

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
ENTOMOPATOGENNÍ HOUBA *METARHIZIUM ANISOPLIAE* –
BIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE

Vedoucí bakalářské práce

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Autor

Jana Konopická

České Budějovice
duben 2014

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

Jméno a příjmení: **Jana KONOPICKÁ**
Osobní číslo: **Z11339**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae* - biologická charakterizace**
Zadávající katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

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

Zadané téma představuje literární kompilaci zaměřenou na analýzu současného stavu poznání v oblasti biologických charakteristik entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae*, s důrazem na vliv abiotických faktorů na vývoj a účinnost tohoto patogena na vybrané druhy škodlivého hmyzu. Výsledky této práce by měly sloužit k objektivnímu posouzení možnosti využít tohoto patogena v biologické a integrované ochraně rostlin.

V literárním přehledu by měly být zahrnuty následující klíčové body:

- 1) Entomopatogenní houby.
- 2) Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub.
- 3) *Metarhizium anisopliae*.
 - Taxonomické zařazení.
 - Morfologická charakteristika.
 - Vývojový cyklus.
 - Sortiment hostitelů.
 - Vztah k abiotickým faktorům.
 - Biopreparáty na bázi *M. anisopliae*.

Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Weiser J., 1966: Nemoci hmyzu. Nakladatelství Akademia.

Goettel M.S., Inglis G.D., Wraight S.P. 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.): Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, 255-282.

Butt T.M., Goettel M.S. 2000: Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.

Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001: Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.

Bailey A., et al., 2010: Biopesticides. CAB International Cambridge.

Publikace získané retrospektivní a průběžnou rešerší v bibliografické databázi CAB.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání bakalářské práce: 21. ledna 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2014



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

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

L.S.



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

V Českých Budějovicích dne 21. ledna 2014

Prohlášení

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

.....
Datum

.....
Jana Konopická

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost a trpělivost při konzultacích.

Abstrakt

Entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae* patří mezi nejrozšířenější druhy využívané v biologické ochraně rostlin. Druh *M. anisopliae* se vyskytuje ve vlhkém a teplém prostředí, nejčastěji infikuje půdní hmyz nebo hmyz žijící na povrchu půdy. Houba je široce polyfágní a parazituje na široké škále hmyzu náležejících do více než 50 řádů: rovnokřídli (Orthoptera), dvoukřídli (Diptera), polokřídli (Hemiptera), motýli (Lepidoptera) a brouci (Coleoptera). Bakalářská práce je zaměřena na podrobný popis houby *M. anisopliae* a také charakteristiku dalších šesti významných rodů hub využitelných v biologické ochraně rostlin (*Beauveria*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*) včetně detailního popisu vývojového cyklu entomopatogenních hub. Práce obsahuje i podrobný popis čtyř komerčně dostupných biopreparátů na bázi houby *M. anisopliae* (Met52, Green Muscle®, BioCane a BIO-Blast) a příklady praktického využití biopreparátu Met52 na vybrané hostitele.

Klíčová slova: integrovaná ochrana rostlin, biologická ochrana, entomopatogenní houby, *Metarhizium anisopliae*, biopreparát

Abstract

Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the most common species used in biological control. Fungus *M. anisopliae* occurs in humid and warm environments. Fungus is able to cause the primary diseases of insect living in soil or on the soil surface. The fungus is widely polyphagous and parasites on a wide range of insects belong to more than 50 orders (Orthoptera, Diptera, Hemiptera, Lepidoptera and Coleoptera). The bachelor's thesis is focused on a detailed description of the fungus *M. anisopliae* and also characteristic of the other six major genera of fungi used in biological control (*Beauveria*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*) including description of development cycle of entomopathogenic fungi. The thesis also contains a detailed description of the four commercially available biological products based on this fungus *M. anisopliae* (Met52, Green Muscle®, BioCane and BIO-Blast) and examples of practical use of biopreparate Met52 on the selected host.

Key words: Integrated pest management, biological control, entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, biopreparate

Obsah

1	Úvod	7
2	Literární přehled	8
2.1	Integrovaná ochrana rostlin	8
2.2	Biologická ochrana	9
2.3	Přirození nepřátelé	9
2.3.1	První skupina přirozených nepřátel	11
2.3.2	Druhá skupina přirozených nepřátel	12
3	Charakteristika entomopatogenních hub	15
3.1	Vývojový cyklus entomopatogenních hub	16
3.2	Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub	19
3.3	Nejvýznamnější rody entomopatogenních hub	22
4	Nejvýznamnější druh <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin	27
4.1	Historie	27
4.2	Taxonomické zařazení <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
4.3	Morfologická charakteristika	29
4.4	Rozšíření	31
4.5	Hostitelské spektrum	32
4.6	Produkce toxinů	32
4.7	Izolace a kultivace <i>Metarhizium anisopliae</i>	33
4.8	Produkce houby <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
4.9	Biologické přípravky na bázi <i>Metarhizium anisopliae</i>	35
4.9.1	Příklady některých biopreparátů na bázi <i>Metarhizium anisopliae</i>	37
4.10	Příklady využití biopreparátu Met52 na vybraných hostitelích	40
5	Diskuse	44
6	Závěr	47
7	Přehled literatury	48

1 Úvod

V současné době se stal trendem zdravý životní styl. Snažíme se jíst co nejvíce zdravě, ale žijeme v tzv. „chemické době“. Většina plodin, které pokládáme za zdravé, se během svého vývoje a růstu setkává s pesticidy a v potravinách se mohou vyskytovat rezidua pesticidů. Pesticidy dlouhodobě přijímané v potravě způsobují rakovinu, hormonální poruchy, podráždění očí, kůže a plic a působí toxicky na vývoj nervové soustavy. Pesticidy mají také negativní vliv na životní prostředí. Mezi nežádoucí důsledky nesprávného používání pesticidů patří kontaminace povrchových vod, narušení ekosystému, ukládání reziduí v živých organismech s následnou kumulací v potravních řetězcích.

Přirozenější alternativy ochrany rostlin, které snižují závislost na pesticidech, jsou využívány v rámci integrované ochrany rostlin. Integrovaná ochrana rostlin je systém hospodaření zahrnující mnoho metod regulace populací škodlivých činitelů bez nežádoucích vedlejších negativních ekologických a toxikologických vlivů. Integrovaná ochrana rostlin byla pěstiteli uplatňována dobrovolně na základě doporučení, ale dodržování zásad je od 1. ledna 2014 pro všechny profesionální uživatele používající přípravky na ochranu rostlin povinné. Sice budou mít zemědělci v prvních letech s dodržováním zásad integrované ochrany rostlin problémy, ale pak je ocení nejen oni, ale i příroda a konzumenti. Zásady integrované ochrany rostlin mají totiž především za cíl eliminovat zbytečné užívání nebezpečných pesticidů.

Mezi nejvýznamnější a nejšetrnější metodu regulace škodlivých činitelů řadíme biologickou ochranu rostlin. Biologická ochrana rostlin využívá přirozené nepřátele s cílem regulovat populace nežádoucích činitelů. Mezi přirozené nepřátele náleží jak makroorganismy, tak i mikroorganismy. Mezi mikroorganismy mimo jiné řadíme i entomopatogenní houby.

Bakalářská práce se věnuje problematice entomopatogenních hub, které se mohou využívat v praktické biologické ochraně rostlin. Je zde kladen důraz na významný druh entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae*. Práce je zaměřena na biologickou charakteristiku tohoto druhu houby a na biopreparáty, které se na bázi *Metarhizium anisopliae* ve světě vyrábí a běžně používají.

2 Literární přehled

2.1 Integrovaná ochrana rostlin

Zpočátku se v ochraně rostlin před škodlivými činiteli využívala fyzikálně-chemická a pěstitelská opatření. V letech 1950 - 1960 vedoucí úlohu v ochraně rostlin zaujímaly chemické metody a zdálo se, že tyto metody jsou klíčem ke konečnému řešení ochrany rostlin. Později se začaly projevovat negativní účinky používání pesticidů. Perspektivním cílem bylo vypracování tzv. integrované ochrany (Kůdela 1989).

Integrovaná ochrana rostlin (IOR) je systém hospodaření, který upřednostňuje přirozenější alternativy ochrany rostlin a zároveň snižuje závislost na pesticidech. Jde o přechod mezi konvenčním a ekologickým systémem hospodaření. Je to soubor vzájemně se doplňujících agrotechnických, biologických, chemických a fyzikálních metod, které dlouhodobě regulují populace škodlivých organismů s ohledem na ekonomickou situaci a bez nežádoucích vedlejších ekologických a toxikologických vlivů na životní prostředí. Jedná se o efektivní ochranu před patogeny, škůdci a plevely. Velmi důležitý je monitoring plodin, zvážení vhodného zásahu a ekonomických prahových hodnot pro aplikaci ochrany rostlin na odlišné škůdce. Je zde kladen velký důraz na snížení rizik dopadu vlivu pesticidů na lidské zdraví a životní prostředí. Pokud nelze regulovat populace škodlivých organismů jiným způsobem než pesticidy, měli by uživatelé používat takové pesticidy, které vykazují vysokou specifitu k danému škodlivému organismu a mají co nejmenší vedlejší účinky na lidské zdraví, necílové organismy a životní prostředí (Bailey *et al.* 2010). Jak již bylo zmíněno, IOR je přechod mezi konvenčním a ekologickým zemědělstvím. Ekologické zemědělství pesticidy nepovoluje vůbec, kdežto aplikací zásad IOR pesticidy ze zemědělství nikdy úplně nevymizí. Použití pesticidů, by mělo být až poslední možností regulace výskytu škodlivého organismu, pokud byly využity všechny preventivní opatření, a přesto se šíření škodlivého organismu nepodařilo žádným jiným způsobem zabránit (Charvát 2013).

V roce 2009 byla přijata členy Evropské Unie směrnice 2009/128/ES, která je již součástí národní legislativy rostlinolékařského zákona č. 199/2012 Sb. § 5. A součástí tohoto zákona je platná vyhláška č. 205/2012 o obecných zásadách IOR, která je povinná pro všechny uživatele, používající přípravky na ochranu rostlin. Vyhláška je platná od 1. 1. 2014 (Anonym I).

Místo postřiků na plodiny vysokými dávkami pesticidů budou muset zemědělci používat k přírodě a lidskému zdraví šetrnější metody. Například každým rokem budou muset na polích střídát plodiny, používat odrůdy odolné nebo tolerantní ke škodlivým organismům

nebo chránit a podporovat organismy užitečné. Co se týká používání přímých metod ochrany rostlin, fyzikálních, biologických nebo chemických, mají být používány ty, které mají co nejmenší vedlejší účinky na lidské zdraví, necílové organismy a životní prostředí. Dodržování zásad kontroluje od 1. 1. 2014 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). Zpočátku bude pravděpodobně úřad k zemědělcům mírnější a spíše se jim bude snažit vysvětlit co zlepšit, pokud však pěstitel nebude dlouhodobě zásady IOR dodržovat, pak se nevyhne sankcím ze zákona (Charvát 2013).

2.2 Biologická ochrana

Biologická ochrana umožňuje používání živých organismů k potlačení populace určitého druhu škůdce. Populace všech živých organismů v přírodě se ve stejné míře snižují pomocí predátorů, parazitů, parazitoidů a různých mikroorganismů. Tento proces se nazývá přírodní ochrana. Jsou-li škůdci kontrolováni, jedná se o biologickou ochranu (Hajek 2004). Biologická ochrana je alternativní způsob opatření. Do těchto opatření patří tzv. přirození nepřátelé. Přirození nepřátelé jsou organismy, které nepříznivě ovlivňují život jiných organismů. Aplikují se s cílem regulovat populace škůdců pod ekonomickým prahem škodlivosti, zpomalování a oddalování vzniku jejich rezistence vůči pesticidům a snižování kontaminace životního prostředí (Honěk *et al.* 2008). Spolu s přirozenými nepřáteli a antagonisty jsou do kategorie alternativní ochrany zahrnovány i metody agrotechnické (např. zpracování půdy, osevní postupy), bioracionální (např. feromony, analogy hormonů ovlivňující vývoj škůdců, syntetické látky indukující a navozující rezistenci rostlin) a genetické (např. rezistentní odrůdy, introdukce sterilních samců). Biologickou ochranou se rozumí nejen záměrné využívání a cílená podpora přirozených nepřátel, ale i záměrné využívání a podpora systémů v interakcích „živý proti živému“ (Landa 2002).

2.3 Přirození nepřátelé

Přirození nepřátelé se dělí do dvou skupin. Do první skupiny se řadí různé druhy mikroorganismů, především viry, bakterie, hlístice a houby. Druhou skupinu tvoří makroorganismy, do kterých patří paraziti, parazitoidi a predátoři (Hajek 2004).

Strategie využití přirozených nepřátel

První strategie je záměrné dovezení přirozených nepřátel z jiných zemědělských oblastí, tzv. introdukce resp. inokulativní strategie. Druh parazita, parazitoida, predátora nebo patogenního mikroorganismu je v malém množství záměrně introdukován do nového areálu

rozšíření škodlivého organismu. Cílem této strategie je zajistit dlouhodobý efekt úspěšného uchycení nasazeného bioagens. Tato strategie vyžaduje národní a mezinárodní infrastrukturu, včetně karanténních zařízení. Má ekologický charakter a podílí se zde jen malý podíl technologických prvků, jako jsou nízkokapacitní chovy a biotechnologie pro introdukci malého množství jedinců (Landa 2002). Prvním významným úspěchem se stala introdukce australského sluněčka *Rodolia cardinalis* do Kalifornie, která vyřešila problém zavlečeného červce *Icerya purchasi*. Nejvýznamnějších úspěchů bylo dosaženo proti zavlečeným škůdcům tím, že byli dovezeni jejich přirození nepřátelé z původního areálu rozšíření (Honěk *et al.* 2008).

Do druhé strategie tzv. augmentativní patří umělé množení přirozených nepřátel a vypouštění do napadených porostů. Zde je možno použít dvou postupů, prvním postupem je tzv. inundativní strategie, kdy je vypouštěno velké množství přirozených nepřátel do jednoletých plodin. Strategie je určena proti jednogenračním škůdcům způsobujících škody na polních plodinách. Příkladem je vypouštění parazitické vosičky *Trichogramma evanescens* do populace zavíječe kukuřičného. Přirození nepřátelé se vypouštějí jednorázově maximálně dvakrát během sezóny, po vyhubení škůdce sami zahynou. Druhý zásah je tzv. strategie sezónně inokulativní, kdy je vypouštěno velké množství přirozených nepřátel, k překrytí populací škodlivých činitelů v řízených podmínkách, tj. skleníků. Cílem augmentativní strategie je dosáhnout okamžitého ochranného efektu. Introdukce se musí opakovat, protože introdukovaný druh se v prostředí nemusí vždy uchytit. Tyto zásahy zahrnují masové chovy a umělé produkce makroorganismů nebo kultivace mikroorganismů. V rámci sezónně inokulativní strategie se využívají např. vosička *Encarsia formosa*, dravý roztoč *Phytoseiulus persimilis*, entomopatogenní bakterie *Bacillus thuringiensis*, entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* a spousta dalších jiných makroorganismů nebo mikroorganismů (Landa 2002; Driesche, Heinz 2004).

Poslední strategií je ochrana a usměrnění pohybu přirozených populací nepřátel škodlivých činitelů. Mechanismus spočívá ve zvýšení početnosti přirozených nepřátel v období počátku vývoje populací škůdců. Početnost se ovlivňuje například vytvořením vhodných míst pro prezimování přirozených nepřátel. Pozitivně se projevilo udržování větší diverzity kvetoucích rostlin jejich vyséváním na okrajích polí, případně vynecháním herbicidního zásahu v těchto místech. K přilákání predátorů a parazitoidů do porostů jsou využívány také atraktanty. Například u predátorů mšic se osvědčily roztoky aminokyseliny tryptofanu, jejichž vůně se podobá vůni medovice mšic, která je přitahuje. Podobný účinek

mělo také rozstříkávání umělé medovice vyrobené ze směsi cukru a kvasničného autolyzátu. (Honěk *et al.* 2008).

2.3.1 První skupina přirozených nepřátel

Makroorganismy

Do první skupiny přirozených nepřátel patří organismy větších rozměrů tzv. makroorganismy. Řadíme sem parazity, parazitoidy a predátory. Paraziti nejsou pro biologickou ochranu tak významní, protože svého hostitele většinou nezabíjejí.

Parazitoidi a paraziti

Jsou významnou složkou biologické ochrany proti škůdcům z kmene členovců. Parazitoidi jsou na svého hostitele vázáni nejen potravně, ale i svým vývojem. Významné jsou řády blanokřídlých (Hymenoptera) a dvoukřídlých (Diptera). Parazitoidi svého hostitele zabíjejí tím, že jejich larvální vývoj probíhá uvnitř těla hostitele. Paraziti žijí na povrchu těla a oslabují hostitele zvenčí (ektoparaziti) nebo zevnitř (endoparaziti). Parazitoidi mohou napadat všechna vývojová stádia nebo se úzce specializují na konkrétní stádium. Larvy se živí tkáněmi a tělními tekutinami hostitele. Při vyhledávání vhodného hostitele využívá samička parazitoida především pachové signály, v menší míře také zrakové podněty. Dospělí parazitoidi se živí rostlinnou potravou, a proto je rozhodující je použít v období, kdy samice napadají hostitele (Honěk *et al.* 2008).

Biologické prostředky na bázi parazitoidů obsahují převážně kukly. Významnými parazitoidy jsou vosičky *Encarsia formosa* proti molicím, *Aphidius colemani* proti mšicím, *Aphidius ervi* proti kyjatkám, *Aphelinus abdominalis* proti mšicím a kyjatkám, *Dacnusa sibirica* a *Diglyphus isae* proti vrtalkám. Významný je také rod *Trichogramma*, který se využívá proti mnoha druhům motýlů (Tichá 2001; Hajek 2004).

Predátoři

Predátoři patří také k významným přirozeným nepřátelům členovců. Jejich životní strategie je odlišná. Na hostitele jsou predátoři vázáni pouze potravně. Patří mezi polyfágní organismy. Napadají velký počet druhů kořisti, nerozlišují mezi vývojovými stádii a také se živí alternativně rostlinnou potravou. Predátory lze najít po celé rostlině i v podzemní části. Při vyhledávání kořisti se řídí zejména pachem produktů vylučovaných kořisti např. medovicí. Samice jednotlivých skupin predátorů zaujímají při kladení vajíček různou strategii. Některé

kladou rozptýleně nebo ve snůškách. Spotřeba potravy je oproti parazitoidům vysoká, protože kombinují oba způsoby potravy (Hoffmann, Frodsham 1993).

Biologické prostředky na bázi predátorů jsou k dostání ve formě dospělců. Významní jsou draví roztoči např. *Typhlodromus pyri*, *Phytoseiulus persimilis* a *Amblyseius californicus* proti sviluškám, *Amblyseius cucumeris* a *A. degenerans* proti třásněnkám. Do významných predátorů patří také dravé ploštice *Orius insidiosus*, *O. laevigatus*, *O. majusculus* proti třásněnce západní a *Macrolophus caliginosus* proti molicím. Dále zlatoočko *Chrysoperla carnea* se využívá proti mšicím a sluněčka *Hippodamia convergens* a *Cryptolaemus montrouzieri* proti mšicím a červcům (Hajek 2004).

2.3.2 Druhá skupina přirozených nepřátel

Mikroorganismy

Jako mikroorganismy jsou označovány organismy, které jsou dobře viditelné pouze pod mikroskopem a patří spolu s členovci k nejvýznamnějším hubitelům škůdců. Některé druhy mikroorganismů jsou schopny vyvolat hromadné nákazy škůdců doprovázené zhroucením jejich populací, a proto se již po mnoho let uplatňují při biologickém boji proti nim (Tichá 2001).

Entomopatogenní viry

Entomopatogenní viry patří mezi obligátní parazity, kteří se reprodukuje pouze ve vhodném intracelulárním prostředí. Reprodukce virů je závislá na hostitelském organismu. Částice viru je tvořena proteinovou složkou (kapsida) a jedním typem nukleové kyseliny (Kůdela 1989). Nejvýznamnější čeleď v biologické ochraně asociovaná s hmyzem je Baculoviridae (tzv. bakuloviry). Viry v této skupině způsobují infekce jen u hmyzu a jsou biochemicky i geneticky velmi odlišné od virů, které napadají obratlovce, a proto jsou považovány za bezpečné pro lidi. Do této čeledi patří dva významné rody *Nucleopolyhedrus* a *Granulovirus*. Bakuloviry infikují převážně larvy hostitele, které získali virové částice během krmení. Virus infikuje buňky střeva, a poté se šíří do celého těla. Při infekci se hostitel stává oslabeným, má snížený vývoj a pohyblivost. Finálním stádiem virového onemocnění je úplné ztekucení tělního obsahu hostitele, praskání kutikuly a kapénková kontaminace. Smrt nastává do 5 - 8 dnů v závislosti na množství inokula viru. Nemocné a mrtvé larvy slouží jako inokulum pro přenos viru. Částice viru se mohou šířit také deštěm a jinými zvířaty (Bailey *et al.* 2010).

Entomopatogenní bakterie

Entomopatogenní bakterie jsou jednobuněčné prokaryotní organismy, které nemají vnitřní membránové organely (mitochondrie, chloroplasty). Doposud bylo izolováno více než 90 druhů bakterií, které vykazují patogenitu k hmyzu. Nejvýznamnější čeledí v biologické ochraně je Bacillacea, zejména rody *Clostridium* a *Bacillus*. Jako biopesticid se používá druh *Bacillus thuringiensis*, který je díky svým vlastnostem zcela unikátní. *Bacillus thuringiensis* obsahuje velké plazmidy nesoucí geny kódující produkci tzv. δ -endotoxinů, které jsou součástí krystalu (proteinová inkluze). Krystal představuje klíčový prvek toxicity a selektivity biopreparátů na bázi tohoto mikroorganismu (Landa 2002). Infekce začíná požitím infikované potravy bakteriemi. Bakterie napadají buňky epitelu středního střeva. Po čase se může tělo hostitele různě zabarvit. Některé druhy bakterií vyžadují dlouhou dobu, někdy i měsíc, než zabijí hostitele, zatímco jiné pomocí svých toxinů poškozují střevní stěnu a hostitele zabijí rychle (Hajek 2004).

Entomopatogenní bakterie *B. thuringiensis* má více než čtyřicet sérotypů. K nejznámějším patří *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, který je součástí preparátu BIOBIT XL a je určen proti škodlivým housenkám bělásků, píďalek, obalečů, bekyní a dalších motýlů (Lepidoptera). Bakterie naruší trávicí ústrojí housenky a způsobí jeho ochromení. Během několika hodin přestanou housenky přijímat potravu a zhruba po 2 - 3 dnech hynou. Přípravek se aplikuje běžnými postřikovači v době líhnutí housenek. Není toxický k necílovým organismům. Aplikace se provádí postřikem v době výskytu housenek. Je mísitelný s většinou fungicidů a pomocných látek. Tento biopreparát je v České republice k dostání od firmy BIOCONT Brno (Anonym II). Mezi další účinné variety patří *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* a *B. thuringiensis* var. *san diego* účinný proti zástupcům řádu brouků (*Coleoptera*) a *B. thuringiensis* var. *israeliensis* proti řádu dvoukřídlí (Diptera) (Landa 2002).

Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou již dlouhou dobu známy jako původci infekcí u hmyzu, který způsobuje významné škody na kulturních plodinách. Mají široké hostitelské spektrum, proto jsou často využívány v biologické ochraně rostlin. Ve srovnání s dalšími entomopatogenními mikroorganismy mají vysoký potenciál, protože mohou aktivně pronikat do hmyzu a způsobovat tak jejich onemocnění. Hostitele mohou infikovat v různém vývojovém stádiu a v přírodě vyvolávat epizootie. Podrobnější charakteristika entomopatogenních hub je popsána níže v samostatné kapitole.

Entomopatogenní hlístice

Nejdůležitější pro biologickou ochranu jsou entomopatogenní hlístice z čeledi Steinernematidae a Heterorhabditidae. Patří mezi vysoce virulentní obligátní parazity hmyzu. Hlístice mají celkem čtyři vývojové stupně. Jediný vývojový stupeň, který je infekční, je třetí. Larva třetího stupně je vzhledem ke svým specifickým vlastnostem a funkcím označována jako invazní larva (Landa 2002). Invazní larva je také jediným vývojovým stádiem, kdy hlístice nepřijímá potravu a intenzivně vyhledává hostitele, do kterého proniká přirozenými otvory, jako je ústní, řitní nebo dýchací otvor. Tyto hlístice žijí v symbióze s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* nebo *Photorhabdus*. V infekční fázi je u hlístic v přední části zažívacího traktu vyvinuta bakteriální komůrka, ve které se vyskytují tyto symbiotické bakterie. Po proniknutí hlístice do hostitele jsou bakterie vypuštěny do hemolymfy, kde se rychle namnoží a způsobují usmrcení napadeného hmyzu. Usmrcení je způsobeno septikémií a dezintegrací tělních tkání a orgánů hostitele. Po úspěšné invazi bakteriemi jsou hlístice vázány na tělní dutinu hostitele, kde ukončují svůj vývoj. Hlístice se živí symbiotickými bakteriemi v těle hostitele. Klíčovým mechanismem tohoto parazitizmu je symbiotická asociace entomopatogenních hlístic se specifickými bakteriemi, které by jinak nebyly schopné hostitele parazitovat (Bailey *et al.* 2010; Lacey, Georgis 2012).

Firma BIOCONT Brno nabízí biopreparáty na bázi entomopatogenních hlístic např. *Steinernema feltiae* proti larvám smutnic, nebo *Heterorhabditis megidis* proti larvám lakonosců. Obě larvy invazního stádia se v půdě pohybují aktivně a čichem vyhledávají hostitele. Do hostitele se dostávají trávícím nebo dýchacím ústrojím. Napadený jedinec do několika dnů hyne. V uhynulých larvách se hlístice dále množí a tím je zajištěna dlouhodobější ochrana. Aplikují se závlivkou nebo postřikem na dobře provlhčenou půdu. Nelze je používat současně s toxickými chemickými postřiky (Anonym III).

3 Charakteristika entomopatogenních hub

Houby jsou nejvýznamnější, nejznámější a nejpočetnější říši eukaryotických heterotrofních organismů. Nejnovější odhady založené na vysoce výkonných sekvenčních metodách naznačují, že existuje až 5,1 milionů druhů hub (Blackwell 2011). Z hlediska výživy se houby dělí na saprotrofy, parazity, saproparazity a symbionty. Saprotrofové získávají živiny z organických zbytků. Parazité napadají živé organismy a odnímají jim živiny. Saproparazité jsou po usmrcení hostitele schopny změnit svůj způsob výživy a přežívají jako saprotrofové na jeho usmrcených buňkách. Symbionti si vzájemně prospívají (Kalina, Váňa 2005).

Do této říše patří velká skupina hub využívána pro biologickou ochranu. Jedná se o entomopatogenní houby. Tato skupina je velmi fylogeneticky různorodá a zahrnuje také jednobuněčné kvasinky a vláknité (hyfální) houby. Rozmnožují se pohlavně (sexuálně) i nepohlavně (asexuálně) (Inglis *et al.* 2001). Jsou to entomopatogenní mikroorganismy asociované s hmyzem, schopné regulovat škodlivou populaci hmyzu. Je známo více než 750 druhů těchto hub, které mohou působit jako obligátní či fakultativní původci onemocnění na různých druzích hmyzu (Landa 1994). Onemocnění jsou nápadnější než jiné nákazy, snadno je můžeme pozorovat pouhým okem, protože hyfy prorostou na povrch mrtvého těla jedince. Entomopatogenní houby mohou být vysoce specifické vyskytující se pouze na jednom hostiteli, nebo na jeho jednom stádiu a jsou také druhy hub, které mají široký hostitelský okruh a napadají celou řadu druhů, rodů a čeledí. Některé skupiny těchto hub jsou vázány na různá prostředí, jako je vodní prostředí, půdní prostředí, provzdušněné prostředí vegetačního pokryvu nebo lidských příbytků. Také se vyskytují druhy hub, které žijí nejen na hmyzu, ale i na mrtvém substrátu organických zbytků semen, listů a kůry, další mohou mít vedle parazitického vztahu s hostitelem i vztah symbiotický (Weiser 1966).

Nejvýznamnější pro biologickou ochranu jsou oddělení Zygomycota a Ascomycota. Většina entomopatogenních druhů se vyskytuje v rámci řádů Entomophthorales a Moniliales. Napadají všechny hlavní skupiny hmyzu a roztočů, např. ploštice (Heteroptera), třásnokřídli (Thysanoptera), motýli (Lepidoptera), brouci (Coleoptera), švábi (Blattodea), rovnokřídli (Orthoptera), mšicosaví (Sternorrhyncha), dvoukřídli (Diptera) a svluškovití (Tetranychidae). Nejčastěji napadají larvy a kukly, ale mohou se vyskytovat na všech vývojových stádiích hmyzu. Řád Entomophthorales zahrnuje houby patřící do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a další. Jsou to obligátní parazité, kteří jsou striktně vázány na živého hostitele, a to je problém při výrobě biopreparátů. Řád Moniliales představuje fakultativní parazity, které je možné kultivovat na přirozených substrátech,

a proto se v současnosti hojně využívají ve formě standartních biopreparátů. Řadíme sem významné rody *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria* a *Lecanicillium* (Bailey *et al.* 2010).

3.1 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

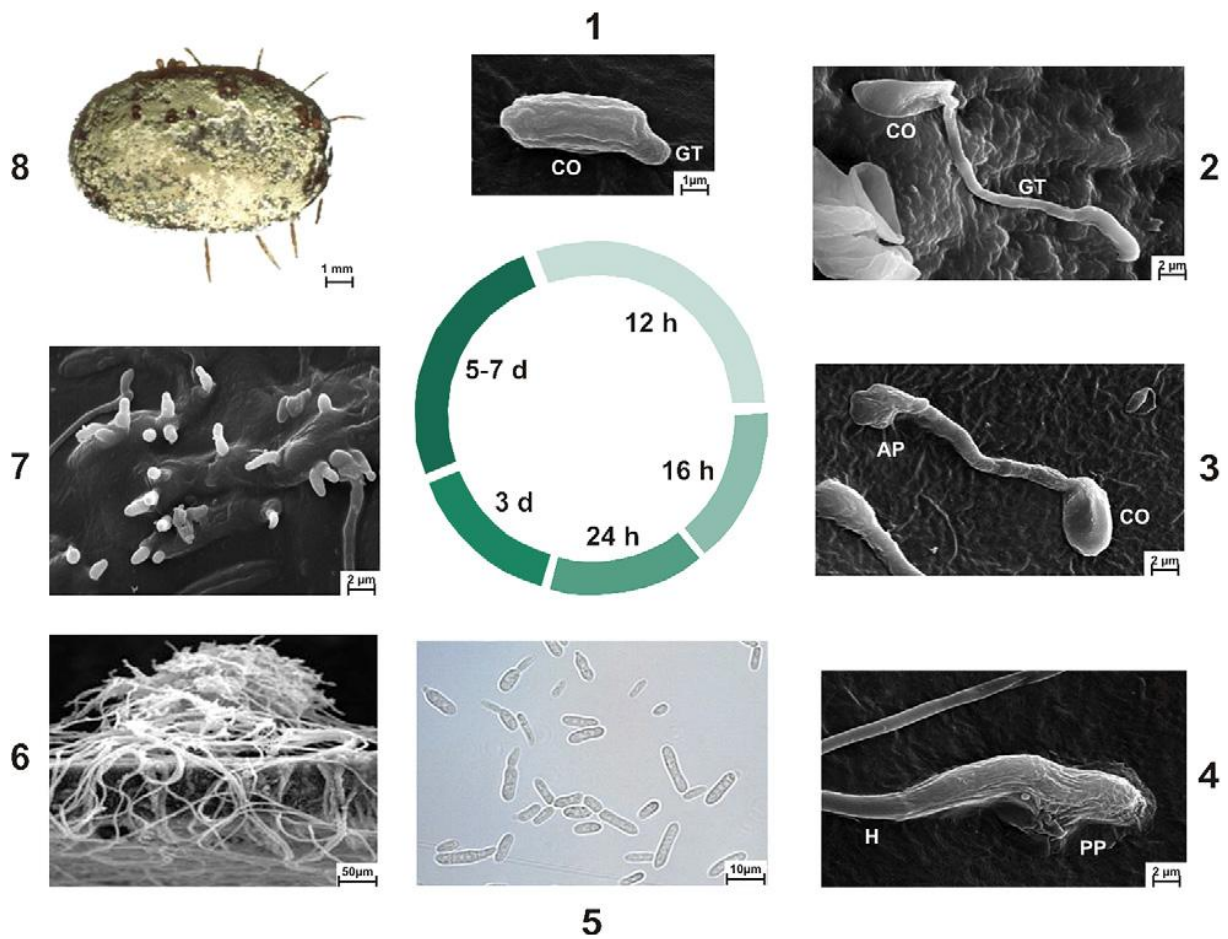
Vývojový cyklus entomopatogenních hub se skládá z parazitického a saprotrofního způsobu života a má několik fází. Patří sem uchycení virulentních konidií na povrch těla hostitele, klíčení, penetrace, proces rozpoznávání, který vyústí v přijetí patogena a navázání parazitického vztahu mezi hostitelem a patogenem, množení v hostiteli, usmrcení a tvorba nových infekčních struktur (Kůdela 1989).

Entomopatogenní houby infikují svého hostitele především přes vnější pokožku zvanou kutikula. Existují i druhy, které jsou schopny napadat hostitele přes trávicí trubici (*Culicinomyces*) (Inglis *et al.* 2001). Dalšími místy, kterými může houba proniknout do těla hmyzu, jsou otvory ústního ústrojí, dýchací otvory, otvory pohlavního aparátu, popřípadě přes různá poranění (Weiser 1966).

Houbová nákaza začíná uchycením konidií na povrch těla hmyzu (Inglis *et al.* 2001). U některých druhů hub zapojují konidie adhezní mechanismy, které slouží k vytvoření pevné vazby s kutikulou hmyzu již při prvním kontaktu (*Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodidis*, *Hirsutella thompsonii*) (Boucias *et al.* 1988; Boucias *et al.* 1991). U jiných druhů entomopatogenních hub (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*) dochází k produkci suchých hydrofobních konidií, kdy dochází k interakci mezi povrchovými proteiny konidie a lipidovou vrstvou pokožky hmyzu. Děje se tak prostřednictvím elektrostatických sil nebo molekulárních interakcí mezi látkami přítomnými na povrchu konidií a kutikuly hostitele, jako jsou hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny, steroly a jiné látky (Fang *et al.* 2007).

Po přichycení na povrch kutikuly začíná propagule produkovat penetrační struktury (klíček a apresorium). Pro proces klíčení není tolik významná výživa, protože konidie, které produkují entomopatogenní houby jsou energeticky ke klíčení vybaveny, ale velmi důležité jsou podmínky prostředí jako je teplota a relativní vzdušná vlhkost (Boucias *et al.* 1988). Při vhodných podmínkách dochází k nabobtnání konidie a začne se tvořit primární klíček. Houba v tomto stádiu začne přijímat živiny, které jsou součástí kutikuly a poté i živiny z vnitřních orgánů a tkání hostitele. Postupně se začíná formovat mycelium na povrchu hostitele (Landa 2002).

Schéma č. 1: Infekční cyklus houby *Metarhizium anisopliae* na modelovém organismu (*Ixodes*) (Upraveno podle Schrank, Vainstein 2010)



CO – konidie, GT – klíček, AP - apresorium, H – hyfy, PP – místo penetrace

- (1) Přilnutí konidie na povrch těla hostitele
- (2) Klíčení konidie
- (3) Produkce apresoria
- (4) Penetrace do pokožky
- (5) Diferenciace vláknité stélky houby na blastospory po proniknutí do hemolymfy
- (6) Kolonizace hostitele
- (7) Proliferace mycelia na povrch mrtvého hostitele
- (8) Sporulace na povrchu těla hostitele

Průnik entomopatogenních hub může být jak pasivní, tak i aktivní. Pasivní proniknutí je vázáno buď na přirozené otvory jako jsou dýchací, řitní a ústní otvory, nebo na poranění hmyzu. Aktivní penetrace probíhá přes kutikulu a patogen zde uplatňuje mechanické,

biochemické a fyzikální mechanismy. Proces penetrace spočívá v tom, že na konci klíčku se vytváří apresorium, kde jsou produkovány enzymy. Největší význam má produkce enzymů degradujících kutikulu (lipázy, chitinázy, proteázy) (Kůdela 1989). Následně se z apresoria formuje penetrační hrot, kterým patogen proniká do těla hmyzu mechanickým tlakem (Landa 2002). Předpokládá se, že enzymy společně působí synergicky v procesu infekce za účelem rozpuštění kutikuly hostitele. Dále poskytují houbě dostatečnou výživu a to umožňuje snadnější proniknutí do těla hostitele a následnou kolonizaci (Fang *et al.* 2007). Ne vždy se podaří proniknout do těla hostitele, protože zde působí určité negativní faktory. Patří sem podmínky prostředí, jako je teplota a relativní vzdušná vlhkost a inhibiční faktory v pokožce hostitele (Inglis *et al.* 2001).

Vniknutím do těla hostitele dochází ke kolonizaci tělních tkání a orgánů. V této fázi je typický přechod vláknitých forem entomopatogenních hub na rychle se dělící a pomnožující tělíška tzv. blastospory. Tyto tělíška se rychle namnoží pučením a roznesou se hemolymfou po celém organismu. V této fázi je již hostitel usmrcen a končí tím parazitická fáze vývojového cyklu (Weiser 1966).

Ve většině případů je usmrcení způsobeno vyčerpáním všech živin a mechanickým poškozením způsobeným rostoucím myceliem uvnitř těla hmyzu, ale také intoxikací hostitele. Některé rody produkují celou řadu toxinů, např. rod *Metarhizium*, *Beauveria* a *Tolypocladium*. Některé z nich, jako destruxin, beauvericin a efrapeptin mají významnou roli v procesu patogeneze (Hajek, St. Leger 1994).

Po usmrcení hostitele dochází k prorůstání houby na povrch těla hostitele a na vzdušném myceliu se vytvářejí konidiofory (saprotrofní vývoj patogena), na kterých vznikají nové konidie (Inglis *et al.* 2001). Z abiotických faktorů se na šíření infekčních propagulí hub v prostředí nejčastěji podílí voda a vzduch. Mohou se šířit větrem, deštěm, pohybem vody v půdě, nebo pomocí vodních par. Mezi běžné mechanismy vzniku houbových nákaz v populacích hmyzu patří kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými. Kontaminace může vzniknout například při kopulaci nebo při kladení vajíček. K šíření mykóz dochází i prostřednictvím biotických vektorů (např. roztoči, hád'átka, brouci a jiný hmyz) (Landa 2002).

Schéma č. 2: Saprotrófní fáze vývojového cyklu entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na larvě potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) (Foto: KRV, ZF, JU)



3.2 Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

Vnější prostředí představuje soubor všech biotických a abiotických faktorů, včetně člověka, který svou činností ovlivňuje prostředí a tím účinnost entomopatogenních hub v populacích hmyzu.

Biotické faktory

Biotické jevy mohou urychlovat (stimulace) nebo zpomalovat (inhibice) růst a množení patogenů (Kúdela 1989).

Patogen

Patogenita je schopnost patogena vyvolat onemocnění a závisí na celé řadě faktorů, včetně fyziologie hostitele (např. obranné mechanismy), fyziologie houby (např. produkce enzymů a toxinů) a životního prostředí. Houby mají široké spektrum hostitelů, ale toto spektrum se liší v závislosti na druhu hub. Například *Aschersonia aleyrodis* je úzce specializovaná jen na molice (Aleyrodoidea), *Nomuraea rileyi* napadá pouze motýly z čeledi Noctuidae. Naproti tomu druhy jako *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* mají široký okruh hostitelů z mnoha řádů členovců. Důležitým faktorem je také virulence patogena, která charakterizuje schopnost nebo účinnost patogena vyvolat infekci (Inglis *et al.* 2001).

Hostitel

Náchylnost hmyzu k entomopatogenním houbám ovlivňují fyziologické a morfologické faktory. Zahrnují hustotu populace, chování, věk, výživu, genetiku, zranění způsobené mechanicky nebo chemickými látkami a také zranění způsobené predátory a parazity. Nejvíce náchylné k infekcím jsou stresované organismy (nedostatečná výživa, expozice chemickým látkám, životní prostředí). Dalším důležitým faktorem je vývojové stádium hmyzu. Všechny etapy životního cyklu hmyzu nejsou stejně náchylné k infekci. V některých situacích jsou nedospělá stádia hmyzu náchylnější k infekci než dospělá stádia a naopak (Feng *et al.* 1985). Nejčastěji infikovaným stadiem hmyzu jsou larvy, případně kukly. Méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu (Landa 1998). Například mladé larvy zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) jsou náchylnější k infekci houbou *Beauveria bassiana* než larvy starších instarů (Feng *et al.* 1985). Naopak dospělci třásněnky západní (*Frankliniella occidentalis*) jsou náchylnější k infekci *Lecanicillium lecanii* než jejich larvy (Vestergaard *et al.* 1995). Vývoj nákazy může také ovlivnit vysoká teplota, která urychluje vývoj hmyzu, chování a samočištění hmyzu (Inglis *et al.* 2001).

Abiotické faktory

Bylo prokázáno, že na účinnost entomopatogenních hub se významně podílí faktory prostředí jako je teplota, vlhkost a sluneční záření (Inglis *et al.* 2001). Abiotické faktory ovlivňují zejména šíření konidií, klíčení konidií, penetraci invazní hyfy kutikulou a sporulaci patogena na mrtvém hostiteli (Drummond *et al.* 1987; Tanada, Kaya 1993).

Sluneční záření

Velmi citlivé na poškození slunečním zářením jsou konidie a hyfy všech taxonů. U všech entomopatogenních hub může dojít ke škodlivým změnám, zejména podílem ultrafialových paprsků UV spektra od 285 do 400 nm. UV záření je méně škodlivé než záření viditelné a infračervené (Fargues *et al.* 1997). K degradaci spor může dojít vlivem slunečního záření velmi rychle, a to už během několika hodin po aplikaci biopreparátů (Butt *et al.* 1999). Rychlá inaktivace infekčních propagulí je považována za hlavní překážku pro úspěšnou komercializaci entomopatogenních hub proti škůdcům polních plodin (Inglis *et al.* 2001). Nicméně, degradaci spor může být předejito použitím vhodné formulace. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub obsahují účinné agens, nutriční složku a inertní složku, která tvoří zejména různá ochranná aditiva (např. UV protektanty, antioxidanty) a přísady zvyšující přilnavost spor na povrch rostlin. Nutritivní složka poskytuje výživu propaguli po jejím zavedení do prostředí (Butt *et al.* 1999; Wraight, Carruthers 1999).

Teplota

Teplota je jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňující účinnost entomopatogenních hub. Okolní teplota ovlivňuje rychlost infekce a čas uhynutí škůdce. Například pro *Metarhizium anisopliae* je optimální teplota k infikování třásněnky 23 °C (Vestergaard *et al.* 1995), poklesem teploty o 3 – 5 °C se zrychlí čas úhynu přibližně o 1 den. Optimální teplota pro většinu hub je mezi 20 – 25 °C, ale infekce se může vyskytnout i při rozmezí od 15 – 30 °C. Inhibice a zastavení růstu nastává při teplotách vyšších jak 37 °C (Thomas 1997).

Vlhkost

Vlhkost ovlivňuje infekci a vývoj onemocnění hmyzu ve formě relativní vzdušné vlhkosti (Kúdela 1989). Relativní vzdušná vlhkost ovlivňuje houby ve více směrech. Důležitý vliv má na odolnost inokula, nejčastěji jsou konidie stabilnější v chladných a suchých podmínkách. Konidie některých druhů jako je například *Metarhizium anisopliae* lépe přežívají při vyšší relativní vlhkosti. Voda je velmi důležitá pro klíčení a také pro průběh konidiogeneze na mrtvém těle hmyzu. Klíčení u *M. anisopliae* se zastavuje při 92 – 94 % relativní vzdušné vlhkosti (Inglis *et al.* 2001).

Dešťové srážky a půda

Děšť pomáhá uvolňovat konidie a tím jsou schopné se přenášet vzduchem na další hostitelský organismus (Kůdela 1989). Půda je velmi složité prostředí, ve kterém působí na houby spousta faktorů. Patří sem půdní typ (textura, kationty, obsah organických látek, pH), vlhkost a půdní mikroflóra (Inglis *et al.* 2001).

3.3 Nejvýznamnější rody entomopatogenních hub

Rod *Lecanicillium*

Houby rodu *Lecanicillium* jsou důležitými patogeny hmyzu a některé izoláty jsou také patogenní pro fytopatogenní hádátka nebo jiné houby (Tichá 2001). Druhy rodu *Lecanicillium* mají široké hostitelské spektrum a byly izolované z různých řádů hmyzu. Nejčastěji způsobují spontánní epizootie v populacích hmyzu podřádu Sternorrhyncha (řád Hemiptera), zvláště pak v populacích různých druhů mšic, molic a červců (Hall 1976). Nejvýznamnějšími druhy jsou *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium muscarium* a *Lecanicillium longisporum*. Houba *Lecanicillium lecanii* byla poprvé popsána v roce 1861 po izolaci z červce *Coccus viridis* (Tichá 2001).



Obr. č. 1: Středová kultura entomopatogenní houby *Lecanicillium muscarium* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Obr. č. 2: Infikované puparium molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) entomopatogenní houbou *Lecanicillium muscarium* (Foto: KRV, ZF, JU)

Druh *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Gams & Zare byl dříve znám pod názvem *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. Přejmenování rodu bylo provedeno v roce 2001, kdy Zare a Gams (2001) provedli revizi rodu *Verticillium* a tento rod následně rozdělili do dvou rodů, na rod *Verticillium* a *Lecanicillium*. Do rodu *Lecanicillium* vyčlenili druhy vykazující entomopatogenní status. Druh *Lecanicillium muscarium* je komerčně využíván a je součástí

biopreparátu Mycotal, který je určen proti molicím s vedlejším efektem na larvy třásněnek a roztočů svilušek. Produkt vyrábí holandská firma Koppert (Anonym IV). Firma Koppert vyráběla dříve přípravek Vertalec, který obsahoval spory houby *Lecanicillium longisporum* a byl určen k regulaci populací mšic. Entomopatogenní houby rodu *Lecanicillium* působí i mykoparaziticky vůči jiným houbám. Mykoparazitická účinnost hub byla zaznamenána vůči houbové chorobě padlí (Askary *et al.* 1997; Goettel *et al.* 2008).

Houby rodu *Lecanicillium* vytváří bílé nebo krémové mycelium. Na tomto vzdušném myceliu vytváří dlouhé úzké lahvicovité konidiofory, kdy se na konci každého konidioforu tvoří elipsoidní konidie. Konidiofory jsou uspořádány v přeslenech a z jedné zóny protilehle vyrůstají 2, 3 až 4 konidiofory. Konidie se vyvíjejí postupně a vždy nová konidie odtlačuje dříve vytvořenou konidii do shluku, který má podobu kuličky. Konidie jsou drženy pospolu pomocí mucilaginózní hmoty, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Hall 1976).

Rod Beauveria

Houby rodu *Beauveria* jsou polyfágní druhy a v přírodě se běžně vyskytují v půdním prostředí, kde způsobují onemocnění na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která v půdě běžně žijí nebo v půdě pouze přezimují (Vega, Blackwell 2005). Běžně se vyskytující druhy jsou *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. tenella* a *B. amorfa*. U houby *B. bassiana* byla jako u jedné z prvních druhů entomopatogenních hub popsána a objasněna nákaza, neboť působila v 18. a 19. století devastující onemocnění v chovech bource morušového (*Bombyx mori*). *Beauveria bassiana* je schopna infikovat hmyz z různých řádů hmyzu, například řád rovnokřídlí (Orthoptera), brouci (Coleoptera), motýli (Lepidoptera) a v poslední době i druhy náležejících do podřádu Sternorrhyncha (Landa 1998; Shimazu *et al.* 2002). Nákazy vyvolané druhy rodu *Beauveria* jsou nazývány jako „bílá muskardina“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, bílým myceliem (Vega, Blackwell 2005). Houba *B. bassiana* a *B. caledonica* způsobuje i významné epizootie v populacích lýkožrouta smrkového (Landa *et al.* 2007).

Beauveria bassiana se vyznačuje bílými, později nažloutlými nebo příležitostně načervenalými koloniemi. Na vzdušném myceliu se formují hroznovitě uspořádané konidiofory. Na konidioforech se tvoří konidiogenní buňky, které mají kulovitou až baňkovitou bazální část a dlouhou apikální část (rachis), často zubovitě (zig-zag) formovanou. Na každém zubu se vytváří jedna jednobuněčná konidie. Konidie jsou hyalinní, kulovité až elipsoidní, zpravidla 2 – 3 × 2 – 2,5 μm velké. Shluky konidioforů s konidiemi vytváří shluky,

kteří vypadají na plně vysporulované kultuře jako bavlněné míčky (Humber 1997; Zimmermann 2007).



Obr. č. 3: Středová kultura entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Obr. č. 4: Dospělec lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) infikovaný entomopatogenní houbou *Beauveria bassiana* (Foto: KRV, ZF, JU)

Rod *Isaria*

Entomopatogenní druhy *I. fumosorosea*, *I. farinosa*, *I. tenuipes* a *I. javanica* reprezentují široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích mnoha řádů hmyzu, např. rovnokřídlí (Orthoptera), třásnokřídlí (Thysanoptera), polokřídlí (Hemiptera), brouci (Coleoptera), motýli (Lepidoptera) a dvoukřídlí (Diptera). Parazitují také na fytofágních roztočích (Tetranychidae) a některých druzích háďátek (cystotvorná háďátka z rodů *Globodera* a *Heterodera*). Tyto druhy dříve náležely do rodu *Paecilomyces*, ale díky nedávným závěrům fylogenetických studií, ve kterých byly posuzovány polyfyletické vztahy v rámci rodu *Paecilomyces*, byly tyto druhy přerazeny do nového rodu *Isaria* (Oborník *et al.* 2001; Luangsa-ard *et al.* 2004, Luangsa-ard *et al.* 2005; Inglis, Tigano 2006). V rodě *Paecilomyces* nadále zůstaly zařazeny například druhy *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii*, *P. marguandii* a *P. carneus*. Druh *Paecilomyces lilacinus* byl přejmenován v roce 2011 na *Purpureocillium lilacinum* (Luangsa-ard *et al.* 2011).

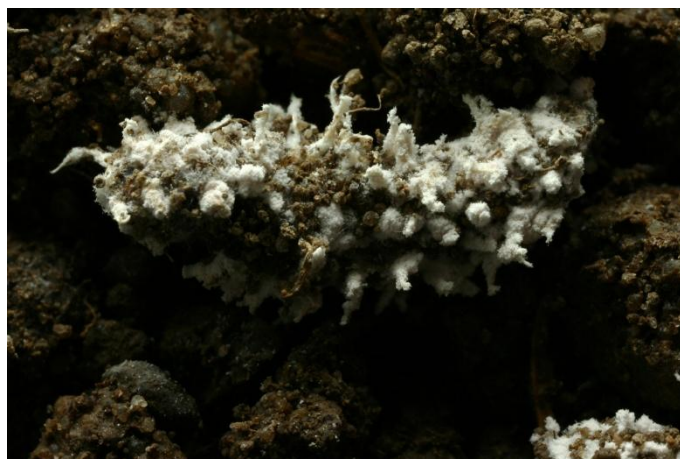
Nejvýznamnější druh *Isaria fumosorosea* je celosvětově rozšířen a je komerčně využíván. *I. fumosorosea* vykazuje nejen status entomopatogenní a akarifágní houby, ale za určitých okolností vykazuje i status mykoparazita. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na rzích a na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového (Kavková, Čurn 2005; Zimmermann 2008; Landa 2002).

Houba *I. fumosorosea* vytváří na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách zprvu bílé vatovité mycelium, které později mění barvu do odstínů narůžovělé, nafialovělé až

šedofialové barvy. Změna barvy kolonií přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Starší, plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter kolonie se mění v prašný, s povrchem zcela pokrytým obrovským množstvím konidií (Samson 1974; Landa 1994). Na hyfách se tvoří konidiofory, které jsou umístěny přeslenovitým způsobem. Na koncích konidioforů se následně formují konidiogenní buňky, na kterých se vytvářejí oválné konidie v řetízcích. V jednom řetízku konidií přichyceném na konidiogenní fialidě může být přítomno i více než 50 konidií (Samson 1974; Osborne, Landa 1992).



Obr. č. 5: Středová kultura entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Obr. č. 6: Houba *Isaria fumosorosea* izolovaná z půdního vzorku pomocí larvy potěmnicka moučného (*Tenebrio molitor*) (Foto: KRV, ZF, JU)

Rod *Aschersonia*

Houby rodu *Aschersonia* představují anamorfní stádia, jehož perfektní teleomorfní stádia patří do rodu *Hypocrella* (Ascomycotina, Sphaeriales). Rod *Aschersonia* je prezentovaná především tropickými a subtropickými druhy hub, které parazitují na nymfách mnoha druhů molíc a červců. Z toho vyplývá, že druhy rodu *Aschersonia* jsou úzce specializované (Fransen 1990; Osborne, Landa 1992). Důležitým druhem je *Aschersonia aleyrodis*. Byla jednou z prvních hub používaná v biologické ochraně proti hmyzím škůdcům v Severní Americe, kde se využila v citrusových hájích na Floridě proti molicím. Nedávný výzkum ukázal, že *Aschersonia aleyrodis* má vysokou toleranci při nízké relativní vlhkosti, dlouhou persistenci na povrchu listů a je kompatibilní s hmyzími parazitoidy. Tento výzkum také ukázal, že druhy *Aschersonia* pomalu rostou v kultuře a nenapadají všechny životní fáze hostitele (Liu *et al.* 2006).

Patogenní druhy tohoto rodu se vyznačují tím, že produkují husté bílé stroma, ve kterém se formují pyknidy s pestrobarevnými pyknosporami. Pyknospory jsou vytlačovány ve formě žlutého, oranžového nebo červeného exudátu „mucilagenu“ (Landa 2002). Běžnou

součástí mucilagenní masy pyknozor je β -karoten, který způsobuje nejen typické zbarvení samotné masy pyknozor, ale je i příčinou načervenalého zbarvení infikovaných larev (Landa *et al.* 1989).



Obr. č. 7: Středová kultura entomopatogenní houby *Aschersonia aleyrodis* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Obr. č. 8: Puparium molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) infikované entomopatogenní houbou *Aschersonia aleyrodis* (Foto: KRV, ZF, JU)

Rod *Hirsutella*

Do tohoto rodu náleží akarifágní druhy proti roztočům včetně svlušky chmelové (*Tetranychus urticae*) a nematofágní druhy proti háďátkům (*Heterodera*, *Globodera*, *Meloidogyne*). Patří sem významné druhy *Hirsutella thompsonii* a *H. kirchneri*. *Hirsutella thompsonii* je významná tím, že v horkém a vlhkém počasí může způsobit obrovské nákazy u roztočů, a proto je považována za jejich klíčového přirozeného nepřitele. Tento druh produkuje a vylučuje protein zvaný hirsutellin, který má silné insekticidní účinky. Hirsutellin vykazuje specifickou aktivitu proti různým hmyzím hostitelům a je významný v procesu patogeneze (Liu *et al.* 1995; Vey *et al.* 1993).

Rod *Nomuraea*

Významný druh z rodu *Nomuraea* je *Nomuraea rileyi*. Je to úzce specializovaný druh patogena, který napadá larvy motýlů rodu *Heliothis*, *Spodoptera*, *Pseudoplusia*, *Trichoplusia*, *Plutella* a *Rachiplusia*. Tato houba se využívá po celém světě, kde reguluje populace významných zemědělských škůdců. Více než třicet druhů motýlů je citlivé na tohoto patogena. Za vhodných podmínek *N. rileyi* snižuje až drasticky populace škůdců. Využívá se především ve Spojených státech amerických, Mexiku, Ekvádoru, Brazílii, Indii a Austrálii (Suwannakut *et al.* 2005).

Rod *Metarhizium*

Rod *Metarhizium* se skládá z pěti druhů: *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, *M. album*, *M. brunneum* a *M. guizhouense*. Druh *M. anisopliae* je možné rozdělit ještě do 4 poddruhů a to *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotium* a *M. anisopliae* var. *majus*. U rodu *Metarhizium* dosud nebyla objevena telemorfa. Známe pouze anamorfní stádium. Vyskytuje se výjimka u druhu *Metarhizium taii*, který má telemorfu *Cordyceps taii*, ale většina kmenů *Metarhizium anisopliae* ztratila schopnost se pohlavně reprodukovat (Driver *et al.* 2000).



Obr. č. 9: Středová kultura entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Obr. č. 10: Kukla potměnka moučného (*Tenebrio molitor*) infikovaná entomopatogenní houbou *Metarhizium anisopliae* (Foto: KRV, ZF, JU)

4 Nejvýznamnější druh *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin

4.1 Historie

Entomopatogenní houba *M. anisopliae* byla pojmenována podle hmyzu, ze kterého byla poprvé izolována a to z brouka jménem *Anisoplia austriaca* (listokaz pšeničný). Houba *M. anisopliae* byla poprvé nalezena Mečnikovem roku 1879 právě na tomto druhu brouka a popsal druh jako *Entomophthora anisopliae*. V roce 1878 se v Rusku uskutečnil na této houbě výzkum za účelem kontroly larev brouků na cukrové řepě (Bischoff *et al.* 2009). Sorokin následně druh v roce 1883 popsal a zařadil do rodu *Metarhizium* (Weiser 1966). První šetření o bezpečnosti a účinnosti této houby proti savcům provedl v roce 1968 Schaerffenberg. Později vznikly o bezpečnosti této houby publikace od mnoha autorů (Zimmermann 2007). Klasifikace rodu *Metarhizium* je založena na morfologických znacích a vedly se v ní o tomto rodu dlouhé spory, a proto byl rod opakovaně přezkoumáván (Kepler, Rehner 2013). První revizi rodu *Metarhizium* provedl Tulloch v roce 1976, který rod

přezkoumal, odlišil a následně určil druh *M. anisopliae* (Driver *et al.* 2000). Později Rombach *et al.* v letech 1986 - 1987 předložili klíč k identifikaci uznaných druhů rodu *Metarhizium*, včetně následujících taxonů: *M. album* Petch, *M. brunneum* Petch, *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin var. *anisopliae*, *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin var. *majus* (Johnston) Tulloch, *M. flavoviride* Gams a Rozsypal var. *flavoviride* a *M. flavoviride* Gams a Rozsypal var. *minus* Rombach, Humber a Roberts (Zimmermann 2007; Schneider *et al.* 2011; Kepler, Rehner 2013). Během posledních let byly izoláty druhu *M. anisopliae* charakterizovány pomocí různých molekulárních a dalších technik. Byla zkoumána genetická diverzita a genomová variabilita hlavně pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). V současné době byla taxonomie projednána a vědci došli k závěru, že morfologicky rozlišitelné jsou druhy *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, *M. album*, *M. brunneum* a *M. guizhouense* (Bidochka, Small 2005; Schneider *et al.* 2011; Kepler, Rehner 2013).

4.2 Taxonomické zařazení *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae se řadí do říše hub, oddělení vřeckovýtrusných hub zvaných Ascomycota, u kterých je pro všechny zástupce tohoto oddělení společná tvorba vřecek, ve kterých se formují askospory. Bylo vytvořeno také pomocné oddělení mitosporických hub (dříve Deuteromycotina) pro skupiny tzv. „nedokonalých“, „imperfektních“ a nedokonale prozkoumaných hub, které jsou známy pouze v anamorfní (nepohlavní) fázi. V pomocném oddělení Deuteromycotina je zařazeno velké množství druhů, ale díky moderním metodám se stále počet druhů snižuje tím, že se přefazují do taxonomie pravých hub (teleomorfní „pohlavní“ stádium) (Kalina, Váňa 2005). Dále se tento druh zařazuje do pomocné třídy Hyphomycetes. Do tohoto oddělení spadá až 10 000 saprotrofních druhů hub a zahrnuje pomocný řád Moniliales (Váňa 1998).

Tab. č. 1: Taxonomické zařazení entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na základě anamorfního stádia (Váňa 1998) a teleomorfního stádia (Sung *et al.* 2007).

Anamorfní stádium	Teleomorfní stádium
Pomocné pododdělení: Deuteromycota	Oddělení: Ascomycota
Pomocná třída: Hyphomycetes	Třída: Sordariomycetes
Pomocný řád: Moniliales	Řád: Hypocreales
-	Čeleď: Clavicipitaceae
Rod: <i>Metarhizium</i>	Rod: <i>Metacordyceps</i> (<i>Metarhizium</i>)
Druh: <i>Metarhizium anisopliae</i>	Druh: <i>Metacordyceps taii</i> (<i>Metarhizium taii</i>)

Teleomorfní stádium je známo jen u druhu anamorfního stádia *Metarhizium taiti* a nazývá se *Metacordyceps taiti*, nicméně se předpokládá, že všechny druhy rodu *Metarhizium* mají teleomorfní stádium, které ale doposud nebylo popsáno. Zařazujeme jej do říše hub, oddělení Ascomycota a velké třídy Sordariomycetes. Tato třída se vyznačuje tím, že tvoří plodnice perithecia, výjimečně i kleistothecia a unitunikátní nebo prototunikátní vřecka. Zahrnuje více jak 600 rodů hub a napadá širokou škálu patogenů, rostlin, zvířat a mykoparazitů. Řád, do kterého patří teleomorfní stádium, se nazývá Hypocreales a čeleď se nazývá Clavicipitaceae. Clavicipitaceae je čeleď hub, která se vyskytuje ve všech suchozemských ekosystémech včetně tropických oblastí. Houby v této čeledi jsou snadno rozpoznatelné podle morfologie aska a askospor. Aska jsou dlouhá, válcovitá s výrazným vrcholem a obsahují dlouhé, nitkovité askospory (Sung *et al.* 2007).

Tab. č. 2: Souhrn vybraných významných teleomorfních a anamorfních stádií entomopatogenních hub náležejících do řádu Hypocreales (Sung *et al.* 2007)

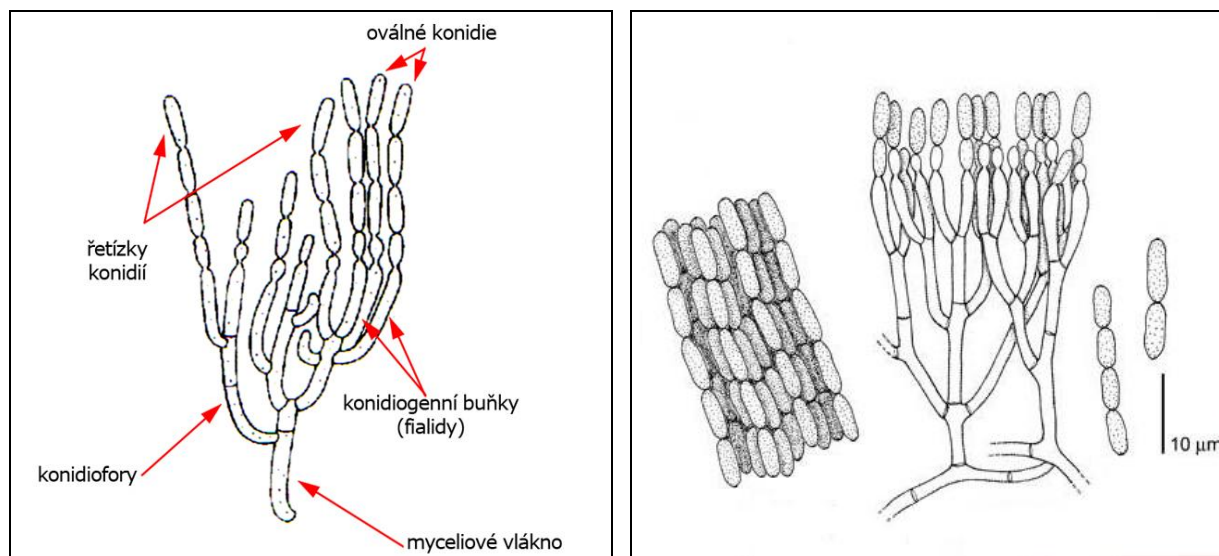
ČELEĎ			
	Clavicipitaceae	Cordycipitaceae	Ophiocordycipitaceae
Teleomorfa	<i>Hypocrella, Metacordyceps, Regiocrella, Torrubiella</i>	<i>Cordyceps s.str., Torrubiella</i>	<i>Ophiocordyceps, Elaphocordyceps</i>
Anamorfa	<i>Aschersonia, Metarhizium, Nomuraea, Paecilomyces, Pochonia, Rotiferophthora, Verticillium</i>	<i>Beauveria, Engyodontium, Isaria, Lecanicillium, Mariannaea, Microhilum, Simplicillium</i>	<i>Haptocillium, Harposporium, Hirsutella, Hymenostilbe, Paecilomyces, Paraisaria, Sorosporella, Syngliocladium, Tolypocladium, Verticillium</i>

4.3 Morfologická charakteristika

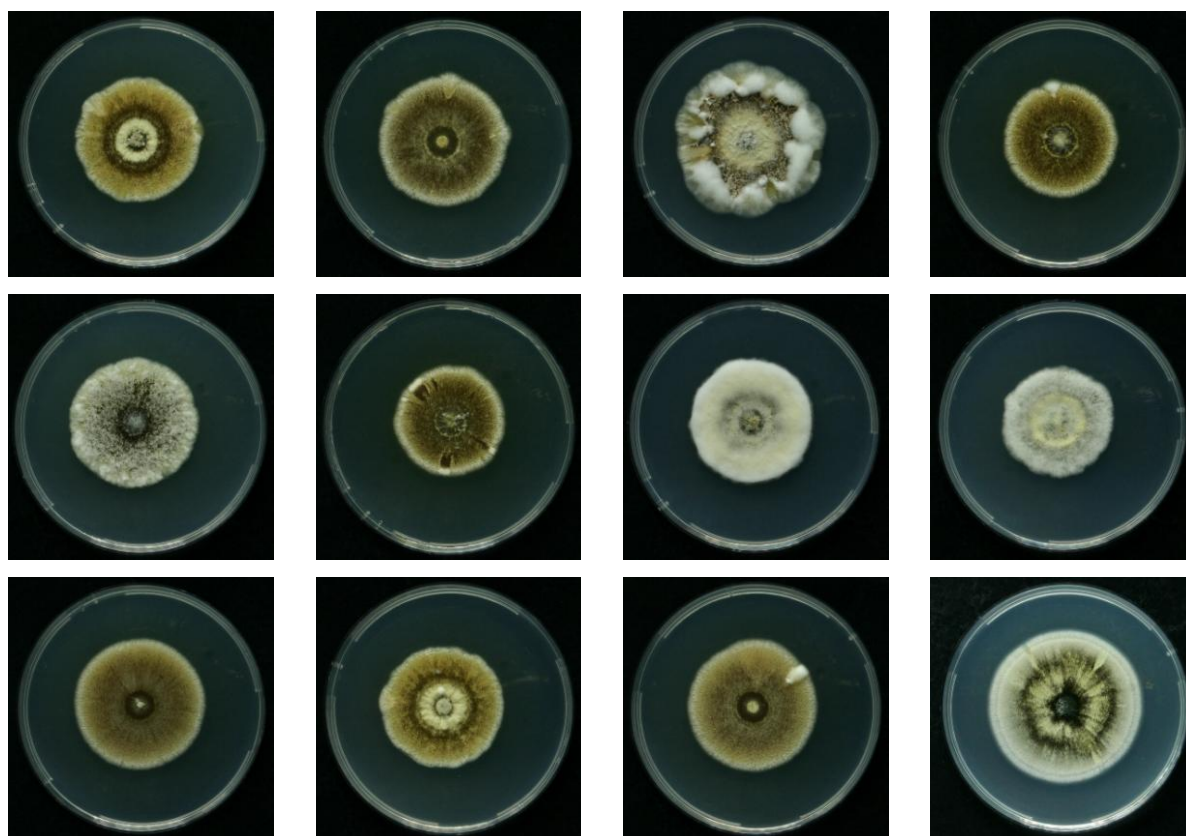
Houba *M. anisopliae* infikuje vnímavé hostitele přímým průnikem přes kutikulu. Infekce jsou snadno rozpoznatelné několik dní po smrti hostitele. Zpočátku je hostitel pokryt bílým myceliem a postupně se mycelium zbarvuje do zelena v závislosti na stupni sporulace. Nákazy vyvolané druhy hub rodu *Metarhizium* jsou označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem (Weiser 1966). V závislosti na druhu a rodokmenu hub rodu *Metarhizium* se kultury zbarvují od bílé, žluté, hnědé a zelené barvy. Mezi zástupce rodu *Metarhizium* jsou řazeny *M. anisopliae* (konidie válcovité až hranolovité, 5 - 8 x 2,5 - 3,5 µm), *M. flavoviridae* (konidie válcovité až

hranolovité, $6,5 - 11 \times 3,5 - 5 \mu\text{m}$) a *M. majus* (konidie válcovité, $8,5 - 14,5 \times 2,5 - 5,0 \mu\text{m}$) (Anonym V).

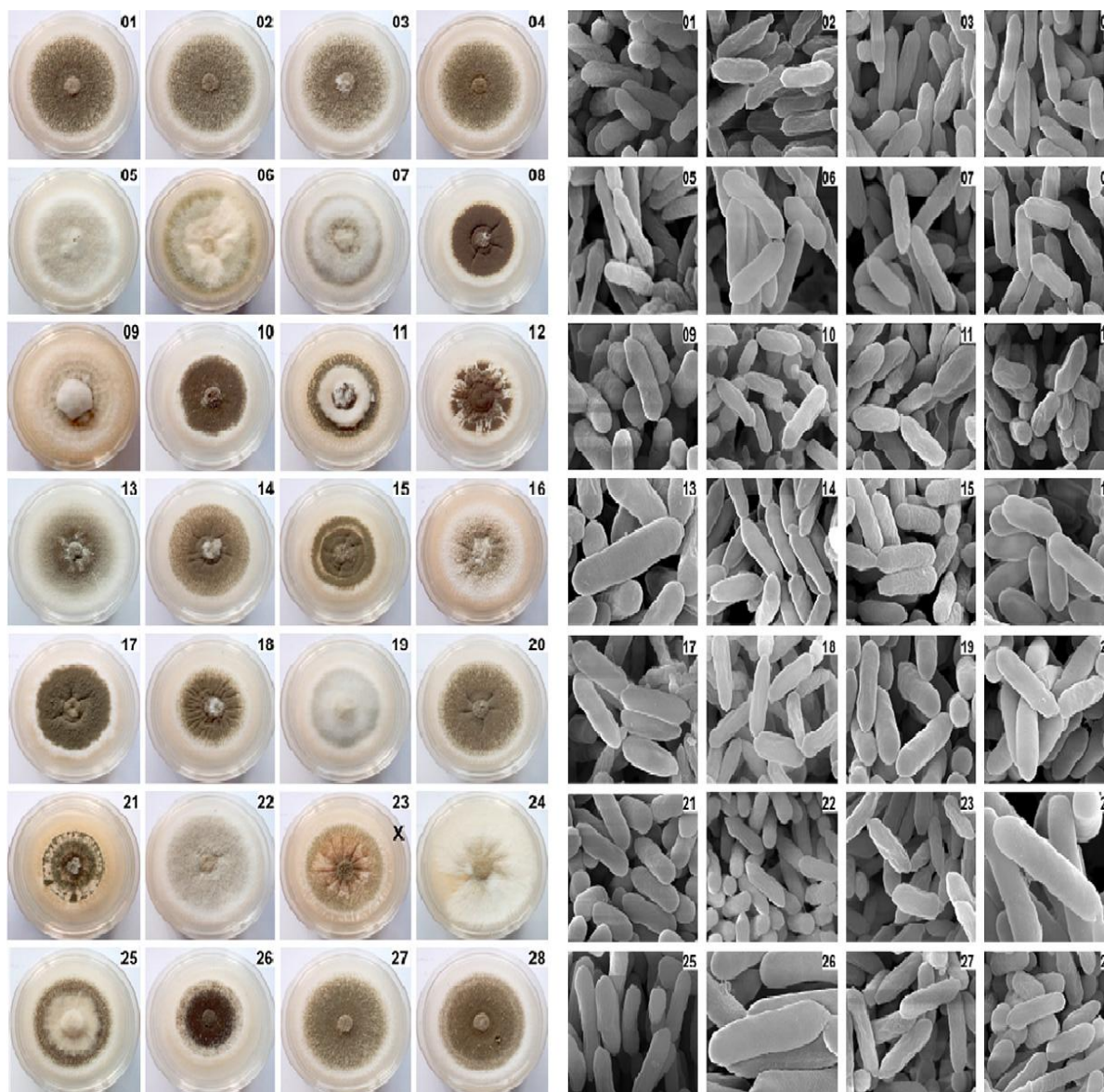
Obr. č. 11: Morfologické struktury entomopatogenní houby *M. anisopliae* (Anonym VI)



Obr. č. 12: Morfologické rozdíly vybraných kmenů druhu *M. anisopliae* izolovaných z půd v regionu Jižní Čechy (Foto: KRV, ZF, JU)



Obr. č. 13: Ukázka biodiverzity různých kmenů druhu *M. anisopliae* a snímky jejich konidií pořízených ze S.E.M. (Upraveno podle Schrank, Vainstein 2010)



4.4 Rozšíření

Entomopatogenní houba *M. anisopliae* se vyskytuje téměř na celém světě včetně tropů a mírného pásu. Používá se na ochranu proti hmyzu v mnoha zemích hlavně ve Spojených státech amerických, Brazílii, Austrálii a Filipínách (Bischoff *et al.* 2009).

Rod *Metarhizium* je půdní saprofyt a zcela běžně se vyskytuje v zemědělských i nezemědělských půdách a v lesních ekosystémech v celé oblasti mírného pásma. Nedávno bylo zjištěno, že houby rodu *Metarhizium* žijí v těsné asociaci v rhizosféře s kořeny rostlin a přežívají v jejich blízkosti lépe, než když se vyskytují jen volně v půdě (Bruck 2005).

4.5 Hostitelské spektrum

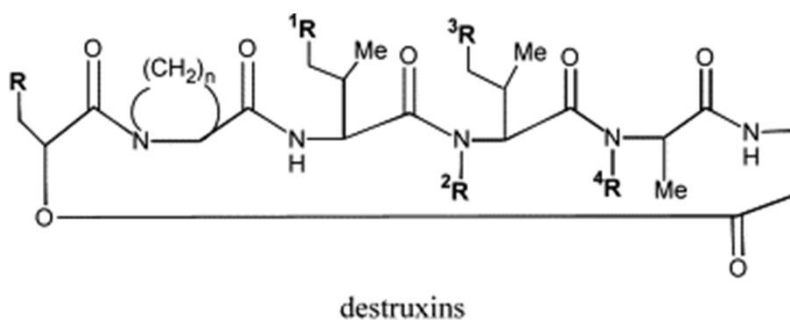
Druh *M. anisopliae* se vyznačuje tím, že je široce polyfágní. Parazituje na široké škále hmyzu, ale v závislosti na jednotlivých kmenech *M. anisopliae* může napadat i daného specifického hostitele. Napadá až 200 druhů členovců náležejících do více než 50 řádů, rovnokřídli (Orthoptera), dvoukřídli (Diptera), polokřídli (Hemiptera), motýli (Lepidoptera) a brouci (Coleoptera) (Bischoff *et al.* 2009). *M. anisopliae* je houba vázaná na vlhké a teplé prostředí, nejčastěji se vyskytuje na půdním hmyzu nebo na hmyzu žijícím na povrchu půdy. Běžně se vyskytuje u ponrav, kukel a dospělců chroustů (*Melolontha melolontha*, *M. hippocastani*, *Amphimallon majalis*, *Anisoplia austriaca*, *Oryctes rhinoceros*, *Bothynoderes punctiventris*, *Otiorhynchus ligustici*). Vyskytuje se u housenek můr (*Autographa gamma*, *Agrotis segetum*) a u škvorů (*Forficula auricularia*). Byly zaznamenány i výskyty onemocnění hmyzu houbami rodu *Metarhizium* žijících na nadzemních částech rostlin i u skladištních škůdců (*Ephestia kuehniella*) (Weiser 1966).

4.6 Produkce toxinů

Destruxin

Některé kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae* produkují sekundární metabolit destruxin, který je toxický. Destruxin produkují zejména variety *M. anisopliae* var. *anisopliae* a *M. anisopliae* var. *majus*. Tento sekundární metabolit byl poprvé zaznamenán v roce 1961. Název destruxin je odvozen z názvu entomopatogenní houby *Oospora destructor*, ze které byl poprvé izolován a název se do dnešní doby zachoval (Pedras *et al.* 2002). Destruxin je cyklický depsipeptid a je složen z α -hydroxykyseliny a pěti aminokyselinových zbytků. Depsipeptidy jsou podobné peptidům, ale peptidická (amidová) vazba je nahrazena depsipeptidickou (esterovou) vazbou (Morel *et al.* 1983).

Obr. č. 14: Chemická struktura destruxinu (Pedras *et al.* 2002)



Je to látka, která má insekticidní a fyto toxické účinky. Destruxin je velmi významným faktorem virulence, který urychluje smrt infikovaného hmyzu. Je popsáno 38 druhů tohoto toxinu a rozděluje se do 5 skupin označených A až E (Hu *et al.* 2006). Většina druhů destruxinu byla izolována z kultur *M. anisopliae*, které napadají hmyz. Méně bylo izolováno z jiných druhů hub, které jsou rostlinnými patogeny. Další houbové kultury, z kterých byl destruxin izolován jsou např. *Trichotecium roseum*, *Alternaria brassicae*, *Ophiosphaerella herpotrich* a *Nigrosabulum globosum* (Pedras *et al.* 2002). Přítomnost destruxinu v extraktech z houbových kultur můžeme detekovat pomocí chromatografie na tenké vrstvě nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (Kaijiang, Roberts 1986).

Zároveň Pedras *et al.* (2002) zjistili, že destruxin má i antivirové účinky a je účinný proti virové hepatitidě B. Depsipeptidy se také studují pro jejich toxicitu na rakovinné buňky. Byly pozorovány významné cytotoxické účinky na leukemické buňky a lymfocyty sleziny léčené destruxinem (Morel *et al.* 1983).

Cytochalsin a swainsonin

Další sekundární metabolity, které byly izolovány z houby *M. anisopliae* jsou cytochalsin a swainsonin. Oba metabolity patří mezi ukazatele patogenity, zvyšují infekci a kolonizaci hostitele hmyzu. Cytochalsin a swainsonin mají též významný potenciál v medicíně při léčbě rakoviny (Zimmermann 2007).

4.7 Izolace a kultivace *Metarhizium anisopliae*

Houba *M. anisopliae* spolu s dalším významným druhem entomopatogenní houby *B. bassiana* patří mezi nejrozšířenější druhy využívané v biologické ochraně rostlin. Nejméně 12 druhů a poddruhů hub je využíváno jako aktivních látek, na kterých jsou koncipovány myko insekticidy a myko akaricidy využívané v biologické ochraně rostlin (Faria, Wraight 2007).

Pro izolaci *M. anisopliae* se používají dvě metody a to metoda využívající selektivní média a metoda využívající živé návnady. Pro příklad se využívají larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*) a larvy květilék rodu *Delia* (Klingen *et al.* 2001; Zimmermann 2007). Základem selektivního média mohou být různé živné půdy, které jsou obohaceny o selektivní složky jako je fungicidní účinná látka dodine (N-dodecylguanidine monoacetate) a antibiotika jako je cykloheximid, chloramfenikol, streptomycin a tetracyklin (Chase *et al.* 1986; Shimazu, Sato 1996). Metoda návnady se

používá k monitoringu přirozeného výskytu *M. anisopliae* v různých typech půdy, oblasti nebo zemí (Vänninen 1995; Klingen *et al.* 2001; Zimmermann 2007).

Tab. č. 3: Přehled entomopatogenních druhů/poddruhů hub inkorporovaných do biopreparátů a jejich status komerčního využití v rámci biologické ochrany rostlin (Faria, Wraight 2007)

Druh entomopatogenní houby/varieta	Počet produktů	Komerční status		
		Aktivní	Neaktivní	Nezjištěno
<i>Aschersonia aleyrodis</i> Webber	1 (0.6%)	0	1	0
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.	58 (33.9%)	45	9	4
<i>Beauveria brongniartii</i> (Sacc.) Petch	7 (4.1%)	5	0	2
<i>Hirsutella thompsonii</i> F.E.Fisher	3 (1.8%)	1	1	1
<i>Isaria fumosorosea</i> Wize	10 (5.8%)	7	1	2
<i>Isaria</i> sp.	1 (0.6%)	1	0	0
<i>Lecanicillium longisporum</i> (Petch) R.Zare & W.Gams	2 (1.2%)	2	0	0
<i>Lecanicillium muscarium</i> (Petch) R.Zare & W.Gams	3 (1.8%)	3	0	0
<i>Lecanicillium</i> sp.	11 (6.4%)	10	0	1
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	58 (33.9%)	44	10	4
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Driver & Milner	3 (1.8%)	3	0	0
<i>Nomuraea rileyi</i> (Farl.) Samson	1 (0.6%)	0	0	1

4.8 Produkce houby *Metarhizium anisopliae*

Pro výrobu biopreparátů se využívají konidie houby. Konidie se produkují v *in vitro* systémech povrchových kultivací na tekutých živných půdách nebo na přirozených substrátech (Landa 2002). Při výrobě biopreparátu je nezbytné, aby byl vybraný kmen dobře udržovaný. Matečné kultury musí být čisté a pečlivě uchovávané, aby se neztratila životaschopnost a virulence konidií. Tekuté živné půdy podporují rychlý růst mycelia. Je to nejekonomičtější způsob výroby (Landa 1998). Tam, kde je to možné, se průmyslově výroba hub provádí v kapalně kultuře ve fermentačním zařízení. Nevýhodou je, že vzdušné konidie se nemohou produkovat v kapalně kultuře, protože potřebují dostatečné množství vzduchu. Kapalně médium se využívá v prvním fázi produkce (inokulační fáze) a obsahuje zásobu sacharidů (C zdroj) a dusíku (N zdroj), které jsou nezbytné pro růst biomasy houby. Druhá fáze masové produkce je realizována na pevném substrátu, kde houba vytváří vzdušné konidie (Anonym VII; Jackson *et al.* 2010).

Jako pevný substrát se využívají ječné kroupy, vločky, rýže, proso, kukuřice nebo pšeničné otruby (Goettel, Inglis 1997). V minulosti se používaly jako přirozené substráty i pивní mláto, nakrájené sterilizované brambory, mrkev, cukrovka, řepa a naklíčená kukuřice nebo rozdrcené zrno kukuřice. Ke kultivaci se využívaly také vysterilizované listy, hnůj nebo mrtvý hmyz (Weiser 1966). Všechno jsou to přírodní produkty, u kterých však neznáme množství živin, které houba pro svůj růst využívá, jako je tomu u tekutých živných půd, kde je přesně definované složení živin. Při kultivaci využívají houby v průběhu růstu a sporulace určitý podíl živin, ale většina zůstane nevyužita. Dalším krokem výroby biopreparátu je sušení a sklizeň konidií. Po kultivační fázi se jednotlivé nádoby se substrátem otevřou a vyprodukované konidie se nechají usušit na vzduchu. Po usušení konidií se houba sklízí pomocí různých sklízecích zařízení. Během sklizně se mohou ke konidiím přidávat různé inertní nebo nutriční nosiče, které jsou součástí finální formulace. Konidie mohou být formulovány v oleji, nebo ponechány na substrátu a jako takové finalizovány do biopreparátu (Anonym VII; Jackson *et al.* 2010).

Během celé fáze kultivace a konečného procesu výroby biopreparátu se provádí kontrola kvality. Konidie musí být životaschopné a bez kontaminujících látek. Finální produkt musí splňovat předem stanovené podmínky, které uvádí firmy na etiketách produktů. Nejdůležitějším parametrem je CFU „Colony Forming Units“ (počet jednotek tvořících kolonie) v 1 gramu produktu. Další parametry, které se v kontrolních laboratořích sledují, jsou garance druhu/kmenu, životaschopnost konidií, virulence kmene, obsah vlhkosti biopreparátu a velikost částic formulace (Anonym VII). Např. biopreparát Met52 je v současné době registrován jako přípravek na bázi rýžových zrn s konidiemi (Jenkins, Goettel 1997). Přípravky na bázi oleje umožňují použití i v horkém a suchém prostředí. Zásadní průlom v aplikaci preparátů na bázi oleje byl v programu LUBILOSA. Během tohoto programu byl vyvinut biopreparát Green Muscle® na bázi houby *M. anisopliae* var. *acridum*, ve kterém jsou konidie formulovány v minerálním oleji. Olejové formulace zlepšují kontakt mezi konidiemi a hydrofobní pokožkou hmyzu. Tímto způsobem se snižuje závislost *M. anisopliae* na relativní vzdušné vlhkosti a dostupnosti volné vody v (Anonym VII).

4.9 Biologické přípravy na bázi *Metarhizium anisopliae*

Entomopatogenní houby jsou mikroorganismy, které specificky infikují a zabíjejí škodlivý hmyz a další členovce. Použití těchto hub jako biopreparátů neustále získává na popularitě. Každý rok se stále více komerčně vyrábí po celém světě z důvodu obav negativních dopadů chemických insekticidů na životní prostředí (Jaronski 2014). Účinnou

složkou většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub jsou konidie nebo blastospory. Konidie jsou produkovány v *in vitro* systémech povrchových kultivací na tekutých živných půdách nebo na přirozených substrátech. Blastospory jsou produkovány fermentačními technologiemi pomocí submerzní kultivace v tekutém živném médiu (Landa 2002).

Tab. č. 4: Příklady některých registrovaných biopreparátů na bázi vláknitých entomopatogenních hub (upraveno podle Landa 2002)

Druh patogenní houby	Obchodní název	Výrobce	Země registrace
<i>Beauveria bassiana</i>	Naturalis-L	Troy Biosciences	USA, státy EU
	Naturalis-H&G	Troy Biosciences	USA, státy EU
	Naturalis-O	Troy Biosciences	USA, státy EU
	Ostrinil	Natural Plant Protection	USA
	Mycotrol-ES	Mycotech	USA
	Mycotrol-O	Mycotech	USA
	Botanigard 22WP	Mycotech	USA
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bio-Blast	EcoScience	USA
	Bio1020	Bayer	Německo
	Met52	Novozyme	Dánsko
	Green Muscle	CABI	Velká Británie
<i>Isaria fumosoroseus</i>	PFR 97 20% WDG	Certis	USA, státy EU,
	PreFeRal	Biobest NV	Japonsko a další
	NoFly	Futureco Bioscience	Španělsko
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Vertalec	Koppert B.V.	USA, státy EU
	Mycotal	Koppert B.V.	USA, státy EU

Jak již bylo uvedeno, *M. anisopliae* je velmi fylogeneticky rozmanitý druh. Je patogenní pro více jak 200 druhů hmyzu. O tomto patogenu je publikováno velké množství informací. Výhodou druhu *M. anisopliae* je, že konidie je možné snadno vyprodukovat (Moore *et al.* 1995). Faria a Wraight (2007) uvedli, že do roku 2007 bylo ve světě komerčně vyráběno až 58 biopreparátů na bázi *M. anisopliae*. Ale vzhledem k nedávným taxonomickým změnám rodu *Metarhizium*, není možné určit přesně druhové zastoupení v jednotlivých biopreparátech, jako jsou např. Green Muscle® a Met52 (Bischoff *et al.* 2009; Schneider *et al.* 2011; Kepler, Rehner 2013; Behle *et al.* 2013).

4.9.1 Příklady některých biopreparátů na bázi *Metarhizium anisopliae*

Met52 G

Biopreparát Met52 G je vyráběn a distribuován firmou Novozymes Biologicals BioAg Group. Produkt obsahuje přirozeně se vyskytující půdní houbu *M. anisopliae* kmene F52. Met52 G obsahuje 2 % aktivní složky, tj. druh *M. anisopliae* kmen F52 a inertní složka přípravku tvoří 98 %. Met52 G obsahuje minimálně 9×10^8 CFU v 1 gramu přípravku.

Granulovaný Met52 G se používá např. proti larvám a vajíčkům lalokonosce rýhovaného (*Otiorhynchus sulcatus*) a lalokonosce vejčitého (*Otiorhynchus ovatus*). Je velmi účinný na všechny larvální instary lalokonosců, které mohou napadat více než 100 druhů rostlin. Tento biopreparát byl schválen pro plodiny, které se pěstují v polních podmínkách i ve sklenících. Může být použit v lesních školkách, do okrasných květin, víceletých píceňin, jahod, rybízu, angreštu, malin a vinné révy. Mezi výhody využití tohoto biopreparátu patří snadné použití, preventivní aplikace, nezanechává v půdě žádná rezidua a není toxický. Další výhodou je jeho doba účinnosti. Rostliny může chránit proti škůdcům po celou dobu vegetační sezóny, je kompatibilní s jinými přípravky na ochranu rostlin a lze jej využít i v ekologickém zemědělství a v rámci integrované ochrany rostlin. Met52 G je distribuován v baleních od 1 do 10 kg. Doporučuje se aplikovat v dávce $0,5 \text{ kg/m}^3$ pěstebního substrátu. Optimální teplota účinnosti biopreparátu je v rozmezí 15 – 30 °C (Anonym VIII). Biopreparát Met52 byl v minulosti vyráběn pod názvem BIO 1020.

Obr. č. 15: Komerční balení biopreparátu Met52 G a Met52 ES (Anonym IX)



Met52 EC

Tento biopreparát je vyroben na základě emulgovaného koncentrátu a také se hojně využívá v biologické a integrované ochraně rostlin jako kontaktní bioinsekticid. Met52 EC stejně jako Met52 G obsahuje entomopatogenní houbu *M. anisopliae* kmen F52. Oba biopreparáty mají stejný infekční mechanismus účinku a význam. Jediný rozdíl je ve formulaci, ve které se oba preparáty distribuují. Spory Met52 EC se suspendují v emulgovaném oleji, proto je tento biopreparát vhodný na postřik půdy. Formulaci můžeme využít proti škůdcům (trásněnkám, roztočům, molicím), kteří vážně poškozují skleníkové kultury, kam řadíme papriky, rajčata, cukety, jahody a další. Tento preparát je také vhodný k regulaci nosatců a klíšťat (Anonym X).

BIO-Blast

Bio-Blast je komerčně vyráběný mykoinsekticid na bázi kmene ESF1 houby *M. anisopliae*. Produkt vyrábí firma EcoScience Corporation v USA. Tento kmen je patogenní vůči mnoha ekonomicky významným škůdcům jak v domácnosti, tak i v zemědělství. Aplikuje se hlavně na šváby, mouchy a termity. Proti termitům se tento preparát aplikuje do dřeva nebo postřikem přímo na populaci termitů. Zasažení termiti mohou infekci roznášet dále do hnízda a spory ulpělé na jejich těle přenášet na zdravé jedince. Jde o tzv. horizontální přenos, kdy se infekce šíří z jedince na jedince v koloniích termitů. Laboratorní studie ukázaly, že dochází k usmrcení během 4 až 10 dnů v závislosti na teplotě. Tento kmen není toxický, ale u lidí může způsobovat alergické reakce, když se houba přímo vdechne (Quarles 1995).

Green Muscle®

Mykopesticid Green Muscle® byl vyvinut v rámci výzkumného programu LUBILOSA. Green Muscle® se stal průlomovým biopesticidem hlavně v Africe. Aktivní složkou je houba *M. anisopliae* var. *acridum*, kmen IMI 330189. Biopreparát napadá specificky pouze kobylky (Acridoidea, Pyrgomorphoidea), sarančata a cikády. Je široce uplatňován v Africe a za příznivých podmínek způsobuje až lokální epidemie kobylek. Roje kobylek a cikád velmi dlouho znepríjemňovaly život farmářům v Africe i po celém světě. Green Muscle® byl aplikován letecky postřikem a zjistilo se, že je až třikrát účinnější, než při použití chemických insekticidů. V rámci projektu LUBILOSA byla aplikace Green Muscle® méně nákladná ve srovnání s použitím chemických insekticidů. Spory *M. anisopliae* var. *acridum* jsou snadno masově produkovány. Green Muscle® je k dispozici ve formě suchého

prášku, nebo na bázi oleje. Po namíchání suspenze vzniká tmavě zelená tekutina, která se může aplikovat ručně nebo letecky. V případě olejové formulace jsou spory entomopatogenní houby chráněny proti slunečnímu záření a zároveň olej poskytuje sporám vyšší vlhkost, která je pro klíčení v Africe nezbytná. Jakmile jsou sarančata a kobylky zasaženy, dojde k infekci a zemřou během 4 až 10 dnů. Tento přípravek nemá žádné vedlejší účinky k necílovým organismům, přirozeným nepřítelům, lidem a je bezpečný pro životní prostředí. Nezpůsobuje ani fytotoxicitu (Anonym VII; Douthwaite *et al.* 2001).

BioCane

Biopreparát byl vyvinut na základě devastujících účinků škůdců na cukrové třtině v Austrálii. V roce 2000 byl tento přípravek zaregistrován a dnes je produkován firmou Becker Underwood Pty Ltd. V Austrálii. Je to biopesticid, jehož aktivní složkou je entomopatogenní houba *M. anisopliae* var. *anisopliae*, kmen FI-1045. Byl vyvinut hlavně proti brouku *Dermolepida albohirtum* (Coleoptera: Scarabaeidae), jehož larvy požírají kořeny cukrové třtiny. BioCane je dostupný ve formě granulí, které tvoří porostlé zrno rýže. Po aplikaci jsou spory odolné, a jsou schopny přežít v prostředí bez přítomnosti hostitelů (Samson *et al.* 2001).

Forestina Substrát supresivní pro výsev a množení

V České republice není registrován žádný biopreparát na bázi entomopatogenní houby *M. anisopliae*. Na trhu již však existuje substrát, který tento druh houby obsahuje. Jedná se o Supresivní substrát pro výsev a množení, který je vyráběn firmou Forestina. Supresivní výsevní substrát je určen speciálně pro výsevy a množení rostlin. Je připraven ze směsi vytříděné světlé a tmavé rašeliny s upravenou pH reakcí a perlitem. Je vhodný jak k setí semen, tak i k přepichování řízků rostlin. Substrát je obohacen hnojivem se základními i stopovými živinami v nezbytném rozsahu, což má vliv na bezproblémové zakořeňování řízků a klíčení výsevů. Substrát obsahuje dva druhy hub potlačující původce významných houbových onemocnění (*Trichoderma virens*) a preventivně působící proti hmyzím škůdcům (*Metarhizium anisopliae*) (Anonym XI).

Obr. č. 16: Ukázka balení Supresivního substrátu určeného pro výsev a množení rostlin (Anonym XI)



4.10 Příklady využití biopreparátu Met52 na vybraných hostitelích

Houba *M. anisopliae* je druh, který má široký hostitelský okruh. V této kapitole je uvedena účinnost kmene F52 na třech vybraných hostitelích.

Klíště obecné (*Ixodes scapularis*)

Tento velmi nebezpečný roztoč (Acari: Ixodidae) způsobuje klíšťovou encefalitidu a lymfskou boreliózu. Každým rokem se zvyšuje počet nakažených lidí některou z těchto nemocí. Obrovská populace klíšťat se nachází v Evropě a ve Spojených státech amerických. Ve Spojených státech amerických se na tuto problematiku dělal rozsáhlý výzkum. Klíště je také vektorem lidské babesiózy a granulární anaplasmózy. Jsou to onemocnění, která způsobují prvoci (Hamer *et al.* 2007).

Klíšťata se nejčastěji vyskytují v lesích, v krajinách a příbytcích blízko zalesněných oblastí. Proti tomuto patogenu se zkoumalo velké množství postupů, jak jeho populace vyhubit, nebo alespoň snížit. Postupy zahrnovaly osobní ochranná opatření, sledování

hostitelů, změnu stanoviště, aplikaci akaricidů a biologickou ochranu. Většina z těchto postupů se setkala se střídavými úspěchy, ale použití entomopatogenních hub byla přijatelná alternativa, jak v účinnosti, tak z ekologického hlediska. Proti tomuto patogenu se využívá entomopatogenní houba *M. anisopliae*, kmen F52, který je součástí biopreparátu Met52. Biopreparát se používá v emulgované formě. Napadá nymfy i dospělé klíštěte obecného. Tento kmen je velmi významný tím, že má až 90% účinnost proti patogenu, protože klíště většinu svého života stráví ve vlhké, nutričně bohaté půdě, v listí nebo v organických nečistotách. Tyto podmínky jsou pro houbové přežití a vyklíčení ideální (Benjamin *et al.* 2002; Kirkland *et al.* 2004). Obrázky zdravého a infikovaného klíštěte jsou upraveny podle (Steigedal *et al.* 2013; Tjomsland 2013).



Obr. č. 17: Zdravý jedinec klíštěte rodu *Ixodes*.



Obr. č. 18: Klíště (*Ixodes scapularis*) infikované houbou *M. anisopliae*

Bázlivec kukuřičný (*Diabrotica virgifera virgifera*)

Bázlivec kukuřičný (Coleoptera: Chrysomelidae) je nejvýznamnějším škůdcem kukuřice v Evropě a ve Spojených státech amerických. Nejvíce škodlivé jsou larvy, které žijí v půdě a okusují kořeny kukuřice. Dospělí jedinci se od června do října živí na kukuřičných listech, pylu a okusují blizny, čímž dochází k hluchosti klasů. Po odkvětu kukuřice stále zůstávají v kukuřičných polích a živí se listy. Někteří jedinci se v malém množství mohou živit i na slunečnici, sóje, vojtěšce a ambrózii. Po spáření samičky kladou vajíčka do půdy v oblasti kukuřičných polí. Kladou je do hloubky 10 až 35 cm (Baca 1994). Vajíčka v půdě prezimují a larvy se líhnou v průběhu měsíce května. Larva bázlivce kukuřičného má tři instary. Nejvíce škod způsobují larvy prvního instaru okusováním kořínků. Ostatní instary se živí též na kořenech kukuřice. Když larvy dospějí, zakuklí se v půdě. Dospělci se vyskytují od

poloviny června do října v závislosti na klimatických podmínkách a oblasti, ve které se vyskytují (Toepfer, Kuhlmann 2006).

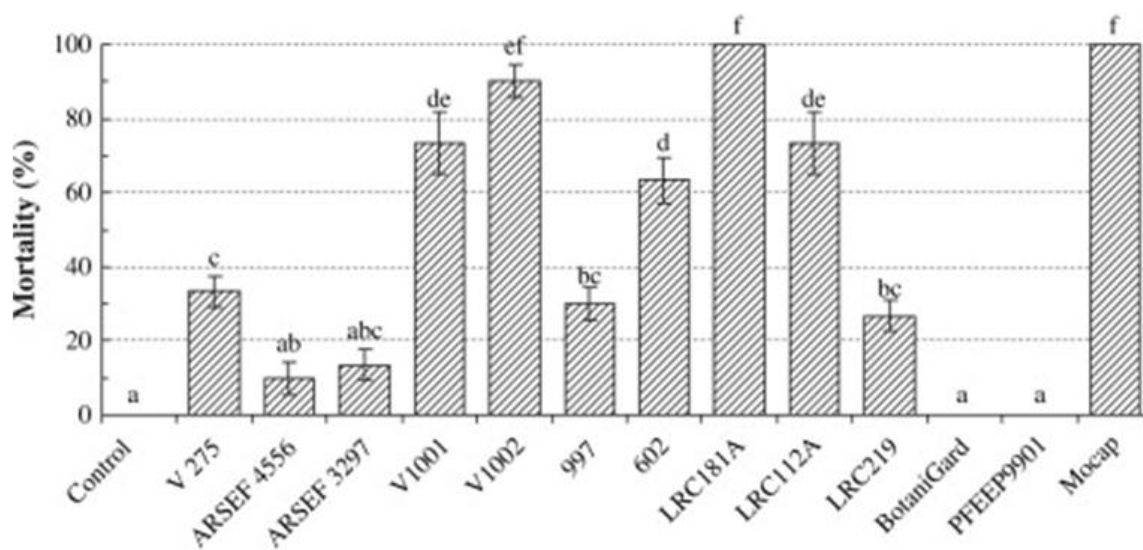
Jako účinná ochrana proti bázlivci kukuřičnému se ve světě, hlavně ve Spojených státech amerických, využívá geneticky modifikovaná kukuřice (Bt-kukuřice) nesoucí geny z bakterie *Bacillus thuringiensis*. Kukuřice si z přijatých genů vyrobí δ -endotoxin, který je pro škůdce smrtelný. Bílkovinná molekula sama o sobě není jedovatá, v toxin se mění až v trávicím traktu hmyzu. Insekticidní protein této kukuřice je však odlišný od Bt-kukuřice rezistentní vůči zavíječi kukuřičnému a pochází z bakterie *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, zatímco u Bt-kukuřice na zavíječe kukuřičného se jedná o *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. V USA jsou již vyvinuty hybridy kukuřice, které mají oba typy insekticidního proteinu a zajišťují ochranu jak proti bázlivci, tak proti zavíječi. V Evropské unii však není použití geneticky modifikované kukuřice odolné vůči bázlivci povoleno a převažuje pěstování konvenčních hybridů kukuřice (Kroutil 2011). K redukcí tohoto škůdce se mimo jiné využívají také entomopatogenní houby *M. anisopliae* kmen F52 a *B. bassiana* (Scheepmaker, Butt 2010).

Drátovci

Drátovci jsou larvy kovaříků (Coleoptera: Elateridae) a patří mezi nejvýznamnější škůdce plodin na orné půdě. Velmi významné škody způsobují na bramborách a kukuřici. Drátovci jsou hrozbou pro zemědělství v důsledku několika faktorů. Larvální vývoj trvá 3 - 6 let a jsou to polyfágní škůdci, takže jsou schopni napadat rozmanité spektrum hostitelských rostlin z různých čeledí. Nejdůležitější druhy jsou *Agriotes obscurus* (kovařík tmavý), *Agriotes lineatus* (kovařík obilní) a *Agriotes sputator* (kovařík locikový) (Gratwickn 1989). Drátovci u brambor silně poškozují hlízy. Výnos může být snížen až o 15%. Hlízy jsou znehodnocené a neprodejně. Regulace populací drátovců je závislá na kombinaci kulturních metod a zpracování půdy. Použití insekticidů je neúčinné a představuje riziko na lidské zdraví a životní prostředí. Velká pozornost se zaměřuje na použití entomopatogenních hub a hlístic. V Kanadě byla testována na drátovcích virulence kmenů entomopatogenních hub a zároveň kmenů entomopatogenních hlístic. Nicméně stále probíhají výzkumy s cílem najít více agresivní kmeny/druhy entomopatogenních hlístic. Kabaluk *et al.* (2007) testovali účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* včetně kmene F52. Kmen F52 prokázal vysokou účinnost proti tomuto škůdci. Ansari *et al.* (2009) hodnotili též účinnost kmenů entomopatogenních hub na populaci drátovců. Testovali 10 kmenů houby *M. anisopliae* (V275, ARSEF4556, ARSEF3297, V1001, V1002, 997, 602, LRC181A, LRC112A

a LRC219), kmen *B. bassiana* (BotaniGard) a kmen *Isaria fumosorosea* (PFEEP9901). V grafu č. 1 jsou uvedeny výsledky účinnosti entomopatogenních hub. Některé kmeny *M. anisopliae* vykazovaly velmi vysokou účinnost, která byla srovnatelná s použitím chemického přípravku Mocap.

Graf č. 1: Použití různých kmenů entomopatogenních hub na drátovce (1×10^8 konidií v 1 ml) v třítydenním intervalu (upraveno podle Ansari *et al.* 2009).



5 Diskuse

V zemědělství se snažíme používat takové metody, které neohrožují zdraví lidí a životní prostředí. Dlouhou dobu byly chemické metody velmi populární. Jsou založené na relativně jednoduché a snadné aplikaci a často jsou velmi toxické. Problémy související s řadou negativních dopadů po jejich dlouhodobém používání vedly k hledání alternativních způsobů ochrany rostlin. Mezi alternativní způsoby ochrany rostlin řadíme například agrotechnické, biologické a bioracionální metody, které jsou součástí programů IOR. Systém IOR je určen pro všechny pěstební systémy a technologie (Charvát 2013). V posledních deseti letech dochází opět k postupnému nárůstu spotřeby pesticidů, a proto se od 1. ledna 2014 stala IOR povinná pro všechny profesionální uživatele, kteří užívají přípravky na ochranu rostlin. Cílem IOR je alespoň minimálně regulovat aplikaci rizikových pesticidů.

Do systému IOR řadíme zejména biologickou ochranu a její strategie. Velký význam má prevence. Měli bychom být vzdělaní natolik, aby naše hospodaření nenapomáhalo rozmnožování škodlivých organismů a abychom dali prostor organismům užitečným. Důraz by měl být také kladen na výživu plodiny, výběr vhodného stanoviště, výběr odrůdy, technologii pěstování plodin a osevni postup (Honěk *et al.* 2008). K výraznějšímu rozvoji biologických metod došlo koncem 20. století a k jejich širšímu uplatnění v praxi dopomohl lepší přístup k informacím a novým poznatkům (Vondrášková 2008). Biologické metody záměrně využívají živé organismy, případně jejich metabolity, k potlačování populací škodlivých činitelů. V biologické regulaci mají významné postavení přirození nepřátelé škůdců, kteří se běžně vyskytují v ekosystémech a podílejí se na přirozené regulaci různých druhů organismů, kteří mohou být významnými škůdci v zemědělství (Věchet 2010). Mezi přirozené nepřátele patří patogenní mikroorganismy schopné vyvolávat různá onemocnění a makroorganismy. Skupina makroorganismů je členěna na základě potravního nebo vývojového vztahu k určité skupině škůdců, kterou jsou schopni regulovat na parazity, parazitoidy a predátory. Důležitým faktorem úspěšného používání biologických metod v ochraně rostlin je včasná aplikace určitého bioagens na základě monitorování výskytu škůdců v porostech (Honěk *et al.* 2008).

Špatné rozhodnutí znamená selhání regulace populací škodlivých organismů. O termínu aplikace by měl rozhodovat pěstitel, který má v biologické regulaci zkušenosti nebo odborník na danou problematiku. Je nutné také zajistit kompatibilitu s jinými metodami ochrany rostlin, zejména s přípravky chemickými.

Proč používat metody biologické ochrany namísto metod chemických? Používání prostředků biologické ochrany nezatěžuje životní prostředí, nejsou pro člověka a necílové organismy toxické, vytváří dlouhodobě stabilizovaný systém a podporují užitečné organismy. Metody biologické ochrany se dají používat i v chráněných oblastech a ochranných pásmech.

Do skupiny mikroorganismů, které vyvolávají nákazy významných hmyzích škůdců, patří entomopatogenní houby. Je popsáno kolem 750 druhů, které mohou infikovat hmyz nebo roztoče. Známe celou řadu této skupiny hub, na jejichž bázi se vyrábí komerční biopreparáty. Komerčně jsou v zahraničí využívány především houby *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* a *Beauveria bassiana*. V České republice byl dříve registrován přípravek Boverol na bázi houby *Beauveria bassiana* určený hlavně proti mandelince bramborové. V roce 1997 byla registrace přípravku ukončena a znovu se neobnovila (Landa 2002). V současné době není bohužel v České republice žádný přípravek na bázi entomopatogenních hub povolen.

Proč v České republice není registrován žádný přípravek na bázi entomopatogenních hub? Odpovědí je nevýhoda těchto bioagens vyžadující vysokou vzdušnou vlhkost, proto mají vysokou účinnost hlavně v teplých oblastech a ve sklenících. Dále standartní biopreparáty podléhají poměrně složitému hodnoticímu procesu a musí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií (Landa 2002). Registrace přípravku je dlouhodobá a složitá záležitost.

Biopreparáty na bázi entomopatogenní houby *M. anisopliae* jsou ve velkém měřítku aplikovány v zemích Jižní Ameriky (BIO-Blast), Africe, Francii a Velké Británii (Green Muscle), Německu (Met52), Austrálii (BioCane) a ve Švýcarsku (Metarhizium Schweizer). Faria a Wraight (2007) ve své práci uvádějí, že procentuální složka biopreparátů na bázi *M. anisopliae* ze všech 171 využitelných přípravků na bázi entomopatogenních hub je až 33,9 % a to není málo.

V České republice, byly preparáty na bázi *M. anisopliae* testovány, ale žádné z nich bohužel nejsou dosud registrované. Je to škoda, protože tato houba má obrovský potenciál v biologické ochraně rostlin. Infikuje více než 200 druhů hmyzu včetně termitů, třásněnek, molic, kobylek, sarančat, lalokonosců a spoustu dalších škůdců.

Na tuto houbu se také dělá výzkum o jejím využití jako biologického insekticidu proti komárům přenášejícím malárii (Scholte *et al.* 2006). U houby *M. anisopliae* se nepotvrdily

žádné vedlejší účinky na lidské zdraví a na zdraví zvířat. Je považován za bezpečný bioinsekticid.

Je jen otázkou času, než se biopreparáty na bázi entomopatogenních hub a konkrétně i biopreparáty na bázi *M. anisopliae* začnou masově vyrábět a používat v biologické ochraně rostlin. Jejich význam v regulaci populací škodlivých činitelů je obrovský a jak již bylo uvedeno, nepředstavují riziko na zdraví lidí a necílových organismů jako pesticidy.

6 Závěr

Tato bakalářská práce je literární kompilací zaměřenou na biologickou charakterizaci entomopatogenní houby *M. anisopliae*. Jsou zde uvedeny používané biopreparáty na bázi této houby, které se používají téměř po celém světě. Práce mimo jiné zahrnuje také základní charakterizaci nejvýznamnějších druhů entomopatogenních hub a jejich vývojový cyklus.

Entomopatogenní houba *M. anisopliae* má v biologické ochraně velký potenciál. Je to polyfágní druh, který napadá obrovské spektrum hmyzu. Je využívána téměř po celém světě. Např. v programu LUBILOSА měla houba vynikající výsledky. V podobě biopreparátu Green Muscle® ustálila populace kobylek v Africe, a tím zachránila mnoho lidských životů před hladomorem. V zahraničí je tato houba využívána, ale v České republice zatím žádný přípravek na bázi *M. anisopliae* není registrován. Výzkumy u této houby neprokázaly žádné vedlejší účinky. Produkty na bázi *M. anisopliae* jsou bezpečné mykoinsekticidy, které neohrožují lidské zdraví, necílové organismy a životní prostředí.

V současnosti je mnoho škůdců významných zemědělských plodin odolných vůči pesticidům. A rezistence se aplikací pesticidů bude neustále zvyšovat. Do budoucna nebude jiná možnost, než využívat metody biologické ochrany rostlin, kam řadíme i entomopatogenní houby. Registrace přípravků na bázi entomopatogenních hub je zdlouhavý a složitý proces. Jejich význam je však úctyhodný a zůstává jen otázkou času, než i u nás v České republice budou biopreparáty na trhu k dostání.

Jak již bylo zmíněno, v České republice není žádný registrovaný přípravek na bázi entomopatogenní houby *M. anisopliae*. Ale na trhu je k dostání substrát, který *M. anisopliae* obsahuje. Je běžně pro veřejnost dostupný a je vyráběn firmou Forestina. Jedná se o supresivní substrát, který je určen speciálně pro výsevy a množení rostlin. Je to zatím pouze začátek, ale pevně věřím, že entomopatogenní houby najdou v České republice široké uplatnění, jako je tomu doposud v jiných zemích světa.

7 Přehled literatury

- Ansari M.A., Shah F.A., Butt T.M. (2009): Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus*, control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129: 340-347.
- Askary H., Benhamou N., Brodeur J. (1997): Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology*, 87(3): 359-368.
- Baca F. (1994): New member of the harmful entomofauna of Yugoslavia *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). *Zastita bilja*, 45: 125-131.
- Bailey A., Chandler D., Grant W.P., Greaves J., Prince G., Tatchell M. (2010): Biopesticides: pest management and regulation. *CAB International, Wallingford, UK*, 88-90.
- Behle R.W., Jackson M.A., Flor-Weiler L.B. (2013): Efficacy of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia against nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(1): 57-63.
- Benjamin M.A., Zhioua E., Ostfeld R.S. (2002): Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 39: 723-728.
- Bidochka M.J., Small C.L., (2005): Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: Vega F.E., Blackwell M. (Eds.): Insect-fungal associations: ecology and evolution. *Oxford University press, NY*, 28-50.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009): A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101: 512-530.
- Blackwell M. (2011): The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3): 426-438.
- Boucias D.G., Pendland J.C. (1991): Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event. of mycoses in arthropod hosts. In: Cole G.T., Hoch H.C. (Eds.): The fungal spore and diseases initiation in plants and animals. *Plenum, New York*, 101-128.
- Boucias D.G., Pendland J.C., Latgé J.P. (1988): Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied Environmental Microbiology*, 54: 1795-1805.
- Bruck D.J. (2005): Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. *Biological Control*, 32: 155-163.

- Butt T. M., Goettel M. S., Papierok B. (1999): Directory of specialists involved in the development of fungi as biocontrol agents. *Colin Butt Design & Print, Warley, West Midlands, 48 p.*
- Douthwaite B., Langewald J., Harris J. (2001). Development and commercialization of the Green Muscle biopesticide. *International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, 22 p.*
- Driver F., Milner R.J., Trueman J.W.H. (2000): A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research, 104: 134-150.*
- Drummond J., Heale J.B., Gillespie A.T. (1987): Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecani* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology, 111: 193-201.*
- Fang W., Pei Y., Bidochka M.J. (2007): A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology, 153: 1017-1025.*
- Fargues J., Rougier M., Goujet R., Smith N., Coustere Ch., Itier B. (1997): Inactivation of Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by Near-Ultraviolet (UVB and UVA) and Visible Radiation. *Journal of Invertebrate Pathology, 69: 70-78.*
- Faria M.R., Wraight S.P. (2007): Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control, 43: 237-256.*
- Feng Z., Carruthers R.I., Roberts D.W., Robson D.S. (1985): Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* on the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Invertebrate Pathology, 46: 259-264.*
- Fransen J.J. (1990): Natural enemies of whiteflies - Fungi, In: Gerling D. (Ed.): Whiteflies: their bionomics, pest status and management. *Athenaeum Press, Newcastle upon Tyne, 187-209.*
- Goettel M.S., Koike M., Kim J.J., Aiuchi D., Shinya R., Brodeur J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology 98: 256-261.*
- Goettel M.S., Inglis G.D. (1997): Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L. (Ed.): Manual of techniques in insect pathology. *Academic press, San Diego, USA, 213-249.*
- Gratwick M. (1989): Potato Pests. MAFF References Book 187. *HMSO, London, 104 p.*
- Hajek A. (2004): Natural enemies: an introduction to biological control. *Cambridge university press, UK, 378 p.*
- Hajek A.E., Leger R.J. (1994): Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology, 39: 293-322.*

- Hall R.A. (1976): A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27: 41-48.
- Hamer S.A., Roy P.L., Hickling G.J., Walker E.D., Foster E.S., Barber CH.C., Tsao J.I. (2007): Zoonotic pathogens in *Ixodes scapularis*, Michigan. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7): 1131-1133.
- Hoffmann M.P., Frodsham A.C. (1993) Natural enemies of vegetable insect pests. *Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY*, 63 p.
- Honěk A., Lukáš J., Martinková Z., Pultar O., Řezáč M. (2008): Význam predátorů a parazitoidů v integrovaných systémech ochrany rostlin. *Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně*, 64 p.
- Hu Q.B., Ren S.X., Wu J.H., Chang J.M., Musa P.D. (2006). Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. *Toxicon* 48: 491-498.
- Humber R.A. (1997): Fungi: Identification. In: Lacey L.A. (Ed.): Manual of techniques in insect pathology. *Academic Press, London*, 153-185.
- Charvát J. (2013): Evropa chce mít potraviny bez pesticidů.
<http://www.ceskapozice.cz/domov/ekologie/bez-pesticidu-budou-potraviny-zdravejsi-ale-nejspis-podrazi>. Online 29. 3.2014.
- Chase A. R., Osborne L. S., Ferguson V. M. (1986): Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomologist*, 69: 285-292.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. (2001): Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds): Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. *CAB International, Wallingford, UK*, 23-69.
- Inglis P.W., Tigano M.S., (2006): Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *General Molekular Biology*, 29: 132-136.
- Jackson M.A., Dunlap Ch.A., Jaronski S.T. (2010): Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55(1): 129-145.
- Jaronski S.T. (2014): Mass production of beneficial organisms. Chapter 11 – Mass Production of Entomopathogenic Fungi: *State of the Art. Academic press*, 357-413 p.
- Jenkins N.E., M.S. Goettel (1997). Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Memoirs Entomological Society of Canada*, 171: 37-48.

- Kabaluk J.T., Ericsson J.D. (2007): *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal*, 99: 1377-1381.
- Kaijiang L., Roberts D.W. (1986): The production of destruxins by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* var. *major*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 120-122.
- Kalina T., Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. *Karolinum, Praha*, 229-236.
- Kavková M., Čurn V. (2005): *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia*, 159: 53-63.
- Kepler R.M., Rehner S.A. (2013): Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species komplex. *Molecular Ecology Resources*, 13(2): 210-217.
- Kirkland B.H., Westwood G.S., Keyhani N.O. (2004): Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology*, 41(4): 705-711.
- Klingen I., Meadow R., Aandal T. (2001): Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with insect pathogenic hyphomycetous fungi. *Journal of Applied Entomology*, 126: 231-237.
- Kroutil P. (2011): Výsledky průzkumu výskytu bázlivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera virgifera*) v ČR v roce 2011. http://eagri.cz/public/web/file/140765/Bazlivec_kukuricny_v_CR_v_roce_2011_final.pdf. Online 8. 4. 2014.
- Kůdela V., Bartoš P., Čača Z., Dirlbek J., Frič F., Lebeda A., Šebesta J., Ulrychová M., Valášková E., Veselý D. (1989): Obecná fytopatologie. *Academia, Praha*, 388 p.
- Lacey L.A., Georgis R. (2012): Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2): 218-225.
- Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O. (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, 646-647.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, 225-280.
- Landa Z. (1998): Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *Agro*, 10: 7-12.
- Landa Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). *ZF JU, České Budějovice*, 14-50.

- Landa Z., Jegorov A., Mařha V., Novák J. (1989): Light induced production of carotenoids by the entomogenous fungus *Aschersonia aleyrodis*. *Proc. Conf. „Biopesticides - theory and practice“*, September 25.- 28. 1989, České Budějovice, 110-119.
- Liu M., Chaverri P., Hodge K.T. (2006): A taxonomic revision of the insect biocontrol fungus *Aschersonia aleyrodis*, its allies with white stromata and their *Hypocrella* sexual states. *Mycological Research*, 110: 537-554.
- Liu W., Boucias D.G., McCoy C.W. (1995): Extraction and characterization of the insecticidal toxin hirsutellin a produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. *Experimental Mycology*, 19: 254-262.
- Luangsa-ard J.J., Houbraken J., Van Doorn T., Hong S.B., Borman A.M., Hywel-Jones N. L., Samson R.A. (2011): *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2): 141-149.
- Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Manoch L., Samson R.A. (2005): On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research*, 109: 581-589.
- Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Samson R.A. (2004): The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia*, 96: 773- 780.
- Moore D., Bateman R.P., Carey M. (1995): Prior Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 193-199.
- Morel E., Pais M., Turpin M., Guyot M. (1983): Cytotoxicity of cyclodepsipeptides on murine lymphocytes and on L 1210 leukemia cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 37(4): 184-185.
- Oborník M., Jirků M., Doležel D. (2001): Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic? *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 813-819.
- Osborne L.S., Landa Z., (1992): Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*, 75: 456-471.
- Pedras M.S.C., Zaharia L.I., Ward D.E. (2002): The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry* 59: 579-596.
- Quarles W. (1995): New technologies for termite control. *IPM Practitioner* 17(5/6): 1-9.
- Rombach M.C., Humber R.A., Evans H.C. (1987): *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf- and planthoppers. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 451-459.
- Rombach M.C., Humber R.A., Roberts D.W. (1986): *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., a pathogen of plant- and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon* 27: 87-92.

- Samson P., Robertson L., Bakker P., Cocco R., Horsfield A., Logan D., Kettle C., Harris W., Allsopp P., McGill N., Milner R., Bullard G. (2001): Development of *Metarhizium*-based biopesticides for use against sugarcane white grubs in Australia. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, 24: 354-360.
- Samson R.A. (1974): *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6: 1-43.
- Shimazu M., Sato H., Maehara N. (2002a): Density of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in forest air and soil. *Applied entomology and zoology*, 37: 19-26.
- Shimazu M., Sato H. (1996): Media for selective isolation of and entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Applied Entomology and Zoology*, 31(2): 291-298.
- Schaerffenberg B. (1968): Untersuchungen über die Wirkung der insektentötenden Pilze *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. und *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. auf Warmblütler. *Entomophaga* 13: 175-182.
- Scheepmaker J.W.A., Butt T.M. (2010): Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. *Biocontrol Science and Technology*, 20(5): 502-552.
- Schneider S., Rehner S.A., Widmer F., Enkerli J. (2011): A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(2): 106-114.
- Schoelte E.J., Knols B.G.J., Takken W. (2006): Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces bloodfeeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91: 43-49.
- Schrank A., Vainstein M.H. (2010): *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56: 1267-1274.
- Steigedal H., Loe L.E., Grøva L., Mysterud A. (2013): The effect of sheep (*Ovis aries*) presence on the abundance of ticks (*Ixodes ricinus*). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, 63: 111-120.
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-Ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W. (2007): Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycology*, 57: 5-59.
- Suwannakut S., Boucias G.D., Wiwat Ch. (2005): Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90: 169-176.
- Tanada Y., Kaya H.K. (1993): Fungal infections. In: Tanada Y., Kaya H.K. (Eds.): Insect pathology. *Academica Press Inc. California and Academica Press Limited London*, 319-387.

- Thomas M.B., Blanford S., Lomer C.J. (1997): Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology*, 7: 327-334.
- Tichá K. (2001): Biologická ochrana rostlin. *Grada Publishing, Praha*, 88 p.
- Tjomsland A. (2013): Fungus kills ticks.
<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/11/131112091005.htm>. Online 29. 3. 2014.
- Toepfer S., Kuhlmann U. (2006): Constructing life-tables for the invasive maize pest *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera; Chrysomelidae) in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 130: 193-205.
- Tulloch M. (1976): The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society* 66: 407-411.
- Van Driesche, Heinz R.G. (2004): An overview of biological control in protected culture. *Ball Publishing, Batavia*, 1-24.
- Vänninen I. (1995): Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, 100(1): 93-101.
- Váňa J. (1998): Systém a vývoj hub a houbových organismů. *Karolinum, Praha*, 164 p.
- Vega F.E., Blackwell M. (2005): Insect-fungal associations: ecology and evolution. *Oxford University press, NY*, 3-50.
- Věchet L. (2010): Biologická ochrana a indukovaná rezistence rostlin k chorobám a škůdcům.
<http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-7427-048-2.pdf>. Online 8. 3. 2014.
- Vestergaard S., Butt T.M., Gillespie A.T., Schreiter G., Eilenberg J. (1995): Pathogenicity of the hyphomycetes fungi *Verticillium lecani* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5(2): 185-192.
- Vey A., Quiot J.M., Mazet I., McCoy C.W. (1993). Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 131-137.
- Vondrášková Š. (2008): Využití dravého hmyzu v biologické ochraně rostlin.
<http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Vyuit%20dravho%20hmyzu%20v%20biologic%20ochran%20rostlin.pdf>. Online 8. 3. 2014.
- Weiser J. (1966): Houbové onemocnění hmyzu. In: Weiser J. (Ed.): Nemoci hmyzu. *Academia, Praha*, 286-290.
- Wraight S.P., Carruthers R.I. (1999): Production, delivery and use of mycoinsecticides for control of insect pests of field crops. *Human Press, Totowa, NJ*, 233-269.

Zare R., Gams W. (2001a): A revision of *Verticillium* section prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*, 73: 1-50.

Zimmermann G. (2008): The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 18(9): 865-901.

Zimmermann G. (2007a): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553-596.

Zimmermann G. (2007b): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 879-920.

Seznam anonymních zdrojů:

Anonym I: Vyhláška č. 205/2012 Sb., o obecných zásadách integrované ochrany rostlin.
http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/predpisy-mze-neucinne/_prezentace_cz_mze_legislativa_pravni-predpisy-mze_predpisy-mze-neucinne_vyhlaska-c-205-2012-sb.html. Online 23. 2. 2014.

Anonym II: http://www.biocont.cz/cz/eshop/biobit-xl_i7.htm. Online 29. 3. 2014.

Anonym III: <http://www.biocont.cz/cz/eshop/heterorhabditis-i11.htm> Online 29. 3. 2014.

Anonym IV: <http://www.koppert.com/products/products-pestdiseases/products/detail/mycotal-1/>. Online 31. 3. 2014.

Anonym V: <http://www.mycolab.cz/cz/projekty/mycobanka.html>. Online 29. 3. 2014.

Anonym VI:

<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=58257&Fields=All>.
Online 8. 4. 2014.

Anonym VII: Mass production of fungal pathogenes for insect control.
<http://www.lubilosa.org/>. Online 3. 3. 2014.

Anonym VIII:

http://www.bioag.novozymes.com/en/products/unitedstates/biocontrol/met52/Documents/Met52%20Extended%20Label_USA.pdf. Online 3. 3. 2014.

Anonym IX: <http://www.roguefarmers.com/catalog/product/gallery/id/3761/image/3263/>.
Online 8. 4. 2014.

Anonym X:

http://www.bioag.novozymes.com/en/products/unitedstates/biocontrol/met52/Documents/12022_Met52%20EC_1L_label_2_FINAL_Apr2_12.pdf. Online 3. 3. 2014.

Anonym XI: <http://www.forestina.cz/zbozi.php?type=81&type2=101&cat=101>.
Online 8. 4. 2014.