

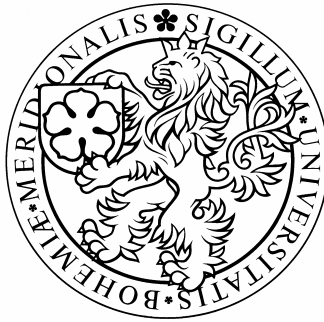
**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH**

Z e m ě d ě l s k á f a k u l t a

Katedra rostlinné výroby

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství - sp. rostlinolékařství



**Synergismus entomopatogenních hlístic a
entomopatogenních hub**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
prof. Ing. Z. Landa, CSc.

Autorka
Tereza Šillerová

2008

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

Jméno a příjmení: **Tereza ŠILLEROVÁ**
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství - sp. rostlinolékařství**

Název tématu: **Synergizmus entomopatogenních hlístic
a entomopatogenních hub**

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

1. Úvod - cílem diplomové práce je studium možného synergizmus entomopatogenních hlístovek a entomopatogenních hub s ohledem na hypotetickou možnost navýšení účinnosti obou skupin bioagens formou současných introdukcí.
2. Literární přehled - kompilace rešerše zaměřené na základní biologické charakteristiky vybraných druhů entomopatogenních hub a hlístic a na standardní laboratorní biotesty používané v komparativních studiích hub a hlísti, včetně standardních postupů používaných při testování účinků pesticidů na entomopatogenní houby a hlístice.
3. Experimentální část a výsledky - zavedení standardních laboratorních biotestů umožňujících objektivní charakteristiku interakčního systému "entomopatogenní houba - entomopatogenní hlístice", včetně biotestů využívajících přirozené hostitele (*Galleria mellonella* a *Spodoptera litoralis*). Tyto biotesty budou využity při studiu koexistence entomopatogenních hlístovek a hub při invazi do hmyzího hostitele.
4. Závěry a výstupy - vypracování standardního metodického postupu, který by byl obecně využitelný při studiu interakčního systému "hlístice - entomopatogenní houby" a vyhodnocení hypotézy možné kombinace entomopatogenních hlísti a entomopatogenních hub v programech biologické a integrované ochrany rostlin.

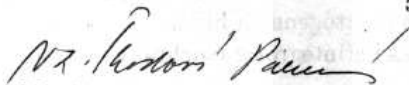
Rozsah práce: 50-60 stran
Rozsah příloh: 15-20 grafů, fotodokumentace
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Gaugler, R., 2001: Entomopathogenic nematology. CABI Publishing, Oxon, UK, 390 s.
Mráček Z., Weiser J., 1988: Parazitické hlístice hmyzu. Academia, Praha, 260 s.
Fuxa J.R., Tanada Y., 1987: Epizootiology of insect diseases. John Wiley and Sons, Inc., 562 s.
Weiser, J., 1977: An atlas of insect diseases. Academia, Praha, 84 s.
Publikace získané pomocí retrospektivních a průběžných rešerší v databázových systémech WoS a CABI, případně v plnotextových databázích (ScienceDirect, Springer)

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.
Katedra rostlinné výroby
Konzultant diplomové práce: RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.
Datum zadání diplomové práce: 15. února 2006
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2008

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


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

děkanka

L.S.

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.
vedoucí katedry



V Českých Budějovicích dne 15. února 2006

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou, ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

30.4.2008

.....
datum

.....
podpis studenta

Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc.. Dále bych chtěla poděkovat konzultantům RNDr. Zdeňku Mráčkovi, DrSc. a Ing. Štěpánce Radové za pomoc při řešení diplomové práce.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá společným působením dvou druhů entomopatogenních hlístic a tří druhů entomopatogenních hub. V in vitro podmínkách byly hlístice kultivovány v suspenzi entomopatogenních hub. Mortalita hlístic způsobená houbovým patogenem byla nižší než 10 %. Pouze mortalita hlístic *Steinernema feltiae* kultivovaných s *Isaria fumosorosea* byla 14,18 %. Oba druhy patogenů byly dále testovány samostatně, při společné a oddělené aplikaci proti poslednímu larválnímu instaru zavíječe voskového *Galleria mellonella*. Při samostatné aplikaci byly testovány čtyři koncentrace hlístic a tři koncentrace hub. Mortalita nebo výskyt infikovaných larev *Galleria mellonella* byl zjišťován po 3, 5 a 7 dnech po aplikaci hlístic, dále 7 a 14 dní po aplikaci hub. V závislosti na koncentraci hlístic a sledovaném čase se mortalita larev pohybovala od 52 % do 100 %. Výskyt infikovaných larev zjišťovaný po 7 dnech od aplikace hub se pohyboval od 0 % do 46 % podle druhu entomopatogenní houby a její koncentrace. Po 14 dnech se výskyt infikovaných larev pohyboval od 48 % do 98 %. Výskyt larev infikovaných houbou *Lecanicillium lecanii* byl velmi nízký a nedostatečný. V dalších pokusech byla u obou patogenů použita pouze jedna koncentrace. Při společné aplikaci byl výskyt infikovaných larev zjišťován po 7 a 14 dnech po aplikaci patogenů. Výskyt infikovaných larev se pohyboval od 38 % do 84 % v závislosti na druzích hlístic, hub a sledovaném čase. V pokusech s oddělenou aplikací patogenů byly infikované larvy zjišťovány po 7 a 14 dnech od aplikace houby, respektive 5 a 12 dní od aplikace hlístic. Výskyt infikovaných larev se pohyboval od 14 % do 84 % v závislosti na druhu hlístic a hub a sledovaném čase.

klíčová slova - synergismus, entomopatogenní hlístice, entomopatogenní houby, *Steinernema arenarium*, *Steinernema feltiae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii*

ABSTRACT

The synergism of two species of entomopathogenic nematodes and three entomopathogenic fungal species was investigated in this study. In in vitro assay, the nematodes were cultivated in the suspension of entomopathogenic fungi. Mortality of nematodes caused by fungi was less than 10 %. Only mortality of *Steinernema feltiae* cultivated with *Isaria fumosorosea* was 14.18 %. Both entomopathogens were tested singly, simultaneously or sequentially against the last instar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Four concentrations of nematodes and three concentrations of fungi were used in singly assays. Mortality or occurrence of infected larvae of *Galleria mellonella* was determined 3, 5 and 7 days after application of nematodes, or 7 and 14 days after application of fungi. In depending of application dose of nematodes and time after application larval mortality achieves from 52 % to 100 %. Occurrence of infected larvae determined 7 day after application of fungi achieves from 0 % to 46 %. It depends on the fungal species and application dose. After 14 days occurrence of infected larvae achieves from 48 % to 98 %. Occurrence of infected larvae caused by *Lecanicillium lecanii* was very low and unsatisfactory. In next assays only one concentration of both pathogens was used. In simultaneously assay occurrence of infected larvae was determined 7 and 14 days after application of pathogens. Occurrence of infected larvae achieve from 38 % to 84 % in depending on fungal and nematode species and time after application. In sequentially assay occurrence of infected larvae was determined 7 and 14 days after application of fungi, respectively 5 and 12 days after application of nematodes. Occurrence of infected larvae achieve from 14 % to 84 % in depending on fungal and nematode species and time after application.

key words - synergism, entomopathogenic nematodes, entomopathogenic fungi, *Steinernema arenarium*, *Steinernema feltiae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii*

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
2.1 Entomopatogenní hlístice.....	12
2.1.1 Charakteristika čeledi <i>Steinernematidae</i>	12
2.1.2 Vývojový cyklus entomopatogenních hlístic rodu <i>Steinernema</i>	13
2.1.3 Symbiotické bakterie asociované s entomopatogenními hlísticemi	15
2.1.4 Charakteristika druhu <i>Steinernema arenarium</i>	16
2.1.5 Charakteristika druhu <i>Steinernema feltiae</i>	17
2.1.6 Využití entomopatogenních hlístic v biologické ochraně	19
2.2 Entomopatogenní houby.....	20
2.2.1 <i>Beauveria bassiana</i>	21
2.2.2 <i>Isaria fumosorosea</i>	23
2.2.3 <i>Lecanicillium lecanii</i>	24
2.2.4 Využití entomopatogenních hub v biologické ochraně	26
2.3 Využití entomopatogenních hub a hlístic v biologické ochraně	27
2.4 Vliv pesticidů na entomopatogenní houby a entomopatogenní hlístice.....	28
3 MATERIÁL A METODY	30
3.1 Kultivace entomopatogenních organismů	30
3.2 Příprava suspenzí entomopatogenních hub a hlístic.....	31
3.3 Metoda in vitro pro sledování vlivu suspenze vybraných druhů entomopatogenních hub na mortalitu entomopatogenních hlístic rodu <i>Steinernema</i>	32
3.4 Metoda pro sledování mortality larev zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i>	33
3.5 Metoda pro sledování mortality larev zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i> entomopatogenními houbami rodu <i>Beauveria</i> , <i>Isaria</i> a <i>Lecanicillium</i>	34
3.6 Metoda pro sledování mortality larev zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> v kombinaci s entomopatogenními houbami rodu <i>Beauveria</i> , <i>Isaria</i> a <i>Lecanicillium</i>	35

4 VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI.....	38
4.1 Hodnocení výsledků metody in vitro pro sledování vlivu suspenze vybraných druhů entomopatogenních hub na mortalitu entomopatogenních hlístic rodu <i>Steinernema</i>	38
4.2 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality larev zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i>	47
4.3 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality larev zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i> entomopatogenními houbami rodu <i>Beauveria</i> , <i>Isaria</i> a <i>Lecanicillium</i>	50
4.4 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality larev zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> v kombinaci s entomopatogenními houbami rodu <i>Beauveria</i> a <i>Isaria</i>	55
5 DISKUSE.....	67
6 ZÁVĚR	70
7 LITERATURA.....	71
8 PŘÍLOHY	81
8.1 Tabulky.....	82
8.2 Fotodokumentace	84

1 ÚVOD

Mezinárodní organizace pro biologickou kontrolu (IOBC) stanovila v roce 1973 definici integrované ochrany rostlin (IOR). IOR je systém regulace škodlivých činitelů, který využívá všechny ekonomicky, ekologicky i toxikologicky přijatelné metody pro udržení škodlivých organismů pod prahem hospodářské škodlivosti s přednostním záměrným využitím přirozených omezujících faktorů (Lánský et al. 2005).

Populace škůdců lze regulovat mechanickými, agrotechnickými, chemickými, biologickými, bioracionálními a genetickými metodami. Všechny uvedené metody jsou v různé míře součástí integrované ochrany rostlin. Mechanické a agrotechnické metody jsou u nás jedním ze základních pilířů v ochraně rostlin. Tyto metody jsou většinou přirozenou součástí technologií v prvovýrobě. Druhým pilířem ochrany rostlin je využívání pesticidů. V roce 2007 se v České republice podle údajů Státní rostlinolékařské správy spotřebovalo celkem 11 585 336 kg, l pesticidů, z toho 6 417 713 kg, l (55,40 %) herbicidů a desikantů, 2 150 736 kg, l (18,56 %) fungicidů, 861 484 kg, l (7,44 %) regulátorů růstu, 539 979 kg, l (4,66 %) zoocidů, 448 992 kg, l (3,88 %) insekticidů, 366 260 kg, l (3,16 %) fungicidních mořidel, 343 690 kg, l (2,97 %) pasivních pomocných prostředků, 266 962 kg, l (2,30 %) rodenticidů a 189 520 kg, l (1,64 %) ostatních prostředků na ochranu rostlin (zdroj 1).

Biologické, bioracionální a genetické metody jsou možnými alternativami chemickým prostředkům. Používání biologické kontroly by mělo být základní taktikou k potlačení populací škůdců v rámci integrované ochrany programů. Biologickou ochranu lze chápat jako používání přirozených nepřátel proti populacím škůdců, která vede ke snížení jejich hustoty a snížení škod na úroveň pod ekonomickým prahem škodlivosti. Jako přirozené nepřátele lze využívat predátory, parazitoidy, entomopatogenní hlístice, entomopatogenní houby, bakterie a viry. Jako bioracionální metody lze uvést použití semiochemikálií, analogů hmyzích hormonů a inhibitory syntézy chitinu. Genetické metody jsou v současné době velmi diskutovaným tématem. Asijské a americké státy jdou cestou využívání GMO v ochraně rostlin. Zdá se ovšem, že konzervativní Evropa touto cestou jít nechce. Proto lze očekávat, že biologická ochrana bude v Evropě hrát důležitou roli v ochraně proti zemědělsky významným škůdcům. Důvodem může být zvětšující se

tlak veřejnosti požadující zdravější potraviny na prvovýrobce. Je totiž požadováno, aby postupně snižovali množství pesticidů i jiných agrochemikálií aplikovaných do porostů plodin určených pro přímý konzum a potravinářský průmysl.

Entomopatogenní hlístice i entomopatogenní houby jsou běžně se vyskytujícími půdními organismy, které mohou účinně snižovat početnost populací škůdců. Kromě podpory přirozeného výskytu je možná i aplikace těchto organismů v podobě evidovaných prostředků na ochranu rostlin. Obě bioagens lze aplikovat samostatně, ale v posledních letech se výzkum zaměřuje i na společnou aplikaci obou entomopatogenních organismů.

Cílem této diplomové práce je studium možného synergistického efektu zvolených druhů obou entomopatogenů, kdy je teoreticky možné předpokládat navýšení jejich účinnosti při společné introdukci do prostředí. Součástí diplomové práce je vytvoření jednotné laboratorní metodiky, kterou by bylo možné standardně využívat při studiu tohoto interakčního systému.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Entomopatogenní hlístice

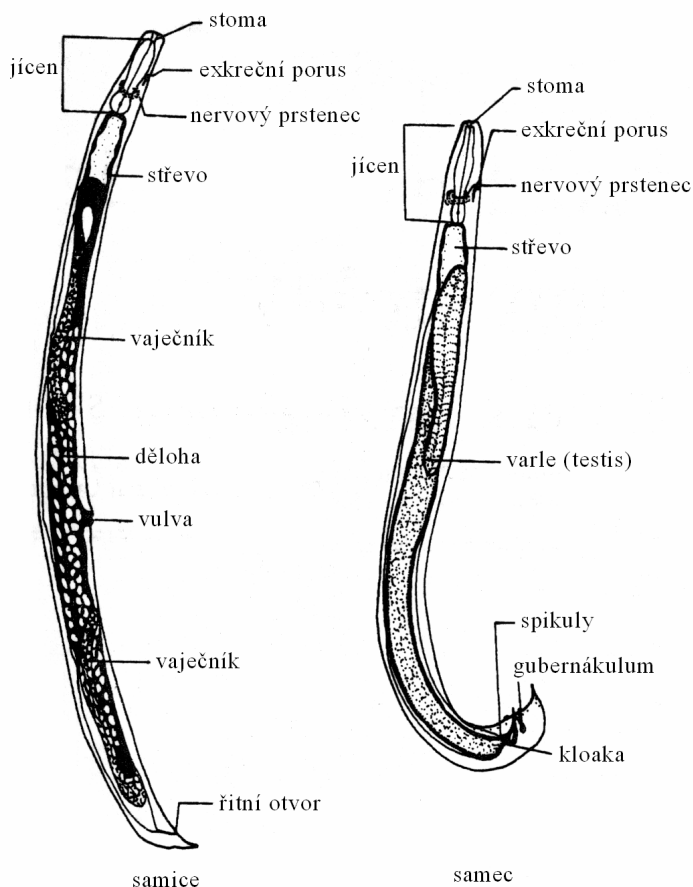
Hlístice (*Nematoda*) jsou nečlánkované organismy, základní tvar těla je protáhlý, válcovitý. Většina hlístic je si tvarově velmi podobná. Výjimku tvoří jen někteří značně specializovaní paraziti. Délka těla hlístic nalezených v těle hmyzu je značně kolísavá, např. u čeledi *Steinenematidae* kolísá u dospělců od 1 do 10 mm. Hlístice jsou bilaterálně souměrné, ale vykazují prvky primitivní radiální souměrnosti ve stavbě hlavy a ve tvaru jícnu. Hexaradiální uspořádání smyslových pysků a papil kolem ústního otvoru je považováno za nejprimitivnější znak. Povrch těla je bez segmentace a přívěsků (Mráček et al. 1988). Entomopatogenní hlístice čeledí *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae* jsou přirozeně se vyskytující obligátní parazité velkého množství druhů hmyzu (Poinar 1979). Obě čeledi patří do nadčeledi *Rhabditoidea*, podřádu *Rhabditina*, řádu *Rhabditida*, třídy *Secernentia* (*Secernentea* - Mráček et al. 1988) a kmene *Nematoda* (Poinar 1979). Jejich ústní otvor je umístěn terminálně a kolem něj jsou uspořádány hlavové papily ve 2 až 3 kruzích. Papily nese také ocasní část samců. Kopulační orgány samců jsou umístěny v koncové části těla. Třívrstevná kutikula, hypodermis a podélné svaly tvoří elastickou trubici, která uzavírá druhotnou tělní dutinu - pseudocoel. V ní jsou uloženy trubicovité, většinou párové a symetrické gonády. Zbytek pseudocoelu vyplňuje trávicí trubice. Tělo, ačkoliv je ohebné, vykazuje jen nepatrné změny v délce a udržuje si vysoký vnitřní hydrostatický tlak. Tento systém výborně umožňuje provádění vlnivých a plazivých pohybů, kterými hlístice proniká půdou a plave (Mráček et al. 1988).

2.1.1 Charakteristika čeledi *Steinernematidae* Chitwood a Chitwood 1937

Kutikula dospělců je hladká s jemným příčným kroužkováním. Kolem ústního otvoru je v kruhu 6 nezřetelných pysků. Každý nese 1 labiální papilu. Druhý, cefalický kruh je tvořen 4 papilami. Amfidy ústí laterálně mezi labiálním a cefalickým kruhem. Stoma je redukované. Jícen má cylindrický prokorpus, poněkud rozšířený metakorpus a kulovitý terminální bulbus. Bulbus má modifikovanou valvu. Vaječníky (ovaria) jsou párové, varle (testis) nepárové (obr. 1). Spikuly jsou párové (Mráček et al. 1988).

Čeleď *Steinernematidae* zahrnuje jediný rod *Steinernema* Travassos, 1927 (Mráček et al. 1988).

Vedle uvedených znaků v charakteristice čeledi platí ještě další pro rod - samci nemají burzu a ocasní část má 2 řady párových papil a 1 nepárovou papilu umístěnou těsně před vyústěním řitního otvoru. Spikuly jsou srpkovitého tvaru a gubernákulum má často hákovité zakončení (Mráček et al. 1988).



Obrázek 1 Schéma tělesné stavby hlístic (Kaya et al. 1997)

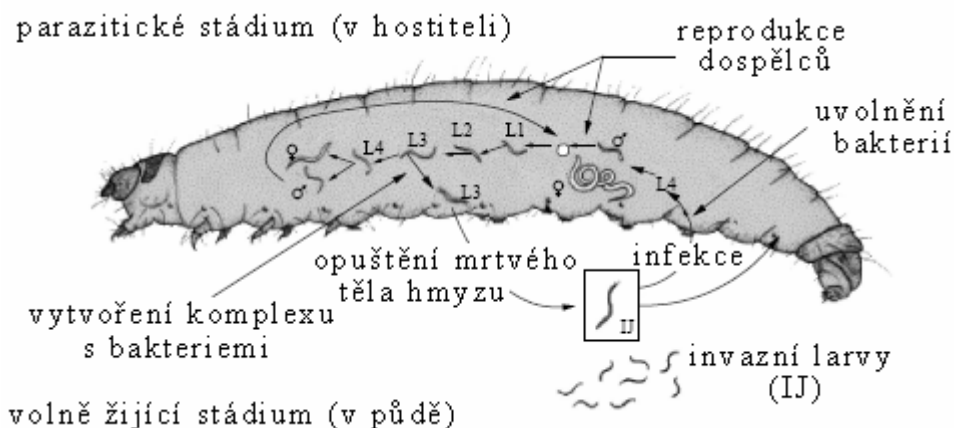
2.1.2 Vývojový cyklus entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*

Většina druhů entomopatogenních hlístic má podobnou biologii (Kaya et al. 1997). Entomopatogenní hlístice jsou svými vývojovými cykly přizpůsobeny k tomu, aby se udržely ve svém hostiteli nebo v určitém hostitelském okruhu. Schéma těchto cyklů nejsou rigidně závazná. Hlístice parazitující hmyz jsou schopné aktivně vyhledávat hostitele a pronikat do jeho tělní dutiny v larválním, pupálním i dospělém stádiu (Mráček et al. 1988).

Hlístice čeledi *Steinernematidae* jsou gonochoristé, a proto je potřeba k dokončení životního cyklu nejméně 2 hlístic (samec a samice) (Fan et al. 1991a, 1991b). Invazní larvy nepřijímají potravu. Symbiotické bakterie jsou uchovávány ve ventrální části střeva. Jakmile najdou vhodného hostitele, invazní larvy do něj vnikají přes přirozené otvory (ústa, řitní otvor, dýchací otvory) a pronikají do hemocoelu. Bakterie jsou vyvrhnuty do hemolymfy, kde se rozmnoží a do 48 hodin dochází k septikémii a smrti hostitele. Hlístice se živí bakteriemi a hostitelskou tkání (Kaya et al. 1997). Po proniknutí do hemolymfy hlístice začnou vylučovat látky bílkovinné povahy, které inhibují aktivitu imunitního systému hmyzu a rovněž ovlivňují jeho nervový systém. Kromě bakterií uvolňují hlístice látky s vysokou antibiotickou aktivitou, které chrání tělo hostitele před napadením dalšími organismy, a tím umožňují nerušený rozvoj hlístic (Glazer et al. 2000).

Z invazních larev se vyvíjí dospělci první generace, kteří jsou v závislosti na velikosti těla hostitele obvykle mnohem větší než dospělci následující generace. Dospělé hlístice lze nalézt 3 až 5 dní po proniknutí invazních larev do hostitele. Samci se mohou vyvíjet rychleji než samice, bezprostředně po dosažení dospělosti dochází k páření. Během páření obtočí samci tělo okolo samičky a po nalezení vulvy, vsunou spirakuly do krátké vaginy. Kopulace může pokračovat nanejvýš hodinu. Během této doby je sperma přeneseno do dělohy samice. Vajíčko se vyvíjí velmi rychle a oplozená vajíčka jsou 24 až 48 hodin po spáření ukládána v těle samice. Poté samice začne klást vajíčka do hemocoelu hostitele, později vajíčka zůstávají v těle samice (Poinar 1979).

Existují dva vývojové modely pro nově se vylíhlé larvy. Mohou pokračovat v parazitickém vývoji během něhož se 4× svlékají, nebo se mohou vyvinout v infekční larvální stádium (invazní larvy). Průběh vývoje závisí na množství dostupné potravy, která závisí na podmínkách prostředí, dále na množství hlístic uvnitř těla hostitele, asociované mikroflóře atd.. Dospělci druhé generace jsou menší než dospělci první generace. Dospělci druhé generace se páří a samice kladou menší počet vajíček. Protože hlístice v této době zaplňují celé tělo hostitele, většina nebo všechny larvy, které se vylíhnou z vajíček, se vyvíjejí v invazní larvy (Poinar 1979). Invazní larvy se poté uvolňují z mrtvých těl do okolního prostředí a vyhledávají nové hostitele (obr. 2) (Kaya et al. 1997).



Obrázek 2 Životní cyklus entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* v asociaci s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* (Emelianoff et al. 2008)

Infekční stádium hlístic závisí na skupině entomopatogenních hlístic. V některých případech je infekčním stádiem vajíčko (např. „thelastomatida“), larvy druhého instaru L2 (např. hlístice čeledi *Mermithidae*) nebo larvy třetího instaru L3, které jsou často označovány jako dauer nebo invazní larvy (např. hlístice čeledí *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae*) nebo oplozené samice (např. hlístice čeledí *Allantonematidae*, *Sphaerulariidae* a „phaenopsitylenchida“). V posledně jmenované skupině jsou dospělí samci neinfekční a umírají po kopulaci (Kaya et al. 1997).

Entomopatogenní hlístice potřebují k přežití vysokou relativní vlhkost půdy a tenkou vrstvu volné vody k pohybu. Při velmi nízké půdní vlhkosti mohou upadat do stavu dormance. Proto jsou vlhkostní podmínky jedním z nejdůležitějších faktorů půdního prostředí, který ovlivňuje přežití, virulenci a perzistenci hlístic (Grant et al. 2003). Při teplotách pohybujících se od 18 °C do 28 °C se životní cyklus uzavře během 6 až 18 dní v závislosti na hostitelském druhu a druhu hlístice (Glazer et al. 2000).

2.1.3 Symbiotické bakterie asociované s entomopatogenními hlísticemi

Bakterie rodu *Xenorhabdus* jsou gram-negativní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* symbioticky vázané na entomopatogenní hlístice čeledi *Steinernematidae* (Fischer-Le Saux et al. 1999). Tento komplex je v laboratorních podmínkách patogenní pro řadu hmyzích druhů, ale v polních podmínkách je okruh hostitelů omezený (Kaya et al. 1997). Životní cyklus bakterií rodu *Xenorhabdus*

začíná a končí osídlením střeva hladovějící a v půdě žijící invazní larvy (Cagnolo et al. 2004, Goodrich-Blair et al. 2007).

Tento symbiotický vztah je specifický a každý druh hlístic rodu *Steinernema* izolovaných v přírodě je kolonizován vlastním fylotypem bakterií. Hlístice rostoucí v laboratoři s bakteriemi jiného původu produkují invazní larvy nekolonizované bakteriemi (Saux et al. 1998, Sicard et al. 2004, Goodrich-Blair et al. 2007).

Bakterie rodu *Xenorhabdus* jsou patogenní pro široký okruh larev hmyzu a dávka < 5 kolonie tvořících buněk (CFU) přímo vstříknutá do oběhového systému je postačující k jejich usmrcení během 48 - 72 hodin. Tato virulence je pozoruhodná vzhledem k tomu, že hmyz má dobře rozvinutou vrozenou imunitní odpověď, díky níž může překonat infekci > 10⁶ CFU *Escherichia coli* (Goodrich-Blair et al. 2007).

2.1.4 Charakteristika druhu *Steinernema arenarium* (Artyukhovskiy 1967) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982

Pro tento druh jsou známa tři synonyma, a to *Steinernema anomalae* (Kozodoi 1984) Curran 1989, *Neoplectana arenaria* Artyukhovskiy 1967 a *Neoplectana anomali* Kozodoi 1984 (Nguyen et al. 1997).

Hlístice *Steinernema arenarium* byla objevena v larvách a kuklách chrousta *Melolontha hippocastani* v roce 1957 v Usmanském lese ve Voronežské oblasti (Воронежская область) (Rusko) (Poinar 1979). Byla označena jako *Neoplectana arenarium*. Následně byla v Rjazanské oblasti (Рязанская область) (Rusko) popsána hlístice *Steinernema anomali* (= *N. anomali*). Artyukhovskiy překvalifikoval *S. arenarium* a navrhl *S. anomali* jako mladší synonymum (Kakouli-Duarte et al. 1999).

Samci jsou 1,03 - 1,83 mm dlouzí (Poinar 1979). Tělo samců první generace je nažloutlé barvy. V přední části je ukončené kruhem s 6 labiálními a 4 nápadnými cefalickými papilami. Stoma je tvaru koule. Jícen je svalnatý, metakorpus a bazální bulba zvětšené. Kardie je 5 - 7 µm dlouhá. Exkreční porus je 2 µm široký (Nguyen a). Je v úrovni nervového prstence (Poinar 1979). Spikuly jsou červenohnědé barvy (Nguyen a). Jsou bez háčků a zářezů (Poinar 1979). Distální konec spikulí je obvykle zakončen zduřelou špičkou s malým otvorem na přední straně spikuly. Střední prekloakální papila je 4 - 5 µm vysoká s průměrem báze 8 - 9 µm. Na ventrální straně v blízkosti konce ocasu jsou umístěny dva páry papil, jeden pár je na dorzální straně.

Dva páry submediálních papil jsou umístěny v blízkosti kloaky, jeden dodatečný pár pak laterálně na stejné úrovni. Pět párů prekloakálních papil je umístěno ve dvou šikmých řadách, kdy přední pár je téměř laterální a poslední pár téměř ventrální (Nguyen a).

Samice jsou 2,17 - 4,00 mm dlouhé (Poinar 1979). Samice mají tělo s nažloutlým střevem a bezbarvými gonádami. Přední část těla je zakončena kruhem se 6 zašpičatělými labiálními papilami a kruhem se 4 cefalickými papilami. V přední části stoma je 1,5 μm tlustý sklerotizovaný kruh, zadní část je stejná jako u ostatních zástupců čeledi *Steinernema*. Jícen má nápadný metakorpus. Exkretční kanálek je v přední části široký 3 μm (Nguyen a). Exkretční pór je ventrálně od bazálního bulbu hltanu (Poinar 1979). V některých případech bylo pozorováno několik vajíček v děloze umístěné především v dorzální a laterální části těla, zadní gonáda má více smyček a prochází skrze všechny části těla. Děloha má dvě části - část blízko vulvy se stěnami ze zduřelých buněk s 2 - 3 jádry, část v blízkosti vaječnicků má tenčí stěny. U mladých samic jsou tyto části dělohy odděleny zúženinou. Přibližně $\frac{1}{4}$ populace má 2 - 3 μm dlouhý hrot, na jedné samičce byly pozorovány 2 takovéto hroty (Nguyen a).

Invazní larvy (L3) mají délku pohybující se od 1 143 do 1 300 μm . Největší průměr je 33 až 42 μm (Poinar 1979). Na laterální straně je 8 hřebenů (9 linií). Přední část těla je zakončena kruhem cefalických kapslí širokých 12 - 14 μm . Ocas je kónický s kulatým nebo nepravidelným okrajem mezi hypodermální a hyalinní částí (Nguyen a).

Životní cyklus druhu *S. arenarium* trvá 6 až 7 dní. V nově infikovaném hostiteli se vyskytuje přibližně 1,5 \times více samečků než samiček. Vajíčka jsou 32 - 48 \times 32 - 56 μm velká. Larvy se líhnou z vajíček v těle samičky a vyvíjející se mláďata nakonec vyplní celé tělo samičky. Produkce vajíček, která se pohybuje od 14 - 16 do 42 - 46 vajíček na samičku, závisí na množství potravy, kterou má samička k dispozici (Poinar 1979)

2.1.5 Charakteristika druhu *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982

Pro tento druh je známo pět synonym, a to *Neoplectana feltiae* Filipjev 1934, *Neoplectana bibionis* Bovien 1937, *Steinernema bibionis* (Bovien, 1937) Wouts,

Mracek, Gerdin & Bedding 1982, *Neoplectana leucaniae* Hoy 1954 a *Steinernema leucaniae* (Hoy, 1954) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982 (Nguyen et al. 1997).

Hlístice *Steinernema feltiae* byla poprvé nalezena a popsána v housence osenice polní *Agrotis segetum* ve východním Rusku (Poinar 1979).

Samice první generace jsou 9,0 - 18,0 mm dlouhé, samice druhé generace 0,8 - 3,5 mm (Poinar 1979). Samice mají hladkou kutikulu. Hlava nese kruh 6 papil (druhý kruh nebyl zřejmě pozorován) (Mráček et al. 1988). Každá papila má na špičce jednu labiální papilu. Druhý kruh je tvořen 4 cefalickými papilami. Amfidy jsou málo znatelné. Jícen je v poměru k tělu krátký (Nguyen b). Ocasní část je krátká, s malým mukronem. Stoma je redukované, přední část jícnu je cylindrická a terminální bulbus má chlopně. Exkreceční porus ústí pod nervovým prstencem. Uložení vnitřních orgánů odpovídá obvyklému schématu (Mráček et al. 1988).

Samci první generace jsou 1,6 - 2,8 mm dlouzí, samci druhé generace 0,68 - 1,4 mm (Poinar 1979). Kutikula samců je rovněž hladká. Přední část těla je stejná jako u samic. Spikuly lehce zakřivené. Špička spikul je prodloužená, poměr průměrné délky spikul a jejich šíře je větší než 1,5, obvykle 2× delší než širší. Gubernákulum se v přední části zužuje. Kónus je krátký, má tvar písmene Y a nedosahuje zadního konce korpusu (Nguyen b). Ocasní část samců je zkrácená a zakončená mukronem. Preanálních papil je 5 - 6 párů, jsou umístěny laterálně. Tři páry papil jsou adanální (2 laterální, 1 laterodorzální). Postanálních papil je 6 párů (1 laterální, 2 lateroventrální, 1 subventrální, 2 subdorzální). Spikuly jsou zakřivené a gubernákulum duté (Mráček et al. 1988).

Invazní larvy (L3) mají štíhlé tělo dlouhé 750 - 950 mm, stejnoměrně se zužující od báze jícnu k přednímu konci těla a od oblasti řitního otvoru ke konci ocasu. Kutikula je s nezřetelným příčným pruhováním, které je velmi jasně viditelné v raném vývoji, kdy je invazní larva ještě obklopená kutikulou předchozího vývojového stádia (L2), a v pozdním vývoji, kdy růst pokračuje v novém hostiteli. Jícen je dlouhý a úzký s třípaprscitým lumen, zabírající $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{4}$ šířky těla, zřetelně užší v úrovni nervového prstence. Lumen střeva je úzký nebo uzavřený. Exkreceční porus je zřetelný, umístěný na úrovni středu jícnu. Exkreceční kanálek dlouhý, obvykle zřetelný, ventrální exkreceční žlázy vytlačují bazální bulbu a přední konec střeva. Bezprostředně pod kardií je váček s bakteriemi obklopený stěnou střeva. Konečník je dlouhý a úzký (Wouts 1980).

Invazní larvy penetrují a zabíjejí hostitele během 48 hodin. Po 10 až 14 dnech opouští mrtvé tělo hostitele velký počet invazních larev. Všechna vajíčka se vyvíjejí do vývojového stupně L1. V čerstvém hostiteli s nízkou populační hustotou se nevyvíjí larvy L2 a L3, ale larvy L1 rychle přechází přímo v larvy L4. Když populační hustota vzroste, larvy L2 se vyvíjí a dávají vzniknout larvám L3 (Wouts 1980).

2.1.6 Využití entomopatogenních hlístic v biologické ochraně

Entomopatogenní hlístice jsou testovány proti mnoha významným zemědělským škůdcům, kteří alespoň část svého vývojového cyklu prodělávají v půdě. Mezi tyto druhy patří škůdci z řádů *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*, *Homoptera*.

Hlísticemi rodu *Steinernema*, se kterými se můžeme nejčasněji setkat v biologické ochraně, jsou *Steinernema feltiae* a *Steinernema carpocapsae*. V boji proti bázlivci kukuřičnému *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), který se brzy stane významným škůdcem kukuřice i v našich podmínkách, lze využít mimo zmiňovaných hlístic také hlístice rodu *Heterorhabditis*, a to *Heterorhabditis bacteriophora* a *H. megidis* (Journey et al. 2000). Proti larvám a kuklám *Luperomorpha suturalis* (Coleoptera: Chrysomelidae), které jsou jedním ze dvou nejvýznamnějších škůdců česneku v Číně, byly s úspěchem testovány hlístice *S. feltiae*, *S. carpocapsae* a *S. ceratophorum* (Yang et al. 2003). Hlístice *S. feltiae* a *S. carpocapsae* lze použít jako bioagens proti obaleči jablečnému *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Lacey et al. 2006) a zavíječi *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Siegel et al. 2004). Hlístici *S. feltiae* je rovněž možné využívat v biologické ochraně proti molici bavlníkové *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Head et al. 2004), vrtalce *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) (Head et al. 2000), proti larvám zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), larvám a dospělcům *Tribolium confusum* (Coleoptera: Terebrionidae) (Athanassiou et al. 2008) a proti třásněnce západní *Frankliniella occidentalis* a třásněnce *Thrips palmi* (Smith et al. 2005). Hlístici *S. carpocapsae* lze spolu s hlísticemi *H. marelatus* a *S. kraussei* využít v ochraně proti *Cydia latiferreana* (Lepidoptera: Tortricidae) a *Curculio occidentalis* (Coleoptera: Curculionidae) (Bruck et al. 2007). Z hlístic rodu *Heterorhabditis* lze uvést aplikaci druhů *H. megidis* a *H. downesi* proti lalokonosci rýhovanému

Otiorhynchus sulcatus (Coleoptera: Curculionidae), který je významným škůdcem širokého okruhu polních a okrasných rostlin (Lola-Luz et al. 2005).

2.2 Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou zkoumány pro svou účinnost v boji proti širokému spektru hmyzích škůdců (Ansari et al. 2005). Mnoho entomopatogenních hub je v přírodě relativně běžných. Často vyvolávají přirozené epizootie v populacích hmyzu, čímž se řadí mezi významné mikroorganismy regulující populace škodlivého hmyzu (Butt et al. 2000). Rozsáhlou a velmi významnou skupinou entomopatogenních hub představují druhy zahrnuté do oddělení *Deuteromycota*, třídy *Hyphomycetes*, řádu *Moniliales*. Z hlediska praktické biologické ochrany má tato skupina největší význam. K nejnámějším vláknitým houbám patří houby rodu *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* a *Isaria*. Houbové onemocnění zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie uchycené na těle hostitele (Bohatá 2005).

Patogen obvykle proniká do hostitele přes kutikulu. Některé druhy mohou hmyz infikovat i přes trávicí trakt. Spory se přichytí na kutikulu, vyklíčí a pronikají kutikulou působením tlaku a pomocí enzymatické degradace kutikuly (Butt et al. 2000). K přilepení konidií na kutikulu hmyzu dochází hydrofobními mechanismy (Bohatá 2005). Po proniknutí do těla hostitele patogen rychle kolonizuje hemocoel, kde vytváří jedno nebo vícebuněčná hyfová tělíška (blastospory) (Goettel et al. 1997). Smrt hostitele je obvykle způsobena kombinací několika dějů, např. vyčerpáním živin hostitele, invazí patogena do tkání hostitele a jejich destrukcí nebo činností toxinů patogena (Goettel et al. 1997, Butt et al. 2000). Smrtí hostitele dochází k ukončení parazitické fáze patogena a začíná fáze saprotrofní. Za vhodných podmínek dochází bezprostředně po usmrcení hostitele k prorůstání houby na povrch těla usmrčeného hostitele a na vzdušném myceliu se vytváří fruktifikační orgány charakteristické pro daný druh. Saprotrofní fáze patogena končí úplnou sporulací. K šíření patogena dochází pomocí konidií rozšiřovaných nejčastěji pasivně (voda, proudění vzduchu) nebo přímým kontaktem zdravých jedinců s jedinci infikovanými (Osborne et al. 1992).

Entomopatogenní houby jsou možnou alternativou k používání pesticidů. Nabízí řadu výhod jako je schopnost růstu na různých substrátech, vysoká virulence,

pronikání do těla hostitele přes kutikulu, široký okruh hostitelů, bezpečnost pro člověka, zvířata a životní prostředí (Kamp et al. 2002).

Velikost spor, rychlost klíčení a uchycení na kutikulu jsou považovány za spolehlivé určující znaky patogenity (Altre et al. 1999).

Velký vliv na patogenitu a virulenci spor mají abiotické podmínky prostředí. Vlhkost je jedním z nejdůležitějších abiotických faktorů. Vysoká vlhkost prostředí je důležitá pro klíčení spor. Rychlost rozvoje mycelia, a tím i rychlost vývoje infekce, závisí rovněž na teplotě. Optimum se pohybuje od 20 °C do 30 °C. Mezní limity jsou 5 °C a 35 °C (Ferron 1978).

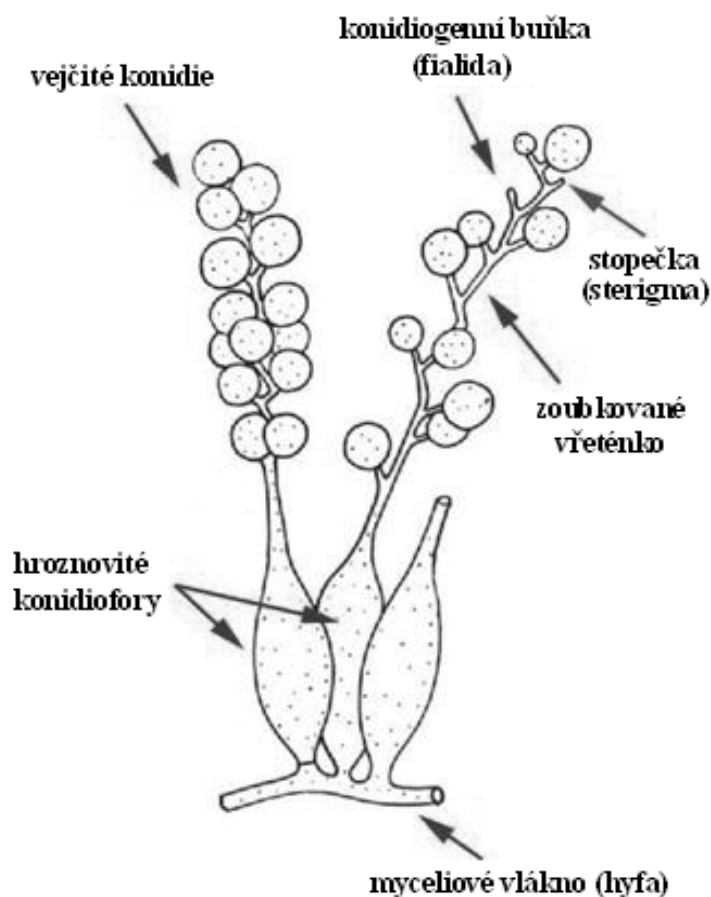
2.2.1 *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. je nepohlavní (anamorfní) formou. Je známé synonymum *Botrytis bassiana* Bals.-Criv. 1836 (Farr et al.). Pohlavní (teleomorfní) formou je *Cordyceps bassiana* Z. Z. Li, C. R. Li, B. Huang & M. Z. Fan 2001 (Sung et al. 2007).

Beauveria bassiana je jednou z nejvíce zkoumaných a nejúčinnějších entomopatogenních hub. Jde o široce polyfágní a běžně se v půdě vyskytující druh, který parazituje na půdním hmyzu (Vänninen et al. 2000). Vykazuje patogenitu u více než 200 různých druhů hmyzu (Thompson et al. 2007).

B. bassiana parazituje na mnoha zástupcích škůdců z řádů *Orthoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*, *Heteroptera*, *Homoptera* a *Hymenoptera* (např. Vänninen et al. 1999, Noma et al. 2000, Führer et al. 2001, Mulock et al. 2001, Hicks et al. 2001, Liu et al. 2002, Tafera et al. 2003, Lohmeyer et al. 2006, Batta 2007, Thompson et al. 2007). Parazituje také na roztočích (Wekesa et al. 2006). Konidie *B. bassiana* mohou pronikat do hostitele buď přes kutikulu, trávicí trakt nebo přes jeho dýchací systém (Trudel et al. 2007).

B. bassiana vytváří na povrchu infikovaného hostitele husté mycelium mléčně bílé barvy. Na hroznovitých konidioforech se v hustých svazcích (přeslenech nebo samostatně) formují dlouhé, bezbarvé konidiogenní buňky s kulovitou nebo baňkovitou bází a vroubkovitým (zubovitým) apikálním prodloužením, na kterých se tvoří jednotlivé konidie. Každá jednobuněčná kulovitá nepřehrádkovaná konidie se tvoří na samostatném zubu (obr. 3) (Humber, 1997).



Obrázek 3 - *Beauveria bassiana* - schéma konidioforů, konidiogenních buněk a konidií (zdroj 2)

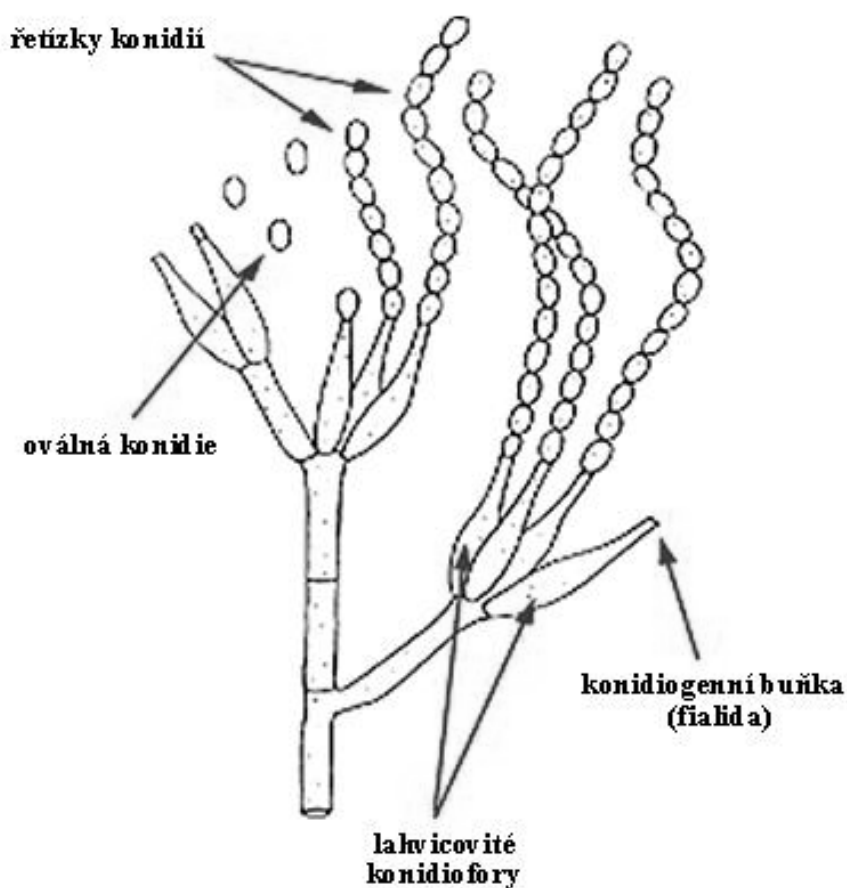
V polních podmínkách vykazuje vodní konidiová suspenze *B. bassiana* během krátké doby po aplikaci rychlý pokles aktivity konidií a ztrátu insekticidní aktivity (Behle 2006).

Účinnost houby *B. bassiana* v biologické ochraně je často ovlivňována podmínkami okolního prostředí. V laboratorních podmínkách je výsledkem aplikace vysoká mortalita cílového organismu. V polních podmínkách často způsobuje aplikace *B. bassiana* nízkou mortalitu, a tím nedostatečnou ochranu. Omezená účinnost v polních podmínkách bývá přisuzována neoptimálním teplotám, vystavení UV záření, nedostatečné dávce patogena a chování hmyzu, termoregulace (Noma et al. 2000).

2.2.2 *Isaria fumosorosea* (Wize)

Isaria fumosorosea (dříve *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith) je široce polyfágní, kosmopolitně rozšířený druh vláknité entomopatogenní houby. Přírozně způsobuje nákazy na zástupcích z řádů *Othoptera*, *Thysanoptera*, *Coleoptera*, *Homoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*. Byla zjištěna na více než 40 druzích hmyzu. Je schopná infikovat hostitele ve všech jeho vývojových stádiích (Osborne et al. 1992). V půdě přežívá jako saprofyt a dekompozitor organického materiálu (Kavková et al. 2005).

Na přirozeném hostiteli vytváří *Isaria fumosorosea* zprvu bílé vatovité mycelium, které později mění barvu do odstínu narůžovělé, nafialovělé až šedofialové barvy. Změna barvy kolonií přímo koresponduje se stupněm sporulace kultury. Starší, plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter se mění v prašný s povrchem zcela pokrytým obrovským množstvím konidií (Landa et al. 1994).



Obrázek 4 - *Isaria fumosorosea* - schéma konidioforů, konidiogenních buněk a konidií (zdroj 3)

V koloniích *I. fumosorosea* se na vzdušném myceliu nejprve vytvářejí konidiofory, které jsou na hyfách uspořádány přeslenovitě. Na konci každého konidioforu se následně formuje 3-6 konidiogenních buněk (fialid), které mají lahvovitý tvar, zduřelou bázi a zřetelný krček. Na nich se vytvářejí oválné konidie. Konidie se postupně oddělují, nejmladší je vždy v kontaktu s konidiogenní buňkou a odtlačuje starší konidie dál do tvořícího se řetízku. V jednom řetízku přichyceném na konidiogenní buňce může být přítomno i více než 50 konidií (obr. 4) (Osborne et al. 1992).

2.2.3 *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams 2001

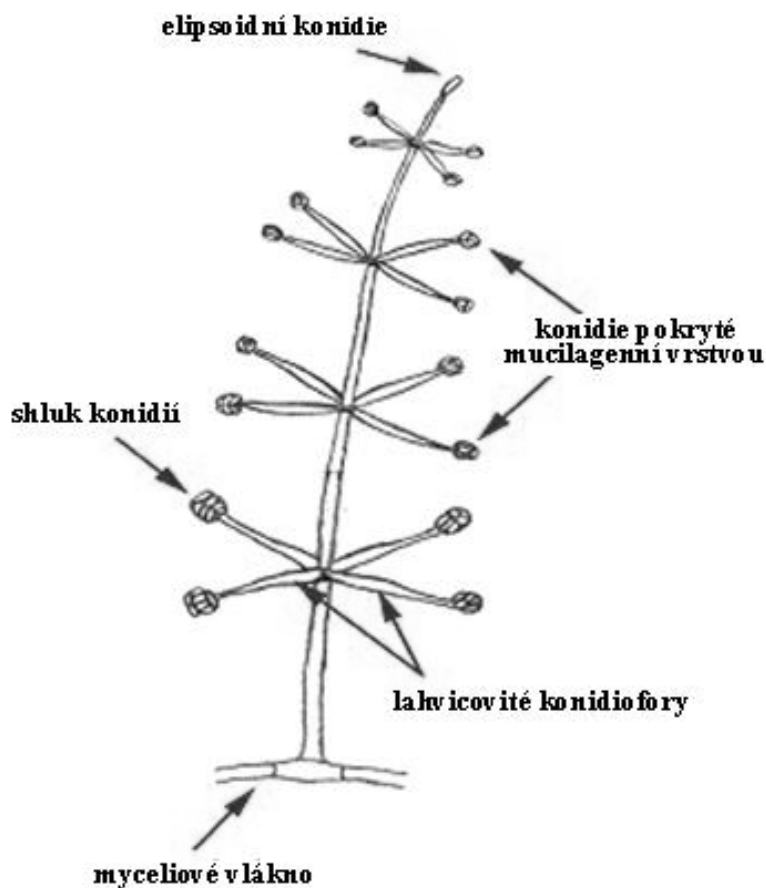
Lecanicillium lecanii (Zimm.) Zare & W. Gams je nepohlavní (anamorfní) stadium. Pro toto stádium jsou známa dvě synonyma, a to *Cephalosporium lecanii* Zimm. 1898 a *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas 1939 (Farr et al.). Pohlavním (teleomorfním) stádiem je *Cordyceps confragosa* (Mains) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Sung et al. 2007) se synonymem *Torrubiella confragosa* Mains 1949 (Farr et al.).

Lecanicillium lecanii je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, který byl poprvé popsán po izolaci z červce *Coccus viridis* (Hemiptera: Coccidae) (Bohatá 2005). *Lecanicillium lecanii* přitahuje pozornost od začátku 70. let 20. století jako bioagens proti hmyzu, roztočům, háďatům, ale i fytopatogenním houbám, např. ržím a plísním u skleníkových kultur (Meyer et al. 1996, Askary et al. 1997, Fournier et al. 2000).

Lecanicillium lecanii způsobuje spontánní epizootie nejčastěji v populacích hmyzu řádu *Homoptera*, zvláště pak v populacích různých druhů molic, mšic a červců (Bohatá 2005). Méně často se tento patogen vyskytuje v populacích hmyzu patřících do jiných řádů hmyzu, ale jsou známy hostitelé z řádů *Orthoptera*, *Heteroptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* a *Thysanoptera* (Osborne et al. 1992).

Determinačním znakem *Lecanicillium lecanii* je typická forma sporulace. V průběhu konidiogeneze se na vzdušném myceliu vytvářejí dlouhé úzké lahvovité konidiofory. Na jejich koncích se postupně tvoří elipsoidní konidie. Konidiofory jsou na myceliu umístěny v přeslenech a z jedné zóny vyrůstají 2, 3 až 4 protilehlé konidiofory. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidiofory

jsou vytvářeny postupně a vždy nová mladší konidie odtlačuje dříve vytvořenou konidii do postupně se tvořícího shluku, který má podobu kuličky. V závěrečné fázi sporulace se kuličky pokrývají mucilagenní hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (obr. 5) (Bohatá 2005).



Obrázek 5 *Lecanicillium lecanii* - schéma konidioforů, konidiogenních buněk a konidií (zdroj 4)

Infekce hmyzu se objeví obvykle v průběhu 7 dnů (Cloyd 1999). Během kolonizace hostitelových tkání *L. lecanii* produkuje sekundární metabolity s insekticidními účinky, které se spolu s vyčerpáním živin mohou podílet na smrti hostitele. V posledních letech jsou v laboratorních a polních pokusech sledovány účinky toxických látek získaných z *L. lecanii* proti molicím a mšicím (Wang et al. 2005).

Významným faktorem určujícím epizootický potenciál *L. lecanii* je vysoká vlhkost okolního prostředí, kterou potřebují konidie ke klíčení (Fournier et al. 2000, Lacey et al. 1996). *L. lecanii* roste nejlépe při teplotě 15 - 25 °C a relativní vlhkosti

85 - 90 %. Vysoká vlhkost je potřebná po dobu nejméně 10 až 12 hodin (Cloyd 1999).

Aktivita *L. lecanii* závisí na kmeni houby. Např. kmeny s malými spory infikují mšice, zatímco kmeny s velkými spory infikují molice. Virulence závisí na hustotě spor a stupni sporulace, která je závislá na podmínkách okolí (Cloyd 1999).

2.2.4 Využití entomopatogenních hub v biologické ochraně

Entomopatogenní houby jsou jedním z nejvyužívanějších agens v biologické ochraně. Spolu s popsány druhy je velmi rozšířené používání *Metarhizium anisopliae*. V laboratorních pokusech jsou testovány i houby jiných rodů (např. *Hirsutella*) nebo jiné druhy rodů *Beauveria* (např. *Beauveria brongniartii*) a *Isaria* (dříve *Paecilomyces*) (např. *Isaria farinosa*, *Paecilomyces carneus*, *Paecilomyces marquandii*, *Paecilomyces lilacinus*).

Houbu *Beauveria bassiana* lze využívat v biologické ochraně proti velkému počtu zemědělsky významných škůdců. Z řádu *Coleoptera* ji lze aplikovat proti bázlivci kukuřičnému *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Mulock et al. 2001, Bruck et al. 2002, Pilz et al. 2007), bělokazu *Scolytus amygdali* (Coleoptera: Scolytidae) (Batta 2007), lýkožroutu smrkovému *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) (Kreutz et al. 2004) nebo smoláku *Pissodes strobi* (Coleoptera: Curculionidae) (Trudel et al. 2007). Lze ji použít i proti sosnokazu borovému *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hicks et al. 2001) a *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) (Tafera et al. 2003). Z rodu *Diptera* byly prováděny studie vlivu *B. bassiana* na květilku *Dalia radicus* a květilku ředkivou *Dalia floralis* (Diptera: Anthomyiidae) (Vänninen et al. 1999), dále *Hematobia irritans* (Diptera: Muscidae) (Lohmeyer et al. 2006) a komára *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Luz et al. 2007). Mezi zástupci rodu *Hemiptera*, proti kterým lze aplikovat *B. bassiana*, patří ploštice *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) (Liu et al. 2002, Liu et al. 2003, Sabbahi et al. 2008) a *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) (Noma et al. 2000). Lze ji aplikovat i proti krtonožkám rodu *Scapteriscus* spp. (Orthoptera: Grylotalpidae) (Thompson et al. 2007), proti pilatce smrkové *Pristiphora abietina* (Hymenoptera: Tenthredinidae) (Führer et al. 2001), molici skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) (Poprawski et al.

2000). *B. bassiana* lze také využít v boji proti svilušce *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) (Wekesa et al. 2006).

Houba *Isaria fumosorosea* je nejčastěji testována proti druhům řádu *Diptera*, a to *Hematobia irritans* (Diptera: Muscidae) (Lohmeyer et al. 2006), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Luz et al. 2007) a květilkám *Delia radicus* a *Delia floralis* (Diptera: Anthomyiidae) (Vänninen et al. 1999). Z ostatních řádů hmyzu ji lze použít proti termitům druhu *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) (Meikle et al. 2005), svilušce *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) (Poprawski et al. 2000). *I. fumosorosea* se může projevovat jako mykoparazit infikující konidie padlí okurkového *Sphaerotheca fuliginea* (Kavková et al. 2005).

V laboratorních i polních podmínkách je houba *Lecanicillium lecanii* testována proti škůdcům z řádu *Homoptera*. Konkrétně proti kyjatci zahradnímu *Macrosiphum euphorbiae*, mšici broskvoňové *Myzus persicae*, mšici meruzalkové *Nasonovia ribisnigri* (Fournier et al. 2000) a molici bavlníkové *Bemisia tabaci* (Wang et al. 2004). *Lecanicillium lecanii* je možné využít proti třásněnce západní *Frankliniella occidentalis* a třásněnce *Thrips palmi* (Smith et al. 2005). Kromě parazitace hmyzích škůdců se může *Lecanicillium lecanii* vyskytovat na konidíích padlí okurkového *Sphaerotheca fuliginea* (Verhaar et al. 1996) a rzi chryzantémové *Puccinia horiana* (Feng et al. 2002).

2.3 Využití entomopatogenních hub a hlístic v biologické ochraně

V poslední době se mnoho výzkumů zaměřuje na využití společného působení obou skupin patogenů. Působení může mít synergistický, aditivní nebo antagonistický efekt. Nelze obecně stanovit jednotlivé kombinace obou agens, které by měly synergistický, aditivní nebo antagonistický efekt. Ve většině případů výsledný efekt závisí na koncentracích jednotlivých bioagens.

Houba *Metarhizium anisopliae* byla v laboratorních a skleníkových podmínkách testována proti chroustkovi *Hoplia philantus* (Coleoptera: Scarabaeidae) spolu s hlísticemi *Heterorhabditis megidis* a *Steinernema glaseri*. Hlístice byly aplikovány společně se suspenzí houby nebo s 2, 3 a 4 týdenním zpožděním. Byl pozorován aditivní a synergistický efekt působení (Ansari et al. 2004). Výsledků z kombinace *H. bacteriophora* a *M. anisopliae*, získaných v těchto experimentech, bylo následně využito v polních podmínkách. K porovnání byl použit insekticid s účinnou látkou

chlorpyrifos. Použití společné aplikace entomopatogenních organismů mělo stejný výsledek jako použití chemické ochrany (Ansari et al. 2006).

Společného působení hlístic *Steinernema carpocapsae*, *S. glaseri* a *Heterorhabditis bacteriophora* a *Beauveria brongniartii* bylo použito proti *Ectinohoplia rufipes* a *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Ke srovnání byl použit fenitrothion. Všechny bioagens měly vyšší mortalitu než chemická ochrana. Jako jediná kombinace byla použita kombinace *Steinernema carpocapsae* a suspenze *B. brongniartii* (Choo et al. 2002).

Proti *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) byly v kombinaci testovány houby *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Isaria fumosorosea* spolu s hlísticemi *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, *Steinernema riobrave*, *S. carpocapsae*, *S. glaseri* a *S. rarum* nebo bakterií *Serratia marcescens*. Ve většině kombinací byl zjištěn antagonistický efekt mezi jednotlivými organismy (Shapiro-Ilan et al. 2003, 2004).

V laboratorních podmínkách byl sledován antagonistický efekt symbiotické bakterie *Photorhabdus luminescens* na houby *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* a *Isaria fumosorosea*. Na rozdíl od *Xenorhabdus poinarii*, který na tyto houby neměl žádný vliv (Ansari et al. 2005).

Pro využívání entomopatogenních hub a hlístic jako agens v biologické ochraně je nutné zabývat se studiem vlivu těchto patogenů na necílové organismy. Houby *Beauveria bassiana* a *Isaria fumosorosea* jsou kompatibilní s predujícím slunéčkem *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae) (Wraight et al. 1998). Naopak toxiny houby *Lecanicillium lecanii* mají na tento druh negativní vliv (Wang et al. 2005).

2.4 Vliv pesticidů na entomopatogenní houby a entomopatogenní hlístice

Využívání entomopatogenních hub a hlístic v integrované ochraně rostlin může být velmi přínosné, ale je nutné věnovat pozornost vlivu pesticidů a jiných agrochemikálií (průmyslových hnojiv, regulátorů růstu) vůči nim. Jednotlivé studie lze rozdělit do dvou směrů zájmu. Zabývají se vlivem pesticidů, resp. účinných látek přímo na entomopatogenní organismy, nebo je jejich vliv studován při společné aplikaci proti konkrétnímu škůdci. Jsou testovány syntetické i přírodní účinné látky.

Obecně lze konstatovat, že nebyl pozorován negativní vliv účinných látek imidaclopridu, thiamethoxamu a acetamipridu na rozvoj a patogenitu hlístic *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis*, *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae* a *S. glaseri* ve společně připravené aplikační jíše (tank mix test) (Koppenhöfer et al. 2003).

Vliv carbosulfanu a carbofuranu na růst hub *Beauveria bassiana* a *B. brongniartii* byl druhově specifický a závisel též na účinné látce. Carbosulfan inhiboval růst obou druhů hub. Mortalita hmyzu ošetřeného hlísticemi *Heterorhabditis megidis*, *Steinernema feltiae* a *S. glaseri* inkubovanými s účinnými látkami nevykazovala statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a jednotlivými kombinacemi bez ohledu na druh hlístice nebo účinnou látku. Žádný z karbamátů nesnížil patogenitu hlístic a hub, ačkoliv došlo k potlačení růstu hub. Kombinace entomopatogenních organismů a nízkých dávek insekticidů může umožnit snížení chemické kontaminace životního prostředí a vzrůst efektivnosti entomopatogenních organismů v ochraně rostlin (Bednarek et al. 2004).

Společná aplikace houby *Beauveria bassiana* a rostlinných esenciálních olejů, minerálního oleje a organosilikonových nosičů proti larvám *Tribolium castaneum* měla za následek jejich vyšší mortalitu (Akbar et al. 2005). Kompatibilita a synergistický efekt byl pozorován mezi houbou *B. bassiana* a syntetickou účinnou látkou deltamethrin při spolupůsobení proti rezistentním kmenům *Boophilus microplus* (Bahiense et al. 2004). Naopak byl pozorován antagonistický efekt mezi houbou *B. bassiana* a účinnou látkou imidacloprid při použití proti molici *Bemisia argentifolii* (Homoptera, Aleyrodidae) (James et al. 2001). V in vitro podmínkách byl testován vliv načasování aplikace na neslučitelnost účinných látek metalaxylu, mancozebu, oxidu měďného a houby *B. bassiana* (Kouassi et al. 2003). Oxid měďný je u nás zakázán.

Houba *Isaria fumosorosea* byla testována v kombinaci s přírodní účinnou látkou azadirachtin proti molici *Bemisia argentifolii* (Homoptera, Aleyrodidae) (James 2003).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Kultivace entomopatogenních organismů

Kultivace entomopatogenních hlístic

Entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema*, používané v pokusech, byly získány ze sbírky Entomologického ústavu Akademie věd České republiky. Hlístice byly dlouhodobě uchovávány v plastických epruvetách v inertním nosiči (molitan) v lednici při teplotě 5 - 7 °C.

Pro získání dostatečného množství hlístic pro pokusy bylo využito následujícího postupu. Z epruvet se získalo dostatečné množství nestandardizované suspenze, která byla naředěna na požadované množství. Pod binokulárem byla zjištěna vitalita hlístic, tj. % živých hlístic z celkového množství. Pokud hodnota přesahovala 85 %, byla suspenze upravena na koncentraci o přibližné hodnotě 10 IJ na 1 larvu zavíječe voskového *Galleria mellonella* a byla použita pro infekci larev. Na povrch filtračního papíru uloženého na dno Petriho misky o průměru 9 cm byla aplikovány 3 ml upravené suspenze hlístic. Do takto připravené misky bylo umístěno 5 - 10 larev *Galleria mellonella*. Petriho misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 25±1 °C (fotoperioda 0/24) po dobu 3 - 5 dní. Pro zdárný průběh infekce bylo nutné kontrolovat vlhkost v Petriho miskách a v případě nadměrného vysychání byla vlhkost upravována přidáním několika kapek sterilní destilované vody. Po 3 - 5 dnech byly mrtvé housenky s příznaky infekce přendány na vodní pasti (Petriho miska obalená filtračním papírem, uložena ve větší Petriho misce), pravidelně vlhčeny destilovanou vodou a uloženy v termostatu při teplotě 25±1 °C (fotoperioda 0/24). Po 10 - 14 dnech od iniciace infekce se do okolí infikovaných larev uvolňovala infekční stádia hlístic, která se shromažďovala ve vodě na dně Petriho misky, odkud byla pravidelně slévána, filtrována a následně skladována po dobu 2 - 3 týdnů před použitím v pokusech.

*Kontinuální chov zavíječe voskového *Galleria mellonella**

Kontinuální chov zavíječe voskového *Galleria mellonella* probíhal za definovaných podmínek na umělém živném substrátu, tzv. Haydakově živné půdě

(22 % kukuřičného šrotu, 11 % pšeničného šrotu, 11 % hladké mouky, 11 % sušeného mléka či sušené syrovátky, 5,5 % sušeného droždí, 17,5 % včelího vosku, 11 % medu a 11 % glycerinu, uvedeno v hmotnostních procentech).

Kultivace entomopatogenních hub

Kmeny testovaných hub byly uloženy v mykologické sbírce na Oddělení ochrany rostlin Katedry rostlinné výroby Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity. Byly dlouhodobě uchovávány ve formě alginátových pelet.

Pro účely pokusů byl použit následující postup reaktivace a kultivace hub. Jednotlivé pelety byly z mrazícího zařízení přemístěny do standardní vlhké komůrky (sterilní plastická Petriho miska obsahující 2 % vodní agar) a vlhká komůrka s peletami byla umístěna do termostatu (25 °C, fotoperioda 0/24). Pelety exponované vysoké vlhkosti přijímaly vodu (bobtnaly), následně se na povrchu pelet objevily první symptomy reaktivace patogena (růst mycelia) a zpravidla v průběhu 5 - 7 dnů byl povrch aktivovaných pelet pokryt plně sporulujícím vzdušným myceliem. Z takto aktivovaných pelet byl patogen jednou pasáží převeden na plotny s agarizovaným živným médiem (PDA) a v následném saprofytickém vývojovém cyklu byla vyprodukována biomasa, která byla buď přímo použitelná pro potřeby pokusů nebo sloužila jako čistá matečná kultura.

3.2 Příprava suspenzí entomopatogenních hub a hlístic

Příprava suspenze hlístic

Suspenze hlístic byla získávána z nestandardizované suspenze uchovávané 2 - 3 týdny v Petriho miskách v ledničce při teplotě 5 - 7 °C. Po důkladném promíchání suspenze byl odebrán vzorek o objemu 10 µl a následně bylo spočítáno množství hlístic pomocí binokuláru. Minimální množství v počítaném vzorku bylo stanoveno na 50 živých invazních larev, odchylka mezi jednotlivými by měla být max. 15 %. Potřebná koncentrace pak byla vypočítána na základě průměrného počtu hlístic z 5 opakování v daném objemu suspenze.

Příprava konidiové suspenze

Konidiová suspenze byla získávána přelitím povrchu plně sporulující kultury, která byla kultivována na PDA po dobu 7 - 14 dní sterilním roztokem 0,05 % Tween 80. Po důkladné homogenizaci byla takto připravená suspenze dle potřeby naředěna a po opětovné homogenizaci byla nanášena do počítací komůrky - hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) a v předem stanoveném počítacím poli byl po sedimentaci konidií stanoven titr s tím, že v jednom počítaném poli bylo ± 50 jednotek a rozdíl mezi poli mohl být max. 15 %. Titr byl vypočítán na základě dvou opakování (horní a dolní počítací pole) a následně byla suspenze odpovídajícím ředěním upravena na potřebný titr.

3.3 Metoda in vitro pro sledování vlivu suspenze vybraných druhů entomopatogenních hub na mortalitu entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*

Cílem pokusu bylo zhodnocení mortality hlístic rodu *Steinernema* vystavených působení konidiové suspenze entomopatogenních hub. Získané výsledky mohou být využity pro vyhodnocení možnosti společné aplikace obou patogenů.

Materiál

- konidiové suspenze hub *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium lecanii*
- suspenze hlístic *Steinernema feltiae* a *S. arenarium*

Postup

- do každého vzorku bylo aplikováno 10 ml konidiové suspenze testované houby o definovaných koncentracích (viz *Příprava konidiové suspenze*) a suspenze testované hlístice o koncentraci 1 000 invazních larev (IJ) (viz *Příprava suspenze hlístic*), každá kombinace byla testována ve 2 sériích, přičemž každá série měla 5 opakování, vzorky byly uchovávány v termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24)
- ihned po aplikaci IJ byl proveden odečet, další odečty byly prováděny po 24, 48, 72 a 96 hodinách (k odečtu byla použita binolupa Stemi SV 11

s připojenou kamerou značky Sony - pro každý vzorek bylo nasnímáno 5 krátkých videozáznamů v předem daných místech. Z pořízených videozáznamů byl následně zjištěn celkový počet nasnímaných hlístic a z tohoto počtu počet mrtvých. Za mrtvé hlístice byly považovány hlístice, které během videozáznamu nevykazovaly žádný pohyb.)

- ze zjištěných údajů byla procentuálně stanovena mortalita, od zjištěných hodnot mortality byla odečtena počáteční mortalita (mortalita v čase 0) a pomocí Abbotova vzorce zjištěna mortalita hlístic způsobená testovanou houbou

3.4 Metoda pro sledování mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema*

Cílem pokusu bylo zhodnocení virulence entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti modelovému škůdci (larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*) v závislosti na koncentraci IJ.

Materiál

- synchronní populace larev třetího až čtvrtého larválního instaru zavíječe voskového *Galleria mellonella*
- suspenze hlístic *Steinernema feltiae* a *S. arenarium*
- půda připravená ze zahradního substrátu a písku v poměru 1 : 1, půda byla sterilizována při teplotě 121 °C po dobu 120 minut

Postup

- do Petriho misek o průměru 9 cm byla odměřena půda o objemu 40 ml, do každé misky bylo vloženo 5 larev zavíječe voskového *Galleria mellonella*, vzorky byly poté přemístěny do plastického sáčku (tím byly zajištěny optimální vlhkostní podmínky, a tím se zabránilo případnému vysušování půdního substrátu), každá hlístice byla testována ve 2 sériích, přičemž každá série měla 5 opakování, vzorky byly inkubovány v termostatu (teplota 22±1 °C, fotoperioda 0/24) po dobu 24 hodin před použitím suspenze hlístic

- po 24 hodinách byla aplikována na povrch substrátu suspenze hlístic (viz *Příprava suspenze hlístic*) o koncentraci 0, 10, 50, 100 a 200 IJ/misku, suspenze byla doplněna sterilní destilovanou vodou na objem 1 ml (tím byla zajištěna optimální vlhkost substrátu), vzorky byly opět vloženy do plastického sáčku a inkubovány v termostatu (teplota 22±1 °C, fotoperioda 0/24), přičemž byly každý druhý den překlopeny o 180°, čímž bylo dosaženo zvýšeného pohybu larev v půdě
- kontrolní dny byly stanoveny na 3., 5. a 7. den po aplikaci hlístic, infikované housenky byly při každé kontrole ze vzorků odebrány, povrchově sterilovány 1 % roztokem chlornanu sodného, opláchnuty sterilní destilovanou vodou a následně umístěny na vodní pasti (viz *Kultivace entomopatogenních hlístic*)

3.5 Metoda pro sledování mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* entomopatogenními houbami rodu *Beauveria*, *Isaria* a *Lecanicillium*

Cílem tohoto pokusu bylo zhodnocení virulence entomopatogenních hub rodu *Beauveria*, *Isaria* a *Lecanicillium* proti modelovému škůdci (larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*) v závislosti na koncentraci.

Materiál

- synchronní populace larev třetího až čtvrtého larválního instaru zavíječe voskového *Galleria mellonella*
- konidiové suspenze hub *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium lecanii*
- půda připravená ze zahradního substrátu a písku v poměru 1 : 1, půda byla sterilizována při teplotě 121 °C po dobu 120 minut

Postup

- v Petriho miskách o průměru 9 cm se nacházela půda o objemu 40 ml, do každé misky bylo umístěno 5 larev zavíječe voskového *Galleria mellonella*, vzorky byly vloženy do plastického sáčku (tím byly opět zajištěny optimální vlhkostní podmínky a zabránilo se tak případnému

vysušování půdního substrátu), každá houba byla testována ve 2 sériích, přičemž každá série měla 5 opakování, vzorky byly inkubovány v termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24) po dobu 24 hodin před aplikací suspenze testované houby

- po 24 hodinách byl na povrch substrátu použit 1 ml standardizované suspenze entomopatogenní houby v roztoku s Tweenem (viz *Příprava konidiové suspenze*) o definované koncentraci $1,0 \cdot 10^4$ /ml, $1,0 \cdot 10^5$ /ml, $1,0 \cdot 10^6$ /ml půdy (tj. o koncentraci $4,0 \cdot 10^5$ /ml, $4,0 \cdot 10^6$ /ml, $4,0 \cdot 10^7$ /ml suspenze), vzorky byly opět vloženy do plastického sáčku a inkubovány v termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24), přičemž byly každý druhý den překlopeny o 180°, čímž došlo ke zvýšenému pohybu larev v půdě
- kontrolní dny byly stanoveny na 7. a 14. den po aplikaci suspenze houby, 7. den byly všechny larvy z půdy vyjmuty a byl zaznamenán výskyt zdravých, infikovaných a mrtvých larev, následně byly larvy povrchově ošetřeny 1 % roztokem chlornanu sodného, opláchnuty ve sterilní destilované vodě a vloženy do vlhkých komůrek, které byly uloženy do termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24), po 14 dnech byly larvy překontrolovány a postup infekce zaznamenán

3.6 Metoda pro sledování mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* v kombinaci s entomopatogenními houbami rodu *Beauveria*, *Isaria* a *Lecanicillium*

Cílem pokusu bylo zhodnocení společného působení entomopatogenních hub rodu *Beauveria*, *Isaria* a *Lecanicillium* a entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti modelovému škůdci (larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*). Pokus byl prováděn ve dvou variantách:

- simultánně, tj. oba patogeny aplikovány najednou
- s časovým odstupem dvou dnů, kdy je nejdříve aplikován houbový komponent

Materiál

- synchronní populace larev třetího až čtvrtého larválního instaru zavíječe voskového *Galleria mellonella*
- konidiové suspenze hub *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium lecanii*
- suspenze hlístic *Steinernema feltiae* a *S. arenarium*
- půda připravená ze zahradního substrátu a písku v poměru 1 : 1, půda byla sterilizována při teplotě 121 °C po dobu 120 minut

Postup

- do Petriho misek o průměru 9 cm byla odměřena půda o objemu 40 ml, do každé misky bylo vloženo 5 larev zavíječe voskového *Galleria mellonella*, vzorky byly umístěny do plastického sáčku (opět tak byly zajištěny optimální vlhkostní podmínky), každá kombinace byla testována ve 2 sériích, přičemž každá série byla tvořena 5 vzorky, ty byly inkubovány v termostatu (teplota 22±1 °C, fotoperioda 0/24) po dobu 24 hodin před aplikací suspenze testované houby
- následný postup pro 1. variantu
 - po 24 hodinách byl na povrch substrátu aplikován 0,5 ml standardizované suspenze entomopatogenní houby v roztoku s Tweenem (viz *Příprava konidiové suspenze*) o definované koncentraci 1,0 · 10⁴/ml, 1,0 · 10⁵/ml, 1,0 · 10⁶/ml půdy (tj. o koncentraci 8,0 · 10⁵/ml, 8,0 · 10⁶/ml, 8,0 · 10⁷/ml suspenze), a suspenze hlístic (viz *Příprava suspenze hlístic*) o koncentraci 10 IJ pro testovaný druh hlístice, suspenze byla doplněna sterilní destilovanou vodou na objem 0,5 ml, vzorky byly vloženy do plastického sáčku a inkubovány v termostatu (teplota 22±1 °C, fotoperioda 0/24), přičemž byly každý druhý den překloupeny o 180°, čímž bylo dosaženo zvýšeného pohybu larev v půdě
 - kontrolní dny byly stanoveny na 7. a 14. den po aplikaci suspenzí patogenů, 7. den byly všechny larvy z půdy vyjmuty a byl zaznamenán výskyt zdravých, infikovaných a mrtvých larev, následně byly larvy povrchově ošetřeny 1 % roztokem chlornanu sodného, opláchnuty ve sterilní destilované vodě a vloženy do

vlhkých komůrek, které byly uloženy do termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24), po 14 dnech byly larvy překontrolovány a byla zaznamenána příčina smrti podle rozvíjejících se příznaků infekce, a to tak, že tvrdé tělo a mycelium ukazují na infekci entomopatogenní houbou, oproti tomu měkké tělo a hnědavé zbarvení, popř. IJ v okolí těla na infekci hlísticemi

▪ následný postup pro 2. variantu

- po 24 hodinách bylo na povrch substrátu použito 0,5 ml standardizované suspenze entomopatogenní houby v roztoku s Tweenem (viz *Příprava konidiové suspenze*) o definované koncentraci $1,0 \cdot 10^4$ /ml, $1,0 \cdot 10^5$ /ml, $1,0 \cdot 10^6$ /ml půdy (tj. o koncentraci $8,0 \cdot 10^5$ /ml, $8,0 \cdot 10^6$ /ml, $8,0 \cdot 10^7$ /ml suspenze), vzorky byly opět vloženy do plastického sáčku a inkubovány v termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24) po dobu 48 hodin
- 48 hodin po aplikaci testované houby byla aplikována na povrch substrátu suspenze hlístic (viz *Příprava suspenze hlístic*) o koncentraci 10 IJ pro testovaný druh hlístice, suspenze byla doplněna sterilní destilovanou vodou na objem 0,5 ml, vzorky byly opět vloženy do plastického sáčku a inkubovány v termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24), přičemž byly každý druhý den překloupeny o 180°, čímž bylo dosaženo zvýšeného pohybu larev v půdě
- kontrolní dny byly stanoveny na 7. a 14. den po aplikaci suspenze houby, respektive 5. a 12. den po aplikaci hlístic, 7. den byly všechny larvy z půdy vyjmuty a byl zaznamenán výskyt zdravých, infikovaných a mrtvých larev, následně byly larvy povrchově ošetřeny 1 % roztokem chlornanu sodného, opláchnuty ve sterilní destilované vodě a vloženy do vlhkých komůrek, které byly uloženy do termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24), po 14 dnech byly larvy překontrolovány a byla zaznamenána příčina smrti podle rozvíjejících se příznaků infekce, a to tak, že tvrdé tělo a mycelium ukazují na infekci entomopatogenní houbou, oproti tomu měkké tělo a hnědavé zbarvení, popř. IJ v okolí těla na infekci hlísticemi

4 VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Hodnoty získané v jednotlivých pokusech byly zpracovány v programu Statistica. Hladina významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,05$.

4.1 Hodnocení výsledků metody in vitro pro sledování vlivu suspenze vybraných druhů entomopatogenních hub na mortalitu entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*

Při pokusech byla zjišťována celková mortalita hlístic. Mortalita byla vyjádřena průměrnou mortalitou a směrodatnou chybou. Vzhledem k délce pokusu bylo nutné vzít v úvahu kromě možného vlivu testované houby i vliv času.

Tabulka 1 Hodnocení vlivu houby *Beauveria bassiana* na mortalitu hlístice *Steinernema arenarium*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita \pm SE)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
kontrola	6,50 \pm 0,96 a	9,37 \pm 1,07 ab	12,02 \pm 1,15 ab	13,50 \pm 1,13 b
1,0 · 10 ⁵ /ml	6,60 \pm 0,54 a	8,51 \pm 0,61 b	10,70 \pm 1,05 b	16,22 \pm 1,46 ab
1,0 · 10 ⁶ /ml	10,02 \pm 0,90 a	13,13 \pm 0,74 a	16,23 \pm 1,14 a	19,15 \pm 0,96 a
1,0 · 10 ⁷ /ml	7,15 \pm 1,30 a	11,89 \pm 1,56 ab	15,55 \pm 1,27 a	21,03 \pm 1,85 a

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

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že mortalita hlístic *S. arenarium* byla po 24 hodinách ($F=2,98$; $df=3;36$; $p=0,0442$) dosažená u koncentrace 1,0 · 10⁶/ml nižší než u koncentrace 1,0 · 10⁷/ml. Nižší koncentrace vykazovala po 48 hodinách ($F=4,13$; $df=3;36$; $p=0,0130$) i po 72 hodinách ($F=5,40$; $df=3;36$; $p=0,0036$) nejvyšší mortalitu. K podobné anomálii došlo mezi kontrolou a koncentrací 1,0 · 10⁵/ml po 48 a 72 hodinách, kdy u koncentrace 1,0 · 10⁵/ml byla zaznamenána nižší mortalita než u kontroly. Po 96 hodinách ($F=5,63$; $df=3;36$; $p=0,0029$) se mortalita pohybovala od 16,22 % do 21,03 % se stoupající koncentrací houbové složky.

Použitím Abbotova vzorce (Goettel et al. 1997)

$$P = \frac{(C - T)}{C} \cdot 100 \quad (1)$$

kde P je odhadovaná mortalita způsobená houbou [%], C je životaschopnost hlístic v kontrole [%] a T je životaschopnost hlístic v testu [%], zjistíme mortalitu hlístic *S. arenarium* způsobenou houbou *B. bassiana* v průběhu pokusu.

Tabulka 2 Mortalita hlístic *Steinernema arenarium* způsobená houbou *Beauveria bassiana*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita, %)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
$1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$	0,11	-	-	3,14
$1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$	3,76	4,15	4,79	6,53
$1,0 \cdot 10^7/\text{ml}$	0,70	2,78	4,01	8,71

Mortalita hlístic způsobená houbou byla po 24, 48 a 72 hodinách nejvyšší u koncentrace $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$. Vzhledem ke skutečnosti, že mortalita u koncentrace $1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$ byla po 48 a 72 hodinách menší než u kontroly, nelze v těchto případech stanovit mortalitu způsobenou pouze houbovým komponentem. Nejvyšší mortality bylo dosaženo po 96 hodinách u nejvyšší koncentrace a tato mortalita byla 8,71 %.

Tabulka 3 Hodnocení vlivu houby *Beauveria bassiana* na mortalitu hlístice *Steinernema feltiae*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita \pm SE)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
kontrola	5,74 \pm 0,89 a	10,53 \pm 0,68 b	14,33 \pm 1,07 b	18,97 \pm 1,45 b
$1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$	4,33 \pm 0,92 a	10,58 \pm 0,72 b	15,25 \pm 1,02 b	19,12 \pm 1,38 b
$1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$	4,59 \pm 0,81 a	12,24 \pm 1,10 ab	18,42 \pm 1,75 ab	23,10 \pm 1,70 ab
$1,0 \cdot 10^7/\text{ml}$	6,93 \pm 1,32 a	14,91 \pm 0,63 a	21,78 \pm 0,90 a	26,28 \pm 1,29 a

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

Z hodnot zjištěných v testu vyplývá, že nejnižší mortality hlístic *S. feltiae* bylo po 24 hodinách ($F=1,41$; $df=3;36$; $p=0,2566$) dosaženo u koncentrace $1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$, přičemž mortalita v kontrole byla vyšší než u koncentrací $1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$ a $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$. Po zbytek testu, tj. po 48 ($F=6,54$; $df=3;36$; $p=0,0012$), 72 ($F=7,57$; $df=3;36$; $p=0,0005$) i 96 ($F=5,76$; $df=3;36$; $p=0,0025$) hodinách, se mortalita zvyšuje se vzrůstající koncentrací konidiové suspenze. Mortalita hlístic se pohybovala od 10,58 % do 14,91 %, resp. od 15,25 % do 21,78 %, resp. od 19,12 % do 26,28 %.

Tabulka 4 Mortalita hlístic *Steinernema feltiae* způsobená houbou *Beauveria bassiana*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita, %)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
$1,0 \cdot 10^5$	-	0,06	1,07	0,19
$1,0 \cdot 10^6$	-	1,91	4,77	5,10
$1,0 \cdot 10^7$	1,26	4,90	8,70	9,02

Mortalita hlístic způsobená houbou byla po celou dobu pokusu nejvyšší u koncentrace $1,0 \cdot 10^7/\text{ml}$. Vzhledem ke skutečnosti, že mortalita u koncentrací $1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$ a $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$ byla po 24 hodinách menší než u kontroly, nebylo možné v těchto případech stanovit mortalitu způsobenou testovanou houbou. Nejvyšší mortality bylo dosaženo po 96 hodinách u nejvyšší koncentrace a tato mortalita byla 9,02 %.

Tabulka 5 Hodnocení vlivu houby *Isaria fumosorosea* na mortalitu hlístic *Steinernema arenarium*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita ± SE)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
kontrola	3,67±0,55 a	6,43±0,82 a	8,74±0,76 a	11,44±0,94 b
1,0 · 10 ⁵ /ml	4,42±0,81 a	6,47±0,79 a	10,01±1,13 a	12,66±0,86 b
1,0 · 10 ⁶ /ml	6,08±1,10 a	8,61±1,31 a	10,61±1,05 a	14,43±1,19 ab
1,0 · 10 ⁷ /ml	3,91±0,84 a	7,66±1,01 a	11,10±0,62 a	17,93±1,33 a

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

Z výsledků testu je zřejmé, že nejvyšší mortality hlístic *S. arenarium* bylo po 24 hodinách ($F=1,64$; $df=3;36$; $p=0,1972$) dosaženo u koncentrace $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$. Po 24, 48 ($F=1,10$; $df=3;36$; $p=0,3625$) ani po 72 hodinách ($F=1,24$; $df=3;36$; $p=0,3105$) nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi a kontrolou. Po 96 hodinách ($F=6,62$; $df=3;36$; $p=0,0011$) se mortalita hlístic pohybovala od 12,66 % do 17,93 % v závislosti na zvyšující se koncentraci.

Tabulka 6 Mortalita hlístic *Steinernema arenarium* způsobená houbou *Isaria fumosorosea*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita, %)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
1,0 · 10 ⁵ /ml	0,78	0,04	1,39	1,38
1,0 · 10 ⁶ /ml	2,50	2,33	2,05	3,38
1,0 · 10 ⁷ /ml	0,25	1,31	2,59	7,33

Mortalita hlístic způsobená houbou byla po 24 a 48 hodinách nejvyšší u koncentrace $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$. Po 24 hodinách byla nejnižší mortalita u koncentrace $1,0 \cdot 10^7/\text{ml}$. Po 72 a 96 hodinách se mortalita zvyšovala se vzrůstající koncentrací. Nejvyšší mortality bylo dosaženo po 96 hodinách u nejvyšší koncentrace a tato mortalita byla 7,33 %.

Tabulka 7 Hodnocení vlivu houby *Isaria fumosorosea* na mortalitu hlístic *Steinernema feltiae*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita ± SE)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
kontrola	4,83±1,12 a	8,22±1,70 a	13,73±2,25 b	19,47±2,57 b
1,0 · 10 ⁵ /ml	5,65±1,20 a	8,28±1,66 a	12,54±1,22 b	22,87±2,17 ab
1,0 · 10 ⁶ /ml	3,05±0,61 a	10,36±1,50 a	17,62±1,62 ab	25,22±1,59 ab
1,0 · 10 ⁷ /ml	5,69±1,19 a	12,04±1,63 a	22,72±2,36 a	30,89±2,26 a

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

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že nejnižší mortality hlístic *S. feltiae* bylo po 24 hodinách ($F=1,36$; $df=3;36$; $p=0,2716$) dosaženo u koncentrace $1,0 \cdot 10^6$ /ml. Po 48 hodinách ($F=1,28$; $df=3;36$; $p=0,2952$) mortalita stoupá se vzrůstající koncentrací suspenze *I. fumosorosea*. Po 72 hodinách ($F=5,71$; $df=3;36$; $p=0,0026$) došlo mezi kontrolou a koncentrací $1,0 \cdot 10^5$ /ml k anomálii, kdy u koncentrace $1,0 \cdot 10^5$ /ml byla zaznamenána nižší mortalita než v kontrole. Po 96 hodinách ($F=4,88$; $df=3;36$; $p=0,0060$) mortalita opět stoupá se vzrůstající koncentrací suspenze.

Tabulka 8 Mortalita hlístic *Steinernema feltiae* způsobená houbou *Isaria fumosorosea*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita, %)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
1,0 · 10 ⁵ /ml	0,86	0,07	-	4,22
1,0 · 10 ⁶ /ml	-	2,33	4,51	7,14
1,0 · 10 ⁷ /ml	0,90	4,16	10,42	14,18

Mortalita hlístic způsobená houbou byla ve všech sledovaných obdobích nejvyšší u koncentrace $1,0 \cdot 10^7$ /ml. Po 24 hodinách u koncentrace $1,0 \cdot 10^6$ /ml a po 72 hodinách u koncentrace $1,0 \cdot 10^5$ /ml nebylo, vzhledem k vyšší mortalitě v koncentraci, možné stanovit mortalitu hlístic způsobenou testovanou houbou. Po 96 hodinách se mortalita pohybovala od 4,22 % do 14,18 %.

Tabulka 9 Hodnocení vlivu houby *Lecanicillium lecanii* na mortalitu hlístic *Steinernema arenarium*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita ± SE)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
kontrola	7,79±1,76 a	10,44±1,62 a	13,53±1,75 a	18,48±1,51 a
1,0 · 10 ⁵ /ml	6,35±0,68 a	10,58±1,38 a	14,53±1,57 a	18,68±2,16 a
1,0 · 10 ⁶ /ml	8,19±1,15 a	11,64±1,32 a	14,20±1,04 a	18,94±1,20 a
1,0 · 10 ⁷ /ml	4,64±0,73 a	10,82±1,74 a	17,46±2,25 a	24,39±1,77 a

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

Z výsledků testu vyplývá, že nejvyšší mortality hlístic *S. arenarium* bylo po 24 hodinách ($F=1,91$; $df=3;36$; $p=0,1457$) dosaženo u koncentrace 1,0 · 10⁶/ml a nejnižší u koncentrace 1,0 · 10⁷/ml, kdy zároveň mortalita v kontrole je u koncentrace vyšší než u koncentrací 1,0 · 10⁵/ml a 1,0 · 10⁷/ml. K anomáliím došlo i po 48 hodinách ($F=0,12$; $df=3;36$; $p=0,9450$), kdy koncentrace 1,0 · 10⁶/ml vykazuje opět nejvyšší mortalitu. K další anomálii došlo rovněž po 72 hodinách ($F=1,03$; $df=3;36$; $p=0,3894$) mezi koncentracemi 1,0 · 10⁵/ml a 1,0 · 10⁶/ml, kdy u vyšší koncentrace byla zjištěna nižší mortalita než u koncentrace nižší. Po 96 hodinách ($F=2,83$; $df=3;36$; $p=0,0523$) mortalita hlístic stoupá se vzrůstající koncentrací konidiové suspenze. Přes výskyt anomálií, lze ovšem konstatovat, že v žádném sledovaném období nejsou statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a kontrolou.

Tabulka 10 Mortalita hlístic *Steinernema arenarium* způsobená houbou *Lecanicillium lecanii*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita, %)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
1,0 · 10 ⁵ /ml	-	0,16	1,16	0,25
1,0 · 10 ⁶ /ml	0,43	1,34	0,77	0,56
1,0 · 10 ⁷ /ml	-	0,42	4,54	7,25

Po 24 hodinách bylo možné stanovit mortalitu hlístic způsobenou houbou pouze u koncentrace $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$. Po 48 hodinách byla u této koncentrace zjištěna nejvyšší mortalita. Naopak po 72 hodinách byla u této koncentrace zjištěna nejnižší mortalita. Po 96 hodinách mortalita vzrůstala se vzrůstající koncentrací a pohybovala se od 0,25 % do 7,25 %.

Tabulka 11 Hodnocení vlivu houby *Lecanicillium lecanii* na mortalitu hlístic *Steinernema feltiae*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita \pm SE)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
kontrola	4,78 \pm 0,78 a	11,09 \pm 0,78 a	17,97 \pm 1,38 a	23,33 \pm 1,43 b
$1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$	5,00 \pm 0,95 a	12,84 \pm 1,19 a	18,86 \pm 0,99 a	24,56 \pm 0,93 b
$1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$	6,58 \pm 0,99 a	14,90 \pm 1,05 a	20,74 \pm 1,13 a	26,17 \pm 1,40 ab
$1,0 \cdot 10^7/\text{ml}$	7,70 \pm 0,86 a	14,84 \pm 1,27 a	20,57 \pm 1,50 a	30,05 \pm 1,76 a

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

Nejvyšší mortality hlístic *S. feltiae* bylo po 24 hodinách ($F=2,35$; $df=3;36$; $p=0,0885$) dosaženo u koncentrace $1,0 \cdot 10^7/\text{ml}$. K jisté anomálii došlo po 48 hodinách ($F=2,81$; $df=3;36$; $p=0,0533$), kdy koncentrace $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$ vykazuje nejvyšší mortalitu. Ke stejné anomálii došlo i po 72 hodinách ($F=1,13$; $df=3;36$; $p=0,3485$). Po 96 hodinách ($F=4,30$; $df=3;36$; $p=0,0108$) stoupá mortalita hlístic se stoupající koncentrací konidií hub a pohybuje se od 24,56 % do 30,05 %.

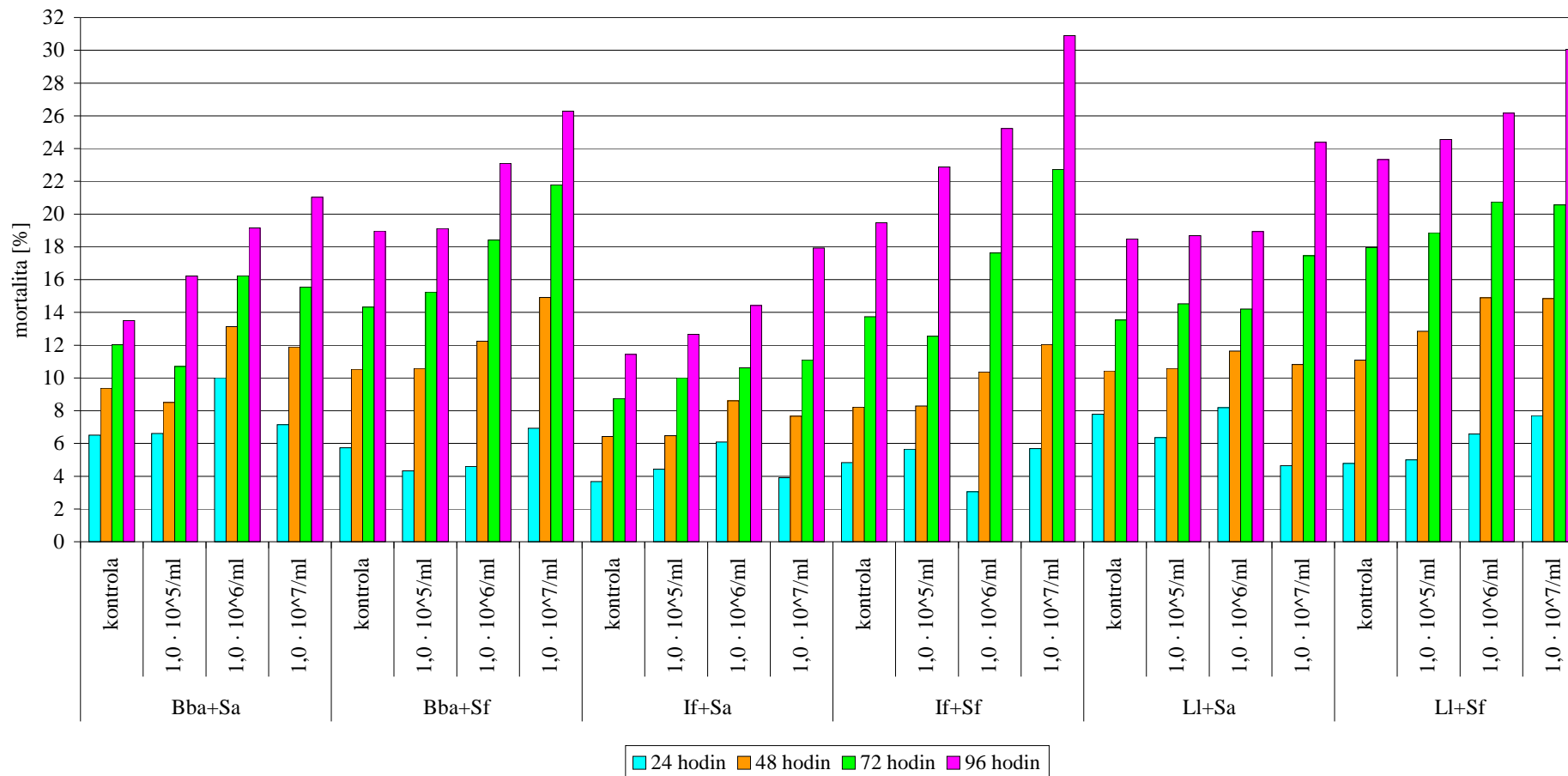
Tabulka 12 Mortalita hlístic *Steinernema feltiae* způsobená houbou *Lecanicillium lecanii*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita, %)			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
$1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$	0,23	1,97	1,08	1,60
$1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$	1,89	4,29	3,38	3,70
$1,0 \cdot 10^7/\text{ml}$	3,07	4,22	3,17	8,76

Mortalita hlístic způsobená houbou byla po 24 a 96 hodinách nejvyšší u koncentrace $1,0 \cdot 10^7$ /ml. Po 48 a 72 hodinách bylo nejvyšší mortality dosaženo u koncentrace $1,0 \cdot 10^6$ /ml. Nejnižší mortalita byla ve všech sledovaných obdobích zjištěna u nejnižší koncentrace. Po 96 hodinách se mortalita pohybovala od 1,60 % do 8,76 %.

V průběhu všech pokusů došlo k anomáliím v mortalitě hlístic. Ke stejné anomálii došlo mezi koncentracemi $1,0 \cdot 10^6$ /ml a $1,0 \cdot 10^7$ /ml u kombinací *Beauveria bassiana* + *Steinernema arenarium* a *Lecanicillium lecanii* + *Steinernema feltiae*, kdy po 48 a 72 hodinách byla mortalita vyšší u nižší koncentrace.

Graf 1 Celková mortalita entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* kultivovaných v suspenzi vybraných druhů entomopatogenních hub



Bba - *Beauveria bassiana*, If - *Isaria fumosorosea*, Ll - *Lecanicillium lecanii*, Sa - *Steinernema arenarium*, Sf - *Steinernema feltiae*

4.2 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema*

Při pokusech byla zjišťována mortalita larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze invazních larev hlístic *Steinernema arenarium* a *Steinernema feltiae*. Mortalita byla vyjádřena procentuálně, průměrnou mortalitou a směrodatnou chybou.

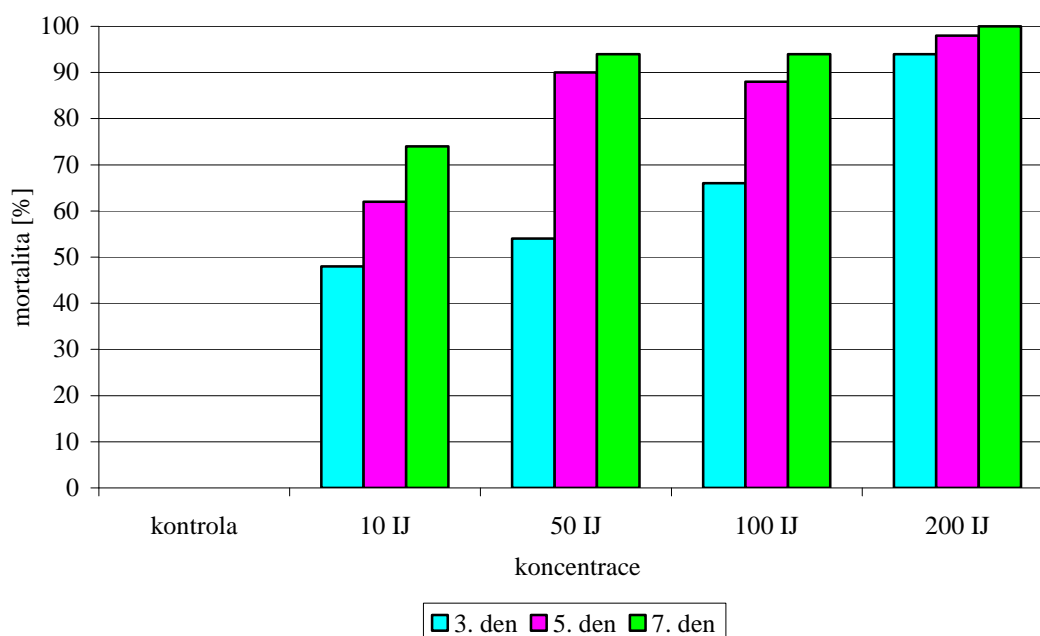
Tabulka 13 Hodnocení mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze entomopatogenní hlístice *Steinernema arenarium*

koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita ± SE)					
	3. den		5. den		7. den	
kontrola	0,00±0,00 0 %	c	0,00±0,00 0 %	c	0,00±0,00 0 %	c
10 IJ	2,40±0,45 48 %	b	3,10±0,41 62 %	b	3,70±0,42 74 %	b
50 IJ	2,70±0,58 54 %	b	4,50±0,31 90 %	a	4,70±0,21 94 %	ab
100 IJ	3,30±0,45 66 %	ab	4,40±0,22 88 %	a	4,70±0,15 94 %	ab
200 IJ	4,70±0,15 94 %	a	4,90±0,10 98 %	a	5,00±0,00 100 %	a

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

Z výsledku testu vyplývá, že mortalita larev ve všech sledovaných obdobích stoupá se vzrůstající koncentrací aplikovaných invazních larev. Po 3 dnech ($F=19,17$; $df=4;45$; $p=0,0000$) se mortalita pohybovala od 48 % do 94 %. K jisté anomálii došlo 5. den ($F=39,55$; $df=4;45$; $p=0,0000$) testu, kdy mortalita larev při koncentraci 50 IJ byla vyšší než u koncentrace 100 IJ. Tato anomálie však nebyla statisticky prokazatelná. Po 7 dnech ($F=28,71$; $df=4;45$; $p=0,0000$) se mortalita pohybovala od 74 % do 100 %.

Graf 2 Mortalita larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze entomopatogenní hlístice *Steinernema arenarium*



Tabulka 14 Hodnocení mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze entomopatogenní hlístice *Steinernema feltiae*

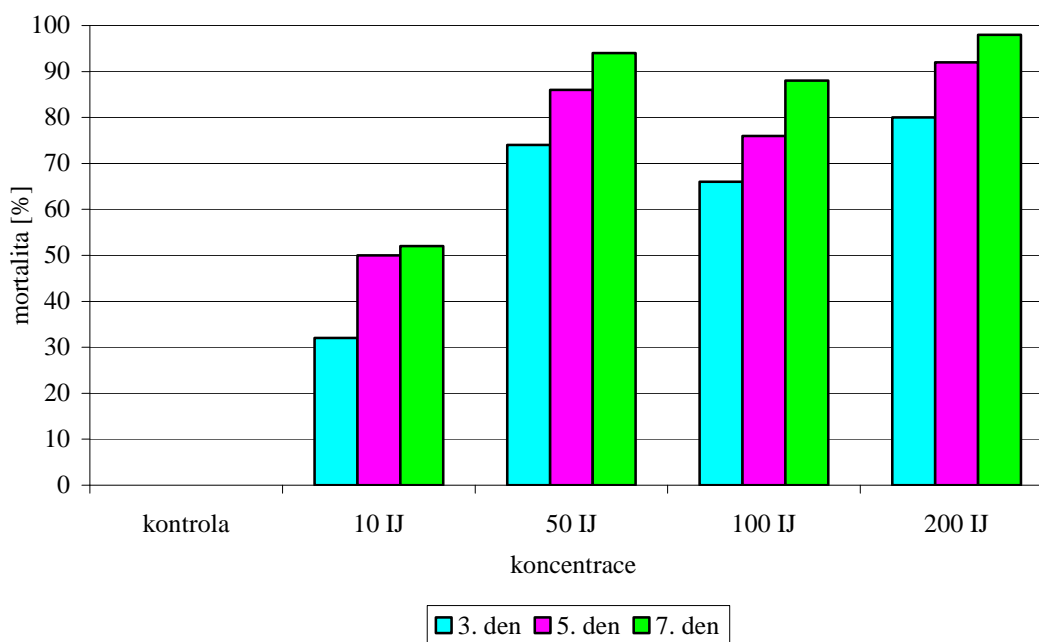
koncentrace	délka expozice (průměrná mortalita ± SE)		
	3. den	5. den	7. den
kontrola	0,00±0,00 0 %	0,00±0,00 0 %	0,00±0,00 0 %
10 IJ	1,60±0,43 32 %	2,50±0,54 50 %	2,60±0,52 52 %
50 IJ	3,70±0,45 74 %	4,30±0,42 86 %	4,70±0,21 94 %
100 IJ	3,30±0,47 66 %	3,80±0,47 76 %	4,40±0,34 88 %
200 IJ	4,00±0,21 80 %	4,60±0,16 92 %	4,90±0,10 98 %

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

Z výsledku testu vyplývá, že nejvyšší mortality larev zavíječe voskového bylo ve všech sledovaných obdobích dosaženo u nejvyšší koncentrace aplikovaných invazních larev. Ve všech sledovaných obdobích došlo k anomálii, kdy mortalita u

koncentrace 100 IJ byla vždy nižší než u koncentrace 50 IJ. Po 3 dnech ($F=20,59$; $df=4;45$; $p=0,0000$) se mortalita pohybovala od 32 % do 80 %. Po 5 dnech ($F=20,88$; $df=4;45$; $p=0,0000$) testu se mortalita larev pohybovala od 50 % do 92 %. Po 7 dnech ($F=24,47$; $df=4;45$; $p=0,0000$) se mortalita pohybovala od 52 % do 98 %.

Graf 3 Mortalita larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze entomopatogenní hlístice *Steinernema feltiae*



U obou testovaných hlístic se vyskytla odchylka, kdy koncentrace 100 IJ vykazovala nižší mortalitu než koncentrace 50 IJ. V případě *Steinernema arenarium* se tato anomálie vyskytuje pouze 5. den kontrol (po 7 dnech byla mortalita stejná). U *Steinernema feltiae* se vyskytuje po celou dobu testu. *Steinernema arenarium* způsobovala po celou dobu testu vyšší mortalitu larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* než *Steinernema feltiae*.

4.3 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* entomopatogenními houbami rodu *Beauveria*, *Isaria* a *Lecanicillium*

Při pokusech byla zjišťována mortalita larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci konidiové suspenze entomopatogenních hub *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium lecanii*. Průběh infekce byl vyjádřen procentuálně, průměrným výskytem zdravých, infikovaných a mrtvých larev a směrodatnou chybou.

Tabulka 15 Hodnocení vlivu aplikace suspenze entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 7 dnech

koncentrace	průběh infekce (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		infikované		mrtvé	
kontrola	5,00±0,00 100 %	c	0,00±0,00 0 %	c	0,00±0,00 0 %	b
1,0 · 10 ⁴ /ml půdy	2,10±0,38 42 %	b	2,90±0,38 58 %	b	0,00±0,00 0 %	b
1,0 · 10 ⁵ /ml půdy	0,20±0,13 4 %	a	4,50±0,22 90 %	a	0,30±0,15 6 %	b
1,0 · 10 ⁶ /ml půdy	0,00±0,00 0 %	a	3,40±0,54 68 %	ab	1,60±0,54 32 %	a

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

Z výsledků testu je zřejmé, že po 7 dnech se v testu vyskytují larvy zdravé (bez příznaků), infikované (s příznaky) i mrtvé (s viditelným myceliem). Zdravé larvy byly zjištěny v koncentracích 1,0 · 10⁴/ml půdy (42 %) a 1,0 · 10⁵/ml půdy (4 %). Infikované larvy se vyskytovaly ve všech testovaných koncentracích a jejich výskyt se pohyboval od 58 % do 90 %. Mrtvé larvy se v koncentraci 1,0 · 10⁴/ml půdy nevyskytovaly a v koncentraci 1,0 · 10⁵/ml půdy jich bylo pouze 6 %. V nejvyšší testované koncentraci se vyskytovalo po 7 dnech 32 % mrtvých larev.

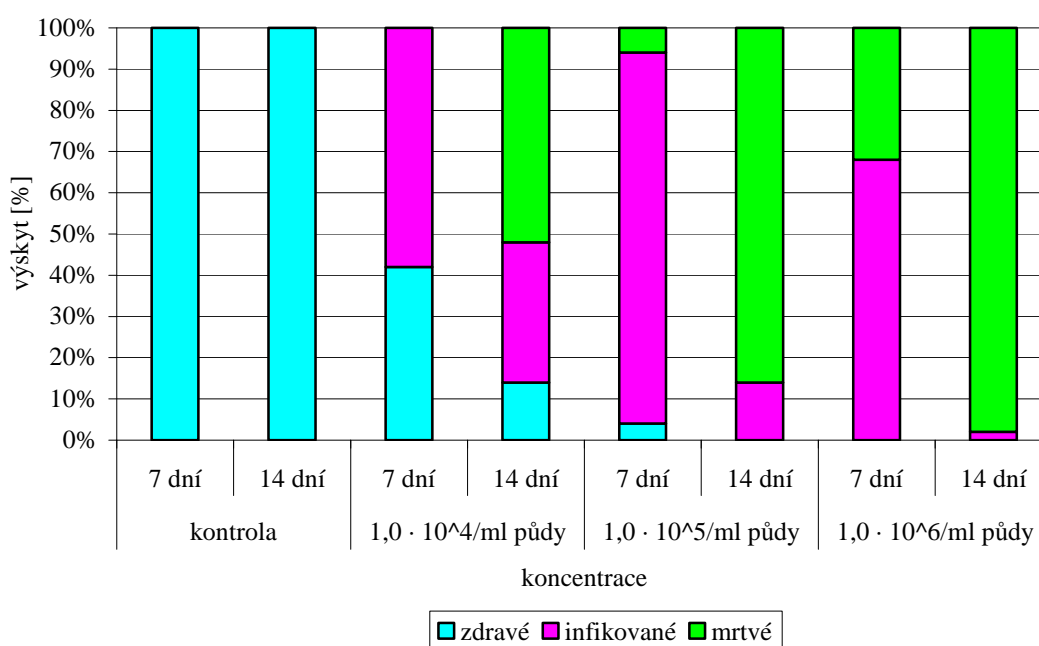
Tabulka 16 Hodnocení vlivu aplikace suspenze entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 14 dnech

koncentrace	průběh infekce (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		infikované		mrtvé	
kontrola	5,00±0,00 100 %	c	0,00±0,00 0 %	a	0,00±0,00 0 %	c
1,0 · 10 ⁴ /ml půdy	0,70±0,15 14 %	b	1,70±0,33 34 %	b	2,60±0,37 52 %	b
1,0 · 10 ⁵ /ml půdy	0,00±0,00 0 %	a	0,70±0,30 14 %	a	4,30±0,30 86 %	a
1,0 · 10 ⁶ /ml půdy	0,00±0,00 0 %	a	0,10±0,10 2 %	b	4,90±0,10 98 %	a

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

Po 14 dnech se zdravé larvy vyskytovaly pouze u koncentrace 1,0 · 10⁴/ml půdy (14 %). Infikované larvy se vyskytovaly ve všech koncentracích, nejvíce u nejnižší koncentrace (34 %). Výskyt mrtvých larev stoupal se vzrůstající koncentrací konidiové suspenze *Beauveria bassiana* od 52 % do 98 %.

Graf 4 Průběh infekce u larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*



Tabulka 17 Hodnocení vlivu aplikace suspenze entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 7 dnech

koncentrace	průběh infekce (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		infikované		mrtvé	
kontrola	5,00±0,00 100 %	c	0,00±0,00 0 %	b	0,00±0,00 0 %	b
1,0 · 10 ⁴ /ml půdy	2,50±0,48 50 %	b	1,90±0,28 38 %	ab	0,60±0,27 12 %	ab
1,0 · 10 ⁵ /ml půdy	1,40±0,40 28 %	b	2,30±0,58 46 %	a	1,30±0,58 26 %	ab
1,0 · 10 ⁶ /ml půdy	0,10±0,10 2 %	a	2,60±0,81 52 %	b	2,30±0,78 46 %	a

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

Z výsledků testu vyplývá, že množství zdravých larev klesá se vzrůstající koncentrací konidiové suspenze *Isaria fumosorosea* od 50 % do 2 %. Množství infikovaných a mrtvých larev naopak se vzrůstající koncentrací stoupá od 38 % do 52 %, resp. od 12 % do 46 %.

Tabulka 18 Hodnocení vlivu aplikace suspenze entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 14 dnech

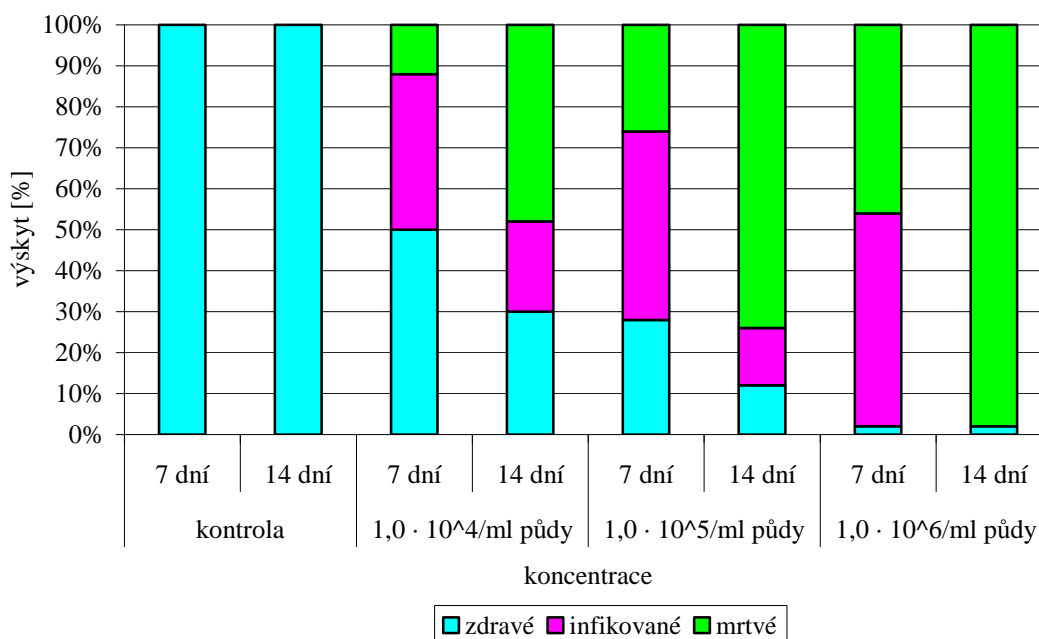
koncentrace	průběh infekce (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		infikované		mrtvé	
kontrola	5,00±0,00 100 %	c	0,00±0,00 0 %	b	0,00±0,00 0 %	c
1,0 · 10 ⁴ /ml půdy	1,50±0,40 30 %	b	1,10±0,38 22 %	a	2,40±0,50 48 %	b
1,0 · 10 ⁵ /ml půdy	0,60±0,40 12 %	ab	0,70±0,30 14 %	ab	3,70±0,40 74 %	a
1,0 · 10 ⁶ /ml půdy	0,10±0,10 2 %	a	0,00±0,00 0 %	b	4,90±0,10 98 %	a

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

Po 14 dnech testu zastoupení zdravých larev kleslo na 2 % až 30 %. Infikované larvy se vyskytovaly v koncentracích 1,0 · 10⁴/ml půdy (22 %) a 1,0 · 10⁵/ml půdy

(14 %). Počet mrtvých larev stoupal se vzrůstající koncentrací konidiové suspenze od 48 % do 98 %.

Graf 5 Průběh infekce u larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*



Tabulka 19 Hodnocení vlivu aplikace suspenze entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 7 dnech

koncentrace	průběh infekce (průměrný výskyt ± SE)		
	zdravé	infikované	mrtvé
kontrola	5,00±0,00 100 %	0,00±0,00 0 %	0,00±0,00 0 %
1,0 · 10 ⁴ /ml půdy	1,30±0,45 26 %	3,60±0,48 72 %	0,00±0,00 0 %
1,0 · 10 ⁵ /ml půdy	1,20±0,33 24 %	3,80±0,33 76 %	0,00±0,00 0 %
1,0 · 10 ⁶ /ml půdy	0,70±0,30 14 %	4,20±0,36 84 %	0,10±0,00 2 %

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

Po 7 dnech bylo zjištěno velké množství larev s příznaky infekce, jejich výskyt stoupal se vzrůstající koncentrací konidiové suspenze. Pouze v koncentraci $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$ půdy se vyskytovala 1 larva s viditelným myceliem. Tento výskyt ovšem nebyl statisticky významný, proto lze obecně konstatovat, že po 7 dnech aplikace suspenze konidií *Lecanicillium lecanii* se nevyskytovaly žádné larvy s viditelným mycelium. Na druhou stranu v koncentraci $1,0 \cdot 10^4/\text{ml}$ půdy byla zjištěna 1 larva, u které byla příčinou smrti bakterióza (tj. 2 % z celkového počtu).

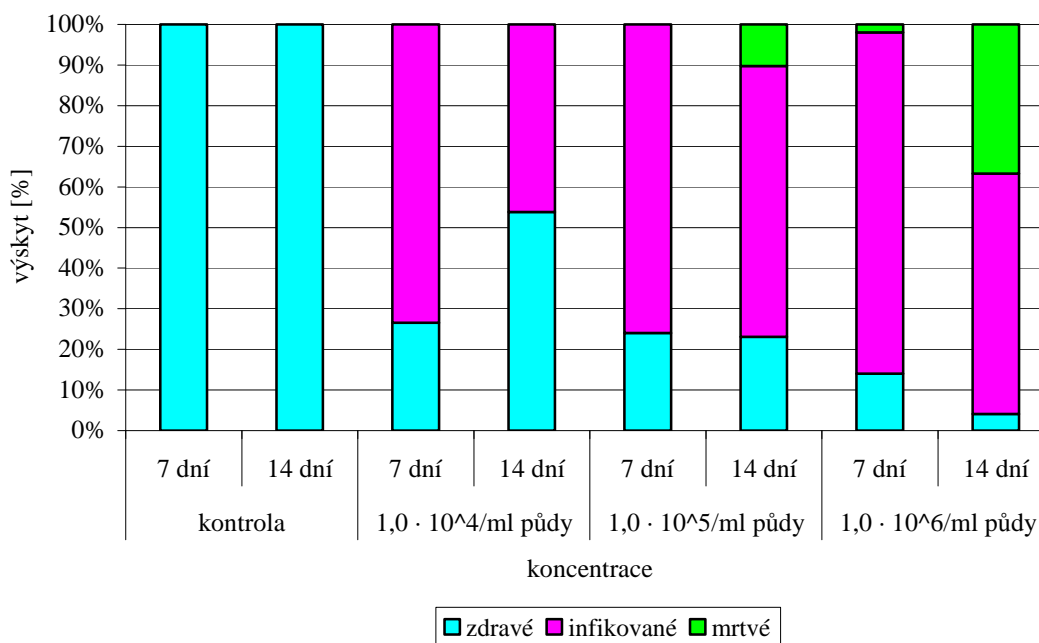
Tabulka 20 Hodnocení vlivu aplikace suspenze entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 14 dnech

koncentrace	průběh infekce (průměrný výskyt \pm SE)					
	zdravé		infikované		mrtvé	
kontrola	5,00 \pm 0,00 100 %	b	0,00 \pm 0,00 0 %	b	0,00 \pm 0,00 0 %	b
$1,0 \cdot 10^4/\text{ml}$ půdy	0,70 \pm 0,26 14 %	a	0,60 \pm 0,27 12 %	b	0,00 \pm 0,00 0 %	b
$1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$ půdy	0,90 \pm 0,28 18 %	a	2,60 \pm 0,16 52 %	a	0,40 \pm 0,16 8 %	b
$1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$ půdy	0,20 \pm 0,13 4 %	a	2,90 \pm 0,48 58 %	a	1,80 \pm 0,49 36 %	a

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

Po 14 dnech od aplikace konidiové suspenze *Lecanicillium lecanii* se ve všech testovaných koncentracích vyskytovalo velké množství infikovaných larev. Z výsledků je patrné, že mrtvé larvy (s viditelným myceliem) se vyskytují u koncentrací $1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$ půdy (8 %) a $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$ půdy (36 %). Ve výsledcích nejsou zahrnuty všechny larvy, protože ve všech koncentracích byly zjištěny larvy, u kterých byla příčinou smrti bakterióza. V koncentraci $1,0 \cdot 10^4/\text{ml}$ půdy se vyskytovalo 37 takovýchto larev (tj. 74 % z celkového počtu), v koncentraci $1,0 \cdot 10^5/\text{ml}$ půdy se vyskytovalo 11 larev (tj. 22 %) a v koncentraci $1,0 \cdot 10^6/\text{ml}$ půdy se vyskytovala 1 larva (tj. 2 %).

Graf 6 Průběh infekce u larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci suspenze entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii*



Mortalita larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* byla po 7 dnech častější u larev ošetřených suspenzí *Isaria fumosorosea* (12 % - 46 %). U *Beauveria bassiana* se výskyt mrtvých larev pohyboval od 0 % do 32 % a u *Lecanicillium lecanii* pak od 0 % do 2 %. Po 14 dnech je výskyt mrtvých larev u hub *B. bassiana* a *I. fumosorosea* téměř stejný (52 % - 98 % u *B. bassiana*, 48 % - 98 % u *I. fumosorosea*). *L. lecanii* způsobilo po 14 dnech mortalitu u 8 % až 36 % larev. Vzhledem ke skutečnosti, že mortalita larev zavíječe voskového byla v koncentraci zvolené pro další testování nulová a v následné vyšší koncentraci nedostatečná, a také z důvodu velkého výskytu bakteriózy, nebylo *Lecanicillium lecanii* testováno v kombinačních testech.

4.4 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* v kombinaci s entomopatogenními houbami rodu *Beauveria* a *Isaria*

Při pokusech byla zjišťována mortalita larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci konidiové suspenze entomopatogenních hub *Beauveria*

bassiana a *Isaria fumosorosea* spolu, příp. s dvoudenním odstupem se suspenzí invazních larev entomopatogenních hlístic *Steinernema arenarium* a *Steinernema feltiae*. Průběh infekce byl vyjádřen procentuálně, průměrným výskytem zdravých, infikovaných a mrtvých larev a směrodatnou chybou.

Tabulka 21 Hodnocení vlivu simultánně aplikovaných suspenzí entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 7 dnech

	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	5,00±0,00 100 %	a	0,00±0,00 0 %	c	0,00±0,00 0 %	b
<i>Steinernema arenarium</i>	3,10±0,38 62 %	b	1,10±0,28 22 %	b	0,80±0,25 16 %	a
<i>Steinernema feltiae</i>	2,60±0,27 52 %	b	2,30±0,30 46 %	a	0,10±0,10 2 %	b

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

Z výsledků pokusu je zřejmé, že po 7 dnech od simultánní aplikace konidiové suspenze *Beauveria bassiana* a suspenze invazních larev hlístic bylo zjištěno 52 % a 62 % zdravých larev. V kombinaci *B. bassiana* se *Steinernema arenarium* bylo 22 % larev infikováno hlísticemi a 16 % konidii *B. bassiana*. V kombinaci *B. bassiana* se *S. feltiae* bylo hlísticí infikováno 46 % larev a *B. bassiana* pouze 2 % larev.

Tabulka 22 Hodnocení vlivu simultánně aplikovaných suspenzí entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 14 dnech

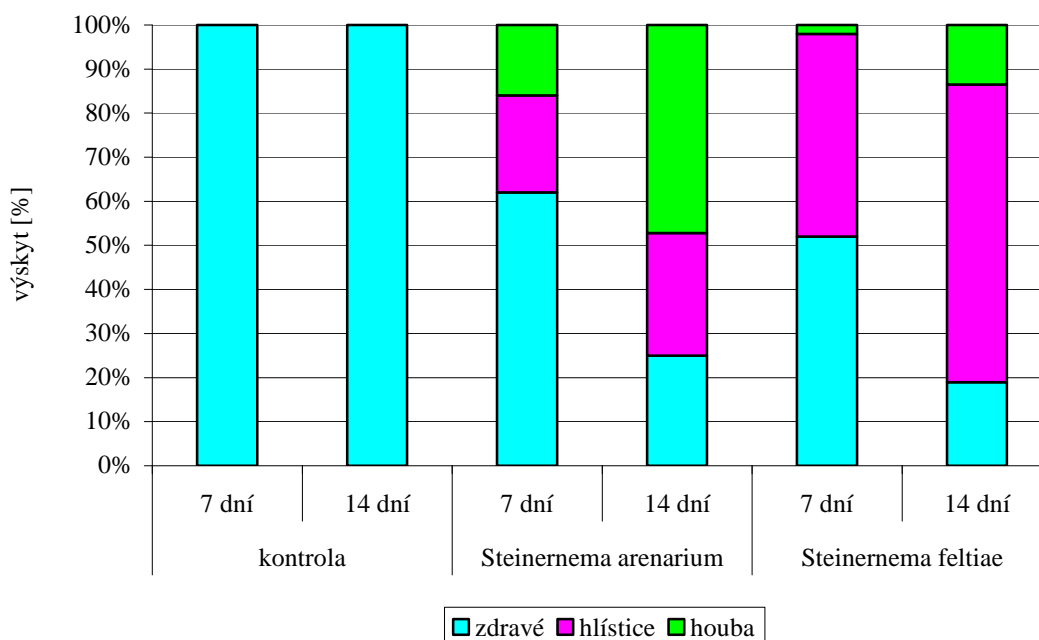
	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	3,70±0,30 74 %	a	0,00±0,00 0 %	c	0,00±0,00 0 %	b
<i>Steinernema arenarium</i>	0,90±0,35 18 %	b	1,00±0,33 20 %	b	1,70±0,26 34 %	a
<i>Steinernema feltiae</i>	0,70±0,21 14 %	b	2,50±0,31 50 %	a	0,50±0,22 10 %	b

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

Výskyt larev infikovaných houbou *Beauveria bassiana* v kombinaci s entomopatogenními hlísticemi byla po 14 dnech od simultánní aplikace obou agens 54 % a 60 %. V kombinacích je patrný rozdíl v působení. Zatímco v kombinaci *B. bassiana* se *Steinernema arenarium* převažují larvy infikované houbovým patogenem (34 %) nad larvami infikovanými hlísticemi (20 %), v kombinaci *B. bassiana* se *Steinernema feltiae* je situace opačná (50 % larev infikovaných hlísticemi a 10 % larev infikovaných houbou).

Ve všech sledovaných skupinách (kontrola, *Steinernema arenarium* a *Steinernema feltiae*) byly po 14 dnech zjištěny larvy, u kterých byla příčinou smrti bakterióza. Výskyt těchto larev byl 26 % v kontrole, 28 % u *Steinernema arenarium* a 26 % u *Steinernema feltiae*.

Graf 7 Průběh infekce u larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* vyvolané simultánní aplikací suspenzí entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*



Tabulka 23 Hodnocení vlivu oddělené aplikace suspenze entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a suspenze hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 7, resp. 5 dnech

	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	5,00±0,00 100 %	a	0,00±0,00 0 %	b	0,00±0,00 0 %	a
<i>Steinernema arenarium</i>	4,30±0,26 86 %	b	0,30±0,15 6 %	b	0,40±0,16 8 %	a
<i>Steinernema feltiae</i>	3,20±0,36 64 %	b	1,30±0,33 26 %	a	0,50±0,27 10 %	a

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

Po 7 dnech od aplikace konidiové suspenze *Beauveria bassiana*, resp. 5 dní po aplikaci suspenze invazních larev hlístic bylo zjištěno velké množství zdravých larev (larev, které nejevily žádné známky infekce, ať již hlísticemi nebo konidii hub). V kombinaci *B. bassiana* se *Steinernema arenarium* bylo 6 % larev infikováno

hlísticemi a 8 % konidii *B. bassiana*. Naopak v kombinaci *B. bassiana* se *S. feltiae* bylo hlísticí infikováno 26 % larev a *B. bassiana* 10 % larev.

Tabulka 24 Hodnocení vlivu oddělené aplikace suspenze entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a suspenze hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 14, resp. 12 dnech

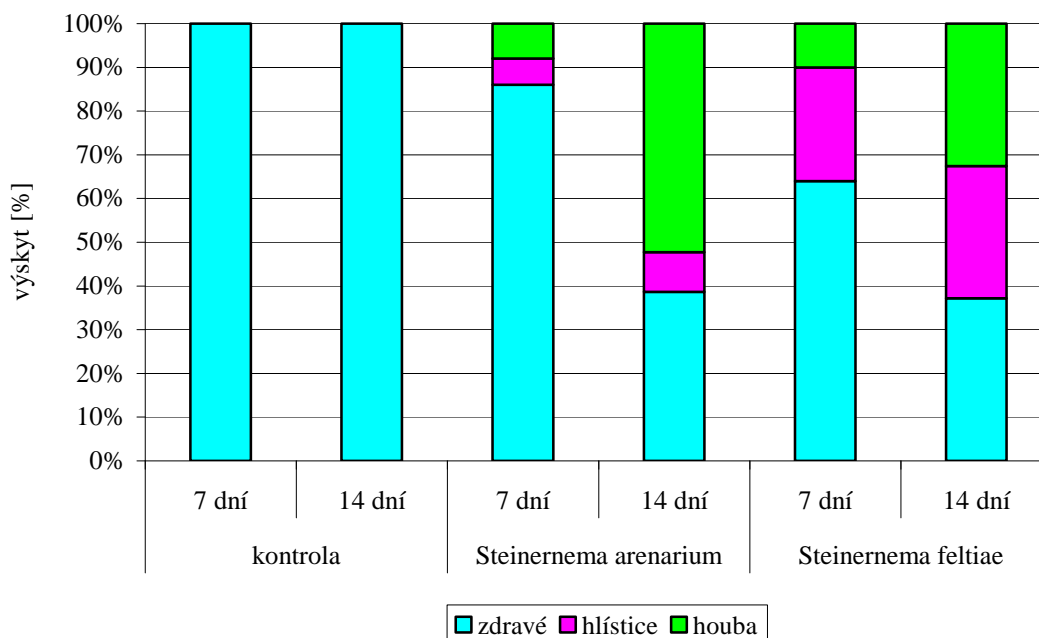
	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	4,20±0,33 84 %	a	0,00±0,00 0 %	b	0,00±0,00 0 %	b
<i>Steinernema arenarium</i>	1,70±0,33 34 %	b	0,40±0,16 8 %	b	2,30±0,40 46 %	a
<i>Steinernema feltiae</i>	1,60±0,22 32 %	b	1,30±0,33 26 %	a	1,40±0,27 28 %	a

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

Z výsledků testu je patrné, že výskyt larev infikovaných houbou *Beauveria bassiana* v kombinaci s entomopatogenními hlísticemi byl po 14, resp. 12 dnech od aplikace jednotlivých agens shodný (54 %), bez rozdílu mezi oběma druhy hlístic použitých v kombinaci. Rozdíl v působení obou agens v kombinacích je ale zřejmý. V kombinaci *B. bassiana* se *S. arenarium* bylo 46 % larev napadeno houbovým patogenem a pouze 8 % hlísticí. Naopak v případě kombinace *B. bassiana* se *S. feltiae* nebyl rozdíl mezi oběma patogeny téměř žádný.

Ve všech sledovaných skupinách byly zjištěny larvy, u kterých byla příčinou smrti bakterióza. Výskyt těchto larev byl 16 % v kontrole, 12 % u *Steinernema arenarium* a 14 % u *Steinernema feltiae*.

Graf 8 Průběh infekce u larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po oddělené aplikaci suspenzí entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*



Tabulka 25 Hodnocení vlivu simultánně aplikovaných suspenzí entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 7 dnech

	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	5,00±0,00 100 %	a	0,00±0,00 0 %	b	0,00±0,00 0 %	b
<i>Steinernema arenarium</i>	1,80±0,39 36 %	b	2,10±0,28 42 %	a	1,10±0,35 22 %	a
<i>Steinernema feltiae</i>	1,70±0,40 34 %	b	1,50±0,27 30 %	a	1,80±0,36 36 %	a

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

Po 7 dnech od simultánní aplikace konidiové suspenze *Isaria fumosorosea* a suspenze invazních larev hlístic bylo zjištěno 34 % zdravých larev u *Steinernema feltiae* a 36 % u *Steinernema arenarium*. V kombinaci *I. fumosorosea* se *S. arenarium* bylo více larev infikováno hlísticemi (42 % larev infikováno hlísticemi a

22 % konidii *I. fumosorosea*). Naopak v kombinaci *I. fumosorosea* se *S. feltiae* bylo hlístic infikováno 30 % larev a *I. fumosorosea* 36 % larev.

Tabulka 26 Hodnocení vlivu simultánně aplikovaných suspenzí entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 14 dnech

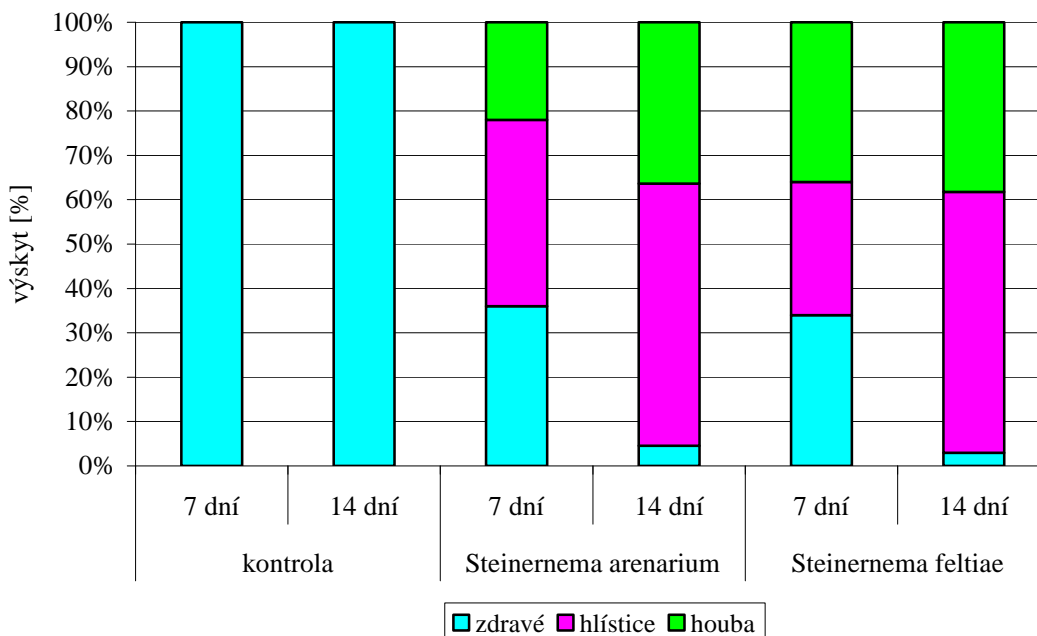
	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	4,10±0,31 82 %	a	0,00±0,00 0 %	b	0,00±0,00 0 %	b
<i>Steinernema arenarium</i>	0,20±0,20 4 %	b	2,60±0,50 52 %	a	1,60±0,45 32 %	a
<i>Steinernema feltiae</i>	0,10±0,10 2 %	b	2,00±0,45 40 %	a	1,30±0,37 26 %	a

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

Po 14 dnech se vyskytovaly pouze 4 %, resp. 2 % zdravých larev. Infekce způsobené oběma patogeny byly 84 % v kombinaci *Isaria fumosorosea* a *Steinernema arenarium* a 66 % u kombinace *Isaria fumosorosea* a *Steinernema feltiae*. V obou případech larvy infikované či usmrcené hlísticemi převažovaly o 20 %, resp. 14 %.

Ve všech sledovaných skupinách byly zjištěny larvy, u kterých byla příčinou smrti bakterióza. Výskyt těchto larev byl 18 % v kontrole, 12 % u *Steinernema arenarium* a 32 % u *Steinernema feltiae*.

Graf 9 Průběh infekce u larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* vyvolaných simultánní aplikací suspenzí entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*



Tabulka 27 Hodnocení vlivu oddělené aplikace suspenze entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a suspenze hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 7, resp. 5 dnech

	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	5,00±0,00 100 %	a	0,00±0,00 0 %	c	0,00±0,00 0 %	b
<i>Steinernema arenarium</i>	1,00±0,42 20 %	b	3,30±0,50 66 %	a	0,60±0,22 12 %	ab
<i>Steinernema feltiae</i>	1,80±0,49 36 %	b	1,30±0,26 26 %	b	1,50±0,43 30 %	a

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

Z výsledků je patrné, že výskyt larev infikovaných hlísticemi (66 %) v kombinaci *Isaria fumosorosea* a *Steinernema arenarium* silně převažuje nad výskytem larev infikovaných houbovým patogenem (12 %). V kombinaci *Isaria fumosorosea* a

Steinernema feltiae způsobil houbový patogen infekci či smrt 30 % larev a hlístice nákazu u 26 % larev.

Larvy, u kterých byla příčinou smrti bakterióza, nebyly zjištěny v kontrolních vzorcích. Výskyt larev s bakteriózou byl 2 % u *Steinernema arenarium* a 8 % u *Steinernema feltiae*.

Tabulka 28 Hodnocení vlivu oddělené aplikace suspenze entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a suspenze hlístic rodu *Steinernema* na průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po 14, resp. 12 dnech

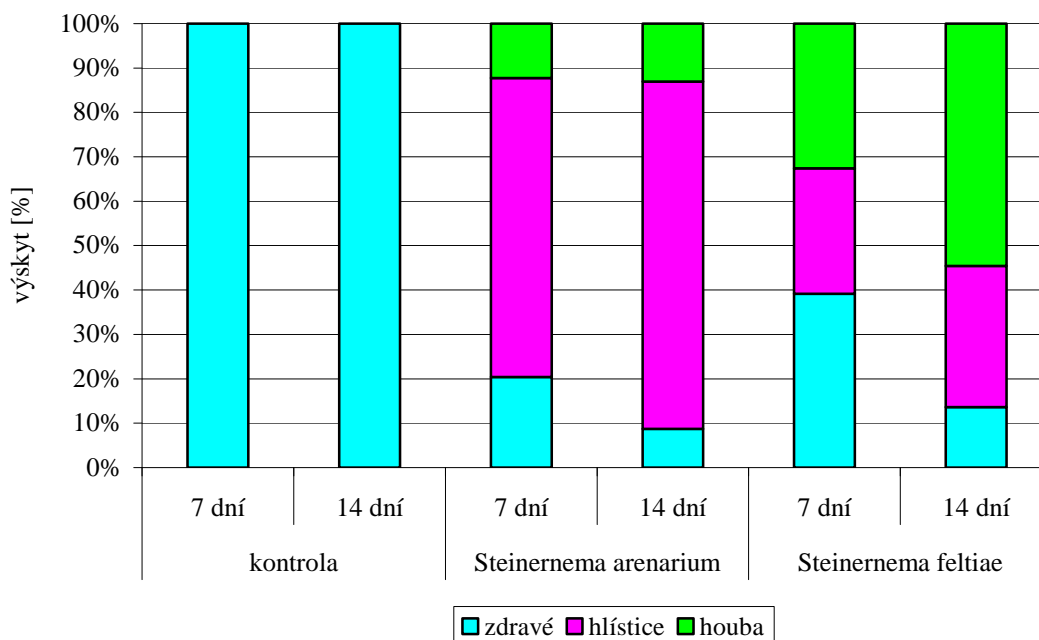
	výskyt infikovaných larev (průměrný výskyt ± SE)					
	zdravé		hlístice		houba	
kontrola	4,50±0,22 90 %	a	0,00±0,00 0 %	c	0,00±0,00 0 %	b
<i>Steinernema arenarium</i>	0,40±0,22 8 %	b	3,60±0,45 72 %	a	0,60±0,16 12 %	b
<i>Steinernema feltiae</i>	0,60±0,31 12 %	b	1,40±0,27 28 %	b	2,40±0,45 48 %	a

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

Z výsledků získaných v testu je zřejmé, že výskyt larev infikovaných hlísticemi v kombinaci *Isaria fumosorosea* a *Steinernema arenarium* vzrostl a výskyt larev infikovaných houbovým patogenem zůstal stejný. Naproti tomu v kombinaci *Isaria fumosorosea* a *Steinernema feltiae* vzrostl výskyt larev s houbovou infekcí o 18 % a u hlístic pouze o 2 %.

Larvy, u kterých byla příčinou smrti bakterióza, byly zjištěny ve všech sledovaných skupinách, a to 10 % v kontrolních vzorcích, 8 % u *Steinernema arenarium* a 12 % u *Steinernema feltiae*.

Graf 10 Průběh infekce u larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po oddělené aplikaci suspenzí entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*



Ve většině pokusů byl výskyt larev infikovaných jedním agens větší než druhým patogenem. Téměř shodný podíl na celkovém výskytu infikovaných či mrtvých larev byl sledován pouze u oddělené aplikace *Steinernema feltiae* a *Beauveria bassiana* po 14 dnech od aplikace houbového patogenu, u oddělené aplikace *S. arenarium* a *B. bassiana* po 7 dnech. Největší rozdíly v působení byly u kombinace *S. arenarium* a *Isaria fumosorosea* při oddělené aplikaci po 7 i 14 dnech. Po 7 dnech bylo zjištěno 14 % až 78 % infikovaných a mrtvých larev. Po 14 dnech se jejich výskyt pohyboval od 54 % do 84 %. Ve všech sledovaných pokusech se po 14 dnech od aplikace patogenů vyskytovaly larvy s bakteriózou. Tento výskyt se pohyboval od 8 % do 32 %.

Pro porovnání výsledků získaných z pokusů vlivu entomopatogenních bioagens na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* můžeme použít pouze výsledky testů získané po 7 dnech od aplikace jednotlivých agens. Je samozřejmé, že výsledky by byly odlišné, kdybychom použili výsledky pokusů po 14 dnech. Potřebné údaje nebyly získány z pokusů vlivu entomopatogenních hlístic na larvy zavíječe voskového.

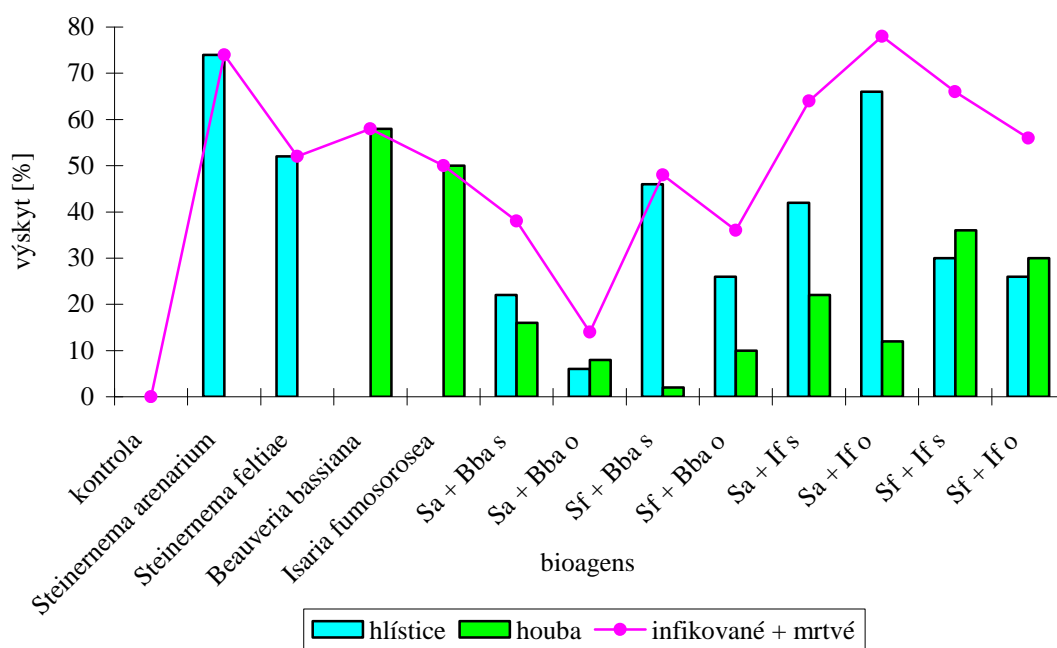
Tabulka 29 Průběh infekce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci jednotlivých bioagens po 7 dnech od aplikace

kombinace	výskyt infikovaných larev (%)			
	zdravé	infikované + mrtvé	z toho	
			houba	hlístice
kontrola	100	0	-	-
<i>Steinernema arenarium</i>	26	74	-	74
<i>Steinernema feltiae</i>	48	52	-	52
<i>Beauveria bassiana</i>	42	58	58	-
<i>Isaria fumosorosea</i>	50	50	50	-
Sa + Bba s	62	38	16	22
Sa + Bba o	86	14	8	6
Sf + Bba s	52	48	2	46
Sf + Bba o	64	36	10	26
Sa + If s	36	64	22	42
Sa + If o	20	78	12	66
Sf + If s	34	66	36	30
Sf + If o	36	56	30	26

s - simultánní, o - oddělená aplikace, Sa - *Steinernema arenarium*, Sf - *S. feltiae*, Bba - *Beauveria bassiana*, If - *Isaria fumosorosea*

Výskyt infikovaných a mrtvých larev se pohyboval v rozmezí 14 % až 78 %. Nejúčinnější byla oddělená aplikace *Steinernema arenarium* a *Isaria fumosorosea*. Obecně lze konstatovat, že kombinace *I. fumosorosea* s oběma druhy hlístic vykazovaly po 7 dnech vysoký počet infikovaných či mrtvých housenek bez ohledu na typ aplikace. Na rozdíl od *Beauveria bassiana*, která vykazovala v kombinacích bez ohledu na způsob aplikace nejnižší napadení larev zavíječe voskového. Ve všech případech byla nižší než u aplikací jednotlivých agens samostatně.

Graf 11 Výskyt infikovaných a mrtvých larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* po aplikaci jednotlivých bioagens



s - simultánní, o - oddělená aplikace, Sa - *Steinernema arenarium*, Sf - *S. feltiae*, Bba - *Beauveria bassiana*, If - *Isaria fumosorosea*

5 DISKUSE

V pokusech byly použity dva druhy hlístic, z nichž *Steinernema feltiae* je běžně masově produkovaným druhem. Na druhé straně stojí poměrně málo známý a komerčně neprodukováný druh *Steinernema arenarium*. Všechny tři druhy entomopatogenních hub jsou polyfágní kosmopolitně rozšířené druhy, které jsou součástí řady přípravků zahraničních firem zabývajících se ochranou rostlin.

Experimentální část práce byla zaměřena na získání základních informací o účinnosti vybraných druhů entomopatogenních organismů, průběhu infekce a možnostech společné aplikace.

Přítomnost konidií entomopatogenní houby v suspenzi spolu s entomopatogenními hlísticemi nemá v průběhu společné kultivace zásadní vliv na jejich vitalitu. I přesto je vhodné takovouto suspenzi (postřikovou jíchu v případě společné aplikace entomopatogenů) aplikovat co nejdříve po namíchání. Kromě kombinace *Isaria fumosorosea* se *Steinernema feltiae* byla mortalita hlístic způsobená konidiami testovaného druhu houby nižší než 10 %. V průběhu pokusu došlo ve většině vzorků k rozvoji houbového mycelia. Ani jeho výskyt nebyl spojen s vyšší mortalitou hlístic. Je velmi pravděpodobné, že při déletrvajícím společné kultivaci (skladování) obou suspenzí a následné aplikaci pomocí postřikovačů, by došlo k ucpaní trysek postřikovače vytvořeným mycelium.

Mortalita larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* se po 3 dnech po aplikaci hlístic pohybovala od 48 % do 94 % u *Steinernema arenarium* a 32 % až 80 % u *S. feltiae* v závislosti na koncentraci hlístic. Yang et al. (2003) dosáhl po 3 dnech mortality 95,8 % ale s použitím 6× vyšší koncentrace hlístic *S. feltiae*. Naopak Head et al. (2004) uvádí při koncentraci 10 000 IJ/ml *S. feltiae* mortalitu molice *Bemisia tabaci* od 10,5 % do 31 % v závislosti na hostitelské rostlině. Po 7 dnech pokusu se mortalita pohybovala od 74 % do 100 % u *Steinernema arenarium* a 52 % až 98 % u *S. feltiae* v závislosti na koncentraci hlístic. Takto vysoké mortality bylo dosaženo i přes poměrně nízké dávky hlístic. V průběhu testů se objevily jisté anomálie v účinnosti u obou druhů, jak *S.arenarium*, tak *S. feltiae*, konkrétně u koncentrací 50 IJ/misku a 100 IJ/misku, kde se mortalita snižovala se zvyšujících se koncentrací IJ v suspenzi. V případě *S. feltiae* se tato výjimka projevila v průběhu celého testu (viz tabulka 14), u *S.arenarium* pouze 5. den testu (viz tabulka 13). Možným vysvětlením této odchylky je jakási vnitrodruhová kompetice mezi hlísticemi,

způsobená určitou dávkou IJ. Pokud pronikne do hostitele větší množství infekčních larev, může dojít k potravní konkurenci, která pak může vést k poruchám průběhu celé infekce. Podobné odchylky v účinnosti aplikovaných hlístic lze pozorovat i v případě mezidruhové kompetice mezi hlísticemi *S. feltiae* Valko a *S. carpocapsae* NY001, které byly naintrodukovány do společného prostředí. V porovnání s variantou ošetřenou pouze jedním druhem (*S. carpocapsae* NY001) dosahovala varianta ošetřená oběma druhy ve všech sledovaných hloubkách substrátu o několik desítek procent nižší účinnosti (Neumann et al. 2006).

Po 7 dnech po aplikaci konidiové suspenze *Beauveria bassiana* se mrtvé larvy objevily pouze ve vzorcích ošetřených koncentracemi $1,0 \cdot 10^5$ /ml půdy (6 %) a $1,0 \cdot 10^6$ /ml půdy (32 %). Po 14 dnech byla zjištěna mortalita 52 % až 98 % v závislosti na koncentraci suspenze konidií. K největšímu nárůstu mrtvých larev došlo u koncentrace $1,0 \cdot 10^6$ /ml půdy a to o 80 %. Podobných výsledků dosáhla řada autorů (např. Batta 2007, Qusada-Morgana et al. 2006, Kreutz et al. 2004). Jiný hostitelský druh a jeho vývojové stádium, použité kmeny patogenu a laboratorní podmínky byly příčinou rozdílů mezi výsledky jednotlivých autorů. V případě *Isaria fumosorosea* se mrtvé larvy vyskytovaly po 7 dnech od aplikace suspenze ve všech testovaných koncentracích. Jejich výskyt se pohyboval od 12 % do 46 % v závislosti na koncentraci. Po 14 dnech se počet mrtvých larev zvýšil až o 52 %. Podobných výsledků dosáhl i Meikle et al (2005), který sledoval účinnost *I. fumosorosea* na termity druhu *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Účinnost obou zmiňovaných entomopatogenních hub se od sebe v zásadě neliší. Naopak účinnost *Lecanicillium lecanii* byla velmi nízká. Po 7 dnech po aplikaci suspenze se mrtvé larvy vyskytovaly pouze u koncentrace $1,0 \cdot 10^6$ /ml půdy a to 2 %. Po 14 dnech se mortalita zvýšila a mrtvé larvy se vyskytovaly i v koncentraci $1,0 \cdot 10^5$ /ml půdy, ale nárůst mortality byl o 8 % a 34 %. Smith et al. (2005) uvádí 52 % a 55 % přežívajících larev třásněnky západní *Frankliniella occidentalis* a třásněnky *Thrips palmi* po ošetření *L. lecanii*. Wang et al (2004) se ve své práci zabývá vlivem šesti různých kmenů této houby na molici bavlníkovou *Bemisia tabaci*. Všechny kmeny vyvolaly mortalitu molice i při velmi nízké koncentraci.

V pokusech s jednotlivými kombinacemi obou druhů patogenů (simultánně i odděleně aplikovaných) převažoval výskyt larev infikovaných jedním druhem patogenu nad larvami infikovanými druhým druhem. Autoři zahraničních studií (Ansari et al. 2004, Shapiro-Ilan et al. 2004) se většinou nezabývají tím, jakou část

celkové mortality způsobily jednotlivé patogeny. Po 7 dnech pokusu se ve vzorcích vyskytovalo 14 % až 78 % infikovaných a mrtvých larev. Po 14 dnech se jejich výskyt pohyboval od 54 % do 84 %. Nejúčinnější byla oddělená aplikace *Steinernema arenarium* a *Isaria fumosorosea*. Přes vysoký výskyt infikovaných či mrtvých larev v kombinaci *I. fumosorosea* s oběma druhy hlístic bez ohledu na typ aplikace, nelze efekt spolupůsobení označit jako synergistický. K odlišným výsledkům dospěl Shapiro-Ilan et al. (2004), který všechny testované kombinace s *I. fumosorosea* označil jako antagonistické. *Beauveria bassiana*, která vykazovala v kombinacích bez ohledu na způsob aplikace nejnižší napadení larev zavíječe voskového *Galleria mellonella*. Tento efekt lze označit jako antagonistický. Ke podobnému závěru dospěl i Shapiro-Ilan et al. (2004). Aditivní a synergistický efekt působení entomopatogenních hlístic a hub byl pozorován v kombinacích *Metarhizium anisopliae* s *Heterirhabditis megidis* nebo *Steinernema glaseri*, kdy se aditivní efekt vyskytoval především při simultánní aplikaci obou druhů patogenů. Při oddělené aplikaci a delší době společné kultivace se synergistický efekt vyskytoval častěji (Ansari et al. 2004).

6 ZÁVĚR

Využívání biologické ochrany bude v následujících desetiletích získávat na důležitosti zejména v evropských zemích. K tomuto účelu alespoň malou měrou měla přispět i tato práce.

Metodika pro testování jednotlivých druhů entomopatogenních hub a hlístic a interakčního systému houba-hlístice v půdním substrátu, která umožňuje porovnání účinnosti testovaných druhů entomopatogenů, byla vypracována na základě vlastních zkušeností v průběhu pokusů. Je určena pro krátkodobé testování entomopatogenů v laboratorních podmínkách.

- Oba testované druhy hlístic prokázaly vysokou virulenci vůči larvám zavíječe voskového *Galleria mellonella*, zvláště druh *S. arenarium* (100 %). Tento druh tak představuje slibnou perspektivu pro využití v dalších projektech.
- V testech účinnosti entomopatogenních hub dosáhly nejlepších výsledků *B. bassiana* a *I. fumosorosea*. *L. lecanii* prokazovala velmi špatnou adaptabilitu na půdní prostředí.
- Společné aplikace vykazují vyšší efektivitu (synergistický vliv) v kratším časovém horizontu (7 dní) než po 14 dnech testu, kdy se objevuje spíše aditivní až antagonistický efekt.
- Simultánní aplikace jsou účinnější, než opožděné.
- Na mortalitě se z vyššího procenta podílí hlístice, a to v průběhu celého biotestu (14 dní). Tento efekt je zřetelnější u *S. feltiae*.
- Lépe reaguje na přítomnost houby *S. feltiae* (vyšší mortalita larev) oproti *S. arenarium*, ačkoliv v samostatných aplikacích *S. arenarium* vykazovala výrazně lepší výsledky, než-li *S. feltiae*
- Oba organismy jsou schopny se reprodukovat ve společném prostředí, a to jak v simultánní, tak opožděné aplikaci.

7 LITERATURA

- Akbar W., Lord J.C., Nechols J.R., Loughin T.M., 2005. Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. *Journal of Economic Entomology*, 98, 683 - 688.
- Altre J.A., Vandenberg J.D., Cantone F.A., 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 332 - 338.
- Ansari M.A., Shah F.A., Tirry L., Moens M., 2006. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control*, 39, 453 - 459.
- Ansari M.A., Tirry L., Moens M., 2004. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biological Control*, 31, 172 - 180.
- Ansari M.A., Tirry L., Moens M., 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *BioControl*, 50, 465 - 475.
- Askary H., Benhamou N., Brodeur J., 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology*, 87, 359 - 368.
- Athanassiou Ch.G., Palyvos N.E., Kakouli-Duarte T., 2008. Insecticidal effect of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) against *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) in stored wheat. *Journal of Stored Products Research*, 44, 52 - 57.
- Bahiense T.C., Bittencourt V.R.E.P., 2004. Laboratory evaluation of the compatibility and the synergism between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and deltamethrin to resistant strains of *Boophilus microplus*. *Impact of Ecological Changes on Tropical Animal Health and Disease Control*, 1026, 319 - 322.
- Batta Y.A., 2007. Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

- (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1406 - 1414.
- Bednarek A., Popowska-Nowak E., Pezowicz E., Kamionek M., 2004. Integrated methods in pest control: Effect of insecticides on entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.)) and nematodes (*Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson, Klein, *Steinernema feltiae* Filipjev, *S. glaseri* Steiner). *Polish Journal of Ecology*, 52, 223 - 228.
- Behle R.W., 2006. Importance of direct spray and spray residue contact for infection of *Trichoplusia ni* larvae by field application of *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology*, 99, 1120 - 1128.
- Bohatá A., 2005. Využití entomopatogenních a mykoparazitických hub v ochraně sazenic rychlené zeleniny a okrasných květin. *Disertační práce*. 173 s.
- Bruck D.J., Lewis L.C., 2002. Whorl and pollen-shed stage application of *Beauveria bassiana* for suppression of adult western corn rootworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103, 161 - 169.
- Bruck D.J., Walton V.M., 2007. Susceptibility of the filbertworm (*Cydia latiferreana*, Lepidoptera: Tortricidae) and filbert weevil (*Curculio occidentalis*, Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 93 - 96.
- Butt T.M., Goettel M.S., 2000. Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In Navon A., Asher K.R.S. (Eds.). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB International, Walingford, UK, 95 - 140. ISBN 0-85-199422-9
- Cagnolo S.R., Donari Y.M., Di Rienzo J.A., 2004. Existence of infective juveniles in the offspring of first- and second-generation adults of *Steinernema rarum* (OLI strain): evaluation of their virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, 33 - 39.
- Cloyd R., 1999. The Entomopathogen *Verticillium lecanii*. *Midwest Biological Control News*, VI (12). Online, cit. 16. 10. 2007, dostupné z <<http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/back.html>>
- Emelianoff V., Chapuis E., Le Brun N., Chiral M., Moulia C., Ferdy J.-B., 2008. A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts. *Evolution*, 62, 932 - 942.

- Fan X., Hominick W.M., 1991a. Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda: Steinernematidae). *Revue de Nematologie*, 14, 407 - 412.
- Fan X., Hominick W.M., 1991b. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from sand and soil. *Revue de Nematologie*, 14, 381 - 387.
- Farr D.F., Rossman A.Y., Palm M.E., McCray E.B. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Online, cit. 16.11.2007, dostupné z <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>
- Feng K.-Ch., Liu B.-L., Tzeng Y.-M., 2002. Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 217 - 224.
- Ferron P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. 23, 409 - 442.
- Fischer-Le Saux M., Arteaga-Hernández E., Mráček Z., Boemare N.E., 1999. The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (Enterobacteriaceae) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: the entomopathogenic species *Steinernema cubanum* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Fems Microbiology Ecology*, 29, 149 - 157.
- Fournier V., Brodeur J., 2000. Dose-response susceptibility of pest aphids (Homoptera: Aphididae) and their control on hydroponically grown lettuce with the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*, *azadirachtin*, and insecticidal soap. *Environmental Entomology*, 29, 568 - 578.
- Führer E., Rosner S., Schmied A., Wegensteiner R., 2001. Studies on the significance of pathogenic fungi in the population dynamics of the lesser spruce sawfly, *Pristiphora abietina* Christ. (Hym., Tenthredinidae). *Journal of Applied Entomology*, 125, 235 - 242.
- Glazer I., Lewis E.E., 2000. Bioassays for Entomopathogenic Nematodes. In Navon A., Asher K.R.S. (Eds.). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB International, Walingford, UK, 229 - 247. ISBN 0-85-199422-9

- Goettel S., Inglis G.D., 1997. Fungi: Hyphomycetes. In Lacey L.A. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, CA, 213 - 249. ISBN 0-12-432555-6
- Goodrich-Blair H., Clarke D.J., 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. Molecular Microbiology, 64, 260 - 268.
- Grant J.A., Villani M.G., 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. Environmental Entomology, 32, 80 - 87.
- Head J., Lawrence A.J., Walters K.F.A., 2004. Efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against *Bemisia tabaci* in relation to plant species. Journal of Applied Entomology, 128, 543 - 547.
- Head J., Walters K.F.A., Langton S., 2000. The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. BioControl, 45, 345 - 353.
- Hicks B.J., Watt A.D., Cosens D., 2001. The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). Forest Ecology and Management, 149, 275 - 281.
- Humber R.A., 1997. Fungi: identification. In Lacey L.A. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, CA, 153 - 185. ISBN 0-12-432555-6
- Choo H.Y., Kaya H.K., Huh J., Lee D.W., Kimm H.H., Lee S.M., Choo Y.M., 2002. Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*) and fungus *Bauveria brongniartii* for biological control of white grubs, *Ectinopholia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf course. BioControl, 47, 177 - 192.
- James R.R., 2003. Combining azadirachtin and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to control *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Economic Entomology, 96, 25 - 30.
- James R.R., Elzen G.W., 2001. Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidacloprid when combined for *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) control. Journal of Economic Entomology, 94, 357 - 361.

- Journey A.M., Ostlie K.R., 2000. Biological control of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) using the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. *Environmental Entomology*, 29, 822 - 831.
- Kakouli-Duarte T., Hague N.G.M., 1999. Infection, development, and reproduction of the entomopathogenic nematode *Steinernema arenarium* (Nematoda: Steinernematidae) in the black vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematology*, 1, 149 - 156.
- Kamp A.M., Bidochka M.J., 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 74 - 77.
- Kavková M., Čurn V., 2005. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia*, 159, 53 - 63.
- Kaya H.K., Stock S.P., 1997. Techniques in insect nematology. In Lacey L. A. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego, CA, 281 - 324. ISBN 0-12-432555-6
- Koppenhöfer A.M., Cowles R.S., Cowles E.A., Fuzy E.M., Kaya H.K., 2003. Effect of neonicotinoid synergists on entomopathogenic nematode fitness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 106, 7 - 18.
- Kouassi M., Coderre D., Todorova S.I., 2003. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). *Journal of Applied Entomology*, 127, 421 - 426.
- Kreutzl J., Vaupel O., Zimmermann G., 2004. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. *Journal of Applied Entomology*, 128, 384 - 389.
- Lacey L.A., Arthurs S.P., Unruh T.R., Headrick H., Fritts R.Jr., 2006. Entomopathogenic nematodes for control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple and pear orchards: Effect of nematode species and seasonal temperatures, adjuvants, application equipment, and post-application irrigation. *Biological Control*, 37, 214 - 223.
- Landa Z., Osborne L., Lopez F., Eyal J., 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control*, 4, 341 - 350.

- Lánský M., Falta V., Kloutvorová J., Kocourek F., Stará J., Pultar O., 2005. Integrovaná ochrana ovoce v systému integrované produkce. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.. 159 s. ISBN 80-902636-7-4
- Liu H., Skinner M., Parker B.L., 2003. Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana* against tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hem., Miridae). *Journal of Applied Entomology*, 127, 299 - 304.
- Liu H., Skinner M., Parker B.L., Brownbridge M., 2002. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*, 95, 675 - 681.
- Lohmeyer K.H., Miller J.A., 2006. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 99, 1943 - 1947.
- Lola-Luz T., Downes M., Dunne R., 2005. Control of black vine weevil larvae *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera:Curculionidae) in grow bags outdoors with nematodes. *Agricultural and Forest Entomology*, 7, 121 - 126.
- Luz C., Tai M.H.H., Santos A.H., Rocha L.F.N., Albernaz D.A.S., Silva H.H.G., 2007. Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44, 799 - 804.
- Meikle W.G., Mercadier G., Rosengaus R.B., Kirk A.A., Derouané F., Quimby P.C., 2005. Evaluation of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Deuteromycota:Hyphomycetes) obtained from Formosan subterranean termites (Isop., Rhinotermitidae). *Journal of Applied Entomology*, 129, 315 - 322.
- Meyer S.L.F., Meyer R.J., 1996. Greenhouse studies comparing strains of the fungus *Verticillium lecanii* for activity against the nematode *Heterodera glycines*. *Fundamental and Applied Nematology*, 19, 305 - 308.
- Mráček Z., Weiser J., 1988. Parazitické hlístice hmyzu. *Academia*, 189 - 195.
- Mulock B.S., Chandler L.D., 2001. Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biological Control*, 22, 16 - 21.
- Neumann G., Shields E.J., 2006. Interspecific interactions among entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* Weiser, *S. feltiae* Filipjev and

- Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, with different foraging strategies for host in multipiece sand columns. *Environmental Entomology*, 35, 1578 - 1583.
- Nguyen K.B., a. *Steinernema arenarium*. Online, cit. 16.10.2007, dostupné z <<http://kbn.ifas.ufl.edu/ARENARIA.htm>>
- Nguyen K.B., b. *Steinernema feltiae*. Online, cit. 16.10.2007, dostupné z <<http://kbn.ifas.ufl.edu/FELTIAE.htm>>
- Nguyen K.B., Hominick W.M., Briscoe B.R., del Pino F.G., Heng J., Hunt D.J., Kozodoy E., Mráček Z., Reid A.P., Spiridonov S., Stock P., Sturhan D., Waturu C., Yoshida M., 1997. *Steinernema*, *Neosteinernema* species, names and authorities. Online, cit. 21.12.2007, dostupné z <<http://kbn.ifas.ufl.edu/namespp.HTM>>
- Noma T., Strickler K., 2000. Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding and oviposition. *Environmental Entomology*, 29, 394 - 402.
- Osborne L.S., Landa Z., 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*, 75, 456 - 471.
- Pilz C., Wegensteiner R., Keller S., 2007. Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *Journal of Applied Entomology*, 131, 426 - 431.
- Poinar G.O., 1979. *Nematodes for biological control of insects*. CRC Press, Boca Raton, 165 - 176.
- Poprawski T.J., Greenberg S.M., Ciomperlik M.A., 2000. Effect of Host Plant on *Beauveria bassiana*- and *Paecilomyces fumosoroseus*-Induced Mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environmental Entomology*, 29, 1048 - 1053.
- Quesada-Moraga E., Ruiz-García A., Santiago-Álvarez C., 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99, 1955 - 1966.
- Sabbahi R., Merzouki A., Guertin C., 2008. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberries. *Journal of Applied Entomology*, 132, 124 - 134.
- Saux M.F.L., Mauleon H., Constant P., Brunel B., Boemare N., 1998. PCR-ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region

- in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4246 - 4254.
- Shapiro-Ilan D.I., Gardner W.A., Fuxa J.R., Wood B.W., Nguyen K., Adams B., Humber R.A., Hall M.J., 2003. Survey of entomopathogenic nematodes and fungi endemic to pecan orchards of the southeastern United States and their virulence to the pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 32, 187 - 195.
- Shapiro-Ilan D.I., Jackson M., Reilly C.C., Hotchkiss M.W., 2004. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control*, 30, 119 - 126.
- Sicard M., Brugirard-Ricaud K., Pages S., Lanois A., Boemare N.E., Brehelin M., Givaudan A., 2004. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6473 - 6480.
- Siegel J., Lacey L.A., Fritts R.Jr., Higbee B.S., Noble P., 2004. Use of steinernematid nematodes for post harvest control of navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae, *Amyelois transitella*) in fallen pistachios. *Biological Control*, 30, 410 - 417.
- Smith R.M., Cuthbertson A.G.S., Walters K.F.A., 2005. Extrapolating the use of an entomopathogenic nematode and fungus as control agents for *Frankliniella occidentalis* to *Thrips palmi*. *Phytoparasitica*, 33, 436 - 440.
- Sung G.-H., Hywel-Jones N.L., Sung J.-M., Luangsa-ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57, 5 - 59.
- Tafera T., Pringle K.L., 2003. Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84, 220 - 225.
- Thompson S.R., Brandenburg R.L., Roberson G.T., 2007. Entomopathogenic fungi detection and avoidance by mole crickets . *Environmental Entomology*, 36, 165 - 172.
- Trudel R., Lavallée R., Guertin C., Côté C., Todorova S.I., Alfaro R., Kope H., 2007. Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the

- white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). Journal of Applied Entomology, 131, 90 - 97.
- Vänninen I., Hokkanen H., Tyni-Juslin J., 1999. Attempts to control cabbage root flies *Delia radicum* L. and *Delia floralis* (Fall.) (Dipt., Anthomyiidae) with entomopathogenic fungi: laboratory and greenhouse tests. Journal of Applied Entomology, 123, 107 - 113.
- Vänninen I., Tyni-Juslin J., Hokkanen H., 2000. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. BioControl, 45, 201 - 222.
- Verhaar M.A., Hijwegen T., Zadoks J.C., 1996. Glasshouse experiments on biocontrol of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by mycoparasites *Verticillium lecanii* and *Sporothrix rugulosa*. Biological Control, 6, 353 - 360.
- Wang L., Huang J., You M., Guan X., Liu B., 2005. Effects of toxins from two strains of *Verticillium lecanii* (Hyphomycetes) on bioattributes of a predatory ladybeetle, *Delphastus catalinae* (Col., Coccinellidae). Journal of Applied Entomology, 129, 32 - 38.
- Wang L., Huang J., You M., Liu B., 2004. Time-dose-mortality modelling and virulence indices for six strains of *Verticillium lecanii* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius). Journal of Applied Entomology, 128, 494 - 500.
- Wekesa V.W., Knapp M., Maniania N.K., Boga H.I., 2006. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. Journal of Applied Entomology, 130, 155 - 159.
- Wouts W.M., 1980. Biology, life cycle and redescription of *Neoaplectana bibionis* Boven, 1937 (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Nematology, 12, 62 - 72.
- Wraight S.P., Carruthers R.I., Bradley C.A., Jaronski S.T., Lacey L.A., Wood P., Galaini-Wraight S., 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Journal of Invertebrate Pathology, 71, 217 - 226.
- Yang X., Jian H., Liu Z., Yang H., Yuan J., Quanli Z., Shuangyue L., 2003. Evaluation of entomopathogenic nematodes for control of the beetle, *Luperomorpha suturalis* Chen (Col., Chrysomelidae). Journal of Applied Entomology, 127, 377 - 382.

Zdroj 1 - Spotřeba - přípravky v roce 2007 (kg,l). Online, cit. 8.4.2008, dostupné z <http://www.srs.cz/portaldoc/pripravky_na_ochranu_rostlin/spotreba_pripravku_na_or/2007/05%20spotřeba%20kategorií%20přípravků%20kg,l.htm>

Zdroj 2 - *Beauveria bassiana*. Online, cit. 12.2.2008, dostupné z <<http://rl.zf.jcu.cz/studijni-informacni-databaze/obecne-informace-1/obecne-informace-1/beauveria-bassiana>>

Zdroj 3 - *Paecilomyces fumosoroseus*. Online, cit. 12.2.2008, dostupné z <<http://rl.zf.jcu.cz/studijni-informacni-databaze/obecne-informace-1/obecne-informace-1/paecilomyces-fumosoroseus>>

Zdroj 4 - *Lecanicillium lecanii*. Online, cit. 12.2.2008, dostupné z <<http://rl.zf.jcu.cz/studijni-informacni-databaze/obecne-informace-1/obecne-informace-1/lecanicillium-lecanii>>

8 PŘÍLOHY

8.1 Tabulky

8.2 Fotodokumentace

8.1 Tabulky

Tabulka 1 Rozměry dospělců *Steinernema arenarium* (Poinar 1979)

znak	samice	samci
celková délka (mm)	2,17 - 4,00	1,03 - 1,83
šířka těla (μm)	149 - 241	60 - 97
délka po jícen (μm)	225 - 257	209
délka po nervový prstenec (μm)	177	144 - 145
vulva v % délky	53 - 54	-
délka ocasu (μm)	96 - 67	38 - 48
šířka ocasu (μm)	48 - 64	41 - 42
délka spikulí (μm)	-	60 - 72
délka gubernákula (μm)	-	35 - 44

Tabulka 2 Rozměry dospělců *Steinernema feltiae* (Poinar 1979)

znak	samice		samci	
	1. generace	2. generace	1. generace	2. generace
celková délka (mm)	9,0 - 18,0	0,8 - 3,5	1,6 - 2,8	0,68 - 1,4
šířka těla (μm)	190 - 450	75 - 180	105 - 220	35 - 51
délka stoma (μm)	6,5 - 11,3	4,0 - 10,1	4,8 - 6,5	1,8 - 7,3
šířka stoma (μm)	9,8 - 14,5	5,2 - 9,5	3,6 - 5,9	2,2 - 7,8
délka po jícen (μm)	225 - 388	55 - 116	171 - 205	120 - 146
délka po exkreční porus (μm)	92 - 170	47 - 106	60 - 101	36 - 74
délka po nervový prstenec (μm)	212 - 272	132 - 229	131 - 197	87 - 116
vulva v % délky	50 - 53	48 - 60	-	-
délka ocasu (μm)	53 - 100	30 - 49	33 - 49	28 - 41
šířka ocasu (μm)	115 - 258	40 - 89	47 - 56	33 - 59
délka ocasního hrbolu (μm)	7,9 - 18,2	1,1 - 6,6	-	-
délka spikulí (μm)	-	-	70 - 97	51 - 71
délka gubernákula (μm)	-	-	46 - 59	38 - 56
délka mukronu (μm)	-	-	2,0 - 3,8	1,7 - 4,0

Tabulka 3 Vybrané rozměry invazní larvy *Steinernema feltiae* (Wouts 1980)

znak	
celková délka (mm)	750 - 950
šířka těla (μm)	22 - 27
délka stoma (μm)	11,5 - 15,5
délka jícnu (μm)	115 - 150
šířka bazálního bulbu (μm)	9 - 12
délka bakteriálního váčku (μm)	18 - 37
délka po jícnu (μm)	53 - 67
délka po exkrementním porusu (μm)	89 - 108
délka po nervovém prstencu (μm)	212 - 272
délka ocasu (μm)	71 - 92

8.2 Fotodokumentace



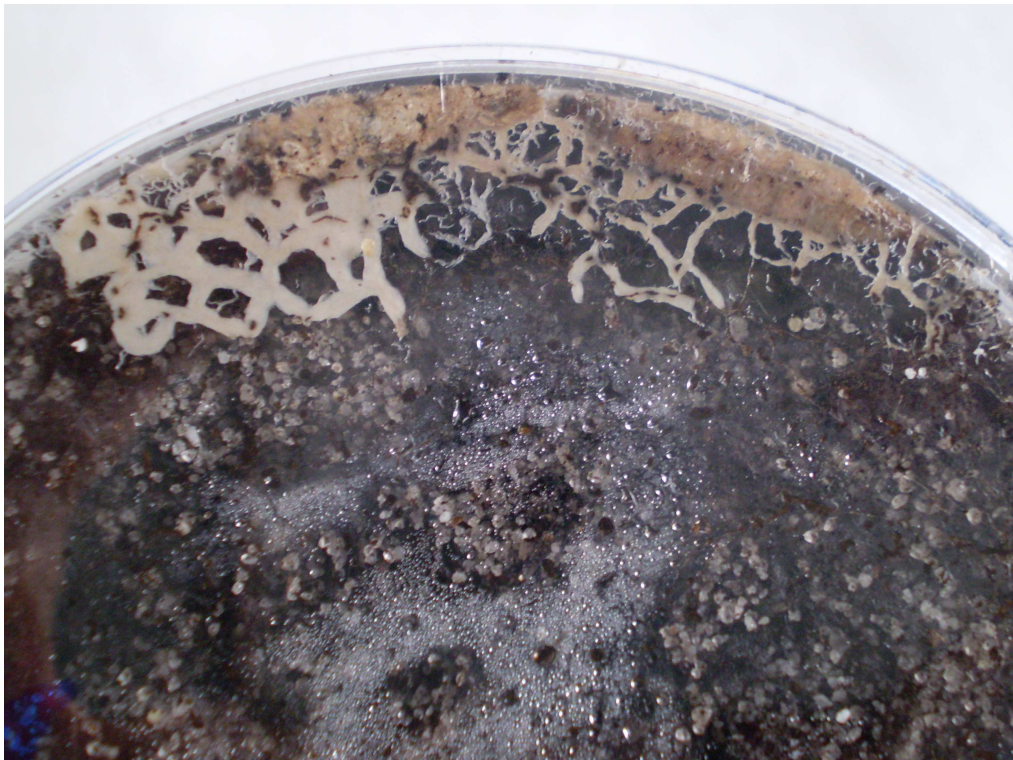
Introdukce larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* do Petriho misek
(foto Štěpánka Radová)



Aplikace suspenze entomopatogéních hlístic nebo hub o definované koncentraci na
povrch substrátu (foto Štěpánka Radová)



Uchování naintrodukovaných jednotek v plastickém sáčku v termostatu (teplota 22 ± 1 °C, fotoperioda 0/24) (foto Štěpánka Radová)



Invarní larvy hlístice *Steinernema arenarium* opouštějící těla larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* (foto Štěpánka Radová)



Larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* 7 dní po aplikaci suspenze *Beauveria bassiana* o koncentraci $1,0 \cdot 10^5$ /ml půdy (foto Tereza Šillerová)



Larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* 14 dní po aplikaci suspenze *Beauveria bassiana* o koncentraci $1,0 \cdot 10^5$ /ml půdy (foto Tereza Šillerová)



Larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* 14 dní po aplikaci *Beauveria bassiana* a *Steinernema arenarium* (foto Štěpánka Radová)