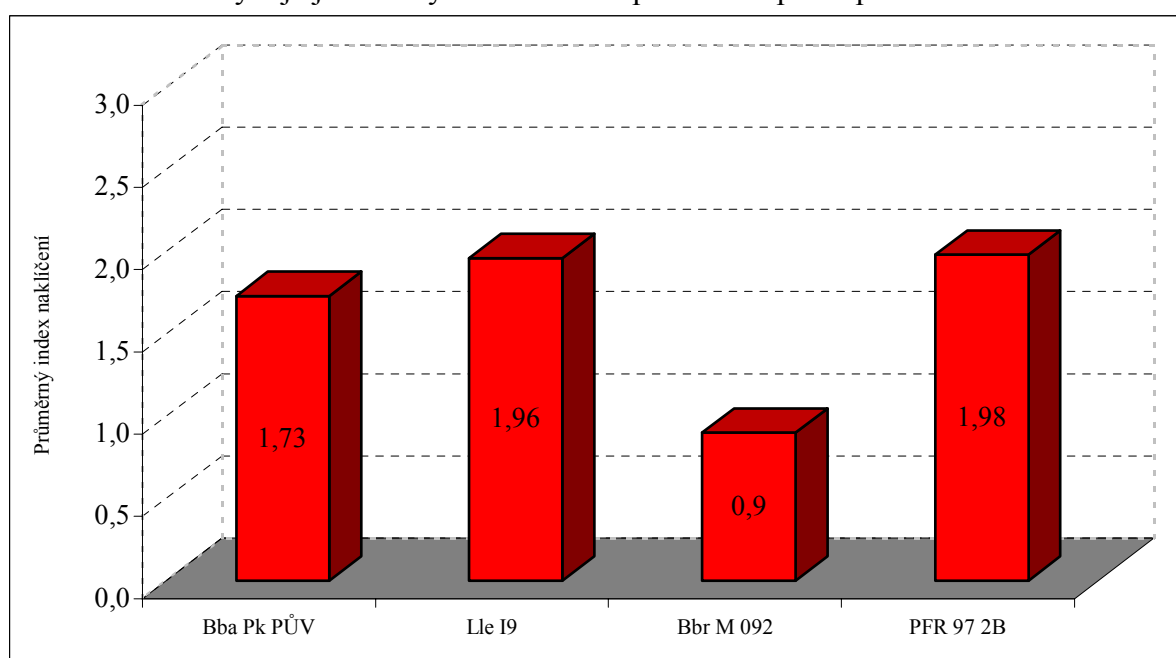
Tabulka 9: Porovnání průměrných hodnot GI jednotlivých kmenů hub

Kmen patogena	GI - 24 hod.	GI - 48 hod.	GI - 72 hod.
Bba Pk PŮV	1,73	3,00	3,00
Lle I9	1,96	2,50	3,00
Bbr M 092	0,90	2,50	3,00
PFR 97 2B	1,98	3,00	3,00

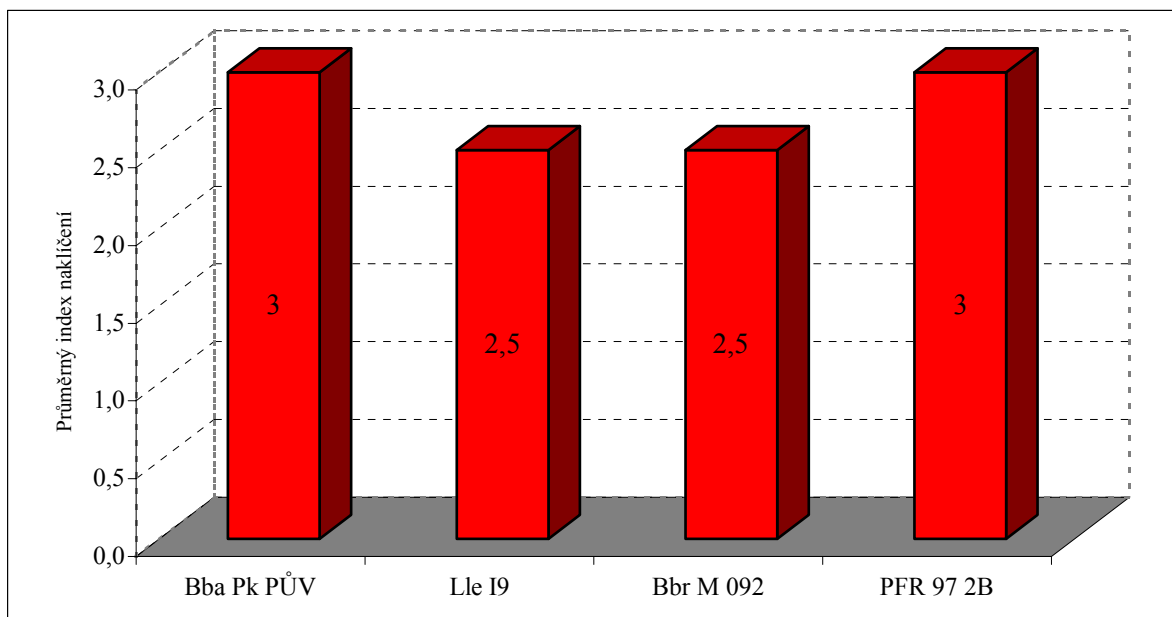
Graf 1: Porovnání vývoje a růstu jednotlivých kmenů hub podle průměrného GI



Graf 2: Intenzita vývoje jednotlivých kmenů hub po 24 hod. podle průměrného GI



Graf 3: Intenzita vývoje jednotlivých kmenů hub po 48 hod. podle průměrného GI



Zhodnocení pokusu :

Z grafu 1 a 2 je patrné, že nejrychlejší počáteční vývoj byl zaznamenán u houby *Paecilomyces fumosoroseus* 97 2B, za 24 hod. dosahoval průměrný index naklíčení hodnoty 1,98 a trend rychlého růstu setrval, už po druhém hodnocení (48 hod.) průměrný index vývoje dosahoval nejvyšší možné hodnoty 3,0 (plná sporulace)(Graf 3). Druhou nejrychleji se vyvíjející houbou v pokusu byla houba *Lecanicillium lecanii* kmen I9, po 24 hodinách dosahoval průměrný index naklíčení 1,96, oproti PFR 97 2B byl však po 48 hodinách průměrný index naklíčení pouze 2,5 (přítomnost konidioforů, počátek sporulace). Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* Pk PŮV dosahovala po 24 hodinách průměrný GI 1,73 a po 48 hodinách už 3 (Graf 3). Nejpomalejší počáteční vývoj byl vyzorován u houby *Beauveria brongniartii* M092, po 24 hodinách byl průměrný GI pouze 0,9 (velikost klíčku na konidii je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie), avšak už po 48 hodinách se vývojem vyrovnala houbě Lle I9.

U všech testovaných hub bylo už po prvních 24 hodinách 100% konidií klíčivých a plné sporulace u všech kmenů hub bylo dosaženo po 72 hodinách (Tabulka 9).

* * *

POKUS 2: Účinnost vybraných kmenů hub *P. fumosoroseus* 97 2B, *B. bassiana* 01, *L. lecanii* I9, *B. brongniartii* M 092 v laboratorním biotestu na nymfách 4. instaru molice bavlníkové *B. tabaci* (FDI test)

Základní údaje k pokusu:

- nymfy molice pozdního 4. instaru (L4) byly odebrány speciálně upravenou jehlou z povrchu spodní strany listů rostlin (okurka, fazol) a přeneseny do kapky suspenze konidií (adjustované převážně na titer $1,00 \times 10^7 / \text{ml}$) na sterilním podložním sklíčku
- na každé sklíčko bylo umístěno 30 kapek (3 řady po 10 kapkách) a do 25 kapek byla umístěna vždy 1 nymfa molice (5 kapek zůstalo prázdných sloužících jako kontrola)(viz obrázek 7)
- sklíčka s nymfami v kapkách byla uzavřena do vlhké komůrky (Petriho miska s vlhkým filtračním papírem na dně) a celý komplet byl uložen do termostatu ($25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$)
- v pravidelných intervalech (každých 24 hodin) byly všechny nymfy vyhodnocovány a byl k nim přidělen příslušný $\text{FDG}_{\text{INDEX}}$
- pro lepší přehlednost jsou všechna originální data uvedena v tabulce 10 a) - b)

Tabulka 10 a: Průběh vývoje entomopatogenních hub *Beauveria brongniartii* a *Beauveria bassiana* na nymfách 4. instaru molice bavlníkové *B. tabaci* (standardní laboratorní biotest – FDGi)

<i>Beauveria brongniartii</i> M 092				<i>Beauveria bassiana</i> 01			
nymfa číslo	FDG _{INDEX}			nymfa číslo	FDG _{INDEX}		
	24 hod	48 hod	72 hod		24 hod	48 hod	72 hod
1	0	0,5	1	1	0	0,5	1,5
2	0	1	2	2	0,5	1,5	2,5
3	0,5	1	1,5	3	0	1	2
4	0,5	1,5	1,5	4	0	1	1,5
5	0,5	1	1	5	0	1,5	2,5
6	1	1,5	1,5	6	0	1,5	1,5
7	0	1	1,5	7	0	1	1,5
8	0	0,5	1,5	8	0	1,5	1,5
9	1,5	2	2	9	0	1,5	1,5
10	1	1,5	1,5	10	0	2	3
11	1,5	2	2	11	0	1,5	1,5
12	0,5	1	2	12	0	1,5	2
13	1	1,5	2,5	13	0,5	1,5	2
14	0,5	1	2	14	0	1,5	1,5
15	0,5	1,5	1,5	15	0,5	2	2
16	1,5	1,5	1,5	16	0	1	1,5
17	0,5	1	1,5	17	0	1,5	1,5
18	1,5	1,5	2	18	0	1	1,5
19	1,5	2,5	2,5	19	0,5	1,5	1,5
20	1	1,5	2	20	0	1	2
21	1	1,5	2	21	0	1,5	1,5
22	0,5	1,5	1,5	22	0	1	2
23	1,5	1,5	2	23	0	1,5	2
24	1,5	2	2	24	0	1	1,5
25	0,5	1,5	2	25	0	1,5	1,5
ØFDGI	0,8	1,38	1,76	ØFDGI	0,08	1,34	1,78
±STDV	±0,54	±0,46	±0,39	±STDV	±0,18	±0,35	±0,41

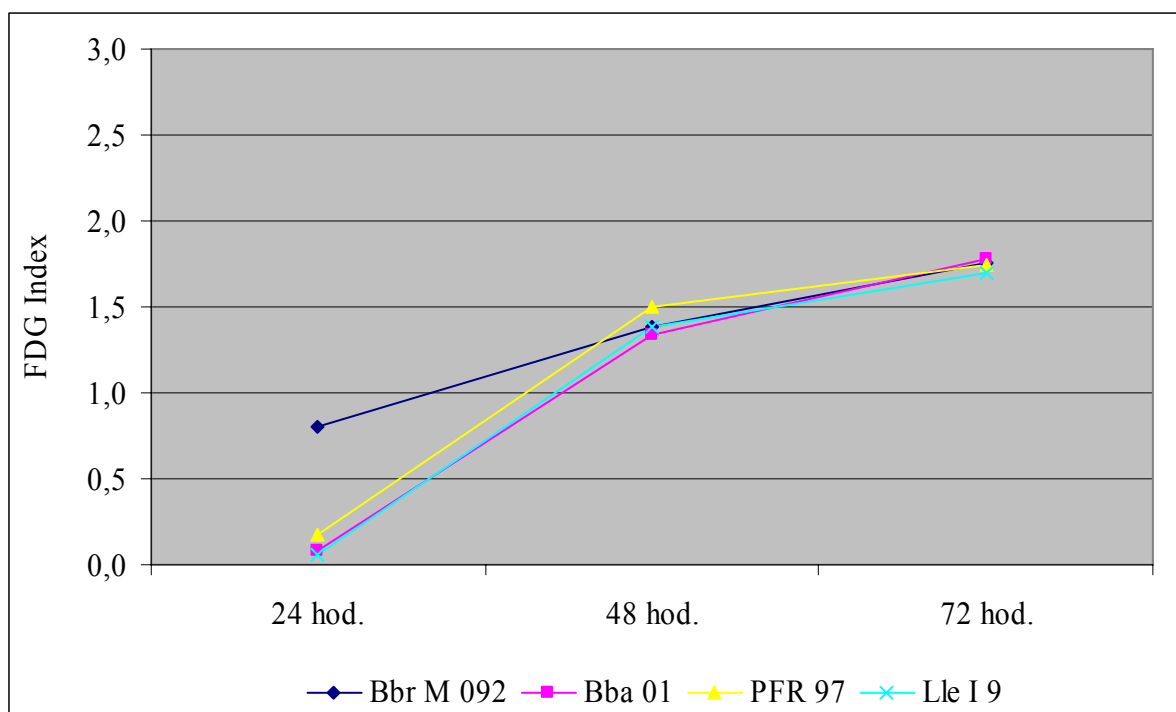
Tabulka 10 b: Průběh vývoje entomopatogenních hub *Paecilomyces fumosoroseus* a *Lecanicillium lecanii* na nymfách 4. instaru molice bavlníkové *B. tabaci* (standardní laboratorní biotest – FDGi)

<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> PFR 97				<i>Lecanicillium lecanii</i> I9			
nymfa číslo	FDG _{INDEX}			nymfa číslo	FDG _{INDEX}		
	24 hod	48 hod	72 hod		24 hod	48 hod	72 hod
1	0	1,5	1,5	1	0	1	2
2	0	1,5	1,5	2	0	1,5	2,5
3	0	1,5	1,5	3	0	1,5	1,5
4	0,5	1,5	1,5	4	0	1	1,5
5	0	1,5	1,5	5	0	1,5	2
6	0	1,5	1,5	6	0	1	1,5
7	0	1	1,5	7	0	1	1,5
8	0	1,5	1,5	8	0	1,5	1,5
9	0,5	1,5	1,5	9	0	1,5	2
10	0	1,5	1,5	10	0	1,5	2
11	0,5	1,5	1,5	11	0	1,5	1,5
12	0	1,5	1,5	12	0	1,5	1,5
13	0,5	2	3	13	0,5	1,5	2
14	0	1,5	1,5	14	0	1,5	1,5
15	0,5	1,5	1,5	15	0	1,5	1,5
16	0	1,5	1,5	16	0,5	1,5	2
17	0	1,5	3	17	0,5	1,5	1,5
18	0,5	1,5	3	18	0	1,5	1,5
19	0,5	1,5	3	19	0	1	1,5
20	0,5	1,5	1,5	20	0	1,5	1,5
21	0	1,5	1,5	21	0	1,5	2
22	0,5	1,5	1,5	22	0	1,5	1,5
23	0	1,5	1,5	23	0	1,5	2
24	0	1,5	1,5	24	0	1	1,5
25	0	1,5	1,5	25	0	1,5	1,5
ØFDGI	0,18	1,5	1,74	ØFDGI	0,06	1,38	1,7
±STDV	±0,24	±0,14	±0,56	±STDV	±0,17	±0,22	±0,29

Tabulka 11: Průměrné FDG_{INDEX} jednotlivých druhů hub zaznamenané pomocí standardního laboratorního biotestu na nymfách 4. instaru molice bavlníkové

Druh patogena	Průměrný FDG_{INDEX}		
	24 hod.	48 hod.	72 hod.
<i>B. brongniartii</i> M 092	0,80	1,38	1,76
<i>B. bassiana</i> 01	0,08	1,34	1,78
<i>P. fumosoroseus</i> 97	0,18	1,50	1,74
<i>L. lecanii</i> I 9	0,06	1,38	1,70

Graf 4: Porovnání účinnosti jednotlivých kmenů hub na vývoj a mortalitu molice bavlníkové



Zhodnocení pokusu:

Z grafu 4 je patrné, že počáteční nejrychlejší vývoj houby v interakční zóně molice bavlníkové byl zaznamenán u houby *B. brongniartii* M 092, kdy se průměrný FDG_{INDEX} vyrovnal hodnotě 0,8 (průměrná velikost klíčku konidií klíčících v interakční zóně téměř dosahuje velikosti matečné konidie). Zatímco u ostatních kmenů hub se hodnota pohybovala na úrovni 0,06 – 0,18%. Po 48 hodinách však nejvyššího stupně vývoje dosahovala houba *P. fumosoroseus* 97 s indexem 1,5 (na povrchu nymf jsou přítomna hyfová vlákna, která jsou prokazatelně v přímém kontaktu s tělem hostitele = parazitická fáze vývojového cyklu).

Průměrný FDG_{INDEX} se u ostatních hub pohyboval pod hranicí 1,5 (Bba 01 - 1,34, Bbr M092 -1,38, Lle I9 – 1,38). Po třech dnech převýšil u všech hub FDG_{INDEX} 1,7, z čehož lze vyvodit, že všechny kmeny vybraných druhů hub jsou schopny po 72 hodinách infikovat tělo hostitele. Dále bylo zjištěno, že všechny kmeny hub jsou schopny prodělat na hostiteli celý svůj vývoj až do úplné sporulace (saprofytická fáze vývojového cyklu = usmrcení hostitele).

* * *

POKUS 3: Účinnost vybraných kmenů hub *P. fumosoroseus* 97 2B, *B. bassiana* 01, *L. lecanii* I9, *B. brongniartii* M 092 v biotestu na nymfách 4. instaru molice skleníkové (*T. vaporariorum*) (FDI test)

Základní údaje k pokusu:

- nymfy molice pozdního 4. instaru (L4) byly odebrány speciálně upravenou jehlou z povrchu spodní strany listů rostlin (okurka, fazol) a přeneseny do kapky suspenze konidií (adjustované převážně na titer $1,00 \times 10^7$ / ml) na sterilním podložním sklíčku
- na každé sklíčko bylo umístěno 30 kapek (3 řady po 10 kapkách) a do 25 kapek byla umístěna vždy 1 nymfa molice skleníkové (5 kapek zůstalo prázdných, sloužících jako kontrola)
- sklíčka s nymfami v kapkách byla uzavřena do vlhké komůrky (Petriho miska s vlhkým filtračním papírem na dně) a celý komplet byl uložen do termostatu ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- v pravidelných intervalech (každých 24 hodin) byly všechny nymfy vyhodnocovány a byl k nim přidělen příslušný FDG_{INDEX}
- pro lepší přehlednost jsou všechna originální data uvedena v tabulce 12 a) - b)

Tabulka 12 a: Průběh vývoje entomopatogenních hub *Beauveria brongniartii* a *Beauveria bassiana* na nymfách 4. instaru molice skleníkové *T. vaporariorum* (standardní laboratorní biotest – FDGi)

<i>Beauveria brongniartii</i> M 092				<i>Beauveria bassiana</i> 01			
nymfa číslo	FDG _{INDEX}			nymfa číslo	FDG _{INDEX}		
	24 hod	48 hod	72 hod		24 hod	48 hod	72 hod
1	0,5	1,5	2	1	0	0,5	1
2	0	1	1,5	2	0	1	1,5
3	0,5	1,5	2	3	0	1,5	1,5
4	0	1	1,5	4	0	0,5	1
5	1	1,5	2	5	0	1	1,5
6	1,5	1,5	1,5	6	0	1,5	2,5
7	0	1	1,5	7	0	1,5	1,5
8	0,5	1	1,5	8	0	1	1,5
9	1	1	1,5	9	0	1,5	2
10	1	1,5	1,5	10	0	1,5	1,5
11	0,5	1	1,5	11	0	1,5	2
12	0,5	1	2	12	0	1,5	2
13	0,5	1	1,5	13	0	1,5	1,5
14	0	1	1,5	14	0	0,5	1,5
15	0,5	1	1,5	15	0	1,5	2
16	0,5	1	1,5	16	0	1,5	2
17	0,5	1,5	2	17	0	1,5	2
18	1	1,5	2	18	0	1,5	1,5
19	1	1,5	1,5	19	0	2	2,5
20	0	1,5	2	20	0	1,5	1,5
21	0	1,5	1,5	21	0	2	3
22	0	1,5	1,5	22	0,5	1,5	2
23	1	1	1,5	23	0	2,5	2,5
24	0,5	1	1,5	24	0	2	2
25	1	1,5	1,5	25	0	1,5	1,5
ØFDGI	0,54	1,24	1,64	ØFDGI	0,02	1,42	1,8
±STDV	±0,43	±0,25	±0,23	±STDV	±0,1	±0,47	±0,48

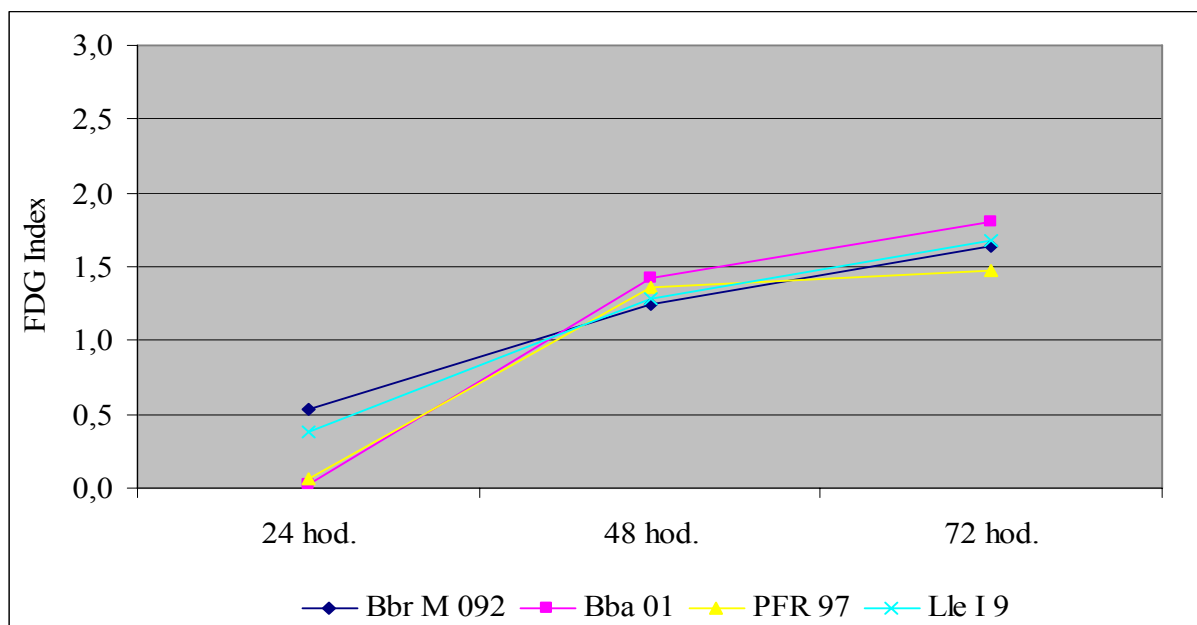
Tabulka 12 b: Průběh vývoje entomopatogenních hub *Paecilomyces fumosoroseus* a *Lecanicillium lecanii* na nymfách 4. instaru molice skleníkové *T. vaporariorum* (standardní laboratorní biotest – FDGi)

<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> PFR 97				<i>Lecanicillium lecanii</i> I9			
nymfa číslo	FDG _{INDEX}			nymfa číslo	FDG _{INDEX}		
	24 hod	48 hod	72 hod		24 hod	48 hod	72 hod
1	0	0,5	1	1	0,5	1	1,5
2	0	1	1,5	2	0	1	1,5
3	0	1,5	2	3	0,5	1	1,5
4	0	1,5	1,5	4	0	1	1,5
5	0	1	1,5	5	0	1	1,5
6	0,5	1,5	1,5	6	0,5	1,5	2
7	0	1	1,5	7	0	1	1,5
8	0	1	1,5	8	0,5	1,5	2
9	0	1,5	2	9	0,5	1	2
10	0	0,5	1,5	10	0,5	1,5	2,5
11	0	1,5	1,5	11	0,5	1,5	1,5
12	0	1,5	2,5	12	0,5	1,5	1,5
13	0,5	1,5	3	13	0,5	1	1,5
14	0	1,5	1,5	14	0,5	1,5	1,5
15	0	1,5	3	15	0,5	1,5	2
16	0	1,5	3	16	0	1	2,5
17	0	1,5	1,5	17	0,5	1,5	1,5
18	0	2	2,5	18	0,5	1,5	1,5
19	0	1,5	2	19	1	1	1,5
20	0,5	1,5	1,5	20	0	1	1,5
21	0	1,5	2	21	0,5	1,5	1,5
22	0	1,5	1,5	22	0	1,5	1,5
23	0	1,5	1,5	23	1	1,5	1,5
24	0	1,5	1,5	24	0	1,5	1,5
25	0	1,5	2	25	0,5	1,5	2
ØFDGI	0,06	1,36	1,84	ØFDGI	0,38	1,28	1,68
±STDV	±0,17	±0,34	±0,55	±STDV	±0,3	±0,25	±0,32

Tabulka 13: Průměrné FDG_{INDEXY} jednotlivých druhů hub zaznamenané pomocí standardního laboratorního biotestu na nymfách 4. instaru molice skleníkové *T. vaporariorum*

Druh patogena	Průměrný FDG_{INDEX}		
	24 hod.	48 hod.	72 hod.
<i>B. brongniartii</i> M 092	0,54	1,24	1,64
<i>B. bassiana</i> 01	0,02	1,42	1,80
<i>P. fumosoroseus</i> 97	0,06	1,36	1,48
<i>L. lecanii</i> I 9	0,38	1,28	1,68

Graf 5: Porovnání účinnosti jednotlivých kmenů hub na vývoj a mortalitu molice skleníkové *T. vaporariorum*



Zhodnocení pokusu:

Z grafu je patrné, že počáteční nejrychlejší vývoj houby v interakční zóně molice skleníkové byl zaznamenán u houby *B. brongniartii* M092, kdy se průměrný FDG_{INDEX} vyrovnal hodnotě 0,54 (přítomny naklíčené konidie, klíček je drobný, jednostranný).

Po 48 hodinách se stupeň vývoje u všech hub vyrovnal hodnotě FDG_{INDEXU} 1,24 – 1,42 (nástup parazitické fáze vývoje). Po 72 hodinách vykazovala nejvyššího stupně vývoje houba *B. bassiana* 01 (FDG_{INDEXU} 1,8 = parazitická fáze vývoje), ale i v případě ostatních hub vývoj dosáhl hranice FDG_{INDEXU} 1,5, což naznačuje, že všechny kmeny vybraných druhů hub jsou schopny po 72 hodinách infikovat tělo hostitele.

Dále bylo zjištěno, že všechny houby jsou schopny prodělat na hostiteli celý svůj vývoj až do úplné sporulace (saprofytická fáze vývojového cyklu = usmrcení hostitele).

* * *

POKUS 4: Porovnání účinnosti entomopatogenních hub *P. fumosoroseus* 97 2B, *B. bassiana* Pk PŮV, *L. lecanii* I9, *B. brongniartii* M 092 a *A. aleyrodis* NEW po aplikaci na populaci molice bavlníkové (*B. tabaci*) synchronizovanou na stádium vývoje L4 (ponožovací metoda)

Základní údaje k pokusu:

- vybrané kmeny entomopatogenních hub byly 14 dní kultivovány na PDA jako celoplošná kultura
- předpěstované rostliny okurky byly na dobu 16–24 hodin umístěny do monofilových izolátorů, ve kterých byl udržovací chov molice bavlníkové
- pokusné rostliny, kterým byly ponechány 2 pravé listy, byly namáčeny do suspenze konidií adjustované na titer $1,0 \times 10^7$ v 1 ml
- rostliny byly následně vloženy po dvou do izolátorů uzavřených PVC poklopem a umístěny do klimatizované místnosti
- pokusy byly jednorázově vyhodnoceny 7.den po aplikaci patogena, ke každému jedinci byla přiřazena kategorie: a)živá, b)vylíhlá, c)infikovaná, d)mrtvá

Tabulka 14: Stav synchronizované populace L4 *B. tabaci* 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií vybraných kmenů entomopatogenních hub.

Patogen	mrtvé		infikované		živé		vylíhlé		L4 celkem	mortalita	živé celkem
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%			
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> 97 2B	5	0,3	1479	95	63	4,0	11	0,70	1558	95,30	4,70
<i>B. bassiana</i> Pk PŮV	2	0,2	790	88	103	11,5	3	0,30	898	88,20	11,80
<i>Lecanicillium lecanii</i> I9	0	0	1229	98	15	1,20	11	0,90	1255	97,90	2,10
<i>Beauveria brongniartii</i> M 092	196	21	546	59	167	18,0	13	1,40	922	80,50	19,50
<i>A. aleyrodis</i> NEW	246	51	71	15	155	32,0	7	1,50	479	66,20	33,80
Kontrola	22	1,4	0	0	1581	97,0	25	0,00	1628	1,40	98,60

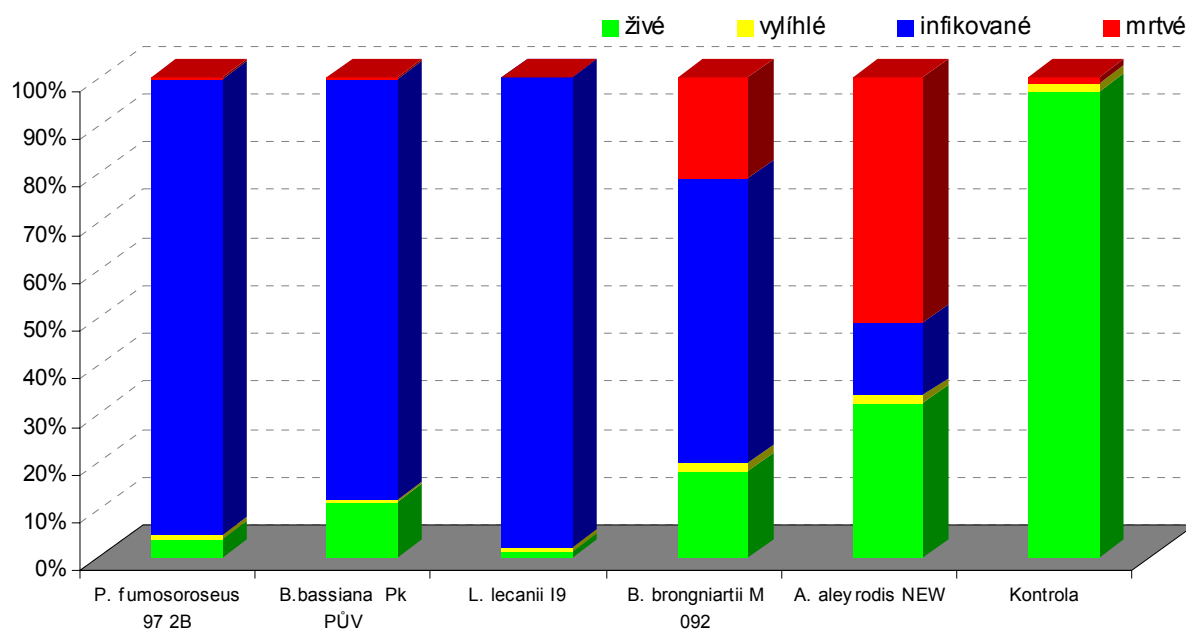
Tabulka 15: Struktura populace *Bemisia tabaci* na listech okurky 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií vybraných kmenů entomopatogenních hub (údaje v %)

Druh patogena	živé	vylíhlé	infikované	mrtvé	mortalita celkem*	živé celkem**
<i>P. fumosoroseus</i> 97 2B	4,00	0,70	95,00	0,32	95,30	4,70
<i>B. bassiana</i> Pk PŮV	11,50	0,33	88,00	0,22	88,20	11,80
<i>L. lecanii</i> I9	1,20	0,90	98,00	0,00	97,90	2,10
<i>B. brongniartii</i> M 092	18,00	1,40	59,00	21,00	80,50	19,50
<i>A. aleyrodinis</i> NEW	32,00	1,50	15,00	51,00	66,20	33,80
Kontrola	97,00	1,50	0,00	1,40	1,40	98,60

* mortalita celkem = kumulovaná mortalita (infikované + mrtvé)

** živé celkem = živé + vylíhlé

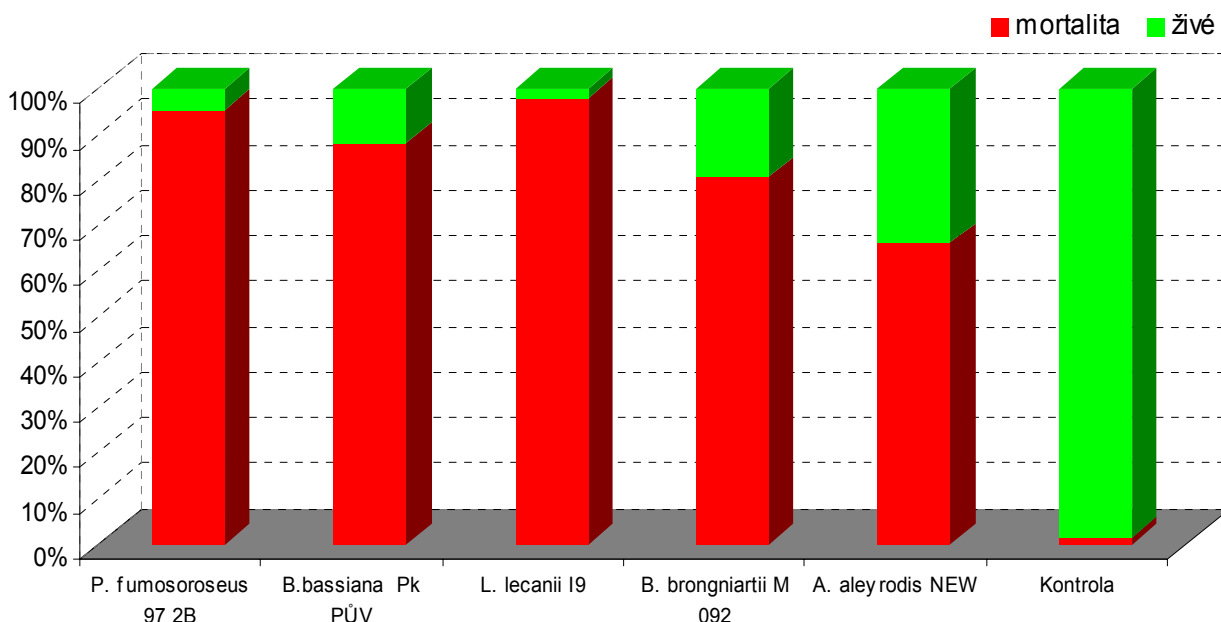
Graf 6: Porovnání účinnosti vybraných kmenů entomopatogenních hub na složení populace molice bavlníkové (*B. tabaci*) synchronizované na pozdní stádium vývoje L4 v biotestu „rostlina-škůdce-patogen“



Tabulka 16: Souhrnné porovnání virulence vybraných kmenů hub v systému „rostlina-škůdce-patogen“ na rostlinách okurky

Druh patogena	L4 celkem	mortalita %	živé %
<i>P. fumosoroseus</i> 97 2B	1558	95,30	4,70
<i>B. bassiana</i> Pk PŮV	898	88,20	11,80
<i>L. lecanii</i> I9	1255	97,90	2,10
<i>B. brongniartii</i> M 092	922	80,50	19,50
<i>A. aleyrodinis</i> NEW	479	66,20	33,80
Kontrola	1628	1,40	98,60

Graf 7: Kumulovaná mortalita indukovaná aplikací vybraných kmenů entomopatogenních hub na populaci molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* synchronizovanou na stádium L4.



Zhodnocení pokusu:

Na listech okurky (ošetřených suspenzí konidií o titru $1,00 \times 10^7$ v 1 ml) byly zaznamenány jak larvy zjevně infikované či morfologicky pozměněné (mrtvá), tak i zdravé L4 a prázdná puparia (vylíhlá). V celkovém hodnocení živé a vylíhlé/mrtvé a infikované (viz Graf 5) dosáhla nejvyšší účinnosti houba *L. lecanii* I9. Tento kmen vyvolal celkovou mortalitu 97,9%, přičemž v rámci kumulované mortality (mrtvé + infikované) dominovala mortalita prokazatelně indukovaná patogenem, tj. kategorie *infikované* (z celkem 1 255 jedinců L4 *B. tabaci* bylo 1 229 infikovaných a pouze 15 živých a 11 vylíhlých). Druhým nejúčinnějším kmenem byl kmen PFR 97 2B houby *P. fumosoroseus*, který vyvolal kumulovanou mortalitu na úrovni 95,3%, přičemž opět téměř výlučně v kategorii *infikované*.

V případě houby *B.bassiana* kmen Pk PŮV dosáhla mortalita 88,2%, u *B. brongniartii* M 092 byla zaznamenána mortalita 80,5%. Nejnižší účinnost na synchronizovanou populaci larvám L4 vykazala houba *A. aleyrodis* kmen NEW – 66,2%. Po 7 dnech vyhodnocení tvořilo u houby *A. aleyrodis* NEW z celkové populace 51% uhynulých jedinců, zatímco u ostatních hub byl vyšší podíl jedinců infikovaných (PFR 97 2B 95%, Lle I9 98%, Bbr M 092 59%, Bba Pk PŮV 88%). V populaci molice, vyvíjejících se na neošetřených rostlinách, nebylo při porovnání hodnot mortality 7. den zaznamenáno průkazné navýšení a přirozená mortalita nepřesáhla 1,4%.

* * *

POKUS 5: Účinnost houby *A. aleyrodis* kmen Aal-NEW na L4 synchronizovanou populaci molice bavlníkové (verifikace standardního biotestu)

Základní údaje k pokusu:

- vybraný kmen entomopatogenní houby *Aschersonia aleyrodis* kmen Aal-NEW byl 14 dní kultivován na PDA jako celoplošná kultura
- předpěstované rostliny okurky byly na dobu 16–24 hodin umístěny do monofilových izolátorů, ve kterých byl udržovací chov molice bavlníkové
- 2 pokusné rostliny, kterým byly ponechány pouze 2 pravé listy, byly namáčeny do suspenze pykno spor Aal NEW adjustované na titer $1,0 \times 10^7$ v 1 ml
- rostliny byly následně vloženy do izolátoru uzavřeného PVC poklopem a na 7 dní umístěny do klimatizované místnosti
- obě rostliny byly zvlášť vyhodnoceny a ke každému jedinci byla přiřazena kategorie: a)živá, b)vylíhlá, c)infikovaná, d)mrtvá

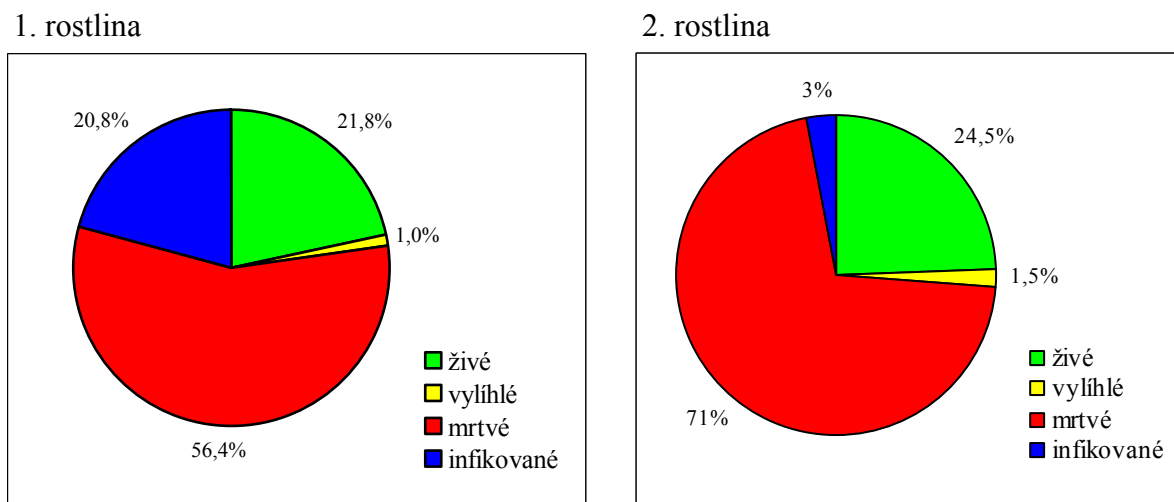
Tabulka 17: Struktura synchronizované populace L4 *B. tabaci* 7. den po aplikaci suspenze pykno spor houby *A. aleyrodis* kmen NEW

		mrtvé		infikované		vylíhlé		živé		živé celkem**	mortalita celkem*
		počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
<i>Aschersonia aleyrodis</i> NEW	1 R	165	56,4	60	20,8	3	1,0	63	21,8	291	77,0
	2 R	246	71,0	12	3,0	4	1,5	83	24,5	345	75,0

* mortalita celkem = kumulovaná mortalita (infikované + mrtvé)

** živé celkem = živé + vylíhlé

Graf 8: Porovnání struktury synchronizované populace L4 *B. tabaci* 7. den po ošetření suspenzí pykno spor houby *Aschersonia aleyrodis* kmen NEW



Zhodnocení pokusu:

Účelem bylo posoudit vypovídací schopnost pokusu, v němž byla aplikována houba za stejných podmínek (stejný titr, stejná rostlina, stejná teplota a vlhkost, stejný čas) na dvě rostliny. Každá rostlina byla zvlášť vyhodnocena podle složení populace jedinců s přiřazenou kategorií mrtvá, infikovaná, živá, vylíhlá. U obou rostlin ošetřených suspenzí houby *A. aleyrodis* kmen Aal-NEW bylo největší zastoupení kategorie mrtvých jedinců.

V případě 1. rostliny 56,4% u 2. rostliny 71%. V případě 1. rostliny však bylo na úkor nižšího procenta uhynulých vyšší procento infikovaných jedinců a pak se celková mortalita na ní zjištěná (77%) vyrovnala mortalitě na rostlině druhé (75%). V populaci molic vyvíjejících se na neošetřených rostlinách nebylo při porovnání hodnot mortality 7. den zaznamenáno průkazné navýšení a přirozená mortalita nepřesáhla 1,4%.

* * *

POKUS 6: Účinnost houby *Lecanicillium lecanii* kmen I9 na L4 synchronizovanou populaci molice bavlníkové (verifikace standardního laboratorního biotestu)

Základní údaje k pokusu:

- vybraný kmen entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii* I9 byl 14 dní kultivován na PDA jako celoplošná kultura
- předpěstované rostliny okurky byly na dobu 16–24 hodin umístěny do monofilových izolátorů, ve kterých byl udržovací chov molice bavlníkové

- po odstranění dospělců molic z rostlin byly rostliny přemístěny do nových izolátorů do doby, než byla na listech zjištěna přítomnost larev 4. instaru.
- 2 pokusné rostliny, kterým byly ponechány pouze 2 pravé listy, byly namáčeny do suspenze konidií Lle I9 adjustované na titer $1,0 \times 10^7$ v 1 ml
- dále viz POKUS 5

Tabulka 18: : Struktura synchronizované populace L4 *B. tabaci* 7. den po aplikaci suspenze konidií houby *Lecanicillium lecanii* kmen I9

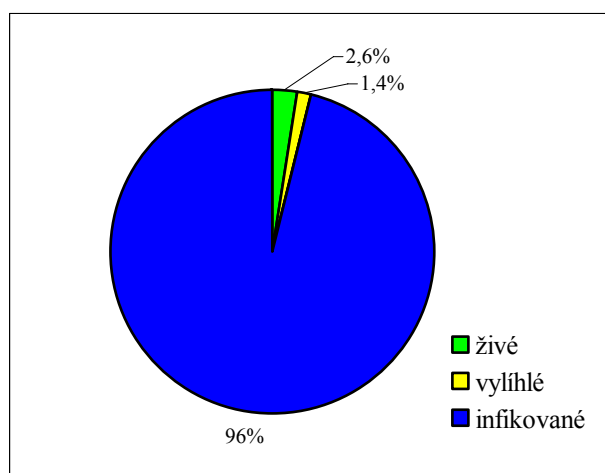
		mrtvé		infikované		živé		vylíhlé		živé celkem**	mortalita celkem*
		počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
<i>Lecanicillium lecanii</i> I9	1 R	0	0	453	96,0	12	2,6	4	1,4	469	96,0
	2 R	0	0	776	99,0	2	0,2	7	0,8	785	99,0

* mortalita celkem = kumulovaná mortalita (infikované + mrtvé)

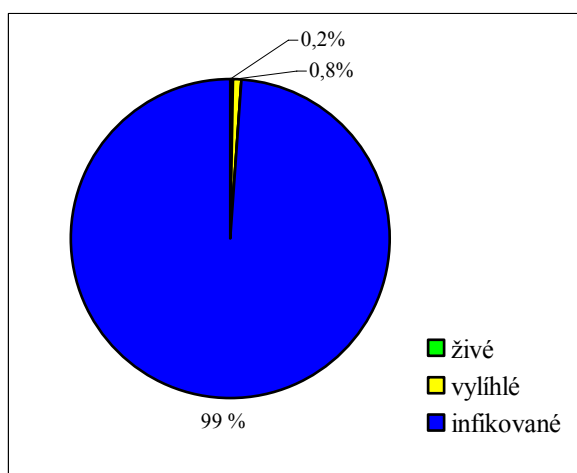
** živé celkem = živé + vylíhlé

Graf 9: Struktura populace molice *Bemisia tabaci* ošetřená houbou *Lecanicillium lecanii* kmen I9 (okurka setá, 7. den po aplikaci)

1. rostlina



2. rostlina



Zhodnocení pokusu:

Účelem bylo posoudit vypovídací schopnost pokusu, v němž byla aplikována houba *L. lecanii* za stejných podmínek (stejný titer, stejná rostlina, stejné teploty a čas) na dvě rostliny. Z grafu 9 lze usoudit, že účinek houby se v obou případech projevil téměř stejně.

U první rostliny mortalita dosáhla 96% a u druhé 99%. Podíl živých a vylíhlých tvořil v prvním případě 4% z celkového počtu a v druhém pouze 1%.

V populaci molic vyvíjejících se na neošetřených rostlinách nebylo při porovnání hodnot mortality 7. den zaznamenáno průkazné navýšení a přirozená mortalita nepřesáhla 1,4%.

POKUS 7: Porovnání účinnosti entomopatogenních hub *P. fumosoroseus* 97 2B, *B. bassiana* Pk PŮV, *L. lecanii* I9, *B. brongniartii* M 092 a *A. aleyrodis* NEW po aplikaci na populaci molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* synchronizovanou na stádium vývoje L4.

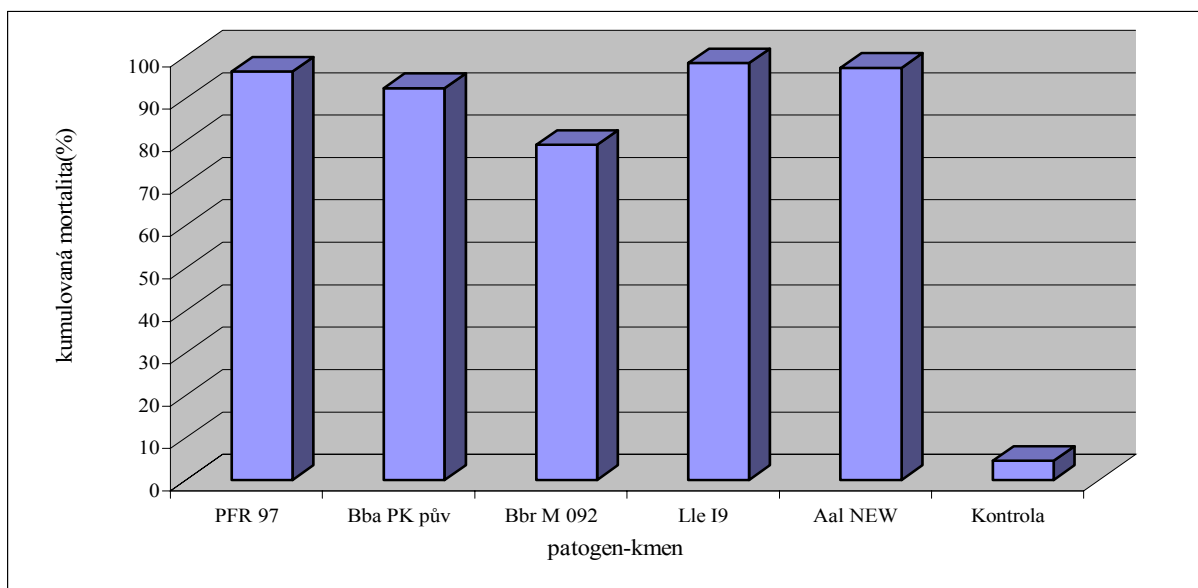
Základní údaje k pokusu:

- vybrané kmeny entomopatogenních hub byly 14 dní kultivovány na PDA jako celoplošná kultura
- předpěstované rostliny okurky byly na dobu 16–24 hodin umístěny do monofilových izolátorů, ve kterých byl udržovací chov molice skleníkové
- po odstranění dospělců molic z rostlin byly rostliny přemístěny do nových izolátorů do doby, než byla na listech zjištěna přítomnost larev 4 instaru
- pokusné rostliny, kterým byly ponechány 2 pravé listy, byly namáčeny do suspenze konidií adjustované na titer $1,0 \times 10^7$ v 1 ml
- rostliny byly následně vloženy po dvou do izolátorů uzavřených PVC poklopem a umístěny do klimatizované místnosti
- pokusy byly jednorázově vyhodnoceny 7.den po aplikaci patogena, ke každému jedinci byla přiřazena kategorie: a)živá, b)vylíhlá, c)infikovaná, d)mrtvá

Tabulka 19: Stav synchronizované populace L4 *T. vaporariorum* 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií vybraných kmenů entomopatogenních hub

Kmen	L4 - celkem		živé		vylíhlé		mrtvé		infikované	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
PFR 97 2B	764	100	14	1,83	14	1,83	22	2,88	714	93,46
Bba-PK	1070	100	32	2,99	49	4,58	78	7,29	911	85,14
Bbr-M092	852	100	86	10,09	93	10,92	65	7,63	608	71,36
Lle-I9	931	100	7	0,75	9	0,97	30	3,22	885	95,06
Aal-New	941	100	21	2,23	5	0,53	103	10,95	812	86,29
Kontrola	994	100	416	41,85	533	53,62	42	4,23	3	0,30

Graf 10: Kumulovaná mortalita indukovaná aplikací vybraných kmenů entomopatogenních hub na populaci molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* synchronizovanou na stádium L4.



Zhodnocení pokusu:

Většina kmenů použitých v pokuse vyvolala mortalitu na úrovni vyšší než 90%, pouze kmen M092 houby *Beauveria brongniartii* vykázal účinnost nižší (79%). Velmi vysokou účinnost vykázaly kmeny NEW *A. aleyrodis*, 97 2B *P. fumosoroseus* a *B. bassiana* kmen PK pův. V kontrolní variantě byl zaznamenán spontánní výskyt houby *Lecanicillium lecanii* I9 na úrovni, která neovlivnila výsledek celého pokusu (3 larvy z 994 – tj. 0.3%).

* * *

POKUS 8: Porovnání účinnosti entomopatogenních hub *P. fumosoroseus* 97 2B, *B. bassiana* Pk PŮV, *L. lecanii* I9, *B. brongniartii* M 092, a *A. aleyrodis* NEW po aplikaci na populace molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* a molice bavlníkové *Bemisia tabaci* synchronizované na stádium vajíčka

Základní údaje k pokusu:

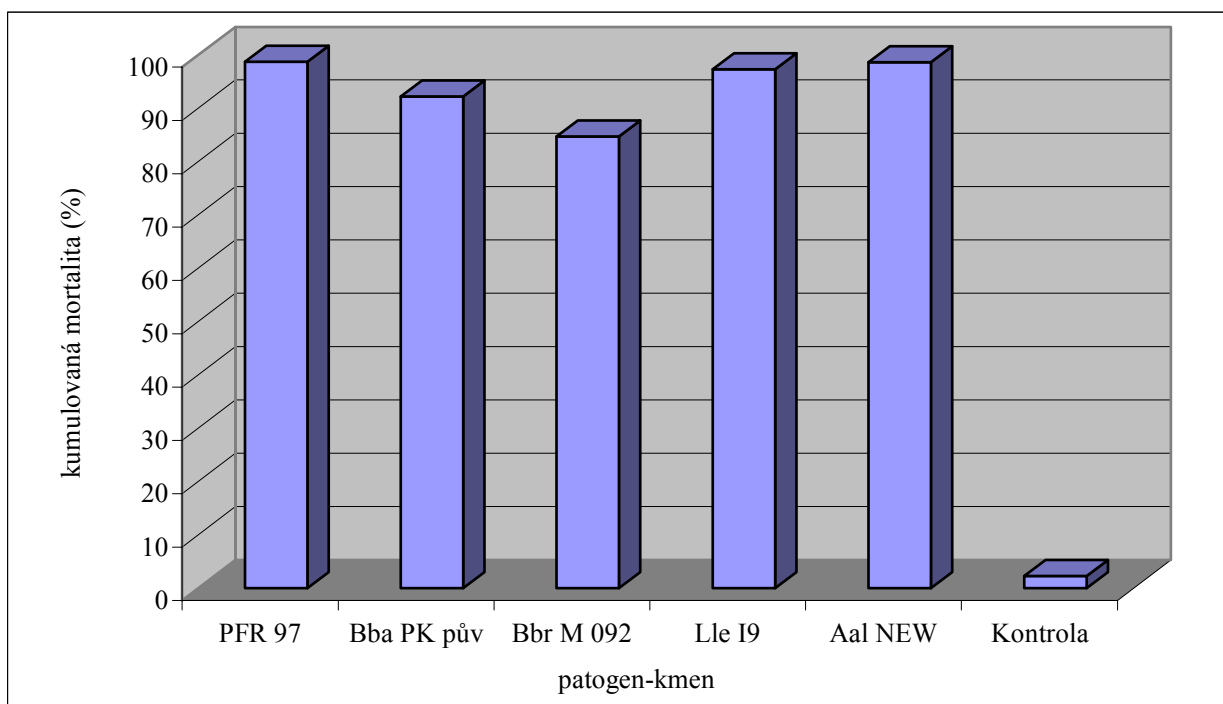
- vybrané kmeny entomopatogenních hub byly 14 dní kultivovány na PDA jako celoplošná kultura
- předpěstované rostliny okurky byly na dobu 16–24 hodin umístěny do monofilových izolátorů, ve kterých byl udržovací chov molice bavlníkové nebo molice skleníkové
- pokusné rostliny, kterým byly ponechány 2 pravé listy, byly namáčeny do suspenze konidií adjustované na titer $1,0 \times 10^7$ v 1 ml ihned po odstranění dospělců z rostlin

- rostliny byly následně vloženy po dvou do izolátorů uzavřených PVC poklopem a umístěny do klimatizované místnosti
- pokusy byly jednorázově vyhodnoceny 7.den po aplikaci patogena, ke každému jedinci (vajíčka, resp. L+-L2) byla přiřazena kategorie: a)živá, b)vylíhlá, c)infikovaná, d)mrtvá

Tabulka 20: Stav populace *T. vaporariorum* synchronizované na stádium vajíčka 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.

Kmen	celkem		vajíčka				L1 - L2					
			živá		infikovaná		živé		mrtvé		infikované	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
PFR 97 2B	683	100	9	1,32	107	15,67	4	0,59	17	2,49	546	79,94
Bba-PK	527	100	41	7,78	9	1,71	33	6,26	39	7,40	405	76,85
Bbr-M092	495	100	76	15,35	8	1,62	42	8,48	52	10,51	317	64,04
Lle-I9	510	100	14	2,75	28	5,49	7	1,37	19	3,73	442	86,67
Aal-New	566	100	8	1,41	0	0,00	6	1,06	54	9,54	498	87,99
Kontrola	480	100	83	17,3	0	0,00	379	78,96	16	3,33	2	0,42

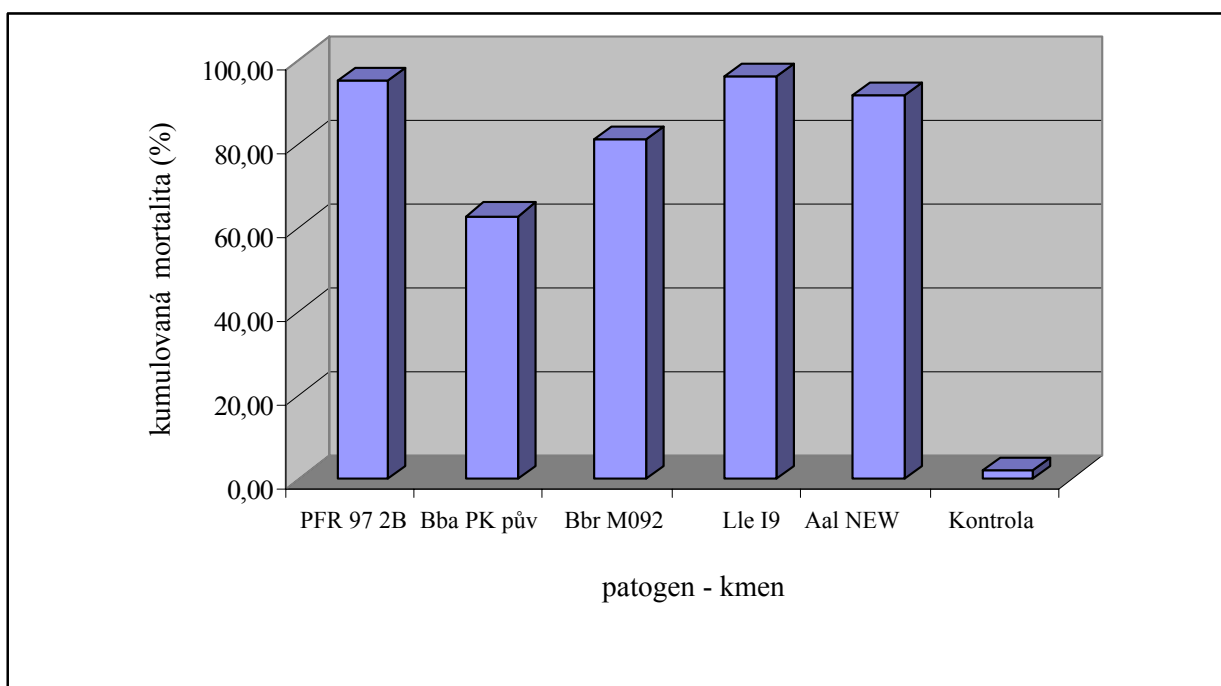
Graf 11: Kumulovaná mortalita v populaci *T. vaporariorum* synchronizované na stádium vajíčka 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.



Tabulka 21: Stav populace molice *Bemisia tabaci* synchronizované na stádium vajíčka 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.

Kmen	celkem		vajíčka				L1 - L2					
			živá		infikovaná		živé		mrtvé		infikované	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
PFR 97 2B	557	100	11	1,97	74	13,29	17	3,05	34	6,10	421	75,58
Bba-PK	408	100	98	24,02	2	0,49	54	13,24	40	9,80	214	52,45
Bbr-M092	488	100	54	11,07	21	4,30	39	7,99	76	15,57	298	61,07
Lle-I9	469	100	4	0,85	35	7,46	14	2,99	20	4,26	396	84,43
Aal-New	459	100	27	5,88	0	0,00	11	2,40	33	7,19	388	84,53
Kontrola	337	100	53	15,7	0	0,00	277	82,20	7	2,08	0	0,00

Graf 12: Kumulovaná mortalita v populaci molice *Bemisia tabaci* synchronizované na stádium vajíčka 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií vybraných kmenů entomopatogenních hub.



Zhodnocení pokusu:

S výjimkou kmene PK pův *B. bassiana* a M 092 houby a *B. brongniartii* u molice bavlníkové indukovaly všechny kmeny entomopatogenních hub, v pokuse zaměřeném na ověření ovidního účinku, kumulovanou mortalitu na úrovni 80% a více.

Zjevnou infekci na vajíčkách obou druhů molice vyvolaly všechny kmeny s výjimkou kmene Aal-New houby *Aschersonia aleyrodis*.

Tento kmen však vykázal velmi vysokou účinnost na mladé nymfy. Při porovnání výsledků zaznamenaných po aplikaci na molici skleníkovou a molici bavlníkovou nebyl v účinnosti kmenů hub použitých v pokusech zaznamenán významný relevantní rozdíl, který by mohl být interpretován jako rozdíl způsobený hostitelem.

POKUS 9: Porovnání účinnosti entomopatogenních hub *P. fumosoroseus* 97 2B, *B. bassiana* Pk PŮV, *L. lecanii* I9, *B. brongniartii* M 092 a *A. aleyrodis* NEW po aplikaci na populace molice skleníkové a molice bavlníkové synchronizované na stádium nymf nižších instarů (L1-L2).

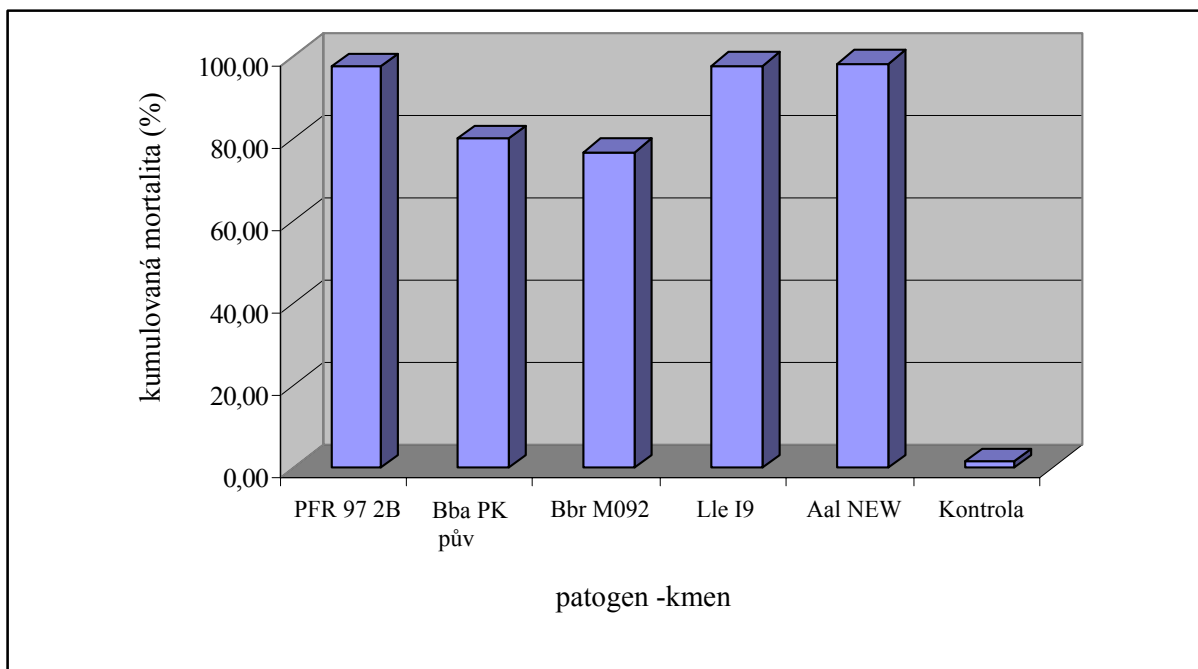
Základní údaje k pokusu:

- vybrané kmeny entomopatogenních hub byly 14 dní kultivovány na PDA jako celoplošná kultura
- předpěstované rostliny okurky byly na dobu 16–24 hodin umístěny do monofilových izolátorů, ve kterých byl udržovací chov molice bavlníkové nebo molice skleníkové.
- po odstranění dospělců molic z rostlin byly rostliny přemístěny do nových izolátorů do doby, než byla na listech zjištěna přítomnost larev nižších instarů (L1 a L2)
- pokusné rostliny, kterým byly ponechány 2 pravé listy, byly namáčeny do suspenze konidií adjustované na titer $1,0 \times 10^7$ v 1 ml ihned po odstranění dospělců z rostlin
- rostliny byly následně vloženy po dvou do izolátorů uzavřených PVC poklopem a umístěny do klimatizované místnosti
- pokusy byly jednorázově vyhodnoceny 7.den po aplikaci patogena, ke každému jedinci byla přiřazena kategorie: a)živá, b)vylíhlá, c)infikovaná, d)mrtvá

Tabulka 22: Stav populace molice *Trialeurodes vaporariorum* synchronizované na stádium nymf 1.-2. instaru 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.

Kmen	celkem		L1 - L2						L3-L4					
			živé		mrtvé		infikované		živé		mrtvé		infikované	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
PFR 97 2B	380	100	2	0,53	7	1,84	336	88,42	7	1,84	3	0,79	25	6,58
Bba-PK	297	100	14	4,71	23	7,74	209	70,37	45	15,15	3	1,01	3	1,01
Bbr-M092	465	100	21	4,52	5	1,08	321	69,03	87	18,71	12	2,58	19	4,09
Lle-I9	460	100	6	1,30	20	4,35	411	89,35	4	0,87	2	0,43	17	3,70
Aal-New	550	100	7	1,27	16	2,91	512	93,09	2	0,36	2	0,36	11	2,00
Kontrola	435	100	21	4,83	3	0,69	0	0,00	408	93,79	3	0,69	0	0,00

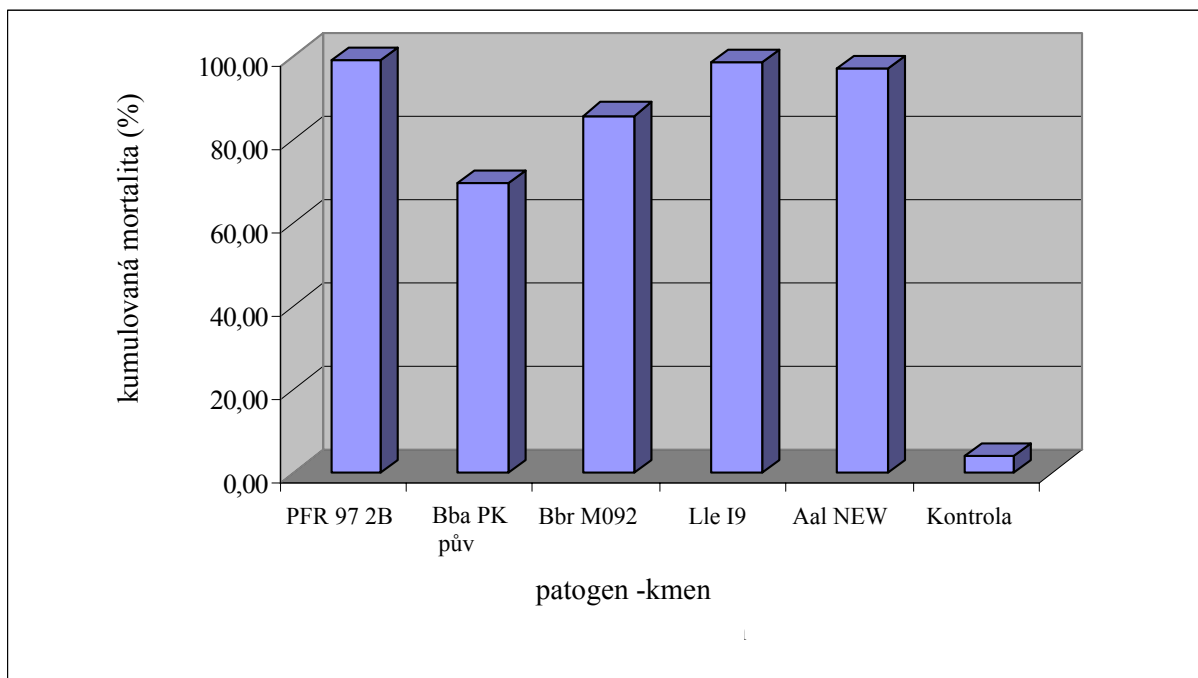
Graf 13: Kumulovaná mortalita v populaci molice *Trialeurodes vaporariorum* synchronizované na stádium nymf 1. a 2. instaru 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.



Tabulka 23: Stav populace molice *Bemisia tabaci* synchronizované na stádium nymf 1.-2. instaru 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.

Kmen	celkem		L1 - L2						L3 - L4					
			živé		mrtvé		infikované		živé		mrtvé		infikované	
	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
PFR 97 2B	342	100	3	0,88	7	2,05	319	93,27	0	0,00	2	0,58	11	3,22
Bba-PK	304	100	44	14,47	4	1,32	179	58,88	49	16,12	7	2,30	21	6,91
Bbr-M092	345	100	20	5,80	28	8,12	245	71,01	29	8,41	17	4,93	6	1,74
Lle-I9	309	100	2	0,65	9	2,91	266	86,08	2	0,65	11	3,56	19	6,15
Aal-New	377	100	7	1,86	17	4,51	317	84,08	4	1,06	3	0,80	29	7,69
Kontrola	434	100	8	1,84	11	2,53	0	0,00	409	94,24	6	1,38	0	0,00

Graf 14: Kumulovaná mortalita v populaci molice *Bemisia tabaci* synchronizované na stádium nymf 1. a 2. instaru 7. den po ošetření rostlin suspenzí konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.



Zhodnocení pokusu:

Po aplikaci na populace obou druhů molic byla většinou kmenů indukována velmi vysoká mortalita a to ve věkové kategorii, na kterou byly populace záměrně synchronizovány (tj. larvy 1. a 2. instaru) a jen velmi malá část jedinců přešla vývojem do následujícího nymfálního instaru (L3). Infekce indukovaná entomopatogenními houbami byla zaznamenána i v populaci nymf 3. instaru. Zřetelně nejnižší mortalita byla zaznamenána v populacích obou druhů molic po ošetření houbou *Beauveria bassiana* – kmen PK Pův. U molice skleníkové byla nižší účinnost prokázána i u kmene M 092 houby *Beauveria brongniartii*.

5. DISKUZE A ZÁVĚR

Vývoj a racionální používání biopreparátů na bázi entomopatogenních hub nepředstavuje pouze zvládnutí praktických biotechnologií a standardních introdukčních postupů, ale i velmi bohaté informační pozadí v oblastech, které s praktickým využíváním biopreparátů zdánlivě nesouvisí. Lze tedy říci, že mezi teorií a praxí využívání entomopatogenních hub je nepoměr, který má svůj velký význam. Na jedné straně je k dispozici nespočet důkazů o přirozeném výskytu entomopatogenních hub a jejich významné roli při přirozené regulaci populací škůdců nebo při regulaci populací škůdců v důsledku záměrných introdukci biopreparátů na bázi entomopatogenních hub, a na straně druhé, je zavedení a úspěšná komercializace nových biopreparátů na bázi entomopatogenních hub záležitostí doposud veskrze výjimečnou a v porovnání se syntetickými insekticidy nelze postavení mykoinsekticidů na současném trhu pesticidů označit ani za minoritní. Příkladem tohoto paradoxu je i disproporce mezi výzkumem a praxí ve využívání vláknitých entomopatogenních hub v Evropě. Existuje více příčin proč tomu tak je. Účinnost biopreparátů je obvykle srovnávána s chemickými standardy, přičemž při hodnocení jsou běžně používány postupy zaměřené na porovnání krátkodobých účinků po přímé aplikaci a následné sledování jejich detoxikace, při zřejmé preferenci látek, které vykazují krátkou perzistenci v prostředí. V důsledku toho jsou pochopitelně mykoinsekticidy znevýhodněny. Účinek biopreparátů na bázi entomopatogenních hub většinou nebývá zdaleka tak rychlý jako účinek syntetických insekticidů a často se také nepostihují dlouhodobější účinky, které jsou právě typické pro systém „patogen-hostitel“ u hub.

Diplomová práce je zaměřena na vybrané druhy entomopatogenních hub asociovaných s molicemi. Struktura experimentální práce byla koncipována nejen s ohledem na základní cíl práce (=ověření účinnosti entomopatogenních hub na dva druhy molic, z nichž jedna patří mezi karanténní škůdce), ale i s ohledem na modelovou demonstraci experimentálního záměru v oblasti práce s entomopatogenními organizmy. V tomto kontextu je nutno posuzovat i strukturu experimentů. V první části byly experimenty zaměřeny na demonstraci základních postupů používaných při standardním hodnocení vitality infekčních propagulí entomopatogenních hub (konidiospory, blastospory...). V pokusech byl použit evaluační systém, který byl již v roce 1993 zaveden v rostlinolékařské laboratoři KRV ZF JU a jehož velikou předností je to, že vedle standardního parametru vitality (= % klíčivost) přináší i nadstandardní informaci a následném vývoji testovaných kmenů hub (GI).

Experimenty prezentované v této části DP je nutno považovat za demonstrativní, protože obdobné hodnocení kvality bylo rutinně používáno i ve všech dalších pokusech.

V průběhu zkoumání entomopatogenních hub byla posuzována jak jejich schopnost naklíčení a růstu, tak i virulence vůči škůdci molici bavlníkové (*Bemisia tabaci*) a skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*). Modelová studie zaměřená na charakteristiku krátkodobých (nebo dlouhodobých) účinků vybraných kmenů entomopatogenních hub, naznačuje klíčový prvek interakčního systému „patogen-hostitel“ a to sice výběr vhodného kmene. Je řada entomopatogenních hub, které jsou schopny asociovat s molicemi a vyvolávat u nich onemocnění prakticky všech vývojových stádií.

Prakticky všechny kmeny použité v pokusech byly schopny v laboratorních podmínkách realizovat kompletní vývojový cyklus na všech vývojových stádiích molice skleníkové (*T. vaporariorum*) a bavlníkové (*B. tabaci*). Byly tedy schopny vyvolat významnou mortalitu v ošetřených populacích. Stejně entomopatogenní účinky charakterizuje ve své disertační práci Bobková (2006) při využití entomopatogenních hub vyjma houby *Aschersonia aleyrodis* se stejnými výsledky na svilušku chmelovou (*Tetranychus urticae*). Nicméně obecná schopnost vybraných druhů entomopatogenních hub vyvolávat onemocnění vývojových stádií molic se významně měnila na úrovni druhů/kmenů. Relevantní rozdíly byly také zaznamenány v rychlosti vývoje jednotlivých druhů/kmenů hub a ve schopnosti dosáhnout konečné fáze vývoje - sporulace. Sporulace hraje významnou roli při vzniku a průběhu epizootií.

Pro parametrizaci virulence jednotlivých kmenů/druhů hub byla využita zejména schopnost jednotlivých kmenů vyvolávat ve sledované populaci mortalitu. S ohledem na průběh infekce a vývoj hub na přirozeném hostiteli bylo zároveň cílem zaznamenat i všechny významné fáze vývoje patogena (klíčení konidií, pronikání do hostitele, usmrcení hostitele, povrchová proliferace, sporulace) a rozšířit tak charakteristiku jednotlivých kmenů o další parametry detailněji definující entomopatogenní status houby.

V pokusech zařazených do diplomové práce bylo pro hodnocení ovlivnění populace pozdního stádia molic využito indexové stupnice v rozmezí 0 – 3, ve které index 0,0 znamenal, že konidie v interakční zóně s hostitelem mají uniformní tvar a indexy 1,5 – 2,0 signalizují externí proliferaci hub a tvorbu vzdušného mycelia, což je předpoklad dalšího vývoje patogena. Sporulace byla zaznamenávána pomocí indexu 2,5 a 3,0 (= plná sporulace). Výsledky byly interpretovány s důrazem na zaznamenání kumulované mortality a následně i zaznamenání rozdílů v následujícím vývoji jednotlivých kmenů hub. Toto hodnocení představuje klíčový metodický aspekt práce.

Z hlediska praktické účinnosti hub byl při vyhodnocování nejvíce zohledňován index 1,5, který souvisí se schopností patogena usmrtit. Z těchto důvodů bylo v biotestech za klíčovou úroveň účinnosti považováno dosažení indexu 1,5 a výše. Dosažení této hodnoty dokazuje, že vlivem houby došlo nejen k usmrcení hostitele, ale i k povrchové proliferaci, která je zpravidla následována dokončením vývoje patogena (konidiogeneze). Tento index byl dosažen ve většině případů za 48-72 hodin. Z hlediska doposud neprováděných srovnávacích pokusů mezi molící bavlníkovou (*B. tabaci*) a molící skleníkovou (*T. vaporariorum*) byl výzkum v diplomové práci částečně směřován i na toto téma.

V pokusech bylo prokázáno, že vybrané kmeny entomopatogenních hub jsou schopny indukovat mortality u všech vývojových stádií (a nymfálních stupňů) obou druhů molic. V rámci jednotlivých srovnávacích pokusů sice byly zaznamenány určité rozdíly v účinnosti hub po aplikaci na molici *Trialeurodes vaporariorum*, resp. *Bemisia tabaci*, nicméně rozdíly byly natolik malé, že lze konstatovat, že účinnost jednotlivých kmenů je na oba druhy molic prakticky stejná. Významným zjištěním je skutečnost zaznamenaná v experimentech zaměřených na ovicidní účinek entomopatogenních hub. Pokusy prokázaly významný účinek na líhivost vajíček a zejména pak na další vývoj larev nižších instarů. Principiálním poznatkem je fakt, že s výjimkou kmene Aal-New houby *Aschersonia aleyrodis*, všechny ostatní druhy (kmeny) hub indukovaly mykózu přímo na vajíčkách a obdobně i na následném vývojovém stádiu – nymfách 1. instaru. Jak již bylo zmíněno, houba *A. aleyrodis* nevyvolala infekci přímo na vajíčkách, nicméně její účinek na nymfy 1. instaru byl velmi vysoký a kumulovaná mortalita dosáhla (spolu s PFR 97 a Lle I9) velmi vysokých hodnot. Obdobné tendence byly zaznamenány i po aplikaci hub na populace obou druhů molic synchronizované před aplikací na stupeň L1-L2, resp. L4.

K významným patří zjištění, že při porovnání virulence dvou kmenů hub rodu *Beauveria* (Bba PK Pův, Bba-01) byly zaznamenány rozdíly. Tyto rozdíly mezi kmeny naznačují, že virulence není definována jen na obecné úrovni (druhem entomopatogenní houby), ale i na poddruhové úrovni (kmen). Respekt k tomuto jevu naznačuje i další možnosti ve výběru kmenů entomopatogenních hub, s cílem jejich využití v biologické ochraně proti molícím.

Z výsledků experimentální části práce lze formulovat tyto nejvýznamnější závěry:

1. U všech testovaných kmenů/druhů entomopatogenních hub (*P. fumosoroseus* 97 2B, *A. aleyrodis* NEW, *B. bassiana* Pk PŮV, *B. brongniartii* M092, *L. lecanii* I9) byla prokázána 100% klíčivost všech konidií po 24 hodinách a plná sporulace po 72 hodinách. Tyto parametry potvrzují velmi vysokou vitalitu všech kmenů hub použitých v pokusech.
2. V rámci *in vitro* testů byly zaznamenány relevantní rozdíly v rychlosti vývoje jednotlivých druhů/kmenů entomopatogenních hub, přičemž nejrychlejšího vývoje dosáhla houba *P. fumosoroseus* 97 2B.
3. Účinnost jednotlivých druhů/kmenů entomopatogenních hub se lišila v porovnání patogenity vůči molici bavlníkové a molici skleníkové minimálně.
4. Počátečního nejrychlejšího vývoje při vyhodnocování *in vivo* FDI testů dosáhla v případě molice bavlníkové i skleníkové entomopatogenní houba *B. brongniartii* M092 s indexem 0,54-0,8 (průměrná velikost klíčku konidií v interakční zóně hostitele dosahuje téměř velikosti matečné konidie), přičemž rychlejší počáteční vývoj houby byl zaznamenán v interakční zóně molice bavlníkové
5. V celkovém zhodnocení měl nejlepší růstové a vývojové předpoklady v případě *in vivo* FDI testů na molicích kmen 97 2B houby *P. fumosoroseus* , po 48 hodinách byla hyfová vlákna houby prokazatelně v přímém kontaktu s tělem hostitele. V případě molice skleníkové se významně prosadila i houba *B. bassiana* 01 s indexem napadení 1,8 po 72 hodinách.
6. Všechny druhy/kmeny testovaných entomopatogenních hub byly schopny prodělat na hostiteli (molice bavlníková a skleníková) celý svůj vývojový cyklus až do konečné fáze vývoje - sporulace.
7. Při separovaném vyhodnocení dvou napadených rostlin okurky ošetřených suspenzí konidií houby *A. aleyrodis* NEW a *L. lecanii* I9 o stejném titru ($1,0 \times 10^7$ konidií v 1 ml) nebyly zaznamenány výrazné odlišnosti v účinku na mortalitu molice bavlníkové.
8. U napadených rostlin okurky, ošetřených suspenzí konidií všech druhů/kmenů hub, byla v případě molice bavlníkové prokázána nejvyšší účinnost houby *L. lecanii* I9 u níž mortalita dosáhla hranice 97,9% a *P. fumosoroseus* 97 2B s 95,3%.
9. S výjimkou houby *A. aleyrodis* NEW, všechny druhy (kmeny) hub indukovaly mykózu na vajíčcích i na následném vývojovém stádiu – nymfách 1. instaru.
10. Houba *A. aleyrodis* nevyvolala infekci přímo na vajíčcích, nicméně její účinek na nymfy 1. instaru byl velmi vysoký.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

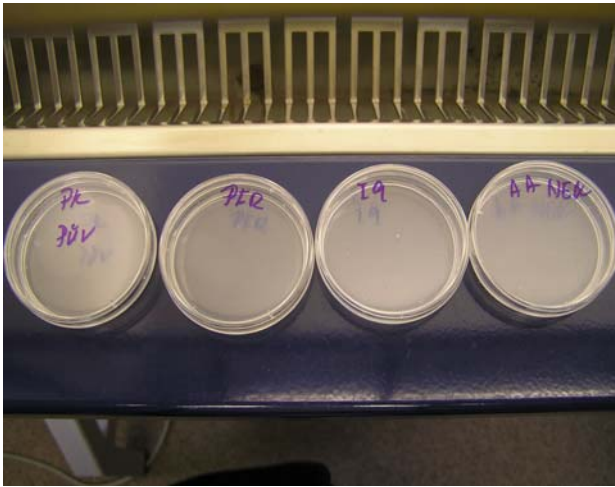
- Ainsworth, G.C., 1973:** Introduction and keys to higher taxa, Vol. IV.A: 1 - 7, in: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S., (Eds.) *The Fungi - An Advanced Treatise*. Academic Press, New York.
- Avidzba, N.S., 1983:** Bioecology of citrus whitefly and its integrated management. Proc. 10th. Intl. Cong. Plant Protection, Brighton, England, 3: 1031.
- Balakrishnan, S., Nene, Y.L., 1983:** A note on the mode of penetration of the fungus *Paecilomyces farinosus* Brown and Smith into the whitefly *Bemisia tabaci*. *Science and Culture*, 46: 231 - 232.
- Bartoš, J., Táborský, V., Landa, Z., 1990:** Integrovaná ochrana rostlin. Metodiky ÚVTIZ, MZ ČR, 11 : 1 - 40.
- Berlinger, M. J. 1986:** Host Plant Resistance to *Bemisia tabaci*. *Agric. Ecosystems Environ.* 17: 69-82.
- Bohatá, A., 2005:** Využití entomopatogenních hub v biologické ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin. *Zemědělská fakulta, JU v Českých Budějovicích (disertační práce), České Budějovice, 172.*
- Červená, G., Březíková, M., 2005:** Molice *Bemisia tabaci* a viry přenášené touto molicí I. *Rostlinolékař 05:* 17-19
- Červená, G., Březíková, M., 2006:** Molice *Bemisia tabaci* a viry přenášené touto molicí II. *Rostlinolékař 03:* 23-25
- Fargues, J., Robert, P.H., 1985:** Persistence des conidiospores des hyphomycètes entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sor., *Nomuraea rileyi* (F.) Samson et *Paecilomyces fumosoroseus* Wize dans le sol, en conditions contrôlées. *Agronomie*, 5: 73 - 80.
- Fawcett, H.S., 1908:** Fungi parasitic upon *Aleyrodia citri*. University of Florida, Experimental studies, 1: 1 - 41.
- Fransen, J.J., 1987:** *Aschersonia aleyrodia* as a microbial control agent of greenhouse whitefly. Ph.D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, Department of Entomology, 167 pp.
- Fransen, J.J., 1990:** Natural enemies of whiteflies - Fungi, pp. 187 - 209, In: Gerling, D.(Ed.): *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*. Atheneum Press, Newcastle upon Tyne.

- Greathead, A. H. 1986. Host Plants. Chapter 3, pp. 17-25. In: *Bemisia tabaci* - a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography (Ed. M.J.W. Cock). CAB International Institute of Biological Control, Ascot, UK. 121 pages**
- Galani, G., 1979:** Studies on the variation of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas to larvae of *Trialeurodes vaporariorum* Westw. An. ICPP, Bucarest, 15: 243 - 248.
- Gams, W.(Ed.), 1971:** *Cephalosporium* - artige Schimmelpilze (Hyphomycetes).Gustav Fischer, Stuttgart.
- Gottwald, T.R., Tedders, W.L., 1982:** Study on the conidia release by the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) from adult pecan weevil (Coleoptera, Curculionidae) cadavers. Environ. Entomol. 11: 1274 - 1279.
- Hamon, A. B. and V. Salguero. 1987:** *Bemisia tabaci*, sweetpotato whitefly, in Florida (Homoptera: Aleyrodidae: Aleyrodinae). Entomology Circular No. 292. Fla. Dept. Agric. & Consumer Serv., Division of Plant Industry.
- Hnízdil, M., 1994:** Molice. *Zahrádkář* 7: 202 - 204
- Kůdela, V., (Ed.), 1989:** Obecná fytopatologie. Academia Praha, pp. 77 - 82.
- Landa, Z., 1983:** Integrovaná ochrana proti molici skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* Westwood ve sklenících. Kandidátská dizertační práce, AF VŠZ Praha, 204 pp.
- Landa, Z., 1984:** Ochrana proti molici skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* v programech integrované ochrany skleníkových okurek. Sborník ÚVTIZ, Praha, XIV., 11:215 - 228.
- Landa, Z., Jiranová, R., 1989:** Entomopathogenic fungi as an additional selective pest suppressing agents of greenhouse whitefly populations in greenhouse cucumbers. Proc. Conf. "Biopesticides - theory and practice", September 25. - 28., České Budějovice, pp. 120 - 130.
- Landa, Z., Jiranová, R., 1989b:** A laboratory improvement of an entomopathogenic fungi and use of selected strains in IPM programme for greenhouse cucumbers. Ann. Rep. Agric. University České Budějovice, 95 pp.
- Lopez-Avila, A., 1986:** Taxonomy and biology of *Bemisia tabaci*, pp. 3 - 12, In: Cock, M.J.W.,(Ed.) *Bemisia tabaci* - a literature survey. Chameleon Press Limited, London.
- McCoy, C.W., Samson, R.A., Boucias, D.G., 1988:** Entomogenous fungi, Vol. 5: 151 - 236, in: Ignoffo, C.M. (Ed.) CRC Handbook of Natural Pesticides, Microbial Insecticides, Part A. Entomogenous Protozoa and fungi.
- McCoy, C.W., 1985:** Citrus: Current status of biological control in Florida, pp. 481 - 499, In: Hoy, M.A., Herzog, D.C.,(Eds.) Biological control in Agricultural IPM Systems. Academic Press, London - New York.

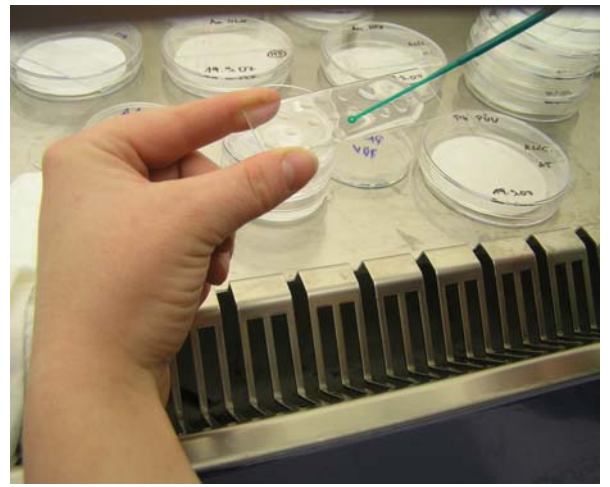
- Osborne, L.S., 1990:** Biological control of whiteflies and other pests with a fungal pathogen. United States Patent Number 4.942 030.
- Osborne, L.S., Landa, Z., 1992:** Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomologist, Vol. 75, No. 4: 456 - 471.
- Ramakers, P.J.M., Samson, R.A., 1984:** *Aschersonia aleyrodinis*, a fungal pathogen of whitefly. II. Application as a biological insecticide in glasshouses. J. Appl. Entomology, 97: 1 - 8.
- Rodriguez-Rueda, D., Fargues J., 1980:** Pathogenicity of entomopathogenic hyphomycetes, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Nomuraea rileyi*, to eggs of Noctuids, *Mamestra brassicae* and *Spodoptera littoralis*. J. Invert. Pathology, 36: 399 - 408.
- Samson, R.A., 1974:** *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Studies in Mycology, 6: 1-43.
- Samson, R.A., Rombach, M.C., 1985:** Biology of the fungi *Verticillium* and *Aschersonia*, pp. 34 - 42, In: Hussey, N.W., Scopes, N., (Eds.): Biological pest control - the glasshouse experience. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Samson, R.A., Evans, H.C., Latgé, J.P., 1988:** Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin.
- Speyer, E.R., 1927:** An important parasite of the greenhouse whitefly. Bull. Ent. Research., 17: 301 - 308.
- Tanada Y., Kaya, H.K., 1993:** Fungal infections, pp. 319 -387, in: Tanada, Y., Kaya, H.K., (Eds.) Insect Pathology. Academic Press Inc. California & Academic Press Limited London.
- Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993:** Amicrobial and microbial agents, pp. 52 - 82, in: Tanada, Y., Kaya, H.K., (Eds.): Insect pathology. Academic Press.
- Van Lenteren, J.C., Noldus, L.P.J.J., 1990:** Whitefly - Plant relationships, behavioural and ecological aspects, pp. 47 - 90, In: Gerling, D.(Ed.): Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management. Atheneum Press, Newcastle upon Tyne.
- Weiser, J., 1966:** Houbová onemocnění hmyzu, pp. 232 - 324, in: Weiser, J.: Nemoci hmyzu, Academia, Praha.

7. PŘÍLOHY - FOTODOKUMENTACE

Grafický list 1: Postup práce při zakládání pokusu na vyhodnocení kvality konidiové suspenze (test klíčivosti entomopatogenních hub) a FDI test na molicích



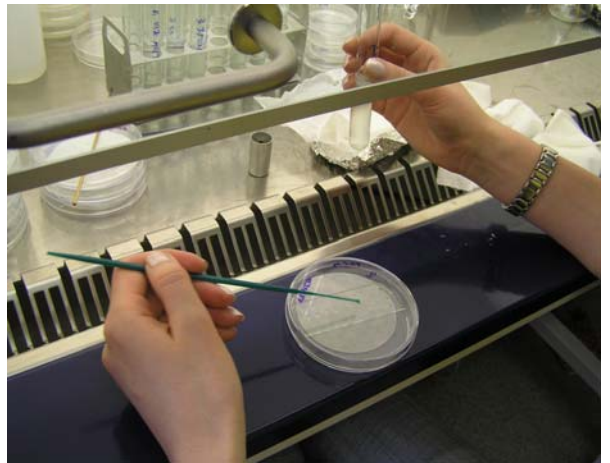
A



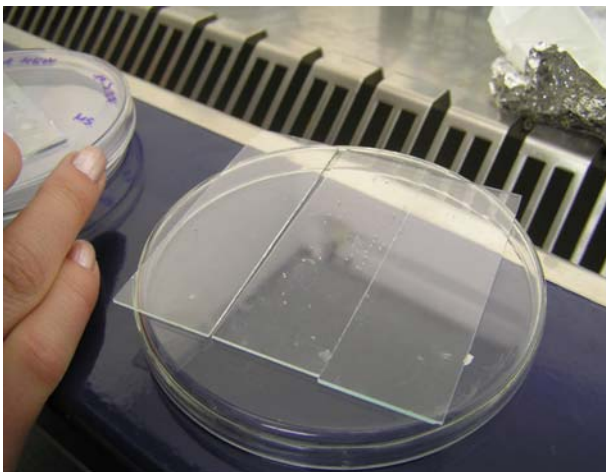
B



C



D



E

A – Petriho misky na hodnocení kvality konidiové suspenze

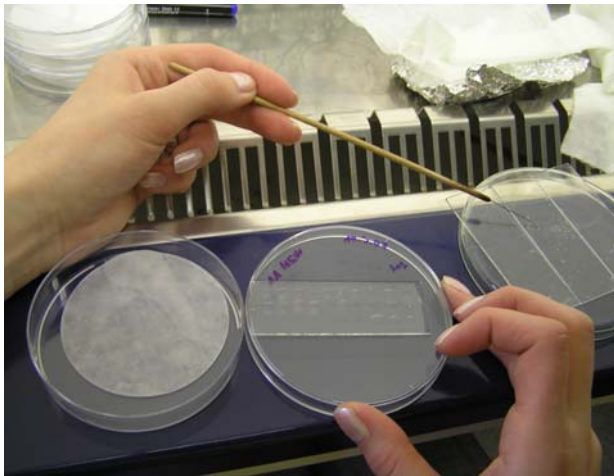
B – podložní sklíčko s tenkou vrstvou 2% vodního agaru, nanášení suspenze

C – laboratorní potřeby pro hodnocení kvality konidiové suspenze

D – nanášení konidiové suspenze na podložní sklíčko pomocí sterilní kličky

E – nymfy molic odebrané ze spodní strany listů na podložním sklíčku

Grafický list 2: Metodický postup při zakládání pokusu ke stanovení účinnosti jednotlivých kmenů entomopatogenních hub na molicích (FDGi biotest + ponořovací metoda)



A



B



C



D

A – nanášení nymf molic do kapky konidiové suspenze pomocí speciálně upravené jehly (FDGi biotest)

B – pokusné rostliny po namočení do suspenze konidií adjustované na titer $1,0 \times 10^7$ v 1 ml - ponořovací metoda

C – namáčení pokusných rostlin do konidiové suspenze - ponořovací metoda

D – umístění pokusných rostlin na 7 dní do izolátorů uzavřených PVC poklopem - ponořovací metoda

Grafický list 3: Metodický postup při vyhodnocování účinnosti hub na pokusných rostlinách v kompletním systému „rostlina-škůdce-patogen“ (ponořovací metoda)



A



B



C



D



A – rostliny v den vyhodnocení (7.den po namočení do suspenze konidií)

B – sestava binokulárního mikroskopu

C – houba *Lecanicillium lecanii* I9 parazitující pupária molice bavlňkové na listu okurky

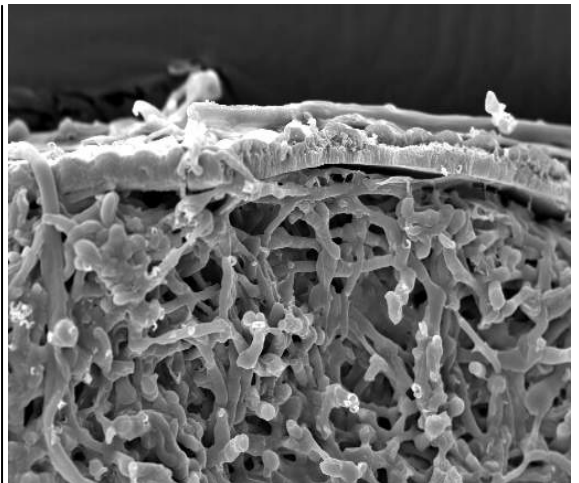
D- houba *Beauveria bassiana* Pk pův parazitující pupária molice bavlňkové na listu okurky

E- houba *Paecilomyces fumosoroseus* 97 2B parazitující pupária molice bavlňkové na listu okurky

Grafický list 4: Parazitizmus a morfologické vlastnosti vybraných druhů / kmenů entomopatogenních hub (Archiv KRV ZF JU)



A



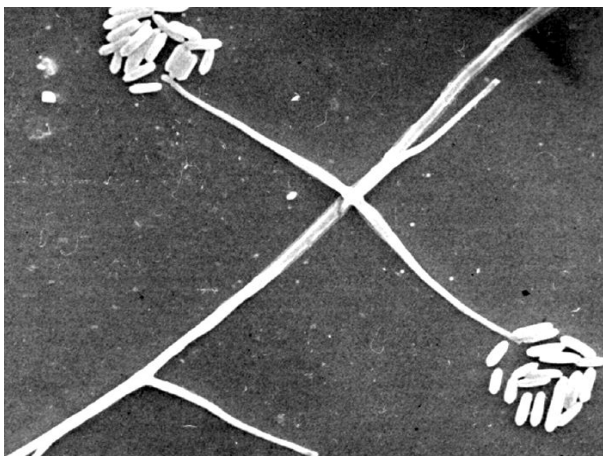
B



C



D



A – rozdíl mezi infikovanou (vpravo) a zdravou larvou molice houbou *Aschersonia*

B – tělní dutina hostitele vyplněná hyfovými tělísky houby *Aschersonia*

C – bílé mycelium *Beauveria bassiana* na povrchu těla molice skleníkové

D – struktura a tvorba konidií *Paecilomyces fumosoroseus*

E – dlouhé konidiofory *Lecanicillium lacanii*

Grafický list 5: Viry přenášené molicí bavlníkovou (*B. tabaci*) a parazitismus hub *A. aleyrodis* a *P. fumosoroseus* (Archiv KRV ZF JU)



A



B



C



D



E

A – Euphorbia mosaic begomovirus přenášený molicí bavlníkovou (*B. tabaci*)

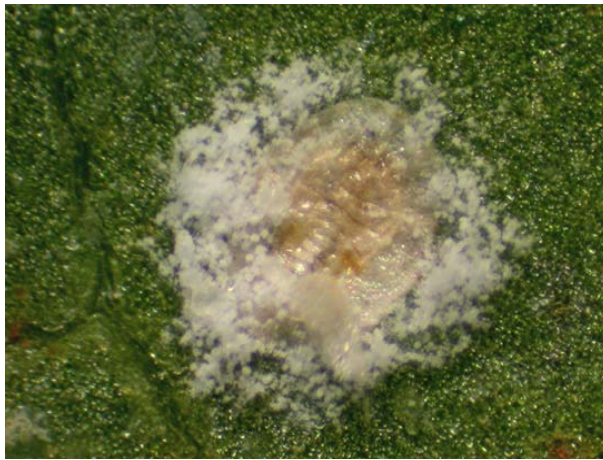
B – Tomato yellow leaf curl virus přenášený molicí bavlníkovou (*B. tabaci*)

C – uhynulý dospělec molice skleníkové (*T.vaporariorum*) po aplikaci přípravku PreFeRal (úč.složka *P. fumosoroseus*)

D – infikovaná larva molice bavlníkové houbou *A. aleyrodis*

E – jedinci molice bavlníkové (*B. tabaci*) napadení houbou *P. fumosoroseus*

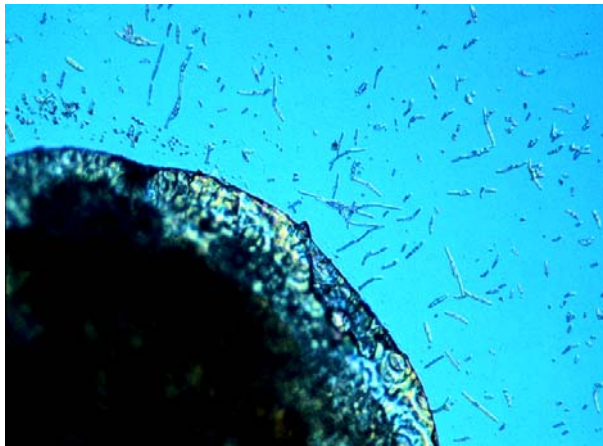
Grafický list 6: Klíčové fáze vývoje entomopatogenních hub na molících charakterizované podle indexové stupnice (použité v FDGI *in vivo* biotestech)(Archiv KRV ZF JU)



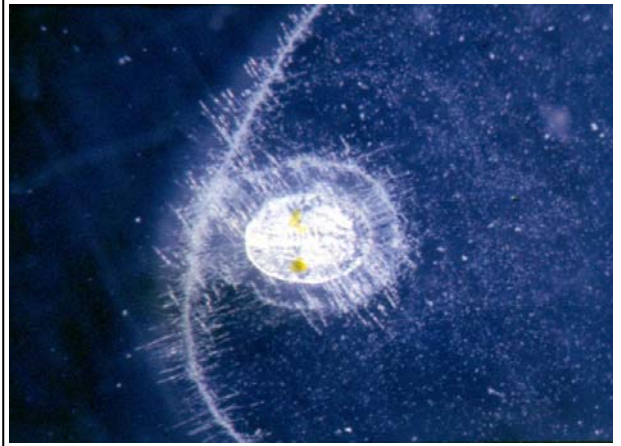
A



B



C



D

A – *Beauveria bassiana* – puparium molice *T. vaporariorum* obrostlé myceliem patogena (FDG index 3.0-sporulace)

B – *Lecanicillium lecanii* – počátek sporulace na vzdušném myceliu porůstajícím povrch puparia *T. vaporariorum* (FDG index 2,5)

C – klíčící konidie houby *P. fumosoroseus* v okolí puparia molice skleníkové (FDGI index 0,5)

D – mycelium v okolí a na povrchu puparia molice skleníkové(FDGI index 1.5-2,0)

