

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta

Obor : Všeobecné zemědělství

Specializace : Rostlinolékařství

Katedra : Rostlinná výroba

Diplomová práce

**Monitoring výskytu a charakterizace entomopatogenních hub přirozeně
asociovaných s populacemi lýkožrouta smrkového *Ips typographus* L.
(Coleoptera, Scolytidae) ve smrčínách NP a CHKO Šumava**

Vedoucí diplomové práce:

Prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.

Autorka diplomové práce:

Hana Kuchynková

2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a použila jsem pouze prameny, které cituji v příloženém seznamu literatury.

.....
Hana Kuchynková

Děkuji Prof. Ing. Zdeňku Landovi, Csc. Za metodické a odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné rady, které mi poskytl v průběhu zpracování této diplomové práce.

Zároveň děkuji Ing. Andree Bohaté, Phd. a pracovnícím Katedry rostlinné výroby, oddělení ochrany rostlin, Olze Divišové a Marii Nýdlové za pomoc a technickou asistenci při zakládání pokusů.

Zvláště bych chtěla poděkovat své rodině za všestrannou podporu v průběhu celého studia na vysoké škole.

Hana Kuchynková

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	9
2.1. NP a CHKO Šumava.....	9
2.2. Morfologie a charakteristika lýkožrouta smrkového.....	10
2.3. Bionomie lýkožrouta smrkového	12
2.4. Integrovaná ochrana rostlin.....	15
2.5. Entomopatogenní houby asociované s lýkožroutem smrkovým	18
2.5.1. Klasifikace hub	18
2.5.2. Vývoj entomopatogenních hub.....	18
2.5.3. Biotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub	20
2.5.4. Abiotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub	20
2.5.5. Rod <i>Beauveria</i>	22
2.5.6. Rod <i>Isaria</i> (=Paecilomyces).....	25
2.5.7. Rod <i>Lecanicillium</i> Zare & Gams	27
2.5.8. Rod <i>Metarhizium</i> Sorokin.....	28
2.6. Metody izolace entomopatogenních hub.....	30
3. METODIKA	32
3.1. Sběr vzorků	32
3.2. Zpracování a analýza vzorků.....	32
3.2.1. Metody izolace kmenů <i>B. bassiana</i>	32
3.3 Uchovávání kmenů.....	35
3.4. Polyfaktoriální hodnocení vybraných kmenů entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> odizolovaných při velkoplošném monitoringu na vybraných lokalitách NP Šumava	36
3.5. Stanovení radiálního růstu.....	37
3.6. Přečištění a identifikace	38
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	39
4.1. Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v lokalitách souvisejících s výskytem lýkožrouta smrkového <i>Ips typographus</i> L. (Coleoptera, Scolytidae) v oblasti NP a CHKO Šumava ..	39
4.2. „In vitro“ charakteristika – stanovení radiálního růstu	45
4.3. Polyfaktoriální hodnocení vybraných kmenů entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> odizolovaných při velkoplošném monitoringu na vybraných lokalitách NP Šumava	46

5. DISKUSE	50
5.1. Metody monitoringu a izolace entomopatogenních hub v NP a CHKO Šumava	50
5.2. „In vitro“ charakteristika – stanovení radiálního růstu	51
5.3. Polyfaktoriální hodnocení vybraných kmenů entomopatogenní houby <i>Beauveria bassiana</i> odizolovaných při velkoplošném monitoringu na vybraných lokalitách NP Šumava.....	52
6. ZÁVĚR	53
6.1. Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub.....	53
6.2. Polyfaktoriální hodnocení kmenů entomopatogenních hub a „In vitro“ charakteristika	54
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
8. PŘÍLOHY	60
8.1. Indexy porůstání.....	60

1. Úvod

Ochrana rostlin před hmyzími škůdci se v dnešní době provádí převážně pomocí chemických látek (pesticidů), jejichž používání je však z hlediska ochrany prostředí a bezpečnosti při manipulaci problematické. U hmyzích škůdců postupně vzniká rezistence, což vede k nutnosti zvyšovat dávky či vyvíjet nové účinnější chemické látky. Zvyšující se dávky chemických látek ale iniciují po určité době vznik další rezistence i na tyto silnější pesticidní látky a koloběh se znovu opakuje. Bylo prokázáno, že proti zvyšování rezistence hmyzích škůdců nejlépe působí prostředky na principu biologického boje.

Biologickému boji proti hmyzím škůdcům se věnuje obor ochrany rostlin, označovaný jako integrovaná ochrana. Integrovaná ochrana rostlin (IOR) je soubor vzájemně se doplňujících agrotechnických, biologických, chemických a fyzikálních metod, které bez nežádoucích vedlejších negativních ekologických a toxikologických vlivů ve svém komplexu dlouhodobě regulují populace škodlivých činitelů.

Významnou součástí integrované ochrany rostlin je biologická část, jejímž základem je bioracionální přístup, kde není primárním požadavkem vyhubení škodlivého organismu, ale pouze regulace hustoty populace daného škůdce. Škůdce je takový organismus, který při svém přemnožení na hostitelské rostlině způsobuje různá poškození, a proto by se jeho populační hustota měla stále pohybovat pod prahem škodlivosti. V NP a CHKO Šumava je považován za největšího škůdce lýkožrout smrkový.

Jednou z možností biologické ochrany rostlin je využití entomopatogenních činitelů, mezi něž patří entomopatogenní viry, houby, bakterie a hlístice. Entomopatogenní činitelé jsou organismy, které jsou patogenní pro hmyz. Význam využívání těchto organismů stoupá díky jejich pozitivním vlastnostem při manipulaci, vůči ochraně prostředí a bezpečnosti lidí, naproti tomu jejich nevýhodou je limitovaná možnost distribuce a skladování a také nutnost synchronizace masového chovu.

Při zavedení systému biologické ochrany lesních porostů do praxe bylo nutné získat informace o entomopatogenních houbách v přirozeném lesním ekosystému prostřednictvím monitoringu dané oblasti, v našem případě NP a CHKO Šumava. Pomocí experimentů jsme se pokusili zjistit, zda se nalezené entomopatogenní druhy hub dají produkovat ve větším množství a introdukovat zpátky do přirozeného prostředí.

Anotace

Využití entomopatogenních organismů je jednou z možností biologické ochrany rostlin, která se v dnešní době preferuje před ochranou chemickou. Na poli vědeckého výzkumu se zájem o tyto organismy v posledních letech výrazně zvýšil, zvláště z toho důvodu, že se s jejich použitím můžeme vyhnout zvyšování dávek chemických látek, na které si škodlivé organismy po určité době vypěstují rezistenci. V každém ekosystému se nacházejí škodliví činitelé a jejich přirození nepřátelé.

Monitoringem v NP a CHKO Šumava jsme chtěli prokázat výskyt entomopatogenních druhů hub, tedy přirozených nepřátel hmyzu. Konkrétním škodlivým činitelem pro nás byl lýkožrout smrkový. Pomocí lokalizace výskytu entomopatogenních hub byly získány kmeny několika druhů (*Beauveria* spp., *Isaria* spp., *Metarhizium* spp., *Lecanicillium* spp.), se kterými byly prováděny pokusy, určující jejich entomopatogenní potenciál. Hodnocení kmenů bylo prováděno stanovením radiálního růstu a výtěžnosti spor kmenů těchto entomopatogenních hub. Kmeny byly po provedených testováních převedeny do formy alginátových pelet a uloženy do mykologické sbírky na katedře rostlinné výroby pro účely dalšího zkoumání.

Z monitoringu a následných pokusů jsme získali cenné informace o běžném výskytu hub v prostředí a taktéž údaje o předpokladech pro využití pro integrovanou ochranu rostlin. Pro další výzkum byly použity nalezené kmeny houby *Beauveria bassiana*, která podle nálezů platila za nejvíce patogenní houbu vůči lýkožroutu smrkovému a její nejvíce produktivní kmeny (NP 0030, NP 0052) byly doporučili právě pro použití v biologickém boji proti lýkožroutu smrkovému. Zbylé nalezené druhy entomopatogenních hub jsou předmětem dalšího zkoumání na katedře rostlinné výroby Jihočeské univerzity.

Annotation

The use of entomopathogenic organisms is one of the possibilities of biological plant protection, which now prefers the protection of the chemical. In the field of scientific research with an interest in these organisms in recent years has increased significantly, particularly on the grounds that their use can avoid increasing the doses of chemicals that have harmful organisms after a period of vypěstují resistance. In any ecosystem are harmful agents and their natural enemies.

By the monitoring Šumava NP and PLA we wanted to demonstrate the occurrence of entomopathogenic fungi, the natural enemies of insects. Specific harmful factor for us was spruce bark beetle. Using the location of occurrence of entomopathogenic fungi were obtained strains of several species (*Beauveria* spp., *Isaria* spp., *Metarhizium* spp. *Lecanicillium* spp.), Which attempts were made, determining the entomopathogenic potential. Rating strains was carried out by setting radial growth and yield of spores of these strains of entomopathogenic fungi. Strains were transferred to the testing carried out forms alginate pellets and stored in mycology collections in the Department of crop production for the purpose of further examination.

The monitoring and follow-up experiments we gained valuable information about the current incidence of fungi in the environment and also data on the assumptions for the use of integrated plant protection. For further research have been used identified fungi *Beauveria bassiana* strains, which, according to the findings apply to most pathogenic sponge against lýkožroutu smrkovému and its most productive strains (NP 0030, NP 0052) are currently recommended for use in the biological fight against spruce bark beetle. The remaining species found entomopathogenic fungi are the subject of further examination at the Department of Plant Production University of South Bohemia.

2. Literární rešerše

2.1. NP a CHKO Šumava

Národní park Šumava je jedním ze čtyř národních parků rozkládajících se na území České republiky. Byl založen v roce 1991 z rozhodnutí Ministerstva životního prostředí za účelem státní správy na úseku ochrany přírody a krajiny, ochrany zemědělského půdního fondu, myslivosti a rybářství v rozsahu daném zákonem č. 114/1992 Sb., O ochraně přírody a krajiny (Anonymus 1).

Od roku 1984 se NP Šumava potýká s problémem výskytu lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). Počátkem výskytu lýkožrouta smrkového byl právě tento rok (1984), kdy na Šumavě padlo působením vichřice téměř 171 000 m³ a v roce 1985 dalších 355 000 m³ dřeva. V témže roce bylo v Bavorském NP, který sousedí s NP Šumava, ponecháno cca 15 000 m³ nezpracovaného dříví po větrné kalamitě, odkud se lýkožrout smrkový rozšířil na naše území a množil se bez jakéhokoli zásahu člověka. Došlo k postupnému nárůstu kůrovcové populace v průběhu tří let na "kalamitní" stav, kdy vznikala kůrovcová ohniska a s nimi prudce narůstala i potřeba asanačních zásahů (Hynek a Juha, 2004).

Od roku 2008 se problematikou lýkožrouta smrkového zabývá i Katedra rostlinné výroby Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.



Obr.č. 2.1. Oblasti NP Šumava s výskytem lýkožrouta smrkového (Kučera, 2009)

2.2. Morfologie a charakteristika lýkožrouta smrkového

Systematické zařazení

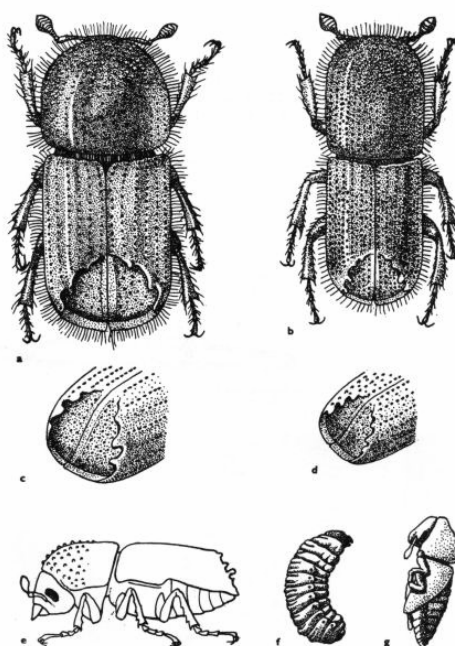
Třída : Hmyz – *Insecta*

Řád : Brouci – *Coleoptera*

Čeleď : Kůrovcovití – *Scolytidae*

Rod : Lýkožrout – *Ips* (De Geer, 1775)

Druh : Lýkožrout smrkový – *Ips typographus* (Linnaeus, 1758)



Obr. č. 2.2.1. Rozpoznávací znaky lýkožroutů (Forst, 1985)

a - lýkožrout smrkový má na krovkách mezirýží hladké a paličku tykadlovou se zřetelně prohýbanými švy; *b* - lýkožrout menší má mezirýží řídce tečkované a paličku tykadlovou s rovnými švy; *c*, *d* - zadečky jsou shodné v počtu čtyř zoubků, z nichž třetí je největší; *e* - pohled na imago z boku, štít vpředu hrbolkovaný, vzadu jemně tečkovaný; *f* - larva; *g* - kukla na níž jsou patrný všechny orgány dospělé

Morfologie dospělé

Lýkožrout smrkový je asi 4,2 – 5,5 mm veliký brouk. Je červenohnědě zbarven, je lesklý a na svém těle má světle žluté chloupky, končetiny a tykadla jsou světlejší. Tykadla má paličkovitá s lomeným švem a plochou tupě oválnou paličkou složenou ze tří článků. Štít je v přední části hrbolkatý, v zadní části jemně tečkovaný a neobroubený. Krovky jsou krátké a válcovité, v řádkách tečkované. Mezi řádkami teček jsou hladké mezery. Na okraji zadní

části krovek má vyhloubeny čtyři zoubky, z nichž třetí zoubek shora je největší. Mladý brouk má barvu žlutavou až hnědavou a dospíváním tmavne až po hnědočernou (Pfeffer, 1989).

Morfologie vajíčka

Vajíčko je oválné, lesklé bílé barvy. Velikostně se pohybuje v rozmezí 0,6 – 1,0 mm. Mají jemnou, měkkou, průhlednou skořápku. V prvních stádiích embryonálního vývoje jsou bílá, později se na povrchu jeví stín zárodku (Pfeffer, 1989).

Morfologie larvy

Larvy lýkožrouta smrkového jsou apodní (beznohé), bílé až zažloutlé. Hlava je zahnědlá a nepatrně určuje vzhled těla (hemicephalní larvy). Na pevné chitinové lebeční schránce mají silná kusadla. Tělo je obloukovitě zakřiveno, jelikož hřbetní část těla je mohutněji vyvinuta než část břišní. Hřbet se skládá ze tří článků a břišní část je nečlánkovaná. Povrch těla larvy je pokryt světlými brvami. Larva se celkem třikrát svléká a dospělá larva dosahuje velikosti 5 – 7 mm (Lekander, 1968).

Morfologie kukly

Kukla je volná, bělavá a dosahuje velikosti 5 – 6 mm. Tvar kukly naznačuje zřetelně tvar dospělého brouka. Na kukle se nacházejí brvy, které porůstají štít a zadeček a jemné hrbolkovité háčky, které zdobí svrchní část zadečkových článků, z nichž poslední, devátý, nese pár silnějších háčků mířících do stran, kterými se kukla opírá o stěny kolébky, v níž odpočívá (Pfeffer, 1989).

2.3. Bionomie lýkožrouta smrkového

Stadium vajíčka trvá zpravidla 6 – 18 dní ve vegetačním období hostitele. Samička klade 1 – 2 vajíčka denně, za celý svůj život naklade zhruba 20 – 100 vajíček. Místem naklazení vajíček jsou vyhlodané vruby na obou stranách matečné chodby. Samička je během klazení vajíček vícekrát oplozována (Zumr, 1995).

Larvy se líhnou z vajíček po 16 – 18 dnech a zaírají se do lýka. Zpočátku vyžírají lýko kolmo na směr matečné chodby, později se tvar mění na vlnovitý. Larvové chodby se nikdy nekřížují. V chodbě zanechávají hnědavý trus a zbytky rozdrčeného lýka. Délka vývoje larev je závislá na teplotě. Při optimální teplotě 29°C je ukončen vývin larev za týden, při teplotě 10°C se prodlužuje na 7 – 8 týdnů, při přezimování se prodlužuje i na několik měsíců (Pfeffer, 1955).

Stadium kukly trvá 6 – 17 dnů. Během vývoje se kukla nachází v kuklové kolébce. Při líhnutí kukla puká podélným hřbetním švem a vylézá z ní měkký, bělavý brouk s tmavě zbarvenýma očima. Brouk vylíhlý z kukly je tedy zpočátku bělavý, později žlutne až hnědne, jak mu zpevňuje pokožka. Poměr pohlaví vylíhlých brouků je v poměru 1 : 1. Vylíhlí dospělci jsou sterilní a musí pohlavně dozrát. Pohlavní dozrávání u lýkožrouta trvá asi 2 – 3 týdny a právě tehdy se zbarvuje dohněda. V tomto období probíhá regenerační žír a vzniká párovitě se vinoucí chodba bez příznaků požeru (Zumr, 1985).

Přezimování a způsob života

Lýkožrout smrkový má dvě generace v roce, jarní a letní pokolení. Přezimuje nejčastěji pod kůrou stromu, a to ve všech vývojových stádiích mimo vajíčka. Dospělci především zalézají pod kůru poražených i stojících stromů, pod kůru starých souší, pařezů, kořenů a do úlomků kůry na zemi. Menší část populace (asi 2 – 6 %) zimuje i v hrabance (Pfeffer, 1955).

Od konce dubna do začátku května brouci začínají vylétat ze svých zimovišť a napadají chřadnoucí či poražené stromy, kde se živí lýkem. Rojení začíná při teplotě kůry či hrabanky 14°C, při 20°C je rojení dost silné a vrcholí při 29°C, kdy nastává pro život lýkožrouta tepelné optimum. Mezi poletujícími brouky rozeznáváme dvě skupiny, a to brouky neúplně dospělé, neschopné dosud rozmnožování a úplně dospělé, schopné svatebního rojení. První létají vždy o 1 – 2 týdny dříve než nastane pravé svatební rojení a hromadně nalétávají

na okraje odchlíplé čerstvé kůry na pařezech, na krajích neoloupaných klád, na odříznuté čerstvé vrcholky stromů, na spodní stranu silnějších, na zemi ležících, čerstvě odseknutých větví, kde hlodají svůj úživný žír a pohlavně dospívají. Po 7 – 14 dnech žír ukončují a nalétávají na kmeny, aby se zde rozmnožovali (Pfeffer, 1955).

Samečci se nejprve zavrtávají do stromu a vyhlodávají snubní komůrku. Hlodání snubní komůrky trvá 2 – 4 dny. Po vyhloubení snubní komůrky dochází k lákání samic pomocí sexuálního atraktantu (výměšek trávicího ústrojí samečků). Atraktant většinou přivábí dvě samičky, které vyhledávají místo závrtu svým jemným čichem, jehož čidla jsou umístěna v paličkách tykadel. Po spáření, které se odbývá ve snubní komůrce, začnou samičky hlodat v kůře matečné chodby a brzy klást vajíčka (Pfeffer, 1955).

Z matečných chodeb vybíhají chodby larvové, které zpočátku vedou těsně vedle sebe a nakonec se oddalují. Z jedné matečné chodby vybíhá napravo i nalevo nejčastěji 10 – 25 larvových chodeb. U požerků více než dvou ramenných vybíhají zpravidla larvové chodby pouze na jednu stranu. Celkem vybíhá z jedné matečné chodby průměrně 100 – 140 larvových chodeb. Zpočátku je chodba rovná, pak se vlnovitě stáčí, avšak zhruba ve směru kolmém na osu matečné chodby. Nejdelší jsou chodby larev, které se vylíhly poblíže snubní komůrky.

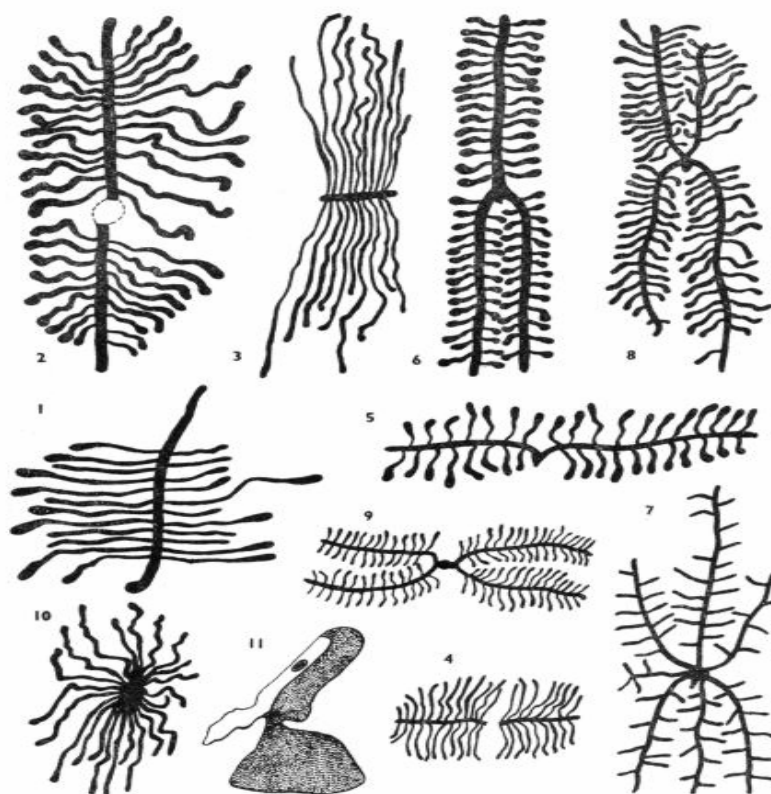
Hustota požerků na kmenech se odvíjí od síly lýka a intenzity náletu lýkožrouta. Největší hustota požerků byla zjištěna v úseku střední části kmene. Není-li kůrovec přemnožen, jeho vývin je vázán na kůru vývrátů smrkových kmenů, které vznikly podzimními, zimními i jarními vichřicemi nebo sněhovými polomy. Teprve při silném přemnožení napadá i stromy zdravé (Pfeffer, 1955).

Charakteristika požerku

Požerek je pro lýkožrouta velice typický. Jak už bylo zmíněno, skládá se ze snubní komůrky a chodbiček. Matečné chodby míří od snubní komůrky nahoru a dolů, jsou vždy svislé a rovné. Jejich délka se liší podle stupně přemnožení, při silnějším výskytu se délka zkracuje a objevují se požerky jednoramenné. Požerek je nejčastěji dvouramenný, tj. jedna chodba matečná míří směrem nahoru a druhá dolů. Vyskytují se ale často i požerky tříramenné, kdy jedna míří jedním směrem a zbylé dvě směrem opačným. Požerky čtyř- až šestiramenné jsou již méně časté.

Požerky se objevují zejména na vzrostlých stromech se silnější vrstvou lýka. Těmto požadavkům odpovídají stromy ve stáří přes 80 let. Pouze při velmi silném přemnožení napadá stromy mladší se slabší vrstvou lýka (Pfeffer, 1955).

První nálet kůrovců směřuje nejčastěji na místa, kde suché větve koruny přecházejí ve větve zelené. Odtud postupně osazuje lýkožrout kmen nahoru a dolů. Při invazi letního pokolení lýkožrouta se často nálet omezuje pouze na horní část kmene, zatímco jeho spodní část zůstává neporušená. Příznakem výskytu je hnědavá drť mezi šupinami borky, závrtové otvory, ronění pryskyřice, šednutí a postupné žloutnutí korun, které se při jarním náletu projeví za 3 týdny. Při letním napadení zůstanou stromy i přes zimu zelené, opadávají z nich zelené jehlice a žloutnou až na jaře (Pfeffer, 1955).



Obr. č. 2.3.1. Tvary požerků kůrovců (Forst, 1985)

1 - jednoramenný podélný (lýkohub sosnový), 2 - dvou-ramenný podélný (lýkožrout smrkový), 3 - jednoramenný příčný (bělokaz dubový), 4 - dvouramenný příčný (lýkohub jilmový), 5 - svorkovitý (lýkohub menší), 6 - vidlicovitý (lýkožrout borový), 7 - hvězdicovitý (lýkožrout vrcholkový), 8 - podélně hvězdicovitý (lýkožrout menší), 9 - příčně hvězdicovitý (lýkožrout jedlový), 10 - plošný broučí (korohlod jedlový), 11 - společný larvový (lýkohub smrkový)

2.4. Integrovaná ochrana rostlin

Podle FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) je integrovaná ochrana rostlin systémem regulace četností populací škodlivých činitelů, který využívá všech metod regulace těchto činitelů s ohledem na ekologické, ekonomické, toxikologické a hygienické požadavky, se záměrem udržet jejich populace na tolerovatelné úrovni, při preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace jejich populační hustoty (Anonymus 2).

Systém integrované ochrany rostlin (IOR) se ubírá dvěma směry, konvenčním a biointenzivním. Prioritním požadavkem biointenzivní IOR je udržení četnosti populací škůdců a suprese vývoje a šíření chorob kulturních rostlin bez využití syntetických pesticidů, zatímco konvenční IOR akceptuje používání těchto syntetických látek. Biointenzivní IOR zahrnuje mj. biologické prostředky a preparáty, a monitoring a identifikace škůdců a přirozených nepřátel. V nejširším možném pojetí jsou do kategorie „biologická ochrana“ zahrnovány nejen metody záměrně využívající různé skupiny a druhy přirozených nepřátel a antagonistů, ale i metody bioracionální, agrotechnické, případně i genetické (Landa, 2002).

Součástí biointenzivního systému IOR jsou biologické metody ochrany rostlin, tj. ochrana rostlin prováděná biologickými prostředky, a to využíváním přirozených nepřátel škodlivých činitelů nebo antagonistických organismů, jejímž cílem je regulace četnosti populací škodlivých činitelů na tolerovatelné úrovni – pod prahem škodlivosti (<http://www.agromanual.cz/cz/atlas/vykladovy-slovník/biologicka-ochrana-rostlin.html>).

Biologická ochrana lesa je jednou ze složek biologických metod ochrany rostlin. Jedná se konkrétně o zjišťování a evidování výskytu škodlivých činitelů a vzniklých poškození, obranu proti vývoji, šíření a přemnožení škodlivých organismů (např. kůrovec, václavka apod.). V rámci biologické ochrany lesa jsou také prováděna preventivní opatření proti vzniku lesních požárů a mimořádných okolností (větrné a sněhové kalamity, přemnožení škůdců apod.) (Anonymus 3).

Biologické metody ochrany rostlin jsou založeny na principu využívání entomopatogenních mikroorganismů, které mají schopnost vyvolat primární onemocnění hmyzu. A právě podle použití některého z druhů entomopatogenních mikroorganismů se přirozené metody regulace dělí na (Anonym 4):

1. Biopreparáty na bázi entomopatogenních virů

Entomopatogenních virů se používá více než 1600 druhů, u nichž byla prokázána schopnost vyvolat primární onemocnění u více než 1000 druhů hmyzu. Pro biologickou ochranu lesa se např. využívají polyedrické viry (proti obaleči dubovému). Dalšími typickými hostiteli jsou housenky bekyní nebo štětconošů, které masově hynou a visí v hroznech na vrcholcích větví, které jsou potaženy bílou polyedrovou tekutinou z prasklých housenek. Masové projevy nákazy se projevují ve vrcholném období gradace, většinou již na defoliovanych stromech (Weiser, 1966).

Méně běžná je nákaza poxvirem, která se vyskytuje u ponrav chroustů a jiných listorohých brouků a vyvolává hnutí larev před kuklením. Poxvirus se vyskytuje i ve střevním epitelu dospělých brouků kůrovce. Nákaza se přenáší trusem a pohybem brouků a infikují se hlavně žlutí brouci těsně po vylíhnutí, při úživném žíru (Pultar, Weiser, 2004).

2. Biopreparáty na bázi entomopatogenních bakterií

Doposud je evidováno více než 90 druhů entomopatogenních bakterií, které jako entomopatogenní vystupují fakultativně či obligatorně. Nejvýznamnější skupinou entomopatogenních druhů je rod *Bacillus spp.* Zástupce tohoto rodu – *Bacillus thuringiensis* se využívá především jako mikrobiální insekticid. Výhodou je silná toxicita vůči cílovému hmyzu a nepoškození necílových organismů (včetně člověka a většiny přirozených nepřátel škůdců). U lesních škůdců zatím neznáme přírodní bakteriální nákazu, která by je účinně redukovala (Weiser, 1966).

3. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hlístic

Mezi používané entomopatogenní hlístice patří řád *Rhabditida*, rod *Steinernema spp.* a *Heterorhabditis spp.* Zástupci rodu *Steinernema spp.* jsou v lesních biotopech běžní všude tam, kde je stálé množství hmyzu přežívajícího v půdě, jako jsou larvy pilatek, ponravy, larvy muchnic a brouků, nebo housenky, které se v půdě kuklí. Do chodeb kůrovce nepronikají.

Steinernema feltiae (Filipjev) napadá larvy muchnic, lalokonosců nebo klikorohů. Hodí se pro biologický boj se škůdci v kořenovém balu okrasných dřevin nebo ve školkách (Weiser, 1966).

4. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Houboví patogeni se u lesních škůdců rekrutují z několika skupin. Mezi nejčastěji využívané entomopatogenní mikroorganismy patří houby řádu *Moniliales*, *Entomophthorales*, *Blastocladales* a *Lagenidiales*. Přední místo zauímají houby *Beauveria bassiana* (Bals.) a *Beauveria brongniartii* (Sac.). Běžně nacházíme houbou napadené kůrovce pod starší, silněji napadenou borkou. Preparát se hodí k ošetření housenic pilatek, školkového materiálu a škůdců v korunách stromů (chrousti) nebo v půdě (ponravy, lalokonosci, klikoroh) (Weiser, 1966).

V půdách školek se používá proti larvám brouků *Metarhizium anisopliae*, proti červcům *Lecanicillium lecanii* a proti pilatkám a ploskohřbetkám *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) a *Isaria farinosa* (= *P. farinosus*) (Weiser, 1966).

2.5. Entomopatogenní houby asociované s lýkožroutem smrkovým

2.5.1. Klasifikace hub

Houby se řadí do třídy *Eumycota* a zahrnují 750 druhů z 56 rodů, které vystupují jako patogeni či parazité členovců (Chandler a kol., 2000). Nejvíce entomopatogenních druhů hub je zařazeno mezi *Zygomycotina* (*Zygomycetes: Entomophthorales*), *Ascomycotina* (*Pyrenomycetes: Spheariales; Laboulbeniomycetes: Laboulbeniales*) a *Deuteromycotina* (*Hyphomycetes: Moniliales*). Tyto skupiny platí za nejvíce virulentní kmeny patogenů hmyzu a roztočů (Poinar, 1998).

Houby mají jedno z nejširších hostitelských spekter v rámci patogenů členovců (Inglis a kol., 2001), které napadají celou řadu druhů, rodů, čeledí nebo i vyšších taxonomických skupin, naproti tomu můžeme nalézt mezi entomopatogenními houbami vysoce specifické druhy, které se vyskytují pouze na jednom hostiteli nebo jen na určitém vývojovém stádiu daného hostitele (Weiser, 1966).

Entomopatogenní houby parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu. Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na druzích patřících do řádů ploštice (*Hemiptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*). Nejčastěji infikovaným stádiem hmyzu jsou larvy, případně kukly. Méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu (př. *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*), *Lecanicillium lecanii* i *Beauveria bassiana* infikují vajíčka) (Landa, 1998).

2.5.2. Vývoj entomopatogenních hub

Vývoj entomopatogenních hub probíhá ve třech stupních. Prvním stupněm je přichycení a klíčení konidií na povrchu těla hostitele, druhým stupněm je parazitická fáze (pronikání do těla hostitele, proliferace), a posledním stupněm je saprofytická fáze (sporulace a tvorba nových konidií).

K šíření konidií v prostředí dochází pomocí několika mechanismů, např. větrem nebo vodou, kontaktem zdravých jedinců s jedinci infikovanými, či tzv. autodiseminací, při které dochází k šíření nákazy uvnitř populace vnitropopulačními procesy (migrace, kopulace, kladení vajíček aj.) (Landa, 1992).

Houbové onemocnění zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie uchycené na těle hostitele. Konidie některých druhů hub jsou pro přichycení na tělo hostitele vybaveny adhezívními substancemi (mucilageny), pomocí kterých vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu, např. *Lecanicillium lecanii* (Wraight a kol., 1990). *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) a *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* produkují suché, silně hydrofobní konidie, které jsou přichyceny k povrchu hostitele pomocí elektrostatických sil, případně molekulární interakcí mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikule hostitele (např. hemaglutiny, N – acetylglukosaminy, glykoproteiny, steroly, polární lipidy aj.) (Malsam a kol., 2002).

Po přichycení na tělo hostitele dochází ke klíčení a počátečnímu růstu, kdy patogen využívá svoje zásobní látky (Samson a Rombach, 1985). Nejdříve dochází k výraznému zvětšení kolonie (bobtnání) a ke komplexní přestavbě stěny konidie, po které se začne tvořit primární klíček. V určité fázi naklíčení začíná primární klíček sloužit jako penetrující hyfa, která proniká do těla hostitele (Boucias a kol., 1988).

Na procesu penetrace se podílí řada faktorů, zejména faktory prostředí a přítomnost inhibičních látek, jako jsou mastné kyseliny nebo melaniny, které jsou obsaženy v hmyzí kutikule (Gillespie a kol., 2000). Na povrchu těla naklíčené konidie penetrují kutikulu hostitele hyfami přímo, nebo se nejprve rozrůstají po povrchu jeho těla. Hyfy prorůstají do těla hostitele přirozenými otvory, mezitělními segmenty, nebo aktivní penetrací konidiálního klíčku do těla (Osborne a Landa, 1992).

Po proniknutí do těla hostitele se patogen velice rychle rozrůstá v tělní dutině, kde tvoří jedno- či vícebuněčná hyfová tělíška (blastospory). Usmrcení hostitele patogenem je způsobeno kombinací několika dějů, včetně potravní deficiente hostitele, invaze patogena do tělních tkání hostitele a jejich destrukce (Inglis a kol., 2001).

Usmrcení hostitele naznačuje ukončení parazitické fáze a začátek fáze saprotrofní. Po usmrcení hostitele dochází k prorůstání houby na povrch jeho těla, začátku proliferace. Na vzdušném myceliu se tvoří fruktifikační orgány, saprotrofní fáze končí úplnou sporulací (Osborne a Landa, 1992).

2.5.3. Biotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

Účinnost entomopatogenních hub ovlivňuje v první řadě patogenita samotné houby. Patogenita je schopnost patogena vyvolat onemocnění v hmyzí populaci a je závislá na mnoha faktorech, jako je fyziologie daného hostitele, fyziologie samotné houby a podmínky vnějšího prostředí. Entomopatogenní houby mají velice široké spektrum hostitelů oproti ostatním entomopatogenním mikroorganismům. Hostitelské spektrum je druhově odlišné (Inglis a kol., 2001).

Hostitelská rostlina významně ovlivňuje přímo či nepřímo účinnost hub produkcí výměšků, jejichž chemické složení a koncentrace určují životnost konidií nebo náchylnost škůdců k entomopatogenním houbám (Vega a kol., 1997).

Dalšími faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub jsou např. populační hustota, chování a bionomie hostitele, vývojové stadium, dostupnost potravy, genetický základ či stres (Inglis a kol., 2001).

2.5.4. Abiotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

Entomopatogenní houby jsou ovlivňované řadou abiotických faktorů, a to jak pozitivně, tak negativně. K faktorům, které ovlivňují růst a vývoj entomopatogenních hub, patří např. UV záření. Ultrafialové záření je škodlivé pro všechny mikroorganismy (Inglis a kol., 1995). Toto záření může rozhodovat o velmi krátké perzistenci houby na povrchu rostlin, zejména konidie, hyfová tělíska a hyfy všech *Hyphomycetes*. Vlivem UV záření se u konidií, které zůstaly životaschopné, snižuje rychlost klíčení, což může být následkem přímého poškození nukleových kyselin a proteinů, obrannou reakcí konidií proti UV záření nebo využitím energie na odstranění poškození vzniklého zářením (Moore a kol., 1993). Konidie, blastospory a hyfy všech taxonů hub, náležejících do třídy *Hyphomycetes* jsou velmi vnímavé k poškození slunečním zářením, v rámci jednotlivých druhů entomopatogenních hub byl pozorován významný rozdíl (Inglis a kol., 2001).

Dalším abiotickým faktorem jsou srážky. Kapénky vody mohou sloužit k uvolnění konidií ze substrátu a napomáhat k šíření propagulí.

Jiným určujícím faktorem je teplota a relativní vzdušná vlhkost. Teplotní omezení není pouze výsledkem okolních podmínek, ale rovněž i schopností mnoha druhů hmyzu zvýšit svoji tělesnou teplotu a tak ovlivnit průběh infekce. Hmyz může zvýšit svou teplotu například výběrem vhodného přirozeného prostředí (slunné lokality), což může mít za následek nižší

frekvenci onemocnění (Inglis a kol., 2001). Pro většinu entomopatogenních hub jsou stanoveny teplotní maxima a minima, při jejichž dosažení se zpomaluje a zastavuje vývoj hub (Ekesi a kol., 2007). Optimální teplotní rozmezí pro většinu *Hyphomycetes* je 20 – 25°C, ale infekce a onemocnění se vyskytuje v širším rozmezí, mezi 15 a 30°C. Při teplotách přesahujících 30°C je snižován vegetativní růst a při 37°C ustává zcela.

Vysoká relativní vlhkost nebo volná voda jsou obecným požadavkem entomopatogenních hub pro klíčení infekčních propagulí a formování reprodukčních útvarů mimo hostitelský organismus. Vlhkost rovněž ovlivňuje perzistenci a přežívání hub. Vliv teploty a vlhkosti spolu úzce koreluje. Některé druhy hub mohou tolerovat extrémní teploty při vyšší vzdušné vlhkosti nebo při snadné kondenzaci vody, kdy je ztráta vody minimální (McCoy a kol., 2002).

Půda, která je posledním ovlivňujícím faktorem, vytváří pro entomopatogenní houby optimální podmínky k vývoji (Ekesi a kol., 2007). Zástupci rodů *Beauveria*, *Metarhizium* a *Isaria* (*Paecilomyces*) jsou adaptováni na půdní prostředí, vykazují široké hostitelské spektrum v rámci třídy *Insecta*, obývají podobné niky a mohou tvořit společenstvo. *Lecanicillium* je více spojeno se stanovišti vzdušnými (Mwangi, 1991). *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* jsou poměrně slabými konkurenty v půdě, obvykle můžeme pozorovat relativně omezený vegetativní růst vycházející z hostitele usmrceného v důsledku mykózy (Gottwald a Tedders, 1984). Jedním z důvodů mohou být fungistatické vlastnosti nesterilní půdy (Warcup, 1965). Nesterilní půdní výluh inhiboval klíčení a vývoj zárodečného klíčku u entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Isaria farinosa* (*Paecilomyces farinosus*). Půdní výluh z nejhlubší půdní vrstvy měl menší inhibiční účinky než výluh získaný z horní vrstvy bohaté na humus a obsahující částečně rozloženou organickou hmotu (Clerk, 1969). Silný antagonistický účinek nesterilní půdy ovlivňující klíčivost konidií *Beauveria bassiana* může být způsoben celou řadou faktorů. Jedním z nich může být např. produkce ve vodě rozpustných látek běžnou půdní houbou *Penicillium urticae*, které klíčivost *B. bassiana* inhibují (Lingg, Donaldson, 1981). Dalším druhem běžně se vyskytující saprotrofní houby produkující metabolity s fungicidním účinkem k *Beauveria bassiana* je houba *Aspergillus clavatus* (Majchrowicz a kol., 1990).

2.5.5. Rod *Beauveria*

Systematické zařazení

Říše : *Fungi*

Kmen : *Ascomycota*

Třída : *Sordariomycetes*

Řád : *Hypocreales* – masenkovitě

Čeleď : *Clavicipitaceae* – paličkovitě

Rod *Beauveria* zahrnuje několik druhů. Mezi nejvýznamnějšími zástupci tohoto rodu patří *Beauveria bassiana* (Balsamo.-Crivelli) Vuillemin (konidie globoidního až subgloboidního tvaru, konidiogenní struktury tvoří husté shluky – hrozny), *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch (konidie podlouhlé vejčité až cylindrické, konidiogenní struktury štíhlé, tvořící řídké hrozny) a *Beauveria tenella* (Balsamo.-Crivelli) Vuillemin (vejčité konidie).

Rod *Beauveria* tvoří bílé, nažloutlé nebo slabě růžové mycelium, které je substrátové a bohatě vyvinuté. V době plné sporulace se konidie stávají práškovité až vápnité. Svrchu je mycelium bílé nebo krémové, spodní strana je bezbarvá. Některé kmeny mají vločkovitý až vatovitý vzhled a výšku mycelia 1 cm (Fassatiová, 1979).

Konidiofory jsou tvořeny jednotlivými fialidami nebo svazky či shluky fialid. Tvar fialid je široce lahvovitý nebo jsou to protáhlé větévky na vrcholu zúžené v tenký krček, na jehož konci se vytvářejí první konidie. Druhá konidie vyrůstá bočně z krčku pod první konidií. Na konci fialidy vzniká několikrát lomený krček, s nejstarší konidií na vrcholu (Fassatiová, 1979).

B. bassiana a *B. brongniartii* patří mezi velice známé entomopatogenní houby, které se celosvětově distribují a jsou používány pro biologickou ochranu proti škodlivému hmyzu více než 100 let. To znamená, že po celou tuto dobu byly vyráběny a využívány tuny houbového materiálu obou druhů. Materiál splnil požadavky pro registraci v několika zemích a je stále široce používán pro biologickou ochranu. Doposud nebyl prokázán žádný vážně škodlivý účinek po aplikaci těchto hub (Zimmermann, 2007).

***Beauveria bassiana* (Balsamo.-Crivelli) Vuillemin 1912**

B. bassiana je kosmopolitně rozšířený druh. Běžně se vyskytuje na mnoha druzích hmyzu, zejména těch herbivorních, které jsou alespoň částí svého vývoje vázány na půdu, a vyvolává jejich onemocnění. Výskyt na škůdcích kolonizujících výhradně nadzemní část rostlin je velice ojedinělý (Weisser, 1966).

Lokality přirozeného výskytu houby *B. bassiana* jsou v alpínské půdě, na vřesovištích, rašeliništích, půdách stepního typu, lesních a kultivovaných půdách, navátých píscích a dunách, pouštní půdě a trvale zavodněných půdách (Zimmermann, 2007).

B. bassiana byla izolována z povrchu a vnitřní části rostlin s použitím selektivních médií. Ačkoli *B. bassiana* nepatří běžně mezi vzdušné houby, byla izolována i ze vzduchu speciální metodou povrchové kultivace na tekutém živném médiu (Zimmermann, 2007).

Houba byla izolována i na těchto řádech hmyzu : *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Siphonaptera*, *Isoptera*, *Thysanoptera*, *Mantodea*, *Neuroptera*, *Dermaptera*, *Blattariae* a *Embioptera* (Zimmermann, 2007).

B. bassiana se běžně používá k regulaci populací zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) (Bruck, Lewis, 2002). Mimo to byl prokázán i endofytický vztah s hostitelskou rostlinou (kukuřicí) díky schopnosti houby vyvolat infekci i u larev škodících uvnitř rostliny (Bing, Lewis, 1991).

Na hmyzu infikovaného houbou *B. bassiana* je možné pozorovat melanizační skvrny a červený pigment. Přítomnost červeného pigmentu je způsobena antibiotikem (oosporein) inhibujícím růst bakterií na substrátu kolonizovaném houbou (Ferron, 1981).

Infekce hostitele probíhá pomocí konidií, které pronikají do těla hostitele. Způsobů penetrace je několik, mj. přes kutikulu a stigmata, *per os*, ústním ústrojím (Siebeneicher a kol., 1992) či dýchacím systémem (Clerk a kol., 1965). Uvnitř tělní dutiny tvoří oválné blastospory, které v další fázi infekce klíčí a patogen vytváří husté mycelium, které hostitele zevnitř mumifikuje. Poslední fází vývoje je prorůstání hyfových vláken na povrch hostitele, kde se tvoří nové konidie a životní cyklus patogena se opakuje (Landa, 2007).

B. bassiana produkuje množství toxických látek zahrnujících beauvericin, bassianolide a oosporein, které jsou pro hmyz smrtelné. Po zahubení hostitele roste často houba na hostiteli jako saprotrof a produkované toxiny mohou vystupovat při kompetici s ostatními organizmy vyskytujícími se na mrtvém těle hostitele (Joshi, St.Leger, 1999).

Optimální teplota pro růst a vývoj *Beauveria bassiana* je v rozmezí 23 – 26°C při r.v.v. či vlhkosti substrátu 80 – 100 %. Minimální teplota pro růst mycelia je 5 – 8°C, maximální teplota je 28 – 31°C, při překročení této hranice se růst mycelia zastavuje (Diribeková, 1991).

Entomopatogenních vlastností houby *B. bassiana* se využívá v biologické ochraně proti různým škůdcům polních plodin, v ochraně rychlené zeleniny, okrasných květin a lesních porostů. V praxi se v rámci Evropy běžně používají přípravky na bázi této houby. V USA jsou registrovány přípravky Mycotrol® a Botanigard® proti molícím, mšicím a třásněnkám na skleníkových a okrasných plodinách, a Naturalis® proti savému hmyzu na bavlně a skleníkových kulturách. Ve Francii je registrován přípravek se značkou Ostrinol® proti zavíječi kukuřičnému, zatímco v České republice byl registrován pouze jediný přípravek na bázi *B. bassiana* s obchodním názvem Boverol®.

Při testování přípravku, Kreutz a kol. prokázali, že v koncentraci $1,0 \times 10^7$ konidií/ml při teplotě 25°C přípravek Boverol® způsobuje 99 – 100 % mortalitu infikovaných brouků. Účinnost přípravku se hodnotí podle kritéria průměrného času přežití infikovaného brouka (median survival time – MST). Při koncentraci $1,0 \times 10^6$ konidií/ml bylo MST 6,1 dne, zatímco při koncentracích $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^8$ konidií/ml byl čas přežití brouka výrazně kratší (4 – 4,2 dne).

Boverol® obsahuje vzdušné konidie houby *Beauveria bassiana* a plnidlo siloxid. Distribuuje se ve formulacích suchý popraš (C) nebo jako vodní suspenze pro postřik (WP) (Hrdý a kol., 1991).

***Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch 1926**

B. brongniartii netvoří v porovnání s *B. bassiana* tak husté shluky fialid, spíše bývají samotné na konidioforovém vláknu. Tvar konidií je pravidelně elipsoidní. Velmi často se vyskytuje na larvách chroustů, parazituje však i na jiném hmyzu (Fassatiová, 1979).

Hostitelské spektrum *B. brongniartii* zahrnuje tyto řády hmyzu : *Heteroptera* (*Pentatomidae*), *Lepidoptera* (*Hepialus lupulinus*), *Coleoptera* (*Coccinellidae*, *Chrysomelidae*, *Plateumaris braccata*, *Galerucella tenella*, *Curculionidae*, *Strophosomus sus.*) a *Hymenoptera* (Zimmermann, 2007).

Na bázi *B. brongniartii* jsou ve Švýcarsku registrovány přípravky proti larvám chroustů používaných na pastvinách, s obchodním názvem Engerlingspilz® a Beauveria Schweizer®.

2.5.6. Rod *Isaria* (= *Paecilomyces*)

Systematické zařazení

Říše : *Fungi*

Kmen : *Ascomycota*

Třída : *Eurotiomycetes*

Řád : *Eurotiales* – plesnivkotvaré

Čeleď : *Trichocomaceae* – plísňovkovité

Druhy *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wize) A. H. S. Brown & G. Sm. a *Isaria farinosa* (= *P. farinosus*) (Holmskjold) Fries jsou velice známé entomopatogenní houby široce používané v mírném a tropickém pásmu. Zatímco *I. farinosa* (= *P. farinosus*) byl v minulosti opomíjeným entomopatogenním druhem, *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) získal v posledních patnácti letech věhlas díky použití proti molicím (Zimmermann, 2008).

Většina druhů hub rodu *Isaria* (= *Paecilomyces*) je saprotrofních, avšak některé mohou parazitovat na hmyzu, výjimečně mohou být patogenní u teplotokrevných živočichů (Fassatiová, 1979).

Houby rodu *Isaria* (= *Paecilomyces*) vytváří vlnaté, práškovité, někdy slabě provazcovité mycelium barvy bílé, žluté, žlutohnědé či fialové. Konidie se tvoří na jednotlivě umístěných fialidách nebo na přeslenovitém, většinou štětičkovitém konidioforu. Fialidy jsou kratší, s rozšířenou bazí nebo protáhlé, vždy s protáhlejším konidiogenním krčkem, který bývá slabě ohnut. Konidie se vytváří v řetězcích (Fassatiová, 1979).

V porovnání s *B. bassiana* a *M. anisopliae* jsou informace o metabolitech/toxinech limitované. První zmínka o izolaci beauvericinu z *P. fumosoroseus* jsou z roku 1975 od Bernardini a kol. Beauvericin je nejdůležitějším metabolitem produkovaným *B. bassiana* a rodem *Fusarium* (Zimmermann, 2007).

***Isaria fumosorosea* (*Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) A. H. S. Brown & G. Sm.)**

Houba *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) je nejen entomopatogenním a akarifágním činitelem, ale také za určitých okolností může působit jako mykoparazit. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na rzích a na některých zástupcích druhu padlí, např. na konidiích padlí okurkového (Landa, 1988).

Zprvu bílé vatovité kolonie, které se později zbarvují do odstínů narůžovělé, nafialovělé až šedofialové barvy se tvoří na umělých půdách. Změna barvy kolonií je přímo odvislá od stupně sporulace kultury. Čím je starší kultura, tím má intenzivnější fialové zbarvení a vatovitý charakter se mění v prašný (Landa, 1994).

V koloniích se na vzdušném myceliu nejprve vytvářejí konidiofory, přeslenovitě umístěných na hyfách. Na koncích konidioforů se formují konidiogenní phialidy (3 – 6 phialid /1 konidiofor), na nichž se tvoří oválné konidie. Ty se oddělují postupně, nejmladší konidie je vždy u phialidy a odtlačováním starších konidií tvoří řetízek. V jednom řetízku může být až 50 konidií (Osborne a Landa, 1992).

Povrch kultur *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) je silně hydrofobní, po přelití kolonie vodou, plavou uvolněné konidie po povrchu vody, kde tvoří prašnou, nesmáčenlivou vrstvu a jsou snadno rozprášeny i při malém pohybu vzduchu (Osborne a Landa, 1992).

I. fumosorosea (= *P. fumosoroseus*) může mít ještě další morfologické stadium (blastospor), které se vytváří při růstu v tekuté živné půdě a v půdních médiích. Tvar blastospor kolísá od kulovitěho tvaru k elipsoidnímu. Blastospor mají slabou buněčnou stěnu a jsou virulentnější než konidie (Osborne a Landa, 1992).

Tato houba vyžaduje při klíčení konidií nejméně 10 – 12 hodin vlhkost vyšší než 95 %. Optimální růst kolonií probíhá při teplotách 20 – 30°C, vyšší teploty (30 – 40°C) omezují růst více než teploty nižší (8 – 11°C) (Vidal a kol., 1997).

I. fumosorosea (= *P. fumosoroseus*) je jedním z nejvýznamnějších přirozených nepřátel nymf a dospělců *Bemisia tabaci* a také *Trialeurodes vaporariorum* ve skleníkových podmínkách. V Evropě a USA jsou registrované přípravky PFR – 97TM® a Preferal®, které se používají ve skleníkových kulturách proti molicím a třásněnkám.

2.5.7. Rod *Lecanicillium* Zare & Gams

Systematické zařazení

Říše : *Fungi*

Kmen : *Ascomycota*

Třída : *Sordariomycetes*

Řád : *Hypocreales*

Čeleď : *Cordycipitaceae*

Rod *Lecanicillium* zahrnuje široké spektrum druhů, které jsou patogenní pro členovce, hlístice, rostliny a živočichy (Zare a kol., 2001), dále jsou zástupci rodu *Lecanicillium* velice důležitými nematogenními činiteli s vysokým potenciálem pro vývoj biopesticidů proti fytoparazitickým hlísticím (Nguyen a kol., 2007).

Tento rod zahrnuje jen jediného patogena hmyzu, a to *Lecanicillium lecanii*. U tohoto zástupce rodu *Lecanicillium* byl prokázán i akaropatogenní účinek.

Výskyt hub rodu *Lecanicillium* je saprofytický vázán na rostlinné zbytky, některé z druhů jsou parazitické na rostlinách, vyšších houbách a hmyzu. Bylo popsáno několik desítek druhů, které se nesnadno určují (Fassatiová, 1979).

Rod *Lecanicillium* tvoří bílé nebo světle zbarvené vzdušné mycelium. Konidiofory jsou přímé, typicky přeslenovitě větvené. Konidie jsou jednobuněčné, většinou elipsoidní (Fassatiová, 1979).

***Lecanicillium lecanii* (*Verticillium lecanii* (Zimmermann) Zare & Gams)**

Bílé nebo slabě nažloutlé, vatovité nebo sametové mycelium vytváří na živném agaru *L. lecanii*. Spodní strana mycelia je lehce nažloutlá nebo bezbarvá. Pro *L. lecanii* je typické, že v závěrečné fázi svého vývoje utvoří kolem hostitele bílý povlak, který je tvořený myceliem rozrůstajícím se do okolí. Fialidy jsou dlouze protáhlé a zašpičatělé, vyrůstají na hyfách jednotlivě nebo v řídkých přeslenech. Konidie jsou hyalinní a mají protáhle oválný tvar (Fassatiová, 1979).

Teplotní optimum bylo stanoveno v rozmezí 15 – 25°C. Optimum pro vlhkost je 85 – 90 %. Spory jsou velmi citlivé na UV záření (Cloyd, 2005).

L. lecanii je součástí několika komerčně vyráběných přípravků, např. Vertalec® a Mycotrol®. Vertalec® se používá k regulaci širokého spektra mšic, je registrován

v několika evropských zemích a v Japonsku pro systém ochrany zeleniny a okrasných rostlin. Je kompatibilní s mnoha parazity a predátory používanými ve sklenících.

2.5.8. Rod *Metarhizium* Sorokin

Systematické zařazení

Říše : *Fungi*

Kmen : *Ascomycota*

Třída : *Sordariomycetes*

Řád : *Hypocreales* – masenkotvaré

Čeleď : *Clavicipitaceae* – paličkovicovité

Rod *Metarhizium* reprezentují široce polyfágní houby, které jsou zpravidla vázány na půdní hmyz (rovnokřídlí, brouci a dvoukřídlí). Vyskytují se ve vlhkém a teplém prostředí a jsou běžnou složkou půdního prostředí (Landa, 1998).

***Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorok.**

M. anisopliae se podílí na biologické ochraně a běžně se distribuují přípravky na bázi této houby od arktické až po tropickou oblast. Spektrum hostitelů zahrnuje tyto řády : *Coleoptera* (*Elateridae*, *Curculionidae*), *Diptera*, *Symphyla*, *Orthoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Homoptera*, *Heteroptera*, *Hymenoptera*, *Siphonaptera* a *Lepidoptera* (Zimmermann, 2007).

Houba *M. anisopliae* má schopnost produkovat široce rozmanité biologicky aktivní látky, které náleží k sekundárním metabolitům. Tyto metabolity jsou schopné vyvolat onemocnění díky infekčnímu potenciálu a houba může kolonizovat hostitelský organismus (Vey a kol., 2001).

V přirozených podmínkách houba *M. anisopliae* produkuje dva typy spor. Vzdušné konidie jsou produkovány na specializovaných sporogenních hyfách, které se nazývají phialidy v průběhu saprofytické fáze a plní funkci asexuálních spor. Druhý typ spor je produkován v hmyzí hemolymfě a označuje se jako blastospory (hyfová tělíska) (Leland, 2001). Vzdušné konidie obsahují na svém povrchu látku ze skupiny monoaminů (hydrophobins), která poskytuje ochranu konidiím v přirozeném prostředí a zvyšuje jejich

hydrofobní vlastnosti. Stejná látka je přítomna i na povrchu konidií entomopatogenní houby *B. bassiana* (Bidochka a kol., 1995).

Infikovaný jedinec po napadení *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* porůstá hustou, tmavě zelenou masou konidií a příznaky nákazy bývají označovány jako „zelené muskardiny“ (Hrdý a kol., 1991). Z mycelia vyrůstají radiálně krátké konidiofory těsně přimknuté k sobě, na nichž se vytvářejí konidie. Konidie jsou zelenošedé až olivově zelené tyčinkovitěho tvaru a tvoří na povrchu hostitele nápadné špalíčky (Weiser, 1966).

M. anisopliae var. *anisopliae* produkuje destruxiny, látky způsobující smrt hmyzu (Joshi a St. Leger, 1999). Přípravky s obsahující *M. anisopliae* var. *Anisopliae* jsou využívány pro regulaci termitů (Bioblast®), pro ochranu trámů proti termitům (Biostop®, Metaguard®) a pro ochranu proti kobyolkám a sarančatům (GreenMuscle®). Tyto přípravky jsou distribuovány ve formě voděrozpustného prášku.

2.6. Metody izolace entomopatogenních hub

Galleria bait method (metoda živých pastí)

Metoda živých pastí je jedním z příkladů izolace entomopatogenních hub z půdy. Je založena na základě „Zimmermannovi metody“, kdy se využívá populace larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) jako přirozeného hostitele. Princip této metody je založen na schopnosti larev zavíječe voskového selektivně „vychytávat“ entomopatogenní houby z půdy při dodržení stanovených podmínek. K detekci se používají larvy třetího až čtvrtého larválního instaru, které mají relativně velký povrch těla a je tedy větší pravděpodobnost přichycení konidií patogena na povrch kutikuly larvy. Zmíněné larvy jsou v půdě vysoce citlivé, neboť je pro ně toto prostředí přirozeně stresující díky absenci potravy a odlišným životním podmínkám, a proto i nižší koncentrace houbového inokula je schopna vyvolat infekci. Negativní stránkou této metody je práce se živým materiálem, tedy nutnost udržovacích chovů zavíječe voskového (Zimmermann, 1986).

Pro detekci entomopatogenních hub je možné použít kromě larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) ještě larvy *Tribolium destructor* (Coleoptera, Tenebrionidae), *Acanthocinus aedilis* (Coleoptera, Cerambycidae) či *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) (Zimmermann, 1986).

Selektivní média

Selektivní média se obecně používají pro kvalitativní či kvantitativní analýzu entomopatogenních hub v polních podmínkách. Tyto média se vyznačují schopností účinně potlačit vývoj „necílových“ druhů mikroorganismů a současně nebránit vývoji cílových druhů. Pro eliminaci saprotrofních a fytopatogenních hub a bakterií jsou do selektivních médií přidávána antibiotická a fungicidní aditiva.

Pro kvantitativní analýzu entomopatogenních hub se v polních podmínkách používají selektivní média. První selektivní médium obsahovalo chloramfenikol a cycloheximid. Médium se běžně používá pro kvantitativní izolaci *Metarhizium ssp.* z půdy pod označením „Veen's medium“ (Veen a Ferron, 1966). Roku 1982 bylo objeveno médium, se kterým se podařilo úspěšně izolovat houby *M. anisopliae* a *B. bassiana* z půdy. Toto médium obsahuje jako hlavní složku dodine (N – dodecylquanidine monoacetate)

(Beilharz a kol., 1982). Dodine byl uveden na trh v roce 1950. Efektivnost dodine byla zkoumána vzhledem k přidanému množství práškového aktivovaného uhlíku (PAC), hodnotě pH, stejně jako typ a dávka srážecího činidla a polyelektrolytu (Kouras a kol., 1995).

Další selektivní médium obsahuje CuCl_2 (krystalickou violet'), má nízký obsah cukru a liší se od ostatních médií tím, že tvoří nepříznivé podmínky pro vývoj *B. bassiana*, pro ostatní houby jsou však tyto podmínky mnohem nepříznivější a inhibují jejich růst.

V současné době je k dispozici velká škála selektivních médií určených pro izolaci entomopatogenních hub z půdy. Média jsou doporučována pro jednotlivé druhy hub. Příkladem jsou již uvedená média Veen's medium a dodine, dále je to selektivní médium pro detekci hub *Paecilomyces* (= *Isaria*) a *Verticillium* (= *Lecanicillium*) navržené Kerry a kol. (1993), či selektivní médium pro izolaci *Paecilomyces lilacinus* od Mitchel a kol. (1987) a další.

3. Metodika

3.1. Sběr vzorků

Odběry vzorků probíhaly na vybraných lokalitách NP Šumava. Lokality byly vybírány pracovníky NP podle výskytu napadených stromů.

Vzorky byly odebírány na napadených stromech lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) ve třech stupních. Záměrně byly vyhledávány ve smrkové kůře infikovaní dospělci, popřípadě larvy infikované entomopatogenní houbou *B. bassiana*. Pokud nebyly nalezeny přímo infikovaní jedinci, odebraly se i vzorky smrkové kůry. Poslední fází sběru bylo odebrání směrných vzorků půdy, resp. hrabanky přímo pod napadenými stromy.

Postup samotného sběru :

- Infikovaní dospělci – sběr probíhal pomocí entomologické pinzety, kterou byli dospělci přeneseni do plastové sterilní flakonky a pečlivě popsáni nebo byli i s kůrou vloženi do sterilní plastové krabičky s vlhkým filtračním papírem na dně a opět pečlivě popsáni.
- Smrková kůra – odebraná kůra byla rozdělena na menší části a vložena do sterilních plastových krabiček a pečlivě popsána.
- Půda – vzorky půdy spolu s hrabankou byly odebrány pomocí lopatky z povrchové vrstvy a následně byly sesypány do sterilní plastové krabičky a pečlivě popsány.

Mezi sběrem vzorků z odlišných lokalit byly všechny pomůcky očištěny alkoholem. Vzorky byly uloženy do tmavé, tepelně izolované polystyrenové krabice a po převezení do laboratoře byly skladovány až do fáze zpracování v chladnu (lednice, 6 – 8°C) a temnu.

3.2. Zpracování a analýza vzorků

3.2.1. Metody izolace kmenů *B. bassiana*

Cílem této fáze komplexního procesu je získat čisté kultury kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub, které byly zachyceny některou z metod použitou při monitoringu. Entomopatogenní houby byly izolovány různými způsoby. Mezi hlavní metody izolace entomopatogenních hub patří :

- Přímá izolace z infikovaných dospělců nebo larev
- Izolace na selektivní živnou půdu s a.i. dodine
- Metoda živých pastí („Bait method“)

Přímá izolace z infikovaných dospělců nebo larev

Pomocí této metody byla biomasa spor entomopatogenních hub na infikovaných jedincích přenesena sterilní kultivační kličkou na živnou půdu PDA (potato dextrose agar) s přídatkem antibiotika Chloramphenicol, a na selektivní živnou půdu s fungicidní složkou dodine. Pokud byla infekce na hostiteli velice silně vyvinutá, spory byly izolovány na živnou půdu PDA bez přídatku antibiotika. Tímto způsobem byly získány čisté kmeny *B. bassiana* vhodné k pasážování kmene přes umělou živnou půdu.

Izolace z kůry na selektivní média obsahující fungicidní složku a.i. dodine

Ze vzorků byla pomocí sterilního skalpelu a sterilní entomologické pinzety odrolena vnitřní část kůry. Získaný výdrol byl odebírán z důvodu možného kontaktu s infikovanými jedinci, a proto byl následně analyzován na detekci entomopatogenních hub pomocí selektivního média s fungicidní složkou a.i. dodine.

- Stanoveným postupem bylo převedeno 5 g analyzovaného vzorku kůry do 50 ml destilované vody s přídatkem Tween 80 (0,05 % roztok) a třepáno 15 min na reciproké třepáče.
- Poté byl pomocí sterilní plastové spatuly rozetřen výluh o objemu 0,5 ml na povrch agarizovaného média s fungicidní složkou a.i. dodine. Z každého analyzovaného vzorku byly založeny 3 opakování.
- Poté byly Petriho misky inkubovány v termostatu při stálé teplotě $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ a následně po 10 (14) dnech byly zhodnoceny. V Petriho miskách byly po inkubaci spočítány vytvořené kolonie entomopatogenních hub a po přepočítání bylo stanoveno celkové množství propagulí entomopatogenních hub vyskytujících se v 1 g kůry. Po celkovém součtu kolonií byly spočítány také počty kolonií jednotlivých rodů entomopatogenních hub.

Izolace z půdy na selektivní média obsahující fungicidní složku a.i. dodine

Princip této metody je založen na selektivním působení dodine k entomopatogenním houbám při současné inhibici ostatních půdních hub v důsledku přeměny jejich buněčné stěny a inhibičního působení na tvorbu a klíčení jejich konidií.

- 20 g půdního vzorku bylo převedeno do 100 ml Tween 80 (0,05 % roztok) a 15 min byl vzorek třepán na reciproké třepáče.

- Stejným způsobem jako u vzorků kůry byl naikulován vzorek na Petriho misky s agarizovaným selektivním médiem s fungicidní složkou a.i. dodine.
- Petriho misky byly ponechány inkubaci v termostatu při stálé teplotě $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ a následně po 10 (14) dnech byly zhodnoceny. V Petriho miskách byly po inkubaci spočítány vytvořené kolonie entomopatogenních hub a po přepočítání bylo stanoveno celkové množství propagulí entomopatogenních hub vyskytujících se v 1 ml vzorku půdy. Po celkovém součtu kolonií byly spočítány také počty kolonií jednotlivých rodů entomopatogenních hub.

Metoda živých pastí „Bait method“

Princip této metody je založen na schopnosti larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) či potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) selektivně vyhledávat entomopatogenní houby z analyzovaného vzorku půdy za standardního postupu a podmínek. Larvy *G. mellonella* dokáží spolehlivě detekovat zejména kmeny *Beauveria bassiana* a *B. brongniartii*, zatímco larvy *T. molitor* dokáží zachytit převážně kmeny houby *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

- Homogenizovaným půdním vzorkem, resp. hrabankou byla naplněna sterilní Petriho miska o průměru 90 mm a upravena půdní vlhkost pomocí destilované vody. Z každého analyzovaného vzorku byly provedeny dvě opakování.
- Do připravených Petriho misek bylo umístěno 10 – 12 larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella* ve třetím až čtvrtém larválním instaru)/potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Petriho misky byly vloženy do igelitových sáčků., aby se udržely stálé vlhkostní podmínky.
- Sáčky s Petriho miskami byly umístěny do termostatu (teplota $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperioda 0/24) a každý druhý den byly obráceny o 180° pro dosažení optimálního pohybu larev.
- Kontrola byla provedena po 7, 10 a 14 dnech. Larvy, které vykazovaly zjevné příznaky houbové infekce (porostlé myceliem) se byly přesunuty do vlhké komůrky (Petriho miska s navlhčeným filtračním papírem).
- Larvy, u nichž se houbová infekce neobjevila za celých 14 dní, byly povrchově sterilovány v 1 % roztoku hypochloridu sodného a následně omyty ve sterilní destilované vodě, poté vloženy do vlhkých komůrek.

- Entomopatogenní houby z povrchu larev byly přečistěny přes umělou živnou půdu s antibiotiky (PDA), dalším krokem je identifikace (minimálně na úroveň rodu). Poté byly houby převedeny do alginátových pelet a uloženy do mykologické sbírky.

Použití larev *T. molitor* je výhodnější z hlediska dostupnosti různě starých larev ve specializovaných obchodech a tedy není nutné mít vlastní laboratorní chov. Kromě toho larvy potemníka moučného nemají tendenci rychlého přechodu do stádia kukly (jako larvy *G. mellonella*), larvy potemníka nevytváří zámotky, které v případě larev zavíječe voskového poněkud snižují citlivost detekčního postupu. V porovnání s larvami zavíječe voskového mají larvy potemníka moučného silněji sklerotizovanou kutikulu, která představuje účinnější obrannou bariéru proti porůstání entomopatogenních hub a zvyšuje tak odolnost proti méně virulentním kmenům.

3.3 Uchovávání kmenů

Všechny druhy/kmeny entomopatogenních hub byly postupně ukládány do mykologické sbírky ve formě suchých alginátových pelet s biomasou partikulárního druhu/kmene, zmrazeny při teplotách -20°C až -24°C . Alginátové pelety byly vytvořeny promícháním vyprodukované biomasy houby se specifickým množstvím 2% alginátu sodného a přísadkou nutričního aditiva, kterým byl zajišťován růst hub v případě reaktivace pelet. Zhomogenizovaná směs (Na-alginát + houba + nutritivní aditivum) byla nakapávána do roztoku chloridu vápenatého CaCl_2 (0,25 M), kde po smíchání docházelo ke gelatinizaci povrchu a vytvoření primárních pelet, které byly vytvrzeny v roztoku CaCl_2 a později usušeny při nižších teplotách.

3.4. Polyfaktoriální hodnocení vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolovaných při velkoplošném monitoringu na vybraných lokalitách NP Šumava

Stanovení produkce konidií nativních kmenů entomopatogenní houby Beauveria bassiana

Cílem studie bylo porovnat produkční vlastnosti vybraných kmenů *B. bassiana* na přirozeném substrátu. Standardní produkční jednotkou byla produkce konidií na 1 partikuly, resp. z 1g sterilních ječných krup.

a) Výtěžnost konidií z 25 propagulí sterilního přirozeného substrátu

- Bylo naváženo 25 g ječných krup do 250 ml Erlenmayerovi baňky a necháno vysterilovat. Kroupy v baňce byly inokulovány suspenzí o koncentraci 1×10^7 konidií v 1 ml, která byla předem připravena z vybraných kmenů *B. bassiana* a sterilní destilované vody s přídavkem Tween 80. Na 25 g bylo použito 12,5 ml suspenze (2:1).
- Opakovaně byly kroupy protřepávány v Erlenmayerových baňkách, aby se suspenze rovnoměrně nasákla.
- Nainokulované kroupy byly ponechány 24 hodin inkubaci.
- Poté bylo rozmístěno 25 krup do 5 řad na povrch 2% vodního agarů v 5 opakováních od každého kmenu.
- Po 3 dnech byla provedena revize porůstání krup na miskách pomocí stupnice porůstání.
- Hodnocení bylo provedeno po 7 dnech od založení pokusu. Kroupy byly vymývány ve sterilní destilované vodě s přídavkem Tween 80 a ponechány třepat na reciproké třepačce 2 hodiny. Byla vymývána vždy 1 Petriho misku s 50 ml roztoku a 3 Petriho misky se 100 ml roztoku v 1 Erlenmayerově baňce. Výtěžnost konidií byla hodnocena stanovením množství konidií v 1 ml s následným teoretickým přepočtem produkce konidií na 1 partikuli ječné kroupy. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí počítačích komůrky – hematocymetru.

b) Výtěžnost konidií z 25 g sterilního přirozeného substrátu

- Bylo naváženo 25 g ječných krup do 250 ml Erlenmayerovi baňky a necháno vysterilovat. Kroupy v baňce byly inokulovány suspenzí o koncentraci 1×10^7 konidií v 1 ml, kterou byla předem připravena z vybraných kmenů *B. bassiana* a sterilní destilované vody s přídavkem Tween 80. Na 25 g bylo použito 12,5 ml suspenze (2:1).

- Opakovaně byly protřepávány kroupy v Erlenmayerových baňkách, aby se suspenze rovnoměrně nasákla.
- Hodnocení bylo prováděno po 7 dnech od založení pokusu. Kroupy byly vymývány ve sterilní destilované vodě s přísadkou Tween 80 a ponechány třepat na recipkové třepačce 2 hodiny. Byly vymývány vždy 2 Petriho misky s 200 ml roztoku v 1 Erlenmayerově baňce. Výtěžnost konidií byla hodnocena stanovením množství konidií v 1 ml s následným teoretickým přepočtem produkce konidií na 1 gram ječných krup. Vyhodnocení bylo prováděno pomocí počítačové komůrky – hematocymetru.

Tabulka č. 3.4.1. Kmeny použité k výzkumu

<i>Kmen</i>	<i>Označení ve sbírce</i>	<i>Datum odběru</i>	<i>Lokalita</i>	<i>Zdroj</i>
B.bassiana	NP 0001	11.6.2008	Černá Hora	dospělec
B.bassiana	NP 0002	11.6.2008	Černá Hora	dospělec
B.bassiana	NP 0003	11.6.2008	Černá Hora	dospělec
B.bassiana	NP 0004	30.6.2008	Styková lesní cesta	dospělec
B.bassiana	NP 0005	3.7.2008	Jelení cesta-U Mlýna	dospělec
B.bassiana	NP 0006	3.7.2008	Borová lada-Silniční slat'	dospělec
B.bassiana	NP 0007	30.6.2008	I.zóna 19, odd.8	dospělec
B.bassiana	NP 0008	1.7.2008	Jelení skok (Oblík)	dospělec
B.bassiana	NP 0009	3.7.2008	Březová cesta	dospělec
B.bassiana	NP 0010	19.6.2008	Poledník	dospělec
B.bassiana	NP 0020	5.6.2008	Staré dráty	dospělec
B.bassiana	NP 0022	10.7.2008	Zlatý stoleček	dospělec
B.bassiana	NP 0026	8.7.2008	Vltavský luh	dospělec
B.bassiana	NP 0027	5.6.2008	Roklandský potok	dospělec
B.bassiana	NP 0028	9.7.2008	Smrčina	dospělec
B.bassiana	NP 0029	10.7.2008	křižovatka mezi Šírokou	dospělec
B.bassiana	NP 0030	10.7.2008	Studená horizont	dospělec
B.bassiana	NP 0031	10.7.2008	Zlatý stoleček	kůra GBM
B.bassiana	NP 0051	1.7.2008	Jelení skok-Dunkelbach	kůra
B.bassiana	NP 0052	1.7.2008	Jelení skok-Bavorská cesta	kůra
B.bassiana	NP 0053	27.6.2008	Hraniční chodník	kůra
B.bassiana	NP 0054	1.7.2008	-	kůra

3.5. Stanovení radiálního růstu

Hodnocení kmenů bylo prováděno také pomocí kritéria radiálního růstu. Stanovení radiálního růstu je finální fází procesu izolace. Cílem tohoto testu bylo zjistit tvar a plochu středových kultur za jednotku času. Středová kultura vznikla po nanesení konidiové suspenze o standardním titru $1,0 \times 10^7$ do středu Petriho misky pomocí inokulační kličky. Kapka na Petriho misce se nechala zaschnout a vložila se v plastických sáčcích do termostatu

($25\pm 1^{\circ}\text{C}$). Růst kultur byl hodnocen po 14 dnech nejméně u 5 kultur od každého kmene, měření probíhalo čtyřikrát a následně byl vypočítán průměr a plocha středové kultury v mm^2 .

3.6. Přečištění a identifikace

Cílem identifikace bylo taxonomické určení druhové příslušnosti entomopatogenních hub. Identifikace předcházela jakékoliv další manipulaci s čistými kulturami, bez níž by nemohly být kmeny entomopatogenních hub zařazeny do sbírky. Předpokladem identifikace bylo určení minimálně na úroveň rodu, lépe však na úroveň druhu.

Pro identifikaci izolátů na úroveň druhové příslušnosti bylo nutné získat preparáty kultur s dobře vyvinutými strukturami. V případě mitosporických entomopatogenních hub byly pro identifikaci nezbytné komplexní sporulující struktury.

Všechny kmeny byly přečištěny a z čistých kultur byly připraveny suspenze konidií a ty postupně nanoseny ve formě kapek na vrstvu 2% vodního bakteriologického agaru. Podložní sklíčko s nanesenou suspenzí bylo uloženo do Petriho misky s navlhčeným filtračním papírem, společně byly vloženy do plastových sáčků a inkubovány v termostatu. Po třech dnech byly izolované kmeny determinovány pomocí světelného mikroskopu.

4. Experimentální část a výsledky

4.1. Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v lokalitách souvisejících s výskytem lýkožrouta smrkového *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) v oblasti NP a CHKO Šumava

Cílem následujícího výzkumu bylo zjistit výskyt a diverzitu druhů entomopatogenních hub přirozeně se vyskytujících v půdě a asociovaných s výskytem l. smrkového.

Entomopatogenní houby byly izolovány pomocí selektivních médií a rozděleny podle nalezených druhů. Dále byly ve formě alginátových pelet uloženy do mykologické sbírky oddělení ochrany rostlin KRV a pro každý kmen byly zpracovány databázového formuláře.

Tabulka č. 4.1.1. Kmeny *Lecanicillium muscarium* získané při velkoplošném monitoringu

<i>Kmen</i>	<i>Datum odběru</i>	<i>Lokalita</i>	<i>GPS</i>
NP 0021	13.5.2008	Weiffeloroxy slatě	N49 02.040 E13 26.103
NP 0024	-	Zlatý stoleček	N49 06.317 E13 20.121
NP 0049	19.6.2008	Poledník	N49 03.802 E13 23.748
NP 0057	5.6.2008	Staré dráty	N49 02.868 E13 24.103
NP 0060	10.7.2008	Studená horizont	N48 58.792 E13 28.750
NP 0061	8.7.2008	Vltavský luh	N48 51.243 E13 54.829
NP 0062	9.7.2008	U Buku	N48 47.249 E13 53.503
NP 0066	3.7.2008	Březová cesta	N48 55.508 E13 40.188
NP 0067	1.7.2008	Jelení skok (Oblík)	N49 03.718 E13 26.060
NP 0098	1.7.2008	Jelení skok (Oblík)	N48 58.612 E13 34.032

Tabulka č. 4.1.2. Odizolované kmeny *L. muscarium* (metody izolace)

<i>Kmen</i>	<i>Zdroj</i>	<i>Druh</i>	<i>Izolace</i>		
			<i>Dodine</i>	<i>PDA+Anti</i>	<i>Historie</i>
NP 0021	dospělec	<i>L. muscarium</i>	Lmu	Lmu	S1
NP 0024	dospělec	<i>L. muscarium</i>	Lmu	-	S1
NP 0049	půda	<i>L. muscarium</i>	Lmu	-	S2
NP 0057	kůra	<i>L. muscarium</i>	Lmu	-	S1
NP 0060	kůra	<i>L. muscarium</i>	Lmu	Lmu	S2
NP 0061	kůra	<i>L. muscarium</i>	Lmu	-	S1
NP 0062	kůra	<i>L. muscarium</i>	Lmu	-	S1
NP 0066	dospělec	<i>L. muscarium</i>	Lmu	Lmu	S2
NP 0067	kůra	<i>L. muscarium</i>	Lmu	-	S2
NP 0098	kůra	<i>L. muscarium</i>	Lmu	-	S3

Tabulka č. 4.1.3. Kmeny *Beauveria brongniartii* získané při velkoplošném monitoringu

<i>Kmen</i>	<i>Datum odběru</i>	<i>Lokalita</i>	<i>GPS</i>
NP 0011	11.6.2008	Prameny Vltavy	N48 58.427 E13 33.726
NP 0012	1.7.2008	Weiffelorovy slatě	N49 02.040 E13 26.103
NP 0013	30.6.2008	Styková lesní cesta	1137139,96 N; 841154,41 E
NP 0015	1.7.2008	Jelení skok - Dünkelbach	N49 03.048 E13 25.350
NP 0039	10.7.2008	Studená horizont	N48 58.792 E13 28.750
NP 0055	9.7.2008	U Buku	N48 47.089 E13 53.207
NP 0064	9.7.2008	V Kotli	N48 47.110 E13 52.330
NP 0065	9.7.2008	Smrčina	N48 44.957 E13 55.195
NP 0107	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0108	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986

Tabulka č. 4.1.4. Odizolované kmeny *B. brongniartii* (metody izolace)

<i>Kmen</i>	<i>Zdroj</i>	<i>Druh</i>	<i>Izolace</i>		
			<i>Dodine</i>	<i>PDA+Anti</i>	<i>Historie</i>
NP 0011	dospělec	<i>B. brongniartii</i>	Bbr		S1
NP 0012	dospělec	<i>B. brongniartii</i>	Bbr	Bbr	S2
NP 0013	dospělec	<i>B. brongniartii</i>	Bbr	Bbr	S2
NP 0015	kůra	<i>B. brongniartii</i>	Bbr	Bbr	S2
NP 0039	kůra	<i>B. brongniartii</i>	Bbr	Bbr	S1
NP 0055	kůra	<i>B. brongniartii</i>	Bbr	Bbr	S2
NP 0064	půda	<i>B. brongniartii</i>	Bbr	Bbr	S3
NP 0065	dospělec	<i>B. brongniartii</i>	Bbr	Bbr	S3
NP 0107	dospělec	<i>B. brongniartii</i>	Bba	Bbr	S2
NP 0108	dospělec	<i>B. brongniartii</i>	Bba	Bbr	S2

Tabulka č. 4.1.5. Kmeny *Metarhizium anisopliae* získané při velkoplošném monitoringu

<i>Kmen</i>	<i>Datum odběru</i>	<i>Lokalita</i>	<i>GPS</i>
NP 0025	-	Zlatý stoleček	N49 06.317 E13 20.121
NP 0047	3.7.2008	Lapka	N49 01.822 E13 34.108
NP 0048	1.7.2008	Jelení skok - Dünkelbach	N49 03.048 E13 25.350
NP 0050	8.7.2008	Vltavský luh	N48 51.243 E13 54.829
NP 0063	1.7.2008	-	N49 03.283 E13 24.020

Tabulka č. 4.1.6. Odizolované kmeny *M. anisopliae* (metody izolace)

<i>Kmen</i>	<i>Zdroj</i>	<i>Druh</i>	<i>Izolace</i>		
			<i>Dodine</i>	<i>PDA+Anti</i>	<i>Historie</i>
NP 0025	půda	<i>M. anisopliae</i>	Met	-	S1
NP 0047	kůra	<i>M. anisopliae</i>	Met	-	S2
NP 0048	půda	<i>M. anisopliae</i>	Met	-	S2
NP 0050	půda	<i>M. anisopliae</i>	Met	-	S2
NP 0063	kůra	<i>M. anisopliae</i>	Met	-	S2

Tabulka č. 4.1.7. Kmeny *Beauveria bassiana* získané při velkoplošném monitoringu

<i>Kmen</i>	<i>Datum odběru</i>	<i>Lokalita</i>	<i>GPS</i>
NP 0001	11.6.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0002	11.6.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0003	11.6.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0004	30.6.2008	Styková lesní cesta	1137139,96 N; 841154,41 E
NP 0005	3.7.2008	Jelení cesta - U Mlýna	N48 54.791 E13 41.769
NP 0006	3.7.2008	Borová Lada- Silniční slat'	N48 57.896 E13 38.104
NP 0007	30.6.2008	I. zóna 19, odd.8	1140377,41 N; 836699,04 E
NP 0008	1.7.2008	Jelení skok (Oblík)	N49 03.718 E13 26.060
NP 0009	3.7.2008	Březová cesta	N48 55.508 E13 40.188
NP 0010	19.6.2008	Poledník	N49 03.802 E13 23.748
NP 0020	5.6.2008	Staré dráty	N49 02.868 E13 24.103
NP 0022	-	Zlatý stoleček	N49 06.261 E13 20.130
NP 0026	8.7.2008	Vltavský luh	N48 51.243 E13 54.829
NP 0027	5.6.2008	Roklandský potok	N48 58.905 E13 27.272
NP 0028	9.7.2008	Smrčina	N48 44.957 E13 55.195
NP 0029	10.7.2008	křižovatka mezi Širokou	N48 58.905 E13 27.272
NP 0030	10.7.2008	Studená horizont	N48 58.792 E13 28.750
NP 0031	-	Zlatý stoleček	N49 06.311 E13 20.086
NP 0051	1.7.2008	Jelení skok - Dunkelbach	N49 03.048 E13 25.350
NP 0052	1.7.2008	Jelení skok - Bavorská cesta	N49 03.367 E13 24.886
NP 0053	27.6.2008	Hraniční chodník	Střel. průsmyk, Hran. chodník
NP 0054	1.7.2008	-	N49 03.283 E13 24.020
NP 0082	4.9.2008	Prameny Vltavy	N48 58.436 E13 33.732
NP 0083	4.9.2008	Prameny Vltavy	N48 58.436 E13 33.732
NP 0085	24.7.2008	Zámecký les (u Styk. lesní cesty)	N49 07.366 E13 15.635
NP 0096	24.7.2008	Zámecký les	N49 07.366 E13 15.635
NP 0100	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0101	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0102	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0103	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0104	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0105	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0106	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986
NP 0109	4.9.2008	Černá Hora	N48 58.683 E13 32.986

Tabulka č. 4.1.8. Odizolované kmeny *B. bassiana* (metody izolace)

<i>Kmen</i>	<i>Zdroj</i>	<i>Druh</i>	<i>Izolace</i>		<i>Historie</i>
			<i>Dodine</i>	<i>PDA+Anti</i>	
NP 0001	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0002	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0003	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0004	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0005	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0006	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0007	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0008	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0009	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0010	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0020	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0022	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0026	půda GBM	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0027	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0028	lapač-dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0029	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0030	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S1
NP 0031	dospělec	<i>B. bassiana</i>	-	Bba	S1
NP 0051	půda	<i>B. bassiana</i>	Bba	-	S2
NP 0052	kůra	<i>B. bassiana</i>	Bba	-	S2
NP 0053	kůra	<i>B. bassiana</i>	Bba	-	S2
NP 0054	kůra	<i>B. bassiana</i>	Bba	-	S2
NP 0082	kůra	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0083	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0085	larva	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S3
NP 0096	kůra	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S3
NP 0100	kůra	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0101	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0102	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0103	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0104	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0105	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0106	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2
NP 0109	dospělec	<i>B. bassiana</i>	Bba	Bba	S2

Tabulka č. 4.1.9. Kmeny *Isaria sp.* (= *Paecilomyces sp.*) získané při velkoplošném monitoringu

<i>Kmen</i>	<i>Datum odběru</i>	<i>Lokalita</i>	<i>GPS</i>
NP 0014	30.6.2008	Styková lesní cesta	1137139,96 N; 841154,41 E
NP 0018	19.6.2008	Poledník	N49 03.802 E13 23.748
NP 0019	5.6.2008	Staré dráty	N49 03.064 E13 24.053
NP 0023	-	Zlatý stoleček	N49 06.311 E13 20.086
NP 0032	1.7.2008	Jelení skok - Bavorská cesta	N49 03.367 E13 24.886
NP 0033	3.7.2008	Březová cesta	N48 55.508 E13 40.188
NP 0034	3.7.2008	Jelení cesta - U Mlýna	N48 54.791 E13 41.769
NP 0035	30.6.2008	I. zóna 19, odd.8	1140377,41 N; 836699,04 E
NP 0036	30.6.2008	Křemelná polom	Křemelná polom
NP 0037	3.7.2008	Lapka	N49 01.822 E13 34.108
NP 0038	27.6.2008	Hraniční chodník	Střel. průsmyk, Hran. chodník
NP 0041	3.7.2008	Borová Lada- Silniční slat'	N48 57.896 E13 38.104
NP 0042	10.7.2008	Studená horizont	N48 58.792 E13 28.750
NP 0043	8.7.2008	Vltavský luh	N48 51.243 E13 54.829
NP 0044	8.7.2008	České Žleby, Stožecká skála	N48 52.310 E13 49.947
NP 0045	8.7.2008	Pod ministerskou, Stožec	N48 50.695 E13 50.317
NP 0046	8.7.2008	Stará Hučická, České Žleby	N48 51.615 E13 52.029
NP 0056	9.7.2008	V Kotli	N48 47.110 E13 52.330
NP 0058	10.7.2008	Nad Šírokou	N48 59.088 E13 27.848
NP 0059	1.7.2008	Weiffelorovy slatě	N49 02.040 E13 26.103
NP 0099	4.9.2008	Prameny Vltavy	N48 58.612 E13 34.032
NP 0016	30.6.2008	I. zóna 19, odd.8	1140377,41 N; 836699,04 E
NP 0017	3.7.2008	Lapka	N49 01.822 E13 34.108

Tabulka č. 4.1.10. Odizolované kmeny *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (metody izolace)

Kmen	Zdroj	Druh	izolace		
			Dodine	PDA+Anti	Historie
NP 0014	dospělec	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0018	dospělec	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	Ifr	S2
NP 0019	dospělec	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	Ifr	S2
NP 0023	lapač-dospělec	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	Ifr	S2
NP 0032	kůra GBM	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0033	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0034	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0035	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0036	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0037	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0038	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0041	dospělec	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0042	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0043	půda	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0044	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0045	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0046	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0056	dospělec	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0058	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0059	kůra	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	-	S2
NP 0099	půda	<i>I. fumosorosea</i>	Ifr	Ifr	S2
NP 0016	dospělec	<i>Isaria sp.</i>	Isa	Isa	S1
NP 0017	dospělec	<i>Isaria sp.</i>	-	Isa	S2

S1 = pasážování přes 1 stupeň

S2 = pasážování přes 2 stupně

S3 = pasážování přes 3 stupně

Při velkoplošném monitoringu byly nalezeny entomopatogenní houby rodu *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) a *Metarhizium anisopliae*. Monitoringem byla zjištěna existence přirozeně se vyskytujících entomopatogenních hub v populacích lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a dále byly zpracovány informace o jejich četnosti v uvedených populacích.

4.2. „In vitro“ charakteristika – stanovení radiálního růstu

Cílem tohoto testu bylo zjistit tvar a plochu středových kultur za jednotku času. Sledované parametry byly hodnoceny po 14 dnech, nejméně u 5 kultur od každého kmene.

Tabulka č.4.2.1. „In vitro“ charakteristika vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* kultivovaných na umělé živné půdě PDA

<i>Kmen</i>	<i>Radiální růst (mm)</i>	<i>Plocha (mm²)</i>	<i>Produkce spor (spor/1 kultura)</i>	<i>Produkce spor (mm²)</i>
NP 0001	42,38	1 410,29	5,05x10 ⁹	3,58x10 ⁶
NP 0002	42,20	1 398,67	4,80x10 ⁹	3,43x10 ⁶
NP 0003	39,57	1 229,85	5,55x10 ⁹	4,51x10 ⁶
NP 0004	42,31	1 406,13	8,20x10 ⁹	6,09x10 ⁶
NP 0005	38,56	1 167,94	7,07x10 ⁹	6,05x10 ⁶
NP 0006	38,71	1 177,15	6,90x10 ⁹	5,86x10 ⁶
NP 0007	39,63	1 233,18	8,25x10 ⁹	6,69x10 ⁶
NP 0008	37,56	1 108,15	8,02x10 ⁹	7,23x10 ⁶
NP 0009	36,63	1 053,52	7,73x10 ⁹	7,34x10 ⁶
NP 0010	39,50	1 225,42	6,53x10 ⁹	5,33x10 ⁶
NP 0020	40,31	1 276,35	8,25x10 ⁹	6,46x10 ⁶
NP 0022	40,13	1 264,50	8,38x10 ⁹	6,62x10 ⁶
NP 0026	42,13	1 393,70	8,13x10 ⁹	5,83x10 ⁶
NP 0027	40,31	1 276,35	7,25x10 ⁹	5,68x10 ⁶
NP 0028	40,75	1 304,20	9,70x10 ⁹	7,44x10 ⁶
NP 0029	40,25	1 272,39	6,68x10 ⁹	5,25x10 ⁶
NP 0030	44,81	1 577,20	6,10x10 ⁹	3,87x10 ⁶
NP 0031	38,25	1 149,09	8,60x10 ⁹	7,48x10 ⁶

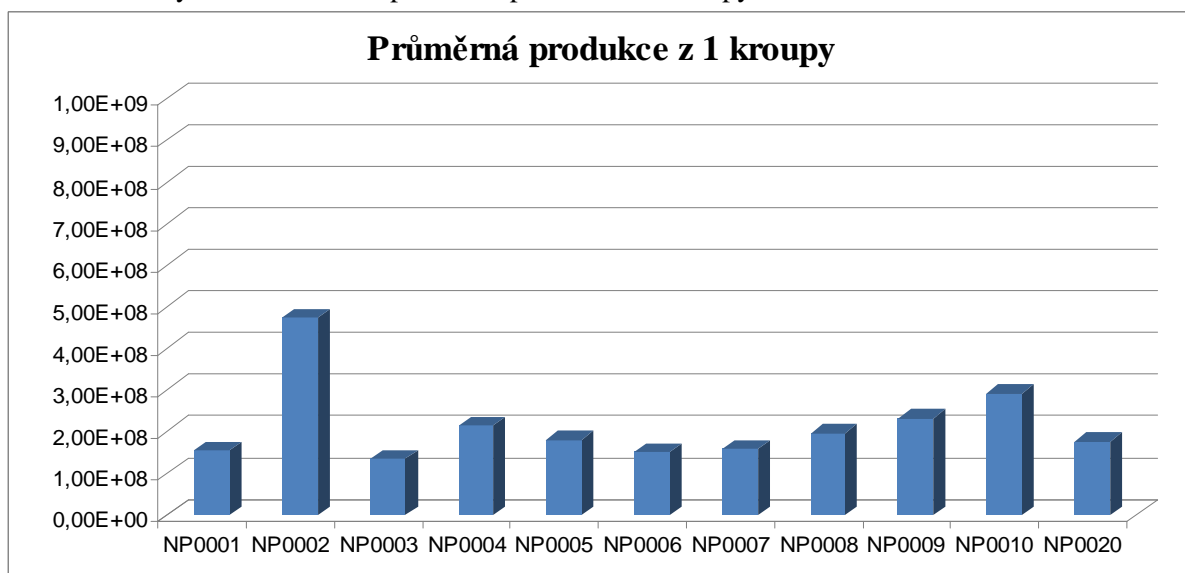
Nejvyšší hodnoty radiálního růstu u vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* dosáhly kmene NP 0001 a NP 0030 (průměrná plocha středové kultury dosahovala hodnot 1 410,29 a 1 577, 2 mm²). Zatímco nejnižší hodnoty byly zaznamenány u kmenů NP 0008 a NP 0009 (1 053,52 a 1 108,15 mm²). V produkci spor byly nejvyšší hodnoty zaznamenány u kmenů NP 0028 a NP 0031 (9,70x10⁹ a 8,60x10⁹ spor/1 kulturu). Naopak nejméně produktivní byly kmene NP 0001 a NP 0002 (5,05x10⁹ a 4,80x10⁹ spor/1 kulturu).

4.3. Polyfaktoriální hodnocení vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolovaných při velkoplošném monitoringu na vybraných lokalitách NP Šumava

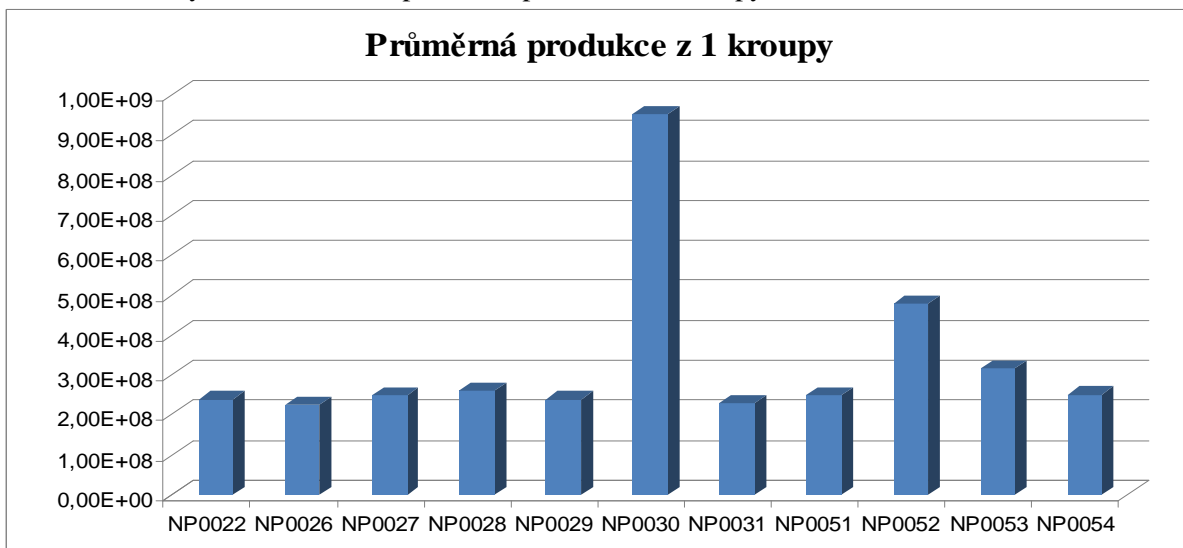
Pro další výzkum byly použity pouze informace o kmenu *Beauveria bassiana* získané z monitoringu, protože entomopatogenní vlastnosti této houby nejlépe splňovali požadavky pro praktické využití entomopatogenních hub v ochraně lesních porostů proti lýkožroutu smrkovému (invazivita, přenos v prostředí, atd.).

Cílem této studie bylo porovnat produkční vlastnosti vybraných kmenů *B. bassiana* na přirozeném substrátu. Standardní produkční jednotkou byla produkce konidií na 1 partikuly resp. 1 g sterilních ječných krup. Hodnocení bylo prováděno pomocí dvou metod po 7 dnech. První metodou byla výtěžnost stanovena pomocí 25 krup umístěných na živném agaru a spočítána průměrná produkce spor z 1 kroupy. Hodnocení stupně porůstání bylo prováděno po 3 dnech pomocí indexu porůstání. Druhá metoda byla založena na základě stanovení průměrné produkce z 25g substrátu v Erlenmayerových baňkách a byla hodnocena průměrnou produkcí z 1g substrátu.

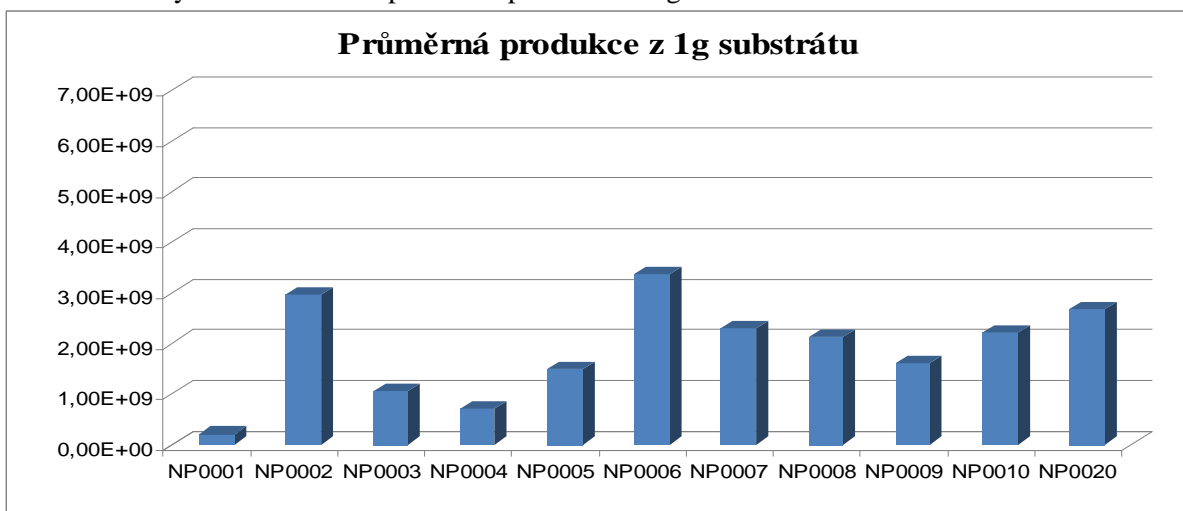
Graf č.4.3.1. Výtěžnost kmenů – průměrná produkce z 1 kroupy



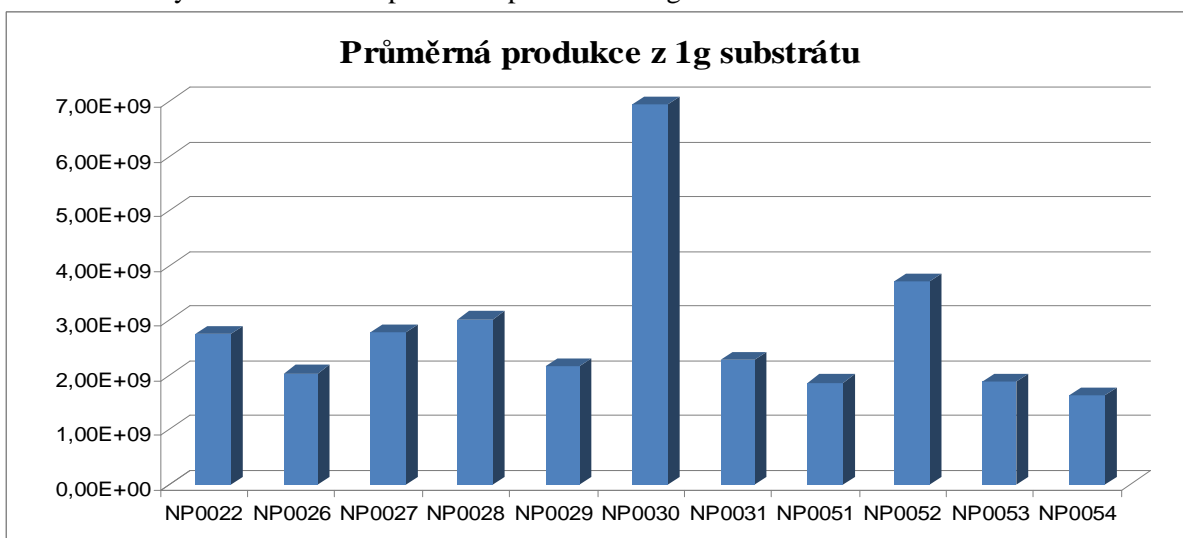
Graf č.4.3.2. Výtěžnost kmenů – průměrná produkce z 1 kroupy



Graf č.4.3.3. Výtěžnost kmenů – průměrná produkce z 1 g substrátu



Graf č.4.3.4. Výtěžnost kmenů – průměrná produkce z 1 g substrátu



Tabulka č.4.3.1. Výtěžnosti kmenů a procentický rozdíl výtěžnosti spor

<i>Kmen</i>	<i>Průměrná produkce z 1 kroupy</i>	<i>Teoretický přepočet na 1 kroupu</i>	<i>Průměrná produkce z 1g substrátu</i>	<i>Teoretický přepočet na 1g substrátu</i>	<i>% rozdíl výtěžnosti spor</i>
NP0001	1,54x10 ⁸	7,54x10 ⁶	2,03x10 ⁸	4,13x10 ⁹	4,90
NP0002	4,75x10 ⁸	1,10x10 ⁸	2,96x10 ⁹	1,27x10 ¹⁰	23,21
NP0003	1,34x10 ⁸	3,89x10 ⁷	1,05x10 ⁹	3,60x10 ⁹	29,04
NP0004	2,14x10 ⁸	2,63x10 ⁷	7,05x10 ⁸	5,75x10 ⁹	12,27
NP0005	1,81x10 ⁸	5,59x10 ⁷	1,50x10 ⁹	4,86x10 ⁹	30,87
NP0006	1,52x10 ⁸	1,25x10 ⁸	3,36x10 ⁹	4,08x10 ⁹	82,21
NP0007	1,59x10 ⁸	8,58x10 ⁷	2,31x10 ⁹	4,27x10 ⁹	53,99
NP0008	1,97x10 ⁸	7,91x10 ⁷	2,13x10 ⁹	5,29x10 ⁹	40,17
NP0009	2,33x10 ⁸	5,96x10 ⁷	1,60x10 ⁹	6,26x10 ⁹	25,58
NP0010	2,93x10 ⁸	8,27x10 ⁷	2,22x10 ⁹	7,87x10 ⁹	28,22
NP0020	1,77x10 ⁸	9,93x10 ⁷	2,67x10 ⁹	4,74x10 ⁹	56,24
NP0022	2,39x10 ⁸	1,02x10 ⁸	2,75x10 ⁹	6,42x10 ⁹	42,85
NP0026	2,26x10 ⁸	7,60x10 ⁷	2,04x10 ⁹	6,07x10 ⁹	33,62
NP0027	2,50x10 ⁸	1,04x10 ⁸	2,79x10 ⁹	6,71x10 ⁹	41,49
NP0028	2,60x10 ⁸	1,12x10 ⁸	3,02x10 ⁹	6,98x10 ⁹	43,19
NP0029	2,39x10 ⁸	8,06x10 ⁷	2,17x10 ⁹	6,42x10 ⁹	33,74
NP0030	9,53x10 ⁸	2,59x10 ⁸	6,95x10 ⁹	2,55x10 ¹⁰	27,20
NP0031	2,30x10 ⁸	8,47x10 ⁷	2,28x10 ⁹	6,18x10 ⁹	36,84
NP0051	2,48x10 ⁸	6,96x10 ⁷	1,87x10 ⁹	6,65x10 ⁹	28,14
NP0052	4,79x10 ⁸	1,38x10 ⁸	3,71x10 ⁹	1,29x10 ¹⁰	28,85
NP0053	3,15x10 ⁸	7,00x10 ⁷	1,88x10 ⁹	8,44x10 ⁹	22,26
NP0054	2,51x10 ⁸	6,07x10 ⁷	1,63x10 ⁹	6,73x10 ⁹	24,23

Průměrná produkce z 1 kroupy = počítaný průměr z 2 pozorování o 25 kroupách

Teoretický přepočet na 1 g substrátu = hodnota průměru 1 kroupy vynásobená počtem krup v 1 g

Průměrná produkce z 1 g substrátu = počítaný průměr z 2 pozorování o 25g krup

Teoretický přepočet na 1 kroupu = hodnota průměru 1 gramu vydělená počtem krup v 1 g

% rozdíl výtěžnosti spor = rozdíl mezi výtěžnostmi kmenů počítaný oběma metodami

Počet krup v 1 g = 26,85

Hodnoty výtěžností uvedených kmenů získaných oběma metodami byly mezi sebou porovnány. Mezi hodnotami byl zjištěn prokazatelný rozdíl a vypočítán procentuální rozdíl ve výtěžnostech. Výtěžnost konidií byla první metodou, stanovením výtěžnosti konidií z 25 krup, objektivně vyšší. Nejvyšší výtěžnost byla naměřena první metodou u kmenů NP 0002 ($4,75 \times 10^8$ konidií/ml), NP 0030 ($9,53 \times 10^8$ konidií/ml) a NP 0052 ($4,79 \times 10^8$ konidií/ml). Druhou metodou dosáhly nejvyšších výsledků kmeny NP 0006 ($3,36 \times 10^9$ konidií/ml), NP 0030 ($6,95 \times 10^9$ konidií/ml) a NP 0052 ($3,71 \times 10^9$ konidií/ml). U několika kmenů byla zaznamenána nižší průměrná produkce z 1g substrátu (graf č. 5.3.3 a 5.3.4).

Vyšší hodnoty bychom získaly při rozdrčení přírodního substrátu na jednotlivé kroupy před samotným vyhodnocováním, kdy docházelo ke ztrátám při vymývání konidií. Tento postup bychom v dalších pokusech upřednostnili. Rozdíl ve výtěžnostech se pohyboval v průměru okolo 34 %. Vyskytly se i takové extrémy ve výtěžnostech, které dosahovaly hodnot 4,9 % a 82,2 %.

Indexy porůstání byly hodnoceny po 3 dnech. Ze zjištěných výsledků bylo zřejmé, že kmeny NP 0006 a NP 0053 vykazují nižší rychlost porůstání, to znamená, že po 3 dnech od inokulace méně krup začalo sporulovat. Nejvyšší rychlost porůstání dosahovaly kmeny NP 0005 a NP 0026, kdy po 3 dnech od inokulace vykazovala většina krup plnou sporulaci.

5. Diskuse

5.1. Metody monitoringu a izolace entomopatogenních hub v NP a CHKO Šumava

Cílem této diplomové práce bylo monitorovat přirozený výskyt a druhové zastoupení entomopatogenních hub v NP a CHKO Šumava. Provedeným plošným monitoringem bylo zjištěno, že entomopatogenní houby jsou běžnými součástmi půdního ekosystému a jejich výskyt není ojedinělý.

Monitoring byl zaměřen zejména na výskyt entomopatogenní houby *Bauveria bassiana* v přímé asociaci s dospělci lýkožrouta smrkového. Přítomnost této houby byla prokázána na většině lokalit, a to v přímé asociaci s dospělci lýkožrouta smrkového. Zmíněné lokality byly vybrány lesníky z NP Šumava.

Mezi nalezenými houbami byl prokázán i výskyt houby *Beauveria brongniartii*, která má také předpoklady k využití pro ochranu rostlin, což bylo potvrzeno i při plošném monitoringu, neboť *B. brongniartii* vykazovala entomopatogenní vlastnosti podobné *B. bassiana*.

Proces samotné izolace nalezených hub byl prováděn pomocí metody živých pastí („Bait Metod“), při které byly použity 2 druhy larev, a to larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) a potemníka moučného (*Tenebrio molitor*), pro detekci entomopatogenních hub v půdě a kůře. Pomocí larev *G. mellonella* byly spolehlivě detekovány zejména kmeny *B. bassiana* a *B. brongniartii*, zatímco pomocí larev *T. molitor* byly zachyceny převážně kmeny houby *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Podle Zimmermanna (1986) je metoda živých pastí vysoce citlivá, neboť pro uvedené druhy larev není půda přirozeným prostředím a zvyšuje tedy citlivost larev vůči sledovaným patogenům. Na larvy půda působí jako stresující faktor, což je příčinou zvýšené vnímavosti larev zavíječe voskového k méně virulentním kmenům. Díky silně sklerotizované kutikule larev potemníka moučného bylo odchyceno méně kmenů jako *Beauveria bassiana* ve srovnání s *G. mellonella*.

Původně bylo v metodickém postupu používáno jen 10 larev, ale vlivem bakterióz bylo v každém pokusu několik larev usmrceno, a proto byl zvýšen počet larev na 12, abychom se vyvarovali ztrátám. Další postup byl přesně dodržen podle metodiky Zimmermanna (1986).

Z uvedených tabulek (4.1.6. – 4.1.10.) je zřejmé, že izolace entomopatogenních hub byla snadněji prováděna přes selektivní médium a.i. dodine.

Nalezené kmeny houby *Beauveria bassiana* byly roztríděny podle morfologických vlastností, přičemž také byla prokázána odlišná výtěžnost konidií u každého kmene a tedy vhodnost pro praktické použití v ochraně rostlin.

5.2. „In vitro“ charakteristika – stanovení radiálního růstu

Při stanovení radiálního růstu u vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* byly získány podstatné informace o produkci spor dané kultury. Hodnoty radiálního růstu na umělé živné půdě PDA nevykazovaly markantní rozdíly díky dodržení přesného metodického postupu. V hodnocení produkce spor byly rozdíly mezi kmeny zřejmé. Průkazné hodnoty svědčí o rozdílné produkci spor. Nejproduktivnějším kmenem byl NP 0031, který je díky své schopnosti produkovat velké množství konidií, vhodný k praktickému využití při regulaci populace lýkožrouta smrkového.

Při tomto testování bylo prokázáno, že jsou houby schopné růst na selektivních médiích a tudíž jsou vhodné i pro produkci a zpětnou introdukci do přirozeného ekosystému.

Nejvyšších hodnot v radiálním růstu bylo dosaženo u kmenů s označením NP 0001 a NP 0030, u kterých bylo předpokládáno, že budou mít nejvyšší produkce konidií ze středových kultur. Při dalším výzkumu bylo zjištěno, že produkce konidií u těchto kmenů je velice nízká a proto neexistuje přímá korelace mezi velikostí kolonie při radiálním růstu a produkcí konidií.

5.3. Polyfaktoriální hodnocení vybraných kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* odizolovaných při velkoplošném monitoringu na vybraných lokalitách NP Šumava

Uvedené laboratorní testy byly použity pro polyfaktoriální hodnocení vybraných kmenů *Beauveria bassiana* a měly vysokou vypovídací schopnost o vlastnostech jednotlivých kmenů. Z hlediska výtěžnosti kmenů byly zjištěny výrazné rozdíly.

Pro metodu polyfaktoriálního hodnocení hub bylo použito selektivního média PDA obsahující antibiotikum a selektivního média a.i. dodine. Při použití selektivního média PDA bez obsahu antibiotika byly na živné půdě zaznamenány výskyty půdních invazivních hub a bakterií.

U několika kmenů byla zaznamenána nižší průměrná produkce z 1g substrátu (graf č. 5.3.3. a 5.3.4.). Jednou z možných příčin nižší výtěžnosti bylo zřejmě nahloučení krup v Erlenmayerově baňce. Jelikož kroupy rozmístěné po ploše Petriho misky zajišťují houbě možnost růst po celém povrchu a proto byla zaznamenána vyšší výtěžnost při produkci konidií z 25 propagulí. Z toho vyplývá, že vyšší hodnoty výtěžnosti bychom získaly při rozdrcení přírodního substrátu na jednotlivé kroupy před samotným vyhodnocováním, aby nedocházelo ke ztrátám při vymývání konidií. Tento postup bychom v dalších pokusech upřednostnili.

Dalším důvodem menší výtěžnosti kmenů mohla být také nižší teplota při jejich inkubaci ve skladu. Doberski (1981) ve svém výzkumu poukázal na schopnost *B. bassiana* velmi dobře klíčit a růst i při nižší teplotě než 10°C. V našich podmínkách snížení teploty způsobilo u kmenů omezení produkce konidií.

Dodržení optimálního teplotního rozmezí pro růst entomopatogenních hub (20 – 25°C) je předpokladem pro získání objektivního výsledku (Inglis a kol., 2001), a proto by bylo vhodné pro další výzkum dodržet stálé podmínky při inkubaci houby na přirozeném substrátu.

6. Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na plošný monitoring vybraných druhů entomopatogenních hub (*Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*), *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) a *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) asociovaných s různými vývojovými stádii lýkožrouta smrkového *Ips typographus* L. ve smrčinách NP a CHKO Šumava a charakteristiku kmenů těchto entomopatogenních hub.

6.1. Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub

- Plošným monitoringem v oblasti NP a CHKO Šumava byly nalezeny entomopatogenní druhy hub *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*), *Lecanicillium lecanii* a *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. Bylo prokázáno, že jsou běžnou součástí půdních ekosystémů a frekvence jejich výskytu v půdě je velice četná.
- Uvedené entomopatogenní kmeny *Beauveria bassiana* byly získány z nalezených dospělců pomocí selektivních živných půd s fungicidní složkou a.i. dodine či PDA s antibiotikem. Selektivní živná půda s fungicidní složkou a.i. dodine umožňuje izolaci širokého spektra entomopatogenních hub a současně působí inhibičně na většinu půdních hub, nevykazujících entomopatogenní schopnosti (*Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. či *Mucor* spp.).
- Při izolaci entomopatogenních hub bylo preferováno získávání z dospělců pomocí selektivní média PDA obsahující antibiotikum před a.i.dodine, neboť selektivní médium a.i. dodine obsahuje kromě antibiotik ještě chemické látky, které by mohly mít vliv na vývoj hub na médiu.
- Pokud nebyl nalezen dospělec, izolace byla prováděna z kůry či půdy, resp. hrabanky; důvodem byla viditelná přímá asociace s lýkožroutem smrkovým.

- Selektivní živné půdy s fungicidní složkou a.i. dodine se také využívají jako prostředek k izolaci entomopatogenních hub v metodách živých pastí („Bait Method“), kde se významně osvědčily pro svou schopnost odizolovat entomopatogenní houby i tam, kde nebyly detekovány pomocí larev.
- Prostorové rozšíření a druhové spektrum přirozeně se vyskytujících entomopatogenních hub bylo ovlivněno celou řadou faktorů (biotických i abiotických). Zástupci rodů *Beauveria*, *Metarhizium* a *Isaria* (= *Paecilomyces*) byly nalezeny na podobných stanovištích, důvodem je zřejmě adaptabilita na stejné niky.

6.2. Polyfaktoriální hodnocení kmenů entomopatogenních hub a „In vitro“ charakteristika

Dále byla diplomová práce zaměřena na izolaci entomopatogenních hub pomocí selektivní živné půdy s fungicidní složkou a.i. dodine. Cílem práce bylo zkoumání základních vývojových charakteristik vybraných kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* pomocí standardních laboratorních postupů, které umožňují parametrizaci jednotlivých kmenů v oblasti „in vitro“.

- Byla prokázána značná vypovídací schopnost polyfaktoriálních hodnocení kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* při dodržení standardních metodických postupů.
- Při polyfaktoriálním hodnocení výtěžnosti jednotlivých kmenů jsme byli nuceni pozměnit metodický postup, protože docházelo ke ztrátám na výtěžnosti. Pozměněný postup bychom doporučily pro další zkoumání.
- Při testování jednotlivých kmenů houby *Beauveria bassiana* dosáhly nejlepších výsledků v testování kmeny číslo NP 0028, NP 0030, NP 0031 a NP 0052. Uvedené kmeny bychom doporučili pro využití v biologickém boji proti lýkožroutu smrkovému.

7. Seznam použité literatury

- Beilharz V.C., Partery D.G., Swart H.J., 1982** : Dodine: A selective agent for certain soil fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 79: 507 – 511.
- Bernardini M., Carilli A., Pacioni G., Santurbano B., 1975** : Isolation of Beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, 14: 1865.
- Bidochka M.J., St. Leger R.J., Josuu L., Roberts D.W., 1995** : The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycol. Res.*, 99 (4): 403 – 406.
- Bing L.A., Lewis L.C., 1991** : Suppression of *Ostrinia nubialis* (Hüber) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environ.*, 20: 1207-1211.
- Boucias D.C., Pendland J.C., Largo J.P., 1988** : Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic *Deuteromyces* to host insect cuticle. *Appl. Environ. Mikrobiology*, 54: 1795–1805.
- Bruck D.J., Lewis L.C., 2002** : Rainfall and crop residue effects on soil dispersion and *Beauveria bassiana* spread to corn. *Applied Soil Ecology*, 20: 183-190.
- Clark T.B., Keller W.R., Fakuda T., Lindegren J.E., 1968** : Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11: 1-7.
- Clerk G.C., 1969** : Influence of soil extracts on the germination of conidia of the fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 13: 120-124.
- Cloyd R.A., Meers T.L., 2005** : Quantitative sampling Method for fungus gnat (Diptera: Sciaridae) eggs in soilles growing media. *Journal of Economic Entomology*, 98: 1937-1942.
- Dirlbeková O., 1991** : Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (*Deuteromycetes*, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.). *Studie VTR, ÚVTIZ, Ř. rostl.výr.*, 11 : 10–21.
- Ekesi S., 2007** : Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. *Research Signpost, Nairobi*, s. 91–92.
- Fassatiová O., 1979** : Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. *SNTL, Praha*, s. 79–80, 82–85, 89–90.
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.C., 1994** : Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3–34.

- Ferron P., 1981** : Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burges, H.D.(Eds.), Microbial control of pests and plant diseases. Academic New York, s. 465–482.
- Forst P., Caban J., Michalík P., 1985** : Ochrana lesů a přírodního prostředí. SZN, Praha, s. 81–89.
- Gottwald T.R., Tedders W.L., 1984** : Colonization transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in soil. Environ. Entomol., 13: 557–560.
- Hrdý I. a kol., 1991** : Biopesticidy v zemědělství. Praha,s. 40–41.
- Hynek V., Juha M., 2004** : Národní park Šumava a kůrovci. Lesnická práce, 82(8).
- Chander L.D., Wright R.J., Scharf M.E., Meinke L.J., Zhou X., Siegfried B.D., 2000**: Larval susceptibility of an Insecticide-Resistant Western Corn Rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae) Population to soil Insecticides: Laboratory Bioassays, Assays of Detoxification Enzymes and Field Performance. Journal of Economic Entomology, 93(1): 7-13.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H., 2001**: Use of Hyphomycetes fungi for mangling Insect Pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents – progress, probléme and potential. CABI Publishing, s. 23–69.
- Joshi L., St. Leger R.J., 1999** : Cloning, expression and substráte specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Journal of Biological chemistry, 274(14): 9803-9811.
- Kerry B.R., Kirkwood I.A., Deleij F.A.A., Barba J., Leijdens M.B., Brookes P.C., 1993** : Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes, in soil. Biocontrol Science and Technology, 3: 355-365.
- Kouras A., Zouboulis C., Samara, Kouimtzis T., 1995** : Removal of pesticides from surface waters by combined physicochemical processes. Part I: Dodine. Chemosphere, 30(12): 2307–2315.
- Kreutz 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 E. N., 128(6): 384-389.
- Kučera A., 2009** : Situace na Šumavě [online], NP Šumava (cit. 20.4.2009), dostupné na URL: <<http://www.npsumava.cz/1327/sekce/situace-na-sumave/>>
- Landa Z. a kol., 2007** : Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. Lesnická práce, 86 :10.

- Landa Z., 2002:** Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních plodinách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hrušovský I. (Eds): Trvalo udržatelné technologie v zahradnictví. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 225–280.
- Landa Z., 1998 :** Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. ZF JCU, České Budějovice, Agro, 4(10) : 7–12.
- Landa Z., 1994 :** Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JCU, České Budějovice, s. 14-50.
- Leland J.E., 2001 :** Environmental – stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African Desert Locust (*Schistocerca gregaria*). Ph.D. Thesis. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Lingg A.J., Donaldson M.D., 1981 :** Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. Journal of Invertebrate Pathology, 38: 191–200.
- Majchrowicz I., Poprawski T.J., Maniania N.K., Robert P.H., 1990 :** Effects of entomopathogenic and opportunistic fungi on *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) at low relative humidity. Environ. Entomol., 19: 1163–1167.
- McCoy C.W., Quintela E.D., Faria M.R., 2002 :** Environmental persistence of entomopathogenic fungi. In: Baur M.E., Fuxa J.R. (Eds.): Factors affecting the survival of entomopathogens. Southern Cooperative Series Bulletin 400.
- Mitchell D.J., Kannwischer-Mitchell M.E., Dickson D.W., 1987 :** A semiselective medium for the isolation of *Paecilomyces lilacinus* from soil. Journal of Nematology, 19: 255-256.
- Moore D., Bridge P.D., Higgins P.M., Bateman R.P., Prior C., 1993 :** Ultra – violet radiation damage to *Metarhizium flavoviridae* conidia and the protection given by vegetable and mineral oil and chemical sunscreens. Ann. Appl. Biol., 122: 605–616.
- Mwangi E.N., Newson R.M., 1991 :** Drop-off patterns engorged adult females, nymphs and larva of *Rhipicephalus-Appendiculatus*. Insect Science and its application, 12(5-6): 629-633.
- Nguyen N.V., Kim Y.-J., Oh K.-T., Jung W.-J., Park R.-D., 2007 :** The role of chitinase from *Lecanicillium antillanum* B-3 in parasitism to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs. Biocontrol Science and Technology, 17: 1047–1058.
- Osborne L.S., Landa Z., 1992 :** Biological Control of Whiteflies with Entomopathogenic Fungi. Florida Entomologist, 75: 456–471.
- Pfeffer A., 1989 :** Kůrovcovití *Scolytidae* a jádrohlodovití *Platypodidae*. Academia, Praha, s. 73–76.

- Pfeffer A., 1955** : Fauna ČSR, svazek 6 Kůrovci – *Scolytoidea*. Československá akademie věd, Praha, s. 243–248.
- Poinar G., Poinar R., 1998** : Parasites and pathogens of mites. Annual review of Entomology, 43: 449-469.
- Pultar O., Weiser J., 2004** : Výsledky posledních patologických studií dominantních kůrovců v NP Šumava a jejich využití. In: *Sborník referátů 28. setkání lesníků tří generací na téma „Nebezpečí kůrovce v roce 2004“* 19.3.2004 (Praha – Novotného lávka). Česká společnost lesnická, VÚLHM Jíloviště-Strnady, Lesnická práce, s. 82-88.
- Samson R.A., Rombach M.C., 1985** : Biology of the *Verticillium* and *Aschersonia*. Pp. 32–42 In : Husary N. V., Scopes N.E.A., Biological pest control – the glasshouse experience. Cornell Univ. Ithaca Press, N.Y.
- Siebeneicher S.R., Bradleigh V.S., Kenerley C.M., 1992** : Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. Journal of Invertebrate Pathology, 59(3): 280–285.
- Vey, A., Hoagland R., Butt T.M., 2001** : Toxic metabolite of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C.W., Magan N., editors. Fungi as biocontrol agents: progress, problem and potential. Wallingford, UK: CABI International, s. 311–346.
- Veen K.H., Ferron P., 1966** : A selective medium for isolation of *Beauveria tenella* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 8: 268–269.
- Vidal C., Fargues J., Lacey L.A., 1997a** : Intraspecific Variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of Temperature on Vegetative Growth, Journal of Invertebrate Pathology, 70: 18–26.
- Warcup J.H., 1965** : Growth and reproduction of soil microorganisms in relation to substrate. In: Baker K.F., Snyder W.C. (Eds.), Ecology of soil – borne plant pathogens. Univ. Of California Press Berkeley, s. 52–68.
- Weiser J., 1966** : Nemoci hmyzu. ČSAV, 1966, Praha, s. 232–324.
- Wraight S.P., Butt T.M., Galaini-Wraight, Allee L.L., Soper R.S., Roberts D.W., 1990**: Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*, Journal of Invertebrate Pathology, 56(2): 157–174.
- Zare R., Gams W., 2001** : A revision of *Verticillium* section *Prostata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium*. Nova Hedwigia, 73: 1–50.
- Zimmermann G., 1986** : The „Galleria bait method“ for detection of entomopathogenic fungi in soil. Journal of Appl. Entomology, 12: 213–215.

Zimmermann G., 2007 : Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9): 879–920.

Zimmermann G., 2007 : Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17 (5/6): 553–596.

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

Anonymus 1: <http://www.npsumava.cz/1005/sekce/o-organizaci/>

Anonymus2: <http://www.agromanual.cz/cz/atlas/vykladovy-slovník/integrovaná-ochrana-rostlin.html>

Anonymus 3: <http://www.lesnimorava.cz/ochrana-lesa.htm>

Anonymus 4: mykoweb.prf.jcu.cz/ento.pdf

(Aktuální 20.4.2009.)

8. Přílohy

8.1. Indexy porůstání

0 = neporostlá

1 = porostlá

2 = hustěji porostlá

3 = z větší části hustější mycelium

4 = začátek sporulace

5 = vysporulovaná

Tabulka č. 8.1. Indexy porůstání

<i>Indexy porůstání</i>	0	1	2	3	4	5
Kmen	Σ	Σ	Σ	Σ	Σ	Σ
NP 0001						
1.pozorování	0	0	0	3	22	0
2.pozorování	0	0	0	5	20	0
3.pozorování	0	0	0	8	17	0
4.pozorování	0	0	0	3	22	0
5.pozorování	0	0	0	3	22	0
NP 0002						
1.pozorování	0	0	0	2	23	0
2.pozorování	0	0	0	1	24	0
3.pozorování	0	0	0	0	25	0
4.pozorování	0	0	0	4	21	0
5.pozorování	0	0	0	0	25	0
NP 0003						
1.pozorování	0	0	0	1	24	0
2.pozorování	0	0	0	2	23	0
3.pozorování	0	0	0	2	23	0
4.pozorování	0	0	0	1	24	0
5.pozorování	0	0	0	2	23	0
NP 0004						
1.pozorování	0	0	0	2	23	0
2.pozorování	0	0	0	1	24	0
3.pozorování	0	0	0	0	25	0
4.pozorování	0	0	0	2	23	0
5.pozorování	0	0	0	0	25	0
NP 0005						
1.pozorování	0	0	0	1	24	0
2.pozorování	0	0	0	1	24	0
3.pozorování	0	0	0	0	25	0
4.pozorování	0	0	0	0	25	0
5.pozorování	0	0	0	0	25	0
NP 0006						
1.pozorování	0	1	2	3	19	0
2.pozorování	0	0	3	5	17	0
3.pozorování	0	0	2	7	16	0
4.pozorování	0	1	2	2	20	0
5.pozorování	0	0	0	6	19	0
NP 0007						
1.pozorování	0	0	0	3	22	0
2.pozorování	0	0	0	5	20	0
3.pozorování	0	0	0	6	19	0
4.pozorování	0	0	1	5	19	0
5.pozorování	0	0	2	4	19	0

Tabulka č. 8.1. Indexy porůstání – pokračování

<i>Indexy porůstání</i>	0	1	2	3	4	5
Kmen	Σ	Σ	Σ	Σ	Σ	Σ
NP 0008						
1.pozorování	0	0	0	4	21	0
2.pozorování	0	0	0	2	23	0
3.pozorování	0	0	0	2	23	0
4.pozorování	0	0	0	2	23	0
5.pozorování	1	0	0	3	21	0
NP 0009						
1.pozorování	0	0	0	2	23	0
2.pozorování	0	0	0	1	24	0
3.pozorování	0	0	0	0	25	0
4.pozorování	0	0	0	1	24	0
5.pozorování	0	0	0	0	25	0
NP 0010						
1.pozorování	0	0	0	8	17	0
2.pozorování	0	0	0	5	20	0
3.pozorování	0	0	0	4	21	0
4.pozorování	0	0	0	4	21	0
5.pozorování	0	0	0	6	19	0
NP 0020						
1.pozorování	0	0	0	4	21	0
2.pozorování	0	0	0	5	20	0
3.pozorování	0	0	0	6	19	0
4.pozorování	0	0	0	7	18	0
5.pozorování	0	0	0	5	20	0
NP 0022						
1.pozorování	0	0	0	4	21	0
2.pozorování	0	0	0	7	18	0
3.pozorování	0	0	0	5	20	0
4.pozorování	0	0	0	9	16	0
5.pozorování	0	0	0	7	18	0
NP 0026						
1.pozorování	0	0	0	0	25	0
2.pozorování	0	0	0	0	25	0
3.pozorování	0	0	0	2	23	0
4.pozorování	0	0	0	0	25	0
5.pozorování	0	0	0	3	22	0
NP 0027						
1.pozorování	0	0	0	8	17	0
2.pozorování	0	0	1	4	20	0
3.pozorování	0	0	0	8	17	0
4.pozorování	0	0	0	6	19	0
5.pozorování	0	0	0	4	21	0
NP 0028						
1.pozorování	0	0	0	4	21	0
2.pozorování	0	0	3	4	21	0
3.pozorování	0	0	2	6	17	0
4.pozorování	0	0	0	3	22	0
5.pozorování	0	0	0	7	18	0

Tabulka č.8.1. Indexy porůstání – pokračování

<i>Indexy porůstání</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Kmen	Σ	Σ	Σ	Σ	Σ	Σ
NP 0029						
1.pozorování	0	0	0	5	20	0
2.pozorování	0	0	0	4	21	0
3.pozorování	0	0	0	4	21	0
4.pozorování	0	0	1	7	18	0
5.pozorování	0	0	2	5	20	0
NP 0030						
1.pozorování	0	0	0	0	25	0
2.pozorování	0	0	0	1	24	0
3.pozorování	0	0	0	1	24	0
4.pozorování	0	0	0	1	24	0
5.pozorování	1	0	0	6	19	0
NP 0031						
1.pozorování	0	0	1	13	11	0
2.pozorování	0	0	3	9	13	0
3.pozorování	0	0	0	18	7	0
4.pozorování	0	0	0	15	10	0
5.pozorování	0	0	1	11	13	0
NP 0051						
1.pozorování	0	0	0	4	21	0
2.pozorování	0	0	0	2	23	0
3.pozorování	0	0	0	1	24	0
4.pozorování	0	0	0	4	21	0
5.pozorování	0	0	0	3	22	0
NP 0052						
1.pozorování	0	0	0	19	6	0
2.pozorování	0	0	0	17	8	0
3.pozorování	0	0	0	18	7	0
4.pozorování	0	0	0	16	9	0
5.pozorování	0	0	0	16	9	0
NP 0053						
1.pozorování	0	0	2	16	7	0
2.pozorování	0	0	4	16	5	0
3.pozorování	0	0	3	8	14	0
4.pozorování	0	0	5	13	7	0
5.pozorování	0	0	10	7	8	0
NP 0054						
1.pozorování	0	0	0	3	22	0
2.pozorování	0	0	0	0	25	0
3.pozorování	0	0	0	2	23	0
4.pozorování	0	0	0	1	24	0
5.pozorování	0	0	0	3	22	0

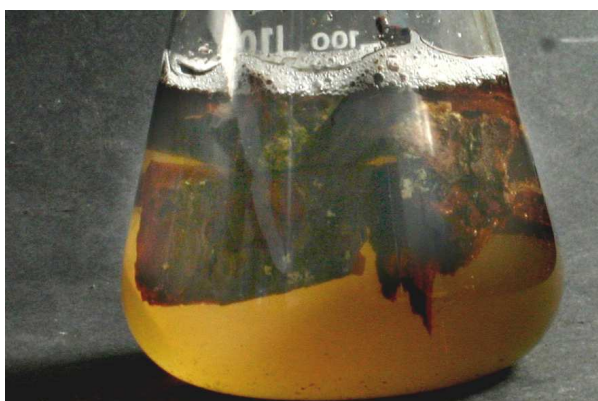
8.2. METODICKÉ POSTUPY DETEKCE A IZOLACE ENTOMOPATOGENNÍCH HUB ZE VZORKŮ POMOCÍ „TENEBRIO BAIT METHOD“ A SELEKTIVNÍHO MÉDIA S FUNGICIDNÍ SLOŽKOU A.I. DODINE



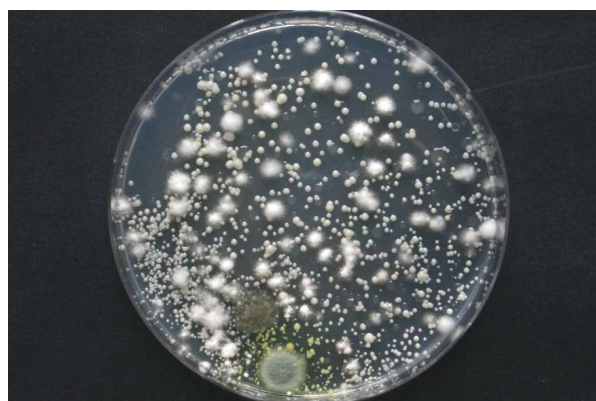
Obr. 1. Infikovaný dospělec *I. typographus* nalezený při cíleném vyhledávání entomopatogenních hub



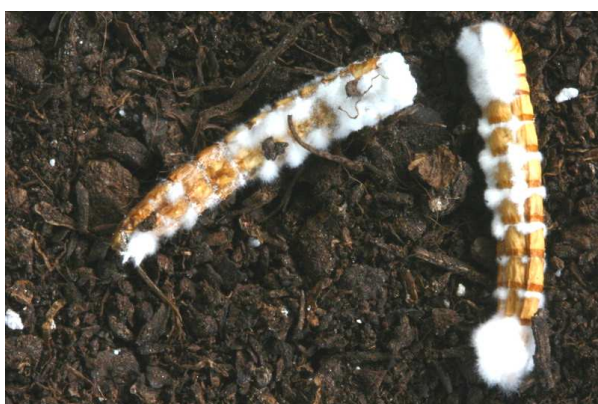
Obr. 2. Čistá kultura houby *B. bassiana* získaná po izolaci z infikovaného dospělce *I. typographus*



Obr. 4. Výluh z kůry analyzované na detekci přítomnosti entomopatogenních hub



Obr. 5. Odizolované kultury entomopatogenních hub pomocí selektivního média s fungicidní složkou a.i. dodine



Obr. 6. Detail larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) infikované houbou *B. bassiana* po analýze půdního vzorku



Obr. 7. Čistá kultura entomopatogenní houby *B. bassiana* ve formě bodové kultury

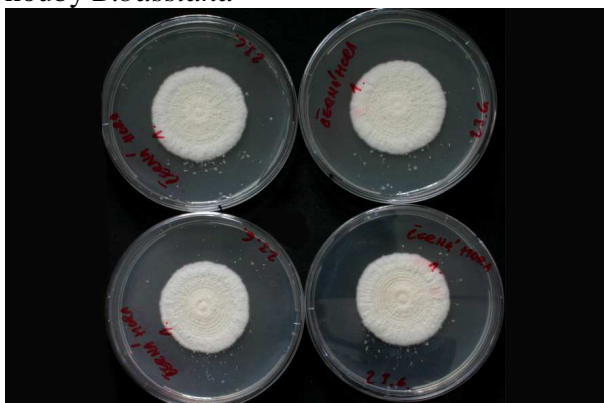
8.3. HODNOCENÍ MORFOLOGICKÝCH MARKERŮ A RADIÁLNÍHO RŮSTU STŘEDOVÝCH KULTUR



Obr. 1. Středová kultura entomopatogenní houby *B. bassiana*



Obr. 2. Radiální růst kultury po 21 dnech kultivace na PDA



Obr. 3. Demonstrace homogenity morfologických markerů kmene NP 0001



Obr. 4. Sada kmenů pro polyfaktoriální charakterizace



Obr. 5. Uchovávání matečny kultur kmenů hub do sbírky ve formě alginátových pelet



Obr. 6. Aktivace kmene entomopatogenní houby *B. bassiana* z alginátových pelet

Název souboru: diplom.rtf
Adresář: C:\Documents and Settings\Hana\Plocha
Šablona: C:\Documents and Settings\Hana\Data
aplikací\Microsoft\Šablony\Normal.dot
Název: JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Předmět:
Autor: Hana
Klíčová slova:
Komentáře:
Datum vytvoření: 8.5.2009 19:05:00
Číslo revize: 4
Poslední uložení: 8.5.2009 19:17:00
Uložil: Hana
Celková doba úprav: 11 min.
Poslední tisk: 8.5.2009 19:18:00
Jako poslední úplný tisk
Počet stránek: 64
Počet slov: 15 780 (přibližně)
Počet znaků: 93 107 (přibližně)