



**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH  
BUDĚJOVICÍCH  
Zemědělská fakulta**

---

**DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Téma:

**HODNOCENÍ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH DRUHŮ  
ENTOMOPATOGENNÍCH HUB PŘI SAMOSTATNÉ  
APLIKACI A APLIKACI VE SMĚSI VÍCE DRUHŮ**

Vypracoval:

**JAN KRÁLOVEC**

Vedoucí diplomové práce:

**prof. Ing. ZDENĚK LANDA, CSc.**

2012



## **PROHLÁŠENÍ:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....

Jan Královec



Děkuji prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za odborné vedení při této práci, cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc, které mi poskytoval v průběhu studia a zpracování této diplomové práce. Poděkování dále patří Ing. Andree Bohaté, Ph.D. a Ing. Janě Kročákové za pomoc, rady a připomínky a pracovníkům Katedry rostlinné výroby a agroekologie Marii Nýdlové a Olze Divišové za pomoc a asistenci při zakládání pokusů.

Zvláště bych chtěl poděkovat mé rodině za všestrannou podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu studia na vysoké škole

Jan Královec



Králavec J. (2012). Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub při samostatné aplikaci a aplikaci ve směsi více druhů. [Evaluation of the effectiveness of chosen strains of entomopathogenous fungi in individual application and in application of more strain mixture] The University of South Bohemia, faculty of Agrarian, České Budějovice, Czech Republic.

### *Annotation*

This diploma theses focuses on comparison of natural and intentionally induced suppressiveness of environment induced by application of entomopathogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium muscarium*. In tests were evaluated the in vitro parameters as well as the effectiveness in vivo biotests on insect host larva *Tenebrio molitor*. The species of entomopathogenous fungi were applied in suspensions, single strains and also in combination of two strains. In the in vitro conditions the possibilities of objective evaluation of the suppressivity level were tested by using the CFU test (Colony Forming Units) on three different nutrient media (PDA, PDA + A , PDA + D), as one of the basic evaluation parameters. Further the germination tests were evaluated according to GI (Germination Index), determination of radial growth (comparison of median cultures) and interaction of strain suspensions on nutrient media PDA. In the in vivo biotests were watched the epizooties from suspensions of these entomopathogenic fungi on insect larva *Tenebrio molitor* in competitive test of strains according to FDI (Fungal development index) evaluation scale. Chosen larva covered by fully sporulating mycelium from epizootie were further evaluated in CFU test. The result were dominant strain/s on the larva from applied suspensions.

**key words** – entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium*, *Tenebrio molitor*, CFU, nutrient media (PDA, PDA + A , PDA + D), bioassay



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

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan KRÁLOVEC**  
Osobní číslo: **Z06274**  
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství**  
Název tématu: **Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub při samostatné aplikaci a aplikaci ve směsi více druhů**  
Zadávací 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 :**

Cílem diplomové práce je porovnání přirozené a záměrně indukované supresivity prostředí navozené aplikací entomopatogenních hub *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium muscarium*. V testech budou hodnoceny jak in vitro parametry (CFU) tak účinnost v in vivo biotestech na vybraném druhu hostitele.

- 1) Ověření možnosti objektivního hodnocení úrovně supresivity prostředí při použití testu CFU (*Colony Forming Units*) jako klíčového hodnotícího parametru.
- 2) Porovnání účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub na vybraný druh hmyzího hostitele (*Tenebrio molitor*).
- 3) Porovnání účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub v konkurenčním testu, v jehož rámci jsou současně aplikovány směsi dvou druhů/kmenů entomopatogenních hub.



Rozsah grafických prací: 5 stran  
Rozsah pracovní zprávy: 40 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

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.

Články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB, BA, ZR.

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

Datum zadání diplomové práce: 18. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2011

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

prof. Ing. Miroslav Šoch, CSc.  
děkan

L.S.

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

V Českých Budějovicích dne 18. února 2011





2. 8. 2. 2 Patogen.....	31
2. 8. 2. 3 Hostitel.....	32
<b>3. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>33</b>
3. 1 Druhy studovaných entomopatogenních hub.....	33
3. 1. 1 <i>Beauveria bassiana</i> kmen I 101.....	33
3. 1. 2 <i>Metarhizium anisopliae</i> kmen F-52.....	34
3. 1. 3 <i>Isaria fumosorosea</i> kmen PFR 97.....	34
3. 1. 4 <i>Lecanicillium lecanii</i> kmen I9.....	34
3. 2 Studovaný druh hmyzu.....	35
3. 2. 1 Potemník moučný ( <i>Tenebrio molitor</i> L.).....	35
3. 3 Používaná živná média.....	35
3. 3. 1 Potato Dextrose Agar.....	35
3. 3. 2 Selektivní média.....	36
3. 3. 2. 1 Potato Dextrose Agar + Antibiotikum.....	36
3. 3. 2. 2 Potato Dextrose Agar + Dodine.....	36
3. 4 Udržování kultur a kultivace entomopatogenních hub.....	36
3. 5 Příprava základní konidiové suspenze kmenů entomopatogenních hub.....	37
3. 6 Metodika prováděných pokusů.....	38
3. 6. 1 Standardní test klíčivosti – GI (Germination Index).....	38
3. 6. 2 Standardní test CFU (Colony Forming Units).....	39
3. 6. 3 Standardní laboratorní biotest.....	40
3. 6. 4 Konkurenční test - porovnání účinnosti vybraných kmenů entomopatogenních hub v kombinaci.....	42
3. 6. 5 Radiální růst a výtěžnost.....	42
3. 6. 6 Interakce.....	43
3. 7 Využívaná technika při pokusech.....	43
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....</b>	<b>44</b>
<b>5. DISKUZE A ZÁVĚR.....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>67</b>
<b>7. PŘÍLOHY.....</b>	<b>74</b>





# 1. ÚVOD

Integrovaná ochrana rostlin má za dobu své existence velmi rozmanitý vývoj. Vznikla v podstatě až v době, kdy člověk výrazně změnil druhovou skladbu životního prostředí díky ekonomickému zefektivnění obhospodařování zemědělské půdy. Následně dochází k rozmachu a širokému využívání pesticidní chemie. Postupem času se zvyšuje reziduální zatíženost zemědělských produktů jak rostlinných, tak i živočišných a zanedbatelné není ani zatížení životního prostředí. Teprve poznání všech negativních chemických účinků zmíněných přípravků vedlo k jejich omezování a následnému nahrazení přípravky přijatelnými z hlediska toxikologie i ekologie.

Do popředí se dostává systém biologické ochrany rostlin proti hmyzím škůdcům. Významnou skupinou biologické ochrany jsou mimo jiné i entomopatogenní houby (dále jen EH). Jejich využíváním je možno snížit negativní zatíženost (toxicitu některých používaných účinných látek, kumulaci jejich reziduí v potravním řetězci a vznik rezistentních populací cílových organismů) a často i jednostranné použití klasických konvenčních chemických pesticidů.

Integrovaný ochranný zásah populaci zemědělského škůdce v daném místě sníží, není však snahou daný druh škůdce vyhubit zcela. Každá zemědělská plodina má menší či větší spektrum druhů škůdců schopných dosáhnout vysokých populačních hustot a způsobovat významné zemědělsko-ekonomické škody. Zvláště významné druhy škůdců jsou proto monitorovány státní rostlinolékařskou správou, která je sleduje a vyhodnocuje četnost jejich výskytu.

Jednou z prioritních alternativ v zemích šetrných k životnímu prostředí je zavádění biopreparátů na bázi různých druhů mikroorganismů do zemědělské praxe. Na trhu v EU a ve světě (USA) se objevují stále nové komerční přípravky s biopreparáty na bázi EH (Jaronski et al., 2007). Jsou také registrovány biopreparáty na bázi EH pro ochranu skleníkových plodin. Biopreparáty na bázi těchto hub musí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních parametrů a podléhají kompletnímu registračnímu procesu. Kvalita se hodnotí pomocí klíčových parametrů se specifikací podílu aktivní a doplňkové složky v biopreparátu. Z kvantitativních parametrů se hodnotí stanovení počtu infekčních jednotek a vitality spor. Kvantitativní parametr CFU (colony forming units) udává, kolik jednotek patogena přítomných v 1 g nebo 1 ml biopreparátu vytvoří samostatnou kolonii na umělé živné půdě (Krátká, 2007).



Cílem této práce je porovnání přirozené a záměrně indukované supresivity prostředí navozené aplikací entomopatogenních hub *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium lecanii*. V testech budou hodnoceny jak *in vitro* parametry (CFU) tak účinnost v *in vivo* biotestech na vybraném druhu hostitele.



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Integrovaná ochrana rostlin

Postupy používající všechny ekonomicky, ekologicky a toxikologicky přijatelné metody pro udržení škodlivého organismu pod hladinou škodlivosti s přednostním záměrným využitím přirozených omezujících faktorů se podle definice IOLB (Mezinárodní organizace pro biologickou kontrolu) nazývají od roku 1973 komplexním pojmem integrovaná ochrana (Soukup, 2005). Integrovaná ochrana rostlin (dále jen IOR) s sebou nese zásadní změny v ochraně zemědělských rostlin. Moderní zemědělské praktiky vedou ke změnám v rovnováze přírody, tyto změny pak způsobují další účinky na ekosystém, ve kterém se nachází systém hospodaření (Pluke et al., 1999). IOR můžeme dále definovat jako pečlivé zvažování veškerých dostupných metod ochrany rostlin a následná integrace vhodných opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin a jiných forem zásahů na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit a které snižují či minimalizují rizika pro lidské zdraví nebo životní prostředí (Směrnice evrop. Parlamentu a rady, 2009/128/ES). Jedno z hlavních hledisek je snížení absolutních dávek používaných pesticidů. IOR s sebou nese snížení rizik a omezení dopadů používání pesticidů na lidské zdraví a životní prostředí, s cílem podpořit vývoj a zavádění IOR a alternativních přístupů nebo postupů, aby se snížila závislost na používání pesticidů (Směrnice evrop. Parlamentu a rady, 2009/128/ES).

Změny biologické rozmanitosti v důsledku lidské činnosti byly rychlejší v posledních 50 letech než kdykoliv v lidské historii. Řídící změny, které způsobují ztráty biologické rozmanitosti, povedou ke změně daného ekosystému. Tyto změny jsou buď stabilní, nevykazují žádné známky, či klesající v čase, nebo jsou vedeny ke zvyšování intenzity (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Dnes téměř zaniká dřívější pestrá mozaika polí, luk a pastevních pozemků, mizí velká část lemovaných útvarů a probíhají nejrůznější regulace mokřadů, podmáčených míst a vodotečí. Německá studie nedávno ukázala, že struktura zemědělské krajiny má vliv na agroekosystém v biologické rozmanitosti, která zahrnuje i EH a tedy i ekosystémové služby (Tscharntke et al., 2005). V ČR se navzdory celkově neuspokojivému stavu přírodního prostředí, ve srovnání s ostatními členskými zeměmi EU, uchovaly cenné části přírody v relativně dobrém stavu nebo stavu, který skýtá možnost obnovy přírodních procesů (Brožová,



2004). Umět zaznamenat a vysvětlit dlouhodobé změny vegetace je mimořádně důležité z hlediska ochrany diverzity druhů a společenstev (Hédl, 2005). Plevelná společenstva se utvářejí pod vlivem vzájemně podmíněného komplexu přírodních podmínek a uplatňované soustavy hospodaření (Soukup, 2005). Stále více se uznává, že biologická rozmanitost v agroekosystémech přináší významné tendence do zemědělské výroby jako biologickou kontrolu nad škůdci (Meyling, Eilenberg, 2007).

Používání chemických metod ošetření plodin je omezováno výběrem odrůd se zvýšenou rezistencí proti chorobám a škůdcům. IOR vychází především ze správných agrotechnických postupů, spočívajících ve správném dodržování střídání plodin v osevních postupech, v optimálních způsobech obdělávání či zpracování půdy, v čištění osiva, v péči o kvalitu statkových hnojiv a v termínech sklizně narušujících reprodukční cyklus plevelů (omezující tvorbu diaspor a jejich šíření). Provázanost článků systému IOR umožňuje minimalizovat spotřebu pesticidů v ochraně rostlin při zabezpečení přiměřených výnosů.

## 2. 2 Biologická ochrana rostlin

Biologickou ochranou rozumíme využívání živých přirozených nepřátel pro regulaci škodlivých organismů (Landa et al., 2007a). Biologická ochrana rostlin je nejčastěji definována jako záměrné využívání živých přirozených nepřátel nebo antagonistických organismů, s cílem snížit populační hustotu škodlivých činitelů, živočichů nebo rostlin na ekonomicky přijatelnou úroveň (Landa et al., 2002).

Využití živých organismů k biologické ochraně je možné těmito způsoby:

- Podpora a udržení užitečných organismů

Podpora v přirozených podmínkách, kdy v pestrých společenstvech roste více druhů kulturních rostlin a není tak problém najít potravu v době vegetace dostupnou pro larvy i dospělé užitečných druhů.

Takto podporovat lze např. dravé roztoče a některé druhy hmyzu např. z čeledi: Coccinellidae, rodu: *Coccinella*, druh: *Coccinella septempunctata* L. (slunéčko sedmítečné) a rodu: *Adalia*, druh: *Adalia bipunctata* L. (slunéčko dvoutečné). Většinou se však dospělci živí nektarem z květů a larvy jsou dravé např. pestřenky, lumci. K ochraně polních i lesních kultur proti hrabošům přispívá podpora dravých ptáků a sov (Kazda et al., 2010).



EH konkrétně *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae*, patří mezi přirozené nepřátele škůdců v agroekosystémech a jsou kandidáti pro budoucí zachování biologické kontroly v oblastech mírného pásma (Meyling, Eilenberg, 2007). Biologická ochrana je biologická kontrolní strategie, která přijímá zemědělské praktiky a ekologické manipulace za účelem zvýšení životních podmínek pro konkrétní přirozené nepřátele škůdců. Je to účelná manipulace životního prostředí ve prospěch EH, a proto je nutná základní znalost aspektů ekologie, faktorů životního prostředí, agronomické praxe, přirozeného výskytu agroekosystémových organismů, populační dynamiky a interakce s jinými organismy.

- Introdukce nových užitečných organismů

V ČR se tato metoda využívá velmi málo. Úspěšně proběhla například introdukce chalcidky *Aphelinus mali* H. (mšicovníka vlnatkového), jakožto přirozeného nepřítele mšice *Eriosoma lanigerum* H. (vlnatky krvavé). (Kazda et al., 2010).

- Umělé masové namnožení a vysazení užitečných organismů

Přirození nepřátelé jsou produkováni a jednorázově nebo periodicky introdukováni do napadených zemědělských plodin. Cílem je nejen okamžitý ochranný efekt, ale i dlouhodobější regulace populací multivoltinních druhů škůdců (po celou dobu pěstitelského cyklu, účinnost i na generace cílového škůdce, které se realizují až po introdukci). Strategie má výrazně technologický charakter, nutným předpokladem jsou masové chovy a umělé produkce. Komerčně je tato strategie realizována standardními prostředky a přípravky biologické ochrany. Metoda opakovaných introdukcí v průběhu jedné vegetace je téměř výhradně využívána v komplexní biologické ochraně.

Správné zvládnutí biologické ochrany zaručuje na rozdíl od ochrany chemické dlouhodobou ochranu rostliny proti přesně specifikovanému škůdci nebo chorobě. Základním úspěchem při využití biologické ochrany rostlin je správné určení organismu, který rostliny poškozuje a následný výběr vhodného biologického preparátu (Kazda et al., 2010).



## 2. 3 Entomopatogenní houby

Velmi zajímavou skupinou hub jsou entomopatogenní houby (dále jen EH), které patří mezi nejdéle známé a nejčastěji determinované entomopatogenní mikroorganismy asociované s hmyzem, protože jejich růst na povrchu těla různých hostitelů je na rozdíl od ostatních skupin entomopatogenních mikroorganismů snadno vizuálně patrný (Landa, 1994). Zahrnují mnoho druhů, které jsou v posledních letech zkoumány pro účely biologické ochrany. Často vyvolávají přirozené epizootie v populacích hmyzu, čímž se řadí mezi významné mikroorganismy regulující hmyzí populace (Butt, Goettel, 2000).

Entomopatogenní organismy patří mezi přirozené nepřátele hmyzích škůdců v agroekosystémech (Meyling, Eilenberg, 2007). Zvláštní skupinu hub představují druhy, které mohou vyvolávat primární onemocnění různých vývojových stádií hmyzu (Landa, 1998). Poměrně velkou skupinu EH tvoří druhy, které kromě hmyzu rostou i na mrtvém substrátu organických zbytků a jejichž patogenita pro hmyz je jen jednou z možností jejich existence (Weiser, 1966). Na rozdíl od bakterií a virů, které musí vniknout přímo do těla hmyzu a vyvolat onemocnění, EH infikují hmyz přímým průnikem přes pokožku (Leger, Wang, 2009). Ve skutečnosti existuje více než 700 druhů EH, které jsou původci onemocnění hmyzu (Hajek, 2004). EH byly zkoumány díky své účinnosti v boji proti širokému spektru hmyzích škůdců (Butt et al., 2001).

### 2. 3. 1 Zařazení entomopatogenních hub do systému

Pravé houby (říše: *Mycota*) se dělí do čtyř skupin: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* (Maniania et al., 2007). Mnoho druhů EH patřících do tříd *Hyphomycetes* a *Zygomycetes* vyvolává primární onemocnění u suchozemského hmyzu, zatímco houby náležející do třídy *Chytridiomycetes* a *Oomycetes* napadají převážně hmyz vodní (Butt, Goettel, 2000). Z několika odlišných revizí se pro klasifikaci EH nejvíce ujal upravený klasifikační systém Ainswortha (Ainsworth, 1973). Dle klasifikačního systému Ainswortha jsou nejvyššími taxony hub *Myxomycota* - houby vytvářející plasmodiální formy a *Eumycota* – houby, které zpravidla vytváří mycelium.



Všechny EH patří do kmene *Eumycota*, kde jsou zastoupeny v podkmenech *Mastigomycotina* (třídy *Chytridiomycetes*, *Blastocladales*); *Zygomycotina* (třída *Zygomycetes*: řády *Entomophthorales*, *Mucorales*); *Ascomycotina* (třída *Pyrenomycetes*: řády *Spaeriales*, *Laboulbeniales*); *Basidiomycotina*. V uměle vytvořené skupině *Deuteromycotina* (třída *Hyphomycetes*: řád *Moniliales*) (Inglis et al., 2001) jsou zařazena imperfektní stádia hub.

V pododdělení *Deuteromycotina* je zastoupena převážná část rodů s druhy EH, které mají praktický a potencionální význam v biologické ochraně rostlin. K nejznámějším patří houby rodů *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* (= *Paecilomyces*), *Lecanicillium* (= *Verticillium*), *Hirsutella*, *Nomuraea* a *Tolypocladium* (Maniania et al., 2007). V těchto rodech je zastoupena řada druhů, z nichž je již v současnosti celá řada využívána ve formě standardních biopreparátů k biologické regulaci populací škůdců zemědělských plodin a kultur. Většina hub této skupiny může realizovat kompletní vývojový cyklus i v alternativních systémech bez přímé vazby na živého hostitele, to znamená, že prodělají saprofytický cyklus na odumírající organické hmotě různého původu.

Další velmi významnou skupinu hub tvoří druhy náležející do řádu *Entomophthorales* (podkmen *Zygomycotina*; třída *Zygomycetes*). EH zastoupené v tomto řádu (např. houby patřící do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a další) reprezentují obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán výhradně na živého hostitele. Právě tento biotrofní charakter však znemožňuje praktické využívání těchto hub. Převážnou většinu hub z řádu *Entomophthorales* je možno produkovat pouze v „in vivo“ systémech na přirozených hostitelích, což prakticky znemožňuje jejich masovou produkci, která je nezbytným předpokladem komercializace standardních biopreparátů (Papierok, Hajek, 1999; Pell et al., 2001).



## TABULKA 1

### Hlavní taxony hub a seznam entomopatogenních hub

KMEN	TŘÍDA	ŘÁD	DRUH
<i>Ascomycota</i> Představují největší taxonomickou skupinu v rámci <i>Eumycot</i> , s více než 30 000 druhů.	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Endomycetales</i>	<i>Blastodendrion pseudococci</i> <i>Monosporella unicuspidata</i> <i>Mycoderma</i> sp.
	<i>Laboulbeniomycetes</i>	<i>Laboulbeniales</i>	<i>Fanniomyces ceratophorus</i> <i>Filariomyces forficulae</i> <i>Hesperomyces virescens</i> <i>Trenomycetes histophthorus</i>
	<i>Loculoascomycetes</i>	<i>Pleosporeales</i>	<i>Podonectria coccicola</i>
	<i>Plectomycetes</i>	<i>Ascospherales</i>	<i>Ascophaera apis</i>
	<i>Pyrenomycetes</i>	<i>Sphaeriales</i>	<i>Cordycepioideus bisporus</i> <i>Cordyceps aphodii</i> <i>Torrubiella carnata</i> <i>Nectia flammea</i> <i>Hypocrella amomi</i> <i>Calonectria pruinosa</i> <i>Aschersonia aleyrodis</i>
	<i>Coelomycetes</i>		<i>Tetranacrium</i> sp. <i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Hyphomycetes</i>		<i>Beauveria bassiana</i> <i>Culicinomyces avenaceum</i> <i>Fusarium entomophila</i> <i>Hirsutella thompsonii</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Nomuraea rileyi</i> <i>Pecilomyces fumosoroseus</i> <i>Sorosporella uvella</i> <i>Stibella nigra</i> <i>Tolypocladium cylindrosporum</i> <i>Verticillium lacanii</i>
<i>Basidiomycota</i>	<i>Phragmobasidiomycetes</i>	<i>Septobasidiales</i>	<i>Septobasidium clelandii</i> <i>Uredinella</i> sp.
<i>Chytridiomycota</i>	<i>Chytridiomycetes</i>	<i>Chytridiales</i>	<i>Myiophagus ucrainicus</i>
		<i>Blastocladales</i>	<i>Coelomomyces stegomyiae</i> <i>Coelomycidium simuli</i>
<i>Oomycota</i>	<i>Oomycetes</i>	<i>Legenidiales</i>	<i>Lagenidium giganteum</i>
		<i>Saprolegniales</i>	<i>Aphanomyopsis sexualis</i> <i>Leptolegnia chapmani</i>
<i>Zygomycota</i> V současnosti asi 200 známých druhů.	<i>Trichomycetes</i>	<i>Harpellales</i>	<i>Legeriomyces</i> sp.
		<i>Eccrinales</i>	<i>Taeniella carani</i>
		<i>Assellariales</i>	<i>Asellaria aselli</i>





	<i>Zygomycetes</i>	<i>Amoebidiales</i> <i>Entomophthorales</i>  <i>Mucorales</i>	<i>Amoebidium parasiticus</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Entomophthora muscae</i> <i>Entomophaga grylli</i> <i>Erynia aquatica</i> <i>Mucor hienalis</i>  <i>Sporodiniella umbellata</i>
--	--------------------	--	---

(upraveno podle Srivastava et al., 2009)

## 2. 3. 2 Zatřídění jednotlivých entomopatogenních hub do systému

### 2. 3. 2. 1 Rod *Beauveria* VUILL. 1912

Rod *Beauveria* Vuillemin reprezentují široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, případně na stádiích hmyzu, která se v půdě vyskytují pouze příležitostně (hibernace). V sortimentu hostitelů jsou zastoupeny i fytofágní druhy z řádů rovnokřídlí (*Orthoptera*), brouci (*Coleoptera*) např. potměnk moučný (*Tenebrio molitor* L.), larvy a kukly motýlů (*Lepidoptera*) např. zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis* H.) a dvoukřídlého hmyzu. V současnosti jsou k dispozici i kmeny *B. bassiana* vysoce virulentní vůči některým druhům stejnokřídlého hmyzu (*Homoptera*). Nákazy vyvolané těmito houbami jsou označovány jako „bílé muskardiny“, protože infikovaný jedinec zpravidla porůstá hustým, bílým myceliem (Weiser, 1966), překrývajícím exoskelet se vzpřímenými svazky hyf (synemata).

Konidiogenní buňky často bývají v hustých svazcích (nebo přeslenech či samostatně), bezbarvé, s kulovitou nebo baňkovitou bází a vroubkovitým (zubovitým) apikálním prodloužením (rachis – páteř), nesoucí po jedné konidii na každém zubu, konidie nepřehrádkované (Humber, 1997).

#### Důležité charakteristické znaky:

- ✓ bohaté mycelium uvnitř i na povrchu hostitele, rozmnožovací orgány jsou na povrchu hostitele
- ✓ mycelium barvy bílé, krémové, oranžové nebo růžové
- ✓ konidie se oddělují jednotlivě vyrůstající z hyf umístěných na konidioforech jednotlivě nebo v přeslenech

Mezi zástupce rodu *Beauveria* VUILL. jsou řazeny *B. bassiana*, *B. brongiartii*, *B. globurifera*, *B. tenella*, *B. velata*, *B. amorpha* a *B. annulatus*.



### 2. 3. 2. 1. 1 Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* (Bals. – Criv.) Vuill. 1912

Houba *Beauveria bassiana* byla jedním z prvních poznanych původců hmyzích nákaz. Již od 16. století byla sledována nákaza v chovech bource morušového. Choroba byla označována v Itálii jako "mal del segno" nebo "calcino", na území Francie byla známa pod názvem "muscardine". Parazitický původ tohoto onemocnění housenek bource morušového prokázal na počátku třicátých let 19. století Agostino Bassi. Determinaci této EH provedl v roce 1835 Giuseppe Balsamo Crivelli a zařadil ji do rodu *Botrytis* (*Botrytis paradoxa*), později změnil označení na *Botrytis bassiana* na počest jejího objevitele. V roce 1912 revidoval systematické zařazení Vuillemin a do dnešní doby je respektováno jeho zařazení do rodu *Beauveria* a označení druhu *bassiana* (Dirlbeková, 1991).

EH *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) se přirozeně vyskytuje v přírodě, je kosmopolitně rozšířená a je typickým představitelem entomopatogenní mykoflóry půdy, kde přežívá ve formě konidií nebo saprofytického mycelia. Byla izolována z více jak 700 druhů hmyzu, z devíti řádů, nejvíce hostitelů se nachází mezi *Lepidoptera* a *Coleoptera*. *B. bassiana* způsobuje primární onemocnění u více než 100 druhů hmyzu (Hajek, Leger, 1994). Výskyt na škůdcích kolonizujících výhradně nadzemní části rostlin je velmi řídký (Weiser, 1966), nicméně v půdě je houba *B. bassiana* perzistentní až po dobu 2 let (Lingg, Donaldson, 1981). Konidie obsahují na svém povrchu látku ze skupiny monoaminů známou jako hydrophobins, která poskytuje ochranu konidiím v přirozeném prostředí a zvyšuje jejich hydrofobní vlastnosti (Bidochka et al., 1995).

Na umělých živných půdách i na přirozeném hostiteli vytváří mycelium mléčně bílé barvy. Konidie jsou globoidního až subgloboidního tvaru, velikost 2-3x2,0-2,5 $\mu$ m. Konidiogenní struktury tvoří husté shluky, hrozny (Dirlbeková, 1991). Nejčastější cestou penetrace houby *B. bassiana* do hostitele je povrch těla (Ferron, 1978), přes kutikulu a stigmata. Kromě těchto hlavních způsobů infikuje *B. bassiana* hmyz též *per os*, zvláště druhy s kousavým ústním ústrojím (Feng et al., 1994). Byla však zaznamenána také infekce přes dýchací systém (Clark et al., 1968) a ústní ústrojí (Siebeneicher et al., 1992). K nákaze hmyzu dochází konidiemi, které klíčí na povrchu kutikuly a po krátkém růstu po povrchu vnikají vláknem kolmo do chitínového pokryvu



kutikuly a dále do dutiny tělní. Rostoucí klíční vlákno enzymaticky penetruje povrch (Smith, Grula, 1981). Aby mohlo dojít k penetraci a následné infekci, musí *B. bassiana* produkovat nejméně dva typy enzymů v určitém pořadí. Jakmile pronikne houba dovnitř těla hostitele, produkuje sekundární metabolit beauvericin pro oslabení imunitního systému hostitele. Po smrti hostitele umožňuje houbě produkované antibiotikum (oosporein) konkurovat intestinálním bakteriím.

Uvnitř těla vznikají válcovité konidie, endokonidie (blastospory), které na fruktifikujících vláknech vyrůstají porůznu po dvou i více na krátké stopce. Z endokonidií narůstají další hyfy a na těch se po určitém růstu tvoří opět endokonidie. Narůstající hyfy vyplní tělo hmyzu (Weiser, 1966). Při vlhkosti 92 % a více prorůstají hyfy na povrch těla. Na povrchu mumifikovaného těla se zdvíhají vlákna, na kterých se vyvíjejí vzdušné konidie.

Optimální teplota růstu je 23 - 26°C při relativní vlhkosti vzduchu nebo vlhkosti substrátu 80 - 100%. Minimální teplota pro růst mycelia je 5 - 8°C, maximální teplota pro růst mycelia je 28 - 31°C (Dirlbeková, 1991).

V přírodě přetrvává druh *Beauveria bassiana* v povrchových vrstvách půdy jako mycelium jednak v uhynulých hostitelích a jednak na organických zbytcích (saprofytní fáze). Navzdory velkému množství hostitelů byly pouze zřídka sledovány epizootie způsobené houbou *B. bassiana* u přirozených populací škůdců (Feng et al., 1994). Houba může též kolonizovat rostliny jako endofyt, čehož je možno využít při redukci zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) (Bing, Lewis, 1992). Dávky blízké LD50 mohou iniciovat subletální nebo sekundární efekt. Jedná se především o ovlivnění reprodukčního potenciálu (plodnosti) (např. u *Leptinotarsa decemlineata*, *Sitona lineatus*) (Feng et al., 1994).

*Beauveria bassiana* je typickým představitelem entomopatogenní mykoflóry půdy. Je rozšířena po celém světě. Přestože se jedná o typického zástupce půdní mykoflóry, komerční využití preparátů na bázi EH je cíleno na foliární škůdce (škůdci nadzemních částí rostlin). Tato houba je nejčastěji aplikována ve formě postřiku konidiovou suspenzí. Byla testována v laboratorních i polních podmínkách proti množství škůdců, jako jsou třásněnky, molice a mšice (Legaspi et al., 2000). Izolace kmenů *B. bassiana* ze zástupců řádu *Diptera* (*Muscidae*) a následné testování demonstrují potenciál k využití v biologické ochraně také proti mouchám (Watson et al., 1995). Mimoto je tato houba neškodná pro řadu necílových organismů (Goettel et al.,



1990). Přestože není *B. bassiana* přirozeným nepřítelem molic, jsou nymfální stádia vysoce náchylná k tomuto patogenu.

Studiu patogenity k roztočům byla věnována menší pozornost, přestože se jedná o řadu škůdců. Jejich malá velikost často ztěžuje diagnostiku. Jako hostitel houby *B. bassiana* je citováno množství roztočů. Pena et al. (1996) demonstruje patogenitu k roztoči *Polyphagotarsonemus latus* (Banks). EH druhu *Beauveria bassiana* je používána v ochraně proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*). Využívání tohoto biopreparátu v boji s lýkožroutem je rozšířeno zejména v Německu, Švýcarsku a Rakousku. Experimentují s ním však i další země, včetně České republiky. V roce 2007 byl takovýto biopreparát použit i na vybrané lokalitě NP Šumava (Landa et al., 2007b).

### 2. 3. 2. 2 Rod *Metarhizium* Sorokin 1879

Tento rod reprezentují zástupci druhů široce polyfágních hub *M. album*, *M. brunneum*, *M. anisopliae* a *M. flavoviridae*, které jsou převážně vázány na půdní hmyz, s širokým spektrem hostitelů (rovnokřídílí - *Orthoptera*, brouci - *Coleoptera* a dvoukřídílí - *Diptera*) a jimiž způsobená infekce byla zaznamenána na více než 200 hostitelích (Maniania et al., 2007).

Infekce jedince je snadno rozpoznatelná několik dní po smrti. Zpočátku jsou vidět jen bílé vláknité hyfy, které se následně rozrůstají a zabarvují od olivova až na charakteristickou zelenou barvu mycelia. Nákazy vyvolané těmito houbami jsou označovány jako „zelené muskar-diny“. V závislosti na druhu a kmenu *Metarhizia*, se vláknité mycelium může zbarvovat od bílé přes žlutou až po hnědou a zelenou barvu. Tyto houby jsou kosmopolitně rozšířeny a zcela běžně se vyskytují v zemědělských i nezemědělských půdách (lesních ekosystémech) v celé oblasti mírného pásma (Weiser, 1966). Navíc nedávná zjištění naznačují, že tyto houby tvoří asociace s kořeny rostlin v rhizosféře a přežívají v tomto prostředí lépe než v okolní půdě (Zdroj -1, 2012). Druhy rodu *Metarhizium* jsou také známé tím, že produkují látky, které jsou toxické pro členovce.



### 2. 3. 2. 2. 1 Entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae*

(Metschnikoff) Sorokin 1883

Druh *M. anisopliae* byl poprvé izolován a popsán v roce 1878 Mečnikovem na vrubounovitém broukovi z čeledi Scarabeidae *Anisopliae austriaca*. V roce 1879 jej Sorokin zařadil do systému. V současnosti je považován druh *M. anisopliae* za polyfyletický, kmeny jsou dále děleny do 4 poddruhů: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *acridum* (Driver et al., 2000). Infikuje více než 200 druhů hmyzu z rozdílných řádů, především *Orthoptera*, *Hemiptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* a *Hymenoptera*. Patří mezi běžné zástupce půdní mykoflóry, nicméně se po celém světě v malé míře vyskytuje i na hmyzu ve fyloplánu (Inglis et al., 2001). Houba *M. anisopliae* produkuje dva typy spor, vzdušné dlouhé tyčinkovité konidie, které vytvářejí kompaktní sloupce řetízků (Humber, 1997) a jsou produkovány na specializovaných sporogenních krátkých hyfách nazývaných phialidy v průběhu saprofytické fáze a jsou označovány jako asexuální spory. Druhý typ spor je produkován v hmyzí hemolymfě a označuje se jako blastospory (Leland, 2001). Nákazy vyvolané houbou *M. anisopliae* jsou označovány jako „zelená muskardina“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem. Konidiofory jsou větvené, tvořící útvary podobné hustým mnohoramenným svícňům. Vzdušné konidie obsahují na svém povrchu látku ze skupiny monoaminů známou jako hydrophobins, která poskytuje ochranu konidiím v přirozeném prostředí a zvyšuje jejich hydrofobní vlastnosti. *M. anisopliae* používá při penetraci hmyzí kutikuly podobně jako většina ostatních druhů EH kombinaci biochemických (enzymy) a fyzikálně mechanických (mechanický tlak penetrující hyfy) prvků. Nejvýznamnějším kutikulu degradujícím enzymem je subtilisin např. Pr1 (Wang et al., 2002). Optimální teplota pro většinu kmenů *M. anisopliae* je 25°C, nicméně teplotní růstový poměr se u jednotlivých kmenů může značně lišit.

### 2. 3. 2. 3 Rod *Isarium* Pers. 1794

Rod *Isarium* (= *Paecilomyces*) (Maniania et al., 2007) reprezentují široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích z mnoha řádů hmyzu (*Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Coleoptera*,



*Lepidoptera*, *Diptera*), fytofágních roztočích (např. svluškovití – *Tetranychidae*) a některých druzích háďátek (cystotvorná háďátka z rodů *Globodera*, *Heterodera*) (Koubová, 2009). Rod *Paecilomyces* byl definován a popsán Bainierem. V roce 1974 provedl Samson revizi rodu, který rozdělil 31 blízce příbuzných druhů hub do dvou sekcí - *Paecilomyces* a *Isarioidea*. Taxonomie rodu je však stále poněkud nejasná a pravidelně se objevují revize rodu (Humber, 1997).

K nejvýznamnějším zástupcům rodu *Isarium* patří široce polyfágní *Isaria fumosorosea*. *I. fumosorosea* se může vyvíjet jako ektoparazit na některých druzích rzí (*Uromyces dianthi*) a na různých druzích padlí (*Sphaerotheca fuliginea*) (Landa, 1994). Rod *Isarium* obsahuje i další druhy hub jako jsou *Isaria farinosa*, *I. amoennerosea*, *I. javanica* a *I. tenuipes* (Maniania et al., 2007).

#### Základní charakteristika zástupců rodu *Isaria*:

- ✓ zahrnuje 10 druhů (Nguya et al., 2007)
- ✓ popsáno na druhu *Isaria fumosorosea*
- ✓ druhy jsou saprofytické a entomopatogenní
- ✓ u mezofilních druhů se optimální teplota růstu pohybuje mezi 20 – 24°C
- ✓ kolonie zabarvující se do světlých barev (bílé, žluté, světle zelené, růžové)
- ✓ tvorba synnemata (coremií-konidiomat) u entomopatogenních druhů (Koubová, 2009)

### **2. 3. 2. 3. 1 Entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea* Wize 1904**

Houba *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Maniania et al., 2007) je schopna infikovat široký hostitelský okruh a byla zjištěna na více než 40 druzích hmyzu (Hoddle, 2004) z více než 25 čeledí (Koubová, 2009). Vykazuje nejen statut entomopatogenní a akarifágní houby, ale za určitých okolností vykazuje i statut mykoparazita. *I. fumosorosea* je hojně rozšířený kosmopolitní druh, také často izolován z různých půd (Koubová, 2009).

Z abiotických faktorů působících na infekční cyklus je nejdůležitější relativní vzdušná vlhkost. Při klíčení konidií vyžaduje *I. fumosorosea* nejméně 10 - 12 hodin vlhkost vyšší než 95%. Teplota se ukazuje méně limitujícím faktorem. Optimální růst je sledován při 20 - 30°C (průměrný růst houby dosahoval 0 - 5,2 mm za den), vyšší teploty (30 - 40°C) omezovaly růst více než teploty nižší (8 - 11°C) (Vidal et al., 1997).



Na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách vytváří *I. fumosorosea* bílé plst'ovité kultury (průměr okolo 4 cm za 14 dnů při 25°C), které později mění barvu do odstínů narůžovělé, nařaflovělé až šedofialové barvy. Barevné zabarvení kolonií přímo koreluje se stupněm sporulace kultury (Landa 1994). Hlavní znaky druhu jsou určovány na morfologických strukturách sporulujících kultur. Nejprve vytvářejí konidiofory, které jsou na hyfách umístěny přeslenovitým způsobem. Na koncích konidioforů se následně formují konidiogenní phialidy (3-6 phialid na 1 konidioforu), na kterých se vytvářejí oválné konidie. Konidie se na koncích phialid oddělují postupně, nejmladší konidie je vždy v kontaktu s phialidou a odtlačuje starší konidie dál do tvořícího se řetízku. V jednom řetízku konidií přichyceném na konidiogenní fialidě může být přítomno i více než 50 konidií (Osborne, Landa, 1992). Konidie *I. fumosorosea* jsou silně hydrofobní.

*I. fumosorosea* je jeden z nejvíce perspektivních houbových druhů, který byl popsán jako patogen molice *T. vaporariorum* (Bolckmans et al., 1995) a *Bemisia tabaci* (Osborne, Landa, 1992). První záznam o asociaci s molicemi pochází z Číny z roku 1983, kde byla *I. fumosorosea* zjištěna jako patogen přirozeně se vyskytující v populacích molice skleníkové *T. vaporariorum* ve sklenících z oblasti Pekingu, kde působila velmi silné spontánní epizootie, které dočasně zcela zdecimovaly populace tohoto škůdce. Druhým případem přirozené epizootie způsobené *I. fumosorosea* v populacích molic byl periodický výskyt tohoto patogena v populacích molice tabákové *Bemisia tabaci* na Floridě (Osborne et al., 1990). *I. fumosorosea* způsobila rozsáhlé epizootie v populacích *B. tabaci* a *T. vaporariorum* jak ve sklenících, tak i v polních kulturách (Osborne, Landa, 1992). Tento nález inicioval intenzivní výzkum, který vyústil v poměrně rychlý vývoj biopreparátu na bázi *I. fumosorosea*, který je známý pod obchodním názvem "PFR 97 WDG - Apopka®" (Apopka – jméno oblasti na Floridě, kde byl v roce 1987 poprvé zachycen a odizolován Dr. Lance S. Osbornem), v současnosti je uložen v centrální americké sbírce mikroorganismů (ATCC). Biopreparáty na bázi PFR 97 lze považovat za bezpečné a z hlediska případné toxicity za bezproblémové (Landa, 1994). Molice *B. tabaci* a *T. vaporariorum* patří mezi velmi senzitivní hostitele, na kterých může *I. fumosorosea* prodělavat vývoj na všech vývojových stádiích (Bohatá, 2005).

*I. fumosorosea* byla testována i s cílem následného záměrného využití v biologické regulaci populací některých druhů mšic. V krátké době po aplikaci (1-2 hod.), lze na ošetřených mšicích sledovat známky "intoxikace", které se projevují sníženou



pohyblivostí, tzv. “knock down“ efektem a nekoordinovaným pohybem (Landa, 1994). Další pokusy s touto houbou prokázaly široce polyfágní základ a vysokou virulenci vůči třásněnkám, larvám některých druhů motýlů, larvám a kuklám vrtalek a dokonce i akaricidní účinnost vůči svilušce chmelové. *I. fumosorosea* je schopna vyvolávat i nákazu na vajíčkách svilušek. V několika případech byl prokázán i stimulující vliv na vývoj hostitelské rostliny (Landa, 1994).

Na bázi tohoto kmene PFR 97 je konstruován biopreparát, který je registrován pod obchodním názvem "PFR 97 205%WDG-Apopka®" (pro distribuci v USA) a PREFERAL® (pro distribuci v zemích EU). Tento biopreparát obsahuje blastospory *I. fumosorosea* vyprodukované pomocí submerzní fermentace a jemně mletou nutritivní složku. Tyto složky jsou formulovány do podoby drobných, vodou rozpustných granulí. Výrobce (CERTIS USA) garantuje standardní obsah účinné složky na úrovni minimálně  $1.0 \times 10^9$  CFU/1 g preparátu, při 95% klíčivosti blastospor ve finálním produktu (Pell et al., 2001).

*I. fumosorosea* je vzhledem k širokému hostitelskému okruhu považována za nadějnýho činitele biologické ochrany (Koubová, 2009). V její prospěch mluví i výsledky testů toxicity, kompatibility s přirozenými nepřáteli a minimálním nebezpečím pro životní prostředí (Osborne, Landa, 1992).

### 2.3.2.4 Rod *Lecanicillium* Zare & W. Gams 2001

Houby rodu *Lecanicillium* (= *Verticillium*) (Maniania et al., 2007) jsou významnými patogeny hmyzu a některé byly vyvinuty jako komerční biopesticidy (Goettel et al., 2008). Rod *Verticillium*, byl klasifikován na rod *Lecanicillium* ve kterém jsou zahrnuty řady hub jako *Lecanicillium lecanii*, *L. muscarium* a *L. longisporum* (Güclü et al., 2010). Některé izoláty jsou také velmi aktivní proti fytopatogenním háďátkům nebo houbám. *Lecanicillium* spp. využívají k přímé penetraci integumentu hmyzu a buněčných stěn houbových patogenů rostlin jak mechanického působení, tak i hydrolytických enzymů. (Goettel et al., 2008) V případě mykoparazitismu rostlinných patogenů je mechanismus účinku spojen s kolonizací pletiv hostitelské rostliny a vyvoláním systémové získané rezistence (SAR). Bylo také prokázáno, že hybridní kmeny *Lecanicillium* spp. získané fúzí protoplastů, které nesou rodičovské vlastnosti, mají širší hostitelský okruh a další prospěšné vlastnosti, jako např. zvýšenou vitalitu.





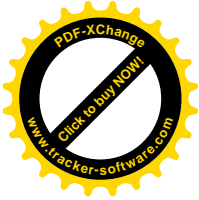
Tyto hybridy vykazují vyšší virulenci vůči mšicím, molicím a cystotvornému háďátku sójovému (*Heterodera glycines*) (Koubová, 2009).

## 2. 3. 2. 4. 1 Entomopatogenní houba *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams 2001

Zare a Gams provedli v roce 2001 revizi rodu a druhu. *Lecanicillium muscarium* je kosmopolitně rozšířený druh EH.

Houba tvoří rozrůstající vzdušné mycelium, které je zbarveno do světlejších odstínů bílé barvy. V průběhu konidiogeneze se tvoří dlouhé, úzké lahvicovité konidiofory, na jejichž koncích se postupně tvoří elipsoidní konidie. Konidiofory jsou uspořádány v přeslenech a z jednoho místa protilehle vyrůstají 2, 3 až 4 konidiofory. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidiofory jsou vytvářeny postupně, mladší konidie odtlačuje dříve vytvořenou konidii do vytvářejícího se shluku, který má podobu kuličky. V závěrečné fázi sporulace se kuličky pokrývají mucilagenní hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Šimková, 2011). Konidie jsou slizovité, přichytávající se na kutikulu hostitele. Teplotní optimum pro *L. muscarium* je 15 – 25°C. Optimum pro vlhkost 85 – 90%, vysoká vlhkost je nezbytná nejméně po dobu 10 – 12 hodin. Spory *L. muscarium* jsou poškozovány ultrafialovým zářením. Houba je schopna během svého vývoje produkovat toxin bassianolide (Cloyd, 2005).

*L. muscarium* je velmi dobře známá polyfágní EH. Spontánní epizootie způsobené tímto patogenem jsou nejčastěji zaznamenány v populacích hmyzu řádu Homoptera, zvláště pak v populacích různých druhů mšic, molic (Hall, 1982) a červců (Hall, 1981). Časté jsou záznamy i s výskytem *Lecanicillium spp.* v populacích hostitelů patřících do jiných řádů hmyzu. V sortimentu hostitelů patogena byly zaznamenáni zástupci z řádů Orthoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera a Thysanoptera, z nichž zejména některé druhy třásněnek patří k velmi běžným hostitelům. Spektrum parazitizmu této houby (mykoparazitizmus) však není omezeno pouze na hmyz. Houba *Lecanicillium spp.* je rovněž schopna potlačovat řadu houbových patogenů rostlin, jako padlí, rzi, plísně nebo *Pythium* (Goettel et al., 2008).



## 2. 4 Potemník moučný *Tenebrio molitor*

Druh potemník moučný (*Tenebrio molitor* L.) patří mezi brouky (*Coleoptera*) do čeledi: Tenebrionidae. Dospělý brouk (dále jen imago) je dlouhý okolo 15 mm, jeho larvy jsou dlouhé až 30 mm. Označován převážně za synantropní druh. Jeho larva i imago škodí na obilí, mouce a moučných produktech. Ve volné přírodě se vyskytuje v odumírajících starých listnatých stromech a v ptačích hnízdech (Hůrka, 2005).

Pro laboratorní účely se tento druh chová v umělých speciálních chovech. Při chovu tohoto brouka se zachovává optimální teplota 20°C (pokojová teplota), při níž trvá vývojový cyklus 5 až 6 měsíců. Při vyšší teplotě se vývojový cyklus urychlí. U těchto intenzivních chovů je nutné od sebe oddělit stadium larvy a stadium imaga.

## 2. 5 Vývoj entomopatogenních hub

Infekční cyklus entomopatogenních deuteromycet lze rozdělit do pěti fází:

- I. přichycení spory na povrchu hostitele
- II. vytvoření klíčku
- III. penetrace kutikulou
- IV. vegetativní růst
- V. konidiogeneze (Osborne, Landa, 1992).

Obecný model vývoje mykóz na hostiteli lze rozdělit do tří fází:

- I. přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele (primární interakce)
- II. průnik patogena do tělní dutiny hostitele a vytvoření povrchového mycelia (parazitická fáze vývojového cyklu)
- III. externí sporulace a tvorba konidií nové generace (saprofytická fáze vývojového cyklu)

Vznik houbových epizootií v populacích hmyzu vyvolávají vitální a virulentní konidie (Boucias et al., 1988), které jsou energeticky dostatečně vybaveny, bez nutnosti absorbování externí živiny. K šíření konidií dochází nejčastěji nad povrchem půdy díky větru nebo dešťové vodě, v půdních částech se konidie šíří pomocí pohybu vody v půdě.



Uvnitř hmyzí populace dochází k šíření nákaz v souvislosti s vnitropopulačními procesy (migrace, kopulace a kladení vajíček).

Nejprve je třeba, aby konidie ulpěly na povrchu potenciálního hostitele (Hajek, 2004).

Primární adheze konidií je zajištěna:

- ✓ přímou vazbou mezi dvěma hydrofobními povrchy (konidie-kutikula hmyzu)
- ✓ prostřednictvím elektrostatických sil
- ✓ molekulární interakcí mezi látkami (hemaglutiny, glykoproteiny, steroly, polární lipidy), které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikuly hostitele

Konidie některých druhů hub jsou pro tuto fázi vybaveny adhezivními substancemi (např. mucilageny), pomocí kterých vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu (např. houby *Verticillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii*) (Vestergaard et al., 1999). Jiné druhy entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*) produkují suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem.

Klíčení konidií silně ovlivňují abiotické a biotické podmínky (Hesketh et al. 2009), dále závisí na externích živinách a zároveň na přítomnosti látek inhibiční povahy na povrchu kutikuly hostitele (mastné kyseliny a melanin) (Inglis et al., 2001). Při klíčení konidií v první části dochází k jejich výraznému bobtnání, které je doprovázeno komplexní přestavbou stěn a následnou tvorbou primárních klíčků (Boucias et al., 1988), které vytvářejí různé penetrační struktury (např. zduřelá špička klíčku, apresorium nebo extracelulární pouzdro). Z těchto struktur se dále formuje penetrační hyfa, která proniká do těla hostitele (Sosa-Gomez et al., 1997). Od určité fáze naklíčení je další vývoj patogena závislý na externím nutričním zdroji a dochází k utilizaci látek přítomných v kutikule hostitele (Boucias et al., 1988).

Při přímé penetraci kutikulou uplatňují houby kombinaci biochemických (enzymy) a fyzikálně mechanických (tlak penetrující hyfy) prvků. V první fázi penetrace jsou v oblasti apresoria (plochý terčovitý útvar na hyfách, který je přitíštěn na tělo hostitele) pronikající hyfy produkovány kutikulu degradující enzymy. Mezi enzymy podílející se na penetraci patří endoproteázy, esterázy, lipázy, chitinázy a chitobiázy, přičemž nejvýznamnější roli hrají exoproteázy (Butt et al., 1998). Koncová špička invazní hyfy tlakem proniká narušenou kutikulou hostitele do tělní dutiny. Častým



místem penetrace jsou méně sklerotizované části na povrchu těla (Boucias, Pendland, 1984). Kromě přímé penetrace kutikulou, využívají EH k pronikání do tělní dutiny i přirozené otvory.

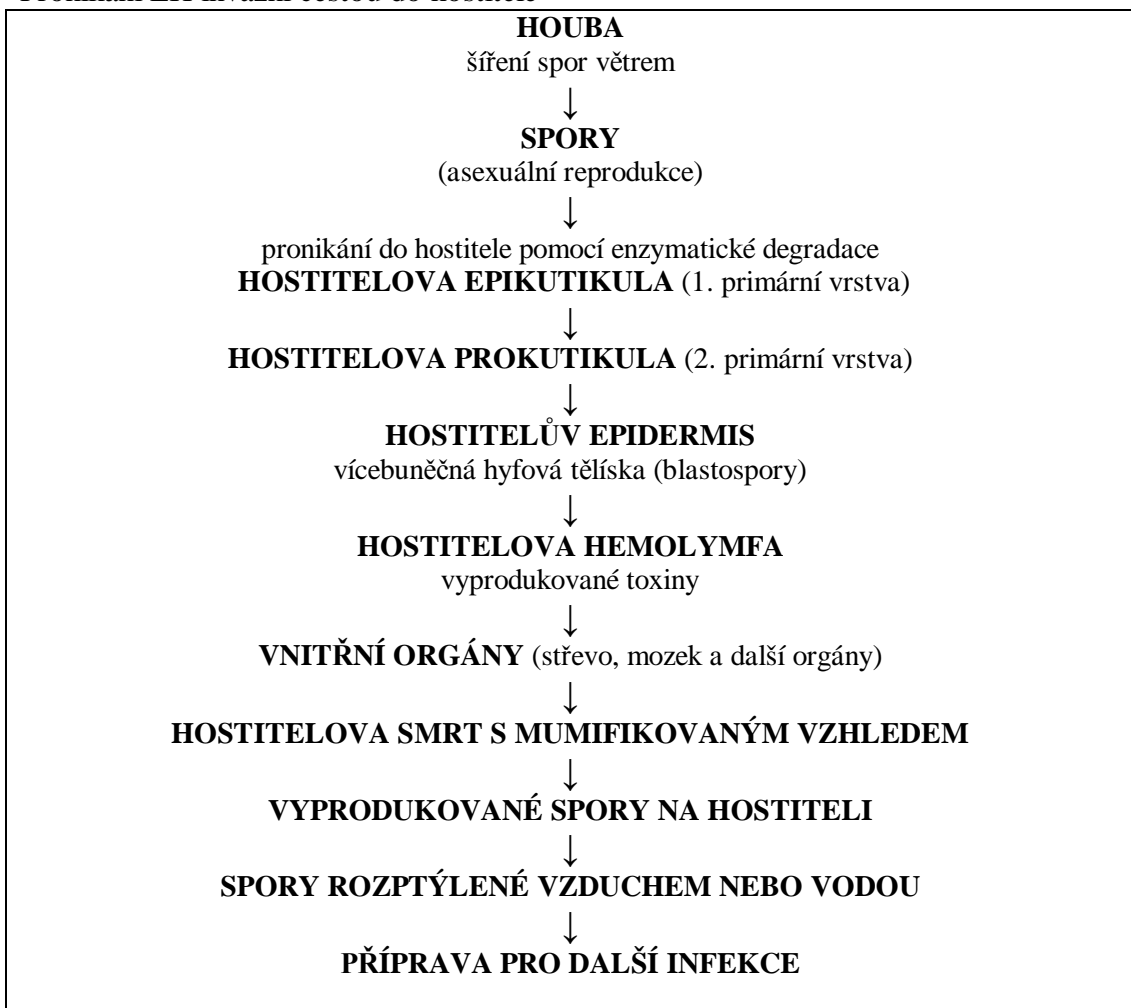
Po proniknutí invazní hyfy do těla hostitele nastupuje vlastní parazitická fáze. Patogen zpravidla rychle kolonizuje tělní dutinu, kde vytváří buď jedno nebo vícebuněčná hyfová tělíska (blastospory) (Inglis et al., 2001), která postrádají buněčnou stěnu, nicméně jsou pokryty tenkou fibrilózní vrstvou na plazmatické membráně. Blastospory se pomnožují pučením a ve velmi krátké době zcela vyplňují tělní dutinu hostitele. Dále se invaze patogena šíří pomocí hostitelské lymfy a nakonec napadá hostitelovy orgány a tkáně, následně na to hostitel umírá. Smrtí hostitele končí parazitická část cyklu. Jiné houby zabíjí hmyz mnohem rychleji, například prostřednictvím využití toxinů, které produkují. Rychlost infekce hmyzího hostitele a následný projev smrti jsou závislé i na druhu a kmenu hub, na velikosti hostitele a okolních podmínkách (Inglis et al., 2001).

Vývojový cyklus uzavírá saprofytická fáze, kdy většina entomopatogenních deuteromycet tvoří myceliální masu uvnitř tělní dutiny usmrčeného hostitele (tzv. mumifikace hostitele). Z myceliální masy pak na povrch těla mumifikovaného jedince prorůstá mycelium, na kterém se tvoří druhově specifické konidiofory, jejichž přítomnost signalizuje počátek poslední části vývojového cyklu patogena - konidiogenezi (Landa, 1994). V této fázi jsou nejpatrnější morfologické rozdíly mezi jednotlivými druhy EH (konidiofor, tvar a velikost konidií, uspořádání konidií atd.). Saprotrfnní fáze patogena končí úplnou sporulací. K šíření patogena dochází pomocí konidií šířených nejčastěji pasivně (voda, proudění vzduchu) nebo přímým kontaktem zdravých jedinců s jedinci infikovanými (Osborne, Landa, 1992).



**TABULKA 2**

Pronikání EH invazní cestou do hostitele



(upraveno podle Srivastava et al., 2009)

## 2. 6 Obecná charakteristika vztahů entomopatogenních hub k hostitelům

Mezi EH můžeme nalézt vysoce specifické druhy, které se vyskytují pouze na jednom hostiteli nebo jen na určitém stádiu jednoho hostitele a zároveň druhy, které napadají celou řadu druhů, rodů, čeledí nebo i vyšších systematických skupin (Weiser, 1966).

EH a jejich hostitelé se vyskytují volně v krajině a jsou ovlivňovány biotickými a abiotickými faktory. Změny životního prostředí, zejména příchod nových druhů (hostitel, houba), změny klimatu, fragmentace mají vliv na celou tuto komunitu. Vzájemná interakce je pravděpodobně největší v polo-přírodních stanovištích.

Patogenita je kvalitativní schopnost patogena způsobit onemocnění a je určena celou řadou faktorů, včetně fyziologie hostitele (např. obranné mechanismy), fyziologie hub (např. patogenita faktorů - tvorba enzymů a toxinů) a podmínkami prostředí (Inglis et al., 2001). Další možností pronikání patogena do těla hostitele je prostřednictvím přirozených tělních otvorů (ústní orgán, tracheální systém, řitní otvor, a další). EH parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera* a *Diptera* (Weiser, 1966). Houby mají jedno z nejširších hostitelských spekter v rámci patogenů členovců (Inglis et al., 2001). Nejčastěji infikovaným vývojovým stádiem hmyzu jsou larvy, méně často kukly a dospělci. Vajíčka hmyzu jsou infikována velice málo.

### TABULKA 3

Hmyzí škůdci a entomopatogenní houby

ŘÁD	CÍLOVÝ HMYZÍ ŠKŮDCE	INFIKOVANÝ	HOUBA (TRÍDA)
<i>Coleoptera</i>	<i>Acanthoscelides obtectus</i> zrnokaz fazolový	imago	<i>Beauveria bassiana</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> mandelinka bramborová	larva, nymfa a dospělec	<i>Beauveria bassiana</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Otiorhynchus sulcatus</i> lalokonosec rýhovaný, <i>Sitona lineatus</i> listopas čárkový	larva	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>B. brongniartii</i> , <i>M. anisopliae</i> , <i>M. flavoviride</i> , <i>P. fumosoroseus</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Oryctes rhinoceros</i> nosorožík	dospělec larva	<i>M. anisopliae</i> ( <i>Hyphomycetes</i> ) <i>B. bassiana</i> , <i>B. tenella</i> , <i>M. anisopliae</i> , <i>P. fumosoroseus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Sitophilus oryzae</i> pilous rýžový	dospělec	<i>B. bassiana</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Sitophilus granarius</i> pilous černý	dospělec	<i>B. bassiana</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
<i>Diptera</i>	<i>Arachnocampa luminosa</i>	larva	<i>Tolyposcladium</i> spp. ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Aedes cantator</i>	larva	<i>Erynia aquatica</i> ( <i>Entomophthoraceae</i> )



	<i>Aedes aegypti</i> komár tropický	dospělec	<i>Coelomomyces stegomyiae</i> ( <i>Coelomomycetaeaceae</i> )
		larva	<i>Laptolegnia chapmanii</i> ( <i>Oomycetes</i> )
		larva	<i>M. anisopliae</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Aedes kochi</i>	larvy	<i>Lagenidium giganteum</i> ( <i>Oomycetes</i> )
	<i>Culex pipiens</i> komár pisklavý, <i>Anopheles stephensi</i>	larvy	<i>Lagenidium giganteum</i> ( <i>Oomycetes</i> )
	<i>Culex quinquefasciatus</i> , <i>Culex pipiens</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles quadrimaculatus</i>	larvy	<i>Laptolegnia</i> ( <i>Oomycetes</i> )
	<i>Culex pipiens</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i>	larva	<i>M. anisopliae</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	larva	<i>M. anisopliae</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Delia antiqua</i> květílka cibulová	dospělec	<i>Metarhizium anisopliae</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Musca domestica</i> moucha domácí	dospělec	<i>Entomophthora muscae</i> ( <i>Entomophthoraceae</i> )
		dospělec	<i>B. bassiana</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
<i>Hemiptera</i>	<i>Adelphocoris</i> spp. klopuška, <i>Eurygaster integriceps</i> , <i>Lygus lineolaris</i>	nymfa a dospělec	<i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
<i>Homoptera</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i> kyjatka hrachová	dospělec	<i>Conidiobolus obscurus</i> ( <i>Entomophthoraceae</i> )
	<i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Lipaphis erysimi</i> mšice trýzelová, <i>Pemphigus sinobursaris</i> , <i>Rhopalosiphum padi</i> mšice střemchová	dospělec	<i>B. bassiana</i> ( <i>Hyphomycetes</i> ), <i>Entomophthora muscae</i> , <i>Erynia aquatica</i> ( <i>Entomophthoraceae</i> )
	<i>Bemisia argentifolii</i> molice bavlníková	dospělec	<i>P. fumosoroseus</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )
	<i>Cameraria ohridella</i> klíněnka jírovcová	kukla	<i>V. lecanii</i> ( <i>Hyphomycetes</i> )

	<i>Diuraphis noxia</i> mšice zhoubná	dospělec	<i>B. bassiana</i> (Hyphomycetes)
	<i>Macrosiphoniella sanborni</i> kyjatka chryzanténová	dospělec	<i>V. lecanii</i> (Hyphomycetes)
	<i>Nilaparvata lugens</i>	dospělec	<i>B. bassiana</i> (Hyphomycetes)
Hymenoptera	<i>Cephalcia tannourinensis</i>	larva	<i>B. bassiana</i> (Hyphomycetes)
Lepidoptera	<i>Galleria mellonella</i> zavíječ voskový	nymfa a dospělec	<i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> (Hyphomycetes)
		larva	<i>B. bassiana</i> (Hyphomycetes)
	<i>Heliothis zea</i>	larva	<i>Nomureae rileyi</i> (Hyphomycetes)
	<i>Lambdina inconsequens</i> , <i>Melanoplus sanguinipes</i>	nymfa a dospělec	<i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> (Hyphomycetes)
	<i>Porthetria disper</i>	vajíčka	<i>Entomophthora aulicae</i> (Entomophthoraceae)
Thysanoptera	<i>Frankliniella occidentalis</i> třásněnka západní	nymfa a dospělec	<i>Verticillium lecanii</i> (Hyphomycetes)
	<i>Taeniothrips inconsequens</i>	nymfa a dospělec	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (Hyphomycetes)

(upraveno podle Srivastava et al., 2009)

## 2. 7 Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Většina EH může realizovat kompletní vývojový cyklus i v alternativních systémech, bez přímé vazby na živého hostitele (např. saprofytický cyklus na odumírající organické hmotě různého původu). Statut fakultativních parazitů umožňuje produkci biomasy infekčních jednotek (konidií, resp. blastospor) pomocí velkokapacitních biotechnologií, což je základní technologický předpoklad pro vývoj a tržní realizaci standardního biopreparátu (Koubová, 2009).

Největší množství biopreparátů na bázi spor EH je produkováno pomocí *in vitro* produkčních systémů využívajících substráty, nejčastěji semena různých druhů rostlin (rýže, proso, kukuřice, pšenice, ječmen). Technologie je zpravidla dvoufázová, v první fázi je vyprodukováno čisté, koncentrované inokulum, kterým je ve druhé fázi ošetřen sterilní nebo semisterilní substrát. Produkt je k jednoduše finalizaci připraven po 2-3 týdnech kultivace a formulaci tvoří různě upravený (např. mletý) komplex „patogen-



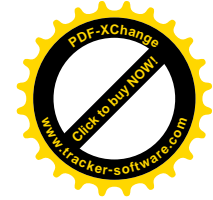


substrát“ (Grimm, 2001). Tyto technologie produkce jsou v dnešní době upřednostňovány, protože jsou často koncipovány na bázi záměrného využívání obnovitelných přírodních zdrojů, případně i odpadních organických produktů. Takto konstruované biopreparáty bývají zpravidla nestandardní v klíčových kvalitativních a kvantitativních parametrech a jejich registrace ve vyspělých zemích je vzhledem k vysokým nárokům registračních procesů prakticky nemožná.

K podstatně standardnějším biopreparátům patří tzv. „pytlová metoda“ (u nás známá také pod pojmem jako „Kýbalova metoda“), při které jsou masy spor EH produkovány v aerobním prostředí na myceliu porůstajícím povrch sterilního tekutého živného média, které je uzavřeno ve sterilních PVC pytlích. Kompletní biomasa (mycelium a spory) je po usušení finalizována mletím a smísením s inertním nosičem (siloxid, jemně mletá křemelina). Touto metodou byl i v ČR produkován doposud jediný tržně dostupný biopreparát na bázi houby *B. bassiana* mající obchodní název BOVEROL (Weiser, 1991).

Některé druhy EH je možno produkovat jako submerzní kultury, lze je v principu považovat za technologické analogie přirozených procesů vývoje EH na hmyzích hostitelích, kdy v klíčové parazitické části vývojového cyklu patogen proniká do tělní dutiny hostitele a v semiaerobních podmínkách v tekutém prostředí (hemolymfa) vytváří zvláštní tenkostěnné, jednobuněčné, tvarově a velikostí poměrně nestabilní útvary nazývané blastospory (někdy též hyfová tělíska) (Humber, 1997). Submerzní kultury se poměrně snadno upravují a dotvářejí do standardní formy biopreparátů. Vývoj biotechnologií orientovaných do oblasti velkokapacitních submerzních kultivací vláknitých hub lze považovat za nejvýznamnější vývoj standardních mykoinsekticidů a mykofungicidů. Většina v současnosti komerčně dostupných preparátů na bázi hub je konstruována na bázi blastospor, resp. biomasy získané pomocí submerzních kultivací (Wright, Carruthers, 1999).

Standardní biopreparáty na bázi EH musí splňovat mnohá kvalitativní a kvantitativní kritéria a podléhají kompletnímu registračnímu procesu. Mezi klíčové parametry kvalitativní povahy patří garance druhu a kmene patogena, specifikace podílu aktivní a doplňkové složky v biopreparátu a maximální přípustná kontaminace (zastoupení cizorodých biotických příměsí, např. bakterií, v 1 g/ml přípravku). Mezi hlavní kvantitativní a kvalitativní parametry houbových biopreparátů patří (Inglis et al., 2001):



- počet infekčních jednotek (garantovaný minimální počet konidií resp. blastospor; zpravidla se pohybuje v rozmezí  $1,0 \times 10^8$  -  $1,0 \times 10^{10}$  konidií v 1 g/ml biopreparátu)
- klíčivost konidií (garantovaná vitalita konidií nebo blastospor v % )
- počet jednotek tvořících kolonie (CFU - colony forming unit) - specifický údaj kvalitativní povahy, udávající z kolika jednotek patogena přítomných v 1 g/ml biopreparátu se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie)

I. Standardní biopreparáty konstruované na bázi hub *B. bassiana*, *P. fumosoroseus* nebo *V. lecanii* jsou již v zahraničí komerčně dostupné a jsou využívány v programech biologické ochrany různých zemědělských plodin a kultur (Patočka, 2010).

II. Další skupinu houbových biopreparátů představují přípravky, které byly cíleně vyvinuty pro účely půdní aplikace proti původcům onemocnění a škůdcům vyskytujícím se v půdě.

a) biopreparáty na bázi myceliových granulí - patogen je finalizován do formy sušených myceliových fragmentů, které po aplikaci do půdy absorbují vodu a postupně regenerují do standardní formy mycelia, na kterém se tvoří konidie, které mohou infikovat hmyzího hostitele (Andersch et al., 1990)

b) biopreparáty na bázi alginátových pelet - smíšená biomasa (mycelium, blastospory, konidie) patogena je spolu s nutritivní složkou imobilizována do drobných pelet, které po aplikaci do půdy absorbují vodu, imobilizovaná houba regeneruje a s využitím živin, které jsou součástí pelety realizuje kompletní saprofytický cyklus, jehož výsledkem je tvorba nové generace konidií (Eyal et al., 1994)

Současný sortiment biopreparátů konstruovaných na bázi některého kmene EH je relativně úzký a zahrnuje převážně specifické kmeny hub rodů *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces* a *Metarhizium*. V současné době je již přibližně 25 druhů využíváno ve formě standardních biopreparátů. V následujícím přehledu (TABULKA 4)



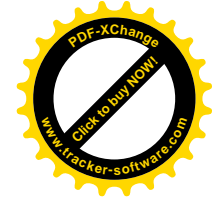
jsou uvedeny příklady komerčních biopreparátů používaných v praktické biologické ochraně rostlin ve světě (Srivastava et al., 2009).

#### TABULKA 4

Komerční biopreparáty EH registrované pro potřeby biologické ochrany proti hmyzím škůdcům

HOUBA	KOMERČNÍ BIOPREPARÁT	CÍLOVÝ ŠKŮDCE	VÝROBCE	OBLAST POUŽITÍ
<i>B. bassiana</i>	Ago Bio Bassiana	hmyz	Ago Biocontrol	Jižní Amerika
<i>M. anisopliae</i>	Ago Bio Metarhizium 50	motýli a brouci	Ago Biocontrol	Jižní Amerika
<i>L. lecanii</i>	Ago Bio Verticillium 50	zelené housenky	Ago Biocontrol	Jižní Amerika
<i>L. giganteum</i>	Laginex AS	komáři	Agraquest Inc	
<i>B. brongniartii</i>	Engerlingspilz	chroust obecný	Andermatt	Švýcarsko
<i>L. giganteum</i>	Leganidium giganteum	komáři	CA Dept of Health	-
<i>M. anisopliae</i> ESF 1	Bioblast	termiti	Ecoscience	USA
<i>M. anisopliae</i> ESF 1	Biopath Roach Chamber	švábi	Ecoscience/Terminex	USA
<i>M. flavoviride</i>	Green Muscle	kobylky, sarančata	International Institute of Bio. Con.	-
<i>L. lecanii</i>	Mycotal	molice	Koppert	Nizozemsko
<i>L. lecanii</i>	Vertalec	mšice	Koppert	Nizozemsko
<i>B. bassiana</i>	Botanigard	molice, třásněnky, mšice	Mycotech	Jižní Parkmont, USA
<i>B. bassiana</i>	Mycotrol	molice, třásněnky, mšice	Mycotech	Jižní Parkmont, USA
<i>B. brongniartii</i>	Betel	chroust obecný	NPP/Calliope	ostrov Reunion
<i>B. bassiana</i>	Ostrinil	<i>Oryctes nubilalis</i> , <i>O. funacalis</i>	NPP/Calliope	Francie
<i>I. fumosorosea</i> Apopka 97	PFR-97	molice, roztoči třásněnky, mšice	Thermo trilogy	-
<i>B. bassiana</i>	Naturalis	stejnokřídlí, brouci, ploštice	Troy bioscience	USA
<i>M. anisopliae</i>	Biogreen	švábi	Biocare	Rakousko
<i>I. fumosorosea</i>	Per97	molice	Grace	USA

- údaje nejsou k dispozici, (upraveno podle Srivastava et al., 2009)



## 2. 8 Faktory ovlivňující entomopatogenní houby

### 2. 8. 1 Abiotické faktory

Na šíření infekčních propagulí hub v prostředí se nejčastěji podílí voda, vlhkost, teplota, vzduch a jeho složení, světlo, dále vítr, déšť, pohyb vody v půdě, vodní páry. Délka vývoje cyklu probíhá v úzké korelaci s okolní teplotou.

#### 2. 8. 1. 1 Půda

Mnoho EH náležejících do třídy *Hyphomycetes* je považováno za typické představitele půdního ekosystému (Inglis et al., 2001). EH obývajících půdní prostředí jsou chráněny proti vysychání, ultrafialovému záření (Jaronski et al., 2007) a extrémním teplotám, nicméně jejich rozšíření je sezónní a způsobuje jejich celkové prostorové rozšíření. Převážná většina EH obývajících půdní prostředí produkuje hydrofobní konidie, které se při kontaktu s hmyzí kutikulou snadno přichytí na její povrch (McCoy et al., 2002).

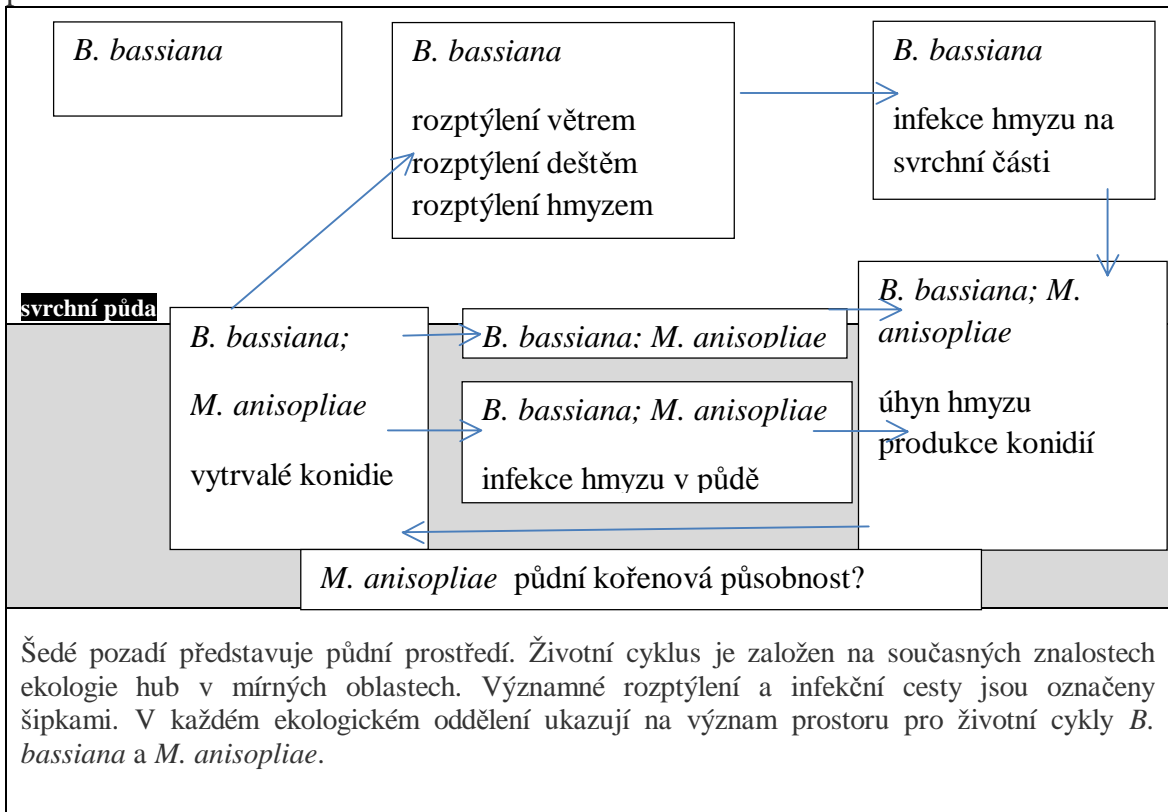
Fyzikální vlastnosti půdy mohou ovlivnit perzistenci (Jaronski et al., 2007) a prostorovou interakci půdního hmyzu a houbových patogenů v půdě (Villani et al., 1994). Například textura půdy ovlivňuje sporulaci a schopnost konidií navázat kontakt s potencionálním hostitelem, ale rovněž i perzistenci a četnost konidií v půdním profilu (Li, Holdom, 1993). Jílové frakce mají snad největší vliv na půdní mikroorganismy z důvodu svého velkého a reaktivního povrchu. (Jaronski et al., 2007). Vzájemné interakce mezi půdními jílovými minerály a konidiami hub mohou omezit pronikání konidií půdním profilem. Naopak tomu je v písčitých půdách, kde se zřejmě tyto interakce nevyskytují a neomezují tak pohyb konidií v půdním profilu (Ignoffo et al., 1977). Půda představuje mimořádně heterogenní prostředí, dokonce i v metru (Jaronski et al., 2007).

Většina druhů EH je tolerantní k širokému rozpětí pH (pH 5 - 10), kdy neutrální půdní reakce (pH 7) se považuje za optimální. Chemické vlastnosti charakteristické pro jednotlivé půdní druhy (typy) mohou ovlivňovat přežívání hub v půdě a vnímavost hostitele k houbové infekci podobně jako kationtová výměnná kapacita a určité minerály (např. měď a síra), které jsou do půdy obvykle vnášeny ve formě hnojiv (McCoy et al., 2002).



**TABULKA 5**

Průběh životního cyklu *B. bassiana* a *M. anisopliae* v severních oblastech mírného pásma

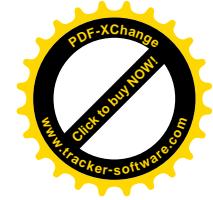


upraveno podle (Meyling, Eilenberg, 2007)

### 2. 8. 1. 2 Sluneční záření

Konidie, hyfová tělíska a hyfy všech *Hyphomycetes* jsou vysoce náchylné k poškození slunečním zářením. Významné rozdíly v citlivosti k záření byly zaznamenány i mezi jednotlivými druhy EH. Rozdíl může být mimo jiné způsoben i tím, že konidie hub, které jsou pigmentované, jsou více perzistentní ke slunečnímu záření než konidie obsahující méně pigmentu (Ignoffo, Garcia, 1992). Přirozené sluneční záření o vlnové délce 290 - 400 nm ovlivňuje perzistenci EH vyskytujících se na povrchu listů a v menší míře i na ostatních substrátech (Fuxa, 1987). Mikrolokalita, ve které se houby nacházejí, je důležitým faktorem ovlivňujícím jejich perzistenci.

Přežívání konidií na substrátu, který je exponován přímému slunečnímu záření, je podstatně sníženo ve srovnání s propagulemi, které jsou před přímým slunečním zářením chráněny např. rostlinným pokryvem (Inglis et al., 1993). Vlivem UV záření se u konidií, které zůstaly životaschopné snižuje rychlost klíčení, což může být způsobeno následkem přímého poškození nukleových kyselin a proteinů (Moore et al., 1993).



### 2. 8. 1. 3 Pesticidy

Chemické insekticidy, herbicidy a fungicidy jsou obvykle používány v konvenčních zemědělských postupech. Tyto sloučeniny a zejména fungicidy jsou používány na rostlinné patogeny, které mohou negativně ovlivnit populaci EH. Přehled dosud publikovaných studií o účincích chemických pesticidů na EH ukazuje, že insekticidy a herbicidy nebyly tak škodlivé na růst hub, zatímco fungicidy v některých případech škodlivé byly (Klingen a Haukeland, 2006). Důsledkem složitých interakcí a složení agroekosystému nemá aplikace specifických fungicidů na výskyt EH v půdě dopad (Meyling, Eilenberg, 2007).

### 2. 8. 1. 4 Relativní vlhkost

Vysoká relativní vzdušná vlhkost je pro EH nezbytná. Vlhkost nad 90% v mikroprostředí okolí houby je nutné pro klíčení, infekci a sporulaci, ale je i považována za nejkritičtější environmentální faktor ovlivňující vývoj onemocnění (Hesketh et al., 2009). Voda není důležitá pouze pro klíčení infekčních propagulí, ale má rovněž vliv i na průběh konidiogeneze na povrchu mrtvého hostitele, kdy je zapotřebí vysoká vlhkost, protože produkce konidií může ovlivnit horizontální rozšíření patogena. Vlhkost má významný vliv na perzistenci inokula, nejčastěji vykazují konidie stabilitu ve studených a suchých podmínkách (Inglis et al., 2001). Pouze v období od proniknutí patogena do tělní dutiny do opětovného prorůstání mycelia na povrch těla, nejsou nároky na vysokou vlhkost v okolním prostředí tak vysoké (Landa, 1994). Vliv teploty a vlhkosti spolu velmi úzce koreluje.

### 2. 8. 1. 5 Teplota

Okolní teplota ovlivňuje rychlost klíčení, růst a následnou smrt hostitele s tvorbou nových konidií (Hasketh et al., 2009). EH se obecně řadí mezi mezofilní organismy a optimální teplota pro většinu EH náležejících do třídy *Hyphomycetes* se pohybuje mezi 20 - 25°C, nicméně infekce a následný vznik onemocnění může probíhat v teplotním rozmezí 15 - 30°C. Při teplotě nad 30°C je vegetativní růst u většiny taxonů inhibován a při teplotě 37°C již růst ustává. Je zcela zřejmé, že okolní teplota má vliv na průběh a rychlost infekce, čímž ovlivňuje čas potřebný pro uhynutí



hostitele (Inglis et al., 2001). Teplota prostředí představuje důležitý faktor, který působí nejen samostatně, ale současně určuje i nasycení vzduchu vodními parami (Weiser, 1966). Většina druhů EH je dokonale adaptována i na dlouhotrvající nízké teploty a přežívá i dlouhodobé zmrazení, toho se využívá při dlouhodobém uchovávání všech druhů/kmenů hub pro laboratorní sbírky. Bylo zaznamenáno, že kolísání teplot má významný vliv na *in vitro* růst mnohých *Hyphomycetes*. Nicméně, vliv kolísání teplot v podmínkách *in vivo* je méně častý. Neschopnost EH růst při teplotě lidského těla má důležitý význam při registraci biopreparátu pro komerční použití (Inglis et al., 2001).

## 2. 8. 2. Biotické faktory

### 2. 8. 2. 1 Bakterie

McCoy et al. (2002) předpokládají, že v půdě se vyskytuje přibližně 464 druhů hub a kvasinek a dále bakterie a aktinomycety, jejichž význam a role závisí na fyziologických a morfologických vlastnostech různých typů půd. Gottlieb (1976) uvádí, že v jednom gramu půdy odebraném z povrchové vrstvy na zemědělsky obhospodařované orné půdě se nachází  $10^6 - 10^8$  bakterií,  $10^6 - 10^7$  aktinomycet,  $5 \times 10^4 - 10^6$  houbových propagulí,  $10^5 - 10^6$  prvoků a  $10^4 - 5 \times 10^5$  řas. Přirozeně se vyskytující půdní mikroorganismy a jejich sekundární metabolity vykazují v určitých půdních podmínkách antagonistické působení ovlivňující infekčnost a přežívání EH v půdních ekosystémech (McCoy et al., 2002).

### 2. 8. 2. 2 Patogen

Patogenita je schopnost patogena vyvolat onemocnění v hmyzí populaci (Inglis et al., 2001). Pro úspěšnou kontrolu hmyzí populace je nezbytný výběr vhodného kmene, který je schopný penetrovat a infikovat jedince. U mnoha kmenů EH může při jejich opětovné kultivaci na umělých živných půdách nebo při dlouhodobějším skladování docházet ke snižování virulence k cílovému škůdci nebo v horším případě může dojít až k úplné ztrátě této vlastnosti (Goettel, 1992). Za účelem zachování nebo navýšení virulence použitého kmene, je proto často zdůrazňována nutnost udržovat virulenci kmenů pasážováním přes přirozeného hmyzího hostitele (Hirte et al., 1989).



## 2. 8. 2. 3 Hostitel

### a) živočišný hostitel

Mezi významné fyziologické a morfologické faktory, které ovlivňují rozvoj onemocnění způsobených EH v populaci hmyzích hostitelů, patří populační hustota, chování a bionomie hostitele, vývojové stádium, dostupnost potravy, genetický základ, možné mechanické či chemické poranění nebo poranění způsobené parazity nebo predátory. Jeden z nejdůležitějších aspektů průběhu houbového onemocnění představuje stres. Stresovaný organismus je více náchylný k onemocnění vyvolané EH. Stres hmyzu (jedince, populace) může být způsoben jedním nebo více faktory (přemnožení populace, nedostatek potravy, vystavení chemickým stresorům, nepříznivé podmínky prostředí nebo ztráta imunity) (Inglis et al., 2001).

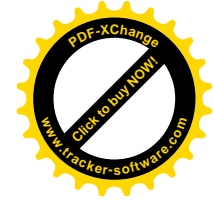
Vývojové stádium hmyzu představuje významný prvek predeterminace průběhu houbového onemocnění. Ne všechna vývojová stádia hmyzu mohou být infikována EH. V mnoha případech jsou juvenilní stádia hmyzu (larvy, nymfy) více náchylná k infekci než dospělci (Butt, Goettel, 2000; Inglis et al., 2001). Juvenilní stádia hmyzu jsou náchylnější k nákazám deuteromycetami zpravidla proto, že mají slabší kutikulu a vnější kostra nepředstavuje tak významnou obrannou bariéru jako v případě dospělců (Weiser, 1966).

V současné době je známo jen málo příkladů šíření konidií EH pomocí biotických vektorů. Jedním z příkladů jsou chvostokoci, kteří jsou schopni přenášet konidie několika druhů entomopatogenních hyphomycet na kutikule a v zažívacím traktu (Dromph, 2001) a tak hrají velmi významnou roli při rozšiřování houbového inokula v půdě.

### b) rostlinný hostitel

Mnohé vlastnosti (produkce chemických látek, růst, morfologie) hostitelských rostlin mohou mít přímý nebo nepřímý vliv na přežívání propagulí EH a jejich účinnost (Elliot et al., 2000). Rostliny produkují široké spektrum chemických látek, které v závislosti na jejich charakteru, koncentraci a biologické aktivitě mohou ovlivnit životnost konidií nebo náchylnost škůdců k EH (Vega et al., 1997; Butt, 2002).





### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3. 1 Druhy studovaných entomopatogenních hub

**TABULKA 6**

Entomopatogenní houby používané v pokusech

HOUBA	KMEN	ZDROJ	PŮVOD	ROK
<i>Beauveria bassiana</i>	<b>I101</b>	<i>Ips typhographus</i>	ČR (Šumava - Prameny Vltavy)	2004
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<b>F-52</b>	<i>Cydia pomonella</i>	Rakousko	1971
<i>Isaria fumosorosea</i>	<b>PRF 97</b>	<i>Phenacoccus sp.</i>	Florida (Apopka)	1987
<i>Lecanicillium lecanii</i>	<b>I9</b>	<i>Ips typhographus</i>	ČR (Šumava - Kvilda)	1999

Pro účely pokusů byly používány kmeny (TABULKA 6) z mykologické sbírky Katedry rostlinné výroby a agroekologie, oddělení Rostlinolékařství na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (dále jen KRV). Všechny druhy/kmeny hub v této sbírce byly dlouhodobě uchovávány ve formě suchých alginátových pelet s biomasou partikulárního kmene zmrazené při teplotě -20 až -22°C.

##### 3. 1. 1 *Beauveria bassiana* kmen I 101

Kmen označovaný jako Bba I101 byl izolován v roce 2004 v NP Šumava, oblast - Prameny Vltavy. Patogen byl nalezen na dospělci lýkožrouta smrkového (*Ips typhographus*), ze kterého byl následně odizolován pomocí selektivního živného média na bázi fungicidní látky dodine. Následně byl kmen pasážován přes umělou živnou půdu PDA (Potato Dextrose Agar). Po úplném přečištění byly spory imobilizovány do formy alginátových pelet, které jsou uchovávány v mykologické sbírce na KRV.



### 3. 1. 2 *Metarhizium anisopliae* kmen F-52

Kmen F-52 (původní označení M-43) je účinnou složkou přípravku Bio 1020®. Pro experimentální účely byl na KRV izolován v roce 2009 přímo z uvedeného preparátu. Referenční typový kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 90448. V roce 1971 byl kmen, který dostal název Ma43 izolován z mrtvé larvy obaleče jabloňového (*Cydia pomonella*) poslané z Rakouska do Ústavu pro biologickou ochranu v německém Darmstadtu. Kmen byl patogenní pro mnoho druhů hmyzu, a proto byl poslán do různých laboratoří. Kromě toho se stal základem pro komerční vývoj *M. anisopliae* Bio 1020 pro biologickou ochranu proti lalokonosci rýhovanému (*Otiorhynchus sulcatus*). Později se izolát stal aktivní složkou několika dalších komerčních produktů v USA.

### 3. 1. 3 *Isaria fumosorosea* kmen PFR 97

V roce 1993 byl kmen poskytnut oddělení Rostlinolékařství KRV firmou Certis USA, kde je uložen ve formě alginátových pelet v mykologické sbírce. Referenční typový kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 20874. V roce 1994 byla udělena licence belgické firmě BIOBEST k používání tohoto preparátu v Evropě, kde je biopreparát na bázi PFR 97 registrován pod komerčním názvem PreFeRal®WG.

### 3. 1. 4 *Lecanicillium lecanii* kmen I9

Kmen I9 byl odizolován z dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typhographus*) odchycených feromonovými lapači v oblasti NP a CHKO Šumava v roce 1999. Od tohoto roku je tento kmen součástí mykologické sbírky KRV.



## 3. 2 Studovaný druh hmyzu

### 3. 2. 1 Potemník moučný (*Tenebrio molitor* L.)

Larvy *Tenebrio molitor* (dále jen larvy) byly zakoupeny ve specializovaných prodejnách v Č. Budějovicích. Jsou běžně známy jako žlutí mouční červi, mají částečně sklerotizovanou kutikulu a jsou vhodným hostitelským organismem v biotestech prováděných s entomopatogenními houbami. Zakoupené larvy byly udržovány v chovu na KRV při pokojové teplotě. Do testu byly vybírány larvy stejné velikosti. Vzhledem k tomu, že larvy se kupují ve specializovaných obchodech a není známo jejich vývojové stádium, je jediným výběrovým kritériem právě velikost. Do pokusů se vybíraly larvy bez zjevných známek onemocnění či mechanického poškození.

## 3. 3 Používaná živná média

Kultivační sterilní médium, které bylo rozléváno na Petriho misky, bylo připravováno z polotovarů od firem působících na trhu ČR (EU).

### Petriho misky

Tyto misky byly použity pro pěstování kultur mikroorganismů v podmínkách *in vitro*. Mohou být jak skleněné, tak i plastové, v případě mého pokusu se jednalo o plastové misky s víčkem o průměru 90 mm.

### Umělé živné půdy

Živné půdy byly připraveny ze standardního předem namíchaného práškového agaru, který byl smíchán s vodou, uvařen a ve sterilním prostředí rozlit do připravených Petriho misek.

### 3. 3. 1 Potato Dextrose Agar

Hlavním používaným živným médiem byl bramboroglukózový agar (dále jen PDA). PDA byl připraven smícháním 500 ml destilované vody s 12g PDB (Potato Dextrose



Broth) a 8g 2% bakteriologického agaru. Směs byla uvařena ve sterilním prostředí a rozlita do připravených Petriho misek o průměru víčka 90 mm.

### **3. 3. 2 Selektivní média**

Patří mezi živná média obsahující fungicidy nebo antibiotika, která podporují růst entomopatogenních hub a zároveň eliminují růst saprotrofních hub a bakterií. Citlivé kmeny entomopatogenních hub mohou být kvůli selektivním složkám v živné půdě potlačeny a tak mohou dávat nepřesné údaje o druhové rozmanitosti a hustotě inokula v prostředí. V této práci byly využívány 2 druhy selektivních médií:

#### **3. 3. 2. 1 Potato Dextrose Agar + Antibiotikum**

Jedná se o umělou živnou půdu PDA s antibiotickou složkou Chloramfenikol – 0,25g/500ml (dále jen PDA + A). Chloramfenikol inhibuje bakteriální syntézu bílkovin, proto je označován za bakteriostatické antibiotikum.

#### **3. 3. 2. 2 Potato Dextrose Agar + Dodine**

Nejselektivnější používanou živnou půdou je PDA s přídavkem fungicidní účinné látky dodine (dále jen PDA + D). Mimo jiné slouží pro izolaci entomopatogenních hub z půdy. Citlivé kmeny entomopatogenních hub mohou být kvůli selektivní složce dodine v živné půdě potlačeny a tím se i růst kolonií může prodloužit o 3 až 4 dny. Účinná látka dodine je obsažena z 65% v komerčním fungicidním přípravku Syllit 65 WP.

### **3. 4 Udržování kultur a kultivace entomopatogenních hub**

V testech byly použity druhy hub z mykologické sbírky KRV. Všechny entomopatogenní houby v této sbírce jsou dlouhodobě uchovávány ve formě alginátových pelet.



Cílem tvorby alginátových pelet je imobilizace biomasy (konidie, blastospor, mycelium, atd.) a její udržování v rozmezí teplot  $-20$  až  $-22^{\circ}\text{C}$ .

Pro přípravu pelet slouží suspenze konidií hub jako základ, dále dvouprocentní alginát sodný (Na sůl kyseliny alginové) a jemně mleté přesáté pšeničné otruby. Směs otrub a alginátu sodného se smíchá a steriluje. Do vychladlé směsi se přidá suspenze spor v poměru 1:1. Poslední složkou pro přípravu pelet je sterilní roztok chloridu vápenatého ( $0,25\text{M CaCl}_2$ ) do kterého se pomocí nálevky kape připravená směs a chemická reakce zaručí vznik pravidelných kuliček. V roztoku chloridu vápenatého se nechají kuličky vytvrdit po dobu 1 - 2 hodin. Po uplynutí potřebné doby je přebytečný roztok odstraněn a samotné kuličky jsou sušeny v aktivním proudu vzduchu po dobu několika hodin při nižších teplotách, aby nedošlo k poškození imobilizované biomasy. Po vyschnutí jsou pelety ukládány do plastových kontejnerů, které jsou označeny a skladovány při již uvedených teplotách. Takto formulované spory je možno uchovávat po řadu let bez jakýchkoli kvalitativních změn.

Pro aktivaci (oživení) již uložených kmenů z mykologické sbírky se používají sterilní vlhké komůrky (Petriho misky) s dvouprocentním bakteriologickým agarem. Na povrch Petriho misky se pravidelně rozmístí pelety (5 - 10 ks). Inkubace probíhá po dobu 3 - 5 dnů při teplotě  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Zhruba 2 - 3 dny po zahájení inkubace na povrchu pelet začne růst mycelium, které 4. - 5. den začíná sporulovat. V době, kdy je na peletách již sporulující mycelium, je možné nově vytvořené spory přeočkovat na sterilní živnou půdu, čímž se získá základní kultura pro další fáze pokusů.

### **3. 5 Příprava základní konidiové suspenze kmenů entomopatogenních hub**

Pro pokusy byly využívány konidiové suspenze, získané přelitím povrchu plně sporulující kultury, která byla kultivována na PDA po dobu 10 - 14 dnů sterilní destilovanou vodou. Sterilizovaná destilovaná voda obsahovala přídavek 0,05% Tween 80 (dále jen roztok Tween). Suspenze se řádně protřepaly a následně se přelily přes sterilní gázu do sterilní Erlenmeyerovy baňky za účelem odstranění shluků konidií resp. kusů mycelia. V případě potřeby byly Erlenmeyerovy baňky umístěny na třepačku a třepány po dobu 15 min. při 200 r.p.m.. Takto připravené suspenze se dle potřeby naředily a po opětovné homogenizaci se nanosly do počítací komůrky (hematocymetr) pod světelný mikroskop a v předem stanoveném počítacím poli se po sedimentaci



konidií stanovil titr. Hodnota titru byla vypočítána na základě dvou opakování (horní a dolní počítací pole komůrky). Všechny základní suspenze byly poté adjustovány na standardní titr  $1 \times 10^6$  konidií/ml (dále jen standardní titr suspenze).

### **3. 6 Metodika prováděných pokusů**

#### **3. 6. 1 Standardní test klíčivosti – GI (Germination Index)**

Cílem testu klíčivosti bylo zjistit procento klíčivosti příslušné populace konidií. Byl odebrán vzorek standardního titru suspenze  $1 \times 10^6$ /ml. Tato konidiová suspenze byla laboratorní kličkou nanášena podélně na sterilní povrch živné půdy PDA na podložním sklíčku v podobě 10 kapek. Po zaschnutí se sklíčko vložilo do vlhké komůrky, kterou tvořily Petriho misky, na jejichž dně byl vlhký filtrační papír. Petriho misky byly uloženy do vytemperovaného termostatu na požadovanou teplotu 25°C. Vyhodnocení se provádělo po 24 hod. pomocí světelného mikroskopu. Hodnoceno bylo minimálně 100 spor z vybraných sekcí (zorné pole mikroskopu). Ke každé konidii byl přiřazen příslušný index GI (TABULKA 7), který specifikuje vývoj patogena a stupeň naklíčení. Z vyhodnocených vzorků bylo vypočteno procento klíčivosti.



## TABULKA 7

Hodnotící indexová stupnice (GI) pro kmeny entomopatogenních hub

G index	Charakteristika
0	na konidiích nejsou zřejmé žádné morfologické změny
0,5	konidie jsou zřetelně protáhlejší, nabobtnalé, na konidii je zřetelný jednostranný klíček velikosti v poměru přibližně 1:0,5 k matečné konidii
1	velikost klíčku na konidii je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie
1,5	primární klíček je 2-3 x delší než matečná konidie, na matečné konidii jsou zřejmé 2 kratší klíčky
2	klíček je více než 3 x tak dlouhý jako matečná konidie, sekundární větvení na jednom z klíčků, na matečné konidii jsou dva dlouhé klíčky
2,5	počátek sporulace
3	plná sporulace

(upravené schéma používané na oddělení Rostlinolékařství KRV)

### 3. 6. 2 Standardní test CFU (Colony Forming Units)

Principem testu je stanovení specifického údaje kvantitativní povahy, který udává, z kolika infekčních propagulí patogena se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie.

Pro základ testu CFU byl použit standardní titr suspenze  $1 \times 10^6$ /ml. Tato suspenze byla naředěna na výchozí suspenzi pro jednotlivé kmeny o titru  $5 \times 10^2$ /ml a současně na výchozí suspenzi pro kombinace jednotlivých kmenů o titru  $5 \times 10^2$ /ml ( $2,5 \times 10^2$ /ml pro jeden kmen +  $2,5 \times 10^2$ /ml pro další kmen v dané kombinaci). Výchozí suspenze v množství 0,5 ml se v sedmi opakováních nanášela na Petriho misky obsahující živná média PDA, PDA + A, PDA + D. Nanesené suspenze se důkladně rozetřely pomocí inokulační hokejky pohybem na otočném stolku. Na svrchní stranu Petriho misky byl zaznamenán kmen houby, příslušný titr suspenze a datum provedení vzorků. Po zaschnutí suspenze (cca 24 hod.) byly Petriho misky uloženy do igelitových sáčků a



umístěny do termostatu vytemperovaného na 25°C. Hodnocení počtu kolonií CFU se provádělo 4. a 7. den (4. den PDA a PDA+A a 7. den PDA+D). Z hodnocené sady se do vlastního výpočtu bralo 5 hodnot (minima a maxima z jednotlivých opakování se nezapočítávala).

Pro kontrolní variantu se na konci pokusu odebralo 0,5 ml roztoku Tween a ve třech opakováních se nanášelo na povrch PDA v Petriho misce. Společně s ostatními vzorky byly kontrolní varianty dále uchovávány ve stejných podmínkách.

### 3. 6. 3 Standardní laboratorní biotest

Na začátku testu se larvy povrchově sterilovaly přelitím jednocentního roztoku SAVA (0,05% NaClO). Následně se v co nejkratší době 3x promyly sterilní vodou (larvy *T. molitor* jsou citlivé a při pomalém postupu mohou zemřít). Pro rychlé oschnutí se larvy umístily na filtrační papír.








Do standardního titru suspenze  $1 \times 10^6$ /ml se larvy ponořily na 2s. Namočené larvy se umístily do vlhkých komůrek (krabičky na tkáňové kultury o 12ti buňkách se dvěma filtračními papírky na dně každé buňky, zvlhčené roztokem Tween). V testu bylo použito 25 larev. Vlhké komůrky byly uloženy do vytemperovaného termostatu s požadovanou teplotu 20°C. Hodnocení pokusů bylo prováděno 1. - 10. den pomocí světelné binolupy. Každé larvě byl přiřazen příslušný index FDI charakterizující klíčovou fází vývoje houby (TABULKA 8). Pomocí regresní analýzy byl z jednotlivých stanovených indexů stanoven výsledný index 1,5.

Pro kontrolní variantu byl na konci testu použit stejný postup, jen standardní titr suspenze kmenů byl nahrazen roztokem Tween.

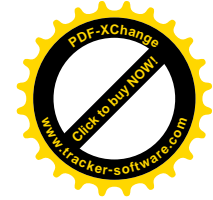


## TABULKA 8

Hodnotící indexová stupnice (FDI) pro *T. molitor*

INDEX VÝVOJE	POPIS SYMPTOMŮ	Fotografie
0	na larvách nejsou vidět žádné známky infekce	
0,5	na larvách se objevují drobné melanizační skvrny, postupně po celém povrchu, ještě se nespojují	
1	větší melanizační skvrny, které se mohou začít spojovat, skvrny jsou černé	
1,5	mezi hrudními končetinami larev se objevuje vláknité mycelium, pouze jednotlivé hyfy	
2	mycelium začíná tvořit vatovité struktury, zatím nemá vyvinuté fruktifikační orgány	
2,5	na konci hyf mycelia se začínají objevovat sporulující konidiofory, počínající sporulace	
3	larva je pokrytá plně sporulujícím myceliem, které tvoří nové konidie ve velkém počtu	

(upravené schéma používané na oddělení Rostlinolékařství KRV)



### **3. 6. 4 Konkurenční test - porovnání účinnosti vybraných kmenů entomopatogenních hub v kombinaci**

Test se prováděl na vybraných larvách, které prošly standardním biotestem. Larva, která vykazovala stupeň sporulace (tzn. stupeň 2,5 a 3), byla vyjmuta z vlhké komůrky a vložena do zkumavky s roztokem Tween. Následným promícháním na vertexu došlo k uvolnění spor z povrchu těla larvy. V počítací komůrce byla spočítána koncentrace těchto spor. Suspenze byla dále adjustována na koncentraci  $1 \times 10^6$  a následně naředěna na koncentraci  $1 \times 10^2$ .

Pro stanovení CFU byla na povrch PDA+D v Petriho misce nanесena suspenze o koncentraci  $1 \times 10^2$  v množství 0,5 ml. Suspenze se po povrchu agaru pravidelně rozptýlila pomocí inokulační hokejky pohybem na otočném stolku. Byla provedena 3 opakování na každou reprezentující larvu. Po důkladném vsáknutí (zaschnutí) suspenze se vzorky uložily do igelitových sáčků a umístily do termostatu vytemperovaného na 25°C.

Hodnocení jednotlivých Petriho misek probíhalo cca po 7 dnech, kdy byly jednotlivé kultury dobře morfologicky rozlišitelné. Hlavním cílem bylo zjistit jaký kmen houby se na povrchu larvy dokáže prosadit (růstu mycelia a produkce spor).

Pro kontrolní variantu byla použita larva z kontrolní varianty standardního biotestu. Vyjmutá larva z vlhké komůrky byla vložena do zkumavky s roztokem Tween a následně promíchána na vertexu. Ze zkumavky byl odebrán kontrolní vzorek na PDA+D.

### **3. 6. 5 Radiální růst a výtěžnost**

Suspenze o standardním titru  $1 \times 10^6$ /ml byla nanесena pomocí sterilní kličky ve formě kapky do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA v 5 opakováních. Po zaschnutí kapky se Petriho misky vložily v plastických sáčcích do termostatu, který byl vytemperován na teplotu 25°C.

Hodnocení a měření průměru středových kultur se provádělo po 21 dnech, nejméně u 4 kultur od každého kmene. Hodnocení radiálního růstu probíhalo na základě měření dvou na sebe kolmých průměrů získané středové kultury. Ze zjištěných rozměrů se vypočítala plocha kultury.



Po změření a vyfotografování kultur následovala jejich homogenizace. Ze živného média se vyřízla pouze porostlá část, která se vložila do mixéru, kde po dobu 20 s probíhala homogenizace.

Počítání spor se provádělo v kalibrované počítačící komůrce pod světelným mikroskopem. Počítalo se vždy ze dvou opakování, výsledná hodnota byla jejich průměrem. Zjištěné hodnoty byly upraveny podle velikosti kultury na hodnoty reprezentující množství spor na kulturu, resp. na  $1\text{mm}^2$ .

### **3. 6. 6 Interakce**

Základní suspenze jednotlivých kmenů a kmenů v kombinaci o standardním titru byla nanášena na umělá živná média PDA. Nanášelo se pomocí inokulační kličky ve formě jedné kapky nalevo a napravo od středu Petriho misky v pomyslné rovině 2,5 cm od okraje Petriho misky. Po zaschnutí kapky na živném médiu PDA se Petriho misky vložily v igelitových sáčcích do termostatu, který byl vytemperován na teplotu  $25^{\circ}\text{C}$ .

Hodnocení interakce kultur se provádělo po 21 dnech nejméně u 3 kultur od každého z kmenů.

### **3. 7 Využívaná technika při pokusech**

Pro veškerou laboratorní činnost ve sterilním prostředí byl využíván flow box BIOHAZARD. Používané laboratorní pomůcky byly sterilizovány ve sterilizátoru STERICELL. Při vyhodnocování pokusů a tvorbě originální digitalizované fotodokumentace bylo použito zařízení (Canon EOS 300D Digital), které je k dispozici na KRV (světelný mikroskop Nikon a binokulární mikroskop Weiss). Převážná většina foto obrázků vybraných a zařazených do diplomové práce jsou originály.



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

### POKUS 1

#### Standardní test klíčivosti – GI (Germination Index)

Cílem tohoto testu je zjistit procento klíčivosti a stupeň naklíčení příslušné populace konidií.

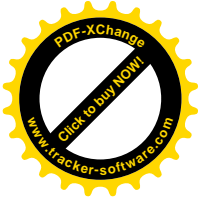
#### Základní údaje k pokusu:

- odebrán vzorek standardního titru suspenze  $1 \times 10^6$ /ml
- konidiová suspenze laboratorní kličkou nanесena podélně na sterilní povrch živné půdy PDA na podložním sklíčku v podobě 10 kapek
- po zaschnutí se sklíčko vložilo do vlhké komůrky, kterou tvořily Petriho misky, na jejichž dně byl vlhký filtrační papír
- Petriho misky byly uloženy do vytemperovaného termostatu na požadovanou teplotu 25°C
- vyhodnocení se provádělo po 24 hod. pomocí světelného mikroskopu
- hodnoceno bylo minimálně 100 spor z vybraných sekcí (zorné pole mikroskopu)
- ke každé konidii byl přiřazen příslušný index GI, který specifikuje vývoj patogena a stupeň naklíčení
- z vyhodnocených vzorků bylo vypočteno procento klíčivosti

#### **TABULKA 9**

Klíčivost a růst kmenů

KMENY	PRŮMĚR GI	KLIČIVOST %
I 101	2	100
F-52	1,99	100
PFR 97	2	100
I 9	2	100
I 101 + F-52	1,99	100
I 101 + PFR 97	2	100
I 101 + I 9	2	100
F-52 + PFR 97	2	100
F-52 + I 9	2	100
PFR 97 + I 9	2	100



### Výsledek pokusu:

U všech kmenů (samostatné i v kombinaci) byla klíčivost po 24 hodinách 100%. V kombinaci se druhy hub negativně neovlivňují (klíčivost byla dělána na živné půdě PDA). Po 48 hod. všechny druhy hub (samostatné i v kombinaci) dosahovaly indexu 2,5-3.

## **POKUS 2**

### **Standardní test CFU na živných půdách PDA, PDA + A, PDA + D pro jednotlivé kmeny**

Cílem pokusu je zjistit jestli živné půdy (PDA, PDA + A, PDA + D) ovlivňují jednotlivé kmeny EH.

#### Základní údaje k pokusu:

- použít standardní titr suspenze  $1 \times 10^6$ /ml
- suspenze byla naředěna na výchozí suspenzi pro jednotlivé kmeny o titru  $5 \times 10^2$ /ml
- výchozí suspenze v množství 0,5 ml (= titr  $2,5 \times 10^2$ /ml) se v sedmi opakováních nanášela na Petriho misky obsahující živná média PDA, PDA + A, PDA + D
- nanesené suspenze se důkladně rozetřely pomocí inokulační hokejky pohybem na otočném stolku
- po zaschnutí suspenze (cca 24 hod.) byly Petriho misky uloženy do igelitových sáčků a umístěny do termostatu vytemperovaného na 25°C
- hodnocení počtu kolonií CFU se provádělo 4. a 7. den (4. den PDA a PDA+A a 7. den PDA+D)
- do vlastního výpočtu se bralo 5 hodnot (minima a maxima z jednotlivých opakování se nezapočítávala)



## Výsledek pokusu:

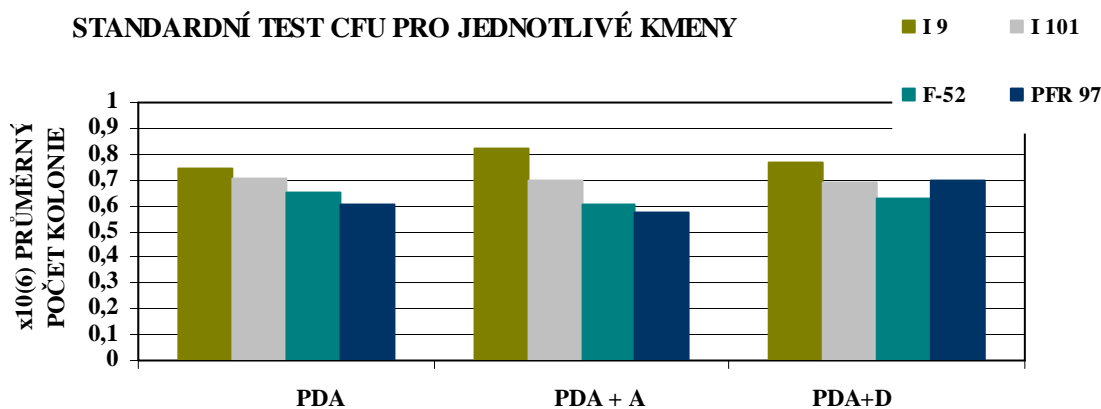
### Kontrola:

- A) Všechny druhy živných půd (PDA, PDA + A, PDA + D) porostly koloniemi jednotlivých kmenů.
- B) I 101 kolonie byly rovnoměrně rozmístěny na povrchu živné půdy, průběh růstu byl normální. Na třech rozdílných půdách byla zaznamenána nepatrná klesající tendence v počtu narostlých kolonií a to z PDA na PDA+A a na PDA+D. Procentická odchylka mezi živnými půdami není větší než 2%.
- C) F-52 kolonie byly rovnoměrně rozmístěny na povrchu živné půdy, průběh růstu byl normální. Na třech rozdílných půdách byla zaznamenána nepatrná klesající tendence v počtu narostlých kolonií a to z PDA na PDA+D a na PDA+A. Na živných půdách PDA+A byly zaznamenány v 7 opakováních skokově odlišné počty kolonií. Procentická odchylka mezi živnými půdami je 7%.
- D) PFR 97 kolonie byly rovnoměrně rozmístěny na povrchu živné půdy, průběh růstu byl normální. Na třech rozdílných půdách byla zaznamenána klesající tendence v počtu narostlých kolonií a to z PDA+D na PDA a na PDA+A. Procentická odchylka mezi živnými půdami je přes 15%.
- E) I 9 kolonie byly rovnoměrně rozmístěny na povrchu živné půdy, průběh růstu byl normální. Na třech rozdílných půdách byla zaznamenána nepatrná klesající tendence v počtu narostlých kolonií a to z PDA+A na PDA+D a na PDA. Procentická odchylka mezi živnými půdami je 8%.



## GRAF 1

Průměrný počet kolonií v CFU jednotlivých kmenů, každé živné půdy zvlášť



## TABULKA 10

Vyhodnocení CFU max. a min. počet kolonií pro jednotlivé kmene na různých živných půdách

ŽIVNÁ PŮDA	PDA	PDA + A	PDA + D
<b>KMEN TVOŘÍCÍ NEJPOČETNĚJŠÍ KOLONII</b>	I 9	I 9	I 9
<b>Ø POČET SPOR TVOŘÍCÍ KOLONII SMODCH</b>	0,741·10 <sup>6</sup> ±11,37	0,824·10 <sup>6</sup> ±9,37	0,764·10 <sup>6</sup> ±4,45
<b>KMEN TVOŘÍCÍ NEJMÉNĚ POČETNOU KOLONII</b>	PFR 97	PFR 97	F-52
<b>Ø POČET SPOR TVOŘÍCÍ KOLONII SMODCH</b>	0,608·10 <sup>6</sup> ±4,87	0,576·10 <sup>6</sup> ±8,11	0,628·10 <sup>6</sup> ±13,37

### Zhodnocení pokusu:

Kmeny I 101, F-52 a I 9 nejsou ovlivňovány živnými půdami. Procentická odchylka mezi živnými půdami nebyla větší jak 10%. U kmene PFR 97 je pozorováno že živné půdy ovlivňují růst a tvorbu kolonií. Procentická odchylka mezi živnými půdami je větší než 10 %. Na různých živných půdách tvořil nejpočetnější kolonie kmen I 9. Naopak nejméně početné kolonie tvořil kmen PFR 97 na živných půdách PDA a PDA + A. Na PDA + D vytvořil nejméně početnou kolonii kmen F-52.



## **POKUS 3**

### **Standardní test CFU – pro kmeny v kombinaci**

Cílem pokusu je zjistit jestli se mezi sebou jednotlivé kmeny ovlivňují v kombinacích kmenů a jestli se ovlivňování mění s druhem živné půdy.

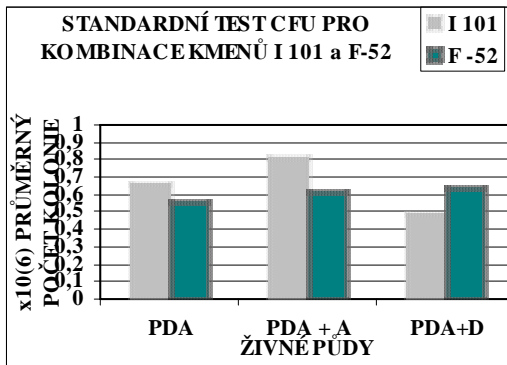
#### Základní údaje k pokusu:

- použít standardní titr suspenze  $1 \times 10^6$ /ml
- suspenze byla naředěna na výchozí suspenzi pro kombinace jednotlivých kmenů o titru  $5 \times 10^2$ /ml ( $2,5 \times 10^2$ /ml pro jeden kmen +  $2,5 \times 10^2$ /ml pro další kmen v dané kombinaci).
- výchozí suspenze v množství 0,5 ml (= titr  $1,25 \times 10^2$ /ml) se v sedmi opakováních nanášela na Petriho misky obsahující živná média PDA, PDA + A, PDA + D
- nanesené suspenze se důkladně rozetřely pomocí inokulační hokejky pohybem na otočném stolku
- po zaschnutí suspenze (cca 24 hod.) byly Petriho misky uloženy do igelitových sáčků a umístěny do termostatu vytemperovaného na 25°C
- hodnocení počtu kolonií CFU se provádělo 4. a 7. den (4. den PDA a PDA+A a 7. den PDA+D)
- do vlastního výpočtu se bralo 5 hodnot (minima a maxima z jednotlivých opakování se nezapočítávala)



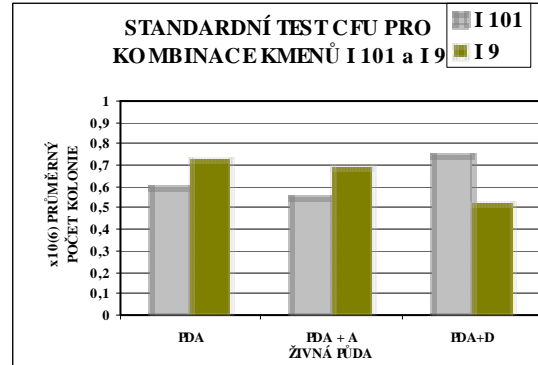
**GRAF 2**

kombinace kmenů I 101 + F-52



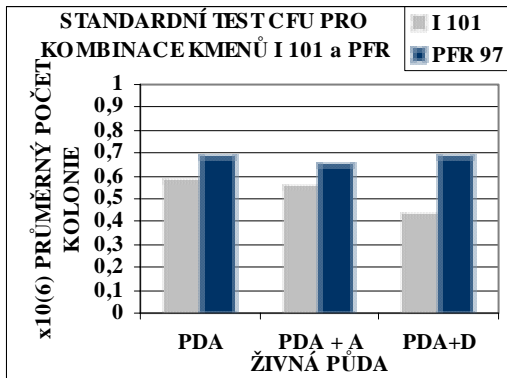
**GRAF 3**

kombinace kmenů I 101 + I 9



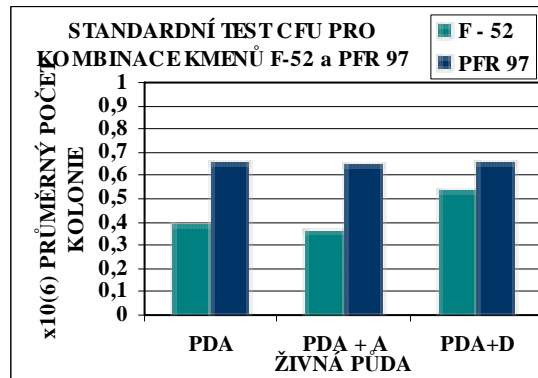
**GRAF 4**

kombinace kmenů I 101 + PFR 97



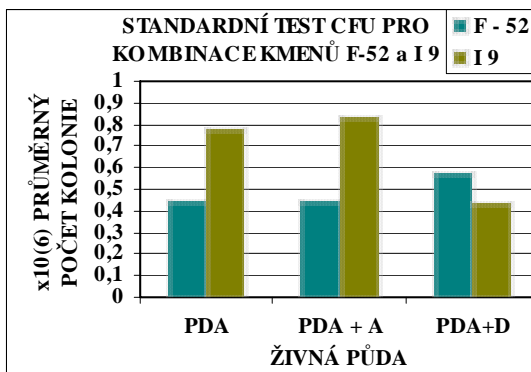
**GRAF 5**

kombinace kmenů F-52 + PFR 97



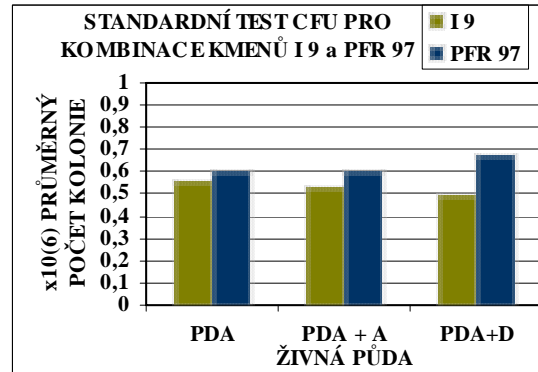
**GRAF 6**

kombinace kmenů F-52 + I 9



**GRAF 7**

kombinace kmenů I 9 + PFR 97





## TABULKA 11

Vyhodnocení CFU max. a min. počet kolonií pro jednotlivé kmeny v kombinacích na různých živných půdách

ŽIVNÁ PŮDA	PDA	PDA + A	PDA + D
<b>KOMBINACE KMENŮ TVOŘÍCÍ NEJPOČETNĚJŠÍ KOLONII</b>	I 101 + I 9	I 101 + F-52	I 101 + I 9
<b>Ø POČET SPOR TVOŘÍCÍCH KOLONII SMODCH</b>	$0,600 \times 10^6 + 0,728 \times 10^6$ $\pm 1,85 \quad \pm 7,31$	$0,816 \times 10^6 + 0,624 \times 10^6$ $\pm 3,44 \quad \pm 3,01$	$0,744 \times 10^6 + 0,528 \times 10^6$ $\pm 8,89 \quad \pm 4,71$
<b>KOMBINACE KMENŮ TVOŘÍCÍ NEJMÉNĚ POČETNOU KOLONII</b>	F-52 + PFR 97	F-52 + PFR 97	F-52 + I 9
<b>Ø POČET SPOR TVOŘÍCÍCH KOLONII SMODCH</b>	$0,392 \times 10^6 + 0,656 \times 10^6$ $\pm 4,44 \quad \pm 5,34$	$0,380 \times 10^6 + 0,648 \times 10^6$ $\pm 1,02 \quad \pm 5,84$	$0,576 \times 10^6 + 0,432 \times 10^6$ $\pm 1,85 \quad \pm 8,01$

### Výsledek pokusu:

#### Kontrola:

- A) Všechny druhy živných půd (PDA, PDA + A, PDA + D) porostly koloniemi jednotlivých kmenů v kombinacích.
- B) **I 101 + F-52** na PDA, F-52 tvořilo celoplošně menší kolonie. Na PDA+A, F-52 tvořilo celoplošně menší kolonie. Na živné půdě PDA+D už netvoří oba dva druhy hub mezi sebou zóny celoplošně, ale naopak kmen I 101 tvoří menší kolonie a vrůstá do F-52. F-52 potlačuje I 101 v růstu (PŘÍLOHA 1).
- C) **I 101 + PFR 97** na PDA vytváří celoplošně I 101 menší kolonie v blízkosti PFR 97. Na PDA+A vytváří celoplošně I 101 menší kolonie v blízkosti PFR 97 má I 101 změněný (jiný) genotyp (PŘÍLOHA 2). Na živné půdě PDA+D vytváří celoplošně I 101 menší velikost kolonie a normální vzhled.
- D) **I 101 + I 9** na živných půdách PDA, PDA+A a PDA+D se tyto druhy vzájemně neovlivňují.



- E) **F-52 + PFR 97** na PDA tvoří celoplošně F-52 menší a potlačené kolonie vůči druhu PFR 97. Na PDA+A tvoří celoplošně F-52 opět menší a potlačené kolonie vůči druhu PFR 97. Na živné půdě PDA+D tvoří celoplošně F-52 větší kolonie než na půdách PDA a PDA+A.
- F) **F-52 + I 9** na PDA a PDA+A se celoplošně oba druhy neovlivňují ani při vrůstání v blízkosti do sebe. I 9 tvoří na celé ploše větší počet kolonií. Na PDA+D vytváří celoplošně F-52 větší kolonie a naopak I 9 tvoří menší počet kolonií.
- G) **PFR 97 + I 9** na PDA a PDA+A se celoplošně oba druhy neovlivňují ani při vrůstání v blízkosti do sebe. Na PDA+D vytváří celoplošně I 9 menší kolonie.

#### **Zhodnocení pokusu:**

Na PDA a PDA + D tvořil nejpočetnější kolonie v kombinaci kmenů kombinace I 101 + I 9. Na PDA + A tvořil nejpočetnější kolonii v kombinaci kmenů kombinace I 101 + F-52. Kmen I 101 se jeví jako kmen který tvoří početné kolonie v kombinaci s kmeny I 9 a F-52. Naopak nejméně početné kolonie tvořil kmen PFR 97 na živných půdách PDA a PDA + A. Na PDA + D vytvořil nejméně početnou kolonii kmen F-52.

## **POKUS 4**

### **Standardní laboratorní biotest na hmyzím hostiteli *Tenebrio molitor***

Principem testu je zjistit kdy dosáhnou kmeny na larvě vývojového indexu 1,5 (FDI).

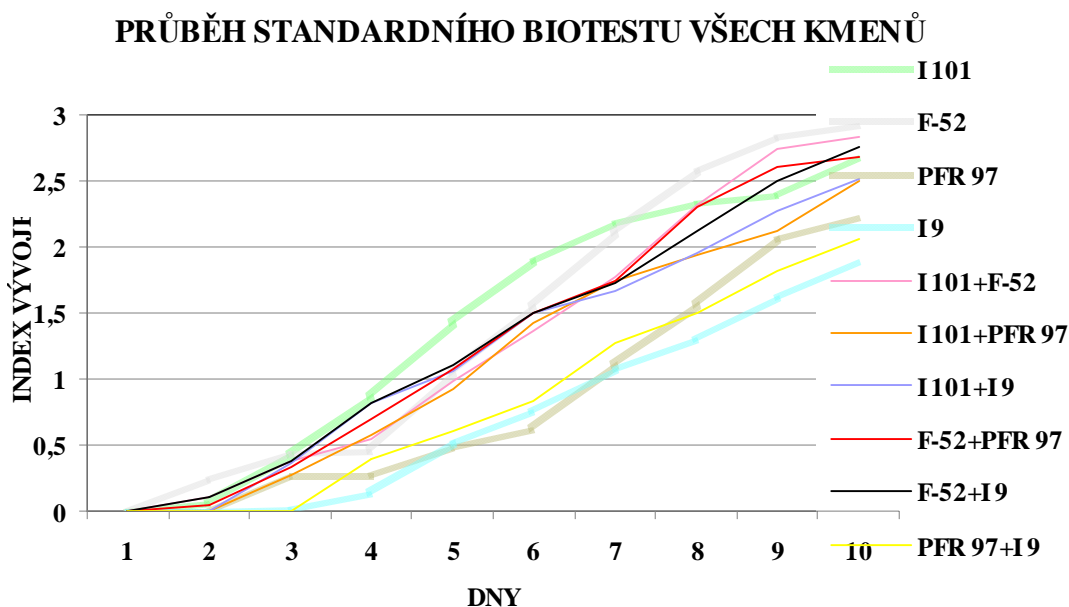
#### **Základní údaje k pokusu:**

- larvy se povrchově sterilovaly přelitím jednoroztokového roztoku SAVA (0,05% NaClO), dále se v co nejkratší době 3x promyly sterilní vodou a umístily na filtrační papír
- do standardního titru suspenze  $1 \times 10^6$ /ml pro jednotlivé kmeny se larvy ponořily na 2s („dip-test“)

- pro kombinace jednotlivých kmenů se standardní suspenze naředila na výchozí suspenzi o titru  $1 \times 10^6/\text{ml}$  ( $5 \times 10^5/\text{ml}$  pro jeden kmen +  $5 \times 10^5/\text{ml}$  pro další kmen v dané kombinaci) a larvy se ponořily na 2s („dip-test“)
- namočené larvy se umístily do vlhkých komůrek (krabičky na tkáňové kultury o 12ti buňkách se dvěma filtračními papírky na dně každé buňky, zvlhčené roztokem Tween)
- v testu bylo použito 25 larev
- vlhké komůrky byly uloženy do vytemperovaného termostatu s požadovanou teplotu  $20^\circ\text{C}$
- hodnocení pokusů bylo prováděno 1. - 10. den pomocí světelné binolupy
- ke každé larvě byl přiřazen příslušný index FDI charakterizující klíčovou fázi vývoje houby
- pomocí regresní analýzy byl z jednotlivých stanovených indexů stanoven výsledný index 1,5

### GRAF 8

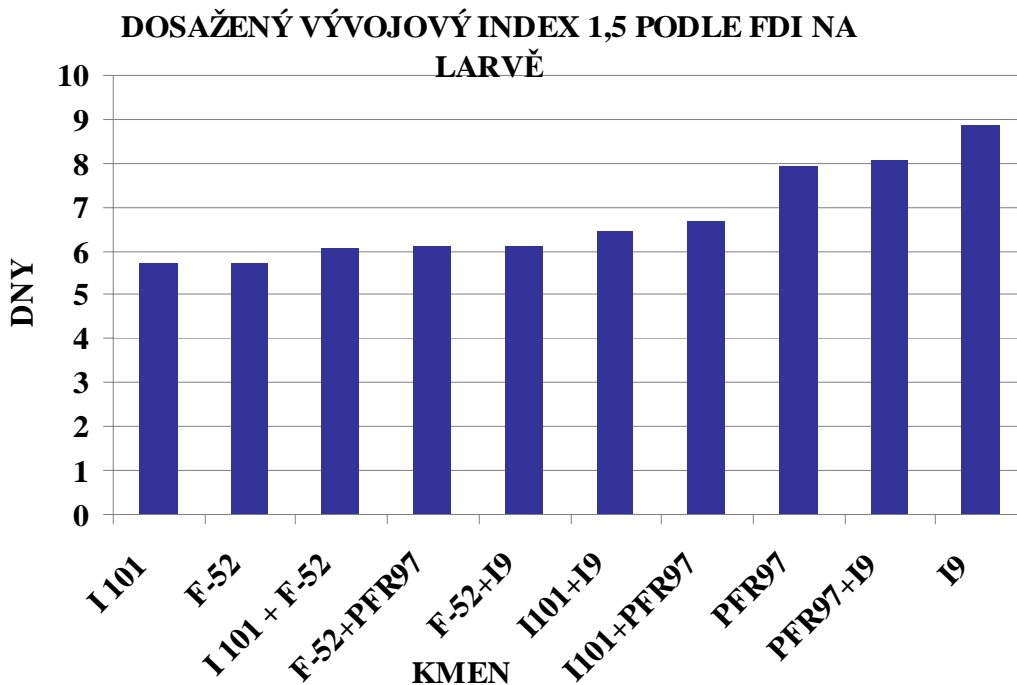
Průběh standardního biotestu pro jednotlivé kmeny a kmeny v kombinacích na larvě *Tenebrio molitor*





## GRAF 9

Dosažený vývojový index 1,5 podle FDI na larvě *Tenebrio molitor*, seřazeno od kmenů které dosáhnou index 1,5 jako první



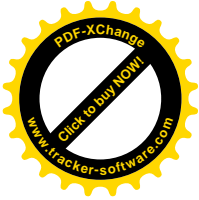
### Výsledek pokusu:

#### Kontrola:

- A) Všechny larvy namočené do standardního a výchozího titru  $1 \times 10^6$ /ml byly mrtvé a porostlé testovanými kmeny.

### Zhodnocení pokusu:

Na larvách se prosadily ke konci 5. dne jednotlivé kmeny I 101 a F-52 (PŘÍLOHA 3), které dosáhly vývojového indexu houby 1,5 podle FDI jako první. Vývojový index 1,5 dosáhl jako poslední kmen I 9 na konci 8 dne. V kombinaci kmenů se prosadily na larvách kmeny na začátku 6 dne I 101 + F-52, které dosáhly vývojového indexu houby 1,5 podle FDI jako první. Vývojový index 1,5 dosáhl jako poslední kmen PFR 97 + I 9 na začátku 8 dne.



## **POKUS 5**

### **Sledování průběhu infekce na povrchu hostitelské larvy *Tenebrio molitor* – konkurenční test**

Cílem testu bylo zjistit, který kmen se prosadil (růstu mycelia a produkce spor) na larvách, které byly ponořené do suspenze z kombinace kmenů (**Standardní laboratorní biotest**).

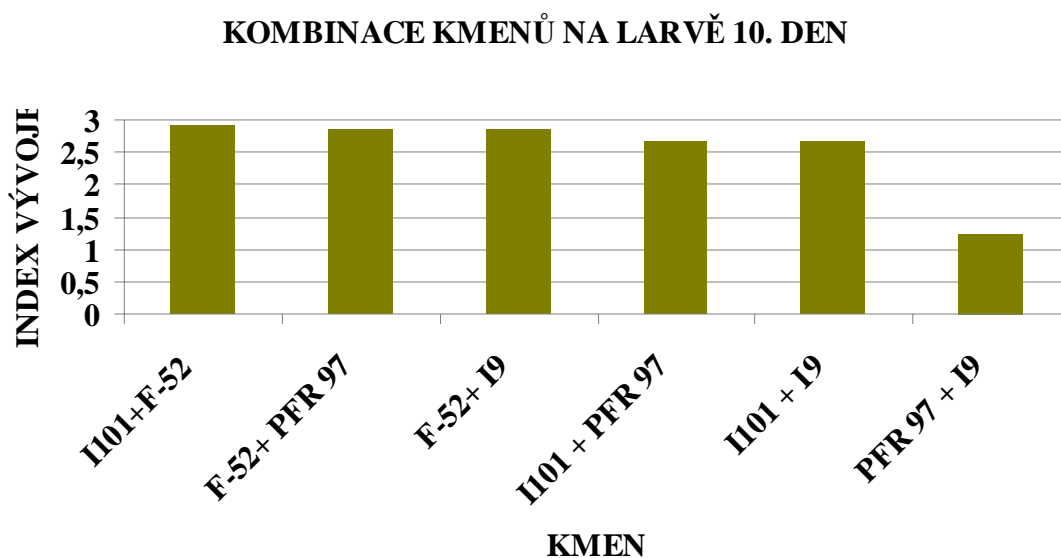
#### Základní údaje k pokusu:

- larvy se povrchově sterilovaly přelitím jednaprocentního roztoku SAVA (0,05% NaClO), dále se v co nejkratší době 3x promyly sterilní vodou a umístily na filtrační papír
- pro kombinace jednotlivých kmenů se standardní suspenze  $1 \times 10^6$ /ml naředila na výchozí suspenzi o titru  $1 \times 10^6$ /ml 1:1 ( $5 \times 10^5$ /ml pro jeden kmen +  $5 \times 10^5$ /ml pro další kmen v dané kombinaci) a larvy se ponořily na 2s („dip-test“)
- namočené larvy se umístily do vlhkých komůrek (krabičky na tkáňové kultury o 12ti buňkách se dvěma filtračními papírky na dně každé buňky, zvlhčené roztokem Tween)
- v testu bylo použito 25 larev
- vlhké komůrky byly uloženy do vytemperovaného termostatu s požadovanou teplotu 20°C
- hodnocení pokusů bylo prováděno 10. den pomocí světelné binolupy
- ke každé larvě byl přiřazen příslušný index FDI charakterizující klíčovou fází vývoje houby
- larva, která vykazovala stupeň sporulace (tzn. stupeň 2,5 a 3) byla vyjmuta z vlhké komůrky a vložena do zkumavky s roztokem Tween
- následným promícháním na vertexu došlo k uvolnění spor z povrchu těla larvy
- suspenze byla dále adjustována na koncentraci  $1 \times 10^6$ /ml a následně naředěna na koncentraci  $1 \times 10^2$  ml

- pro stanovení CFU byla na povrch PDA+D v Petriho misce nanesena suspenze o koncentraci  $1 \times 10^2$  v množství 0,5 ml
- suspenze se po povrchu agaru pravidelně rozptýlila, byla provedena 3 opakování na každou reprezentující larvu
- po důkladném vsáknutí (zaschnutí) suspenze, se vzorky uložily do igelitových sáčků a umístily do termostatu vytemperovaného na 25°C
- hodnocení cca po 7 dnech, kdy byly jednotlivé kultury dobře morfologicky rozlišitelné

### GRAF 10

Kombinace kmenů na larvě 10. den



### TABULKA 12

Vyhodnocení kmenů v kombinaci na hmyzím hosti

KOMBINACE KMENŮ	I 101	F-52	F-52	I 101	I 101	PFR 97
	+ F-52	+ PFR 97	+ I 9	+ PFR 97	+ I 9	+ I 9
Ø INDEX VÝVOJE	2,90	2,85	2,85	2,65	2,65	1,25
±SMODCH	±0,24	±0,25	±0,33	±0,43	±0,32	±0,77



### TABULKA 13

Vyhodnocení konkurenčního testu CFU

KOMBINACE KMENŮ	I 101 + F-52	I 101 + PFR 97	I 101 + I 9	F-52 + PFR 97	F-52 + I 9	PFR 97 + I 9
POČET VYTVOŘENÝCH KOLONIÍ A PROSAZUJÍCÍ KMEN	6 + 11 <b>F-52</b>	1 + 11 <b>PFR 97</b>	2 + 24 <b>I 9</b>	18 + 3 <b>F-52</b>	1 + 32 <b>I 9</b>	10 + .5 <b>I 9</b>
POČET VYTVOŘENÝCH KOLONIÍ A PROSAZUJÍCÍ KMEN	5 + 10 <b>F-52</b>	2 + 10 <b>PFR 97</b>	1 + 5 <b>I 9</b>	2 + 15 <b>PFR 97</b>	12 + 3 <b>F-52</b>	14 + 1 <b>I 9</b>

#### Výsledek pokusu:

##### Kontrola:

- A) Všechny larvy namočené do výchozího titru  $1 \times 10^6$ /ml byly mrtvé a porostlé testovanými kmeny.

#### **Zhodnocení pokusu:**

Na larvách v kombinaci kmenů I 101 + F-52 se prosadil kmen F-52.

Na larvách v kombinaci kmenů I 101 + PFR 97 se prosadil kmen PFR 97.

Na larvách v kombinaci kmenů I 101 + I 9 se prosadil kmen I 9.

Na larvách v kombinaci kmenů F-52 + PFR 97 se prosadily oba dva kmeny.

Na larvách v kombinaci kmenů F 52 + I 9 se prosadily oba dva kmeny.

Na larvách v kombinaci kmenů PFR 97 + I 9 se prosadil kmen I 9.





## POKUS 6

### Radiální růst a výtěžnost

Cílem testu bylo zjistit průměr středových kultur vyprodukovaných při kultivaci kmenů, následně vypočítat jejich plochu a zjistit množství spor vyprodukovaných při kultivaci kmenů na živné půdě.

Dále bylo třeba rozlišit jednotlivé kmene vybraných druhů EH použitých v testu (PŘÍLOHY 4, 5, 6) a podle toho určit který kmen se více prosazuje na larvách *Tenebrio molitor*.

#### Základní údaje k pokusu:

- suspenze o standardním titru  $1 \times 10^6$ /ml byla nanášena pomocí sterilní kličky ve formě kapky do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA v 5 opakováních
- po zaschnutí kapky se Petriho misky vložily v plastických sáčcích do termostatu, který byl vytemperován na teplotu 25°C
- hodnocení a měření průměru středových kultur se provádělo po 21 dnech, nejméně u 4 kultur od každého kmene
- hodnocení radiálního růstu probíhalo na základě měření dvou na sebe kolmých průměrů získané středové kultury
- ze zjištěných rozměrů se vypočítala plocha kultury
- po změření a vyfotografování kultur následovala jejich homogenizace
- ze živného média se vyřízla pouze porostlá část, která se vložila do mixéru, kde po dobu 20 s probíhala homogenizace
- počítání spor se provádělo v kalibrované počítačové komůrce pod světelným mikroskopem
- počítalo se vždy ze dvou opakování, výsledná hodnota byla jejich průměrem
- zjištěné hodnoty byly upraveny podle velikosti kultury na hodnoty reprezentující množství spor na kulturu, resp. na  $1 \text{ mm}^2$

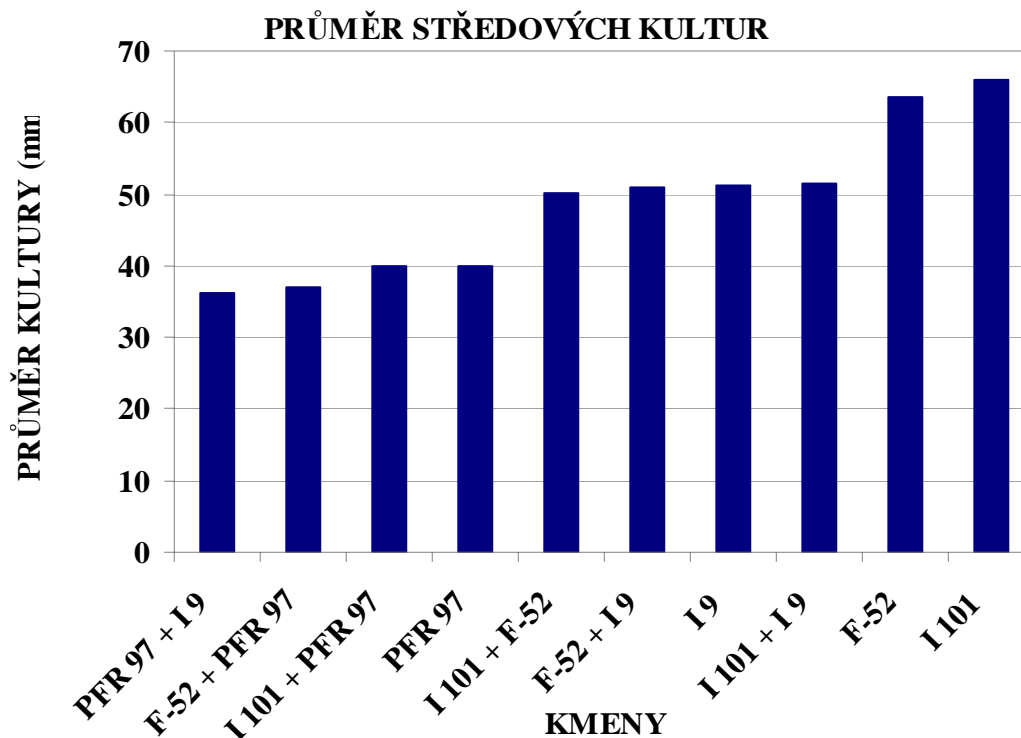
#### TABULKA 14

### Vyhodnocení radiálního růstu a výtěžnosti spor

KMENY	Ø KULTURY (mm)	PLOCHA (mm <sup>2</sup> )	PRODUKCE SPOR (SPOR/1 KULTURA)	PRODUKCE SPOR (mm <sup>2</sup> )
I 101	66,00±1,15	3421,19	4,51x10 <sup>9</sup> ±5,62x10 <sup>8</sup>	1,26x10 <sup>6</sup>
F-52	63,50±0,58	3166,92	7,04x10 <sup>8</sup> ±3,75x10 <sup>6</sup>	1,97x10 <sup>5</sup>
PFR 97	40,00±0,82	1256,64	4,23x10 <sup>8</sup> ±6,25x10 <sup>7</sup>	1,18x10 <sup>5</sup>
I 9	51,25±0,50	2062,90	2,25x10 <sup>9</sup> ±1,25x10 <sup>8</sup>	6,30x10 <sup>5</sup>
I 101 + F-52	50,25±5,85	1983,18	3,90x10 <sup>9</sup> ±7,75x10 <sup>8</sup>	1,09x10 <sup>6</sup>
I 101 + PFR 97	39,88±1,25	1248,79	2,73x10 <sup>8</sup> ±5,50x10 <sup>7</sup>	7,63x10 <sup>4</sup>
I 101 + I 9	51,50±0,93	2083,07	3,13x10 <sup>9</sup> ±1,50x10 <sup>8</sup>	8,75x10 <sup>5</sup>
F-52 + PFR 97	37,00±1,20	1075,21	1,89x10 <sup>8</sup> ±1,13x10 <sup>7</sup>	5,28x10 <sup>4</sup>
F-52 + I 9	51,00±1,07	2042,82	3,45x10 <sup>9</sup> ±2,50x10 <sup>7</sup>	9,66x10 <sup>5</sup>
PFR 97 + I 9	36,13±0,99	1024,96	1,84x10 <sup>8</sup> ±8,13x10 <sup>7</sup>	5,14x10 <sup>4</sup>

### GRAF 11

Vyhodnocení průměrů středových kultur vzestupně dle velikosti (mm)





## TABULKA 15

Rozlišené (prosazující se) kmeny z kombinací středových kultur

KMENY Z KOMBINACÍ	PROSAZUJÍCÍ SE KMEN
I 101 + F-52	F-52
I 101 + PFR 97	PFR 97
I 101 + I 9	I9
F-52 + PFR 97	PFR 97
F-52 + I 9	I9
PFR 97 + I 9	PFR 97

### Výsledek pokusu:

Produkce spor je po 21 dnech největší u kmene I 101 a koreluje s velikostí kultury. Současně je u tohoto kmene zaznamenán i největší průměr středové kultury. Naopak nejmenší produkce spor je u kombinací kmenů PFR 97 + I 9 a F-52 + PFR 97. I zde produkce spor koreluje s velikostí kultury. Současně je u těchto kmenů zaznamenán i nejmenší průměr středové kultury. Z testu vyplývá, že kmen PFR 97 tvoří nejméně spor a zároveň nejmenší plochu středové kultury z jednotlivých kmenů a taktéž z kombinací jednotlivých kmenů.

## POKUS 7

### **Interakce**

Cílem bylo zjistit jak na sebe působí jednotlivé kultury kmenů během růstu.

### Základní údaje k pokusu:

- suspenze o standardním titru  $1 \times 10^6$ /ml byla nanášena na umělá živná média PDA, pomocí inokulační kličky ve formě jedné kapky nalevo a napravo od středu Petriho misky v pomyslné rovině 2,5 cm od okraje Petriho misky
- po zaschnutí kapky na živném médiu PDA se Petriho misky vložily v igelitových sáčkách do termostatu, který byl vytemperován na teplotu 25°C
- hodnocení interakce kultur se provádělo po 21 dnech nejméně u 3 kultur od každého z kmenů



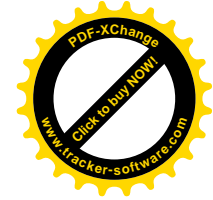
## TABULKA 16

Nejvýrazněji se projevující kmen v kombinaci

KMENY Z KOMBINACÍ	PROJEVUJÍCÍ SE KMEN/Y
I 101 + F-52	F-52 i I101
I 101 + PFR 97	PFR 97
I 101 + I 9	I9
F-52 + PFR 97	PFR 97
F-52 + I 9	I9
PFR 97 + I 9	PFR 97

### Výsledek pokusu:

Samostatné kmeny se mezi sebou zásadně neovlivňují. V místech možného styku vytváří hraniční zóny (PŘÍLOHA 7). Naopak kmeny z kombinací se výrazně ovlivňují (PŘÍLOHY 8 a 9). Nejvýrazněji se v kombinacích projevuje kmen I 9 a kmen PFR 97. Výrazný projev kmene I 9 v kombinaci spočívá v jeho rychlém růstu a zároveň v tvorbě nejpravidelnějších kultur, současně ostatní kmen z kombinace zásadně moc neovlivňuje. Kmen PFR 97 v kombinaci se též výrazně projevuje, což spočívá v jeho sice pomalém růstu avšak tvorbě pravidelných kultur a též tvorbě velkých viditelných hraničních zón s druhým kmenem z kombinace. F-52 má snahu se prosadit a zároveň v kombinacích na hranicích styku kmenů ustupuje. Kmen I 101 má též snahu prosadit se a zároveň v kombinacích na hranicích styku kmenů ustupuje.



## 5. DISKUZE A ZÁVĚR

Pro metody využívající živých pastí se využívají zejména larvy *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* (Zdroj 3). Pro svůj výzkum jsem tedy jako živý pokusný materiál zvolil larvy *Tenebrio molitor*, jelikož jsem je na základě prostudované literatury a rady vedoucího mé diplomové práce vyhodnotil jako vhodný a též dostupný materiál pro účely tohoto pokusu.

0,05% roztok Tween 80 (polyethylen glykol sorbitan) (Bohatá, 2005), používaný v mých pokusech je chemická látka schválená v EU jako smáčedlo které zvyšuje smáčendlivost jak suspenzí hub užívaných pro pokusy tak i smáčendlivost výsledných biopreparátů.

Při hodnocení všech čtyř kmenů EH byly využity laboratorní testy a byly zformulovány následující závěry:

### POKUS 1

#### **Standardní test klíčivosti – GI**

- udává procento klíčivosti, stupeň naklíčení příslušné populace konidií a následný vývoj patogena
- ⇒ 100% klíčivost byla po 24 hodinách prokázána u všech čtyř kmenů EH jak v samostatných pokusech tak v pokusech ve vzájemných kombinacích, tzn. klíčivost není významně ovlivňována ani živnou půdou ani vzájemnými interakcemi kmenů EH



## POKUS 2

### **Standardní test CFU na živných půdách PDA, PDA + A, PDA + D pro jednotlivé kmeny**

- udává, zda živné půdy (PDA, PDA + A, PDA + D) ovlivňují jednotlivé kmeny EH
  - ✓ početné kolonie jednotlivých kmenů EH v průběhu celého testu rostly na živných půdách rovnoměrně po celém povrchu a současně průběh jejich růstu byl standardní
  - ✓ celkově nejpočetnější kolonie dle testu tvořil kmen I 9
  - ✓ nejméně početné kolonie vytvořil kmen PFR 97 konkrétně na živných půdách PDA a PDA + A; a současně kmen F-52 na živné půdě PDA + D
- ⇒ živné půdy ovlivňují růst a tvorbu kolonií kmene PFR 97; procentická odchylka mezi živnými půdami je větší než 10 %
- ⇒ z vyjmenovaných čtyř kmenů EH je tedy samotný kmen PFR 97 na živných půdách závislý nejvíce a tedy potřebuje velmi specifické podmínky k tomu, aby se mohl projevit a případně ovlivnit svého hostitele (živnou půdu)
- ⇒ s nutností specifických podmínek kmene PFR 97 souvisí i jeho nejvýraznější projev na živné půdě PDA + D, kdy se tento kmen projevil nejsuverénněji oproti ostatním kmenům, které na přítomnost dodinu nereagují tak kladně jako právě kmen PFR 97
- ⇒ kmeny I 101, F-52 a I 9 živnými půdami ovlivněny nejsou; procentická odchylka mezi živnými půdami není větší než 10 %
- ⇒ tyto kmeny se dokážou na svém hostiteli projevit častěji i při méně specifických podmínkách



### POKUS 3

#### **Standardní test CFU na živných půdách PDA, PDA + A, PDA + D pro kmeny v kombinaci**

- udává, zda se jednotlivé kmeny v kombinacích vzájemně ovlivňují a zda se na ovlivňování podílí také druh živné půdy
  - ✓ nejpočetnější kolonie kmenů vytvořila kombinace kmenů I 101 + I 9 na živných půdách PDA a PDA + D a současně kombinace kmenů I 101 + F-52 a to na živné půdě PDA + A
  - ✓ nejméně početné kolonie tvořil na živných půdách PDA a PDA + A kmen PFR 97 a současně na živné půdě PDA + D kmen F-52
- ⇒ pro tvorbu nejpočetnějších kolonií je tedy vhodná kombinace kmenů s kmenem I 101 a zároveň vhodně zvolený druh živné půdy – pro kombinaci kmene I 101 s kmenem I 9 je to živná půda PDA a PDA + D, pro kombinaci kmene I 101 s kmenem F-52 je to živná půda PDA+A
- ⇒ dalo by se říci, že kmen I 101 má pro ostatní kmeny v kombinacích nejsilnější stimulační účinek, což se projevuje přítomností nejpočetnějších kolonií spor v kombinačních testech kmene I 101 s ostatními kmeny na živné půdě

### POKUS 4

#### **Standardní laboratorní biotest na hmyzím hostiteli *Tenebrio molitor***

- udává, kdy dosáhnou kmeny EH na larvě *Tenebrio molitor* vývojového indexu 1,5 (FDI)
  - ✓ vývojový index 1,5 značí, že larva je mrtvá a na jejím povrchu se začíná objevovat vláknité mycelium - pouze jednotlivé hyfy
  - ✓ tohoto indexu jako první dosáhly kmeny I 101 a F-52, které se na larvách začaly prosazovat ke konci 5. dne



- ✓ nejdéle, na konci 8. dne, vývojového indexu 1,5 dosáhl kmen I 9
  - ✓ z kombinací kmenů vývojového indexu nejrychleji, na začátku 6 dne, dosáhla kombinace I 101 + F-52
  - ✓ nejpozději dosáhla tohoto indexu, na začátku 8 dne, kombinace kmenů PFR 97 + I 9
- ⇒ kmeny I 101 a F-52 vykazují jak v testech jednotlivých, tak v testech kombinačních na larvě *Tenebrio molitor* nejsuverénnější viditelné projevy mortality (porůstání myceliem)
- ⇒ můžeme tedy konstatovat, že tyto kmeny jsou nejrychlejším a nejúčinnějším spouštěčem úmrtnosti

## **POKUS 5**

### **Sledování průběhu infekce na povrchu hostitelské larvy *Tenebrio molitor* – konkurenční test**

- udává, který kmen z kombinace se na larvách *Tenebrio molitor* prosadí 10. den po jejich namočení do suspenze z kombinací těchto kmenů
- ✓ schopnost prosadit se byla v tomto testu posuzována dle porůstání larvy plně sporulujícím myceliem
- ⇒ vysoká schopnost prosadit se byla zaznamenána u kmene F-52 v kombinacích a současně tento kmen má na druhý kmen z kombinace nižší konkurenční schopnost, tzn. většinou se projeví oba současně
- ⇒ vysokou schopnost prosadit se v kombinacích má také kmen I 9, u tohoto kmene se ale z velké míry projevuje na druhý kmen z kombinace vyšší konkurenční schopnost, tzn. v kombinacích s kmenem I 9 se většinou projeví právě tento kmen





⇒ z testu vyplývá, že nejnižší schopnost prosadit se na larvě *Tenebrio molitor* má v kombinaci kmenů kmen I 101

## **POKUS 6**

### **Radiální růst a výtěžnost**

- udává průměr středových kultur, plochu těchto kultur a též množství vyprodukovaných spor během kultivací kmenů
    - ✓ největší průměr středové kultury a současně nejvyšší produkce spor po 21 dnech byla zaznamenána u kmene I 101
    - ✓ nejmenší průměr středové kultury a současně nejmenší produkce spor po 21 dnech byla zaznamenána u kombinace kmenů PFR 97 + I9 a F-52 + PFR 97 a současně u samostatného kmene PFR 97
- ⇒ v konkurenčním testu dosahuje rychlého růstu kmen PFR 97 v kombinacích a naopak kmen I 101 v kombinacích se neprosazuje

## **POKUS 7**

### **Interakce**

- udává, jak na sebe působí jednotlivé kultury kmenů během růstu
  - ✓ u samostatných kmenů nedochází k zásadnímu ovlivňování
  - ✓ kmen I 9 v kombinaci se prosadí a ostatní kmen z kombinace zásadně moc neovlivňuje
  - ✓ kmen PFR 97 v kombinaci se také prosadí a zároveň na rozhraní obou kmenů tvoří výrazné hraniční zóny (zejména s kmenem F-52)
  - ✓ kmen F-52 v kombinacích se sice projeví avšak na rozhraní obou kmenů převážně ustupuje
  - ✓ kmen I 101 v kombinacích se projevuje avšak na rozhraní převážně ustupuje



- ⇒ nejvýrazněji se v kombinacích projevuje kmen I 9 a kmen PFR 97
- ⇒ kmen I 9 se razantně projevuje (rychlý růst, pravidelné kultury) a zároveň není vůči druhému kmeni z kombinace příliš agresivní
- ⇒ kmen PFR 97 se též razantně projevuje (tvorba pravidelných kultur), ale oproti kmenu I 9 je vůči druhému kmenu z kombinace agresivní (tvorba velkých viditelných hraničních zón)

### . TABULKA 17

Uvedené prosazující se kmény z pokusů 6, 7 a 5

<b>KOMBINACE KMENŮ</b>	<b>STŘEDOVÉ KULTURY</b>	<b>INTERAKCE</b>	<b>PROSAZUJÍCÍ SE KMEN/Y NA LARVĚ <i>T. MOLITOR</i></b>
<b>I 101 + F-52</b>	F-52	F-52 i I 101	F-52
<b>I 101 + PFR 97</b>	PFR 97	PFR 97	PFR 97
<b>I 101 + I 9</b>	I 9	I 9	I 9
<b>F-52 + PFR 97</b>	PFR 97	PFR 97	PFR 97 i F-52
<b>F-52 + I 9</b>	I 9	I 9	I 9 i F-52
<b>PFR 97 + I 9</b>	PFR 97	PFR 97	I 9

Z uvedené tabulky je vidět, který/é kmen/y se prosazují z dané kombinace kmenů v prováděných pokusech (POKUS 6 středové kultury, POKUS 7 interakce, POKUS 5 sledování průběhu infekce na povrchu hostitelské larvy).



## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Ainsworth G.C. 1973:** Introduction and keys to higher taxa, Vol. IV.A: 1-7, In: Ainsworth, G.C., Sparrow F.K., Sussman A.S., (Eds.): *The Fungi - An Advanced Treatise*. Academic Press, New York.

**Andersch W., Hartwig J., Reinecke P., Roberts D. 1990:** Production of mycelial granules of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for biological control of soil pests. In: *Proceedings of 5 Int. Colloq. Invert. Pathol. and Microb. Control.*, Adelaide, Australia, 2-5.

**Bidochka M.J., StLeger R.J., Joshi L., Roberts D.W. 1995:** The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycol. Res.*, 99 (4): 403-406.

**Bing L.A., Lewis L.C. 1992:** Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology*, 2: 39-47.

**Bohatá A. 2005:** Využití entomopatogenních a mykoparazitických hub v ochraně sazenic rychlé zeleniny a okrasných květin (disertační práce). ZF JU, České Budějovice, 173.

**Bolckmans K., Sterk G., Eyal J., Sels B., Stepman W. 1995:** PreFeRal, (*Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith, strain Apopka 97), a new microbial pesticide for the biological control of whiteflies in greenhouses. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige, Universiteit Gent*, 60: 719-724.

**Boucias D.G., Pendland J.C. 1984:** Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Inverteb. Pathology*, 43: 288-292.

**Boucias D.G., Pendland J.C., Latge J.P. 1988:** Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1795-1805.

**Brožová J. 2004:** Biologická rozmanitost v České republice. Současný stav a trendy. Ministerstvo životního prostředí. Praha. ISBN-80-7212-344-0. 7-18.

**Butt T.M., Segers R.J., Leal S.C.M., Kerry B.R. 1998:** Variation in the subtilisins of fungal pathogens of insects and nematodes. In: Bridge P., Couteaudier Y., Clarkson J. (Eds.): *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, 149-169.

**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.



**Butt M.T., Jackson CH., Magan N. 2001:** Introduction – Fungal biological control agents. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential. CABI Publishing.

**Butt T.M. 2002:** Use of Entomopathogenous Fungi or the Control of Insect Pests. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): The Mycota XI.-Agricultural Applications. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 111-134.

**Clark T.B., Kellen W.R., Fukuda T., Lindegren J.E. 1968:** Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, 11: 1-7.

**Cloyd R. 2005:** The Entomopathogen *Verticillium lecanii*. <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf612.html>, 20.3.2012.

**Dirlbeková O. 1991:** Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (I.*Deuteromycetes*, *Beauveria bassiana*) Studie VTR, ÚVTIZ, Ř. Rostl. Výr. 11: 10 - 21.

**Driver F., Milner R.J., Trueman J.W. 2000:** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research, 104: 134-150.

**Dromph K.M., 2001:** Dispersal of entomopathogenic hyphomycete fungi by collembolans. Soil Biol. Biochem., 33: 2047-2051.

**Elliot S.L., Sabelis M.W., Janssen A., van der Geest L.P.S., Beerling E.A.M., Fransen J. 2000:** Can plants use entomopathogens as bodyguards? Ecology Letters, 3: 228-235. Environmental Microbiology, 54: 1795-1805.

**Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G., 1994:** Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control - current status. Biocontrol Science and Technology, 4:3-34.

**Ferron P. 1978:** Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, 23: 409-442.

**Eyal J., Mabud A., Fischbein K.L., Walter J.F., Osborne L.S., Landa Z. 1994:** Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 Strain, Which Produces a Red Pigment for Microbial Control. Applied Biochemistry and Biotechnology, 44: 65-80.

**Fuxa J.R. 1987:** Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Annu. Rev. Entomol., 32: 225-251.

**Goettel M.S., Poprawski T.J., Vanderberg J.D., Li Z., Roberts D.W. 1990:** Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M., Lacey L.A., Davidson E.W. (Eds): Safety of microbial Insecticides. CRC Press, Boca Ratón, FL, 209-231.

**Goettel M.S. 1992:** Fungal agents for biocontrol. In: Lomer C.J., Prior C. (Eds.): Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International, Wallingord, UK, 122-132.



**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 (3): 256-261.

**Gottlieb D. 1976:** Production and role of antibiotics in soil. *Journal of Antibiotics*. 29: 987-1000.

**Grimm C. 2001:** Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop-Protection*. 2001, 20: 7, 623-630.

**Güclü S., Ak K., Eken C., Akyol H., Sekban R., Beytut B., Yildirim R. 2010:** Pathogenicity of *Lecanicillium muscarium* against *Ricania simulans*. *Bulletin of Insectology* 63 (2): 243-246.

**Hajek A.E., StLeger R.J. 1994:** Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Anu. Rev. Entomol.*, 39: 293-322.

**Hajek A.E. 2004:** Natural enemies: an introduction to biological control. The Edinburg Building, Cambridge, 22: 203-209.

**Hall R.A. 1981:** The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges H.D. (Ed.): *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London, 483-498.

**Hall R.A. 1982:** Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii*, in greenhouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Ann Appl Biol*. 101: 1-11.

**Hédli R. 2005:** Sledování změn vegetace. In: Vačkář D. (Eds.): *Ukazatele změn biodiverzity*. Academia Praha, 171-194.

**Hesketh H., Roy H.E., Eilenberg J., Pell J.K., Hails R.S. 2009:** Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl*, 55: 55-73.

**Hirte W.F., Glathe I., Adam H. 1989:** Production and application of microbial preparation with *Aschersonia* spores. *Zentrallbl. Microbiol.*, 144: 155-162.

**Hoddle M.S. 2004:** Biological control of whiteflies ornamental crops. In: Heinz K.M., van Driesche R.G., Parrella P. (Eds.): *Biocontrol in protected culture*. Ball Publishing, Batavia, 149-170.

**Humber R. A. 1997:** Fungi-Identification. In: Lacey L. A. (Ed.): *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, Chapter III., 153-185.

**Hůrka K. 2005:** Brouci České a Slovenské republiky. Nakladatelství Kabourek, Zlín.



**Ignoffo C.M., Garcia C., Hosteller D.L., Pinnell R.E. 1977:** Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* through sand and loam soils. J. Econ. Entomol., 70: 163-164.

**Ignoffo C.M., Garcia C. 1992:** Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi by simulated sunlight. Environ. Entomol., 21: 913-917.

**Inglis G.D., Goettel M.S., Johnson D.L. 1993:** Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. Biological Control, 3: 258-270.

**Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001:** Use of Hyphomycetes fungi for manging 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.

**Jaronski S.T. 2007:** Soil ecology of the entomopathogenic *Ascomycetes*: A critical examination of Chat we (think) we knot. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.): Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. Research Signpost, Kerala. 91-173.

**Kazda J., Mikulka J., Prokinová E. 2010:** Encyklopedie ochrany rostlin. Vydavatelství Profi Press s.r.o., Praha, 10-51.

**Klingen I., Haukeland S. 2006:** The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg J., Hokkanen H.M.T. (Eds.): An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 145–211.

**Koubová D. 2009:** Využití hub v biologické ochraně rostlin proti škůdcům. UZEI, Agronavigátor: 1-42.

**Krátká J. 2007:** Laboratorní metody. In: Kůdela V., Breunová M. a kol. (Eds.): Česko-anglická rostlinolékařská terminologie = Czech-English plant health terminology. Academia, Praha, 1. vyd.: 534-555.

**Landa Z. 1994:** Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JU, České Budějovice, 204.

**Landa Z. 1998:** Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. Agro, 10: 7-12.

**Landa Z., Bobková P., Bohatá A. 2002:** Rostlinolékařská terminologie 13. Biologická ochrana. Plant Protection Science, 38 (3), I-XXXIV.

**Landa Z., Bobková P., Bohatá A. 2007a:** Biologické metody. In: Kůdela V., Breunová M. a kol. (Eds.): Česko-anglická rostlinolékařská terminologie = Czech-English plant health terminology. Academia, Praha, 1. vyd.: 697-724.

**Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O. 2007b:** Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. Lesnická práce, 10: 14-15.



**Legaspi J.C., Poprawski T.J., Legaspi B.C. 2000:** Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (*Lepidoptera: Pyralidae*) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *Journal of Economic Entomology*, 93 (1): 54-59.

**Leger St.J.R., Wang C. 2009:** Entomopathogenic Fungi and the Genomics Era. In: Stock S.P., Vandenberg J., Glazer I., Boemare N. (Eds): *Insect Pathogens Molecular Approaches and Techniques*. CAB International, London, 16: 365-368.

**Leland J.E. 2001:** Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* for control of African Desert Locust (*Schistocerca gregaria*). Ph.D. Thesis. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.

**Li D.P., Holdom D.G. 1993:** Effect of soil matric potential on sporulation and conidial survival of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 273-277.

**Lingg A.J., Donaldson M.D. 1981:** Biotic and abiotic factors affecting stability of *B. bassiana* conidia in soil. *J. Invert. Pathol.*, 38: 191-200.

**Maniania N.K., Nchu F., Ekesi S. 2007:** Fungal pathogens for biocontrol of ticks. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.): *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*. Research Signpost, Kerala. 275-294.

**McCoy C.W., Quintela E.D., Faria M.R. 2002:** Environmental persistence of entomopathogenic fungi. In: Baur, M.E., Fuxa, J.R. (Eds.): *Factors affecting the survival of entomopathogens*. Southern Cooperative Series Bulletin 400.

**Meyling N.V., Eilenberg J. (2007):** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43,145–155.

**Millennium Ecosystem Assessment (2005):** Ecosystems and human well-being: biodiversity synthesis. World Resources Institute, Washington, DC.

**Moore D., Bridge P.D., Higgins P.M., Bateman R.P., Prior C. 1993:** Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviridae* conidia and the protection given by vegetable and mineral oil and chemical sunscreens. *Ann. Appl. Biol.*, 122: 605-616.

**Osborne L.S., Landa Z. 1992:** Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*, Vol. 75, No. 4: 456-471.

**Osborne L.S., Storey G.K., McCoy C.W., Walter J.F. 1990:** Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Colloquium on Invertebrate Pathology and Biological Control*, Adelaide, Australia, 386-390.

**Papierok B., Hajek A.E. 1999:** Fungi – Entomophthorales. In: Lacey L.A. (Ed.): *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, Chapter V-2, 188-212.

**Patočka J. 2010:** Destruxy: cyklohexadepsipeptidy entomopatogenních hub. Wednesday.



**Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E., Steinraus D.C. 2001:** Biology, Ecology and Pest Management Potential of Entomophthorales. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential. CABI Publishing, 71-153.

**Pena, J.E., Osborne, L.S., Duncas, R.E. 1996:** Potential of fungi as biocontrol agents of *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). Entomophaga, 41: 27-36.

**Pluke R., Permual D., Leibee G. 1999:** Integrated pest management and the use of botanicals in Guyana,3.

**Siebeneicher S.R., Vinson S.B., Kenerley C.M. 1992:** Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. Journal of Invertebrate Pathology, 59: 280-285.

**SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2009/128/ES** ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů.

**Smith R.J., Gula E.A. 1981:** Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, 37 (3): 222-230.

**Sosa-Gomez D.R., Boucias D.G., Nation J.L. 1997:** Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezera viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes. Journal of Invertebrate Pathology, 69: 31-39.

**Soukup J. 2005:** Metody regulace zaplevelení In: Mikulka J., Kneifelová M., Martinková Z., Soukup J., Uhlík J. (Eds.): Plevelné rostliny. Vydavatelství Profi Press s.r.o. Praha,39-42.

**Srivastava C.N., Maurya P., Sharma P., Mohan L. 2009:** Prospective role of insecticides of fungal origin. Review, Entomological Research, 341-355.

**Šimková J. 2011:** Vývoj formulační biomasy mitosporických hub cílené na využití v programech biointenzivní integrované ochrany rostlin (disertační práce). ZF JU, České Budějovice.

**Tscharntke T., Klein A.M., Kruess A., Steffan-Dewenter I., Thies C. 2005:** Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity-ecosystem service management. Ecol. Lett. 8, 857–874.

**Vega F.E., Dowd P.F., McGuire M.R., Jackson M.A., Nelsen T.C. 1997:** In vitro effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal of Invertebrate Pathology, 70 (3): 209-213.





**Vestergaard S., Butt T.M., Bresciani J., Gillespie A.T., Eilenberg J. 1999:** Light and Electron Microscopy Studies of the Infection of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 7: 25-33.

**Vidal C., Fargues J., Lacey L.A. 1997:** Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. Journal of Invertebrate Pathology, 70: 18 - 26.

**Villani M.G., Krueger S.R., Schroeder P.C., Consolif F., Consolif N.H., Preston-Wilsey L.M., Roberts D.W. 1994:** Soil applications effects of *Metarhizium anisopliae* on japanese beetle (*Coleoptera: Scarabaeidae*) behavior and survival in turfgrass microcosms. Environ, Entomol, 23 (2): 502-513.

**Wang C., Typas M.A., Butt T.M. 2002:** Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters, 213: 251-255.

**Watson D.W., Geden C.J., Long S.J., Rutz D.A. 1995:** Efficacy of *Beauveria bassiana* for Controlling the House Fly and Stable Fly (*Diptera: Muscidae*). Biological Control, 5: 405-411.

**Weiser J. 1966:** Houbová onemocnění hmyzu.: Nemoci hmyzu. Academia, Praha, 232-324.

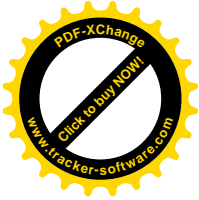
**Weiser J. 1991:** Mikrobiální insekticidy. In: Hrdý I. (Ed.) Biopesticidy v zemědělství. MZ ČR, Praha,30-43.

**Wright S.P., Carruthers R. 1999:** Production, Delivery and Use of Mycoinsecticides for control of Insect Pests in field Crops. In: Biopesticides – use and delivery. Hall F.R., Menn J.J. (Eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 233-270.

Zdroj 1 *Metarhizium a.* Online, cit.18.3.2012, dostupné z <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/Metarhizium.html>.

Zdroj 2 *B. bassiana, I. Fumosorosea, Metarhizium a.* Online, cit.18.3.2012, dostupné z <http://www.mycobank.org/DefaultInfo.aspx?Page=Home>

Zdroj 3 Online, cit. 15.2.2011, dostupné z <http://pdfserve.informaworld.com/507979>



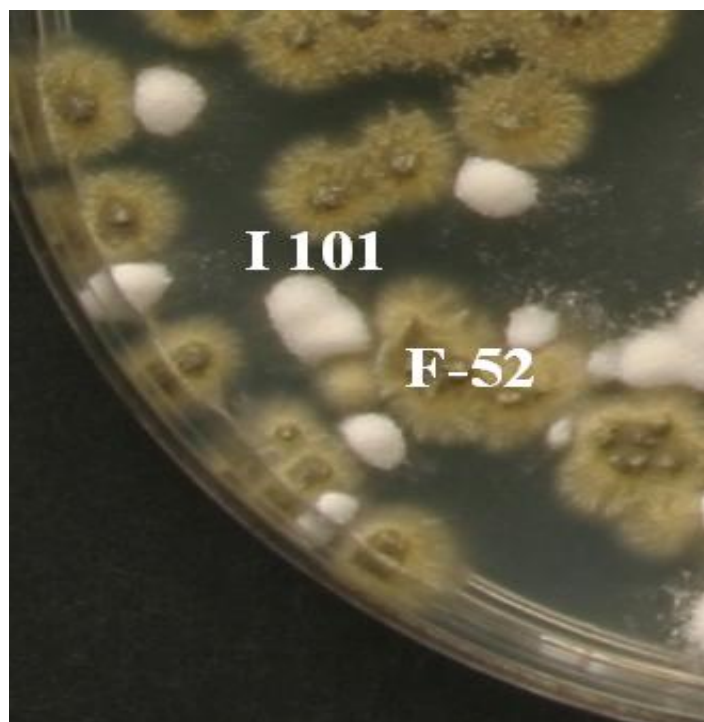
## 7. PŘÍLOHY

Jako přílohy byly použity fotografie z mého vlastního výzkumu.

- Příloha 1:** Kmeny I 101 + F-52 na živné půdě PDA + D
- Příloha 2:** Kmeny I 101 + PFR 97 na živné půdě PDA + A
- Příloha 3:** Příklad kombinace kmenů I 101 + F-52  
na larvě *T. molitor* 10. den hodnocení
- Příloha 4:** Příklady středových kultur kombinací kmenů (1. část)
- Příloha 5:** Příklady středových kultur kombinací kmenů (2. část)
- Příloha 6:** Příklady středových kultur kombinací kmenů (3. část)
- Příloha 7:** Příklady interakce kultur jednotlivých kmenů
- Příloha 8:** Příklady interakce kultur kombinací kmenů (1. část)
- Příloha 9:** Příklady interakce kultur kombinací kmenů (2. část)

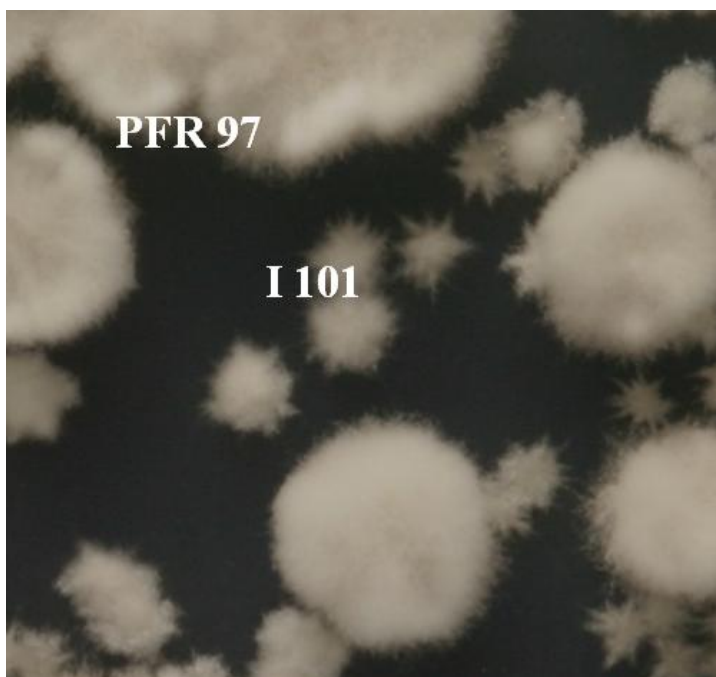


**Příloha 1:** Kmeny I 101 + F-52 na živné půdě PDA + D





**Příloha 2:** Kmeny I 101 + PFR 97 na živné půdě PDA + A





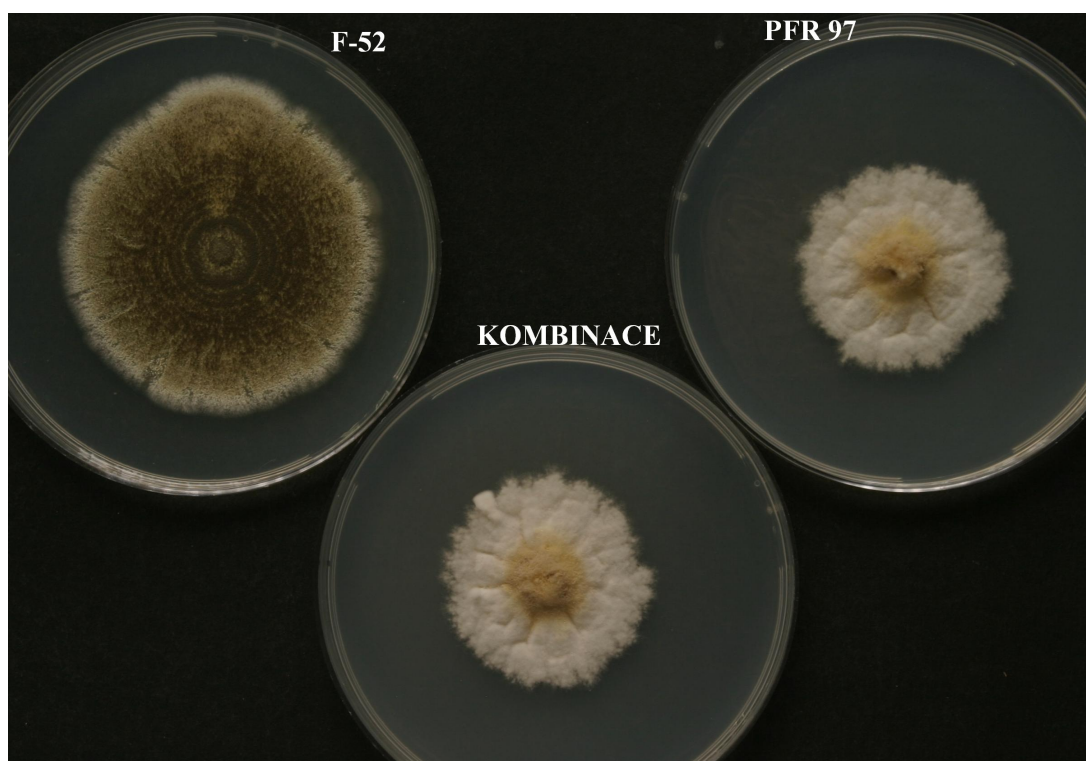
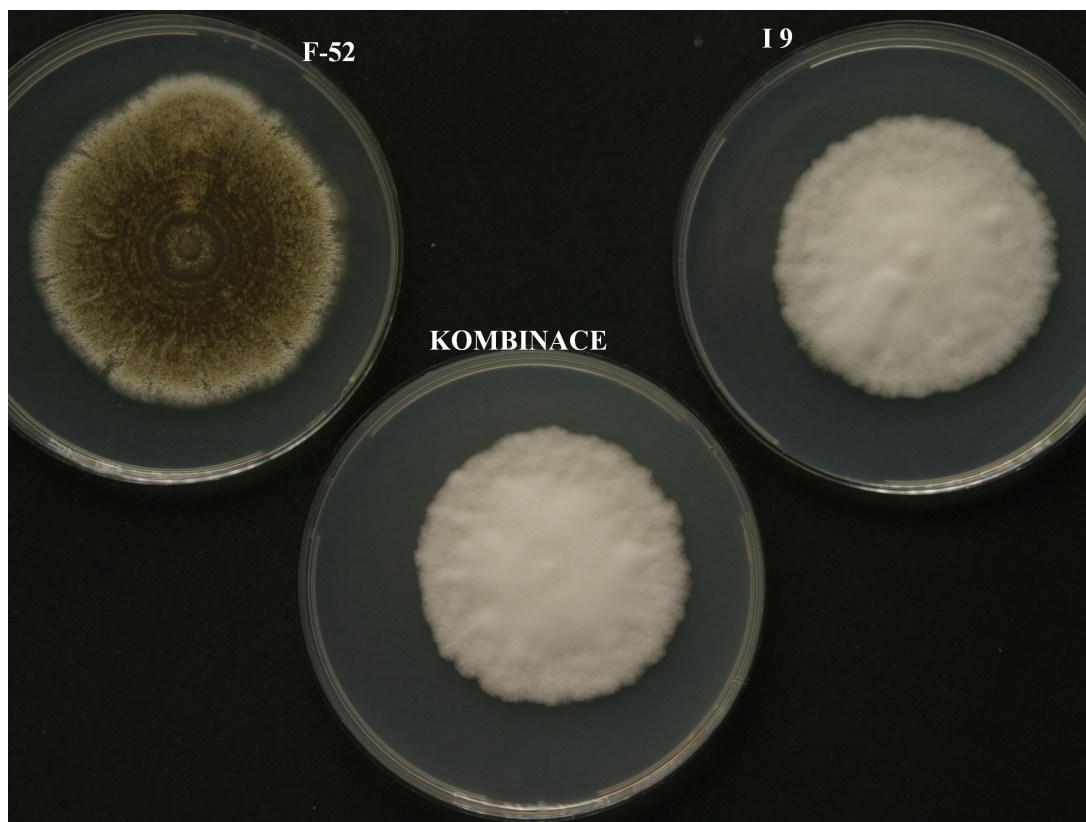
**Příloha 3:** Příklad kombinace kmenů I 101 + F-52  
na larvě *T. molitor* 10. den hodnocení



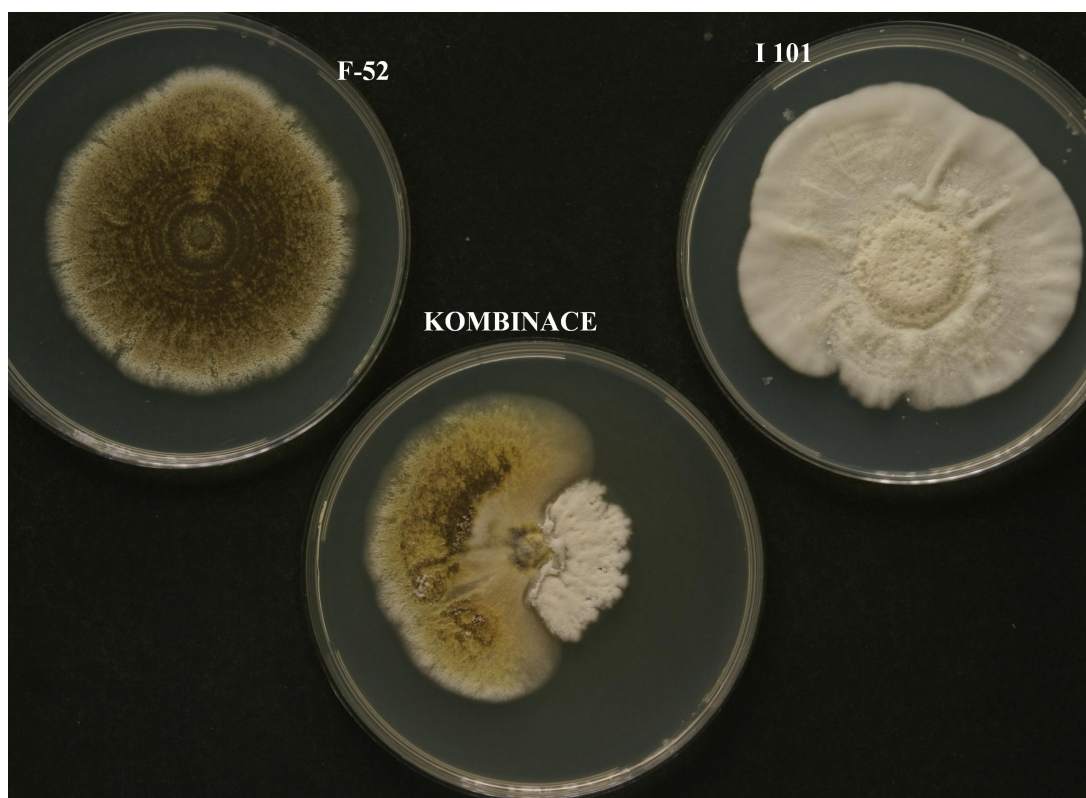
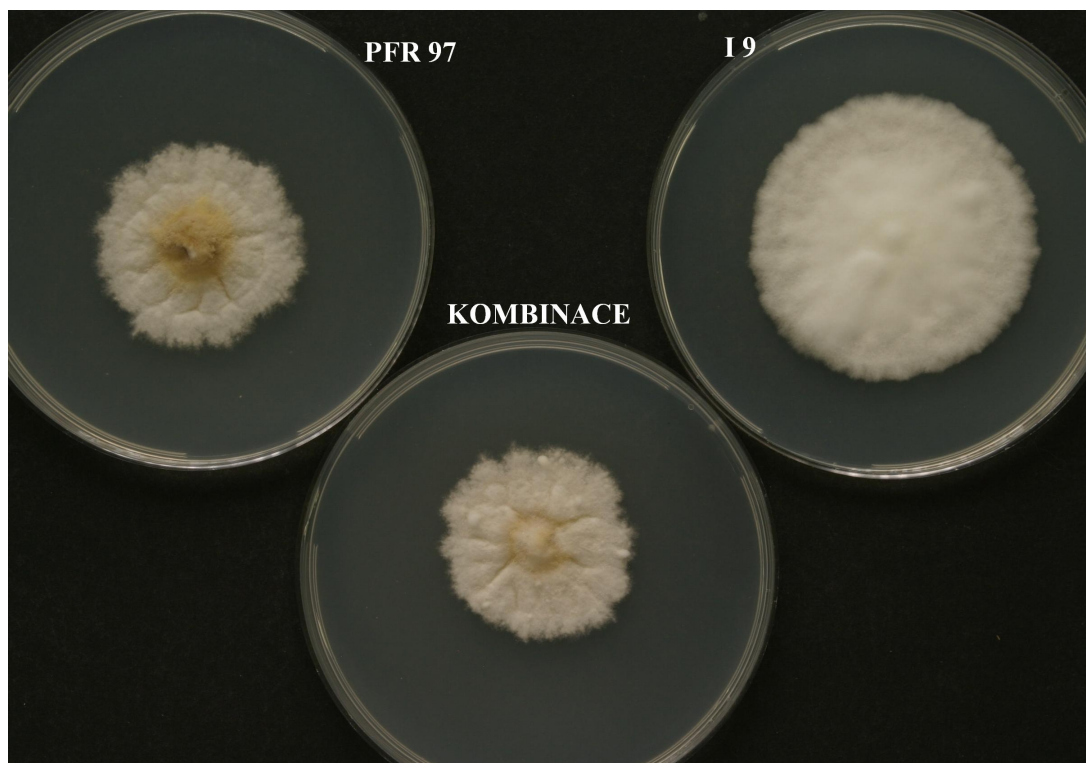
**Příloha 4:** Příklady středových kultur kombinací kmenů (1. část)  
(vlevo a vpravo nahoře jednotlivé kmeny, dole uprostřed kmeny kombinací)



**Příloha 5:** Příklady středových kultur kombinací kmenů (2. část)  
(vlevo a vpravo nahoře jednotlivé kmeny, dole uprostřed kmeny kombinací)



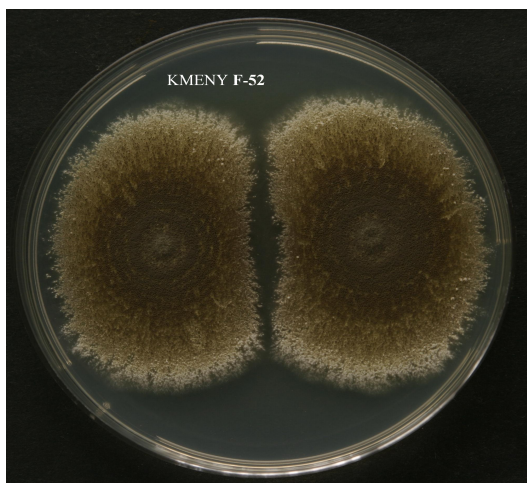
**Příloha 6:** Příklady středových kultur kombinací kmenů (3. část)  
(vlevo a vpravo nahoře jednotlivé kmeny, dole uprostřed kmeny kombinací)



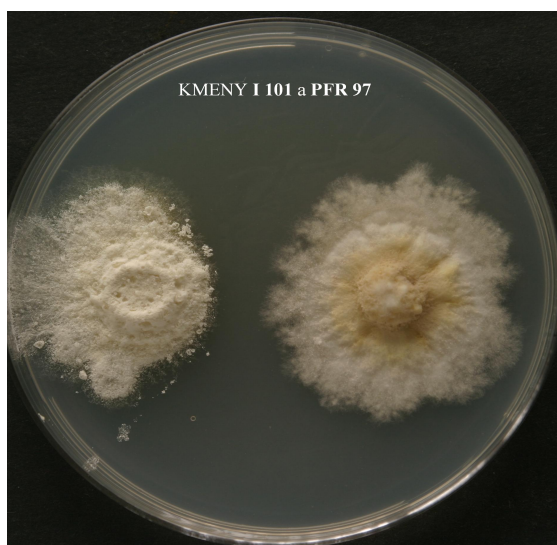




**Příloha 7:** Příklady interakce kultur jednotlivých kmenů



**Příloha 8:** Příklady interakce kultur kombinací kmenů (1. část)



**Příloha 9:** Příklady interakce kultur kombinací kmenů (2. část)

