

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Disertační práce

**STUDIUM ÚČINNOSTI VYBRANÝCH DRUHŮ
ENTOMOPATOGENNÍCH HUB A HLÍSTIC NA LARVÁCH
MODELOVÝCH DRUHŮ HMYZÍCH ŠKŮDCŮ**

Autor disertační práce

Ing. Štěpánka RADOVÁ

Školitel

prof. Ing. Zdeněk LANDA, CSc.
Katedra rostlinné výroby, ZF JU

*České Budějovice
Květen 2010*

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Studium účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub a hlístic na larvách modelových druhů hmyzích škůdců“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....
ŠTĚPÁNKA RADOVÁ

České Budějovice, květen 2010

Děkuji svému školiteli prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za odborné vedení, velkou toleranci a pomoc, kterou mi poskytl v průběhu studia a zpracování disertační práce.

Dále děkuji všem, kteří mi dodávali morální sílu a pomáhali zvláště v závěrečných fázích studia.

ŠTĚPÁNKA RADOVÁ

ŘEŠENÍ TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE BYLO PODPOROVÁNO Z NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ:

Identifikace	Název
IG 06/07	Využití entomopatogenních hub v kombinaci s entomoparazitickými hlísticemi v programech biointenzivní IOR proti modelovým druhům hmyzích škůdců
IG 09/09	Testování vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu <i>Steinernema</i> proti modelovým druhům škůdců

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Entomopatogenní hlístice (EPNs)	2
2.2	Entomopatogenní houby (EPFs)	20
2.3	EPNs a EPFs ve společné kombinaci a jejich potenciál v IOR	21
3	CÍLE PRÁCE	23
4	MATERIÁL A METODY	24
4.1	Entomopatogenní hlístice	24
4.2	Entomopatogenní houby	25
4.3	Populace larev hmyzu používaných v pokusech	27
4.4	Kultivační jednotky a půdní substrát používaný v pokusech	28
4.5	Přehled hlavních metodických postupů	28
4.6	Digitalizace obrazu, mikroskopická technika a statistika	31
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	33
5.1	Hodnocení kompatibility vybraných pesticidů s hlísticí <i>S. feltiae</i>	33
5.2	Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu <i>Steinernema</i> proti larvám modelových škůdců	38
5.3	Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na účinnost hlístic rodu <i>Steinernema</i>	43
5.4	Hodnocení vlivu teploty a vlhkosti na účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu <i>Steinernema</i> proti larvám modelových škůdců	47
5.5	Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub proti larvám <i>T. molitor</i>	57
5.6	Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na vývoj infekce entomopatogenních hub na larvách <i>T. molitor</i>	63
5.7	Hodnocení vlivu přítomnosti hmyzího hostitele na schopnost entomopatogenních hub namnožit se v půdním substrátu	73
5.8	Studium interakcí mezi entomopatogenními hlísticemi a houbami	77
5.9	Vliv entomopatogenní hlístice <i>S. carpocapsae</i> na vývoj infekce entomopatogenních hub na larvách <i>T. molitor</i>	86
6	DISKUZE	94
7	ZÁVĚRY	104
8	SUMMARY	106
9	SEZNAM LITERATURY	109
10	PŘÍLOHY	128

1 ÚVOD

V současné době je kladen důraz na využívání bioracionálních přístupů v boji proti zemědělsky významným škůdcům s co možná nejšetrnějšími zásahy do agroekosystému. Vznik rezistence vůči insekticidům je jednou z hnacích sil pro změnu managementu pesticidních prostředků. V rámci regulační politiky vlády klesá počet nově registrovaných látek, naopak se podporují projekty na rozvoj komponentů šetrných k prostředí, s nízkou toxicitou, krátkou dobou perzistence, bez ohrožení kontaminace podzemních vod a s limitovaným dopadem na necílové organismy. Tyto podmínky však redukuje možnosti výroby účinných látek a dramaticky zvyšují cenu výzkumu a vývoje. Pro chemickou kontrolu půdního hmyzu jsou tyto podmínky zvláště významné, neboť na rozdíl od pesticidů aplikovaných do fyloplánu, musí být účinné látky insekticidů schopny působit často ve velkých hloubkách. Tak aby dosáhly účinnosti i v tak extrémních podmínkách, musí být rozpustné ve vodě, čímž se zvyšuje riziko kontaminace podzemní vody. Během realizace jsou účinné látky dále vystavovány biodegradaci půdními organismy a absorpci minerálními a organickými složkami půdy. Tak aby mohly účinné látky čelit všem těmto nástrahám a zároveň dosahovat odpovídajících výsledků, musí být vysoce toxické a perzistentní, což popírá veškeré požadavky regulační politiky. Díky takto nastaveným podmínkám je potřeba hledat nové alternativní přístupy k ochraně rostlin. Nejvhodnějším řešením tohoto problému se jeví integrovaný systém ochrany rostlin (IOR), který slučuje chemické, fyzikální, agrotechnické a biologické přístupy, jež minimalizují ekonomické, zdravotní a environmentální rizika. Současná definice IOR zvyšuje důraz na záměrné využívání biologických a bioracionálních metod regulace populací škůdců (Landa 2002). Biologická ochrana je svou podstatou založená na interakci škůdce a jeho přirozených nepřátel (parazitoidi, predátoři a patogeny). Mezi patogeny používané v biologické ochraně rostlin řadíme bakterie, houby, viry, prvoky a hlístovky. Každá skupina zahrnuje stovky druhů, které mohou atakovat hmyz. Nicméně pouze některé druhy jsou využívány v biologické ochraně rostlin. Kombinace dvou entomopatogenních agens, které se v přírodě běžně vyskytují a dokáží regulovat širokou škálu škodlivého hmyzu, je naplněním myšlenky biointenzivní integrované ochrany rostlin. Nejen že poskytují co do účinnosti adekvátní náhradu za chemické prostředky, ale jejich bonusem je i perzistence v prostředí, která umožňuje stálý zdroj ochrany. Z technického hlediska lze upozornit i na nenáročnost aplikace. Také lze poukázat na fenomén rezistence, který je stále více a více diskutován a to jak z hlediska producentů ochranných prostředků tak cílových uživatelů. Nejvhodnějším řešením tohoto problému s rezistencí se jeví právě ochrana založená na působení bioagens. Případná kombinace entomopatogenních hlístovek s jinými organismy využívanými v biologické ochraně, jako např. s entomopatogenními houbami (*Hyphomycetes*) by mohla vést k synergistickému účinku, který by zvýšil potenciál ochrany proti cílové skupině hmyzích škůdců.

Zavádění biologických metod založených na kombinaci biologických agens do praxe ochrany rostlin však vyžaduje velké množství znalostí a zkušeností. Tato práce by mohla přispět k rozpoznání složitých interakcí vznikajících mezi entomopatogenními organismy. Práce je zaměřena na modelový interakční systém houba-hlístice-hostitel a je věnována především charakteristice účinnosti kombinace entomopatogenních agens na modelové druhy hmyzích škůdců.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Entomopatogenní hlístice (EPNs)

Hlístice (*Nematoda*) jsou nečlánkované organismy, základní tvar těla je protáhlý, válcovitý (Mráček and Weiser 1988), postrádající oběhovou a dýchací soustavu (Koppenhöfer et al. 2000). Většina hlístic je si tvarově velmi podobná. Výjimku tvoří jen někteří značně specializovaní parazité. Druhy hlístic, které parazitují nebo jsou jiným způsobem spjaty svým životním cyklem s hmyzem, tvoří jen malé procento z celkového počtu známých druhů. Vztah mezi hlísticemi a hmyzem přechází od obligátního a fakultativního parazitismu až k neškodné foresii. Z celkového počtu 184 čeledí hlístic v 25 řádech nalezneme zástupce napadající nebo žijící na těle hmyzu (Mráček and Weiser 1988). Sedm z těchto čeledí je možné využít v biologické ochraně proti hmyzu, jsou to: Mermitidae a Tetradonematidae (řád: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenidae a Sphaerulariidae (řád: Tylenchida); Heterorhabditidae a Steinernematidae (řád: Rhabditida). V současnosti jsou využívány jako mikrobiální insekticidy pouze čeledi Heterorhabditidae a Steinernematidae, které jsou produkovány komerčně mnoha společnostmi po celém světě (Lacey et al. 2000).

EPNs čeledí Steinernematidae a Heterorhabditidae jsou přirozeně se vyskytující obligátní parazité velkého množství druhů hmyzu (Poinar 1979). Obě čeledi patří do nadčeledi Rhabditoidea, podřádu Rhabditina, řádu Rhabditida, třídy Secernentia (Secernentea - Mráček and Weiser 1988) a kmene Nematoda (Poinar 1979). Rod *Steinernema* je součástí čeledi Steinernematidae (Rhabditida: Nematoda). Tato čeleď zahrnuje kromě tohoto rodu i rod *Neosteinernema* s jediným zástupcem *N. longicurvicauda*, parazita termitů (Nguyen and Smart 1994). Poinar (1979) popsal nový druh EPN *Heterorhabditis bacteriophora*, jenž byl umístěn do nové čeledi Heterorhabditidae (Rhabditida: Nematoda). Rody *Steinernema* a *Heterorhabditis* představují nejvýznamnější rody entomopatogenních hlístic. K dnešnímu dni bylo popsáno 46 druhů rodu *Steinernema* a 10 druhů rodu *Heterorhabditis* (Nguyen 2009). Všechny entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis* jsou mimo jiné symbioticky asociovány s fakultativně anaerobními bakteriemi (Boemare 2002).

Hlístice jako parazité hmyzu jsou známi již od 17. století (Nickle 1984), ale až teprve ve 30. letech 20. století se začaly využívat cíleně v ochraně rostlin proti hmyzím škůdcům. V roce 1929 Glaser a Fox (1930) našli hlístici infikovaného brouka *Popillia japonica* na golfovém hřišti ve státě New Jersey. Steiner popsal tuto hlístici ve stejném roce jako *Neoplectana* (= *Steinernema*) *glaseri* (Dutky 1937).

Co se týče názvosloví EPNs, je třeba upozornit na jistou diverzitu v terminologii, která je uváděna i v této práci. Ve světě je obecně používáno několik terminologických ustálených spojení pro tuto skupinu entomopatogenů. Kromě již zmiňovaného názvu „entomopatogenní hlístice“ se dále používají názvy, „entomopatogenní nematody“, „entomoparazitické hlístice“, či „parazitické hlístice hmyzu“ nebo české synonymum „hlístovky“, uváděné týmem autorů Weiser and Mráček (1988).

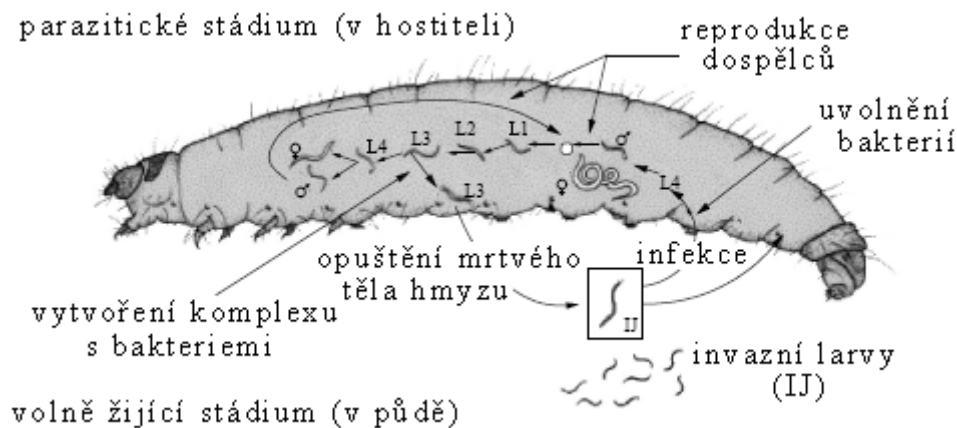
2.1.1 Vývojový cyklus EPNs rodu *Steinernema*

Většina druhů EPNs má podobnou biologii (Kaya and Stock 1997) a jsou svými vývojovými cykly přizpůsobeny k tomu, aby se udržely ve svém hmyzím hostiteli. Schémata těchto cyklů nejsou rigidně závazná. Hlístice parazitující hmyz jsou schopné aktivně vyhledávat hostitele a pronikat do jeho tělní dutiny v larválním, pupálním i dospělém stádiu (Mráček and Weiser 1988).

Hlístice čeledi Steinernematidae jsou gonochoristé, a tudíž je potřeba k dokončení životního cyklu minimálně dvou jedinců opačného pohlaví (Fan et al. 1991a, 1991b). Jediným

volně žijícím stádiem je infekční larva (= IJ, dauer juvenil, infective juvenil). Infekční stádia se vyznačují řadou morfologických, fyziologických a behaviorálních adaptací, které jim umožňují přežít v půdních podmínkách a nalézat nového hostitele. IJs jsou mnohem tolerantnější vůči teplotním a vlhkostním změnám ve srovnání s jinými stádii. Jednou z dalších odlišností infekčních stádií je obsah zásobních látek v těle, které tvoří až 40% hmotnosti. Slouží jako zdroj energie, neboť stádium IJ je stádiem jež nepřijímá potravu (ústní otvor i řitní otvor je uzavřen), proto je ve srovnání s jinými vývojovými stádii menší a užší. Infekční larvy si ponechávají kutikulu z předchozího instaru, která slouží jako ochranný „štít“ proti extrémním podmínkám a mikrobiální infekci. Infekční larvy různých druhů hlístic mají podobnou morfologii, ale značně se odlišují ve velikosti a chování (Kaya 1990; Kung et al. 1991). Infekční larvy hlístovek jsou schopny přežít až několik měsíců z vytvořených energetických zásob či ve stavu částečné anhydrobiózy. Délka přežívání infekčních larev hlístic bez přítomnosti hostitele závisí především na řadě faktorů, jako jsou teplota, vlhkost, přítomnost přirozených nepřátel a půdní typ (Molyneux 1985; Nguyen 1988; Kaya 1990; Kung et al. 1991). Infekční larvy pronikají do hostitele ústním otvorem, řitním otvorem, spirákuly nebo přímou penetrací kutikuly. Nejsnadnějším způsobem vniknutí do hostitele je ústní nebo řitní otvor. Při přímé penetraci se před průnikem kutikulou infekční stádia pohybují volně po povrchu hmyzího hostitele a prozkoumávají jeho záhyby. Během této doby svlékne kutikulu jedna čtvrtina až jedna třetina hlístovek. Hmyzí kutikulou pak infekční stádia pronikají hlavovým koncem tělními záhyby hostitele nebo mezi články jeho končetin. Jakmile hlístice prorazí hmyzí kutikulu, průnik proběhne rychle, často během několika minut. Následují opět minutové nebo i delší průzkumné pohyby uvnitř hostitele. Hlístice penetrují do dalších oblastí. Jakmile jeden infekční jedinec prolomí kutikulu, ostatní larvy pronikají zpravidla to samou cestou (Molyneux and Bedding 1984). Po proniknutí do hemolymfy hlístice začnou vylučovat látky bílkovinné povahy, které inhibují aktivitu imunitního systému hmyzu a rovněž ovlivňují jeho nervový systém. Kromě bakterií uvolňují hlístice látky s vysokou antibiotickou aktivitou, které chrání tělo hostitele před napadením dalšími organismy. Tento mechanismus umožňuje nerušený rozvoj hlístic (Glazer et al. 2002). Ve vhodných podmínkách napadený hmyz umírá do 24 - 72 hodin. Ačkoliv je primárně smrt hostitele zapříčiněna bakteriózou, na letálních účincích se podílí i toxiny produkované hlísticemi (Burman 1982). Z invazních larev se vyvíjí dospělci první generace, kteří jsou v závislosti na velikosti těla hostitele obvykle větší než dospělci následující tj. druhé generace. Dospělé hlístice lze nalézt v těle mrtvého hostitele 3 až 5 dní po průniku invazních larev. Samci se mohou vyvíjet rychleji než samice, bezprostředně po dosažení dospělosti dochází k páření. Samice kladou vajíčka do hemocelu hostitele, později vajíčka zůstávají v těle samice (*endotokia matricida*) (Poinar 1979). Tento jev je typický zvláště pro EPNs rodu *Heterorhabditis* a je indukován nedostatkem potravy. Oplozená vajíčka se vyvíjí v těle samice, až do fáze infekčních larev (Johnigk and Ehlers 1999).

Existují dva vývojové modely pro nově se vylíhlé larvy. Buď mohou pokračovat v parazitickém vývoji, během něhož se 4 x svlékají nebo se mohou vyvinout v infekční larvální stádium (invazní larvy). Průběh vývoje závisí na množství dostupné potravy, která závisí na podmínkách prostředí, dále na množství hlístic uvnitř těla hostitele a asociované mikroflóře. Samice druhé generace se páří se samci a kladou menší počet vajíček. Protože hlístice v této době zaplňují celé tělo hostitele, většina nebo všechny larvy, které se vylíhnou z vajíček, se vyvíjejí v invazní larvy (Poinar 1979), které si ponechávají kutikulu předcházejícího instaru, opouštějí mrtvého hostitele a vyhledávají nové hostitele (Kaya et al. 1997). Infekční cyklus je závislý především na teplotě a na druhové či kmenové specifitě hlístic. Celý životní cyklus trvá 7-10 dní při 25°C na larvách *Galleria mellonella*. (Wouts 1979; Wouts 1980; Nguyen and Smart 1992) (obr. 1)



Obr. 1 Životní cyklus EPNs rodu *Steinernema* v asociaci s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* (Emelianoff et al. 2008)

2.1.2 Symbiotické bakterie asociované s EPNs

Všechny entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* a *Heterorhabdits* jsou symbioticky asociovány s fakultativně anaerobními Gram negativními bakteriemi čeledi Enterobacteriaceae (kmen: Proteobacter). Hlístice rodu *Steinernema* jsou sdruženy s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* a hlístice rodu *Heterorhabditis* s rodem *Photorhabdus* (Boemare 2002; Forst and Clarke 2002). Každý jednotlivý druh bakterie je asociován s daným druhem hlístice, ale daný druh bakterií může být asociován s více druhy hlístic (Kaya and Koppenhöffer 1999) (tab. 1).

Infekční larvy hlístovek si v přední části svého střeva uchovávají 200-2000 symbiotických bakterií (Endo and Nickle 1994). Na rozdíl od ostatních hlístic řádu Rhabditida, které se dokáží žít a rozvíjet ve spolupráci s rozdílnými druhy bakterií, u EPNs se vyvinul uzavřený vztah se symbiotickými druhy. Hlístice poskytují bakteriím ochranu před vlivy vnějšího prostředí a infekční larvy nematod slouží jako vektor, který vnáší bakterie do sterilního prostředí. Naproti tomu bakterie překonávají hmyzí obranné mechanismy a vytváří vhodné podmínky pro vývoj hlístovek. Produkují látky antibiotické povahy, které potlačují konkurenční mikroorganismy, transformují hostitelské tkáně ve vhodný zdroj potravy a současně slouží jako potrava pro samotné hlístice. (Han and Ehlers 2001). Jakmile se bakterie dostanou do hemolymfy hostitelského organismu, začnou produkovat řadu toxinů a hydrolytických enzymů, které jsou zodpovědné za smrt hostitele a následně přeměňují tělo mrtvého hmyzu na vhodný zdroj potravy pro hlístice. Hlístice se vyvíjejí do té doby, než se zásoby potravy začnou stávat limitujícími. Tento impulz vede k vývoji infekčních larev, které nabírají do jícnu symbiotické bakterie a opouštějí vyčerpané tělo hostitele. Tento pozoruhodný navzájem propojený reprodukční cyklus je výsledkem dlouhodobého vývoje vztahu mezi bakteriemi a EPNs (Forst and Clark 2002).

Bakterie vytváří dvě formy (Arkhurst 1980), ale pouze primární forma je přenášena invazními larvami do nového hostitele. Obě formy jsou přibližně stejně patogenní. Při injikaci bakterií do tělní dutiny housenek zavíječe voskového s axenickými hlísticemi vytváří primární formy lepší podmínky pro růst a rozmnožování hlístic než sekundární forma (Weiser and Mráček 1988). Primární formu lze izolovat z infekčních larev a z těl infikovaného hmyzu, kdežto do sekundární fáze bakterie přechází *in vitro* či *in vivo* kulturách, kdy hlístice migrují z usmrcených těl svých hostitelů. Sekundární stádium bakterií není přijímáno infekčním stádiem druhu *H. bacteriophora* (Han and Ehlers 2001). Krasomil-Osterfeld (1995) převedl při kultivaci ve stresových podmínkách (př. snížený osmotický tlak) primární formu na sekundární. Jakmile

byly bakterie kultivovány opět ve standardních podmínkách, vrátili se zpět do primární formy. Kultivací ve stresových podmínkách jsou stabilně produkovány sekundární kultury bakterií (Boemare and Arkhurst 1988). Kromě ztrát některých metabolických funkcí při přechodu do sekundární formy (př. produkce proteáz, lipáz, intracelulárních krystalinních proteinů, antibiotik a pigmentu) je důležitou informací fakt, že sekundární stádia bakterií mají významný a rozhodující vliv na vývoj a výnos hlístic v *in vitro* kultivacích (Han and Ehlers 2001).

Mezi oběma rody symbiotických bakterií existují některé fyziologické rozdíly: bakterie rodu *Photorhabdus* jsou bioluminiscenční, během patogeneze zbarvují tělo hostitele do odstínu červené a v některých případech až do zelena. Izoláty bakterií tohoto rodu vykazují katalytické účinky, zatímco rod *Xenorhabdus* tyto účinky nevykazuje. Bakterie rodu *Xenorhabdus* zbarvují infikovaný hmyz do odstínu okru, šedé či tmavě šedé barvy a nejsou bioluminiscenční (Forst and Nealson 1996).

Tab. 1 Přehled druhů EPNs a jejich symbiotických bakterií (Kaya and Köppenhofer 1999)

Druh EPNs	Bakteriální symbiont
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nemathophilus</i>
<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. glaseri</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>S. kushidai</i>	<i>X. japonicus</i>
<i>S. riobrave</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. scapterisci</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Heterorhabdus bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>H. marelatus</i>	<i>P. luminescens</i>
<i>H. megidis</i>	<i>P. luminescens</i>

2.1.3 Faktory ovlivňující účinnost EPNs

Infekční larva hlístic je v půdním prostředí vystavena působení abiotických faktorů (vlhkost, teplota, pH, půdní druh, UV záření či pesticidy) a biotickým faktorům, ke kterým lze počítat všechny faktory, které ovlivňují přežívání nematod a jejich symbiontů. Do této skupiny lze zařadit organismy, které mohou působit jako konkurenti (intraspecifičtí či interpecifičtí) a přirozené nepřátele hlístic (Kaya et al. 1998). Neméně podstatnou roli hrají i látky antibiotické povahy vylučované samotnými hostiteli hlístic (Barbercheck et al. 1995) nebo allelopatika vylučované rostlinami, jež pak mohou negativně ovlivňovat vyhledávací schopnosti nematod (Kaya and Köppenhofer 1996). K těmto faktorům lze připočítat i faktor samotného patogena, který disponuje řadou fyziologických a behaviorálních vlastností, které mohou predeterminovat účinnost samotných hlístic.

Hostitelský okruh a behaviorální strategie

V laboratorních podmínkách je hostitelský okruh hlístovek velmi široký, neboť pro průběh infekce jsou zajištěny optimální podmínky (Kaya 1990). V polních podmínkách je však hostitelský okruh mnohem užší (Arkhurst 1990). Řada druhů hlístic má široké spektrum účinnosti a jejich hostitelský okruh se pohybuje v rámci řádů hmyzu, na druhé straně existuje řada úzce specializovaných druhů hlístic příkladem je *S. kushidai* (Mamiya 1989) a *S. scarabaei* (Stock and Köppenhofer 2003), jež jsou adaptovány na larvy čeledi *Scarabaeidae*. *S. scapterisci* je dalším úzce specializovaným druhem, jež je schopen napadat pouze krtonožky (Grewal et al. 1993). Jedním z hlavních faktorů zužujících hostitelský okruh EPNs je také potravní strategie infekčních larev. Hlístice využívají různých postupů při lokalizaci vhodného hostitele, jde o tzv.

sit-and-wait strategii nebo další široce rozšířenou cruiser strategii (Lewis 2002). Sit-and-wait, nebo-li tzv. ambusher je charakterizován sníženou mobilitou a sklonem zdržovat se v blízkosti povrchu půdy, při které je tělo infekční larvy z 95% exponováno ve volném prostoru, což napomáhá tomuto druhu napadat hmyzí larvy pohybující se těsně po půdním povrchu. Proto nejčastějšími hostiteli této skupiny jsou housenky osenic či obalečů nebo krtonožky, příkladem jsou *S. carpocapsae* a *S. scapterisci*. Dalším extrémem je strategie tzv. cruiser jenž je charakterizován vysokou pohyblivostí a schopností lokalizovat hostitele díky volatilním látkám. Tato schopnost umožňuje hlísticím napadat sedentární hmyz jako jsou larvy chroustů a kukly motýlů. Zástupci této skupiny jsou *S. glaseri* a *H. bacteriophora*. U většiny nematod jde však o jakési kontinuum mezi oběma – strategiemi. Příkladem mohou být hlístice *S. riobrave* a *S. feltiae*, které napadají hostitele, jako jsou housenky motýlů, larvy smutnic či lalokonosců (Campbell and Gaugler 1997).

2.1.3.1 Abiotické faktory

Vlhkost

Půdní vlhkost je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím přežívání a pohyb hlístovek. Pokud se hlístice vyskytují v prostředí s postupným poklesem vlhkosti, dokáží přežít delší dobu ve stavu anhydriobiózy až několik let (Wharton 1986). Postupné vysychání půdy poskytuje infekčním stádiím hlístic dost času, aby své tělo fyziologicky přizpůsobily nastávajícím podmínkám a převedly jej tak do částečně desikovaného stavu a imobilizované kviescence. Jednou z behaviorálních adaptací je i svinování některých druhů hlístic do těsného prstence, který zabraňuje nadměrnému vysychání. Toto chování umožňuje snížit evaporační plochu těla (Womersley 1987). V prostředí s nízkou relativní vzdušnou vlhkostí nejsou schopny hlístice přežít déle než několik hodin v závislosti na druhu hlístice, teplotě a vlhkosti prostředí (Glazer 1992; Menti et al. 1997). Rychlé vysychání hlístovek limituje jejich využití proti škůdcům působícím na nadzemních částech rostlin. V suché půdě dokáží však hlístice přetrvávat 2 až 3 týdny (Kaya 1990). Do určité míry může chránit hlístice před vysycháním tělo hostitele, ve kterém se hlístice vyvíjí (Koppenhöfer et al. 1997). Ve studii Serwe-Rodriguez et al. (2004) dokonce prokázali cross protektivní účinek vlhkostního stresu v průběhu vývoje nematod v mrtvém hostiteli. Stresové podmínky indukovaly u infekčních larev nematod vyšší odolnost vůči dalším environmentálním stresorům jako jsou extrémní teploty a pH.

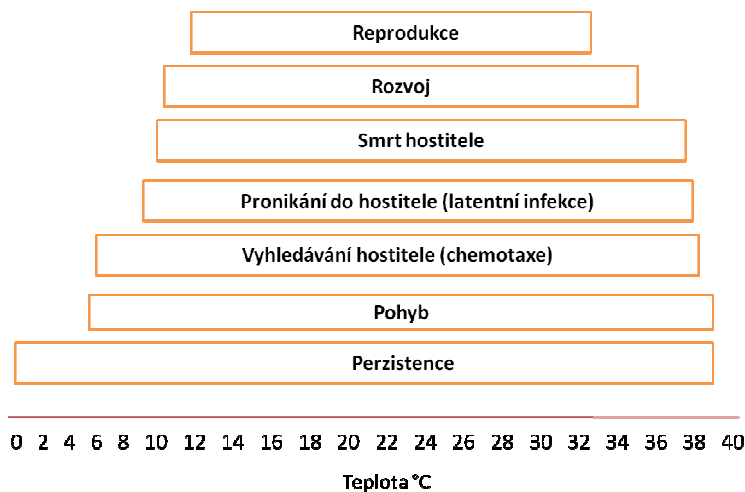
Na druhé straně při extrémně vysoké vlhkosti může docházet k hynutí hlístovek v důsledku nedostatku vzduchu (př. vysoký sloupec vody). Hlístovky jsou schopny krátkodobě přežít po určitou dobu v anaerobních podmínkách (Molyneux and Bedding 1984).

Teplota

Stejně jako vlhkost tak i teplota hraje velmi důležitou roli v aktivitě a schopnosti nematod působit efektivně v IPM programech. Tento faktor nejen že ovlivňuje hlístice jako takové, ale je také důležitým faktorem pro zdárný a rychlý rozvoj symbiotických bakterií. Díky tomu, že se hlístice vyskytují téměř ve všech zeměpisných šířkách, je nedílnou součástí jejich životní strategie i vysoká přizpůsobivost k vnějším podmínkám. Nematody žijící v půdních podmínkách jsou vystavovány v arktických či subarktických podmínkách teplotám výrazně nižším. Podobně je tomu i ve vyšších nadmořských výškách, kde se teploty pohybují výrazně pod bodem mrazu (Wharton 1986). Podle řady studií sledující přirozený výskyt EPNs lze říci, že jak hlístice rodu *Heterorhabditis* tak hlístice rodu *Steinernema* jsou schopny odolávat nízkým teplotám, neboť byly izolovány z mnoha míst severní Evropy a Kanady (Griffin and Downes 1991; Mráček and Webster 1993). Schopnost překonávat extrémně nízké teploty je přisuzována především kryoprotektivním látkám, které dokáží ochraňovat biologické tkáně před poškozením vznikajícím při tvorbě krystalů ledu při velmi nízkých teplotách. Obecně lze však říci, že hlístice

rodu *Steinernema* jsou mnohem tolerantnější k nižším teplotám, než-li druhy *Heterorhabditis*. Tento závěr potvrzují i studie Molyneux (1985) a Kaya (1990).

Dalším extrémem pro přežívání hlístovek jsou podmínky tropických oblastí, kde teploty běžně stoupají k hodnotám nad 30°C. I v takovýchto podmínkách je možno z půd izolovat hlístice rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis*. *S. riobravis* je schopna tolerovat teploty do 37°C. Stejně jako nedávno izolované druhy rodu *Heterorhabditis* v Izraeli a v Egyptě (Glazer 2002) či v tropické oblasti Srí Lanky (Amarasinghe et al. 1994). Přežívání EPNs se pohybuje v širokém teplotním rozmezí od 0 do 40 °C. Grewal et al. (1994) určil, že jednotlivé fáze životního cyklu nematod: infekce (pronikání do hostitele a smrt hostitele), rozvoj (vývoj infekčních larev až po generaci dospělců schopných se pářit) a reprodukce, se pohybují v mnohem užším teplotním rozpětí (obr. 2).



Obr. 2. Teplotní rozmezí aktivit pro základní biologické procesy entomopatogenních nematod

Půdní druh/typ

Půdní druh může výrazně ovlivňovat přežívání hlístovek v půdě, jejich pohyb i schopnost detekovat hostitele. Tento činitel působí na výskyt hlístovek nejen velikostí partikulí substrátu, jež výrazně ovlivňuje pohyb hlístic ale i celkovým provzdušněním půdy. Tento předpoklad je jeden ze základních k přežívání hlístic. EPNs jsou aerobními organismy, které nejsou schopny dlouhodobě přežít v prostředí se sníženým obsahem kyslíku (Wharton 1986). Problémy s areací mají především půdy jílovité a půdy s vysokým obsahem organické hmoty. Kromě ovlivnění pohybových aktivit je signifikantní vliv složení půdy i na patogenitu hlístic, jak potvrzuje studie Kung et al. (1990), jenž studoval vliv druhu půdy na hlístice *S. glaseri* a *S. carpocapsae*.

Osmotický tlak

Hlístice jsou obecně velmi tolerantní ke koncentraci solí v prostředí. Midity (1996) při monitoringu výskytu hlístic na území Belgie potvrdil přítomnost druhů *Steinernema* a *Heterorhabditis* v půdách, jejichž pH se pohybovalo v rozmezí 4,0 - 8,1. Ve studii, kterou prováděl Cheng and Hou (1997), byly inkubovány infekční larvy hlístic v roztoku pufrů v rozsahu pH 4,0 - 12,0 po dobu 10 dní a i po této době se vitalita hlístovek pohybovala kolem 70%.

UV záření

EPNs jsou velmi citlivé na sluneční záření, zvláště na ultrafialovou složku. Gaugler et al. (1992) prokázal v testech s *H. bacteriophora* vysokou citlivost tohoto druhu. Patogenita *H.*

bacteriophora se snížila již po 4 minutách expozice při hodnotě záření 302 nm. U *S. carpocapsae* se projevila podobná reakce po 6 minutách. Fujiiie and Yokohama (1998) zjistili obdobný vliv záření na hlístici *S. kushidai* a její symbiotické bakterie *X. japonicus*.

Pesticidy

Hlístice rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis* jsou považovány za odolné organismy vůči širokému spektru chemických pesticidů (Hara and Kaya 1982; Rovesti et al. 1989; Rovesti and Deseö 1990). Přesto existují výjimky především v případě některých druhů nematocidů (Rovesti and Deseö 1990, 1991). Většina prací je zaměřena na vliv insekticidů a nematocidů, ačkoliv nezanedbatelný je vliv i dalších látek např. fungicidů či herbicidů aplikovaných do agroekosystému. Del Pino and Jové (2005) studovali vliv fipronilu na *Steinernema carpocapsae*, *S. arenarium* a *Heterorhabditis bacteriophora*. Z výsledků pokusů vyplynulo, že druh *Steinernema carpocapsae* a *H. bacteriophora* byly velice odolné vůči fipronilu, *S. arenarium* však vykazovala vysokou citlivost vůči této látce. Vliv na infektivitu u housenek *Galleria mellonella* byl však u všech tří druhů zanedbatelný. Alumai and Grewal (2004) testovali životaschopnost *Steinernema carpocapsae* s řadou chemických komponentů, podle dosažených výsledků však nebyla ovlivněna žádnou testovanou látkou (halofenozid, imidacloprid, mefenoxam, trichlorfon, chlorpyrifos, thiametoxam, carbaryl), ale trichlorfon redukoval významným způsobem patogenitu. Vitalitu druhu *Heterorhabditis bacteriophora* snižovaly látky thiametoxam a trichlorfon, zatímco patogenitu snížil halofenozid, trichlorfon a carbaryl. Zajímavý výsledek pak byl dosažen s účinnou látkou imidacloprid, která v kombinaci s hlísticí *H. bacteriophora* zvyšovala výrazně účinky vůči larvám účinku chrousta, tedy lze mluvit o synergistickém vlivu kombinace obou složek (Koppenhöfer and Kaya 1998). Vliv na snížení invaznosti infekčních larev *Steinernema feltiae* mají také účinné látky abamectin, deltametrin a heptenophos (Head et al. 2000). Gordon et al. (1996) zjistil ve své práci, že hlístice *Steinernema feltiae* a *Steinernema carpocapsae* vykazují vysokou citlivost vůči karbamátům carbofuran a fenoxycarb. Oba vyvolávaly vysokou mortalitu. Vliv karbamátů a dalších pesticidů na entomopatogenní hlístice sledovali také Ishibashi and Takii (1993). Podle jejich výsledků však tyto látky způsobují spíše sníženou pohybovou aktivitu než mortalitu, což má za následek snížení patogenity těchto organismů. Další práci na téma kompatibilita pesticidů s entomoparazitickým nematodem *Heterorhabditis bacteriophora* publikoval Rovesti et al. (1988), ten ve své práci sledoval vliv celkem 75 pesticidů různých chemických skupin na přežívání a invaznost infekčních larev *H. bacteriophora*. Při testování byly použity různé kombinace standardních metod testování entomopatogenních nematodů. Z výsledků vyplývá, že některé účinné látky byly toxické již v koncentracích nižších, než jsou producentem doporučované. Byly to například fungicidy na bázi účinné látky dodin a carbendazim, herbicidy na bázi alachloru a paraquatu nebo insekticidy s aktivní látkou parathion, fonofos, carbofuran a další, mezi které patří například i nematocidy na bázi henamiphosu. U druhů *Steinernema feltiae* a *S. carpocapsae* nebyly zjištěny výrazné rozdíly v citlivosti na různé pesticidy a z celkového počtu 75 testovaných látek je možné za silně toxické považovat parathion, aldicarb, methomyl, flubenzimin, metham sodium a pfenamifos. (Rovesti and Deseö 1990). Hara and Kaya (1982) zjistili, že testované karbamáty a organofosfáty ovlivňují negativně reprodukční schopnost *S. carpocapsae* již při koncentracích větších nebo rovných 0,1 mg/ml.

Méně studovanou problematikou je vliv herbicidů na entomopatogenní hlístice. Vliv glyphosatu sledovali Gibb and Buhler (1998). Podle výsledků docházelo v půdě ošetřené herbicidem ke snížení infektivitu invazních larev *Steinernema carpocapsae*. Vlivem fungicidů na hlístice, konkrétně thiophanatmethylu, se zabýval Fujiiie et al. (1993). Podle výsledků této práce nemá thiophanatmethyl žádný vliv na patogenitu invazních larev *Steinernema kushidai*. Další účinnou látkou s fungicidním účinkem je např. azoxystrobin, ten na rozdíl od účinné látky

cinnamaldehyd nemá na druh *Steinernema feltiae* velký vliv a je vhodný ke společné aplikaci (Krishnayya and Grewal 2002).

2.1.3.2 Biotické faktory

Viry, bakterie a protozoa

Zaměříme-li se na interspecifické interakce hlístic a dalších organismů využívaných v biologické ochraně (př. viry, bakterie nebo houby) můžeme tyto vztahy definovat jako antagonistické, neboť jde o vzájemný vztah organismů konkurujících se ve stejném prostředí o prostor a společný zdroj potravy. Jako příklad takového antagonismu mezi hlísticemi a viry je test se *S. carpocapsae*, jež byla schopna proniknout do larev hostitele předem infikovaných virem polyedrózy. Hlístice infekci urychlily, ovšem díky rychlému průběhu došlo k předčasnému prasknutí infikované housenky, hlístice byly vystaveny působení vnějšího prostředí a došlo k jejich úhynu vlivem vysychání ještě před tím, než se mohly pomnožit (Kaya and Burlando 1989). U larev infikovaných bakterií *Bacillus thuringiensis* byl vývoj hlístic *S. carpocapsae* a *H. bacteriophora* ovlivněn především načasováním expozice hostitele. Je-li larva motýla 24 hodin před infekcí bakterie exponována nematodám, vývoj hlístic je normální (Poinar et al. 1990; Kaya 2002). Pokud však dojde nejdříve k vystavení larev bakterii *B. thuringiensis*, vývoj hlístic byl velmi slabý či vůbec žádný (Kaya 2002).

Nematofágní houby

Další poměrně významnou skupinou organismů jsou nematofágní houby, jež se vyskytují poměrně běžně v půdách po celém světě. Lze je rozdělit do dvou skupin a to na takzvané „nematode trapping“ houby, které svou oběť obtáčejí spleť speciálních hyf a následně pronikají do jejich těla. Tyto druhy mohou přežívat také jako saprofyty. Příkladem jsou druhy *Arthrobotrys oligospora*, *A. dactyloides*, *Monacosporium ellipso sporum* a *M. cionopagum*. Druhou skupinou entomofágních hub je skupina tzv. endoparazitických hub. Tyto houby jsou typickými obligátními parazity. Svou oběť zpravidla napadají po infekci iniciovanou konidiemi či zoosporami, jež pronikají do těla hlístice. Hyfy rostoucí houby využívají tělní obsah s následnou sporulací a šířením spor do okolí. Do této skupiny hub lze zařadit druh *Hirsutella rhossiliensis* (Jaffe et al. 1992; Kaya 2002). Tento druh má poměrně široký hostitelský okruh a dalo by se o něm uvažovat jako o možném biologickém prostředku proti fytopatogenním druhům hlístic. Naneštěstí je infekční i pro entomopatogenní a volně žijící druhy nematod.

Co se týče dalších druhů organismů působících jako přirození nepřátelé hlístic, lze sem zahrnout některé druhy mikrosporidií (Poinar 1988; Vermetchuk and Issi 1970) poškození těmito organismy se pohybuje v rozmezí od nepatrných až po letální poruchy. Mezi další predátory hlístivek patří i bezobratlí ze skupiny roztočů (Epsky et al. 1988) či chvostokoci (*Collembola*) druh *Folsomia candida* či *Sinella caeca* (Gilmore and Potter 1993; Kaya 2002).

2.1.4 Charakteristika vybraných druhů entomopatogenních hlístivek

Steinernema arenarium (Artyukhovskiy 1967) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982

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

Hlístice *Steinernema arenarium* byla poprvé pozorována na larvách a kuklách chrousta *Melolontha hippocastani* v roce 1957 v Usmanském lese ve Voroněžské oblasti (Воронежская область) (Rusko) (Poinar 1979). Byla označena jako *Neoplectana arenarium*. Následně byla v Rjazanské oblasti (Рязанская область) (Rusko) popsána hlístice *Steinernema anomalae*

(= *N. anomali*). Artyukovsky překvalifikoval *S. arenarium* a navrhl *S. anomali* jako mladší synonymum (Kakouli-Duarte et al. 1999).

Samci jsou 1,03 - 1,83 mm dlouzí (Poinar 1979). Tělo samců první generace je nažloutlé barvy. V přední části je ukončené kruhem s 6 labiálními a 4 nápadnými cefalickými papilami. Stoma kulovitěho tvaru. Jícen je svalnatý, metakarpus a bazální bulba zvětšené. Kardie je 5 - 7 μm dlouhá. Exkrece porus je 2 μm široký (Nguyen 2009). Je v úrovni nervového prstence (Poinar 1979). Spikuly jsou červenohnědé barvy (Nguyen 2009). Jsou bez háčků a zářezů (Poinar 1979). Samice měří v průměru 2,17 - 4,00 mm (Poinar 1979). Samice mají tělo s nažloutlým střevem a bezbarvými gonádami. Přední část těla je zakončena kruhem se 6 zašpičatělými labiálními papilami a kruhem se 4 cefalickými papilami. V přední části stoma je 1,5 μm sklerotizovaný kruh, zadní část je stejná jako u ostatních zástupců čeledi Steinernematidae. Jícen má nápadný metakarpus. Velikost invazních larev (L3) se pohybuje od 1,14 do 1,30 mm, průměr těla 33 - 42 μm (Poinar 1979). Na laterální straně je 8 hřebenů (9 linií). Přední část těla je zakončena kruhem cefalických kapslí širokých 12 - 14 μm . Ocas je kónický s kulatým nebo nepravidelným okrajem mezi hypodermální a hyalinní částí (Nguyen 2009). Životní cyklus druhu *S. arenarium* trvá 6 až 7 dní. V nově infikovaném hostiteli se vyskytuje přibližně 1,5× více sameček než samiček. Vajíčka jsou 32 - 48 × 32 - 56 μm velká. Larvy se líhnou z vajíček v těle samičky a vyvíjející se mláďata nakonec vyplní celé tělo samičky. Produkce vajíček, která se pohybuje od 14 - 16 do 42 - 46 vajíček na samičku, závisí na množství potravy, kterou má samička k dispozici (Poinar 1979).

***Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982**

Tento druh je znám pod řadou synonym (*Neoplectana dutkyi* Jackson, 1965, *Neoplectana georgica* Kakulija a Vermečuk, 1965, *Neoplectana* Vermečuk, 1969, *Neoplectana belorussica* Vermečuk, 1969, *Neoplectana kirjanovae* Vermečuk 1969, *Neoplectana semiothisae* Vermečuk a Litvinčuk, 1971 a *Neoplectana tabanivora* Rubcov a Polevik, 1979) (Nguyen 2009).

Jde pravděpodobně o neprostudovanější druh zástupců čeledi Steinernematidae. Tento druh byl poprvé popsán v Československu z okolí Holovous jako parazit housenek *Cydia pomonella*. Hlístice je rozšířena po celém světě (stejně jako její hostitel). Samice obří generace dorůstá délky až 14 mm. Tvar těla je válcovitý, hlavová část se pozvolně zužuje. Ústní otvor je triradiálně symetrický a kolem jsou nezřetlené pysky. Ústní dutina je krátká. Cylindrický jícen se za nervovým prstencem rozšiřuje v terminální bublus. Celkově se délka jícnu rovná 1/7 délky celého těla. Kutikula dospělců je hladká, pysky kolem ústního otvoru jsou spojené a nesou 2 kruhy papil. V prvním kruhu je 6 papil, ve druhém jsou 4. Amfidy jsou malé, vyúsťují jako póry. Stoma je redukováno. Jícen je svalnatý, poněkud rozšířený metakarpus je od terminálního bulbu oddělen zřetleným isthmem. Terminální bublus má 3 chloupky. Exkrece porus ústí obvykle před jícnovým prstencem. Vulva u samic vyčnívá na povrch. Vagina je krátká, se svalnatými stěnami. Samci mají jednoduché nepárové testes. Spikuly jsou zakřivené. Ocasní část samců je kónická (Mráček and Weiser 1988) a nese 23 genitálních papil: (11 párů a jednu nepárovou preanální: 5 párů subventrálních preanálních, 2 páry kloakálních, 1 pár laterálních a 3 páry post kloakálních). Ocas vybíhá v krátké mukro, burza chybí. Invazivní larvy měří 500-700 μm , jsou štíhlé užší, než následně parazitický typ. Ústní a řitní otvory jsou uzavřené. Jícen a střevo jsou nefunkční. Ocasní část je zašpičatělá a kutikula má zřetelná laterální pole (Nguyen 2009).

S. carpocapsae je s úspěchem používána v boji proti široké škále škůdců, jako jsou larvy nosatce *Listonotus oregonensis*, škodících na kořenech kořenové zeleniny (Bélair and Biovin 1995), dále proti larvám *Delia radicum* (L.) (Bracken 1990), mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) (Nickle et al. 1994) a především proti housenkám *Cydia pomonella* (Lacey et al. 2000; Lacey et al. 2006).

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

Pro tento druh je známo pět synonym, a to *Neoaplectana feltiae* Filipjev 1934, *Neoplectana bibionis* Bovien 1937, *Steinernema bibionis* (Bovien 1937) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982, *Neoaplectana leucaniae* Hoy 1954 a *Steinernema leucaniae* (Hoy 1954) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982 (Nguyen et al. 1997).

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

Samice první generace jsou 9,0-18,0 mm dlouhé, samice druhé generace 0,8-3,5 mm (Poinar 1979). Samice mají hladkou kutikulu. Hlava nese kruh 6 papil. Každá papila má na špičce jednu labiální papilu. Uložení vnitřních orgánů odpovídá obvyklému schématu (Mráček and Weiser 1988). Samci první generace dorůstají velikosti 1,6-2,8 mm, samci druhé generace 0,68-1,4 mm (Poinar 1979). Kutikula samců je rovněž hladká. Přední část těla je stejná jako u samic. Spikuly lehce zakřivené. Špička spikul je prodloužená, poměr průměrné délky spikul a jejich šíře je větší než 1,5, obvykle 2× delší než širší. Spikuly jsou zakřivené a gubernákulum duté (Mráček and Weiser 1988). Invazní larvy (L3) mají štíhlé tělo dorůstající velikosti 0,75-0,95 mm, stejnoměrně se zužující od báze jícnu k přednímu konci těla a od oblasti řitního otvoru ke konci ocasu. Kutikula je s nezřetelným příčným pruhováním, které je velmi jasně viditelné v raném vývoji, kdy je invazní larva ještě obklopená kutikulou předchozího vývojového stádia (L2), a v pozdním vývoji, kdy růst pokračuje v novém hostiteli. V čerstvém hostiteli s nízkou populační hustotou se nevyvíjí larvy L2 a L3, ale larvy L1 rychle přechází přímo v larvy L4. Když populační hustota vzroste, larvy L2 se vyvíjí a dávají vzniknout larvám L3 (Wouts 1980). *S. feltiae* je s úspěchem využívána především proti škůdcům řádu *Diptera* jako jsou smutnice (Jagdale et al. 2004; Oetting and Latimer 1991), larvy vrtalek (Hara et al. 1993; Head and Walters 2003; Williams and Walters 2000), květilek (Bracken 1990; Shapiro-Ilan et al. 1996) a řadě dalších hmyzích škůdců.

2.1.5 Přípravky na bázi EPNs

V dnešní době se na trhu pohybuje méně než 1% prostředků na ochranu rostlin na bázi entomopatogenních hlístic. Produkty, jejichž aktivní složkou jsou entomopatogenní hlístice, si těžko nalézají své místo na trhu díky některým limitujícím faktorům (především cena), nicméně tento trend se pomale obrací. Díky neustále se zlepšujícím technologiím produkce, formulace, balení a skladování se bude cena těchto produktů snižovat a tím i jejich dostupnost. Ačkoliv je popsáno více než 30 druhů hlístic z obou rodů, pouze sedm z nich je komerčně produkováno: *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravisi*, *S. scapterisci*, *S. kraussei*, *H. bacteriophora* a *H. megidis* (Smart 1995). V tabulce 2. jsou uvedeny příklady registrovaných přípravků na bázi EPNs.

Tab. 2 Přehled druhů entomopatogenních hlístovek používaných v registrovaných prostředcích na ochranu proti hmyzím škůdcům

Název přípravku	Druh hlístice	Cílový organismus	Firma
Entonem	<i>S. feltiae</i>	Smutnice	Koppert (Holandsko)
Scia-Rid	<i>Steinernema sp.</i>	Smutnice	
Traunem	<i>S. feltiae</i>	Smutnice	Andermatt Biocontrol (Švýcarsko)
Nemaplus	<i>S. feltiae</i>	Smutnice, muchnice	
Nemacel	<i>S. feltiae</i>	Smutnice	
Nemapom	<i>S. feltiae</i>	Obaleč jablečný, Nesytka jabloňová	e-Nema (Německo)
Nemaflor	<i>S. feltiae</i>	Třásněnka západní	
Nemasys	<i>S. feltiae</i>	Smutnice	Becker Underwood (USA)
Carponem	<i>S. carpocapsae</i>	Krtonožky	Andermatt Biocontrol (Švýcarsko)
Capsanem	<i>S. carpocapsae</i>	Můry, tiplice, klikoroh borový, brouci, krtonožky	Koppert (Holandsko)
Nemastar	<i>S. carpocapsae</i>	Krtonožky, osenice	e-Nema (Německo)
Nemasys L	<i>S. kraussei</i>	Lalokonosci	
Nematac S	<i>S. scapterisci</i>	Krtonožky	Becker Underwood (USA)
Nemasys G	<i>Heterorhabditis sp.</i>	Listokazi	
Terranem	<i>H. bacteriophora</i>	Listokazi	Koppert (Holandsko)
Larvanem	<i>H. bacteriophora</i>	Lalokonosci, hrotnokřídlec	Koppert (Holandsko)
Nemá-Green	<i>H. bacteriophora</i>	Chrousti, listokazi	e-Nema (Německo)
Larvanem-M	<i>H. megidis</i>	Lalokonosci	Koppert (Holandsko)

2.2 Entomopatogenní houby (EPFs)

Houby zahrnují fylogeneticky diverzní skupinu mikroorganismů, jež je prezentována jak jednobuněčnými (kvasinky) tak hyfálními (vláknité houby) eukaryotickými organismy rozmnožujícími se sexuálně či asexuálně cestou. Některé druhy hub ztratily schopnost rozmnožovat se pohlavně nebo se rozmnožují pohlavně jen zřídka. Do této skupiny lze zahrnout většinu EPFs. Tato skupina hub je tedy tradičně umístěna do oddělení Mitozporické houby (Fungi imperfecti, Deuteromycota) s uměle vytvořenou třídou Hyphomycetes. Zástupci této třídy vytváří mycelium s následnou produkcí asexuálních spor nazývanými konidie (Hawksworth et al. 1995). Třída Hyphomycetes zahrnuje řád Moniliales jenž má z hlediska praktické biologické ochrany největší význam neboť se v něm vyskytují nejznámější rody EPFs, rod *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* a (*Paecilomyces*= *Isaria*) (McCoy et al. 1988; Humber 1997).

2.2.1 Vývojový cyklus EPFs

EPFs patří mezi druhy hmyzích patogenů, které dokáží infikovat svého hostitele primárně přes kutikulu. Konidie mnoha taxonů entomopatogenních Hyphomycet dokáží pevně přilnout k hmyzí kutikule. Tato schopnost je přisuzována řadě nesespecifických adhezních mechanismů daných hydrofobním složením buněčné stěny spor (Boucias et al. 1991). Kromě schopnosti přilnout na povrchu hmyzího hostitele se na zdárném klíčení a penetrace propagule houbového patogena podílí řada faktorů a to jak faktory prostředí (teplota, vlhkost), tak i přítomnost inhibičních činitelů jako jsou mastné kyseliny, melanin v kutikule hostitele. Adheze propagulí k povrchu hostitele je prvním krokem infekčního cyklu. Prvotní vazba je obvykle pasivní, ale následující spojení a klíčení je procesem aktivním. Hydrofobní konidie mnoha patogenů mohou být navázány na nesespecifické části epikutikuly příhodných i rezistentních druhů hmyzu (Boucias et al. 1988). Produkce penetrujícího klíčku se však obvykle nevyskytuje u organismu, jenž není hostitelem. V okamžiku kontaktu propagule s vhodnou hmyzí kutikulou může klíčit a produkovat penetrační struktury (klíček, apresorium), z kterých se formuje penetrační hyfa. Klíčení vyžaduje odpovídající vlhkost a přístupné zdroje výživy pro produkci klíčku. Dalším krokem patogeneze je rozpoznání hostitele. Tento systém je pravděpodobně napojen na specifické geny virulence, avirulence a citlivosti patogena. Při penetraci kutikuly hostitele všechny houby využívají kombinaci enzymů a mechanického tlaku. Vylučováno je velké množství enzymů, především proteázy, esterázy, lipázy a chitinázy. Vzhledem k tomu, že velkou část hmyzí kutikuly tvoří proteiny, musí v procesu penetrace sehrávat významnou úlohu proteázy. (Butt 2002). Kromě enzymů EPFs produkují široké spektrum biologicky aktivních látek (toxiny), obvykle produktů sekundárního metabolismu. Tyto metabolity slouží k různým funkcím. Některé mohou být antibiotiky sloužícími k ochraně proti antagonistickým mikroorganismům, jiné předcházejí růstu saprofytických mikroorganismů na hostiteli po jeho smrti a tak zvyšují přežití agens. Některé jsou rozhodujícími faktory patogenity (Strasser et al. 2000). Po dosažení hemocelu pokračuje růst houby jako tenkostěnná, jedno či vícebuněčná hyfální tělíska. Kulovité až oválné buňky vzniklé pučením jsou také někdy označovány jako blastospory. Během fáze kolonizace hostitele musí houba překonat imunitní odpověď hmyzu (Gillespie et al. 2000). Některé ze sekundárních metabolitů vykazují aktivitu narušující buněčnou a humorální obranu hostitele (Vilcinskas et al. 1997; Vey et al. 2001). Odpověď hostitele na houbovou infekci může být kombinací humorálních a buněčných obranných mechanismů (např. fagocytóza či enkapsulace) (Butt et al. 1996; Bidochka et al. 1997; Lamberty et al. 1999). Smrt hostitele bývá nakonec kombinací toxikózy, invaze do orgánů a vyčerpání živin. Samozřejmě také v hostiteli produkují houby široké spektrum enzymů zahrnujících esterázy, proteázy a

oxidázy (Joshi and St. Leger 1999). Smrtí hostitele dochází k ukončení parazitické fáze a začíná fáze saprotrofní. Za vhodných podmínek dochází bezprostředně po usmrcení hostitele k prorůstání houby na povrch těla usmrceného hostitele a na vzdušném myceliu se vytváří fruktifikační orgány charakteristické pro daný druh. Saprotrofní fáze patogena končí úplnou sporulací. K šíření patogena dochází pomocí konidií rozšiřovaných nejčastěji pasivně (voda, proudění vzduchu) nebo přímým kontaktem zdravých jedinců s jedinci infikovanými (Osborne et al. 1992). Mnoho zástupců Hyphomycetes (např. *Beauveria*, *Metarhizium* a *Isaria*) produkují hydrofobní konidie s bílkovinami hydrofobiny (bohatými na cystein) s tyčkovitou vrstvou buněčné stěny. Oproti tomu *L. lecanii* produkuje hydrofilní konidie. Hydrofobnost konidiogenní buněčné stěny ovlivňuje biologii těchto hub a je důležitým faktorem při vývoji vhodné formulace a aplikační metody v biologické ochraně proti škůdcům; hydrofilní konidie se snadno rozptylují ve vodních nosičích, zatímco hydrofobní konidie se lépe mísí v olejovém nosiči.

2.2.2 Faktory ovlivňující účinnost EPF

Infekce hmyzu způsobené entomopatogenními houbami jsou podmíněny faktory biotickými (fyziologické podmínky hostitele a patogena, hostitelská rostlina) a faktory abiotickými (teplota, relativní vzdušná vlhkost, sluneční záření) (Gindin et al. 2000). Významné rozdíly byly zaznamenány nejen mezi jednotlivými druhy entomopatogenních hub, ale i mezi jejich jednotlivými kmeny. V rámci jednoho druhu EPFs existuje široké spektrum kmenů, které jsou různě tolerantní k odlišným podmínkám prostředí, mohou se vyznačovat různou rychlostí klíčení, vitalitou, patogenitou či schopností růstu a sporulace na povrchu mrtvého hostitele, včetně odlišné virulence vůči jednotlivým druhům hostitelů (Butt and Goettel 2000).

2.2.2.1 Hostitelský okruh

Hostitelské spektrum entomopatogenních hub se významně liší v závislosti na druhu houby. Například houba *Aschersonia aleyrodis* infikuje pouze zástupce z čeledi Aleyrodidae a *Nomuraea rileyi* téměř výhradně infikuje housenky motýlů čeledi Noctuidae. Naproti tomu druhy patřící do rodů *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Isaria* a *Tolypocladium* jsou zpravidla široce polyfágní a mohou parazitovat na zástupcích patřících do různých řádů hmyzu. Pro úspěšnou kontrolu hmyzí populace je nezbytný výběr vhodného kmene, který je schopný penetrovat a infikovat jedince (Gindin et al. 2000; Meekes et al. 2002). Za účelem zachování nebo navýšení virulence použitého kmene je proto často zdůrazňována nutnost udržovat virulenci kmenů pasážováním přes přirozeného hmyzího hostitele (Hirte et al. 1989).

2.2.2.2 Hostitel

Dalším významným hlediskem jsou fyziologické a morfologické faktory, které ovlivňují rozvoj onemocnění způsobených entomopatogenními houbami v populaci hmyzích hostitelů. Patří k nim: populační hustota, chování a bionomie hostitele, vývojové stádium, dostupnost potravy, genetický základ, možné mechanické či chemické poranění nebo poranění způsobené parazity nebo predátory (Inglis et al. 2001). Vývojové stádium hmyzu představuje významný prvek predeterminace průběhu houbového onemocnění. Ne všechna vývojová stádia hmyzu mohou být infikována entomopatogenními houbami. V mnoha případech jsou juvenilní stádia hmyzu (larvy, nymfy) více náchylná k infekci než dospělci (Butt and Goettel 2000; Inglis et al. 2001). Juvenilní stádia hmyzu jsou náchylnější k houbovým nákazám zpravidla proto, že mají slabší kutikulu a vnější kostra nepředstavuje tak významnou obrannou bariéru jako v případě dospělců (Weiser 1966). Hustota populace hmyzu je obzvláště důležitá na počátku a v průběhu epizootie choroby, neboť zvyšuje pravděpodobnost kontaktu jedinců zdravých s jedinci infikovanými (Steinhaus 1958). Navíc, při vyšší populační hustotě dochází uvnitř populace

škůdce k vytvoření specifického mikroklimatu (teplota a RH%) a možnému urychlení vývoje patogena (Gindin et al. 2000).

2.2.2.3 Abiotické faktory

Teplota

Teplota prostředí představuje důležitý faktor (Weiser 1966). Optimální teplota pro řadu EPFs se pohybuje v rozmezí od 20°C do 25°C, nicméně infekce a následná nákaza se může vyskytovat v rozmezí 15°C až 30°C. Při teplotách nad 30°C běžně dochází k inhibici růstu mycelia a růst je obvykle úplně zastaven při teplotách vyšších než 37°C. Teplotní tolerance může být ovlivněna existencí genotypů, které mohou vykazovat i kmenově specifickou teplotní valenci, predeterminovanou geografickou oblastí původu kmene. To znamená, že kmen, který byl odizolován v tropické nebo subtropické oblasti může být k vyšším teplotám tolerantnější, na rozdíl od kmene získaného z chladnějších oblastí, který se naopak může lépe a rychleji vyvíjet i při nízkých teplotách (Fargues et al. 1997; Inglis et al. 2001). Příkladem může být teplotní specifita některých izolátů *I. fumosorosea* izolovaných z různých zemí. Z výsledků lze konstatovat, že pro izoláty tohoto druhu získaného z Evropy se optimum pro růst pohybovalo mezi 20 a 25°C, pro izoláty z jižních částí USA a západní Asie to bylo rozmezí od 25-28°C a izoláty získané z Indie vykazovaly vysokou toleranci k teplotám pohybujícím se okolo 32-35°C (Vidal et al. 1997)

Vlhkost

Klíčovým faktorem pro rozvoj nákazy v populaci škůdce je vlhkost, zejména pak relativní vzdušná vlhkost (RH %). Vysoká relativní vzdušná vlhkost je nezbytná pro klíčení, neboť většina konidií EPFs klíčí při vlhkosti vyšší než 90% (Hall 1981). Pro druh *I. farinosa* bylo zjištěno, že spory této houby byly schopny klíčit a infikovat larvy *Scotylus scotylus* při vlhkosti v rozmezí 86 - 100% (Doberski 1986). V přirozeném prostředí dochází k vytvoření těchto vlhkostních podmínek během dne několikrát, při poklesech a vzestupech teploty, při čemž si každý živý organismus vytváří na povrchu pokožky vrstvičku nasycenou vodními parami (Weiser 1966). Rozklad infikovaného jedince může probíhat i za méně příznivých vlhkostních poměrů. V důsledku produkce chitinolytických enzymů může docházet k desintegraci kutikuly (Milner et al. 1997) a za příznivých podmínek pak mycelium snáze prorůstá z tělní dutiny na povrch mrtvého hostitele a při dostatečné vlhkosti tvoří typické morfologické struktury související se sporulací (konidiofor, fialida ... apod.) (Arthurs and Thomas 2001). Vliv vlhkosti na vývoj EPFs lze v omezené míře cíleně ovlivňovat. Přidání olejových substancí do suspenze konidií napomáhá překlenout kritické období klíčení konidií EPFs. Olej nejenže umožňuje lepší přilnavost konidií na povrch hostitele, ale vytváří i vhodné vlhkostní podmínky pro klíčení (Butt 2002).

Sluneční záření

Konidie všech EPFs mohou být poškozeny vlivem slunečního záření, zejména pak podílem ultrafialových paprsků UVB spektra (285 - 320nm) a UVA spektra (320 - 400nm). Viditelné a infračervené záření je méně škodlivé než UV záření (Fargues et al. 1997). Významné rozdíly v citlivosti k záření byly zaznamenány i mezi jednotlivými druhy EPF (Fargues et al. 1996) jež potvrdil vysokou citlivost spor *I. fumosorosea* vůči UV záření oproti ostatním studovaným druhům entomopatogenních hub (*M. anisopliae*, *M. flavoviridae* a *B. bassiana*).

Půda

Půda je přirozeným rezervoárem entomopatogenních hub, které vyvolávají přirozené infekce na půdním hmyzu, ale i na hmyzu kolonizujícím nadzemní systém rostlin. Mnoho

entomopatogenních hub náležejících do třídy Hyphomycetes je považováno za typické představitele půdního ekosystému (Inglis et al. 2001), který jim poskytuje příznivé podmínky ovlivňující perzistenci konidií. Příkladem mohou být konidie entomopatogenní houby *B. bassiana*, které si při půdní aplikaci udržují životaschopnost po dobu týdnů až měsíců, na rozdíl od aplikace foliární, kde životaschopnost konidií dosahuje pouze několika hodin (Gaugler et al. 1989).

Půda představuje velmi složité prostředí. K nejvýznamnějším faktorům podmiňujícím výskyt a působení EPFs patří půdní typ (textura půdy, obsah organické hmoty, pH), vlhkost (vodní kapacita) a půdní mikroflóra (Inglis et al. 2001). Tyto faktory mohou ovlivňovat životnost, perzistenci i účinnost hub, které jsou využívány v biologické ochraně rostlin (Studdert and Kaya 1990). Půda představuje pro mnoho druhů entomopatogenních hub zcela přirozené prostředí a v různých typech půd lze zaznamenat přítomnost a přirozený výskyt mnoha druhů hub, zejména *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *I. farinosa* (Landa et al. 2002). Konidie hub přetrvávají v půdě mírného klimatu déle než blastospor (Butt 2002). Mnoho EPFs je schopno v půdě snášet rozdílné teploty i podmínky vysoké vlhkosti a sucha (Inglis et al. 2001). Mnoho studií prokázalo, že konidie aplikované na povrch půdy nebo konidie zapravené do půdy vykazují značnou stálost v podmínkách mírného klimatu (Storey et al. 1989). V půdě mohou houby přežívat na částech organické hmoty i jako saprotrofové (Tanada and Kaya 1993).

2.2.2.4 Biotické faktory

Houbové propagule jsou kromě abiotických faktorů ovlivněny i faktory biotickými. McCoy et al. (2002) předpokládají, že v půdě se vyskytuje přibližně 464 druhů hub a kvasinek a dále bakterie a aktinomycety, jejichž význam a role závisí na fyziologických a morfologických vlastnostech různých typů půd. Gottlieb (1976) uvádí, že v jednom gramu půdy odebraném z povrchové vrstvy na zemědělsky obhospodařované orné půdě se nachází $10^6 - 10^8$ bakterií, $10^6 - 10^7$ aktinomycet, $5 \times 10^4 - 10^6$ houbových propagulí, $10^5 - 10^6$ prvoků a $10^4 - 5 \times 10^5$ řas. Zdá se, že přirozeně se vyskytující půdní mikroorganismy a jejich sekundární metabolity vykazují v určitých půdních podmínkách antagonistické působení ovlivňující infekčnost a přežívání entomopatogenních hub v půdních ekosystémech (McCoy et al. 2002). Například přežívání entomopatogenní houby *B. bassiana* v půdě a její potenciál pro biologickou ochranu rostlin je pravděpodobně více závislý na biotických faktorech než na faktorech fyzikálních, které jsou asociovány s půdou. Půdní mikroorganismy mohou snižovat perzistenci (Lingg and Donaldson 1981) a účinnost houby *B. bassiana* proti půdnímu hmyzu (Pereira et al. 1993). Rovněž Groden and Lockwood (1991) uvádí, že aktinomycety, eventuálně bakterie inhibují klíčivost *B. bassiana* v půdě. Na základě výsledků vědeckých prací se předpokládá, že úroveň inhibičního působení se mění v závislosti na druhu houby a rovněž může být ovlivněna půdní vlhkostí, teplotou a půdním druhem (typem) (Studdert and Kaya 1990).

I přesto, že mnoho druhů entomopatogenních hub náležejících do třídy Hyphomycetes je kosmopolitně rozšířeno v půdě, je velmi málo známo o saprofytické schopnosti jednotlivých taxonů. Hodně nepřímých důkazů naznačuje, že mnoho entomopatogenních hyphomycet (např. *B. bassiana* a *M. anisopliae*) je poměrně slabými konkurenty v půdě, a obvykle můžeme pozorovat relativně omezený vegetativní růst vycházející z hostitele usmrčeného v důsledku mykózy (např. Gottwald and Tedders 1984). Jedním z důvodů mohou být fungistické vlastnosti nesterilní půdy (Sussman 1965). Silný antagonistický účinek nesterilní půdy ovlivňující klíčivost konidií *B. bassiana* může být způsoben celou řadou faktorů. Jedním z nich může být např. produkce ve vodě rozpustných látek běžnou půdní houbou *Penicillium urticae* či dalším druhem běžně se vyskytující saprofytické houby *Aspergillus clavatus* (Shields et al. 1981; Lingg and Donaldson 1981; Majchrowicz et al. 1990).

Inhibice klíčivosti konidií entomopatogenních hub v půdě může být i jednou z příčin přežívání hub v půdě (Sussman 1965).

2.2.3 Charakteristika vybraných druhů entomopatogenních hub

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

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. je kosmopolitně rozšířenou entomopatogenní houbou. Byla izolována z více jak 700 druhů hmyzu z devíti řádů, nejvíce hostitelů se nachází na zástupcích škůdců z řádů Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera a Hymenoptera (např. Vänninen et al. 1999, Noma and Strickler 2000, Führer et al. 2001, Mulock et al. 2001, Batta 2007, Thompson et al. 2007). Parazituje také na roztočích (Wekesa et al. 2006). Houba *Beauveria bassiana* byla jedním z prvních poznanych původců hmyzích nákaz. Již od 16. století byla zaznamenána nákaza v chovech bource morušového.

Na umělých živných půdách i na přirozeném hostiteli vytváří mycelium mléčně bílé barvy. Konidie jsou globoidního až subgloboidního tvaru, velikost 2 – 3 x 2,0 - 2,5 μm. Konidiogenní struktury tvoří husté shluky, hrozny (Diribeková 1991). Nejčastější cestou penetrace houby *B. bassiana* do hostitele je povrch těla (Ferron 1978), přes kutikulu a stigmata. Kromě těchto hlavních způsobů infikuje *B. bassiana* hmyz též *per os*, zvláště druhy s kousavým ústním ústrojím (Feng et al. 1994), byly však zaznamenány také infekce přes dýchací systém (Clark et al. 1968) a ústní ústrojí (Siebeneicher et al. 1992). Uvnitř těla vznikající válcovité konidie, endokonidie (blastospory), z nich pak narůstají další hyfy a na těch se po určitém růstu tvoří opět endokonidie. Narůstající hyfy vyplní tělo hmyzu (Weiser 1966). Při dostatku vlhkosti (92 a více %) prorůstají hyfy na povrch těla (Mahr 1997). *B. bassiana* vytváří na povrchu infikovaného hostitele husté mycelium mléčně bílé barvy. Na hroznovitých konidioforech se v hustých svazcích (přeslenech nebo samostatně) formují dlouhé, bezbarvé konidiogenní buňky s kulovitou nebo baňkovitou bází a vroubkovitým (zubovitým) apikálním prodloužením, na kterých se tvoří jednotlivé konidie. Každá jednobuněčná kulovitá nepřehrádkovaná konidie se tvoří na samostatném zubu (Humber 1997). Optimální teplota růstu je 23 - 26 °C při relativní vlhkosti vzduchu nebo vlhkosti substrátu 80 - 100 %. Minimální teplota pro růst mycelia je 5 - 8 °C, maximální teplota pro růst mycelia je 28 - 31 °C (Diribeková 1991). V přírodě přetrvává druh *Beauveria bassiana* v povrchových vrstvách půdy jako mycelium jednak v uhynulých hostitelích, jednak na organických zbytcích (saprofytní fáze).

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

***Isaria fumosorosea* (Wize) (PFR)**

Isaria fumosorosea (dříve *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith) je široce polyfágní, kosmopolitně rozšířený druh vláknité entomopatogenní houby. Patogen byl popisován a evidován pod řadou různých jmen (např. *Isaria fumosoroseus* WIZE; *Spicaria aphodii* Vuill.; *Spicaria cossus* Portier & Sartory; *Penicillium hibernicus* Kennelly & Grimes; *Penicillium isarioides* Inagaki aj.) (Samson and Rombach 1985; Samson 1974; Osborne and Landa 1992). Více než 30 let byly druhy *P. fumosorosea* a *Paecilomyces farinosa* zahrnovány do jednotného rodu *Paecilomyces*. Díky nedávným závěrům fylogenetických studií (Oborník et al. 2001; Lungsaard et al. 2004, 2005; Inglis and Tigano 2006), ve kterých byly posuzovány polyfyletické vztahy v rámci rodu *Paecilomyces* byla rozlišen nový rod *Isaria*. Do tohoto nového rodu byly zařazeny i druhy *I. amoenerosea*, *I. cicadae* a *I. tenuipes*. Výjimku tvoří druhy *P. lilacinus* a *P. marguandii*, jež nebyly do nového rodu zahrnuty.

Na přirozeném hostiteli vytváří *Isaria fumosorosea* zprvu bílé vatovité mycelium, které později mění barvu do odstínu narůžovělé, nařezavělé až šedofialové barvy. Změna barvy kolonií přímo koresponduje se stupněm sporulace kultury. Starší, plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter se mění v prašný s povrchem zcela pokrytým obrovským množstvím konidií (Landa et al. 1994). V koloniích *I. fumosorosea* se na vzdušném myceliu nejprve vytvářejí konidiofory, které jsou na hyfách uspořádány přeslenovitě. Na konci každého konidioforu se následně formuje 3 - 6 konidiogenních buněk (fialid), které mají lahvicovitý tvar, zduřelou bázi a zřetelný krček. Na nich se vytvářejí oválné konidie. Konidie se postupně oddělují, nejmladší je vždy v kontaktu s konidiogenní buňkou a odtlačuje starší konidie dál do tvořícího se řetízku. V jednom řetízku přichyceném na konidiogenní buňce může být přítomno i více než 50 konidií (Osborne and Landa 1992). Povrch kultur PFR, a zvláště pak povrch jednotlivých konidií je silně hydrofobní (Osborne and Landa 1992). Při růstu v submerzní kultuře (tekutá živná půda) ale i v půdních médiích vznikají blastospory. Tvar blastospor kolísá od kulovitého tvaru k elipticky prodlouženým strukturám. Jsou virulentnější. Na povrchu molic začínají blastospory klíčit rychleji než konidie (Vega 2005). Nejdůležitější roli z abiotických faktorů působících na infekční cyklus hraje relativní vzdušná vlhkost, při klíčení konidií vyžaduje *I. fumosroseus* nejméně 10 – 12 hodin vlhkost vyšší než 95%. Teplota je méně limitujícím faktorem. Optimální růst je sledován při 20 - 30 °C, vyšší teploty (30 - 40 °C) omezovaly růst více než teploty nižší (8 - 11°C) (Vidal et al. 1997).

Houba *Isaria fumosorosea* je široce rozšířený druh, jež je možné izolovat nejen z těl napadených bezobratlých (především řádu Lepidoptera) ale také ze vzduchu, vody, rostlin, z dalších hub a především z půdy (Zimmermann 2008). Nejčastěji je používána proti svlušce *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) (Poprawski et al. 2000) dále proti druhům řádu Diptera (Lohmeyer et al. 2006; Luz et al. 2007; Vänninen et al. 1999). Z ostatních řádů hmyzu je zaznamenána účinnost proti termitům druhu *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) (Meikle et al. 2005), *I. fumosorosea* se může projevovat jako mykoparazit infikující konidie padlí okurkového *Sphaerotheca fuliginea* (Kavková and Čurn 2005).

2.2.4 Přípravky na bázi EPFs

Historicky prvním pokusem využití hub v ochraně rostlin proti škůdcům byla aplikace houby dnes známé pod názvem *Metarhizium anisopliae* (Metchn.) Sorokin v Rusku v roce 1888. Houba byla naprodukována a použita proti brouku *Celomus punctivnetris* (Germar) (Lord 2005). V roce 1965 byl aplikován Boverin, prostředek na bázi *B. bassiana*, proti dospělcům mandelinky bramborové a obaleči jablečném v dřívějším SSSR (Kendrick 2000).

Výzkum v posledních letech významně rozšířil okruh znalostí o bioinsekticidech, zároveň se rozšířil i počet produktů na bázi entomopatogenních hub sloužících k ochraně plodin vůči hmyzím škůdcům a také roztočům (de Faria and Wraight 2007). Produkty na bázi hub (mykoinsekticidy) jsou definovány jako produkty založené na bázi živých propagulí hub, používaných v ochraně proti škůdcům v inokulativních či inundativních aplikacích. Propagule těchto produktů lze klasifikovat jako hyfy (mycelium), blastosopry či konidie (Triplehorn and Johnson 2005). Za posledních 40 let bylo vyprodukováno 80 firmami po celém světě přes 171 druhů mykoinsekticidů a mykoakaricidů. Doposud je používáno 12 druhů hub jako aktivní složka komerčních produktů. Do budoucna je předpokládáno, že se tento počet navýší, díky neustále probíhajícím molekulárním studiím, které odkrývají nové a nové druhy v rámci jednotlivých rodů hub (př. rod *Peecilomyces*). Následující list mykopesticidů reprezentuje podíl jednotlivých druhů hub na celkovém počtu přípravků registrovaných či v současné době probíhajících registrací (tab 3) (de Faria and Wraight 2007). V příloze je pak uveden seznam konkrétních přípravků na bázi entomopatogenních hub registrovaných proti hmyzím škůdcům a roztočům ve vybraných zemích Evropy a USA.

Tab 3 Přehled entomopatogenních hub (druhy a kmeny) používaných v registrovaných prostředcích na ochranu proti hmyzím škůdcům a roztočům (de Faria and Wraight 2007)

Druh /kmen	Počet produktů (% z celkového počtu)
Houby: Hypocreales (Anamorfní stádium)	
<i>Ashersonia aleyrodis</i> Webber	1 (0,6%)
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.	58 (33,9%)
<i>Beauveria brogniartii</i> (Sacc.) Petch	7 (4,1%)
<i>Hirsutella thompsonii</i> F.E. Fisher	3 (1,8%)
<i>Isaria fumosorosea</i> Wize.	10 (5,8%)
<i>Isaria</i> sp.	1 (0,6%)
<i>Lecanicillium longisporum</i> (Petch) R. Zare & W. Gams	2 (1,2%)
<i>Lecanicillium muscarium</i> (Petch) R. Zare & W. Gams	3 (1,8%)
<i>Lecanicillium</i> sp.	11 (6,4%)
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metch.) Sorokin	58 (33,9%)
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> Driver & Milner	3 (1,8%)
<i>Nomurea riley</i> (Farl.) Samson	1 (0,6%)
Fungi: Anamorfní stádium identifikované jako	
<i>Sporothrix insectorum</i> de Hoog & H.C. Evans	3 (1,8%)
Fungi: Zygomycota: Zygomycetes: Entomophtorales	
<i>Conidiobolus thrombodies</i> Dreschler	2 (1,2%)
Cromista: Oomycota: Oomycetes: Pythiales	
<i>Lagedinidium giganteum</i> Couch	1 (0,6%)
Mix (2 a více druhů hub)	7 (4,1%)
Total	171 (100%)

2.3 EPNs a EPFs ve společné kombinaci a jejich potenciál v IOR

V poslední době se mnoho výzkumů zaměřuje na využití společného působení různých druhů entomopatogenních agens. Vliv společné aplikace může mít synergistický, aditivní nebo antagonistický efekt. Ve většině případů výsledný efekt závisí na koncentraci a načasování aplikace jednotlivých bioagens. Takovým příkladem úspěšné kombinace je synergistická interakce EPN a *Bacillus thuringiensis* společně aplikovaných na larvy chroustů (Köppenoffer and Kaya 1997). Další výsledky společných kombinací EPNs a EPFs přináší studie Ansari et al. (2004) jež testoval houbu *Metarhizium anisopliae* spolu s hlísticemi *Heterorhabditis megidis* a *Steinernema glaseri* proti chroustkovci *Hoplia philantus* (Coleoptera: Scarabaeidae) v laboratorních a následně ve skleníkových podmínkách. Hlístice byly aplikovány ve dvou modelech a to a) společně se suspenzí houby b) se zpožděním. Byl pozorován aditivní a synergistický efekt. Výsledků kombinací *H. bacteriophora* a *M. anisopliae* získaných v těchto experimentech, bylo následně využito v polních podmínkách. K porovnání byl použit insekticid s účinnou látkou chlorpyrifos. Použití společné aplikace entomopatogenních organismů mělo stejný výsledek jako použití chemické ochrany (Ansari et al. 2006). Dalším příkladem úspěšného působení EPNs a EPFs bylo dosaženo v případě hlístic *Steinernema carpocapsae*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis bacteriophora* a *Beauveria brongniartii* jejíž společná kombinace byla využita proti *Ectinohoplia rufipes* a *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Ke srovnání byl použit fenitrothion. Všechny bioagens vykazovaly vyšší mortalitu než chemická ochrana (Choo et al. 2002). Jak již bylo dříve baznačeno, ne všechny kombinace EPFs a EPNs musí nezbytně vést k synergistickému či aditivnímu efektu, příkladem negativního výsledku byly kombinace hub *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Isaria fumosorosea* v kombinaci s hlísticemi *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, *Steinernema riobrave*, *S. carpocapsae*, *S. glaseri* a *S. rarum* proti *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). Ve většině kombinací byl zjištěn antagonistický efekt mezi jednotlivými organismy (Shapiro-Ilan et al. 2003, 2004). Taktéž Ansari et al. (2005) prokázal, že výměšky symbiotických bakterií *Photorhabdus luminescens* negativně působily na růst EPF *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* a *Isaria fumosorosea*. *Xenorhabdus poinarii* však neměla na houby žádný vliv.

Jak houby tak nematody vlastní širokou navzájem se překrývající škálu potencionálních hostitelů, vyskytují se přirozeně v půdě a způsobují u hmyzu epizoocie za vhodných podmínek (Poinar, 1979; Kaya 1987). Tab. 4 Uvádí některé příklady hostitelského spektra obou druhů studovaných organismů.

Tab 4 Příklady překrývajícího se hostitelského spektra obou druhů studovaných organismů

Řád	Rod	Plodina	EPFs	EPNs
Orthoptera	<i>Gryllothalpidae</i>	Trávníky, pastviny	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i> <i>I. fumosorosea</i>	<i>S. scapterisci</i> <i>S. carpocapsae</i>
Blattodea	<i>Blattidae</i>	Domácnost	<i>M. anisopliae</i>	<i>S. carpocapsae</i>
Thysanoptera	<i>Thripidae</i>	Skleníkové kultury, okrasné rostliny	<i>L. lecanii</i> <i>B. bassiana</i> <i>I. fumosorosea</i>	<i>S. feltiae</i>
Heteroptera	<i>Cydnidae</i>	Polní kultury	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i> <i>L. lecanii</i>	<i>Steinernema</i> sp. <i>H. bacteriophora</i>
Homoptera	<i>Phylloxeridae</i> <i>Aleyrodidae</i>	Skleníková kultury	<i>L. lecanii</i> <i>B. bassiana</i> <i>I. fumosorosea</i>	<i>S. glaseri</i> <i>S. feltiae</i>
Lepidoptera	<i>Tortricidae</i> <i>Noctuidae</i> <i>Cossidae</i> <i>Sesiidae</i> <i>Pyalidae</i>	Skleníkové kultury, ovocné sady, polní kultury	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i> <i>I. fumosorosea</i>	<i>S. carpocapsae</i> <i>S. feltiae</i>
Coleoptera	<i>Chrysomelidae</i> <i>Curculionidae</i> <i>Scarabaeidae</i> <i>Tenebrionidae</i>	Drobné ovoce, polní kultury, les, trávníky, pastviny, parky, sklady	<i>B. bassiana</i> <i>B. brogniartii</i> <i>M. anisopliae</i> <i>M. flavoridae</i> <i>I. fumosorosea</i>	<i>S. riobrave</i> <i>S. carpocapsae</i> <i>S. scarabaeidae</i> <i>H. bacteriophora</i>
Diptera	<i>Agromyzidae</i> <i>Ephydriidae</i> <i>Sciaridae</i> <i>Tipulidae</i> <i>Muscidae</i>	Skleníkové kultury, okrasné rostliny, žampionárny, polní kultury, domácnost	<i>B. bassiana</i> <i>I. fumosorosea</i>	<i>S. feltiae</i> <i>S. carpocapsae</i>

3 CÍLE

Cílem této práce je rozšířit znalosti o interakcích mezi entomopatogenními houbami a hlístovkami. Základní hypotéza doktorské práce vychází ze skutečnosti, že většina praktických aplikací bioagens je orientována do oblasti kurativních účinků, ale jen málokteré práce studují efekt profylaktického použití, zvláště v případě entomopatogenních hlístovek. Tato práce je věnována rozmanité škále interakcí, které souvisejí se záměrnou introdukcí entomopatogenních hub a hlístovek do společného prostředí. Modelovými organismy této práce jsou larvy *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* jako hlavní představitelé významných řádů škodlivého hmyzu. Housenky *G. mellonella* slouží jako model pro zástupce řádu Lepidoptera a silně sklerotizované oligopolní larvy *T. molitor* jako zástupce řádu Coleoptera.

V experimentální části práce jsou studovány i některé další faktory, ovlivňující účinnost entomopatogenních hlístovek a jsou ověřovány i možnosti kombinace hlístic a chemických pesticidů. Hlavní cíle této doktorské práce lze v souladu se strukturou experimentální části formulovat následovně:

Hlavní cíle disertační práce:

- Ověřit kompatibilitu *S. feltiae* s komerčně dostupnými pesticidy s ohledem na možnosti využití aplikace pomocí tank-mixu.
- Porovnat účinnosti entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* v kurativní a profylaktické aplikaci vůči larvám modelových druhů hmyzích škůdců
- Stanovit vliv teploty a vlhkosti na účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic.
- Porovnat účinnosti různých druhů entomopatogenních hub na mortalitu larev *T. molitor*.
- Stanovit efektu kolonizace půdního prostředí entomopatogenními houbami s následným hodnocením supresivity vztažené ke schopnosti hub namnožit se v prostředí i bez přítomnosti hmyzího hostitele.
- Porovnat interakce mezi různými druhy hub a hlístic a určit, zda se interakce mění v závislosti na kombinaci druhů agens a načasování aplikace.
- Obecná charakteristika interakčního systému houba/hlístice/hostitel

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Entomopatogenní hlístice

Steinernema arenarium Slov. a *S. carpocapsae* NCR

Hlístice byly získány z chovu udržovaného v laboratořích Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích (RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.). *S. arenarium* byla získána z Malacek (Slovensko). *S. carpocapsae* kmen NCR byl izolován poblíž Sankt Petěrburgu v 70. letech. Chov všech druhů byl udržován v *in vivo* podmínkách na larvách *G. mellonella* (viz 4.5)

Steinernema feltiae

V pokusech byly používány dva kmeny hlístice *Steinernema feltiae*. *S. feltiae* Ust. byl původně izolován z půdy v 80. letech ve východním Rusku pomocí „Galleria bait methode“ a byl udržován v laboratořích Entomologického ústavu AV ČR. Druhý kmen byl poskytnut firmou Biobest N.V. (Belgie). Tento kmen hlístice *S. feltiae* Filipjev je součástí komerčního biopreparátu s názvem Entonem[®] produkovaným firmou Koppert (Nizozemí). S tímto kmenem byly realizovány pokusy v části zabývající se kompatibilitou hlístic a vybraných pesticidů.

4.1.1 Uchování a kultivace entomopatogenních hlístic

Uchovávání hlístic

Hlístice rodu *Steinernema*, byly dlouhodobě uchovávány ve skleněných epruvcích naplněných inertním nosičem (molitan) v lednici při teplotě 5 – 7 °C. Hlístice používané v pokusech byly skladovány po dobu 2 - 3 týdnů před použitím ve vodní suspenzi v Petriho misce v teplotě 5 - 7°C.

Kultivace hlístic pro pokusy

Pro kultivaci hlístic byl použit následující postup. Ze skleněných epruvců byla získána suspenze požadovaného druhu hlístice, která byla následně ředěna sterilní vodou na dostatečné množství. Pod binokulárem byla zjištěna vitalita (tj. % živých infekčních larev hlístic z celkového množství). Podle vitality hlístic, byla suspenze dále upravena na koncentraci o přibližné hodnotě 100 živých infekčních larev hlístic/ml suspenze. Dále byla připravena inkubační komůrka (Petriho miska s filtračním papírem na dně), do které byla naaplikována suspenze hlístic o objemu 1 ml. Do takto připravené inkubační komůrky bylo umístěno 10 larev zavíječe voskového *Galleria mellonella*. Komůrky s larvami byly inkubovány v termostatu při teplotě 25±1 °C po dobu 5 - 7 dní. Pro zdárný průběh infekce bylo nutné kontrolovat vlhkost v Petriho miskách a v případě nadměrného vysychání byla vlhkost upravována přidáním několika kapek sterilní vody. Po 5 - 7 dnech byly mrtvé housenky s příznaky infekce překládány na vodní pasti (Petriho miska obalená filtračním papírem, uložena ve větší Petriho misce a pravidelně vlhčena destilovanou vodou) a uloženy v termostatu při teplotě 25±1 °C. Po 10 - 14 dnech od iniciace infekce se do okolí infikovaných larev uvolňovala infekční stadia hlístic, která se shromažďovala ve vodě na dně vodní pasti, odkud byla pravidelně slévána, filtrována a následně uchovávána ve vodní suspenzi v Petriho misce 2 - 3 týdny před vlastním použitím v testech.

4.1.2. Příprava suspenze hlístic a hodnocení kvality

Adjustovaná suspenze hlístic používaná v pokusech byla získávána ze suspenze uchovávané v Petriho miskách v lednici při teplotě 5 - 7 °C. Hlístice bylo třeba vždy 24 hodin před použitím nechat aklimatizovat při pokojové teplotě. Následně byl po důkladném promíchání suspenze odebrán vzorek o objemu 5 µl a spočteno množství vitálních hlístic pomocí binokuláru. Potřebná koncentrace pak byla získána na základě průměrného počtu vitálních hlístic z 10 opakování v daném objemu suspenze.

4.2 Entomopatogenní houby

Isaria fumosorosea (pův. *Paecilomyces fumorosea*)

Ve všech pokusech byl výhradně použit kmen PFR 97 Apopka (Apopka - jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen v roce 1987 izolován). Kmen PFR 97 je od roku 1994 využíván jako účinný agens biopreparátu registrovaného pod obchodním názvem PreFeRal™. Kmen této houby byl v roce 1993 poskytnut oddělení rostlinolékařství KRV ZF JU firmou Thermo Trilogy (dnes Certis USA) a od té doby je používán pro experimentální účely v rámci řady výzkumných, magisterských a doktorandských projektů.

Beauveria bassiana

V pokusech byl použit kmen I 101, který byl původně izolován z infikovaného dospělce lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) v roce 2004 v průběhu monitoringu výskytu entomopatogenních hub na Šumavě v blízkosti pramenů Vltavy.

4.2.1 Kultivace hub a kultivační média

Pro většinu experimentů byly používány suspenze konidií získané z čistých kultur kultivovaných povrchovou kultivací na standardních živných médiích. Pro povrchové kultivace entomopatogenních hub byl používán výhradně bramboro-glukózový agar (PDA - potato dextrose agar, DIFCO, 39 g/1000 ml destilované vody). Kmeny testovaných hub byly uloženy v mykologické sbírce ve formě alginátových pelet. Pro účely pokusů byl použit následující postup reaktivace a kultivace hub. Jednotlivé pelety byly z mrazicího zařízení přemístěny do kultivační komůrky (sterilní plastová Petriho miska obsahující 2 % vodní agar) a kultivační komůrka s peletami byla umístěna do termostatu (25°C, fotoperioda 0/24). Pelety exponované vysoké vlhkosti přijímaly vodu (bobtnaly), následně se na povrchu pelet objevily první symptomy reaktivace patogena (růst mycelia) a zpravidla v průběhu 5 - 7 dnů byl povrch aktivovaných pelet pokryt plně sporulujícím vzdušným myceliem. Z takto aktivovaných pelet byl patogen jednou pasáží převeden na plotny s agarizovaným živným médiem (PDA) a v následném saprofytickém vývojovém cyklu byla vyprodukována biomasa, která sloužila jako čistá matečná kultura pro produkční kultivaci, která probíhala na povrchu umělého živného média (PDA). Testované houby byly kultivovány formou povrchových kultur. Po inokulaci byly misky vloženy do plastického sáčku a uloženy do termostatu temperovaného na konstantní teplotu 25±1°C (fotoperioda 0/24) a kultury hub byly kultivovány po dobu 14 - 21 dnů.

4.2.2 Příprava konidiových suspenzí a hodnocení kvality hub

Příprava konidiové suspenze

Pro převážnou většinu pokusů byly používány přesně adjustované suspenze konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub. Základní suspenze byla získána přelitím povrchu plně sporující kultury sterilním roztokem (0,05% Tween® 80). Po důkladné homogenizaci byla takto připravená suspenze dle potřeby naředěna a po opětovné homogenizaci byla nanášena do počítací komůrky - hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) a v předem stanoveném počítacím poli byl po sedimentaci konidií stanoven titr s tím, že v jednom počítacím poli bylo ± 50 spor a rozdíl mezi poli mohl být max. 15 %. Titr byl vypočítán na základě dvou opakování (horní a dolní počítací pole) a následně byla suspenze odpovídajícím ředěním upravena na potřebný titr.

Standardní test klíčivosti - GI (Germination Index)

Pro určení kvality houbového inokula vstupujícího do testu bylo třeba zjistit podíl vitálních, tj. klíčících konidií. Pro účely testu byla použita konidiová suspenze, která byla adjustována na standardní titr ($1,0 \times 10^7$ konidií v 1 ml suspenze). Pomocí laboratorní klíčky byla takto připravená suspenze konidií nanášena ve formě kapek (20 kapek/sklíčko) na povrch tenké agarové vrstvy (2% vodní agar) na podložním sklíčku. Po zaschnutí kapek bylo podložní sklíčko s houbou vloženo do vlhké komůrky (Petriho miska s vlhkým filtračním papírem na dně). Takto připravené vzorky byly umístěny do plastických sáčků a inkubovány v termostatu ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24). Hodnocení vzorků bylo provedeno po 24 hodinách pomocí světelného mikroskopu. Při vyhodnocování se hodnotilo minimálně 100 konidií z každého vzorku, přičemž byl ke každé konidii přiřazen příslušný index GI (0 - 3 v intervalu 0,5) (tab. 5), který přesně specifikoval stupeň naklíčení a vývoj patogena. Z takto vyhodnocených vzorků se vypočítal průměrný index klíčivosti, přičemž za klíčivé konidie se považovaly ty, které byly ohodnoceny indexem GI 0,5 a více.

Tab. 5 Hodnotící stupnice standardního laboratorního testu klíčivosti (Landa et al. 1994)

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

4.3 Populace larev hmyzu používaných v pokusech

Zavíječ voskový *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)

Jako laboratorní objekt má zavíječ voskový některé významné přednosti (rychlý vývoj, poměrně velké larvy, velký objem hemolymfy, velké tukové těleso, snadné opatření potravy v kterékoli roční době, vývoj je nepřetržitý po celý rok, bez diapauzy). Předností je také schopnost vývoje larev za definovaných konstantních podmínek na umělé potravě. V pokusech byla použita populace udržovaná pomocí kontinuálního chovu na umělém živném substrátu a udržovaného v konstantních podmínkách (klimabox $30\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24). Pro jednotlivé experimentální cykly byla používána záměrná synchronizace chovu v posloupnosti: kladení vajíček na filtrační papír – inkubace vajíček – chov věkově synchronizované populace larev chovaných na živném substrátu tzv. „Haydakově živné půdě“ (složení: kukuřičný šrot 22%, pšeničný šrot 11%, hladká mouka 11%, sušené mléko 11%, sušené droždí 5,5%, včelí vosk 17,5%, med 11% a glycerin 11%, uvedeno v hmotnostních procentech). Populace používaná v pokusech byla původně získána z chovu, udržovaném v laboratořích Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích (RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.) a z tohoto zdroje byl i chov udržován na KRV ZF JU pravidelně doplňován.

Z části byl na larvách zavíječe voskového realizován i *in vivo* chov hlístic, jenž byly využívány v biotestech (viz 4.1.1).

Potemník moučný *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Larvy potemníka moučného představují skupinu larev se silně sklerotizovanou kutikulou. Významnou předností je pomalý vývoj, díky němuž je možno uchovávat larvy nižších instarů v definovaných podmínkách po dlouhou dobu a pro pokusy vybírat požadované instary, dále nenáročnost chovu a snadná dostupnost. Larvy pro pokusy byly pravidelně kupovány ve specializovaných obchodech a udržovány v plastických boxech na živném substrátu (otruby).

4.3.1 Příprava hostitelských larev před pokusy

Výběr larev

K experimentům byla cíleně vybírána starší vývojová stádia larev. Pro pokusy *G. mellonella* byly vybírány larvy posledního instaru, v pokusech s *T. molitor* byly vybírány taktéž larvy pozdějších instarů vyrovnané velikosti.

Povrchová sterilace

Larvy byly před samotnými testy povrchově sterilovány pomocí 1% roztoku chlornanu sodného (NaOCl), během této procedury byly larvy na cca 1 minutu ponořeny do připraveného roztoku chlornanu a následně omyty ve sterilní destilované vodě (1 - 2 minuty), přebytečná voda byl odsáta filtračním papírem. Takto ošetřené larvy byly používány k pokusům.

4.4 Kultivační jednotky a půdní substrát používaný v pokusech

Kultivační jednotky používané v testech

Převážná část testů probíhala v plastických kontejnerech 300 ml (90 x 70 x 50 mm) jenž byly plněny půdním substrátem. Do každé misky bylo odměřeno 40 ml substrátu. Půdní substrát byl speciálně připraven ze směsi prosetého pěstební substrátu pro pokojové rostliny (komerčně prodávaný zahradnický substrát B) a akvarijního písku (velikost částic 0,5 - 1,2 mm) v poměru 3:2. Tento substrát byl před pokusy sterilizován v cca 5 cm vrstvě na kovových platech (121°C po dobu 2 hodin).

4.5 Přehled hlavních metodických postupů ¹

*4.5.1 Kompatibilita vybraných pesticidů se *S. feltiae*-in vitro test*

Vybrané pesticidy byly v pokusech adjustovány na požadovanou koncentraci pomocí destilované vody. Do Petriho misek (ø 9 cm) bylo naaplikováno 10 ml roztoku daného pesticidu (tab. 6). Do suspenze připraveného roztoku pesticidu bylo aplikováno cca 2000 infekčních larev *S. feltiae* ve 100 µl. Jako kontrolní varianta byl použit roztok destilované vody a hlístic. Pro každý pesticid bylo provedeno pět opakování. Petriho misky se suspenzemi byly inkubovány v klimaboxu (teplota 23±1°C, fotoperioda 0/24). Vitalita nematod byla zjišťována po 24, 48 a 72 hodinách tak, že z každé Petriho misky bylo odebráno pětkrát 5µl a pomocí binokulárního stereomiokroskopu spočten podíl živých a mrtvých infekčních larev hlístic. V případě snížené mobility hlístic byla zjišťována reakce na podráždění preparační jehlou.

*4.5.2 Kompatibilita vybraných pesticidů se *S. feltiae*-in vivo test*

K pokusům byly využity suspenze z pokusu 4.5.1. Infekční larvy byly po 72 hodinách třikrát promyty destilovanou vodou přes filtrační papír. Disk filtračního papíru byl vložen do laboratorní nálevky a suspenze hlístic a pesticidu promyta a přefiltrována. Tento postup by zopakován následně ještě dvakrát. Čisté larvy hlístic byly ponechány přes noc v destilované vodě při pokojové teplotě. Následující den byla aplikována suspenze 500 živých infekčních larev *S. feltiae* v 1 ml destilované vody do vlhkých komůrek (Petriho misky s filtračním papírem). Množství 500 živých invazních larev bylo stanoveno na základě zjištěné procentické mortality hlístic v suspenzi (viz. 4.1.2). Jako kontrolní varianta sloužil roztok hlístic suspendovaný ve sterilní destilované vodě. Do Petriho misky bylo následně vloženo 10 larev *Tenebrio molitor*. Vlhké komůrky s larvami byly následně uchovávány v temnu při teplotě 22±1°C v plastických boxech s navlhčenou buničinou pro zamezení vysychání. Pro každou variantu byla provedena tři opakování. Mortalita larev byla zjišťována 3. a 5. den. Mrtvé larvy *T. molitor* byly pokládány na vodní pasti.

¹ Upřesňující metodické údaje jsou uváděny v Experimentální části

Tab. 6 Přehled pesticidů použitých v testech kompatibility s hlísticí *S. feltiae*

Pesticid	Obchodní název	Účinná látka (a.i.)	Formulace*	Doporučená dávka (%)	Obsah a.i.(g/l)
Akaricidy	Apollo	clofentezin	SC	0,03	500
	Borneo	etoxazole	SC	0,05	110
	Naja	fenpyroximate	SC	0,1	50
	Perporal	azocyclotin	WP	0,1	25
	Torque-L	fenbutatinoxide	SC	0,05	25
	Masai	tebufenpyrad	WG	0,05	25
	Polo	diafenthurion	SC	0,08	250
Fungicidy	Candit	kresoxim-methyl	WG	0,02	50
	Captan	captan	WG	0,15	80
	Teldor	fenhexamid	WG	0,15	50
	Tridal	nuarimol	SC	0,05	120
Insekticidy	Admiral	pyriproxyfen	EC	0,025	100
	Enstar	kinoprene	EC	0,075	65
	Match	lufenuron	EC	0,1	50
	Mimic	tebufenozide	SC	0,1	240
	Runner	metoxyfenozide	SC	0,04	240
	Spruzit	piperonyl-butoxide	EC	0,1	144

*SC...suspenzní koncentrát, WP...smáčitelný prášek, WG... smáčitelné granule, EC...emulgovatelný koncentrát

4.5.3 Hodnocení účinnosti účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hlístic v půdním substrátu

Většina experimentů byla realizována v kontejnerech plněných půdním substrátem (viz. 4.5). Prakticky shodný metodický postup byl použit v pokusech sledujících účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic v optimálních a různých teplotních a vlhkostních režimech proti larvám *T. molitor* a *G. mellonella*, dále v pokusech zaměřených na studium prekolonizace půdního substrátu entomopatogenními houbami na vývoj infekce na larvách *T. molitor*, včetně studie zaměřené na charakteristiku interakcí mezi houbami a hlísticemi ve společném systému.

V pokusech zaměřených na studium sledující účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic byly do kultivačních jednotek aplikovány suspenze různých koncentrací hlístic a doplněny sterilní destilovanou vodou na úroveň 12,5% (v:v) tzn. do 40 ml vysušeného půdního substrátu byla aplikována suspenze hlístovky a doplněna sterilní destilovanou vodou na celkový objem 5 ml. Substrát se suspenzí hlístic a vody byl důkladně promíchán, aby se vytvořila jemně drobtovitá struktura. V kurativní variantě pokusu bylo do takto připravených jednotek vloženo následovně 10 larev *T. molitor*. V pokusech zaměřených na účinky prekolonizace půdního substrátu byly larvy *T. molitor* introdukovány se 7denním zpožděním. Jednotky byly inkubovány v klimaboxu (teplota 25±1°C, fotoperioda 0/24) po dobu 14 dnů.

Kurativní způsob kultivace byl použit též v pokusech, ve kterých byl testován vliv teploty a vlhkosti na účinnost hlístic. V pokusech sledující vliv teploty byly testovány tři teplotní režimy: 10, 15 a 25°C.

Pro experiment studující vliv vlhkosti byly zvoleny dvě úrovně vlhkosti substrátu: 6 a 12,5 % (v:v), tzn. pro dosažení 6% vlhkosti byla aplikována suspenze hlístic doplněná sterilní

destilovanou vodou na množství 2,4 ml. V případě 12,5% vlhkosti byla suspenze hlístic doplněna sterilní destilovanou vodou na objem 5 ml. Kontejnery byly následně inkubovány v jedné teplotě ($15\pm 1^\circ\text{C}$). Pro experiment s nízkou hladinou vlhkosti (6%) byl zvolen model s rehydrací, kdy byla 7. den testu vlhkost substrátu doplněna odpovídajícím množstvím sterilní vody (tzn. 2,6 ml) na úroveň 12,5%. Larvy vykazující zjevnou infekci entomopatogenními hlísticemi byly při každé kontrole z kultivačních jednotek odebrány a následně umístěny na vodní pasti.

4.5.4 Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub v půdním substrátu

V experimentech zaměřených na sledování účinnosti entomopatogenních hub proti larvám *T. molitor* byly suspenze různých koncentrací aplikovány do připravených kontejnerů v objemu 5 ml. Substrát se suspenzí byl důkladně promíchán. Do takto připravených jednotek bylo po té vloženo 10 larev *T. molitor*. V pokusech zaměřených na účinky prekolonizace půdního substrátu byly larvy *T. molitor* introdukovány se 7denním zpožděním. Jednotky byly inkubovány v klimaboxu (teplota $25\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24). Pokusy z této série byly vyhodnocovány prakticky stejným způsobem. Všechny larvy byly v daném kontrolním dnu z kultivačních jednotek vyjmuty a pomocí binokulárního mikroskopu byl zaznamenán výskyt zdravých, infikovaných a mrtvých larev. V tomto rozhodování sehrávala významnou úlohu modifikovaná indexová stupnice (FDI) (tab. 7). Při hodnocení byl zaznamenán statut každého jedince v kultivační jednotce v dané variantě. Výsledky byly podrobně statisticky analyzovány. Larvy vykazující zjevnou infekci již v prvním kontrolním dni byly ze substrátu vyjmuty a dokultivovány ve vlhkých komůrkách, tak aby nedocházelo k sekundární infekci v kultivačních jednotkách.

Tab. 7 Stupnice pro hodnocení vývoje houby na larvách *T.molitor* (upraveno dle Landa et al. 1994)

FDI Index	Charakteristika
0	- na larvě nejsou patrné zjevné známky infekce
0,5	- drobné nebo velké melanizační skvrny na povrchu larvy
1	- larva je mrtvá nepohyblivá
1,5	- lokalizovaný růst mycelia na povrchu larvy
2	- mycelium kompaktní, zhruba na 1/3 těla larvy, sporulace se ještě neobjevuje
2,5	- na myceliu se objevují morfologické struktury související s počátkem sporulace
3	- mycelium jsou zjištěny morfologické struktury související s plnou sporulací

4.5.5 Vliv přítomnosti hmyzího hostitele na schopnost entomopatogenních hub namnožit se v půdním substrátu

V těchto pokusech byly používány kultivační jednotky připravené viz. 4.5.4 Z připravených kultivačních jednotek bylo odebráno 20 ml půdního substrátu (odpovídá objemu půdy po okraj naplněné $\varnothing 5$ cm Petriho misky) a analyzováno metodou CFU (Colony Forming Units). Vzorky půdy byly převedeny do 100 ml 0,05% roztoku Tween 80. Suspenze byla po dobu 15-20 minut třepána na reciproké třepačce. Půdní výluh byl následně ředěn podle

předpokládaného množství spor, které bylo naaplikováno na počátku testu v poměru 1:10 (tzn. do 9 ml sterilního 0,05% roztoku Tween 80 se přidá 1 ml půdního výluhu). 0,5 ml naředěného půdního výluhu bylo pak rovnoměrně rozetřeno po povrchu agarizovaného selektivního média s přídatkem Sylit pomocí sterilních skleněných kuliček. Pokusné jednotky byly inkubovány v klimaboxu (teplota 25 ± 1 °C, fotoperioda 0/24) a kontrola byla prováděna po 7 a 10 dnech.

4.5.6 Vliv prekolonizace půdního substrátu na interakce mezi entomopatogenními houbami a hlístitci

Kultivační jednotky byly ošetřeny 5 ml suspenzí daného druhu houby současně se suspenzí hlístit. Substrát byl důkladně promíchán. Do takto připravených jednotek bylo po té introdukováno 10 larev *T. molitor*. V kurativní variantě pokusu bylo do takto připravených jednotek vloženo následovně 10 larev *T. molitor*. V pokusech zaměřených na účinky prekolonizace půdního substrátu byly larvy *T. molitor* introdukovány se 7denním zpožděním. Jednotky byly inkubovány v klimaboxu (teplota 25 ± 1 °C, fotoperioda 0/24) po dobu 14 dnů. Při hodnocení byl použit stejný postup jako v experimentech zaměřených na hodnocení účinnosti různých druhů entomopatogenních hub a hlístit (detailní hodnocení stavu populace na úrovni každého jedince v populaci) při čemž se rozlišovalo, zda jsou symptomy infekce způsobené houbou či hlístití.

4.5.7 Vliv aplikace hlístitice na vývoj infekce entomopatogenních hub na larvách *T. molitor*

Pokusy v této části byly realizovány ve vlhkých komůrkách (Petriho miska o průměru \varnothing 60 mm s navlhčeným diskem filtračního papíru). Pro experiment bylo vybráno z chovu 80 larev *T. molitor*. 10 larev z tohoto výběru bylo vloženo do vlhkých komůrek ošetřených suspenzí hlístitice *S. carpocapsae* o koncentraci 60 IJs a 10 larev bylo vloženo do komůrek ošetřených pouze sterilní destilovanou vodou. 60 larev bylo na 1 s. ponořeno do suspenze entomopatogenní houby o titru $1,0 \times 10^6$ spor/ml, (přebytečná suspenze byla odsáta filtračním papírem) a jednotlivě vkládáno do vlhkých komůrek. Současně s larvami bylo do 10 misek aplikováno 60 IJs *S. carpocapsae*. 10 misek bylo ponecháno jako kontrolní varianta pro sledování vývoje samostatně aplikované houby. Všechny vlhké komůrky s larvami byly inkubovány v klimaboxu (teplota 25 ± 1 °C, fotoperioda 0/24). Každých 24 hodin bylo aplikováno 60 IJs *S. carpocapsae* do 10 vlhkých komůrek s larvami ošetřenými suspenzí houby tak, že odstup od společné aplikace dosáhl 96 hodin. Hodnocení probíhalo každých 24 hodin ve variantě ošetřené pouze houbou, u variant ošetřených oběma agens kontrola probíhala ode dne po ošetření hlístití. Hodnocení probíhalo po dobu 7 dnů a pak 9. a 14. den testu. Při hodnocení byl použit stejný postup jako v experimentech zaměřených na hodnocení účinnosti různých druhů entomopatogenních hub a hlístit (detailní hodnocení jedince) při čemž se rozlišovalo, zda jsou symptomy infekce způsobené houbou či hlístití. Pro detailnější popsání interakčního systému byla využita modifikovaná stupnice FDI.

4.6 Digitalizace obrazu, mikroskopická technika a statistika

Digitalizace obrazu, mikroskopická technika

Při vyhodnocování pokusů a tvorbě originální digitalizované fotodokumentace bylo použito zařízení, které je k dispozici KRV ZF JU (světelný mikroskop Nikon, binokulární mikroskop Zeiss, digitální fotoaparáty Olympus Camedia E-20 a Canon EOS 10D, barevná LCD kamera Sony propojitelná se světelným mikroskopem nebo stereomikroskopem, barevným

monitorem a pomocí programu Adobe Photoshop i s PC, s možností vytvářet digitální videozáznam nebo jednotlivé obrázky). Při úpravě a archivaci digitálních obrázků byly standardně využívány programy Adobe Photoshop, ACD a formát JPG.

Statistika

V části práce zabývající se kompatibilitou vybraných pesticidů s hlísticí *S. feltiae* byly hodnoty mortalit infekčních larev hlístice nejdříve korigovány pomocí Abbottova vzorce (Abbott 1925). Upravená mortalita M byla určena pomocí $M = M_c + (1 - M_c) \times M_o$, kde M_c byla mortalita zjištěná v kontrole, M_o byla mortalita zjištěná v ošetřené variantě. Dále byla data analyzována pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu a k zdůraznění rozdílů použit Tukeyho test ($p \leq 0,05$).

V dalších částech práce byla před statistickou analýzou provedena arcsin transformace % mortality larev. Pro většinu pokusů byl použit program Statistica™ version 7 (StatSoft, Inc. 2006). Základem pro vyhodnocení dat byla jednofaktorová analýza rozptylu („Analysis of Variance“, ANOVA). Průkaznost rozdílů mezi jednotlivými hodnotami různých úrovní byla testována prostřednictvím „Post-hoc comparasion“ (Tukey HSD test, $p \leq 0,05$). Dále byly použity v hodnocení indexu vývoje hub (FDI) neparametrické metody, resp. Man-Whitneyho dvouvýběrový test a Kruskal-Wallisův test ($p \leq 0,05$). Pro zhodnocení interakcí mezi houbami a hlísticí *S. carpocapsae* byl nejdříve použit vzorec pro výpočet očekávané mortality M_E podle vzorce $M_E = M_N + M_F(1 - M_N)$, kde M_N a M_M jsou zjištěné mortality larev vyvolané samostatnou aplikací hlístice/houby (Ansari et. al 2006) a porovnán se zjištěnou mortalitou pomocí χ^2 -testu.

Pro určení LD_{50} u jednotlivých druhů hub a hlístic byl použit program BioStat 2009, stejně tak pro určení LT_{50} v části zabývající vlivem aplikace hlístice na vývoj infekce entomopatogenních hub.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

5.1 Hodnocení kompatibility vybraných pesticidů s hlísticí *S. feltiae*

5.1.1 Hodnocení vlivu vybraných pesticidů na vitalitu *S. feltiae* v *in vitro* testech

V testech kompatibility hlístice *S. feltiae* s vybranými druhy fungicidních přípravků se hodnoty mortalit infekčních larev hlístice pohybovaly pod hranicí 9% a mezi jednotlivými účinnými látkami (ú.l.) nebyl zjištěn významný statistický rozdíl s výjimkou ú.l. nuarimol, kde byla zaznamenána nižší mortalita, než-li v kontrolní variantě a to v průběhu celého testu (uváděná čísla jsou po Abbottově korekci).

U insekticidů byl zaznamenán statistický vliv testovaných účinných látek na přežívání infekčních larev hlístovky *S. feltiae*. Mortalita se pohybovala od 2,26 do 18,68% v závislosti na testované ú.l. v průběhu celého testu. Mezi jednotlivými účinnými látkami byly detekovány statistické rozdíly. Nejvyšší hodnoty mortality zaznamenala ú.l. piperonyl-butoxide (18,86%) na druhé straně nejnižší mortalitu larev hlístice způsobil ú.l. tebufenozide (2,94%). Mortalita ostatních ú.l. se pohybovala v rozmezí 9-12%.

Nejvyšší hodnota mortality u testovaných akaricidů dosáhla ú.l. fenpyroximate (20,18%). Hodnoty mortality se u této ú.l. během prvních 48 hodin držely na nízké úrovni (5,22 a 7,75% resp.). Posledních 24 hodin před koncem testu však mortalita infekčních larev dosáhla hranice 20%. Druhou nejvyšší mortalitu zaznamenala ú.l. azocyclotin, jež způsobila 12,11% mortalitu larev hlístice *S. feltiae*. Ostatními akaricidy ovlivnily vitalitu hlístice jen na hranici 7-9%.

Tab. 8. Hodnocení vlivu vybraných fungicidů na mortalitu *S. feltiae* po 24, 48 a 72 hodinách

Účinná látka	Mortalita (průměr±SD%)		
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
captan	8,68±3,58 ^b	8,73±2,74 ^b	8,73±3,03 ^b
fenhexamid	8,13±5,06 ^b	8,15±3,46 ^b	8,86±4,40 ^b
kresoxim-methyl	7,04±3,58 ^b	7,33±4,43 ^b	8,43±4,07 ^b
nuarimol	-1,83±3,32 ^a	-1,81±3,19 ^a	-0,41±3,04 ^a

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

Tab. 9. Statistické hodnocení vlivu jednotlivých druhů fungicidů na mortalitu infekčních larev *S. feltiae* po 24, 48 a 72 hodinách

Doba testu hodiny/parametry	24			48			72		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	3	0,037	23,22	3	0,03	29,04	3	0,03	18,70
Error	56	0,00		56	0,00		56	0,00	

Tab. 10. Hodnocení vlivu vybraných insekticidů na mortalitu *S. feltiae* po 24, 48 a 72 hodinách

Účinná látka	Mortalita (průměr±SD%)		
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
kinoprene	10,36±4,67 ^{bc}	11,28±4,63 ^b	11,59±4,40 ^b
lufenuron	6,55±3,39 ^b	9,86±4,82 ^b	10,06±5,32 ^b
metoxyfenozide	8,08±4,41 ^{bc}	8,40±3,04 ^b	8,72±3,65 ^b
piperonyl-butoxide	11,03±5,26 ^c	11,07±5,82 ^b	18,68±4,97 ^c
pyriproxifen	8,66±3,17 ^{bc}	8,73±2,91 ^b	8,90±3,19 ^b
tebufenozide	2,26±3,32 ^a	2,59±3,05 ^b	2,94±3,13 ^a

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

Tab. 11. Statistické hodnocení vlivu jednotlivých druhů insekticidů na mortalitu infekčních larev *S. feltiae* po 24, 48 a 72 hodinách

Doba testu hodiny/parametry	24			48			72		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	5	0,02	9,54	5	0,02	11,76	5	0,05	27,67
error	83	0,00		83	0,00		83	0,00	

Tab. 12. Hodnocení vlivu vybraných akaricidů na mortalitu *S. feltiae* po 24, 48 a 72 hodinách

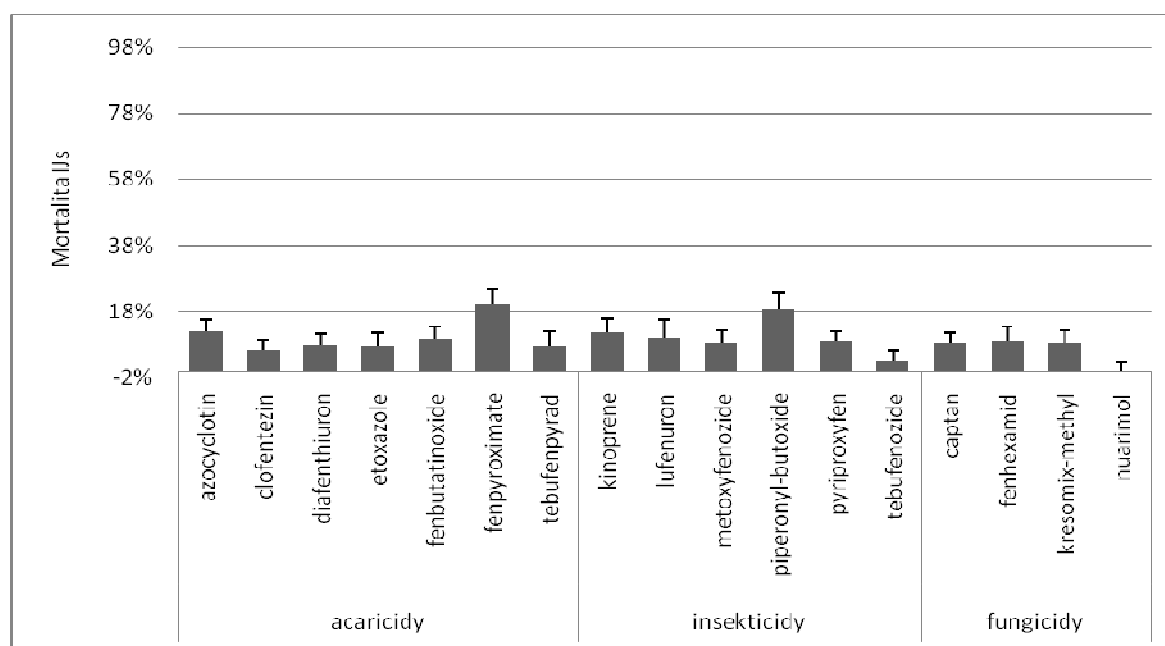
Účinná látka	Mortalita (průměr±SD%)		
	24 hodin	48 hodin	72 hodin
azocyclotin	11,08±2,79 ^a	11,57±4,01 ^a	12,11±3,26 ^{ab}
clofentezin	5,03±3,41 ^a	5,25±3,16 ^a	6,33±2,99 ^a
diafenthiuron	5,64±2,85 ^a	6,97±3,41 ^a	7,78±3,73 ^a
etoxazole	6,08±3,87 ^a	6,49±4,85 ^a	7,63±4,09 ^a
fenbutatinoxide	8,47±3,27 ^a	9,17±2,97 ^a	9,74±3,62 ^{ab}
fenpyroximate	5,22±2,87 ^a	7,75±3,77 ^a	20,18±4,71 ^b
tebufenpyrad	7,29±5,53 ^a	7,59±4,53 ^a	7,63±4,49 ^a

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

Tab. 13. Statistické hodnocení vlivu jednotlivých druhů akaricidů na mortalitu infekčních larev *S. feltiae* po 24, 48 a 72 hodinách

Doba testu hodiny/parametry	24			48			72		
	df	MS	F	Df	MS	F	df	MS	F
Intercept	6	0,01	1,13	6	0,01	0,84	6	0,04	3,50
Error	98	0,01		98	0,01		98	0,01	

Graf 1 Kumulovaná mortalita IJs *S. feltiae* po ošetření různými druhy pesticidů po 72 hodinách



Z celkového hodnocení vlivu pesticidů na mortalitu infekčních larev hlístice *S. feltiae*, vyplývá, že ani jedna ze studovaných ú.l. nezpůsobila výrazné snížení vitality hlístovky. Hodnoty mortality se pohybovaly nejčastěji v rozmezí 6-10%. Výjimku tvoří ú.l. fenpyroximate, u kterého přesáhla hranice mortality 20%. Naopak ú.l. nuarimol zaznamenal nižší mortalitu, než byla detekována v kontrolní variantě.

5.1.2 Hodnocení vlivu vybraných pesticidů na vitalitu *S. feltiae* v *in vivo* testech

Virulence *S. feltiae* byla po ošetření vybranými druhy fungicidů statisticky ovlivněna v prvních 3 dnech testu. 100% účinnosti dosáhly hlístovky ošetřené ú.l. nuarimol. 5. den testu se hodnoty mortalit hostitelských larev pohybovaly v rozmezí 82,5-100% a nebyla mezi nimi detekována statistická odchylka.

Stejně tak u testovaných insekticidů nebyly 5. den testu detekovány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými ú.l. Hodnoty mortalit *T. molitor* se pohybovaly od 82,5-100% v porovnání s kontrolou (80%). Po 5 dnech se hodnoty mezi jednotlivými variantami vyrovnaly. U akaricidů se projevil výrazný negativní efekt na virulenci infekčních larev v případě ú.l. fenpyroximate a tebufenpyrad. Infekční larvy ošetřené těmito dvěma akaricidními látkami vykazovaly sníženou virulenci po celou dobu testu. Ú.l. tebufenpyrad potlačil schopnost hlístovek infikovat larvy *T. molitor* téměř až na nulovou úroveň. Fenpyroximate po 5 dnech testu

zaznamenal 12,5% účinnost. V porovnání s kontrolní variantou (97,5%) tak došlo k významnému snížení účinnosti *S. feltiae*.

Tab. 14. Hodnocení vlivu vybraných fungicidů na virulenci *S. feltiae* po 3 a 5 dnech

Účinná látka	Mortalita (průměr±SD%)	
	3. den	5. den
<i>S. feltiae</i>	80,00±8,20 ^b	97,50±5,00 ^a
captan	82,50±15,00 ^{ab}	82,50±15,00 ^a
fenhexamid	90,00±8,20 ^{ab}	92,50±5,00 ^a
kresoxim-methyl	95,00±5,00 ^{ab}	95,00±5,00 ^a
nuarimol	100,00±0,00 ^a	100,00±0,00 ^a

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

Tab.15. Statistické hodnocení vlivu jednotlivých druhů fungicidů na virulenci infekčních larev *S. feltiae* po 3 a 5 dnech

Doba testu dny/parametry	3			5		
	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,03	3,57	1	0,02	3,00
Error	4	0,01		4	0,01	

Tab. 16. Hodnocení vlivu vybraných insekticidů na virulenci *S. feltiae* po 3 a 5 dnech

Účinná látka	Mortalita (průměr±SD%)	
	3. den	5. den
<i>S. feltiae</i>	80,00±8,20 ^b	97,50±5,00 ^a
kinoprene	82,50±17,1 ^{ab}	90,00±8,20 ^a
lufenuron	92,50±5,50 ^{ab}	95,00±5,00 ^a
metoxyfenozide	87,50±9,60 ^{ab}	100,00±0,00 ^a
piperonyl-butoxide	87,50±9,60 ^{ab}	92,50±7,50 ^a
pyriproxifen	100,00±0,00 ^a	100,00±0,00 ^a
tebufenozide	87,50±9,60 ^{ab}	90,00±8,20 ^a

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

Tab. 17. Statistické hodnocení vlivu jednotlivých druhů insekticidů na virulenci infekčních larev *S. feltiae* po 3 a 5 dnech

Doba testu dny/parametry	3			5		
	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	6	0,02	1,92	6	0,01	2,64
Error	25	0,01		25	0,00	

Tab. 18. Hodnocení vlivu vybraných akaricidů na virulenci *S. feltiae* po 3 a 5 dnech

Účinná látka	Mortalita (průměr±SD%)	
	3. den	5. den
<i>S. feltiae</i>	80,00±8,20 ^a	97,50±2,50 ^{ab}
azocyclotin	85,00±10,0 ^a	95,00±5,00 ^{ab}
clofentezin	77,50±26,3 ^a	92,50±7,50 ^{ab}
diafenthiuron	77,50±5,00 ^a	82,50±5,00 ^b
etoxazole	97,50±5,00 ^a	100,00±0,00 ^a
fenbutatinoxide	85,00±10,0 ^a	85,00±10,0 ^{ab}
fenpyroximate	7,50±15,0 ^b	12,50±9,60 ^c
tebufenpyrad	0,00±0,00 ^b	2,50±5,00 ^c

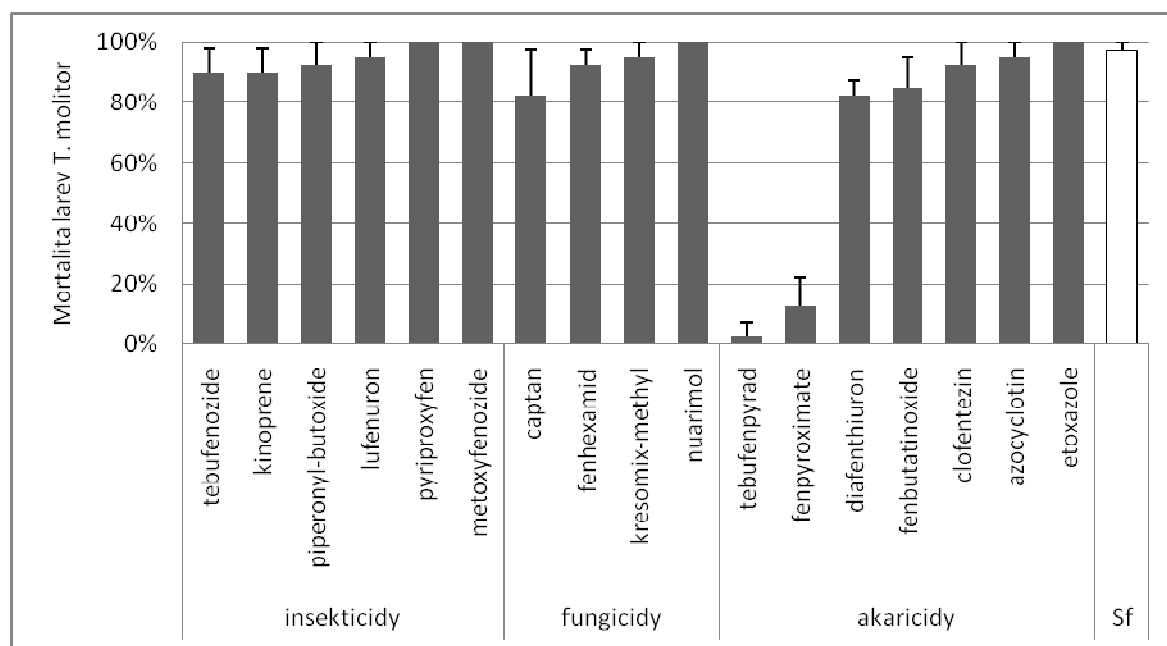
(a, b, c ..Průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 19. Statistické hodnocení vlivu jednotlivých druhů akaricidů na virulenci infekčních larev *S. feltiae* po 3 a 5 dnech

Doba testu dny	3			5		
	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	7	0,57	36,74	7	0,63	95,95
error	24	0,02		24	0,01	

Z celkového hodnocení vlivu jednotlivých druhů pesticidů virulenci *S. feltiae* dá říci, že většina testovaných ú.l. nezpůsobila výrazné snížení účinnosti. 100% účinnosti dosáhly hlístovky ošetřené ú.l. pyriproxifen, metoxyfenozone, nuarimol a etoxazole. Naopak nejnižší hodnoty účinnosti byly zaznamenány u účinných látek ze skupiny akaricidů. Naprostou inkompatibilitu prokázaly ú.l fenpyroximate a tebufenpyrad. Tyto dvě látky způsobily výrazné snížení účinnosti *S. feltiae*. Hodnoty virulence se snížily na 12,5 a 2,5% respektive, což v porovnání s kontrolní variantou představuje až 90% redukci účinnosti testovaného druhu hlístovky.

Graf 2. Kumulovaná mortalita v populaci larev *T. molitor* po aplikaci infekčních larev *S. feltiae* předem inkubovaných 72 hodin ve vybraných pesticidech



5.2 Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti larvám modelových škůdců

Základní údaje k pokusu:

- příprava suspenze entomopatogenních hlístic *S. carpocapsae*, *S. arenarium* nebo *S. feltiae* - koncentrace 50, 100, 200 a 500 IJs/kontejner (viz kapitola 4.5.3.)
- záměrná introdukce hlístic (1 ml suspenze hlístic + 4 ml sterilní destilované vody) pro zvlhčení substrátu; jako kontrola sloužila varianta ošetřená pouze destilovanou vodou.
- do každé jednotky bylo vloženo 10 larev *T. molitor* a bylo provedeno 5 opakování pro každou pokusnou variantu, tj. 50 larev pro každou variantu
- larvy byly v substrátu exponované po dobu 14 dní, kontrola byla prováděna 7. a 14. den testu

5.2.1 Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *Galleria mellonella*

V testu sledující vliv různých druhů hlístovek aplikovaných vůči larvám *Galleria mellonella* se mortalita larev pohybovala v rozmezí od 26 do 100% 7. den testu v závislosti na testovaném druhu hlístice a koncentraci. Účinnost se mezi jednotlivými druhy statisticky nelišila s výjimkou koncentrace 100 IJs. Při hodnocení po 14 dnech nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými druhy testovaných druhů hlístic pouze u koncentrace 100 IJs, kde se projevil jistý propad v účinnosti *S. carpocapsae*. U nejvyšší testované koncentrace byla shodně u *S. feltiae* a *S. carpocapsae* zaznamenána 100% mortalita larev. *S. arenarium* dosáhla jen o 2% nižší účinnost v porovnání s oběma druhy.

Tab. 20. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *Galleria mellonella* po aplikaci různých koncentrací IJs po 7 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
		7. den
	Kontrola	6,00±8,94
50	<i>S. carpocapsae</i>	30,00±23,45 ^a
	<i>S. feltiae</i>	46,00±19,49 ^a
	<i>S. arenarium</i>	36,00±26,07 ^a
100	<i>S. carpocapsae</i>	26,00±15,17 ^b
	<i>S. feltiae</i>	66,00±19,49 ^a
	<i>S. arenarium</i>	58,00±19,24 ^{ab}
200	<i>S. carpocapsae</i>	60,00±28,28 ^a
	<i>S. feltiae</i>	78,00±17,89 ^a
	<i>S. arenarium</i>	76,00±16,73 ^a
500	<i>S. carpocapsae</i>	96,00±5,48 ^a
	<i>S. feltiae</i>	100,00±0,00 ^a
	<i>S. arenarium</i>	94,00±8,94 ^a

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

Tab. 21. Statistické hodnocení účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *Galleria mellonella* po aplikaci různých koncentrací IJs po 7 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	50			100			200			500		
	df	MS	F	Df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	2	0,04	0,56	2	0,31	6,43	2	0,11	0,79	2	0,07	1,30
Error	12	0,07		12	0,05		12	0,15		12	0,05	

Tab. 22. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *Galleria mellonella* po aplikaci různých koncentrací IJs po 14 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
		14. den
	kontrola	8,00±13,04
50	<i>S. carpocapsae</i>	52,00±24,89 ^a
	<i>S. feltiae</i>	50,00±17,32 ^a
	<i>S. arenarium</i>	60,00±25,50 ^a
100	<i>S. carpocapsae</i>	34,00±13,42 ^b
	<i>S. feltiae</i>	80,00±15,81 ^a
	<i>S. arenarium</i>	84,00±18,17 ^a
200	<i>S. carpocapsae</i>	78,00±22,80 ^a
	<i>S. feltiae</i>	88,00±16,43 ^a
	<i>S. arenarium</i>	96,00±5,48 ^a
500	<i>S. carpocapsae</i>	100,00±0,00 ^a
	<i>S. feltiae</i>	100,00±0,00 ^a
	<i>S. arenarium</i>	98,00±4,47 ^a

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

Tab. 23. Statistické hodnocení účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *Galleria mellonella* po aplikaci různých koncentrací IJs po 14 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	50			100			200			500		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	2	0,27	0,29	2	0,89	7,87	2	0,15	0,96	2	0,01	1,00
Error	12	0,09		12	0,11		12	0,15		12	0,01	

5.2.2 Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *T. molitor*

Tab. 24. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací IJs po 7 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
		7. den
	kontrola	2,00±4,47
50	<i>S. carpocapsae</i>	30,00±12,25 ^a
	<i>S. feltiae</i>	14,00±11,40 ^b
	<i>S. arenarium</i>	12,00±8,37 ^b
100	<i>S. carpocapsae</i>	52,00±8,37 ^a
	<i>S. feltiae</i>	36,00±11,40 ^b
	<i>S. arenarium</i>	10,00±7,07 ^c
200	<i>S. carpocapsae</i>	58,00±4,47 ^a
	<i>S. feltiae</i>	48,00±10,95 ^a
	<i>S. arenarium</i>	20,00±12,25 ^b
500	<i>S. carpocapsae</i>	86,00±11,40 ^a
	<i>S. feltiae</i>	78,00±13,04 ^b
	<i>S. arenarium</i>	30,00±12,25 ^c

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

Tab. 25. Statistické hodnocení účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací IJs po 7 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	50			100			200			500		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	2	0,05	4,15	2	0,26	25,55	2	0,23	29,18	2	1,35	30,69
Error	12	0,01		12	0,01		12	0,01		12	0,04	

Tab. 26. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací IJs po 14 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
		14. den
	kontrola	6,00±8,94
50	<i>S. carpocapsae</i>	34,00±16,32 ^a
	<i>S. feltiae</i>	28,00±16,43 ^{ab}
	<i>S. arenarium</i>	16,00±8,94 ^b
100	<i>S. carpocapsae</i>	60,00±17,32 ^a
	<i>S. feltiae</i>	38,00±8,37 ^b
	<i>S. arenarium</i>	12,00±8,37 ^c
200	<i>S. carpocapsae</i>	68,00±4,45 ^a
	<i>S. feltiae</i>	50,00±10,00 ^b
	<i>S. arenarium</i>	20,00±12,25 ^c
500	<i>S. carpocapsae</i>	94,00±5,48 ^a
	<i>S. feltiae</i>	82,00±17,89 ^a
	<i>S. arenarium</i>	38,00±8,37 ^b

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

Tab. 27. Statistické hodnocení účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací IJs po 14 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	50			100			200			500		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	2	0,05	1,95	2	0,35	44,29	2	0,38	34,97	2	1,14	12,83
Error	12	0,02		12	0,01		12	0,01		12	0,08	

Po aplikaci různých koncentrací hlístic se mortalita larev *T. molitor* pohybovala u *S. carpocapsae* v rozmezí 30-86%, u *S. feltiae* 14-78% a *S. arenarium* 12-30%. *S. carpocapsae* vykazovala během testu poměrně vysokou účinnost i při nejnižších aplikovaných dávkách a udržovala si během celého testu signifikantně vyšší účinnost v porovnání se dvěma dalšími druhy hlístic. *S. feltiae* vykazovala v průběhu biotestu srovnatelné mortality larev, zvláště při vyšších koncentracích (200 a 500 IJs). Účinnost tohoto druhu se statisticky nelišila od *S. carpocapsae*, naopak *S. arenarium* prokázala jen velmi nízkou účinnost, která se s časem jen pozvolna zvyšovala. V případě koncentrace 200IJs dokonce setrvala na stejné úrovni po celou dobu testu. Úroveň účinnosti se ani při nejvyšší testované koncentraci nepřehoupla přes hranici 40%.

Tab. 28. Určení LD₅₀ pro jednotlivé druhy testovaných nematod pro *G. mellonella* nebo *T. molitor* při teplotě 25°C po 7 dnech

Hostitel	Druh hlístice	LD ₅₀ ±SD (IJs)	χ ²	df	P Model fitting
<i>G. mellonella</i>	<i>S. carpocapsae</i>	129,75±33,14	6,43	2	0,04
	<i>S. feltiae</i>	61,78±10,14	0,45	2	0,80
	<i>S. arenarium</i>	78,81±11,84	0,02	2	0,99
<i>T. molitor</i>	<i>S. carpocapsae</i>	110,64±18,03	0,63	2	0,73
	<i>S. feltiae</i>	188,433±25,64	0,56	2	0,76
	<i>S. arenarium</i>	2735,73±152,17	0,91	2	0,64

Tab. 29. Určení LD₅₀ pro jednotlivé druhy testovaných nematod pro *G. mellonella* nebo *T. molitor* při teplotě 25°C po 14 dnech

Hostitel	Druh hlístice	LD ₅₀ ±SD (IJs)	χ ²	df	P Model fitting
<i>G. mellonella</i>	<i>S. carpocapsae</i>	78,49±14,84	9,24	2	0,01
	<i>S. feltiae</i>	48,88±8,81	0,19	2	0,91
	<i>S. arenarium</i>	35,56±9,84	0,08	2	0,96
<i>T. molitor</i>	<i>S. carpocapsae</i>	84,10±12,79	0,55	2	0,76
	<i>S. feltiae</i>	151,00±23,91	0,90	2	0,64
	<i>S. arenarium</i>	1639,97±360,8	2,03	2	0,36

Z hodnot uváděných v tabulce 21. a 22. lze říci, že larvy *G. mellonella* vykazovaly vyšší citlivost vůči testovaným druhům entomopatogenních hlístic v porovnání s *T. molitor*. Hodnoty LD₅₀ se pro *G. mellonella* pohybovaly po 7 dnech testu v rozmezí 61,78-129,75 IJs a pro *T. molitor* od 110,64 do 2735,73 IJs. *T. molitor* prokázalo vysokou odolnost vůči infekčním larvám *S. arenarium*, neboť hodnoty LD₅₀ se pro tento druh pohybují ve vysokých dávkách. Po 14 dnech se hodnoty pohybovaly v nižším rozmezí dávek u obou testovaných hostitelských larev, při čemž nejúčinněji působil vůči larvám *G. mellonella* druh *S. arenarium*. Na druhé straně larvy *T. molitor* prokázaly nejvyšší citlivost vůči *S. carpocapsae* kdy LD₅₀ dosáhla hodnoty 48,1 IJs.

5.3 Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na účinnost hlístic rodu *Steinernema*

Základní údaje k pokusu:

- pro pokusy byl využit postup popsáný v kapitole 4.5.3
- záměrná introdukce hlístic *S. carpocapsae*, *S. arenarium* nebo *S. feltiae* do připravených kultivačních jednotek - koncentrace 50 a 500 IJs/kontejner
- pro každou variantu bylo provedeno 10 opakování; do poloviny kontejnerů od každé koncentrace bylo vloženo 10 larev *T. molitor* (neprekolonizovaná), polovina krabiček byla ponechána bez hostitele (prekolonizovaná); tj 5 krabiček s larvami a 5 krabiček bez larev
- larvy byly v substrátu exponovány po dobu 14 dní; kontrola byla prováděna 7. a 14. den testu; 7. den testu bylo do kontejnerů bez hostitele introdukováno 10 larev *T. molitor* a opět kultivovány 14. dní

Tab. 30. Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací hlístic rodu *Steinernema* po 7 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Mortalita <i>T. molitor</i> (průměr±SD%)	
		neprekolonizovaná	Prekolonizovaná
	kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00
50	<i>S. feltiae</i>	14,00±11,40 ^{bA}	38,00±19,24 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	30,00±12,24 ^{aA}	24,00±23,02 ^{abA}
	<i>S. arenarium</i>	12,00±8,37 ^{bA}	16,00±8,94 ^{abA}
500	<i>S. feltiae</i>	78,00±13,04 ^{aB}	94,00±8,94 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	86,00±11,40 ^{aB}	60,00±14,14 ^{bA}
	<i>S. arenarium</i>	30,00±12,24 ^{bA}	38,00±8,37 ^{cA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/neprekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 31. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na mortalitu larev *T. molitor* po aplikaci 50 IJs/kontejner po 7 dnech v teplotě 25°C

Druh/parametry	<i>S. feltiae</i>			<i>S. carpocapsae</i>			<i>S. arenarium</i>		
	Df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,17	5,29	1	0,19	4,80	1	0,00	0,54
Error	8	0,03		8	0,04		8	0,01	

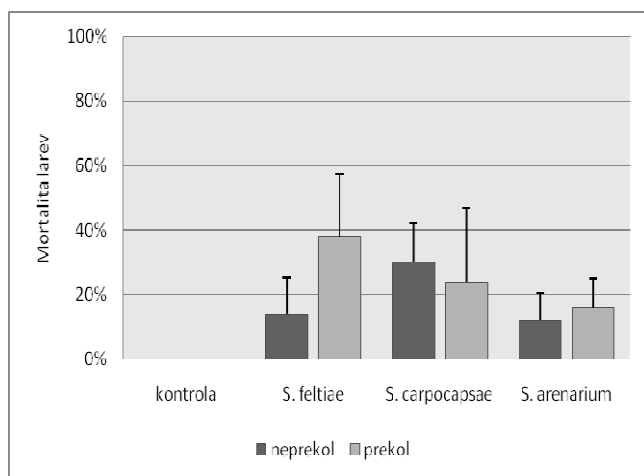
Tab. 32. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na mortalitu larev *T. molitor* po aplikaci 500 IJs/kontejner po 7 dnech v teplotě 25°C

Druh/parametry	<i>S. feltiae</i>			<i>S. carpocapsae</i>			<i>S. arenarium</i>		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,47	6,81	1	0,50	8,06	1	0,02	1,40
Error	8	0,07		8	0,06		8	0,01	

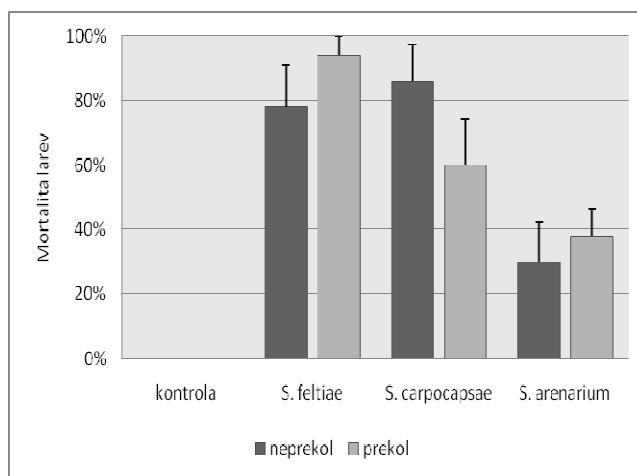
V testu sledující vliv osídlení půdního substrátu vybranými druhy hlístic před introdukcí hostitele bylo zjištěno, že mortalita larev *T. molitor* byla signifikantně ovlivněna efektem prekolonizace. 7. den testu byly detekovány rozdíly mezi jednotlivými druhy hlístic, jak ve variantě prekolonizované tak neprekolonizované. Jednotlivé druhy hlístic také reagovaly na prekolonizaci odlišně zvláště v případě *S. feltiae* a *S. carpocapsae*. *S. feltiae* navýšila svou účinnost, kdežto *S. carpocapsae* zaznamenala signifikantní pokles účinnosti. *S. arenarium* zaznamenala jen statisticky neprokazatelný nárůst u obou testovaných koncentrací. Z grafů je patrné, že *S. feltiae* v dávce 50 IJs navýšila svou účinnost v prekolonizovaném prostředí až o 24%, kdežto *S. carpocapsae* vykázala snížení účinnosti až o 26% v dávce 500 IJs. Tento trend snížené účinnosti byl detekován i u dávky 50 IJs.

Graf 3. Mortalita larev *T. molitor* po ošetření různými druhy hlístic v koncentraci a) 50 IJs, b) 500 IJs po 7 dnech v teplotě 25°C

a) 50 IJs



b) 500 IJs



Tab. 33. Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací hlístic rodu *Steinernema* po 14 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace IJ/kontejner	Varianta	Mortalita <i>T. molitor</i> (průměr±SD%)	
		neprekolonizovaná	Prekolonizovaná
50	kontrola	2,00±4,44	2,00±4,44
	<i>S. feltiae</i>	28,00±16,43 ^{bA}	42,00±16,43 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	34,00±16,73 ^{aA}	30,00±27,87 ^{abA}
	<i>S. arenarium</i>	16,00±8,94 ^{cA}	18,00±8,94 ^{abA}
500	<i>S. feltiae</i>	82,00±17,89 ^{aA}	96,00±8,94 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	94,00±5,47 ^{bB}	60,00±14,14 ^{aA}
	<i>S. arenarium</i>	38,00±8,36 ^{bA}	52,00±16,43 ^{bA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/neprekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 34. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na mortalitu larev *T. molitor* po aplikaci 50 IJs/kontejner po 14 dnech v teplotě 25°C

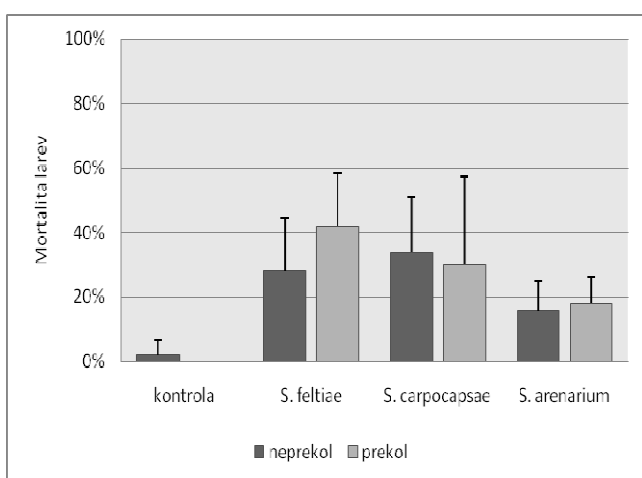
Druh	<i>S. feltiae</i>			<i>S. carpocapsae</i>			<i>S. arenarium</i>		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,06	1,74	1	0,28	4,24	1	0,00	0,13
Error	8	0,03		8	0,07		8	0,01	

Tab. 35. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na mortalitu larev *T. molitor* po aplikaci 500 IJs/kontejner po 14 dnech v teplotě 25°C

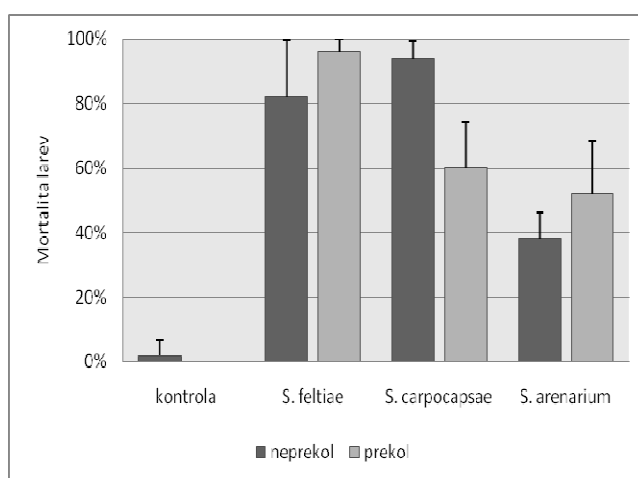
Druh	<i>S. feltiae</i>			<i>S. carpocapsae</i>			<i>S. arenarium</i>		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,30	2,13	1	1,04	21,67	1	0,07	2,99
Error	8	0,14		8	0,05		8	0,02	

Graf 4. Mortalita larev *T. molitor* po ošetření různými druhy hlístic v koncentraci a) 50 IJs, b) 500 IJs po 14 dnech v teplotě 25°C

a) 50 IJs



b) 500 IJs



Po 14 dnech testu byl zaznamenán signifikantní vliv prekolonizace pouze u *S. carpocapsae*, u které přetrvával trend snížené účinnosti v prekolonizované variantě v dávce 500 IJs. U *S. feltiae* byl zaznamenán nárůst účinnosti, ten však nebyl statisticky signifikantní ani u jedné z testovaných koncentrací. Stejný trend bez statistické významnosti byl detekován i u *S. arenarium*. Z grafů je patrný trend navýšení účinnosti *S. feltiae*, u které se mortalita larev zvýšila při dávce 500 IJs z 38% na 52%. U *S. carpocapsae* rozdíl mezi oběma variantami činil 34% v neprospěch prekolonizované varianty.

5.4 Hodnocení vlivu teploty a vlhkosti na účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti larvám modelových škůdců

Základní údaje k pokusu:

- pro pokusy byl využit postup popsany viz kapitola 4.5.3.
- záměrná introdukce hlístic *S. carpocapsae* nebo *S. feltiae* do připravených kultivačních jednotek - koncentrace 50 a 500 IJs/kontejner
- takto připravené jednotky byly inkubovány v termostatu ve třech teplotách 10, 15 a 25±1°C.
- larvy byly v substrátu exponované po dobu 14 dní, kontrola byla prováděna 7. a 14. den
- pro experiment studující vliv vlhkosti byly zvoleny dvě úrovně vlhkosti substrátu 6 a 12,5 % (v:v). Konečná vlhkost půdního substrátu byla standardizována na studované úrovně po přidání suspenze hlístic o koncentraci 50 a 500 IJs/misku; jako kontrola sloužila varianta ošetřená pouze destilovanou vodou
- jednotky byly inkubovány v jedné teplotě 15±1°C; pro experiment s nízkou hladinou vlhkosti (6% v:v) byl zvolen model s dehydratací; 7. den testu byla vlhkost substrátu doplněna odpovídajícím množstvím sterilní vody na úroveň 12,5% (v:v).
- larvy byly v substrátu exponované po dobu 14 dní; kontrola byla prováděna 7. a 14. den

5.4.1 Hodnocení vlivu teploty na účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti larvám *G. mellonella* a *T. molitor*

Tab. 35. Vliv různých teplot na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *G. mellonella* 7. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Teplota/Mortalita (průměr±SD)		
		25°C	15°C	10°C
	kontrola	6,00±8,94	2,00±4,47	0,00±0,00
50	<i>S. feltiae</i>	46,00±19,49 ^{aA}	68,00±13,04 ^{aA}	2,00±4,47 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	30,00±23,45 ^{aA}	18,00±8,37 ^{bAB}	0,00±0,00 ^{aB}
500	<i>S. feltiae</i>	100,0±0,00 ^{aA}	100,0±0,00 ^{aA}	58,00±13,04 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	96,00±5,48 ^{aA}	54,00±11,40 ^{bB}	0,00±0,00 ^{bC}

a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 36. Statistické hodnocení vlivu různých teplot na účinnost hlístic vůči larvám *G. mellonella* 7. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,70	22,28	2	1,48	145,00	2	0,13	4,83	2	2,44	91,24
error	8	0,03		12	0,01		12	0,03		12	0,03	

Tab. 37. Vliv různých teplot na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *G. mellonella* 14. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Teplota/Mortalita (průměr±SD)		
		25°C	15°C	10°C
	kontrola	8,00±13,04	6,00±5,47	4,00±5,48
50	<i>S. feltiae</i>	50,00±17,32 ^{aA}	74,00±8,95 ^{aA}	52,00±21,68 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	52,00±25,00 ^{aA}	28,00±4,48 ^{bAB}	18,00±8,37 ^{bB}
500	<i>S. feltiae</i>	100,0±0,00 ^{aA}	100,0±0,00 ^{aA}	100,0±0,00 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	100,0±0,00 ^{aA}	68,00±8,37 ^{bB}	30,00±10,00 ^{bC}

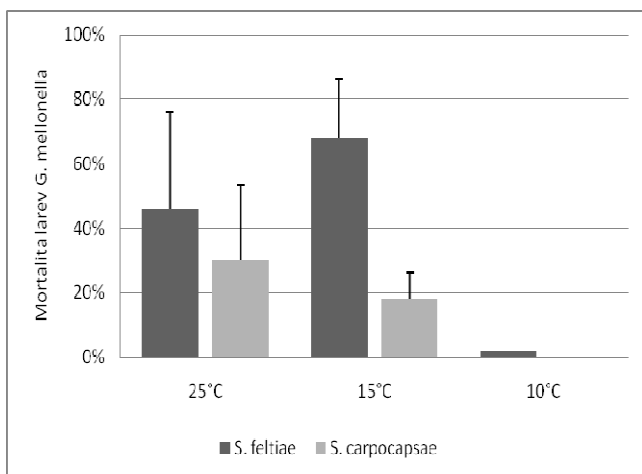
a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 38. Statistické hodnocení vlivu různých teplot na účinnost hlístic vůči larvám *G. mellonella* 14. den testu

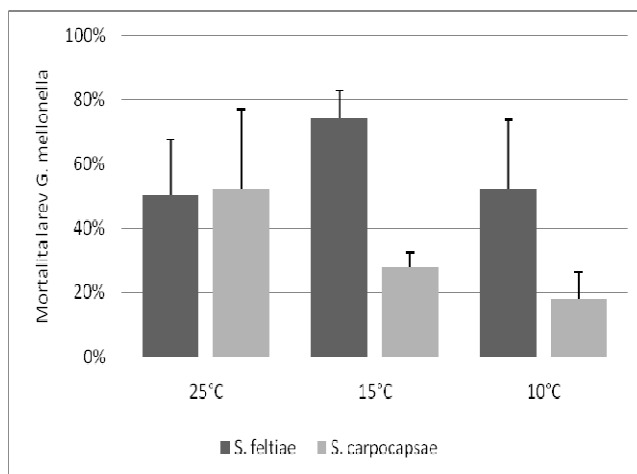
Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,14	3,02	-	-	-	1	0,21	5,24	2	2,06	247,96
Error	8	0,05		-			8	0,04		12	0,01	

Graf 5. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *G. mellonella* po aplikaci a) 50 a b) 500 IJs v různých teplotních režimech po 7 dnech testu

a) 50 IJs



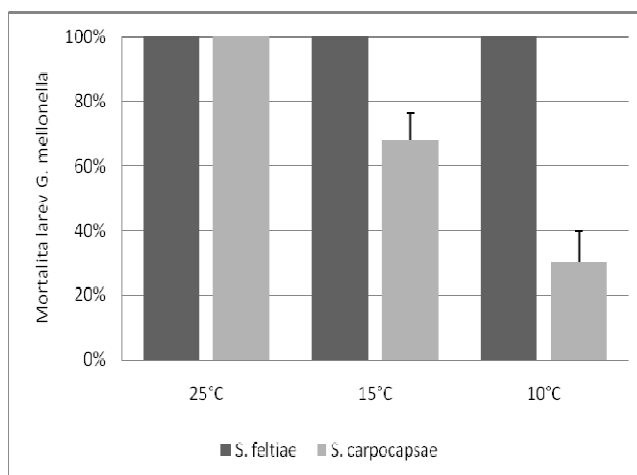
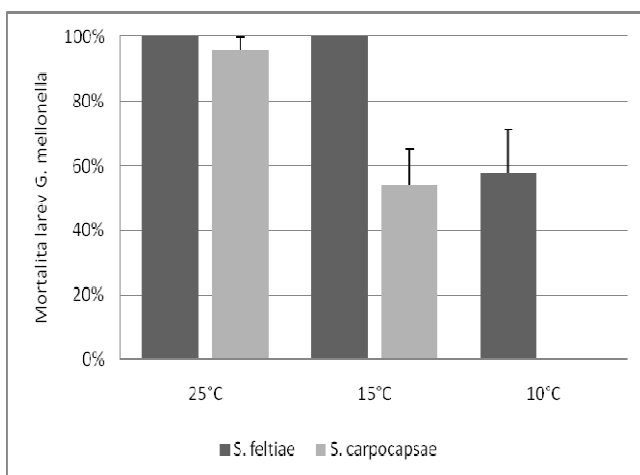
b) 500 IJs



Graf 6. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *G. mellonella* po aplikaci a) 50 a b) 500 IJs v různých teplotních režimech po 14 dnech testu

a) 50 IJs

b) 500 IJs



Z hodnot získaných po 7 dnech testu je patrné, že oba druhy hlístic reagovaly na sníženou teplotu snížením účinnosti. Výjimku tvoří *S. feltiae*, jenž prokázala v teplotě 15°C vyšší účinnost, než-li při 25°C. Nejnižší hodnoty mortalit larev *G. mellonella* byly zaznamenány v teplotě 10°C. Tyto rozdíly byly statisticky detekovatelné. *S. carpocapsae* reagovala na snížené teploty citlivěji, než-li *S. feltiae*, která si udržovala vysokou účinnost i v nižších testovaných teplotách. Po 14 dnech testu byla u *S. feltiae* zaznamenána 100% mortalita ve všech testovaných teplotách. *S. carpocapsae* zaznamenala po 7 dnech v nejnižší teplotě i při nejvyšší koncentraci 0% mortalitu. Po 14 dnech se účinnost tohoto druhu zvýšila na úroveň 30% v porovnání se *S. feltiae*, která při té samé koncentraci způsobila 100% mortalitu larev *G. mellonella*.

Tab. 39. Vliv různých teplot na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *T. molitor* 7. den testu.

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Teplota/Mortalita (průměr±SD)		
		25°C	15°C	10°C
	kontrola	2,00±4,47	0,00±0,00	0,00±0,00
50	<i>S. feltiae</i>	14,00±11,40 ^{bA}	12,00±13,04 ^{abA}	4,00±5,58 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	50,00±12,25 ^{aA}	20,00±10,00 ^{aB}	0,00±0,00 ^{aC}
500	<i>S. feltiae</i>	78,00±13,04 ^{aA}	70,00±14,14 ^{aAB}	26,00±25,09 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	86,00±11,40 ^{aA}	54,00±20,73 ^{aB}	0,00±0,00 ^{aC}

a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 40. Statistické hodnocení vlivu různých teplot na účinnost hlístic vůči larvám *T. molitor* 7. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,01	1,27	2	0,53	8,80	1	0,35	35,92	2	2,11	49,88
Error	8	1,01		12	0,06		8	0,01		12	0,04	

Tab. 41. Vliv různých teplot na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *T. molitor* 14. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Teplota/Mortalita (průměr±SD)		
		25°C	15°C	10°C
	kontrola	6,00±8,94	2,00±4,47	4,00±4,37
50	<i>S. feltiae</i>	28,00±16,43 ^{bA}	12,00±13,04 ^{bA}	10,00±12,25 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	60,00±17,32 ^{aA}	38,00±16,43 ^{aA}	6,00±5,48 ^{aB}
500	<i>S. feltiae</i>	82,00±17,89 ^{aA}	80,00±12,25 ^{aA}	66,00±20,74 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	94,00±5,48 ^{aA}	62,00±22,08 ^{aB}	26,00±5,48 ^{aC}

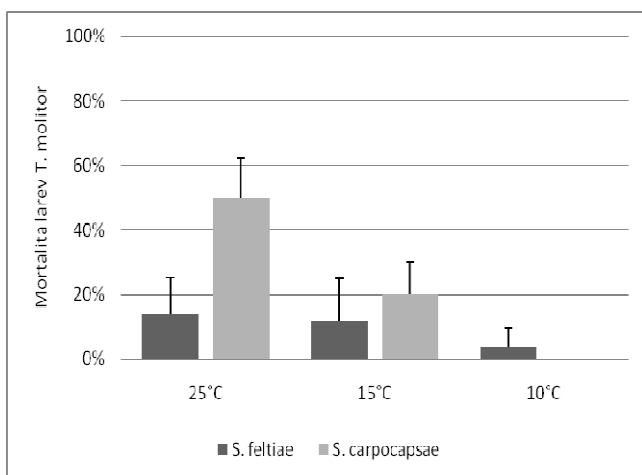
a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 42. Statistické hodnocení vlivu různých teplot na účinnost hlístic vůči larvám *T. molitor* 14. den testu

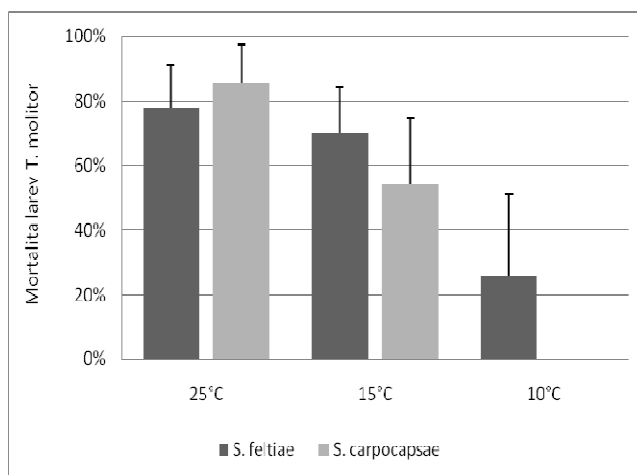
Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,05	2,48	2	0,16	1,54	1	0,44	17,84	2	1,35	25,73
Error	8	0,02		12	0,10		8	0,02		12	0,05	

Graf 7. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *T. molitor* po aplikaci a) 50 a b) 500 IJs v různých teplotních režimech po 7 dnech testu

a) 50 IJs

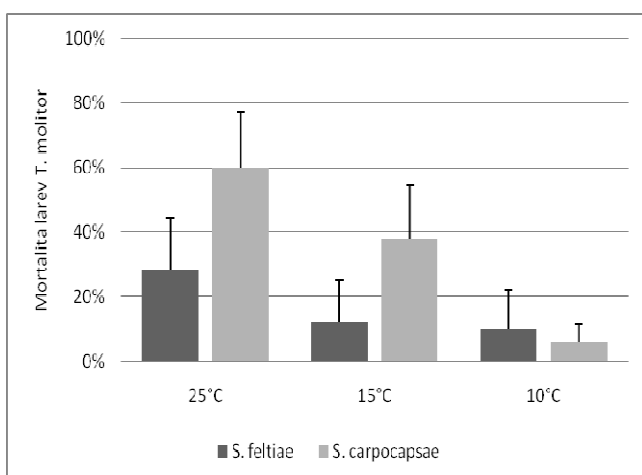


b) 500 IJs

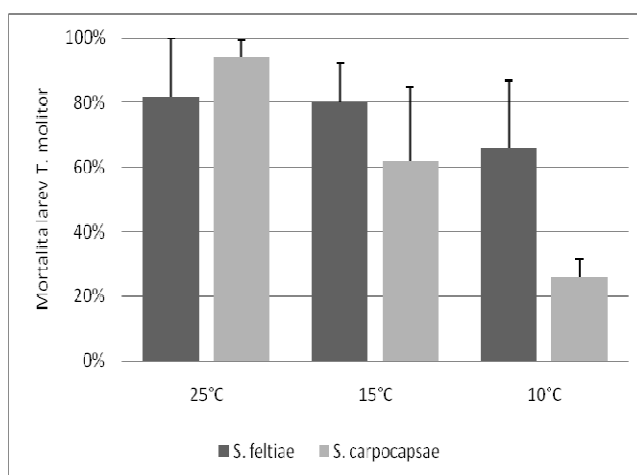


Graf 8. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic proti larvám *T. molitor* po aplikaci a) 50 a b) 500 IJs v různých teplotních režimech po 14 dnech testu

a) 50 IJs



b) 500 IJs



Z testů prováděných na larvách *T. molitor* vyplývá, že nejvyšších hodnot mortalit bylo dosaženo při nejvyšší testované teplotě (25°C) u obou testovaných druhů hlístic. Statisticky průkazné rozdíly v účinnosti v závislosti na teplotě byly detekovány u druhu *S. carpocapsae*. *S. feltiae* si udržovala po dobu testu poměrně vyrovnanou účinnost u obou testovaných koncentrací. Mortalita larev *T. molitor* ošetřených *S. carpocapsae* klesala se snižující se teplotou z 86 na 54 a 0% u nejvyšší testované koncentrace. *S. feltiae* zaznamenala při té samé koncentraci pokles ze 78 přes 70 na 26%. Po 14 dnech byla u *S. feltiae* koncentrace 500IJs v 10°C zaznamenána 66% mortalita, kdežto u *S. carpocapsae* 26%.

5.4.2 Hodnocení vlivu vlhkosti na účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti larvám *G. mellonella* a *T. molitor*

Tab. 43. Vliv vlhkostního režimu na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *G. mellonella* 7. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Vlhkost/Mortalita (průměr±SD)	
		12,5%	6%
	kontrola	2,00±4,47	2,00±4,47
50	<i>S. feltiae</i>	68,00±13,04 ^{aA}	18,00±8,37 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	18,00±8,37 ^{bA}	6,00±8,94 ^{aA}
500	<i>S. feltiae</i>	100,00±0,00 ^{aA}	58,00±25,88 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	54,00±11,40 ^{bA}	24,00±16,73 ^{bB}

a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 44. Statistické hodnocení vlivu různých vlhkostí na účinnost hlístic vůči larvám *G. mellonella* 7. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,83	43,13	1	2,11	37,16	1	0,04	4,77	1	0,27	10,76
Error	8	0,01		8	0,01		8	0,01		8	0,03	

Tab. 45. Vliv vlhkostního režimu na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *G. mellonella* 14. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Vlhkost/Mortalita (průměr±SD)	
		12,5%	6%
	kontrola	6,00±5,48	2,00±4,47
50	<i>S. feltiae</i>	74,00±8,94 ^{aA}	76,00±13,42 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	28,00±4,47 ^{bA}	16,00±11,40 ^{bA}
500	<i>S. feltiae</i>	100,00±0,00 ^{aA}	98,00±4,47 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	68,00±8,37 ^{bA}	76,00±11,40 ^{bA}

Tab. 46. Statistické hodnocení vlivu různých vlhkostí na účinnost hlístic vůči larvám *G. melonella* 14. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,02	0,31	1	0,20	1,00	1	0,04	4,84	1	0,04	1,79
Error	8	0,07		8	0,02		8	0,01		8	0,02	

Tab. 47. Vliv vlhkostního režimu na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *G. mellonella* 21. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Vlhkost/Mortalita (průměr±SD)	
		12,5%	6%
	kontrola	6,00±5,48	4,00±5,48
50	<i>S. feltiae</i>	76,00±11,40 ^{bB}	92,00±8,37 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	34,00±11,40 ^{aA}	38,00±17,89 ^{bA}
500	<i>S. feltiae</i>	100,00±0,00 ^{bA}	100,00±0,00 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	78,00±8,37 ^{aB}	92,00±8,37 ^{aA}

a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

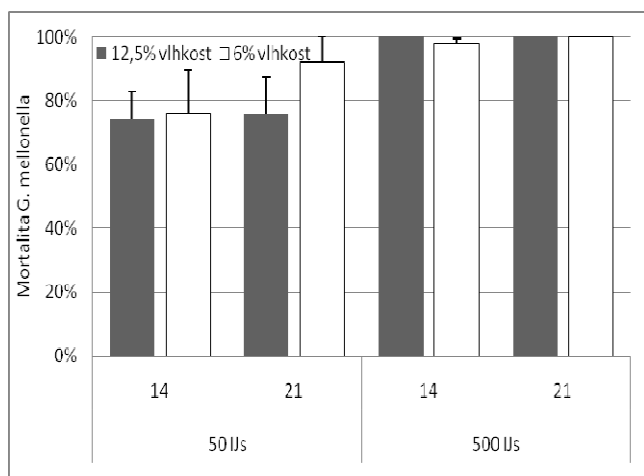
Tab. 48. Statistické hodnocení vlivu různých vlhkostí na účinnost hlístic vůči larvám *G. melonella* 21. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,37	6,22	-	-	-	1	0,01	0,21	1	0,32	6,00
Error	8	0,06		-	-		8	0,03		8	0,05	

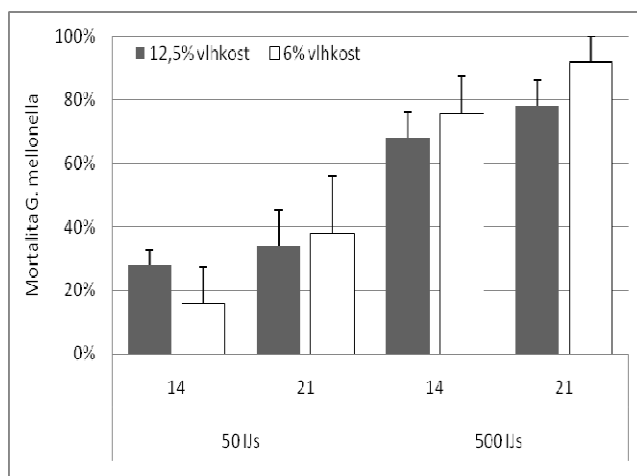
Obě hlístice prokázaly signifikantní snížení účinnosti v režimu s 6% vlhkostí po 7 dnech testu. Po 14 dnech, kdy byla vlhkost navýšena a zároveň došlo k navýšení i účinnosti u obou sledovaných druhů hlístovek. Mezi jednotlivými vlhkostními úrovněmi nebyly detekovány významné. Podíváme-li se na porovnání účinnosti mezi oběma druhy. *S. feltiae* dosáhla signifikantně vyšší účinnosti v porovnání se *S. carpocapsae*. 21. den testu došlo u obou druhů k navýšení účinnosti ve srovnání s mortalitami získanými v optimálních vlhkostních podmínkách. Tento rozdíl je statisticky detekovatelný u koncentrace 50 IJs *S. feltiae* a 500 IJs *S. carpocapsae*.

Graf 10. Porovnání účinnosti hlístic a) *S. feltiae* a b) *S. carpocapsae* na larvách *G. mellonella* v optimálních vlhkostních podmínkách (12,5%) a v podmínkách vlhkostního stresu (6%) po 7 dnech testu navýšena na optimum

a) *S. feltiae*



b) *S. carpocapsae*



S. feltiae i v režimu snížené vlhkosti zaznamenala 7. den testu 58% účinnost v porovnání se *S. carpocapsae*, jenž způsobila 24% mortalitu larev *G. mellonella*. 14. den byl rozdíl v účinnosti mezi *S. feltiae* a *S. carpocapsae* v obou testovaných koncentracích 60 a 22% respektive. 21. den byla zaznamenána ve variantě s 6% vlhkostí, dovlhčené po 7 dnech testu na úroveň 12,5%, vyšší mortalita larev, než ve variantě s udržovanpu optimální vlhkostí od počátku testu. U koncentrace 50 IJs *S. feltiae* byl rozdíl 16%, u *S. carpocapsae* 6%. U koncentrace 500 IJs *S. carpocapsae* se rozdíl pohyboval na úrovni 14%. *S. feltiae* dosáhla shodně v obou variantách 100% mortality.

Tab. 49. Vliv vlhkostního režimu na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *T. molitor* 7. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Vlhkost/Mortalita (průměr±SD)	
		12,5%	6%
	kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00
50	<i>S. feltiae</i>	12,00±13,04 ^{aA}	0,00±0,00 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	20,00±10,00 ^{aA}	0,00±0,00 ^{aB}
500	<i>S. feltiae</i>	70,00±14,14 ^{aA}	4,00±1,73 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	54,00±20,74 ^{aA}	4,00±5,48 ^{aB}

a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 50. Statistické hodnocení vlivu různých vlhkostí na účinnost hlístic vůči larvám *T. molitor* 7. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,04	4,21	1	1,40	69,82	1	0,10	19,55	1	0,75	21,65
Error	8			8			8	0,01		8	0,03	

Tab. 51. Vliv vlhkostního režimu na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *T. molitor* 14. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Vlhkost/Mortalita (průměr±SD)	
		12,5%	6%
	kontrola	2,00±4,47	2,00±4,47
50	<i>S. feltiae</i>	12,00±13,04 ^{bA}	2,00±4,47 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	38,00±16,43 ^{aA}	4,00±5,48 ^{aB}
500	<i>S. feltiae</i>	80,00±12,25 ^{aA}	40,00±17,32 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	62,00±22,80 ^{aA}	16,00±11,40 ^{bB}

a, b, c ..Průměry ve sloupci mezi jednotlivými druhy se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test; A, B, C ... Průměry mezi teplotními variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 52. Statistické hodnocení vlivu různých vlhkostí na účinnost hlístic vůči larvám *T. molitor* 14. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejner	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,03	2,63	1	0,70	17,44	1	0,31	18,90	1	0,72	13,52
Error	8	0,01		8	0,04		8	0,02		8	0,05	

Tab. 53. Vliv vlhkostního režimu na účinnost hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *T. molitor* 21. den testu

Koncentrace IJs/kontejner	Varianta	Vlhkost/Mortalita (průměr±SD)	
		12,5%	6%
	kontrola	2,00±4,47	4,00±5,48
50	<i>S. feltiae</i>	14,00±11,40 ^{bA}	8,00±13,04 ^{aA}
	<i>S. carpocapsae</i>	38,00±16,43 ^{aA}	6,00±5,48 ^{aB}
500	<i>S. feltiae</i>	88,00±8,37 ^{bA}	46,00±15,17 ^{aB}
	<i>S. carpocapsae</i>	62,00±22,80 ^{aA}	16,00±11,40 ^{bB}

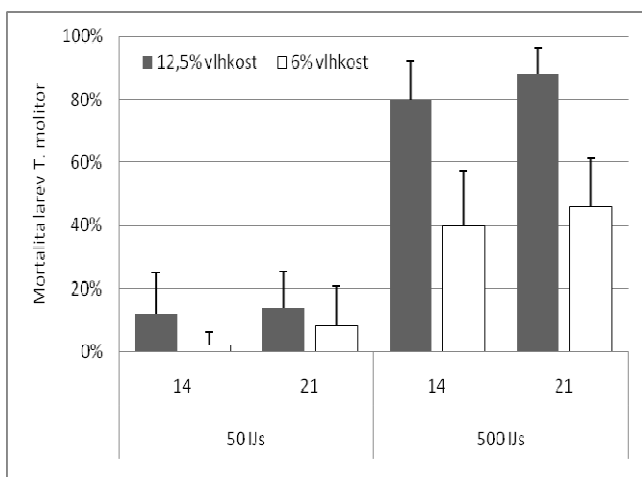
Tab. 54. Statistické hodnocení vlivu různých vlhkostí na účinnost hlístic vůči larvám *T. molitor* 21. den testu

Druh hlístice	<i>S. feltiae</i>						<i>S. carpocapsae</i>					
	50			500			50			500		
Koncentrace IJs/kontejne	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,01	0,59	1	1,05	20,67	1	0,28	16,83	1	0,72	13,52
Error	8	0,02		8			8	0,02		8	0,05	

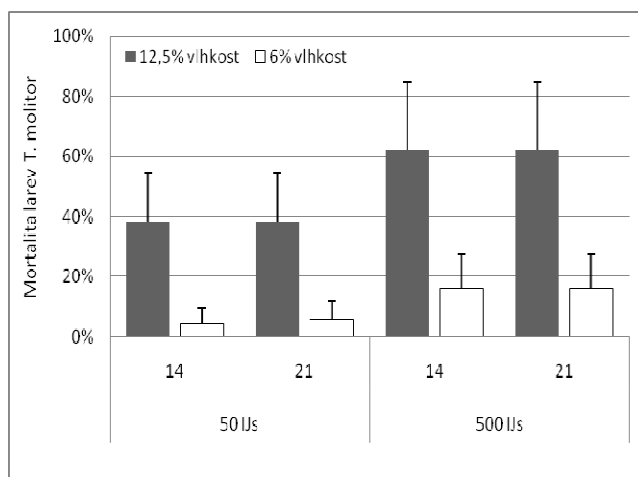
V testu porovnávající účinnost *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *T. molitor* ve dvou různých vlhkostních režimech zaznamenaly oba testované druhy shodně velmi nízkou účinnost u obou testovaných koncentrací. 14. den testu (7 dní po dovlhčení varianty s 6% vlhkostí substrátu), došlo k signifikantnímu navýšení účinnosti, a to jak u *S. feltiae* tak u *S. carpocapsae*, zvláště u koncentrace 500 IJs. Oba testované druhy nebyly však schopny dosáhnout po dovlhčení srovnatelné úrovně účinnosti ani na konci testu.

Graf 11. Porovnání účinnosti hlístic a) *S. feltiae* a b) *S. carpocapsae* na larvách *T. molitor* v optimálních vlhkostních podmínkách (12,5%) a v podmínkách vlhkostního stresu (6%) po 7 dnech testu navýšena na optimum

a) *S. feltiae*



b) *S. carpocapsae*



Hodnoty mortalit larev se po 7 dnech testu ve vlhkosti 6% pohybovaly 0-4% v závislosti na testované koncentraci infekčních larev u obou druhů hlístic. V porovnání s hodnotami získanými v optimálních vlhkostních podmínkách se mortalita larev pohybovala od 12-70%. 14. den testu se hodnoty mortalit larev navýšily po dovlhčení v režimu 6% na 40% v případě *S. feltiae*. Tato hodnota však dosahuje poloviny účinnosti ve srovnání s mortalitou získanou v optimálních podmínkách při té samé koncentraci aplikovaných infekčních larev. *S. carpocapsae* si po celou dobu testu i při nejvyšší testované koncentraci udržovala nízkou účinnost. Ve stresových vlhkostních poměrech a i při nejvyšší testované koncentraci dosáhla pouze 16% účinnosti v porovnání s 62% účinností zaznamenanou ve vlhkosti 12,5%.

5.5 Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub proti larvám *T. molitor*

5.5.1 Porovnání účinnosti *I. fumosorosea* a *B. bassiana* proti larvám *T. molitor*

Základní údaje k pokusu:

- pro pokusy byl využit postup popsáný viz kapitola 4.5.4
- příprava konidiové suspenze entomopatogenní houby *B. bassiana* nebo *I. fumosorosea* - titr $1,0 \times 10^3$; $1,0 \times 10^4$ $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^6$ spor/ml půdního substrátu (tedy $8,0 \times 10^2$, $8,0 \times 10^3$, $8,0 \times 10^4$ a $8,0 \times 10^5$ spor/ml suspenze).
- záměrná introdukce houby (5 ml konidiové suspenze odpovídajícího titru) pro zvlhčení substrátu; jako kontrola sloužila varianta ošetřená pouze destilovanou vodou.
- do každé jednotky bylo vloženo 10 larev *T. molitor*; bylo provedeno 5 opakování pro každou pokusnou variantu
- larvy byly v substrátu exponované po dobu 14 dní, kontrola byla prováděna 7. a 14. den testu.

Tab. 55. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hub proti larvám *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor po 7 dnech v teplotě 25°C

Titř (počet spor/ml suspenze)	Mortalita (průměr±SD%)	
	Varianta	7. den
$1,0 \times 10^3$	kontrola	0,00±0,00
	<i>I. fumosorosea</i>	4,00±5,48 ^a
	<i>B. bassiana</i>	4,00±5,48 ^a
$1,0 \times 10^4$	<i>I. fumosorosea</i>	10,00±14,14 ^a
	<i>B. bassiana</i>	6,00±8,94 ^a
$1,0 \times 10^5$	<i>I. fumosorosea</i>	24,00±20,74 ^a
	<i>B. bassiana</i>	4,00±5,48 ^b
$1,0 \times 10^6$	<i>I. fumosorosea</i>	68,00±8,37 ^a
	<i>B. bassiana</i>	28,00±14,83 ^b

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 56. Statistické hodnocení jednotlivých druhů entomopatogenních hub proti larvám *T. molitor* po 7denní expozici larev různých koncentrací spor v půdě v teplotě 25°C

Titř (počet spor/ml suspenze)	10^3			10^4			10^5			10^6		
	Df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,00	0,00	1	0,01	0,22	1	0,21	4,52	1	0,45	22,40
Error	8	0,01		8	0,40		8	0,05		8	0,02	

Tab. 57. Vývoj infekce jednotlivých druhů entomopatogenních hub na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor po 7 dnech v teplotě 25°C

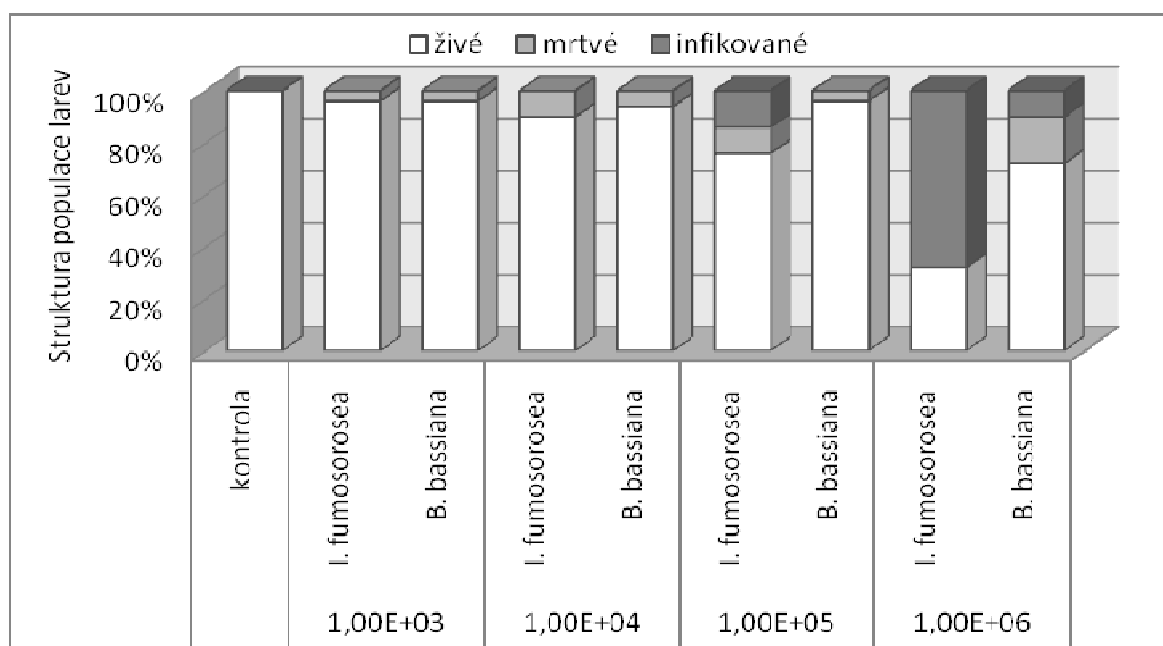
Titř (počet spor/ml suspenze)	FDI (průměr±SD%)	
	Varianta	7. den
1,0x10 ³	kontrola	0,02±0,03
	<i>I. fumosorosea</i>	0,14±0,07 ^a
	<i>B. bassiana</i>	0,17±0,03 ^a
1,0x10 ⁴	<i>I. fumosorosea</i>	0,32±0,15 ^a
	<i>B. bassiana</i>	0,39±0,12 ^a
1,0x10 ⁵	<i>I. fumosorosea</i>	0,67±0,18 ^a
	<i>B. bassiana</i>	0,39±0,07 ^b
1,0x10 ⁶	<i>I. fumosorosea</i>	1,46±0,15 ^a
	<i>B. bassiana</i>	0,69±0,13 ^b

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými hodnotami FDI ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$; Man-Whitney test)

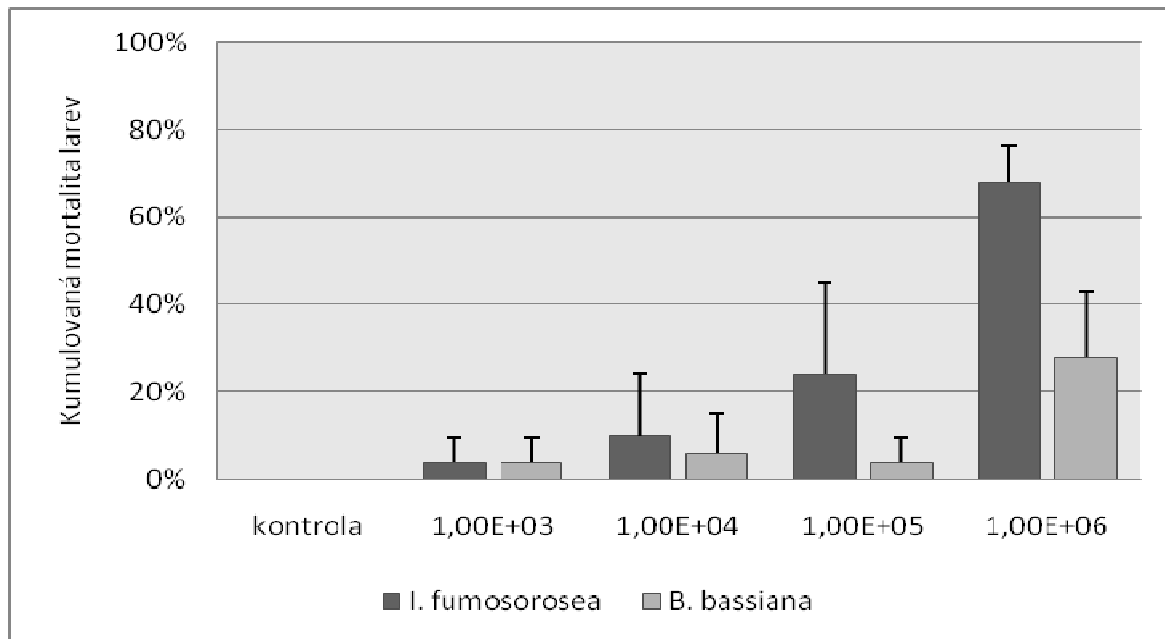
Tab. 58. Statistické hodnocení FDI jednotlivých druhů entomopatogenních hub po 7denní expozici larev různých koncentrací spor v půdě v teplotě 25°C

Titř (počet spor/ml suspenze)	Parametry		
	Valid N	U	2*1 Sided exact p
10 ³	5	6,50	0,22
10 ⁴	5	8,00	0,42
10 ⁵	5	0,00	0,00
10 ⁶	5	0,00	0,01

Graf 12. Porovnání vlivu různých koncentrací spor hub *I. fumosorosea* nebo *B. bassiana* na strukturu populace larev *T. molitor* po 7 dnech v teplotě 25°C



Graf 13. Porovnání vlivu různých koncentrací spor hub *I. fumosorosea* nebo *B. bassiana* na kumulovanou mortalitu larev *T. molitor* po 7 dnech v teplotě 25°C



Pomocí biotestu v půdním substrátu byl sledován vliv vybraných druhů hub *B. bassiana* a *I. fumosorosea* na mortalitu larev *T. molitor*. Po 7 denní expozici larev se účinnost obou druhů statisticky nelišila v nižších koncentracích. Naopak u koncentrací 10^5 a 10^6 se *I. fumosorosea* projevila jako účinnější. Tento rozdíl byl statisticky průkazný. Z hodnot sledující vývoj infekce (FDI) bylo patrné, že se indexy po 7 dnech u obou druhů v nižších koncentracích výrazně nelišily. Ve vyšších koncentracích byly však již detekovány rozdíly, např. u nejvyšší testované koncentrace ($1,0 \times 10^6$) se v populaci larev ošetřených *I. fumosorosea* objevovali mrtví jedinci s počátkem prorůstání mycelia. Na druhé straně u *B. bassiana* se u té samé koncentrace vyskytovali jedinci stále živí s detekovanými melanickými skvrnami na povrchu těla. Graf reprezentující strukturu populace ukazuje, že v převážné většině se v nižších koncentracích vyskytovali živí jedinci. V nejvyšší testované koncentraci lze již v populaci mrtvých larev zaznamenat kategorii larev s prorůstajícím myceliem, zvláště pak u *I. fumosorosea*, kde tato kategorie převládá. V souhrnném hodnocení vykázala vyšší účinnost houba *I. fumosorosea*, která v nejvyšší testované dávce spor dosáhla 68% mortality na rozdíl od *B. bassiana*, která zaznamenala pouze 28% mortalitu larev.

Tab. 59. Porovnání účinnosti jednotlivých druhů entomopatogenních hub proti larvám *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor po 14 dnech v teplotě 25°C

Titř (počet spor/ml suspenze)	Mortalita (průměr±SD%)	
	Varianta	14. den
1,0x10 ³	kontrola	10,00±7,07
	<i>I. fumosorosea</i>	56,00±16,73 ^a
	<i>B. bassiana</i>	24,00±11,40 ^b
1,0x10 ⁴	<i>I. fumosorosea</i>	86,00±14,00 ^a
	<i>B. bassiana</i>	72,00±16,43 ^a
1,0x10 ⁵	<i>I. fumosorosea</i>	98,00±2,00 ^a
	<i>B. bassiana</i>	88,00±8,37 ^a
1,0x10 ⁶	<i>I. fumosorosea</i>	100,00±0,00 ^a
	<i>B. bassiana</i>	96,00±4,00 ^a

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 60. Statistické hodnocení jednotlivých druhů entomopatogenních hub proti larvám *T. molitor* po 14 denní expozici larev různých koncentrací spor v půdě v teplotě 25°C

Titř (počet spor/ml suspenze)	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	Df	MS	F	df	MS	F	Df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,32	12,30	1	0,03	1,48	1	0,01	5,52	1	0,00	2,67
Error	8	0,03		8	0,19		8	0,00		8	0,00	

Tab. 61. Vývoj infekce jednotlivých druhů entomopatogenních hub na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor po 14 dnech v teplotě 25°C

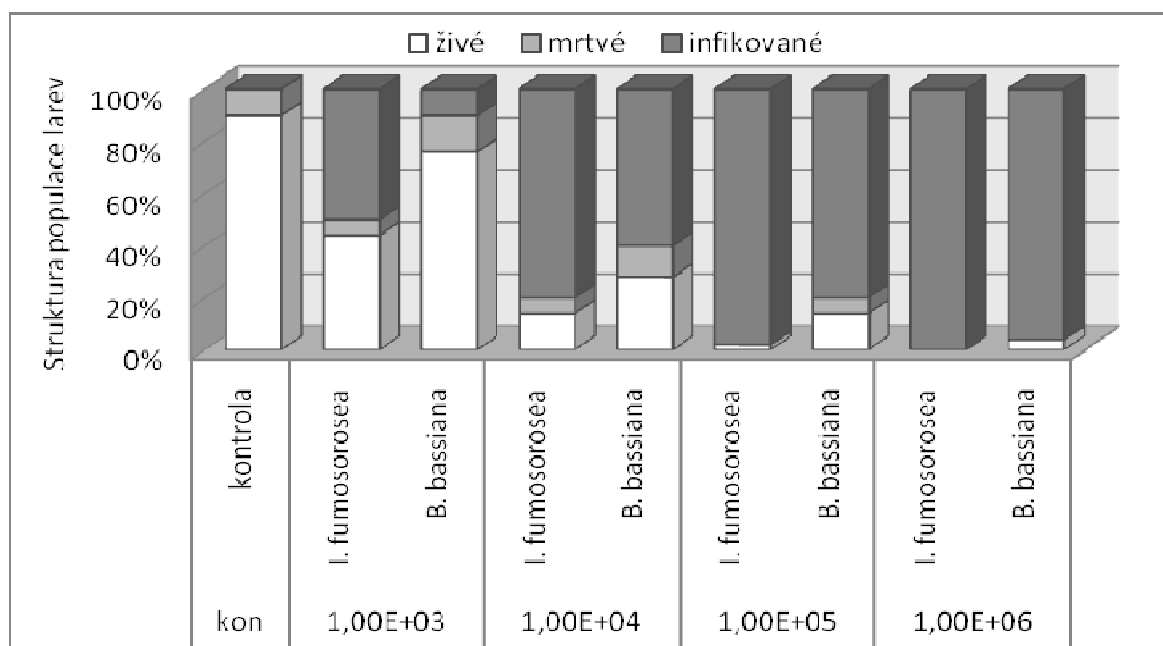
Titř (počet spor/ml suspenze)	FDI (průměr±SD%)	
	Varianta	14. den
1,0x10 ³	kontrola	0,11±0,07
	<i>I. fumosorosea</i>	1,43±0,35 ^a
	<i>B. bassiana</i>	0,65±0,19 ^b
1,0x10 ⁴	<i>I. fumosorosea</i>	2,24±0,66 ^a
	<i>B. bassiana</i>	1,65±0,48 ^b
1,0x10 ⁵	<i>I. fumosorosea</i>	2,81±0,16 ^a
	<i>B. bassiana</i>	2,27±0,18 ^b
1,0x10 ⁶	<i>I. fumosorosea</i>	3,00±0,00 ^a
	<i>B. bassiana</i>	2,88±0,17 ^b

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými hodnotami FDI ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$; Man-Whitney test)

Tab. 62. Statistické hodnocení FDI jednotlivých druhů entomopatogenních hub po 14denní expozici larev různých koncentrací spor v půdě v teplotě 25°C

Titr (počet spor/ml suspenze)	Parametry		
	Valid N	U	2*1 Sided exact p
10 ³	5	0,50	0,01
10 ⁴	5	2,50	0,04
10 ⁵	5	0,00	0,01
10 ⁶	5	0,00	0,01

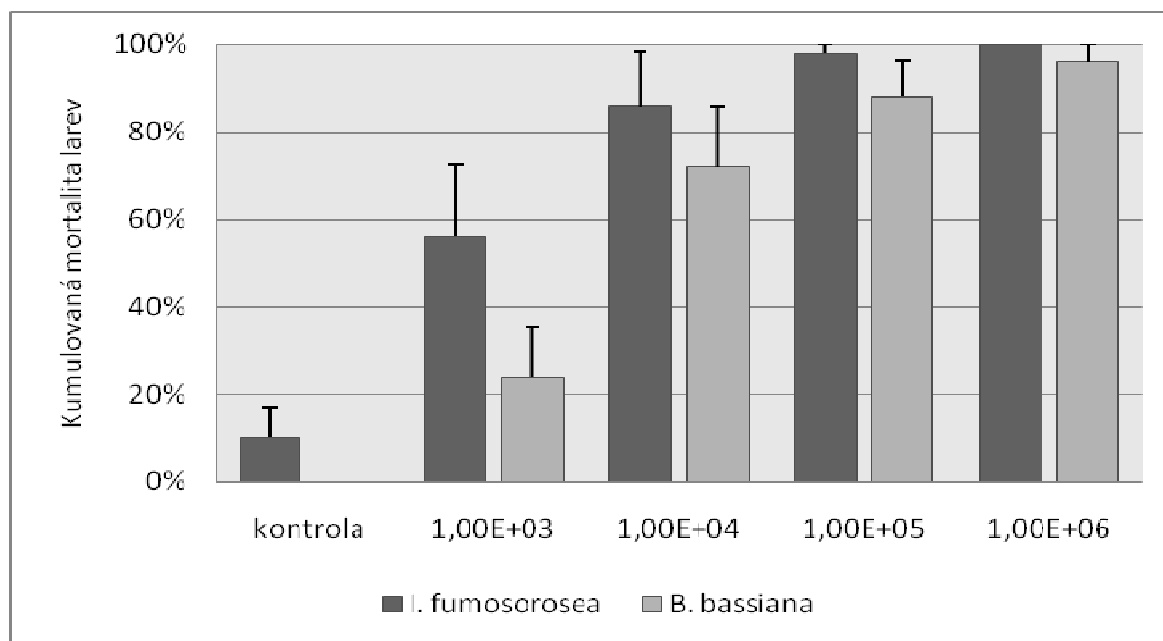
Graf 14. Porovnání vlivu různých koncentrací spor hub *I. fumosorosea* nebo *B. bassiana* na strukturu populace larev *T. molitor* po 14 dnech v teplotě 25°C



Po 14 dnech testu byla v kontrolní variantě zaznamenána 10% mortalita. Mezi oběma druhy hub nebyl detekován signifikantní rozdíl, pouze u nejnižší aplikované koncentrace spor (1×10^3). Co se týče indexu vývoje, byl ve všech testovaných koncentracích zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi oběma druhy hub. Jestliže se při koncentraci 1×10^4 v populaci larev ošetřených *B. bassiana* vyskytovaly larvy s počátečním růstem mycelia na povrchu (index 1,65), pak u *I. fumosorosea* bylo detekováno mycelium s prvními náznaky sporulace (index 2,24).

Z grafu prezentující strukturu populace je patrné, že ačkoliv se v nejnižší testované koncentraci vyskytovali ještě živí jedinci, od koncentrace 1×10^4 v populaci larev převažovaly larvy infikované (s viditelnými příznaky houbové infekce). Celkové hodnocení účinnosti ukazuje, že rozdíly, zvláště ve vyšších koncentracích jsou mezi oběma druhy jen nepatrné. Při koncentraci 1×10^6 byl rozdíl mezi *I. fumosorosea* a *B. bassiana* pouhých 4%.

Graf 15. Porovnání vlivu různých koncentrací spor hub *I. fumosorosea* nebo *B. bassiana* na kumulovanou mortalitu larev *T. molitor* po 14 dnech v teplotě 25°C



Tab. 63. Určení LD₅₀ pro jednotlivé druhy testovaných hub pro *T. molitor* při teplotě 25°C po 7 dnech

Druh houby	LD ₅₀ ±SD (spor/ml suspenze)	χ ²	df	p Model fitting
<i>I. fumosorosea</i>	3,95±1,62x10 ⁵	2,19	2	0,34
<i>B. bassiana</i>	6,63±0,74x10 ⁷	4,10	2	0,13

Tab. 64. Určení LD₅₀ pro jednotlivé druhy testovaných hub pro *T. molitor* při teplotě 25°C po 14 dnech

Druh houby	LD ₅₀ ±SD (spor/ml suspenze)	χ ²	df	p Model fitting
<i>I. fumosorosea</i>	7,15±0,37x10 ²	2,08	2	0,56
<i>B. bassiana</i>	4,14±1,43x10 ³	1,27	2	0,53

Z hodnot LD₅₀ vyplývá jednoznačně, že larvy *T. molitor* reagovaly na houbu *I. fumosorosea* mnohem citlivěji v porovnání s *B. bassiana*. Letální dávka je pro *I. fumosorosea* o dva a půl řádu nižší než pro *B. bassiana* po 7 dnech testu. Hodnoty LD₅₀ s postupujícím časem klesají a dávky potřebné pro usmrcení poloviny populace larev se snižují.

5.6 Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na vývoj infekce entomopatogenních hub na larvách *T. molitor*

Základní údaje k pokusu:

- pro pokusy byla využita stejný postup jako v pokusu 4.5.4.
- pro každou variantu bylo však provedeno 10 opakování, při čemž do poloviny kontejnerů od každé koncentrace bylo vloženo 10 larev *T. molitor* (neprekolonizovaná), polovina krabiček byla ponechána bez hostitele (prekolonizovaná); tj 5 krabiček s larvami a 5 krabiček bez larev
- larvy byly v substrátu exponovány po dobu 14 dní; kontrola byla prováděna 7. a 14. den testu; 7. den testu bylo do kontejnerů bez hostitele introdukováno 10 larev *T. molitor* a opět kultivovány 14. dní

5.6.1 Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na vývoj infekce houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor*

Tab. 65. Vliv prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor houby *B. bassiana* po 7 dnech v teplotě 25°C

Titř (počet spor/ml suspenze)	Mortalita (průměr±SD%)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	0,00±0,00	-
1,0x10 ³	4,00±5,48 ^{bB}	22,00±16,43 ^{bA}
1,0x10 ⁴	6,00±8,94 ^{bB}	42,00±8,37 ^{bA}
1,0x10 ⁵	4,00±5,48 ^{bB}	46,00±18,17 ^{abA}
1,0x10 ⁶	28,00±14,83 ^{abB}	78,00±21,88 ^{abA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 66. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor houby *B. bassiana* po 7 dnech v teplotě 25°C

Titř (počet spor/ml suspenze)	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,08	5,4	1	0,32	43,20	1	0,44	24,50	1	0,63	14,04
Error	8	0,02		8	0,01		8	0,02		8	0,04	

Tab. 67. Vývoj infekce *B. bassiana* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 7 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet spor/ml suspenze)	FDI (průměr±SD)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	0,02±0,03	-
1,0x10 ³	0,17±0,03 ^b	0,63±0,19 ^a
1,0x10 ⁴	0,39±0,12 ^b	1,00±0,14 ^a
1,0x10 ⁵	0,39±0,07 ^b	1,00±0,18 ^a
1,0x10 ⁶	0,69±0,13 ^b	1,56±0,31 ^a

a,b,c ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$; Man-Whitney test)

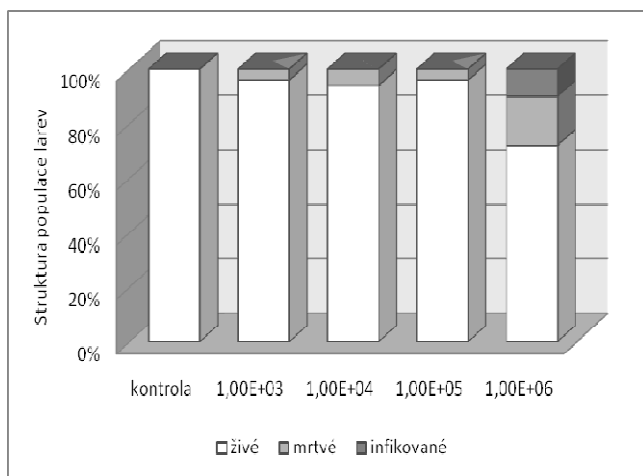
Tab. 68. Statistické hodnocení FDI *B. bassiana* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 7 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet spor/ml suspenze)	Parametry		
	Valid N	U	2*1 Sided exact p
10 ³	5	0,00	0,01
10 ⁴	5	0,00	0,01
10 ⁵	5	0,00	0,01
10 ⁶	5	0,00	0,01

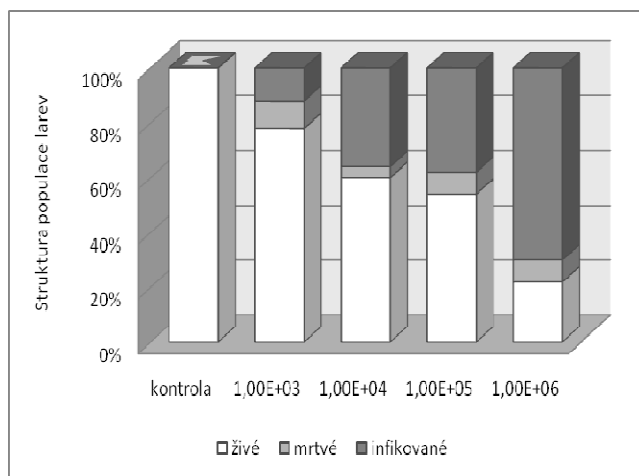
Při hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na účinnost houby *B. bassiana* vůči larvám *T. molitor* se obecně prokázal signifikantní vliv tohoto efektu u všech testovaných koncentrací. V souvislosti s účinností byl sledován i parametr FDI, na kterém je taktéž patrný vliv prekolonizace. Jestliže u koncentrací 1x10⁴ až 1x10⁶ se v neprekolonizované variantě vyskytovaly larvy živé pouze s metanizačními skvrnami (průměrný index vývoje 0,39-0,69), tak v prekolonizované variantě se u těch samých koncentrací vyskytovaly larvy mrtvé či s prvními známkami porůstání mycelia (průměrný index vývoje 1,00-1,56). Struktura populace v obou testovaných variantách zaznamenala taktéž patrné rozdíly. V neprekolonizovaných variantách koncentrací 1x10³ až 10⁵ se vyskytovaly v populacích z více než 90% živé larvy. Kategorie mrtvých larev byla zastoupena pouze larvami bez příznaků houbové infekce, naproti tomu v prekolonizované variantě se ve struktuře populace mrtvých jedinců vyskytovaly v převážné míře již larvy s příznaky houbové infekce. V grafu porovnávající celkově účinnost prekolonizovaných/neprekolonizovaných variant je patrný očividný rozdíl u všech testovaných koncentrací. Mortalita larev se po 7 dnech pohybovala u koncentrace 1x10³ na úrovni 22% v porovnání se 4% v neprekolonizované variantě. Stejně tak i u koncentrací 1x10⁴, 10⁵ a 10⁶ došlo k navýšení o 36, 42 a 50% respektive. Z tohoto trendu je patrný přímoúměrný nárůst účinnosti s navyšující se koncentrací spor aplikovaných do půdy.

Graf 16. Struktura populace larev *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor houby *B. bassiana* po 7 dnech ve variantě a) neprekolonizované, b) prekolonizované v teplotě 25°C

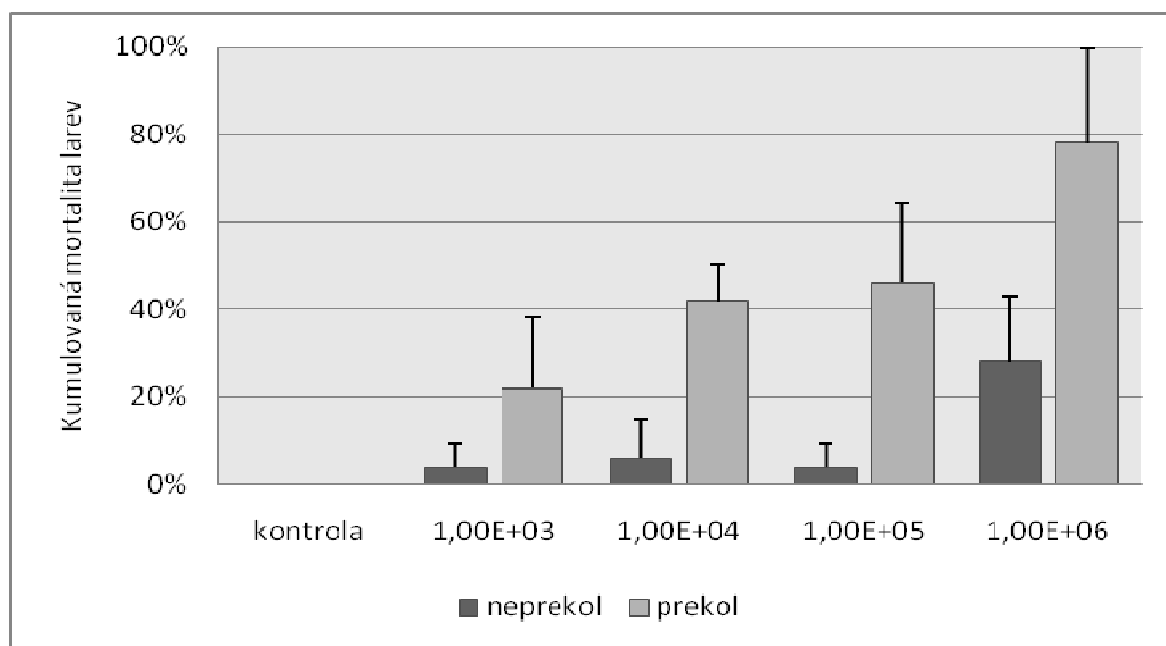
a) neprekolonizovaná



b) prekolonizovaná



Graf 17. Kumulovaná mortalita v populaci larev *T. molitor* po ošetření různých koncentrací spor houby *B. bassiana* ve variantě neprekolonizované a prekolonizované po 7 dnech v teplotě 25°C



Tab. 69. Vliv prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor houby *B. bassiana* po 14 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet spor/ml suspenze)	Mortalita (průměr±SD%)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	10,00±7,07	-
1,0x10 ³	24,00±11,40 ^{bB}	78,00±13,04 ^{bA}
1,0x10 ⁴	72,00±16,43 ^{abB}	100,00±0,00 ^{aA}
1,0x10 ⁵	88,00±8,37 ^{abA}	96,00±4,00 ^{aA}
1,0x10 ⁶	96,00±4,00 ^{aA}	100,00±0,00 ^{aA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 70. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor houby *B. bassiana* po 14 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet spor/ml suspenze)	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,73	48,60	1	0,20	14,52	1	0,02	3,20	1	0,00	2,67
Error	8	0,02		8	0,01		8	0,01		8	0,00	

Tab. 71. Vývoj infekce *B. bassiana* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 14 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet spor/ml suspenze)	FDI (průměr±SD)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	0,11±0,07	-
1,0x10 ³	0,65±0,19 ^a	2,39±0,38 ^b
1,0x10 ⁴	1,65±0,48 ^a	2,77±0,15 ^b
1,0x10 ⁵	2,27±0,18 ^a	2,84±0,22 ^b
1,0x10 ⁶	2,88±0,17 ^a	3,00±0,00 ^a

a,b,c ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$; Man-Whitney test)

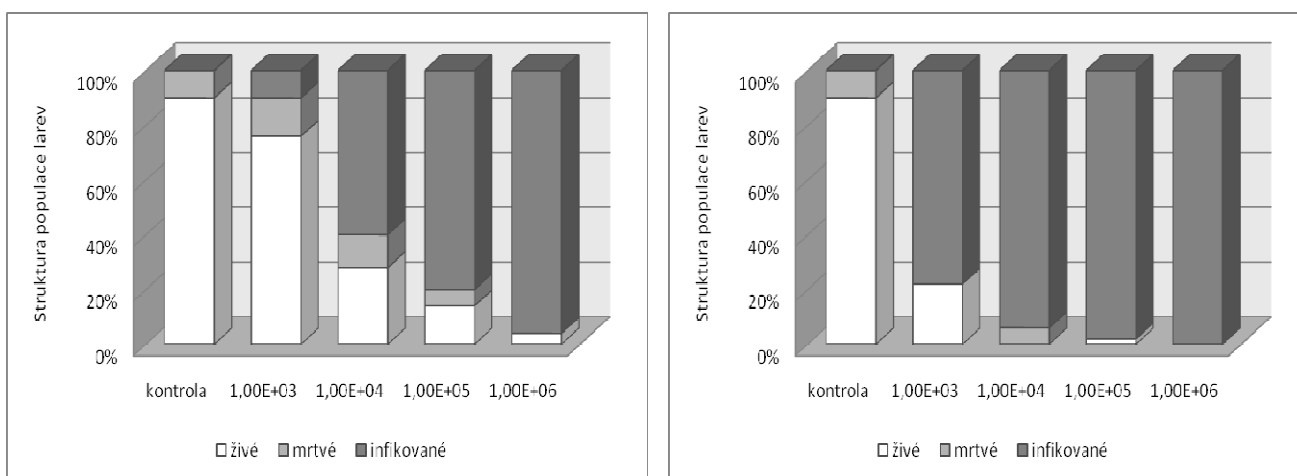
Tab. 72. Statistické hodnocení FDI *B. bassiana* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 14 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet spor/ml suspenze)	Parametry		
	Valid N	U	2*1 Sided exact p
10 ³	5	0,00	0,01
10 ⁴	5	0,00	0,01
10 ⁵	5	0,00	0,01
10 ⁶	5	7,50	0,31

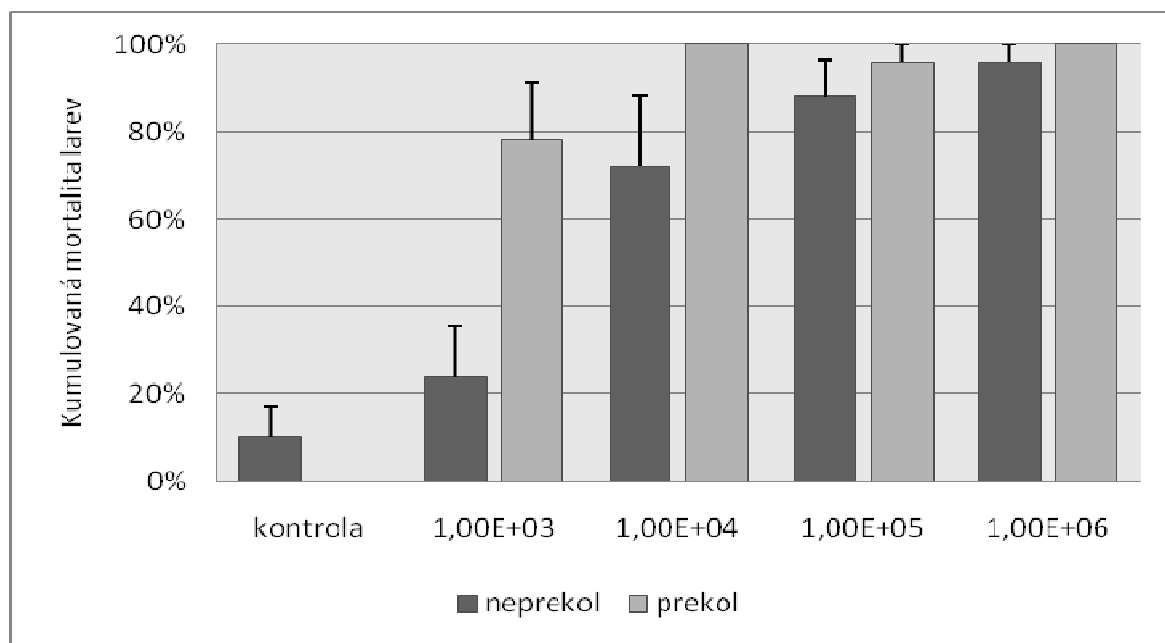
Graf 18. Struktura populace larev *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor houby *B. bassiana* po 14 dnech ve variantě a) neprekolonizované, b) prekolonizované

a) neprekolonizovaná

b) prekolonizovaná



Graf 19. Kumulovaná mortalita v populaci larev *T. molitor* po ošetření různých koncentrací spor houby *B. bassiana* ve variantě neprekolonizované a prekolonizované po 14 dnech



Po 14 dnech trend navýšení účinnosti houby *B. bassiana* v prekolonizovaných variantách u jednotlivých koncentrací v porovnání s neprekolonizovanými postupně zanikal. Signifikantní rozdíl byl detekován pouze u nižších koncentrací (10^3 a 10^4) u vyšších koncentrací (10^5 a 10^6) se mortalita larev pohybovala od 88 do 100%. Také u FDI byl zaznamenán výrazný rozdíl mezi variantami. U prekolonizovaných variant se průměrný index vývoje pohyboval v rozmezí od 2,39-3,00, kdežto v neprekolonizované variantě od 0,65-2,88. Struktura populace ukazuje, jak se podílely na mortalitě kategorie mrtvých a infikovaných larev. Z grafů je patrné, že v neprekolonizovaných variantách se na mortalitě z větší míry podílí kategorie infikovaných larev, stále je však v populacích patrný výskyt larev bez aparentních příznaků infekce. Naproti tomu v prekolonizovaných variantách se na mortalitě podílel z více než 90% jedinci již

infikovaní. Kumulovaná mortalita u jednotlivých koncentrací ukázala, že v prekolonizovaných variantách se účinnost shodně pohybovala na hranici 100% nezávisle na množství aplikovaných spor do půdy, kdežto v neprekolonizované variantě se mortalita larev pohybovala v širokém rozmezí mezi 24 a 96%.

5.6.2 Hodnocení vlivu prekolonizace půdního substrátu na vývoj infekce houby *I. fumosorosea* na larvách *T. molitor*

Tab. 73. Vliv prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor houby *I. fumosorosea* po 7 dnech v teplotě 25°C

Varianta	Mortalita (průměr±SD%)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	0,00±0,00	-
1,0x10 ³	4,00±5,48 ^{cB}	62,00±17,89 ^{abA}
1,0x10 ⁴	10,00±14,14 ^{bcB}	58,00±8,37 ^{bA}
1,0x10 ⁵	24,00±20,74 ^{bB}	76,00±5,48 ^{abA}
1,0x10 ⁶	68,00±8,37 ^{aA}	80,00±10,00 ^{aA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 74. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor houby *I. fumosorosea* po 7 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace spor/ml půdy	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	1,31	75,90	1	0,92	32,31	1	0,79	19,12	1	0,02	4,27
Error	8	0,02		8	0,03		8	0,04		8	0,01	

Tab. 75. Vývoj infekce *I. fumosorosea* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 7 dnech v teplotě 25°C

Varianta	FDI (průměr±SD)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	0,02±0,03	-
1,0x10 ³	0,14±0,07 ^b	1,36±0,37 ^a
1,0x10 ⁴	0,32±0,15 ^b	1,45±0,21 ^a
1,0x10 ⁵	0,67±0,18 ^b	1,89±0,26 ^a
1,0x10 ⁶	1,46±0,15 ^b	2,07±0,20 ^a

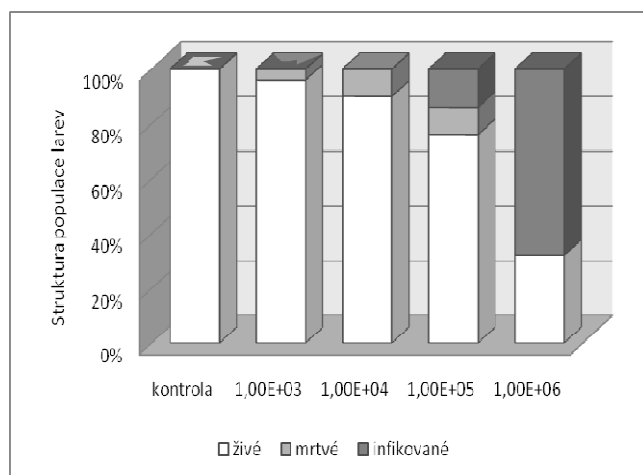
a,b,c ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$; Man-Whitney test)

Tab. 76. Statistické hodnocení FDI *I. fumosorosea* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 7 dnech v teplotě 25°C

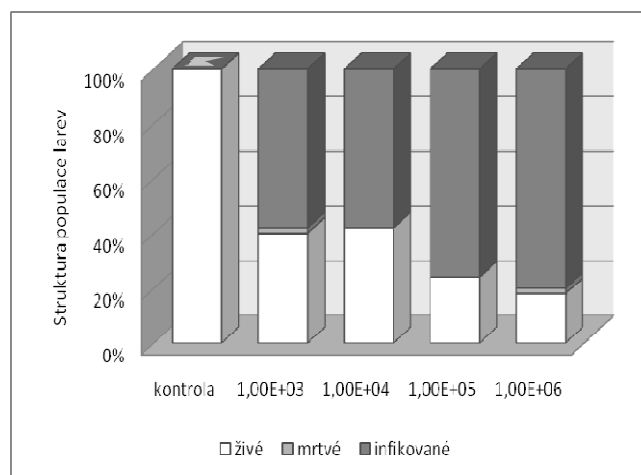
Koncentrace spor/ml půdy	Parametry		
	Valid N	U	2*1 Sided exact p
10 ³	5	0,00	0,01
10 ⁴	5	0,00	0,01
10 ⁵	5	0,00	0,01
10 ⁶	5	7,50	0,31

Graf 20. Struktura populace larev *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor houby *I. fumosorosea* po 7 dnech ve variantě a) neprekolonizovaná, b) prekolonizovaná

a) neprekolonizovaná



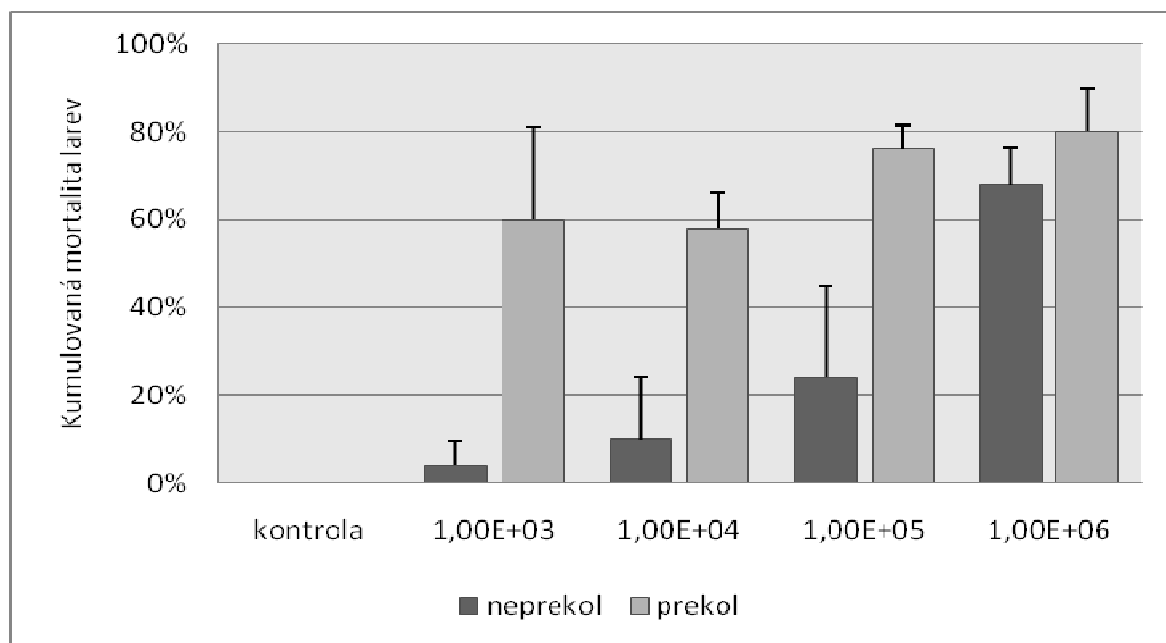
b) prekolonizovaná



Po 7 dnech testu zaznamenala *I. fumosorosea* výrazně pozitivní nárůst v účinnosti v prekolonizovaných pokusech v porovnání s neprekolonizovanými. Statisticky signifikantní rozdíly byly detekovány u koncentrací 10³, 10⁴ a 10⁵. U nejvyšší testované koncentrace se mortalita statisticky nelišila po 7 dnech testu. U nejnižší testované koncentrace (10³) neprekolonizované variantě byly detekovány 4% mrtvých larev s průměrným indexem vývoje 0,14. U té samé koncentrace ovšem v prekolonizované variantě bylo mrtvých larev 62% a průměrný index odpovídal hodnotě 1,36. Celkově lze říci, že u neprekolonizovaných variant odpovídal FDI výskytu larev živých s melanizačními skvrnami až po mrtvé s počátkem tvorby vzdušného mycelia v porovnání s larvami v prekolonizovaných variantách, u kterých se vyskytovaly pouze larvy mrtvé s počátkem tvorby mycelia a zvláště larvy již porostlé. Struktura larev ukazuje, že nejen že v neprekolonizované variantě převažují ve větší míře jedinci živí, ale také to, že se na mortalitě podílí jedinci bez viditelných příznaků houbové infekce. V prekolonizované variantě se podílí na mortalitě z více než 95% larvy infikované.

V celkovém hodnocení lze říci, že k *I. fumosorosea* reagovala na prekolonizaci rapidním nárůstem účinnosti a v prekolonizovaných variantách u jednotlivých koncentrací došlo k navýšení o 58, 48, 42 a 20%.

Graf 21. Kumulovaná mortalita v populaci larev *T. molitor* po ošetření různých koncentrací spor houby *I. fumosorosea* ve variantě neprekolonizované a prekolonizované po 7 dnech



Tab. 77. Vliv prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor pŕdy houby *I. fumosorosea* po 14 dnech v teplotě 25°C

Varianta	Mortalita (průměr±SD%)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	10,00±7,07	-
1,0x10 ³	56,00±16,73 ^{bB}	100,00±0,00 ^{aA}
1,0x10 ⁴	86,00±14,00 ^{aA}	100,00±0,00 ^{aA}
1,0x10 ⁵	98,00±2,00 ^{aA}	100,00±0,00 ^{aA}
1,0x10 ⁶	100,00±0,00 ^{aA}	100,00±0,00 ^{aA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/neprekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 72. Statistické hodnocení vlivu prekolonizace na mortalitu larev *T. molitor* v závislosti na aplikaci různých koncentrací spor houby *I. fumosorosea* po 14 dnech v teplotě 25°C

Koncentrace spor/ml pŕdy	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	1	0,32	22,47	1	0,03	2,55	1	0,00	1,00	-	-	-
Error	8	0,01		8	0,01		8	0,00		-	-	

Tab. 78. Vývoj infekce *I. fumosorosea* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 14 dnech v teplotě 25°C

Varianta	FDI (průměr±SD)	
	neprekolonizovaná	prekolonizovaná
kontrola	0,11±0,07	-
1,0x10 ³	1,43±0,35 ^b	2,92±0,08 ^a
1,0x10 ⁴	2,24±0,66 ^b	2,92±0,10 ^a
1,0x10 ⁵	2,81±0,16 ^a	2,98±0,03 ^a
1,0x10 ⁶	3,00±0,00 ^a	2,99±0,02 ^a

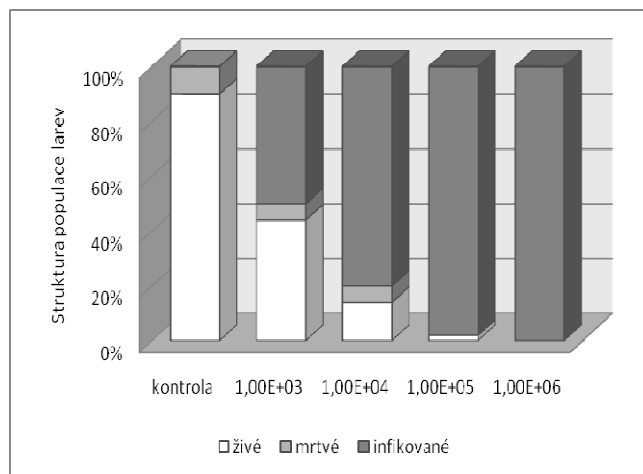
a,b,c ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$; Man-Whitney test)

Tab. 79. Statistické hodnocení FDI *B. bassiana* na larvách *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor v režimu prekolonizace po 14 dnech v teplotě 25°C

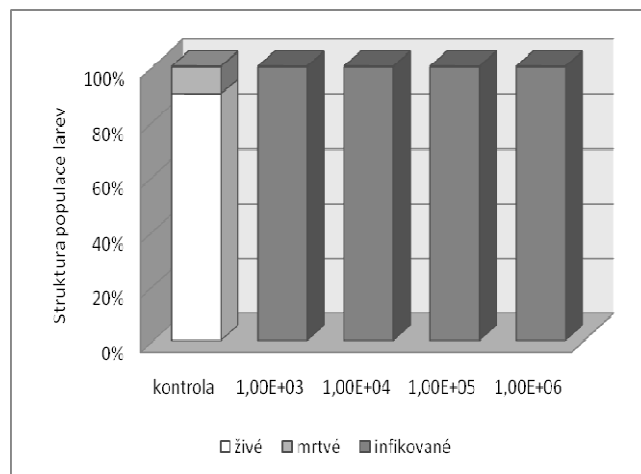
Koncentrace spor/ml půdy	Parametry		
	Valid N	U	2*1 Sided exact p
10 ³	5	0,00	0,01
10 ⁴	5	1,50	0,02
10 ⁵	5	6,00	0,22
10 ⁶	5	10,00	0,69

Graf 22. Struktura populace larev *T. molitor* po aplikaci různých koncentrací spor houby *I. fumosorosea* po 14 dnech ve variantě a) neprekolonizované, b) prekolonizované

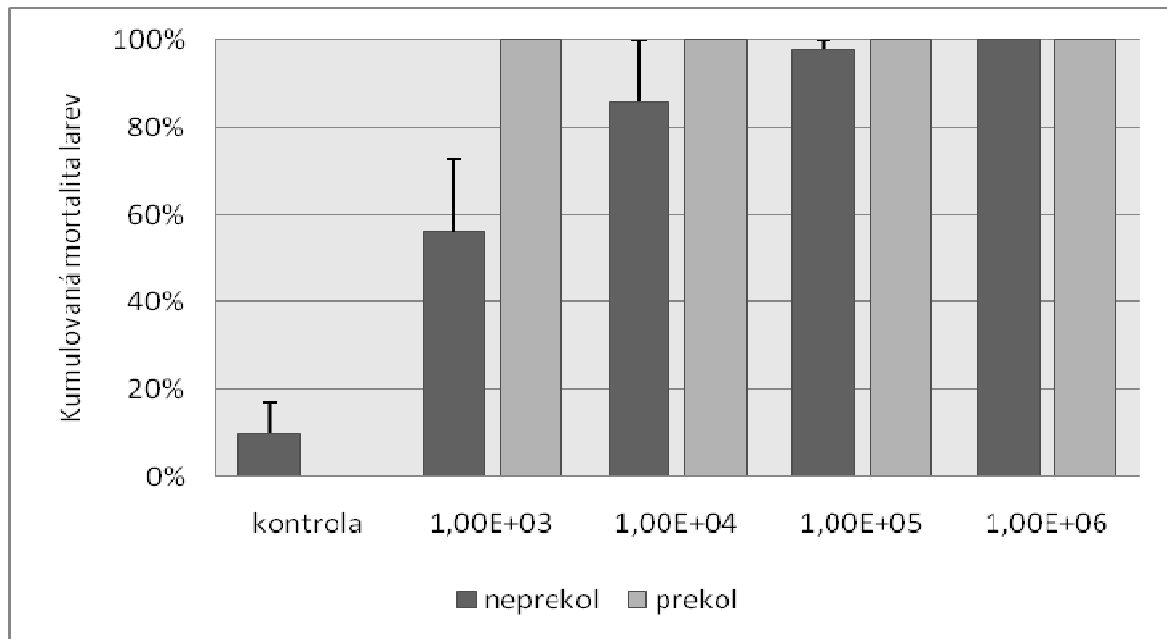
a) neprekolonizovaná



b) prekolonizovaná



Graf 23. Kumulovaná mortalita v populaci larev *T. molitor* po ošetření různých koncentrací spor houby *I. fumosorosea* ve variantě neprekolonizované a prekolonizované po 14 dnech



Po 14 dnech testu byly rozdíly v účinnosti mezi oběma variantami minimální a statisticky signifikantní jen u koncentrace 10^3 . Taktéž FDI dosáhl v prekolonizovaných variantách vysokých hodnot indikujících převahu larev infikovaných s plně sporulujícím myceliem (průměrný index vývoje 2,92-2,99), na rozdíl od neprekolonizované varianty kde se hodnoty pohybovaly v širokém rozmezí 1,43-3,00. Z hodnotami FDI úzce souvisí i struktura populace, ze které je patrné, že v prekolonizované variantě se ve všech sledovaných koncentracích vyskytovali pouze jedinci s viditelnými příznaky infekce. U neprekolonizované varianty se na mortalitě do určité míry podílely i mrtvé larvy bez příznaků. Mortalita larev v neprekolonizovaných variantách se pohybovala od 56-100% v závislosti na koncentraci. Významným zjištěním bylo, že mortalita larev v prekolonizovaných variantách dosáhla hodnoty 100% bez rozdílu na aplikované koncentraci spor.

5.7 Hodnocení vlivu přítomnosti hmyzího hostitele na schopnost entomopatogenních hub namnožit se v půdním substrátu

Základní údaje k pokusu:

- K pokusu 4.5.4. byla ke každé koncentraci připravena krabička s inokulovaným půdním substrátem navíc; z každého kontejneru (pro každou koncentraci/s larvou i bez) byl odebrán vzorek půdy o objemu 20 ml; odběr vzorků byl realizován 1., 7. a 14. den testu
- vzorek byl nasypán do Erlenmayerovy baňky a zalit 100 ml 0,05% TW 80; baňky byly pak třepány cca 20 minut; získaný půdní výluh byl filtrován přes gázu a z takto připravené suspenze byl odebrán 1 ml suspenze a ten dále ředěn 1:10 podle vstupní koncentrace inokula v půdě
- 0,5 ml suspenze bylo rozetřeno na misky s kultivačním médiem a přísadkou Syllit; pro každou koncentraci byly provedeny 3 opakování;
- misky byly nadále kultivovány při 25°C v klimaboxech; po 7-10 dnech byl počítán počet kolonií na miskách

Tab. 80. Počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *B. bassiana* v přítomnosti hmyzího hostitele nebo se 7 denní prekolonizací bez hostitele po 7 dnech v teplotě 25°C

Titř (počet konidií/ml suspenze)	CFU/ml půdy 1 den po aplikaci (průměr±SD)	CFU/ ml půdy (průměr±SD)	
		prekolonizovaná	neprekolonizovaná
kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1x10 ³	6,67±5,77x10 ^{2bcA}	3,50±0,61x10 ^{3cA}	3,43±0,15x10 ^{3dA}
1x10 ⁴	4,67±2,89x10 ^{3abB}	1,24±0,19x10 ^{5cdA}	2,10±0,11x10 ^{5cA}
1x10 ⁵	5,33±0,58x10 ^{4bA}	1,50±0,24x10 ^{5abA}	7,27±0,59x10 ^{5bA}
1x10 ⁶	6,00±1,00x10 ^{5aC}	1,53±0,15x10 ^{6aB}	2,23±0,16x10 ^{6aA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/neprekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 81. Statistické hodnocení vlivu přítomnosti hmyzího hostitele na počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *B. bassiana* po 7 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet konidií/ml suspenze)	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	2	2,36	2,36	2	2,56	118,13	2	1,53	5,13	2	0,30	97,90
Error	6	1,00		6	0,02		6	0,30		6	0,00	

Tab. 82. Počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *B. bassiana* v přítomnosti hmyzího hostitele nebo se 7 denní prekolonizací bez hostitele po 14 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet konidií/ml suspenze)	CFU/ml půdy 1 den po aplikaci (průměr±SD)	CFU/ ml půdy (průměr±SD)		
		prekolonizovaná (bez hostitele)	prekolonizovaná (s hostitelem)	neprekolonizovaná
kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1x10 ³	6,67±5,77x10 ^{2bcB}	2,14±0,26x10 ^{5dA}	2,50±0,17x10 ^{5cA}	2,73±0,35x10 ^{5bA}
1x10 ⁴	4,67±2,89x10 ^{3abB}	6,20±0,33x10 ^{5cA}	6,27±1,17x10 ^{5bA}	5,13±0,50x10 ^{5abA}
1x10 ⁵	5,33±0,58x10 ^{4aB}	9,91±0,18x10 ^{5bB}	2,83±0,47x10 ^{6aA}	9,67±5,03x10 ^{5aB}
1x10 ⁶	6,00±1,00x10 ^{5aA}	1,83±0,41x10 ^{6aA}	2,00±1,00x10 ^{6aA}	5,67±3,51x10 ^{5abB}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/neprekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 83. Statistické hodnocení vlivu přítomnosti hmyzího hostitele na počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *B. bassiana* po 14 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet konidií/ml suspenze)	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	3	2,60	139,20	3	0,15	60,30	3	0,21	12,98	3	0,28	6,26
Error	8	0,00		8			8	0,02		8	0,05	

Při sledování vlivu prekolonizace na schopnost houby *B. bassiana* namnožit se v půdním substrátu testu bylo zjištěno, že pouze u nejvyšší testované koncentrace (10⁶) byl detekován rozdíl mezi počtem kolonií z půdního výluhu prekolonizované a neprekolonizované varianty. V tomto případě byl počet kolonií v prekolonizované variantě (1,53x10⁶) signifikantně nižší než v neprekolonizované (2,23x10⁶). Zaměříme-li se na porovnání hodnot CFU získaných 1 den po aplikaci s prekolonizovanou/neprekolonizovanou variantou, můžeme zaznamenat rozdíl u koncentrací 10⁴ a 10⁶, kde se počet získaných kolonií od počátku testu signifikantně zvýšil. Ze získaných hodnot lze obecně říci, že hodnoty CFU se po 7 dnech inkubace navýšily v porovnání

s výluhem 1. den po aplikaci a že u neprekolonizovaných variant byly hodnoty CFU vyšší, než-li hodnoty u prekolonizovaných, ačkoliv nebylo možno tyto rozdíly statisticky prokázat.

Po 14 dnech testu došlo k signifikantnímu nárůstu počtu CFU u všech koncentrací v porovnání s počty získanými po 1 dní po aplikaci spor do půdy, zvláště u koncentrace 10^3 , kde došlo k navýšení až o dva a půl až tři řády v závislosti na variantě. U vyšších koncentrací se tento trend navýšení prokázal také, ale ne v takové míře. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými variantami byly detekovány u koncentrací 10^5 a 10^6 , u kterých byl zjištěn nižší počet CFU v neprekolonizovaných pokusech.

Tab. 84. Počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *I. fumosorosea* v přítomnosti hmyzího hostitele nebo se 7 denní prekolonizací bez hostitele po 7 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet konidií/ml suspenze)	CFU/ml půdy 1 den po aplikaci (průměr±SD)	CFU/ ml půdy 7 dní po aplikaci (průměr±SD)	
		prekolonizovaná	neprekolonizovaná
kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1×10^3	$6,67 \pm 5,57 \times 10^{2bB}$	$5,28 \pm 0,52 \times 10^{4cA}$	$3,01 \pm 0,31 \times 10^{4dAB}$
1×10^4	$3,67 \pm 0,57 \times 10^{3aC}$	$3,54 \pm 0,27 \times 10^{5bA}$	$1,59 \pm 0,15 \times 10^{5cB}$
1×10^5	$6,33 \pm 1,27 \times 10^{5aAB}$	$5,13 \pm 1,62 \times 10^{5bB}$	$1,04 \pm 0,13 \times 10^{6bA}$
1×10^6	$2,03 \pm 0,06 \times 10^{6aA}$	$2,03 \pm 0,30 \times 10^{6aA}$	$2,43 \pm 0,36 \times 10^{6aA}$

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/neprekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 85. Statistické hodnocení vlivu přítomnosti hmyzího hostitele na počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *I. fumosorosea* po 7 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet konidií/ml suspenze)	10^3			10^4			10^5			10^6		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	2	7,33	6,06	2	3,38	125,88	2	0,08	7,68	2	0,01	2,10
Error	6	1,21		6	0,00		6	0,01		6	0,00	

Tab. 86. Počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *I. fumosorosea* v přítomnosti hmyzího hostitele nebo se 7 denní prekolonizací bez hostitele po 14 dnech v teplotě 25°C.

Titr (počet konidií/ml suspenze)	CFU/ml půdy 1 den po aplikaci (průměr±SD)	CFU/ ml půdy (průměr±SD)		
		prekolonizovaná (bez hostitele)	prekolonizovaná (s hostitelem)	neprekolonizovaná
kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1x10 ³	6,67±5,57x10 ^{2bB}	9,47±0,86x10 ^{5bA}	1,22±0,10x10 ^{6cA}	8,80±0,85x10 ^{5bA}
1x10 ⁴	3,67±0,57x10 ^{3C}	2,40±0,20x10 ^{6aA}	1,08±0,15x10 ^{6bB}	1,36±0,13x10 ^{6bB}
1x10 ⁵	6,33±1,27x10 ^{5aB}	2,57±0,41x10 ^{6aA}	1,20±0,44x10 ^{6bAB}	1,93±1,10x10 ^{6bA}
1x10 ⁶	2,03±0,06x10 ^{6aB}	2,45±0,17x10 ^{6aAB}	2,50±0,52x10 ^{6aAB}	2,80±0,00x10 ^{6aA}

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými koncentracemi suspenzí ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test); A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/neprekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 87. Statistické hodnocení vlivu přítomnosti hmyzího hostitele na počet CFU získaných z půdního substrátu po aplikaci různých koncentrací spor *I. fumosorosea* po 14 dnech v teplotě 25°C

Titr (počet konidií/ml suspenze)	10 ³			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	3	12,62	13,89	3	1,85	106,30	3	0,21	9,74	3	0,01	3,70
Error	8	0,91		8			8	0,02		8	0,00	

Počet CFU získaných z půdního substrátu 7 dní po aplikaci různých koncentrací spor *I. fumosorosea* se v neprekolonizované variantě pohyboval v rozmezí od 3,01x10⁴ do 2,43x10⁶, u prekolonizované varianty od 5,28x10⁴ do 2,03x10⁶. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými variantami byly detekovány u všech testovaných koncentrací kromě koncentrace 10⁶. Také u *I. fumosorosea* byl zjištěn vyšší počet CFU u nižších koncentrací v porovnání s vyššími. Řádově se hodnoty pohybovaly až na úrovni dvojnásobného nárůstu u koncentrací 10³ a 10⁴, na druhé straně poloviční či žádný v případě koncentrací 10⁵ a 10⁶.

Výsledky hodnot po 14 dnech potvrzují trend zvyšujících se hodnot CFU. U koncentrace 10³ se v porovnání s hodnotou získanou z 1 dne po aplikaci suspenze do substrátu zvýšil počet jednotek/ml půdy až o dva a půl řádu. Toto zvýšení bylo statisticky prokazatelné, ovšem rozdíly mezi jednotlivými variantami zůstaly statisticky neprůkazné.

5.8 Studium interakcí mezi entomopatogenními hlístitkami a houbami

Základní údaje k pokusu:

- pro pokusy byl využit postup popsán viz kapitola 4.5.6.
- příprava konidiové suspenze entomopatogenní houby *B. bassiana* nebo *I. fumosorosea* - titr $1,0 \times 10^3$ spor/ml půdního substrátu; záměrná introdukce houby (5 ml konidiové suspenze) spolu se suspenzí hlístit odpovídající koncentraci 50 IJs/kontejner;
- pro každou variantu bylo provedeno 10 opakování; do poloviny kontejnerů od každé koncentrace bylo vloženo 10 larev *T. molitor* (neprekolonizovaná), polovina krabiček byla ponechána bez hostitele (prekolonizovaná)
- larvy byly v substrátu exponovány po dobu 14 dní; kontrola byla prováděna 7. a 14. den testu; 7. den testu bylo do kontejnerů bez hostitele introdukováno 10 larev *T. molitor* a opět kultivovány 14. dní
- pro model s opožděnou aplikací byl zvolen 2 denní odstup mezi aplikacemi obou bioagens; do substrátu byla aplikována suspenze hub dva dny před introdukcí hlístitky.

5.8.1 Vliv prekolonizace půdního substrátu na interakce mezi *B. bassiana* a *S. carpocapsae*

Tab. 88. Hodnocení vlivu společné aplikace spor *B. bassiana* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech simultánním (sim), o 2 dny opožděném (delay) a prekolonizovaném (prekol) po 7 dnech v teplotě 25°C

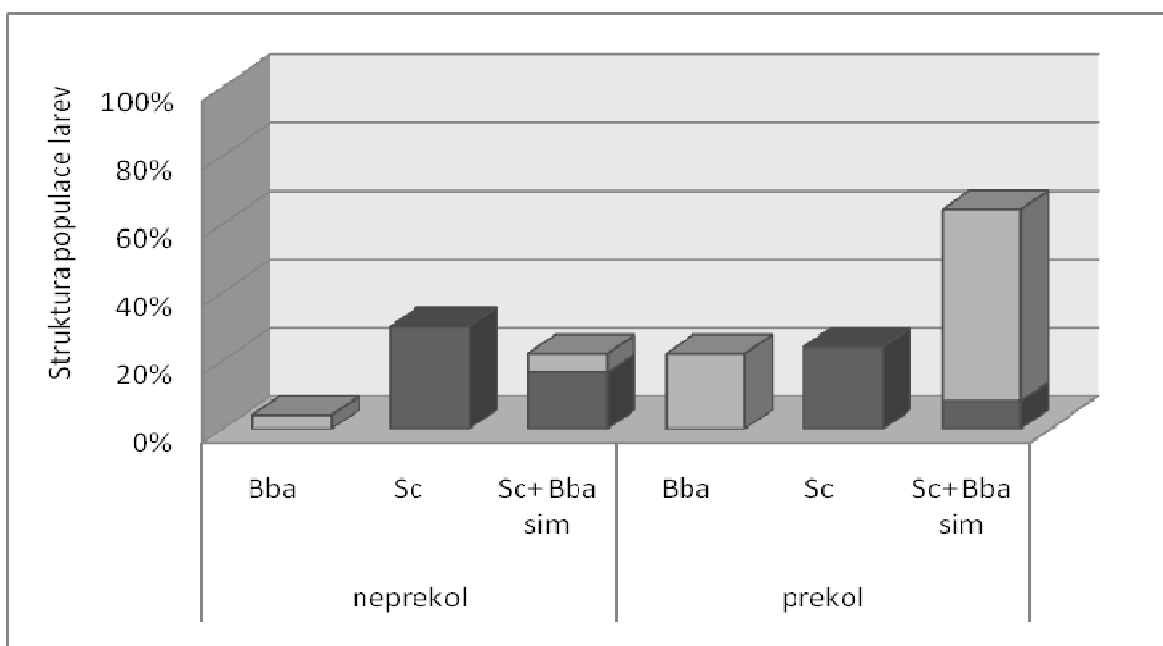
Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
	7. den
kontrola	0,00±0,00
<i>B. bassiana</i>	4,00±5,48 ^b
<i>S. carpocapsae</i>	30,00±10,00 ^b
<i>B. bassiana</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim	22,00±4,20 ^b
<i>B. bassiana</i> + <i>S. carpocapsae</i> delay	18,00±20,2 ^b
<i>B. bassiana</i> prekol	22,00±16,43 ^b
<i>S. carpocapsae</i> prekol	24,00±19,21 ^b
<i>B. bassiana</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim prekol	64,00±14,93 ^a

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými variantami ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 89. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace spor *B. bassiana* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech

den testu	7.		
	df	MS	F
Intercept	6	0,21	9,24
Error	28	0,02	

Graf 24. Struktura populace *T. molitor* ve vybraných modelech po aplikaci *B. bassiana* a *S. carpocapsae* po 7 dnech



Bba...*B. bassiana*, Sc...*S. carpocapsae*, Sc+Bba sim... *B. bassiana* + *S. carpocapsae* simultánně, neprekol...neprekolonizovaná varianta, prekol...prekoloizovaná varinata

Ze zjištěných hodnot po aplikaci *B. bassiana* v kombinaci se *S. carpocapsae* vyplývá, že mortalita larev se po 7 dnech pohybovala v rozpětí od 4-64% v závislosti na variantě. Mezi jednotlivými variantami byly detekovány statistické rozdíly ($p < 0,05$). Signifikantně nejvyšší účinnosti dosáhla prekoloizovaná simultánně aplikovaná varianta v porovnání se samostatnými aplikacemi jednotlivých agens. Účinnost se ve společném prostředí navýšila o více než 40%.

V neprekoloizovaných variantách se projevila účinnější samostatná aplikace *S. carpocapsae* v porovnání se simultánní či opožděnou, i když tento jev nebyl statisticky významný.

Pro demonstraci struktury populace *T. molitor* po aplikaci *B. bassiana* a *S. carpocapsae* a porovnání podílu zastoupení jednotlivých agens na infekci larev byl záměrně vyloučen model s opožděnou aplikací hlístice, neboť se hodnoty i zastoupení jednotlivých agens na mortalitě téměř shodují s aplikací simultánní. V grafech jsou demonstrovány prekoloizované a neprekoloizované modely, neboť lze na těchto modelech detailněji pozorovat vliv prekoloizace na konkurenceschopnost hlístice ve společném prostředí s houbou. Ze struktury populace larev po 7 dnech testu je patrné, že se hlístice podílela na celkové mortalitě larev vyšším procentem (74%) naopak *B. bassiana* se podílela na mortalitě larev ze zbylých 26%. V prekoloizované variantě byl tlak hubové infekce mnohem vyšší, takže se *S. carpocapsae* prosadila pouze z necelých 13% a 87% zbylých larev bylo infikováno houbou.

Tab. 90. Hodnocení vlivu společné aplikace spor *B. bassiana* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech simultánním (sim), o 2 dny opožděném (delay) a prekolonizovaném (prekol) po 14 dnech v teplotě 25°C

Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
	14. den
kontrola	10,00±10,54
<i>B. bassiana</i>	24,00±11,40 ^c
<i>S. carpocapsae</i>	34,00±11,40 ^c
<i>B. bassiana</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim	52,00±14,22 ^{bc}
<i>B. bassiana</i> + <i>S. carpocapsae</i> delay	40,00±14,93 ^c
<i>B. bassiana</i> prekol	78,00±13,04 ^b
<i>S. carpocapsae</i> prekol	30,00±12,74 ^c
<i>B. bassiana</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim prekol	100,00±0,00 ^a

a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými variantami ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

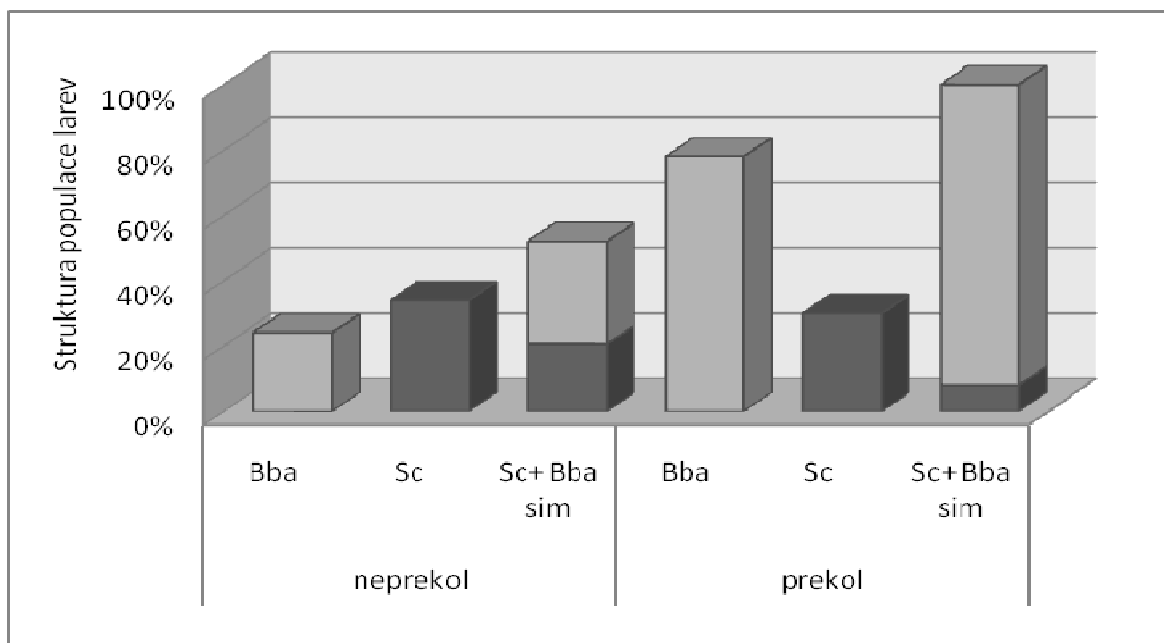
Tab. 91. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace spor *B. bassiana* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech

den testu	14.		
	df	MS	F
Intercept	6	1,12	21,07
Error	28	0,05	

Po 14 dnech dosáhla 100% mortality larev *T. molitor* simultánní aplikace obou biagens v prekolonizované variantě. Druhou nejúčinnější variantou byla samostatná aplikace *B. bassiana* v prekolonizovaném modelu, u které byla zaznamenána 78% mortalita larev. Taktéž vyšší účinnosti dosáhly kombinace v neprekolonizovaném modelu (40 a 52%) v porovnání se samostatnými aplikacemi jednotlivých agens (24 a 34%).

Srovnáme-li účinnost v prekolonizovaných variantách, účinnosti kombinace prekolonizované/neprekolonizované varianty, rozdíl v účinnosti se pohyboval na hranici 50% ve prospěch prekolonizovaných variant.

Graf 25. Struktura populace *T. molitor* ve vybraných modelech po aplikaci *B. bassiana* a *S. carpocapsae* po 14 dnech



Bba...*B. bassiana*, Sc...*S. carpocapsae*, Sc+Bba sim... *B. bassiana* + *S. carpocapsae* simultánně, neprekol...neprekolonizovaná varianta, prekol...prekoloizovaná varinata

Po 14 dnech se situace u neprekolonizovaného modelu změnila ve prospěch houby. *B. bassiana*. Ta se podílela na infekci ze 60%, kdežto hlístice ze 40%. Podíl infekce hlísticí *S. carpocapsae* byla viditelně potlačena ve společném prostředí s *B. bassiana* i v neprekolonizované variantě. Ve srovnání se samostatnou aplikací činil rozdíl 13%.

U prekolizované varianty přetrvává trend převahy houbové infekce v populaci larev *T. molitor*. *S. carpocapsae* se podílí na mortalitě larev pouze z 8%. Z hodnot je patrný vliv navýšení celkové účinnosti v porovnání se samostatnou aplikací houby do prostředí.

5.8.2 Vliv prekolonizace půdního substrátu na interakce mezi *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae*

Tab. 92. Hodnocení vlivu společné aplikace spor *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech simultánním (sim), o 2 dny opožděném (delay) a prekolizovaném (prekol) po 7 dnech v teplotě 25°C

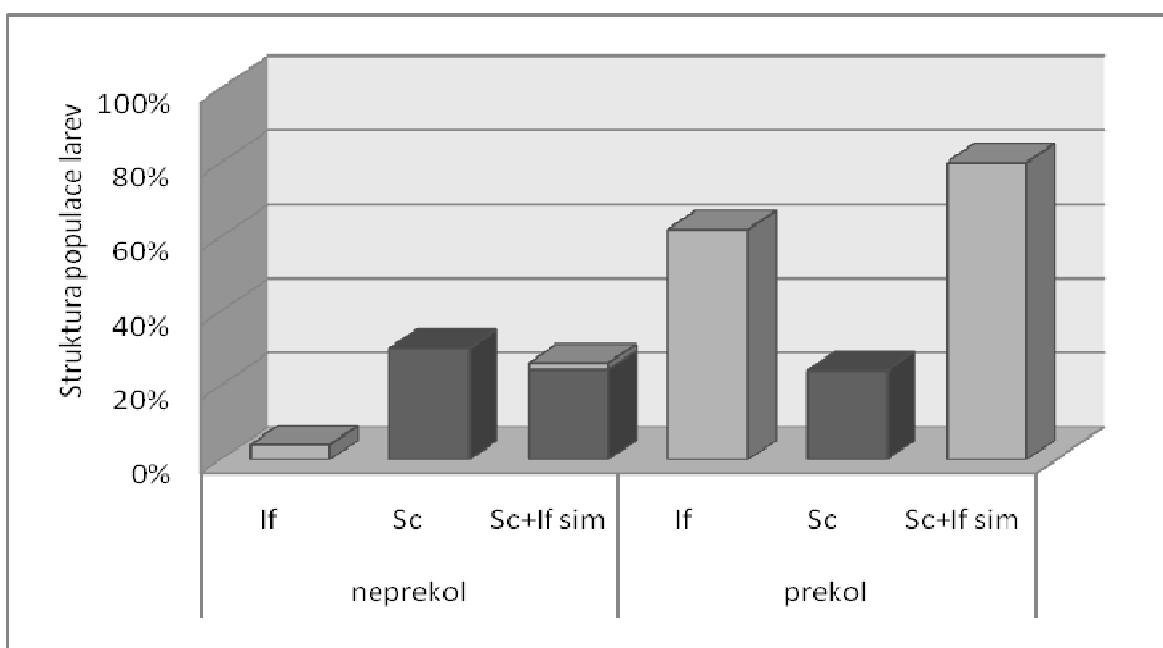
Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
	7. den
kontrola	0,00±0,00
<i>I. fumosorosea</i>	4,00±5,48 ^b
<i>S. carpocapsae</i>	30,00±10,00 ^b
<i>I. fumosorosea</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim	26,00±11,40 ^b
<i>I. fumosorosea</i> + <i>S. carpocapsae</i> delay	26,00±26,00 ^b
<i>I. fumosorosea</i> prekol	62,00±17,89 ^a
<i>S. carpocapsae</i> prekol	24,00±23,02 ^b
<i>I. fumosorosea</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim prekol	80,00±7,07 ^a

Tab. 93. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace spor *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech

den	7.		
	df	MS	F
Intercept	6	0,48	16,93
Error	28	0,03	

Po 7 denní expozici larev *T. molitor* společnému působení houby *I. fumosorosea* a hlístice *S. carpocapsae* v různých časových modelech byly zaznamenány statistické rozdíly. Nejnižší mortalita byla zaznamenána v neprekolonizované variantě ošetřené suspenzí *I. fumosorosea* (4%). Naopak nejvyšší mortality larev *T. molitor* dosáhla varianta simultánní aplikace obou bioagens v profylaktické variantě, u které se hodnota vyšplhala na úroveň 80% a předčila tak samostatné aplikace jednotlivých agens. Druhou nejúčinnější variantou byla samostatná aplikace *I. fumosorosea* v prekolonizované variantě. Simultánní a o dva dny opožděný model dosáhly shodně hranice 26%, což bylo o 4% méně, než když byla *S. carpocapsae* použita v samostatné aplikaci.

Graf 26. Struktura populace *T. molitor* ve vybraných modelech po aplikaci *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* po 7 dnech



If...*I. fumosorosea*, Sc...*S. carpocapsae*, Sc+If sim... *I. fumosorosea* + *S. carpocapsae* simultánně, neprekol...neprekolonizovaná varianta, prekol...prekolonizovaná varianta

Z grafu je patrný vliv prekolonizace na schopnost hlístice prosadit se v silně konkurenčním prostředí namožené houby. Jestliže podíl hlístice na celkové mortalitě larev v neprekolonizované variantě je více než 90%, tak u prekolonizované varianty se hlístice nepodílí vůbec.

Tab. 94. Hodnocení vlivu společné aplikace spor *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech simultánním (sim), o 2 dny opožděném (delay) a prekolonizovaném (prekol) po 14 dnech v teplotě 25°C

Varianta	Mortalita (průměr±SD%)
	14. den
kontrola	10,00±12,36
<i>I. fumosorosea</i>	56,00±16,73 ^b
<i>S. carpocapsae</i>	34,00±10,00 ^b
<i>I. fumosorosea</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim	54,00±16,08 ^b
<i>I. fumosorosea</i> + <i>S. carpocapsae</i> delay	56,00±5,48 ^b
<i>I. fumosorosea</i> prekol	100,00±0,00 ^a
<i>S. carpocapsae</i> prekol	30,00±27,39 ^b
<i>I. fumosorosea</i> + <i>S. carpocapsae</i> sim prekol	100,00±0,00 ^a

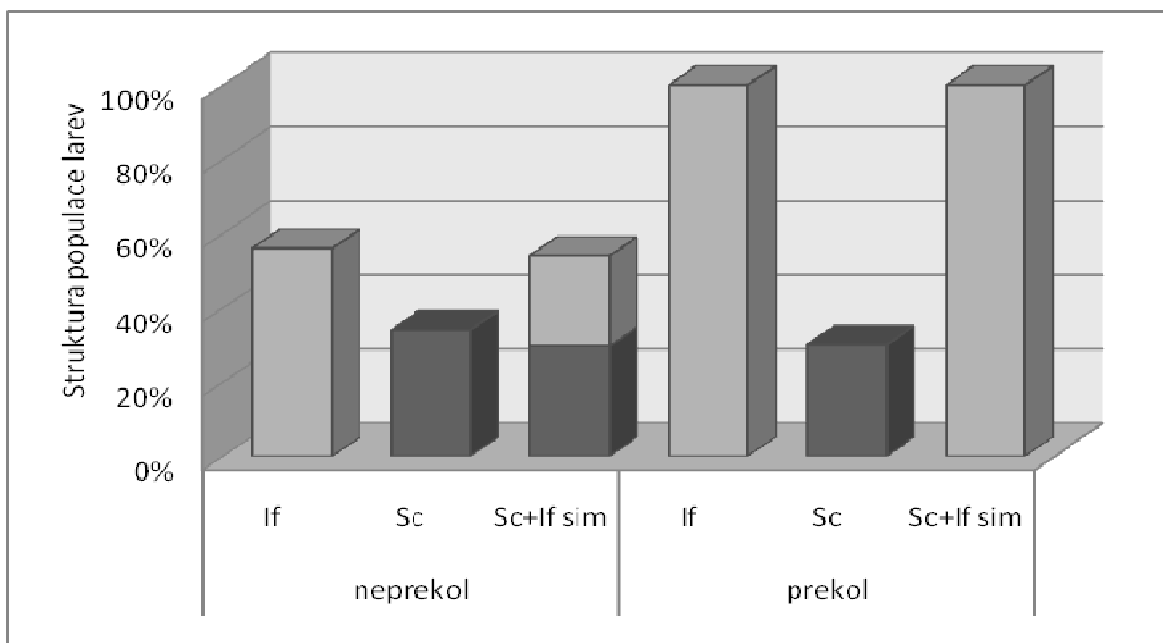
a,b,c ... Průměry mezi jednotlivými variantami ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 95. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace spor *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových modelech

den	14.		
	df	MS	F
Intercept	6	1,55	42,34
Error	28	0,04	

V hodnocení po 14 dnech bylo dosaženo 100% účinnosti u prekolonizovaných variant samotné *I. fumosorosea* a simultánní aplikace. O 44-46% nižší mortalita larev byla zaznamenána ve variantách neprekolonizovaných (*I. fumosorosea*, simultánní a delay). Signifikantně nejnižších hodnot dosáhla samostatná aplikace *S. carpocapsae* a to jak v prekolonizované tak neprekolonizované variantě.

Graf 27. Struktura populace *T. molitor* ve vybraných modelech po aplikaci *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* po 14 dnech



If...*I. fumosorosea*, Sc...*S. carpocapsae*, Sc+If sim... *I. fumosorosea* + *S. carpocapsae* simultánně, neprekol...neprekolonizovaná varianta, prekol...prekoloizovaná varinata

Ze struktury populace po 14 dnech je patrné, že v neprekolonizované variantě se v podíl hub na mortalitě larev zvýšil ze 7% na 45%. Hlístice se podílely na infekci ze zbývajících 55%. Lze říci, že si *S. carpocapsae* udržuje simultánní aplikaci stabilní podíl infekce v porovnání se samostatnou aplikací a konkurenční prostředí s houbou jej nijak výrazně neomezuje. U prekolonizované varianty přetrvával trend absolutní převahy houby na podílu infekce v populaci larev *T. molitor*.

Tab. 96. Efekt společné aplikace houby *B. bassiana* nebo *I. fumosorosea* v kombinaci se *S. carpocapsae* v jednotlivých časových modelech po 7 dnech v teplotě 25°C

Houba/ <i>S. carpocapsae</i>	Časový model ^a	Zjištěná mortalita ^b	Očekávaná mortalita ^c	χ^2	Interakce ^d
<i>B. bassiana</i>	sim	0,22	0,33	0,43	antagonistická
<i>I. fumosorosea</i>	sim	0,26	0,33	0,31	antagonistická
<i>B. bassiana</i>	delay	0,18	0,30	0,38	antagonistická
<i>I. fumosorosea</i>	delay	0,26	0,29	0,74	antagonistická
<i>B. bassiana</i>	prekol	0,64	0,38	5,05	aditivní
<i>I. fumosorosea</i>	prekol	0,80	0,71	0,30	aditivní

Tab. 97. Efekt společné aplikace houby *B. bassiana* nebo *I. fumosorosea* v kombinaci se *S. carpocapsae* v jednotlivých časových modelech po 14 dnech v teplotě 25°C

Houba/ <i>S. carpocapsae</i>	Časový model ^a	Zjištěná mortalita ^b	Očekávaná mortalita ^c	χ^2	Interakce ^d
<i>B. bassiana</i>	sim	0,52	0,50	0,68	aditivní
<i>I. fumosorosea</i>	sim	0,54	0,71	0,66	anatagonistická
<i>B. bassiana</i>	delay	0,40	0,48	0,34	antagonistická
<i>I. fumosorosea</i>	delay	0,56	0,70	0,16	aditivní
<i>B. bassiana</i>	prekol	1,00	0,87	0,11	aditivní
<i>I. fumosorosea</i>	prekol	1,00	1,00	-	-

^a Časový model a) sim=simultánní; b) delay=opožděný; c) prekol=prekolonizovaný

^b Zjištěná průměrná mortalita larev *T. molitor* (%)

^c Očekávaná mortalita $M_E = M_N + M_F(1-M_N)$, kde M_N a M_M jsou zjištěné mortality larev *T. molitor* vyvolané samostatnou aplikací houby/hlístice

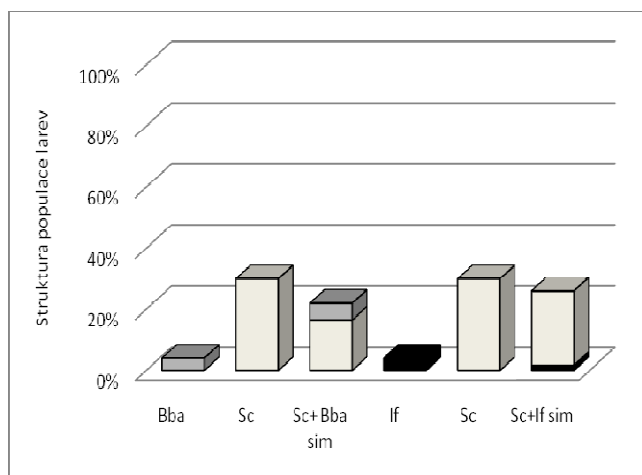
^d Interakce zjištěná na základě χ^2 analýzy

Z tabulky hodnotící interakce mezi jednotlivými agens je patrné, že převažujícím vztahem mezi testovanými druhy entomopataogenních hub a hlístic *S. carpocapsae* je v prvních fázích testu antagonismus. Výjimku tvoří pouze modely s prekolonizací, kde lze statisticky prokazatelně potvrdit aditivní efekt použité kombinace hub a hlístice.

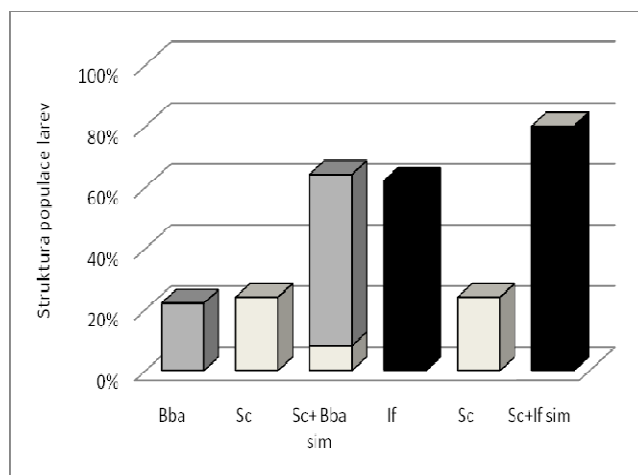
Po 14 dnech byly potvrzeny kromě *B. bassiana* delay a *I. fumosorosea* sim aditivní účinky. U prekolonizovaných modelů lze konstatovat, že kombinace zaznamenaly aditivní efekt. U *I. fumosorosea* nemohl být efekt určen díky shodně dosaženým výsledkům v očekávaných a naměřených hodnotách.

Graf 28. Porovnání účinností a zastoupení jednotlivých entmopatogenních agens v populaci larev *T. molitor* po společné aplikaci hlístice a *B. bassiana* nebo *I. fumosorosea* a) v neprekolonizovaném nebo b) prekolonizovaném prostředí po 7 dnech testu

a) neprekolonizovaná

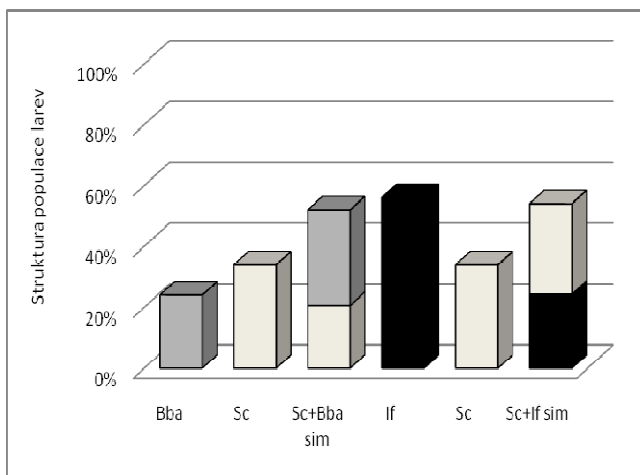


b) prekolonizovaná

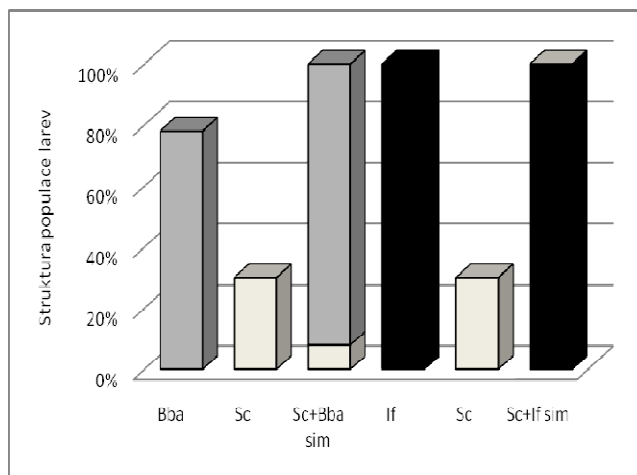


Graf 29. Porovnání účinností a zastoupení jednotlivých entmopatogenních agens v populaci larev *T. molitor* po společné aplikaci hlístice a *B. bassiana* nebo *I. fumosorosea* a) v nerekolonizovaném nebo b) prekolonizovaném prostředí po 14 dnech testu

a) neprekolonizovaná



b) prekolonizovaná



Struktura populace v kurativní variantě po ošetření kombinace houb/hlístice vykazovala v obou případech (*B. bassiana* a *I. fumosorosea*) po 7 dnech vysoké zastoupení infekce hlístic. Mortalita larev způsobená *S. carpocapsae* byla v simultánní aplikaci s *I. fumosorosea* srovnatelná s hodnotami v samostatné aplikaci hlístovky. V kombinaci s *B. bassiana* však došlo k potlačení nejen celkové účinnosti, ale také podílu hlístice na infekci. V prekolonizované variantě simultánních aplikací došlo k potlačení infekce hlístic na naprosté minimum. V případě kombinace s *B. bassiana* se hlístice prosadila pouze z 8% v kombinaci s *I. fumosorosea* se neprosadila vůbec. Naopak z pohledu houbového patogena došlo u obou druhů jak v prekolonizované, tak neprekolonizované variantě k jistému navýšení účinnosti v porovnání se samostatnými aplikacemi jednotlivých hub. Zvláště v případě prekolonizované varianty *B. bassiana* navýšila svou účinnost o 34%. U *I. fumosorosea* došlo k navýšení o 18%.

Po 14 dnech se podíl jednotlivých patogenů na mortalitě larev v simultánních aplikacích vyrovnaly. U hlístic došlo jen k nepatrnému navýšení účinnosti, u hub se účinnost i podíl na infekci zvýšil na 24-56% v závislosti na druhu. *I. fumosorosea* po celou dobu testu reagovala na simultánní aplikaci sníženým podílem na infekci v porovnání se samostatnou aplikací. Na druhé straně *B. bassiana* ve společném prostředí s hlísticí vykazovala vyšší účinnost než v samostatném působení. V prekolonizované variantě byl tento trend potvrzen více méně taktéž.

5.9 Vliv entomopatogenní hlístice *S. carpocapsae* na vývoj infekce entomopatogenních hub na larvách *T. molitor*

5.9.1 Vliv entomopatogenní hlístice *S. carpocapsae* na vývoj infekce *B. bassiana* na larvách *T. molitor*

Tab. 98. Vliv společné aplikace *B. bassiana* (Bba) a *S. carpocapsae* (Sc) na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových rozestupech v teplotě 25°C

Den testu	Varianta/Mortalita (průměr±SD%)							
	Kon	Sc	Bba	sim	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
1	0,00±0,00 ^A	10,00±3,16 ^A	10,00±3,16 ^A	20,00±4,22 ^A	-	-	-	-
2	0,00±0,00 ^B	40,00±5,16 ^{AB}	10,00±3,16 ^{AB}	50,00±5,27 ^A	10,00±3,16 ^{AB}	-	-	-
3	0,00±0,00 ^B	50,00±5,27 ^{AB}	20,00±4,22 ^{AB}	60,00±5,16 ^A	30,00±4,83 ^{AB}	20,00±4,22 ^{AB}	-	-
4	0,00±0,00 ^C	60,00±5,16 ^{AB}	20,00±4,22 ^{BC}	60,00±5,16 ^{AB}	80,00±4,22 ^A	30,00±4,83 ^{ABC}	30,00±4,83 ^{ABC}	-
5	0,00±0,00 ^B	70,00±4,83 ^A	80,00±4,22 ^A	80,00±4,22 ^A	80,00±4,22 ^A	70,00±4,83 ^A	50,00±5,27 ^{AB}	80,00±4,22 ^A
6	0,00±0,00 ^B	70,00±4,83 ^A	90,00±3,16 ^A	100,00±0,00 ^A	90,00±3,16 ^A	90,00±3,16 ^A	80,00±4,22 ^A	100,00±0,00 ^A
7	10,00±3,16 ^B	80,00±4,22 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	90,00±3,16 ^A	100,00±0,00 ^A	90,00±3,16 ^A	100,00±0,00 ^A
9	10,00±3,16 ^B	80,00±4,22 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A
14	10,00±3,16 ^B	80,00±4,22 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A

A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 99. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace *S. carpocapsae* a *B. bassiana* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových rozestupech

Dny testu	1			2			4			4			5			6			7			9			14		
	df	MS	F	Df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	3	0,16	0,71	4	1,16	3,16	5	1,18	0,47	6	1,89	3,96	7	1,90	4,23	7	0,42	8,58	7	0,45	15,76	7	9282,1	-	-	-	-
Error	36	0,23		45	0,37		54			63	0,48		72	0,45		72	0,05		72			72	0,00		-	-	

Tab. 100. Vliv aplikace *S. carpocapsae* na index vývoje infekce (FDI) *B. bassiana* (Bba) v různých časových rozestupech po 14 dnech testu v teplotě 25°C

Dny	FDI (průměr±SD)						
	kontrola	Bba	sim	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
1	0,00±0,00 ^A	0,20±0,35 ^A	0,20±0,42 ^A	-	-	-	-
2	0,00±0,00 ^B	0,25±0,35 ^{AB}	0,60±0,46 ^A	0,45±0,28 ^A	-	-	-
3	0,00±0,00 ^B	0,65±0,53 ^A	0,75±0,49 ^A	0,70±0,42 ^A	0,65±0,47 ^A	-	-
4	0,00±0,00 ^B	0,75±0,54 ^{AB}	1,10±0,52 ^A	1,00±0,33 ^A	0,85±0,63 ^{AB}	0,95±0,72 ^{AB}	-
5	0,00±0,00 ^B	1,45±0,60 ^A	1,30±0,54 ^{AB}	1,30±0,54 ^{AB}	1,25±0,95 ^{AB}	1,25±0,92 ^{AB}	1,50±0,71 ^A
6	0,10±0,32 ^C	1,90±0,77 ^A	1,60±0,39 ^{AB}	1,45±0,50 ^{AB}	1,45±0,86 ^B	1,40±0,94 ^B	2,05±0,72 ^A
7	0,10±0,32 ^B	2,15±0,71 ^A	1,70±0,59 ^{AB}	1,65±0,53 ^{AB}	1,75±0,72 ^{AB}	1,75±0,95 ^{AB}	2,10±0,74 ^A
9	0,10±0,32 ^C	2,65±0,53 ^A	1,90±0,52 ^B	1,80±0,42 ^B	2,25±0,63 ^{AB}	2,35±0,58 ^{AB}	2,70±0,63 ^A
14	0,10±0,32 ^C	2,85±0,33 ^A	1,85±0,53 ^{BC}	2,15±0,85 ^B	2,30±0,94 ^{AB}	2,50±0,84 ^{AB}	2,75±0,63 ^A

a,b,c ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$; Kruskal-Wallisův test)

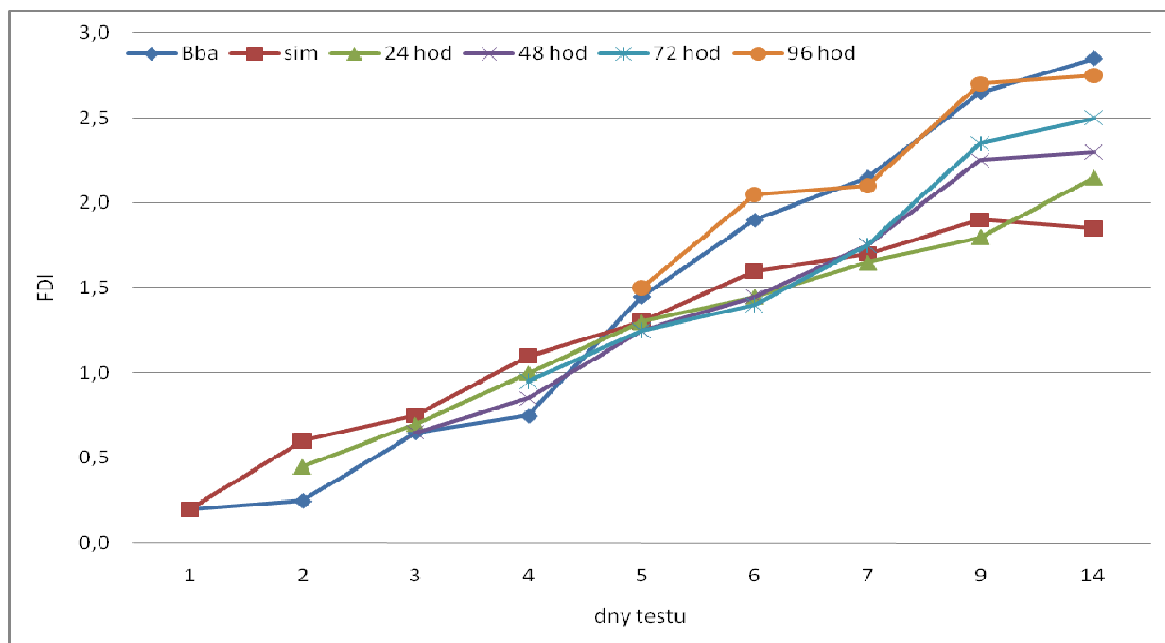
Tab. 101. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace *S. carpocapsae* na index vývoje infekce (FDI) *B. bassiana* v různých časových rozestupech

Parametry	Dny testu									
	1	2	3	4	5	6	7	9	14	
Df	2	3	4	5	6	7	6	6	6	
H	0,00	1,05	3,11	7,74	10,79	16,41	26,17	30,8	33,76	
P	1,00	0,79	0,54	0,17	0,1	0,01	0,00	0,00	0,00	

Tab. 102. Vliv společné aplikace *B. bassiana* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových rozestupech (hodnoceno pomocí LT₅₀)

Varianta	LT ₅₀ (průměr±SD dny)	χ^2	df	P Model fitting
<i>S. carpocapsae</i>	3,14±0,72	0,58	7	0,99
<i>B. bassiana</i>	3,69±1,56	19,42	7	0,01
<i>S. carpocapsae</i> + <i>B. bassiana</i> sim	2,20±0,37	0,95	7	0,99
<i>S. carpocapsae</i> + <i>B. bassiana</i> po 24 hod	3,42±0,34	0,60	6	0,99
<i>S. carpocapsae</i> + <i>B. bassiana</i> po 48 hod	4,20±0,31	1,02	5	0,96
<i>S. carpocapsae</i> + <i>B. bassiana</i> po 72 hod	4,79±0,40	0,13	4	0,99
<i>S. carpocapsae</i> + <i>B. bassiana</i> po 96 hod	4,13±0,27	2,99	5	0,70

Graf 30. Vliv aplikace *S. carpocapsae* na index vývoje infekce (FDI) *B. bassiana* (Bba) v různých časových rozestupech po 14 dnech testu v teplotě 25°C



Vlivem společné aplikace houby *B. bassiana* a hlístice *S. carpocapsae* se mortalita larev *T. molitor* zvláště v počátečních dnech testu zvyšovala. V prvním dnu po aplikaci nebyl detekován mezi jednotlivými variantami statisticky signifikantní rozdíl. 3. den testu vykazala simultánní aplikace nejvyšší účinnost (60%). 5. den testu došlo k rapidnímu nárůstu účinnosti *B. bassiana*, která zaznamenala 80% mortalitu larev. Této hranice dosáhly i varianty simultánní a o 24 hod opožděná. Ostatní varianty se pohybovaly se svou účinností v rozpětí 50-70%. 6. den zaznamenala simultánní aplikace 100% mortalitu larev. Tato hodnota však nebyla statisticky odlišná od hodnot mortalit ostatních variant. 9. den testu dosáhly všechny kombinované varianty 100% mortalitu larev. *S. carpocapsae* během testu zaznamenala pozvolný růst účinnosti. Do 3. dne zaznamenávala nejvyšší počet usmrcených larev a postupně je překonávána jednotlivými kombinacemi. Na konci testu dosáhla 80% účinnosti. Současně s kvantitativním hodnocením vlivu společné aplikace je sledován i vliv hlístice na vývoj *B. bassiana* pomocí hodnotící stupnice FDI. Z výsledků vyplývá, že se zvyšujícím se odstupem od společné aplikace se zvyšuje i tento index a na konci testu dosahuovala varianta 96 hod podobných výsledků jako při samostatném působení houby *B. bassiana*. Rozdíly mezi oběma variantami jsou 14 den testu statisticky neprůkazné. V obou variantách se na konci testu vyskytovali jedinci s plně sporulujícím myceliem na povrch těla. Na druhé straně simultánní kombinace zaznamenala hodnotu 1,85, což odpovídá jen velmi sporadickému výskytu larev se symptomy houbové infekce.

Z hodnot sledující LT_{50} je patrné, že simultánní aplikace viditelně urychlila průběh infekce v porovnání se samostatnými aplikacemi jednotlivých agens. Ostatní kombinace spíše prodlužovaly dobu k usmrcení hostitele. Z hodnoty vyplývá, že s prodlužující expozicí houbovému patogenu a následné aplikace hlístice se zvyšuje i doba potřebná k úspěšné infekci. Výjimku tvoří kombinace po 96 hod, u které došlo ke zkrácení LT_{50} v porovnání s variantami 48 hod a 72 hod.

5.9.2 Vliv entomopatogenní hlístice *S. carpocapsae* na vývoj infekce *I. fumosorosea* na larvách *T. molitor*

Tab. 103. Vliv společné aplikace *I. fumosorosea* (If) a *S. carpocapsae* (Sc) na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových rozestupech v teplotě 25°C

Den testu	Varianta/Mortalita (průměr±SD%)							
	Kon	Sc	If	sim	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
1	0,00±0,00 ^A	10,00±3,16 ^A	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	-	-	-	-
2	0,00±0,00 ^A	40,00±5,16 ^A	10,00±3,16 ^A	10,00±3,16 ^A	10,00±3,16 ^A	-	-	-
3	0,00±0,00 ^A	50,00±5,27 ^A	20,00±4,22 ^A	20,00±4,22 ^A	30,00±4,83 ^A	20,00±4,22 ^A	-	-
4	0,00±0,00 ^B	60,00±5,16 ^A	40,00±5,16 ^{AB}	20,00±4,22 ^{AB}	50,00±5,27 ^{AB}	20,00±4,22 ^{AB}	20,00±4,22 ^{AB}	-
5	0,00±0,00 ^A	70,00±4,83 ^A	50,00±5,27 ^A	40,00±5,16 ^A	60,00±5,16 ^A	60,00±5,16 ^A	50,00±5,27 ^A	60,00±5,16 ^A
6	0,00±0,00 ^B	70,00±4,83 ^A	80,00±4,22 ^A	90,00±3,16 ^A	60,00±5,16 ^A	80,00±4,22 ^A	80,00±4,22 ^A	80,00±4,22 ^A
7	10,00±3,16 ^B	80,00±4,22 ^A	90,00±3,16 ^A	90,00±3,16 ^A	80,00±4,22 ^A	80,00±4,22 ^A	90,00±3,16 ^A	90,00±3,16 ^A
9	10,00±3,16 ^B	80,00±4,22 ^A	90,00±3,16 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	90,00±3,16 ^A	100,00±0,00 ^A	90,00±3,16 ^A
14	10,00±3,16 ^B	80,00±4,22 ^A	90,00±3,16 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A	90,00±3,16 ^A	100,00±0,00 ^A	100,00±0,00 ^A

A, B, C ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Tab. 104. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor*

Dny testu	1			2			4			4			5			6			7			9			14		
	df	MS	F	Df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Intercept	3	0,04	1,00	4	0,28	2,03	5	0,32	1,53	6	0,52	2,26	7	0,57	2,02	7	0,42	8,58	7	0,89	5,74	7	947,1	-	-	-	-
Error	36	0,03		45	0,14		54	0,21		63	0,23		72	0,28		72	0,05		72	0,16		72	0,00		-	-	

Tab. 105. Vliv aplikace *S. carpocapsae* na index vývoje infekce (FDI) *I. fumosorosea* (If) v různých časových rozestupech po 14 dnech testu v teplotě 25°C

Dny	FDI (průměr±SD)						
	kontrola	If	sim	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
1	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	-	-	-	-
2	0,00±0,00 ^A	0,10±0,32 ^A	0,10±0,32 ^A	0,10±0,32 ^A	-	-	-
3	0,00±0,00 ^A	0,20±0,42 ^A	0,25±0,54 ^A	0,30±0,48 ^A	0,20±0,42 ^A	-	-
4	0,00±0,00 ^A	0,55±0,72 ^A	0,35±0,75 ^A	0,65±0,71 ^A	0,30±0,63 ^A	0,20±0,42 ^A	-
5	0,00±0,00 ^A	0,80±0,89 ^A	0,55±0,76 ^A	0,95±0,83 ^A	0,90±0,84 ^A	0,65±0,71 ^A	0,90±0,84 ^A
6	0,10±0,32 ^B	1,20±0,79 ^{AB}	0,95±0,60 ^{AB}	1,15±0,85 ^{AB}	1,25±0,75 ^A	1,25±0,72 ^A	1,20±0,75 ^{AB}
7	0,10±0,32 ^B	2,00±0,21 ^A	1,40±0,57 ^{AB}	1,40±0,77 ^{AB}	1,35±0,78 ^{AB}	1,75±0,63 ^A	1,70±0,75 ^A
9	0,10±0,32 ^B	2,30±0,68 ^A	1,65±0,34 ^{AB}	1,85±0,58 ^A	1,60±0,74 ^{AB}	2,00±0,24 ^A	1,80±0,79 ^A
14	0,10±0,32 ^B	2,60±0,17 ^A	1,80±0,53 ^{AB}	1,85±0,53 ^{AB}	1,70±0,82 ^{AB}	2,15±0,67 ^A	2,10±0,81 ^A

a,b,c ... Průměry mezi prekolonizovanými/prekolonizovanými variantami v řadě se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (Neparаметrická metoda, $\alpha=0,05$ Kruskal-Wallisův test)

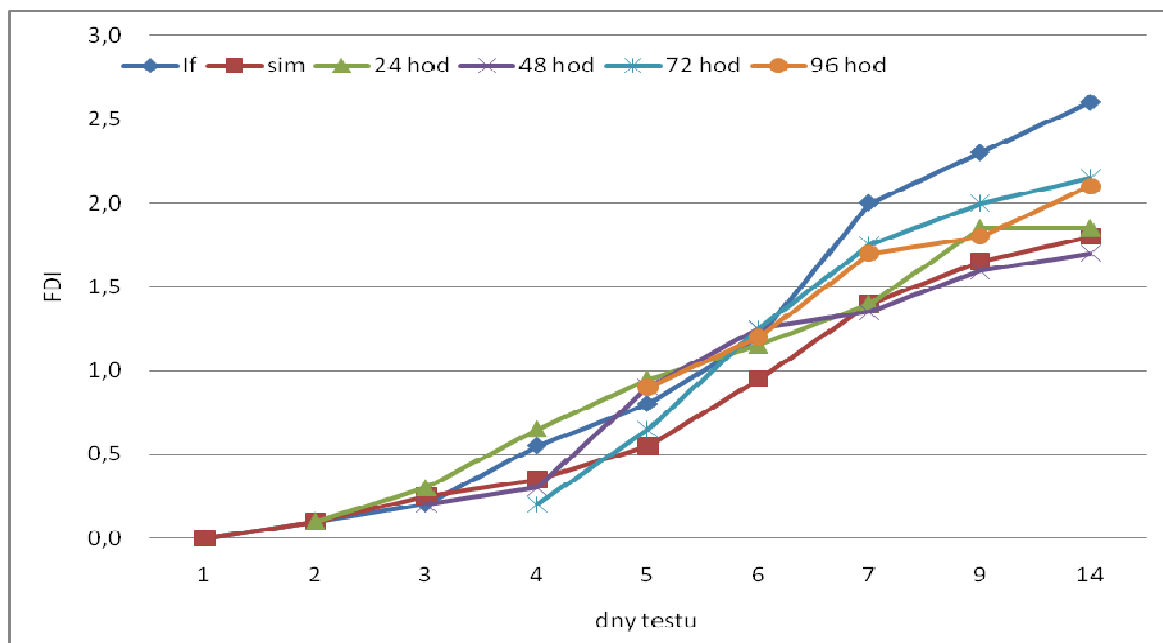
Tab. 106. Statistické hodnocení vlivu společné aplikace *S. carpocapsae* na index vývoje infekce (FDI) *I. fumosorosea* v různých časových rozestupech

Parametry	Dny testu									
	1	2	3	4	5	6	7	9	14	
df	2	3	4	5	6	6	6	6	6	
H	3,06	14,39	20,74	30,44	27,97	29,86	28,25	39,3	37,49	
P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tab. 107. Vliv společné aplikace *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* na mortalitu larev *T. molitor* v různých časových rozestupech (hodnoceno pomocí LT₅₀)

Varianta	LT ₅₀ (průměr±SD dny)	χ^2	df	P Model fitting
<i>S. carpocapsae</i>	3,14±0,72	0,58	7	0,99
<i>I. fumosorosea</i>	4,46±0,47	1,31	7	0,99
<i>S. carpocapsae</i> + <i>I. fumosorosea</i> sim	4,96±0,40	4,32	6	0,63
<i>S. carpocapsae</i> + <i>I. fumosorosea</i> po 24 hod	4,20±0,44	0,43	6	0,99
<i>S. carpocapsae</i> + <i>I. fumosorosea</i> po 48 hod	4,76±0,57	1,33	5	0,93
<i>S. carpocapsae</i> + <i>I. fumosorosea</i> po 72hod	4,95±0,34	0,03	4	0,99
<i>S. carpocapsae</i> + <i>I. fumosorosea</i> po 96 hod	4,23±8,91	0,08	3	0,99

Graf 31. Vliv aplikace *S. carpocapsae* na index vývoje infekce (FDI) *I. fumosorosea* (If) v různých časových rozestupech po 14 dnech testu v teplotě 25°C



Účinnost po společné aplikaci houby *I. fumosorosea* a *S. carpocapsae* v různých časových rozestupech se mezi jednotlivými kombinacemi v různých časových intervalech nelišila po celou dobu testu. Výjimkou byl 4. den, ve kterém zaznamenala nejvyšší mortalitu samostatná aplikace hlístice. 5. den testu se mortalita larev *T. molitor* pohybovala v rozmezí 40-70%, při čemž nejvyšších hodnot dosáhla samostatná aplikace hlístice. Naopak nejnižší mortality dosáhly simultánní aplikace. Po 7 dnech testu se hodnoty mortalit vyrovnaly a účinnost samostatné hlístice byla postupně překonána. 9. den testu dosáhly varianty sim, 24 hod a 72 hod 100% mortalitu larev. 14. den testu dosáhly postupně nejvyšší hranice účinnosti varianty simultánní, 24 hod, 72 hod a 96 hod. *I. fumosorosea* dosáhla 90% účinnosti.

V souvislosti s účinností byl sledován i parametr FDI, který měl za úkol popsat vliv hlístice na vývoj houbové infekce. Ze získaných hodnot je patrný vliv aplikace *S. carpocapsae* na vývoj *I. fumosorosea* zvláště v rané fázi, kdy se houbou infikované larvy dostaly do kontaktu s hlísticí bezprostředně po aplikaci do společného prostředí. Hodnoty FDI dosahují úrovně 1,80 po 14 dnech, kdežto u samostatné aplikace se houba za tu samou dobu dostala do fáze 2,60. Taktéž z průběhu vývoje v jednotlivých dnech lze pozorovat zpomalený průběh infekce. Jestliže u samostatně aplikované *I. fumosorosea* se 7. den vyskytují larvy porostlé kompaktním myceliem houby, u simultánní aplikace lze detekovat larvy mrtvé s indikovaným počátkem růstu mycelia. Pokud se zaměříme na vývoj houby v dalších variantách, dá se říci, že z prodlužujícím se intervalem od iniciace houbové infekce do aplikace hlístice, se zvyšuje i index vývoje. Během testu lze pozorovat jisté výkyvy zvláště u varianty 48 a 96.

Z hodnot v tabulce sledující rychlost průběhu infekce vyplývá, že nejrychleji dosáhla LT_{50} samostatná aplikace *S. carpocapsae*. Na rozdíl od kombinace s *B. bassiana* simultánní aplikace potlačila průběh a tím pádem i rychlost infekce a způsobila spíše prodloužení LT_{50} . Z hodnot nelze ani jednoznačně říci, že by šlo o přímoúměrný růst letální periody se zvyšujícím se rozstupem mezi aplikacemi. Hraničními variantami se ukazují být rozestupy po 24 a 96 hodinách. Ostatní varianty prokazují spíše antagonismus společné kombinace.

6 DISKUZE

6.1 Hodnocení kompatibility vybraných pesticidů s hlísticí *S. feltiae*

Základní hypotézou studie zabývající se kompatibilitou vybraných chemických pesticidů je ověřit kombinovatelnost entomopatogenních hlístovek s látkami, které jsou v běžné zemědělské praxi využívány k eradikaci chorob a škůdců. Součástí ověření této hypotézy je nastínění možnosti náhrady chemických pesticidů v integrovaných ochranných programech jinými alternativami, které by mohly nastat v případě neslučitelnosti (inkompatibility) daného pesticidu s testovaným bioagens.

Helminti vlastní, stejně jako jiné organismy, pro detoxikaci škodlivých látek řadu mechanismu. Nedávné studie potvrdily, že jedním z důležitých mechanismů využívaných helmintími parazity je i cytochrom P450 (Kerboeuf et al. 1995; Kotze 1997; Alvinerie et al. 2001). Piperonyl-butoxid je využíván jako synergistická látka v řadě insekticidních přípravků. Tato látka je schopná blokovat cytochrom P450 a tím i celý detoxifikační proces insekticidu v těle hmyzu. V této studii piperonyl-butoxid způsobil 18,68% mortalitu infekčních larev *S. feltiae*. Studie sledující vliv této účinné látky na larvy parazitických hlístů *Haemonchus contortus* a *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda: Trichostrongylidae) neprokázala žádnou toxicitu v dávce 20 mg/ml (Kotze et al. 2006). Fungicidy obecně prokázaly nízký vliv jak na vitalitu, tak virulenci *S. feltiae*. Ú.l. kresoxim-methyl ovlivnil vitalitu hlístice z 8,43%. Tato účinná látka patří do skupiny chemických látek strobilurinové povahy stejně jako ú.l. azoxystrobin. Řada studií potvrzuje kompatibilitu azoxystrobinu s hlístovkou *S. feltiae* (Krishnayya and Grewal 2002; De Nardo and Grewal 2003). Také side effect list firmy Becker Underwood potvrzuje necílový vliv ú.l. kresoxim-methylu na EPNs (Anonym 2009). Ú.l. nuarimol je další z řady fungicidů, který prokázal ve studii kompatibility dokonce pozitivní vliv nejen na vitalitu *S. feltiae*, ale také na zvýšenou pohybovou aktivitu infekčních larev ve vodní suspenzi (data neuvádí). Tento efekt mohl následně pravděpodobně ovlivnit i virulenci infekčních larev, což bylo patrné zvláště 5. den testu virulence na larvách *T. molitor*, kdy mortalita larev dosáhla 100% hranice. Nuarimol patří spolu s ú.l. fenrimol do stejné skupiny chemických látek (Pyrimidiny). Rovestí at al. (1988) potvrdil zanedbatelný vliv fenarimolu na *H. bacteriophora*. Akaricidy zaznamenaly v této studii poměrně významný vliv zvláště na druhý sledovaný parametr hlístovek, tedy na virulenci. Ú.l. tebufenpyrad a fenpyroximate prokázaly silný negativní vliv na schopnost hlístovek detekovat a usmrtit svého hostitele. Obě tyto ú.l. patří mezi pyrazolové sloučeniny se metabolickým účinkem tzv. inhibitora transportu elektronů v mitochondriích. Tento specifický účinek vede pravděpodobně k řadě především fyziologických změn, které pak mohou vyústit v komplexní poruchy spojené s neschopností hlístovek nalézt a infikovat hostitele. V současné době jsou pyrazolové sloučeniny studovány pro jejich nematicidní účinky (Cherkupally et al. 2009; Katsurada 2009), proto by se měl brát ohled na tento fakt při jejich využívání s IOR.

Ačkoliv dlouhodobé uchování tank-mix směsí pesticidů není součástí běžné zemědělské praxe, pesticidy aplikované do půdy však mohou zůstat v kontaktu s hlístovkami po určitou dobu. Další možností, jak by se mohly hlístovky dostávat do přímého kontaktu s účinnými látkami chemických pesticidů je model typický zvláště ve skleníkových podmínkách, kde vlivem častého vlhčení či pravidelnou zálivkou může docházet ke smývání pesticidů a tím i následný kontakt hlístic a látek původně aplikovaných do fyloplánu. Na základě těchto předpokladů je nutné vycházet ze znalostí o účincích pesticidů na vitalitu a virulenci bioagens a uzpůsobit tak aplikační dávky hlístovek, popřípadě nahradit daný pesticid v případě silného necílového vlivu za vhodnější alternativu.

V návaznosti na tuto myšlenku je řešena problematika kombinace hlístovek s jiným entomopatogenním organismem v dalších částech této doktorské práce.

6.2 Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti larvám modelových škůdců vlivu prekolonizace půdního substrátu na jejich účinnost

V části zaměřené na hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hlístic proti larvám modelových škůdců byly v testech používány 2 druhy běžně masově produkovaných hlístic (*S. carpocapsae*, *S. feltiae*) a 1 druh (*S. arenarium*), druh známý ale, ve velkoobjemovém měřítku neprodukovaný. Cílem této části bylo zhodnotit hostitelskou specifitu testovaných hlístovek. Z hodnot LD₅₀ je patrné, že larvy *G. mellonella* celkově vykazovaly vyšší citlivost vůči testovaným druhům entomopatogenních hlístic, než-li larvy *T. molitor*. Zavíječ voskový (*G. mellonella*) je obecně považován za velmi citlivého hostitele (Anderson and May 1982) a je poměrně často využíván v biotestech jako modelový organismus. Všechny tři testované druhy hlístovek prokázaly vysokou afinitu k tomuto hostiteli. Converse and Miller (1999) ve své studii testovali 4 druhy hlístovek rodu *Steinernema* (*S. glaseri*, *S. riobrave*, *S. carpocapsae* a *S. feltiae*) proti larvám *G. mellonella*. Mortalita se u všech sledovaných druhů po 72 hodinách pohybovala od 48,4-69,7%. V této studii se mortalita larev pohybovala po 7 dnech testu od 30-100% v závislosti na druhu a testované koncentraci. O vysoké citlivosti tohoto hostitele svědčí i fakt, že je nejpoužívanějším hmyzím druhem pro *in vivo* kultivace většiny druhů doposud popsáných hlístovek. Nejcitlivěji larvy *G. mellonella* reagovaly na druh *S. arenarium*. Tento druh hlístovky patří do tzv. glaseri skupiny (infekční larvy této skupiny jsou jedny z největších, dosahují velikosti až 1 mm) a v přírodě téměř výhradně napadají larvy čeledi *Scarabaeidae*. Larvy této čeledi se svou morfologií a velikostí těla přibližuje larvám zavíječe voskového, proto pravděpodobně tento druh prokázal tak vysokou afinitu k tomuto hostiteli. Jako druhým modelovým hostitelem byly v biotestech použity larvy *T. molitor*. Larvy tohoto druhu se vyznačují především silnou sklerotizací kutikuly. V testech byla prokázána nižší citlivost larev vůči testovaným hlísticím. Ze zjištěných výsledků lze říci, že larvy *T. molitor* prokázaly nejvyšší citlivost vůči *S. carpocapsae* a *S. feltiae*. Hodnoty mortalit se u těchto dvou druhů na konci testu pohybovaly v rozmezí 16-94%. *S. carpocapsae* je jedním z druhů, jež prokázaly účinnost vůči larvám kovaříků (drátovců) jež jsou právě díky své silné sklerotizaci kutikuly a řadě dalších adaptací vůči entomopatogenním organismům silně rezistentní (Schalk et al. 1993). Jedním z vysvětlení této schopnosti napadat i jinak poměrně odolné druhy hmyzu je fakt, že infekční larvy *S. carpocapsae* dosahují nejmenší velikosti v porovnání s ostatními skupinami hlístovek, což je zvýhodňuje při pronikání do hostitele. V protikladu s druhem *S. arenarium*, která prokázala jen nízkou účinnost vůči *T. molitor*. Mortalita larev u tohoto druhu dosáhla u nejvyšší testované koncentrace pouze 38%. Tento fakt by mohl být zapříčiněno právě velikostí infekčních larev. Jak již bylo výše zmiňováno velikost infekčních larev *S. arenarium* dosahuje oproti ostatním dvěma testovaným druhům dvojnásobné velikosti. Tento fakt může hrát velkou roli v pronikání do těla přirozenými otvory. Podobné fyziologické bariéry, tedy malý ústní a řitní otvor, se uvádí v souvislosti s larvami kovaříků (drátovci), které lze považovat za velmi odolné vůči infekci EPNs právě díky těmto predispozicím (Edit and Thurston 1995). Tato hypotéza je podložena i studiemi, které se zabývají účinností *S. arenarium* proti larvám jiných škůdců z řádu Coleoptera, proti kterým se jejich účinnost prokázala. Příkladem mohou být pokusy na larvách brouků bázlivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) či larvám krasce černého (*Capnodis tenebrionis* (L.)) (Toepfer et al. 2005; Del Pino and Morton 2005). Larvy těchto zástupců hmyzu nedisponují tak silnou sklerotizací kutikuly, proto se u nich pravděpodobně projevila citlivost vůči testovanému druhu hlístovky. Kromě fyziologických a morfologických predispozic by mohla hrát

důležitou roli i změna chování potencionálního hostitele v přítomnosti patogena jako je to uváděno v případě larev čeledi *Scarabaidae*, kdy byla po aplikaci entomoparazitických hlístovek pozorována snaha larev eliminovat průnik infekčních larev ústním otvorem zvýšenou kousací a žvýkácí aktivitou (Koppenhöfer et al. 2000), či zvýšenou defekací u larev much a vrtalek, které se touto cestou snažily omezit průnik infekčních larev EPNs řitním otvorem (Renn 1998). Lze tedy konstatovat, že se účinky jednotlivých druhů hlístovek odlišovaly v závislosti na cílovém hostiteli, což ukazuje na rozdílné hostitelské spektrum testovaných druhů. Na tento fakt by se měl brát ohled v případě aplikace těchto poznatků v praktickém využití a na základě těchto výsledků postupovat při výběru některého z druhu v cílené ochraně.

V části sledující účinnost hlístovek v profylaktickém použití byl sledován efekt prekolonizace půdního substrátu vybranými druhy hlístic. EPNs jsou obecně používány k cílené ochraně proti danému škůdci v kurativní formě. Vesměs všechny dosavadní studie jsou zaměřeny na výsledky přímé aplikace hlístovek v programech IOR (Begley 1990; Klein 1990; Ogura, 1993; Parkman et al. 1993; Georgis and Manweiler 1994; Cabanillas and Ralston 1994; Williams and Walters 2000; Jagdale et al. 2004). Nicméně některé biologické pesticidy př. mykopesticidy na bázi mykoparazitických či entomopatogenních hub mohou být užívány v preventivních aplikačních programech a tím poskytovat dostatečnou ochranu proti fytopatogenním houbám respektive škodlivému hmyzu již od počátku. Touto problematikou se částečně zabývá i tato doktorská práce, proto v návaznosti se zvyšováním účinnosti profylakticky aplikovaných hub, byla provedena i podobná studie s entomopatogenními hlístovkami. Schopnost hub přežívat a popřípadě se množit na alternativních zdrojích dává garanci permanentní ochrany. Hlístovky však nedisponují schopností reprodukce v nehostitelských podmínkách díky jejich biologickým aspektům. Existuje však řada cest, jak zvýšit jejich účinnost. Mezi nejčastější patří především dodržování zásad v průběhu aplikace a post aplikace, dále používání dalších adjutantů, chemických pesticidů (Head et al. 2000) či popřípadě biologických agens (Agra Gothama et al. 1996; Choo et al. 1996; Baur et al. 1997; Koppenhöfer and Kaya 1997; Koppenhöfer et al. 2000; Koppenhöfer et al. 2003). Předpokladem k této studii byla však hypotéza, která vycházela z myšlenky krátkodobé expozice infekčních larev nehostitelským podmínkám, jež by vedla k adaptaci hlístovek v novém prostředí a efektivnímu osídlení celého prostoru a tím pak k následnému zvýšení účinnosti po následné introdukci hostitelských larev. Výsledky ukázaly, že jednotlivé druhy reagovaly na prekolonizaci různě. *S. feltiae* jako druh s úspěchy využívaný v kurativních programech, lze s úspěchem využívat taktéž v preventivních aplikacích. V tomto testu došlo k navýšení od 16 do 24% v závislosti na testované koncentraci. Na druhé straně *S. carpocapsae* prokázala signifikantní snížení účinnosti (6-16%) po 7 denní expozici v nehostitelských podmínkách. Tento výsledek je v protikladu s výsledky experimentu Toepfer et al. (2008), jež úspěšně testoval tento druh v preventivní aplikaci v době setí kukuřice proti larvám škůdce bázlivce kukuřičného *Diabrotica virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). Stejně tak Kim et al. (2004) potvrdil účinnost preventivní introdukce hlístice *S. carpocapsae* v ochraně rostlin vodního melounu proti larvám *Bradysia agrestis* Sasakawa (Diptera: Sciaridae). Snížená účinnost tohoto druhu by mohla být přičítána tzv. fázovému střídání infekтивности (Hominick and Reid 1990). Podle této teorie dochází ke střídání infekční a neinfekční fáze u jednotlivců v populaci hlístovek. Podíl neinfekčních jedinců v populaci se může měnit v čase Bohan and Hominick 1996; Hominick and Reid 1990). Fázové střídání je ovlivněno především přítomností vhodného hostitele. V případě, že mají infekční larvy hlístovek neomezený přístup k hostiteli, nebude v populaci toto fázové střídání detekováno. Campbell et al. (1995) testoval infektivitu třech druhů hlístovek rodu *Steinernema* (*S. glaseri*, *S. carpocapsae* a *S. feltiae*) v přítomnosti dostatečného množství vhodných hostitelských larev a podařilo se mu tento fakt potvrdit. U druhu *S. arenarium*

ukázal efekt prekolonizace jen velmi nízký vliv na účinnost. V testech došlo jen k mírnému navýšení, jež nebylo ani statisticky prokazatelné. Nízká účinnost tohoto druhu je diskutována výše, nicméně tento výsledek ukazuje, že by se prekolonizace mohlo využít do určité míry pro zvýšení účinnosti v případech, které by vylučovaly použití jiného druhu hlístovky. Tato studie demonstruje možnosti preventivního využití EPNs v programech IOR, zvláště v případě *S. feltiae*. Ze studie je patrné, že ne všechny druhy hlístovek reagují na prekolonizaci stejným způsobem, proto by se měl tento fakt brát v úvahu v případě profylaktického použití.

6.3 Hodnocení vlivu teploty a vlhkosti na účinnost vybraných druhů entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti larvám *T. molitor* a *G. mellonella*

V části zaměřené na hodnocení teploty a vlhkosti na účinnost vybraných druhů EPNs, byl testován vliv dvou nejvýznamnějších abiotických faktorů. Teplota a vlhkost jsou jedny z nejdůležitějších limitujících faktorů úspěšného využití EPNs. Oba faktory přímo ovlivňují vyhledávací schopnost, patogenitu a přežívání hlístovek. Cílem práce bylo definovat, za jakých podmínek je účinnost vybraných druhů omezena a jestli se reakce na stres v podobě snížené vlhkosti, či teploty liší v závislosti na testovaném druhu.

Půda je přirozeným prostředím pro EPNs, zároveň jde však o složitý komplex navzájem provázaných složek jak biologické, chemické tak fyzikální podstaty. Všechny tyto složky hrají důležitou roli v přežívání nejen hlístovek, ale celé řady dalších organismů (Poinar, 1990; Hominick et al., 1996). V této práci byly studovány dva komerčně produkované druhy hlístovek. *S. feltiae* a *S. carpocapsae*. *S. feltiae* prokázala v této studii velmi dobrou toleranci vůči nízkým teplotám. Tato tolerance byla demonstrována vysokou účinností vůči oběma druhům studovaným hostitelských larev. V případě testů na larvách *G. mellonella* dosáhla účinnost tohoto druhu dokonce vyšších hodnot při teplotě 15°C, než-li při 25°C. *S. feltiae* je druhem dobře adaptovaným na chladnější podmínky. Také Chen et al. (2003) potvrzuje ve své práci, že se tento druh projevil jako nejúčinnější vůči larvám *Delia radicum* v teplotách 10°C. *S. carpocapsae* spolu se dvěma dalšími testovanými druhy v té samé studii prokázaly účinnost až při teplotách vyšších 15°C. *S. carpocapsae* zaznamenala v této studii nejvyšší účinnost při nejvyšší testované teplotě (25°C). Tento výsledek koresponduje s faktem, že tento druh vlastní velmi úzké reprodukční teplotní rozmezí (Grewal et al., 1994). Podobné výsledky jsou prezentovány i v práci Toledo et al. (2009), ve které byly testovány tři teploty 19, 25 a 30°C. Testy na larvách *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) prokázaly jasný vliv snížené aktivity *S. carpocapsae* ve snížených teplotách. Stejně tak ve studii Vega et al. (2000), ve které byly testovány dva kmeny *S. carpocapsae*, jež shodně zaznamenaly při 11°C pouze 8% účinnost proti larvám obaleče jablečného (*Cydia pomonella* (L.)). V části práce zabývající se vlivem vlhkosti na účinnost obou druhů hlístovek byla potvrzena pozitivní korelace mezi sníženou hladinou vlhkosti a efektivitou obou druhů. Tyto výsledky korespondují i s výsledky dalších autorů (Townsend et al. 1998; Grant and Villani 2003). Nízká úroveň vlhkosti v prvních 7 dnech testu výrazně potlačila schopnost obou druhů infikovat jak larvy *G. mellonella*, tak *T. molitor*. Po znovu nabytí vhodných podmínek došlo v průběhu 14 dní k rapidnímu nárůstu účinnosti u obou testovaných druhů. Obdobné výsledky jsou prezentovány ve studii Grant and Villani (2003). Ti sledovali vliv různých úrovní vlhkosti na účinnost pěti izolátů EPNs. Z výsledků vyplynulo, že hlístovky reagovaly negativně na nejnižší hladinu vlhkosti (6%) nejnižší účinností. Po rehydrataci 7 den testu však účinnost všech studovaných druhů dosáhla 100% mortality larev *G. mellonella*. V optimálních podmínkách (15%) však hlístovky zaznamenaly již po prvním týdnu testu maximální účinnost. Stejně závěry byly dosaženy i v této studii. Zajímavým faktem však bylo, že *S. feltiae* reagovala na vlhkostní stres mnohem lépe, než *S. carpocapsae*, jež je považována obecně za druh tolerantní k vlhkostnímu stresu (Glazer, 1992). Tento poznatek je přičítán především potravnímu chování tohoto druhu. *S. carpocapsae* je tzv. ambusher, jež

užívá k detekci svého hostitele strategii „sit and wait“, při které je tělo infekční larvy z 95% exponováno ve volném prostoru, což napomáhá tomuto druhu napadat hmyzí larvy pohybující se těsně po půdním povrchu. Toto chování vystavuje *S. carpocapsae* extrémnímu nedostatku vlhkosti a tím pádem i rychlému vysychání (Campbell and Kaya 2000). Proto jsou všechny hlístovky ze skupiny „ambusher“ považovány za poměrně tolerantní ke snížené hladině vlhkosti. Snížená vlhkost však může u hlístovek navodit stav kviescence. Tento jev byl dokumentován u řady parazitických i volně žijících háďátek (Womersley et al. 1998). Na rozdíl od *S. feltiae*, která reaguje na zhoršené vlhkostní podmínky přesunem do hlubších vrstev půdy. Tato reakce jim umožňuje zůstat aktivnějšími a tím pádem i infekčními (Lewis, 2002). Po znovunabytí optimálních vlhkostních podmínek došlo k signifikantnímu zvýšení účinnosti. V případě larev *G. mellonella* bylo dokonce zjištěno navýšení účinnosti v porovnání s daty získanými z testu, jež již od počátku probíhal v optimálních podmínkách. Toto navýšení účinnosti mohlo být způsobeno prostým zlepšením vlhkostních podmínek a tím pádem i aktivací vyhledávací aktivity u obou studovaných druhů. Druhým, neméně podstatným faktorem je faktor stresu hostitelských larev. Fyzikální stres mohl v tomto případě hrát významnou roli. Larvy *G. mellonella* jsou obecně považovány za velmi citlivé vůči stresovým podmínkám, nicméně fyzikální či chemické stresy obecně zvyšují citlivost obranných mechanismů jak u rostlin, tak živočichů vůči infekcím a patogenům (Daane and Williams, 2003; Pickett et al., 2003; Shibata, 2000). Brown et al. (2006) prokázal vliv teplotního šoku larev *T. molitor* na následnou citlivost vůči infekci hlísticí *H. bacteriophora*.

Významným zjištěním této části bylo, že *S. feltiae* na vlhkostní stres reagovala mnohem lépe, než-li *S. carpocapsae*, jež je považována díky své potravní strategii za adaptabilnější v podmínkách rapidního vysychání. Dalším neméně podstatným poznatkem je, že v části sledující vliv teploty na účinnost hlístovek dokázala zvýšená koncentrace aplikovaných hlístovek nahradit do určité míry sníženou účinnost v teplotě 10°C. Tento fakt by mohl hrát roli v systémech, kde by teplota mohla být limitujícím faktorem a kde by pouhé navýšení aplikační dávky hlístovek mohlo snížit negativní vliv nízkých teplot na účinnost vůči cílovému škůdci.

6.4 Hodnocení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub a vlivu prekolonizace půdního substrátu na jejich účinnost vůči larvám *T. molitor*

Entomopatogenní houby představují obecně velmi studovanou skupinu mikroorganismů, zvláště *B. bassiana* a *I. fumosorosea*, jež patří mezi nejprostudovanější druhy entomopatogenních hub vůbec. Oba druhy mají široké hostitelské spektrum a dají se snadno kultivovat na umělých živných substrátech. Kromě tohoto a výhod spojených s jejich necílovým působením a ekotoxikologických vlastností, jsou předurčeny k cílenému využívání v ochraně rostlin před celou řadou škůdců. Hlavním záměrem této studie bylo porovnat účinnost obou výše zmiňovaných druhů vůči larvám *T. molitor* jako modelovým hmyzím škůdce, jehož larvy disponují silnou sklerotizací kutikuly. Jak už bylo řečeno, oba druhy hub testovaných v této práci vlastní určité hostitelské spektrum. Houby komplexu druhu *I. fumosorosea* jsou houbami široce rozšířenými, jejichž účinnost byla prokázána vůči larvám motýlů, třásněnek, mšicím a roztočům. (Castineiras et al. 1996; Mesquita et al. 1996; Altre and Vandenberg 2001; Shi and Feng 2004), avšak v souvislosti s přirozeným hostitelským spektrem tohoto patogena byla potvrzena těsná vázanost zvláště s populacemi molice *Bemisia* spp. a *Trialeurodes vaporariorum* (Lacey et al. 1996; Lacey et al. 2008). *B. bassiana* vykazuje taktéž statut entomopatogena širokého spektra bezobratlých hostitelů, avšak spektrum tohoto patogena je mnohem širší než druhu *I. fumosorosea*. Kromě řádů Diptera, Hemiptera, Homoptera, Lepidoptera je také evidován jako patogen širokého spektra druhů řádu Coleoptera. Příkladem je úspěšné využití této houby vůči bázlivci kukuřičnému *Diabrotica virgifera virgifera* (Chrysomelidae) (Mulock et al. 2001; Bruck et al. 2002; Pilz et al. 2007),

bělokazu *Scolytus amygdali* (Scolytidae) (Batta 2007), lýkožroutu smrkovému *Ips typographus* (Scolytidae) (Kreutz et al. 2004) nebo smoláku *Pissodes strobi* (Curculionidae) (Trudel et al. 2007). Z výsledků studie vyplývá, že u obou sledovaných druhů byla rychlost vývoje houbové infekce a mortalita larev přímo úměrná koncentraci houbového inokula aplikovaného do půdního substrátu. Michalaki et al. (2007) prokázal účinnost *I. fumosorosea* na larvách *Tribolium confusum*. Mortalita larev se po 7 dnech pohybovala pod úrovní 20%, po 14 dnech však dosáhla 100%. Podobné výsledky byly dosaženy i v této studii, kde mortalita larev *T. molitor* kolísala v závislosti na aplikovaném počtu spor od 4-68% po 7 dnech a od 56-100% po 14 dnech. *B. bassiana* se projevila taktéž jako účinný biogens a po 7 dnech byla při koncentraci 1×10^6 spor/ml půdy zaznamenána 28% mortalita larev. Podobné výsledky prezentoval Geden and Steinkraus (2003), jež testovali 12 kmenů houby *B. bassiana* vůči larvám potemníka stájového (*Alphitobius diaperinus* (Panzer)) (Tenebrionidae). Mortalita larev se při koncentraci $1,5 \times 10^6$ spor/g přípravku pohybovala po 7 dnech testu v rozmezí 20,5-100% v závislosti na kmeni. Stejně tak v testu proti larvám potemníka skladištního (*Tribolium castaneum* (Herbst)), ve kterém byly testovány různé kombinace *B. bassiana* s esenciálními oleji proti tomuto škůdci. Zjištěná účinnost této houby se pohybovala v rozmezí 0,5-67,5% po 8 dnech testu v závislosti na variantě (Akbar 2005). V testech porovnávající účinnost obou druhů hub používaných i v této doktorské práci se *I. fumosorosea* projevila jako účinnější. Tento výsledek je v protikladu s výsledky studie porovnávající účinnost *B. bassiana* a *I. farinosus* vůči lýkožroutu borovému (*Ips sexdentatus* boerner) (Coleoptera: Scolytidae) v dávce 1×10^8 spor/ml suspenze. *B. bassiana* způsobila po 10 dnech 90-97% mortalitu v závislosti na kmeni, kdežto *I. farinosus* 45-67% (Draganova 2006). Naopak studie sledující vliv *B. bassiana* a *I. fumosorosea* na mortalitu třetího instaru nymf molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) (Homoptera: Aleyrodidae) a *Bemisia argentifolii* prokázala vyšší účinnost *I. fumosorosea* (Poprawski et al. 200; Wraight et al. 2000). Výsledky v této experimentální části prokázaly vysokou účinnost houby *I. fumosorosea* vůči larvám *T. molitor* a ukázaly tak, že by se tento druh dal s úspěchem používat i proti škůdcům řádu Coleoptera.

V části zabývající se hodnocením vlivu prekolonizace půdního substrátu na schopnost hub namnožit se v něm byla studována možnost profylaktické aplikace hub s následným hodnocením jejich účinnosti. Statut entomopatogenních hub jako “patogen hmyzu” je v posledních letech poměrně diskutován a z nedávných studií vyplynulo, že s tímto statutem nesouvisí a nebo souvisí jen nepřímo. Příkladem mohou být studie zabývající se monitoringem jejich výskytu či v poslední době tolik diskutovaný statut rostlinných endofytů (Vega 2008). Schopnost entomopatogenních hub přežít v nehostitelském prostředí (v půdě) je doložena řadou studií zabývající se monitoringem jejich výskytu (Keller and Zimmermann 1989; Mietkiewski et al. 1997; Vänninen 1995; Chandler et al. 1997). Dále fakt, že je možné EPFs produkovat na umělých živných médiích či na přirozených substrátech potvrzuje jen to, že jsou schopny v nehostitelském prostředí přežít, ale i se v něm množit. V přírodních podmínkách na spory entomopatogenních hub působí řada biotických a abiotických faktorů, které výrazně ovlivňují denzitu a klíčení spor (Walstad et al. 1970; Lingg and Donaldson 1981). V porovnání s pokusy, které probíhaly ve sterilní půdě, kde se tyto fungistatické účinky „nesterility“ neprojevovaly. Stejně tak mohou mít na perzistenci a klíčení spor vliv externí nutriční zdroje, či přítomnost hostitele. Tyto faktory mohou pozitivně ovlivnit klíčení a následnou kolonizaci prostředí entomopatogenní houbou. Pokusy prováděné v této práci, probíhaly v půdním substrátu speciálně připraveném ze směsi pěstebního substrátu a písku. Navíc byl tento substrát před každým pokusem důkladně vysterilován. Výsledky této experimentální části přinášejí zajímavé závěry. Oba testované druhy entomopatogenních hub se byly schopny v nehostitelském namnožit a zvýšit tak koncentraci spor inokulovaných do půdy od počátku testu až o dva řády. Z hodnot však nelze jednoznačně říci, zda nepřítomnost

hostitele zvýšila/snížila množství CFU/ml získaných z půdního výluhu. Ekesi et al. (2003) zaznamenal v testech sledující účinnost *M. anisopliae* vůči larvám vrtule třešňové (*Ceratitis capitata*) signifikantní navýšení množství spor jednoho kmene oproti ostatním testovaným kmenům v původně aplikovaném titru spor. Nebyl však schopen toto navýšení logicky odůvodnit. Podobné výsledky navýšení denzity spor v půdě bez zdůvodnění prezentoval i Müller-Kögler and Zimmermann (1986) v pokusech s *B. bassiana* jak v polních tak laboratorních pokusech. Obecně však autoři konstatovali, že se podíl spor v půdě v čase snižuje, neboť během sledování došlo k poklesu houbového inokula v půdě o dva až tři řády (z původní 10^6 /g půdy na 10^4 - 10^3 g/půdy). Taktéž ve studii sledující perzistenci *B. brogniartii* po aplikaci do prostředí v nepřítomnosti hostitelských larev chrousta obecného (*Melolontha melolontha*) byl prokázán signifikantní pokles inokula v půdě (až o 90%). V půdách s vysokým obsahem organické hmoty byl tento pokles mnohem výraznější. Podobné výsledky jsou prezentovány v souvislosti s perzistencí spor *B. bassiana* týmem autorů Gaugler et al. (1989) či Storey (1989). Naopak o *M. anisopliae* je známo, že je schopná přežívat v nehostitelském prostředí mnohem déle než ostatní druhy entomopatogenních hub (Vänninen et al. 2000). Dočasné navýšení denzity tohoto druhu v nepřítomnosti hostitele bylo zaznamenáno ve studii Fargues and Robert (1985), jež vysvětlili toto navýšení mikrocyklickou konidiací nebo je možné, že se v prostředí mohl vyskytnout jiný citlivý hostitel (Vänninen et al. 2000). Pokusy této experimentální části probíhaly v kontrolovaných podmínkách, a tudíž lze přepokládat, že na spory aplikovaných hub nepůsobily přírodní vlivy abiotického či biotického charakteru. Experiment probíhal dokonce v optimálních vlhkostních a teplotních podmínkách, navíc ve sterilní půdě s obsahem organického materiálu. Tyto předpoklady mohly vést pravděpodobně k saprotrofickému namnožení houby na zdrojích organického materiálu půdního substrátu. Další uvažovanou možností mohlo být, že růst a namnožení hub mohlo být podpořeno přítomností svleček larev *T. molitor*, které mohly sloužit jako vhodný nutriční zdroj navíc s obsahem chitinu. Smith and Grula (1981) prokázali, že klíčení a růst *B. bassiana* je ovlivněno přítomností dusíkatých a uhlíkatých látek. Uhlíkaté sloučeniny musí být přítomny ve fázi klíčení a dusíkaté látky jsou nutné pro následný vývoj houby. Jak studie ukázala, pro utilizaci dusíku byla houba schopna využít jak organických tak anorganických zdrojů. Závěrem šlo tedy konstatovat, že *B. bassiana* byla schopna udržet se a vyvíjet se v různých prostředích, které poskytují základní živiny pro její přežívání.

Další část práce se zabývala činností profylakticky aplikovaných hub a více méně navazovala a rozšiřovala poznatky studie předchozí. V této části se podařilo potvrdit zvýšenou účinnost obou druhů hub preventivně aplikovaných do půdního substrátu. Jak *I. fumosorosea*, tak *B. bassiana* zaznamenaly signifikantní navýšení účinnosti a to jak v parametrech kumulované mortality, tak v indexu FDI. Tento efekt se projevil zvláště u nižších aplikovaných koncentrací. Tento poznatek je důležitý zvláště z pohledu ekonomického, kdy profylaktickou aplikací nižší dávky spor entomopatogenních hub dosáhneme ve finále srovnatelnou účinnost jako v kurativním ošetření dávkou o několik řádů vyšší. Nehledě na další možné pozitivní necílové účinky, jež byly pozorovány v práci Bohatá (2005) v souvislosti s aplikací *I. fumosorosea* na kolonizaci rostlin a následný vývoj populací molice skleníkové (*T. vaporariorum*) na sazenicích okurky seté. Při sledování průběhu kolonizace rostlin se dospělci molice skleníkové záměrně vyhýbaly ošetřeným rostlinám. Preference res. avoidance tohoto typu byla v pokusech zaznamenána opakovaně a potvrzuje dřívější zkušenosti týmu autorů Osborne and Landa (1992).

Na úplný závěr této části práce zaměřené na studium účinků *I. fumosorosea* a *B. bassiana* lze konstatovat, že se podařilo prokázat vysokou účinnost obou druhů hub vůči larvám *T. molitor* navíc posílenou profylaktickou aplikací.

6.5 Studium interakcí mezi entomoparazitickými hlísticemi a entomopatogenními houbami v půdním substrátu a detailní náhled na přímou interakci mezi *S. carpocapsae* a entomopatogenními houbami

Díky politice prosazující biologické přístupy v řešení problémů s významnými hmyzími škůdci se v posledních letech zájem o kombinace entomopatogenních organismů výrazně zvýšil. Zvláště lze pozorovat tento trend v případě entomopatogenních hub a hlístovek. Všechny doposud publikované práce shrnují výsledky jak laboratorních, tak polních pokusů a zabývají se vlivem kombinace na celkovou mortalitu hmyzího škůdce. V této části práci je kladen důraz na detailnější charakteristiku vlivu kombinace a zastoupení jednotlivých agens na mortalitě hostitelských larev. Navíc byl sledován vliv prekolonizace půdního prostředí oběma entomopatogeny na výše zmiňované charakteristiky.

Do kombinačních testů byl z hlístovek vybrán druh *S. carpocapsae*, neboť prokázal vůči larvám *T. molitor* nejvyšší účinnost (viz. 6.2.). Tento druh byl následně testován v kombinaci jak s *B. bassiana*, tak s *I. fumosorosea*. Z výsledků vyplývá, že po 7 dnech testu v kurativních kombinacích převažovaly antagonistické vztahy (tzn. společná kombinace dosáhla nižší účinnosti, než-li samotná aplikace jednoho z agens) a to jak u simultánní, tak delay variantě. Kaya (2002) uvádí, že antagonistické působení mezi entomopatogenními hlístovkami a jinými patogeny je přisuzováno především nepřímým interakcím, které jsou spojeny s kompeticí o potravní zdroje ve společném hostiteli. Tyto jevy se však obecně projevují vlivem na vývoj či reprodukci hlístic a ne na schopnost hostitele zabít. V této práci byly zaznamenány po 14 dnech, až na pár výjimek, aditivní interakce. Podobné účinky byly potvrzeny i Shapiro- Ilan et al. (2004) v testech na larvách *Curculio caraye* (Coleoptera: Curculionidae), ve kterém bylo proti larvám tohoto škůdce testována kombinace *H. indica* nebo *S. carpocapsae* s houbami *B. bassiana*, *M. anisopliae* či *P. fumosorosea*. Mortalita larev byla zjišťována po 14 dnech a ve všech sledovaných kombinacích kromě *H. indica* s *M. anisopliae* byl zjištěno antagonistické působení kombinací jednotlivých agens. Nicméně většina doposud publikovaných studií potvrzuje spíše aditivní až synergistické vztahy v působení mezi aplikovanými houbami a hlístovkami. V pokusech Ansari et al. (2004, 2006) byla testována týmem autorů kombinace *M. anisopliae* s *H. bacteriphora* či *S. glaseri* proti larvám *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae). Zjištěné výsledky v polních pokusech potvrdily aditivní až synergistické působení obou agens na mortalitu larev chroustů. Stejně tak v boji proti larvám lalokonosce libečkového (*Othiorhynchus sulcatus*) zaznamenala kombinace houby *M. anisopliae* a třech druhů hlístovek vesměs synergistické účinky (Ansari et al. 2008). Ve variantě, kde byl testován profylaktický vliv aplikace na následnou účinnost kombinovaných bioagens převažovaly, na rozdíl od kurativní aplikace, již od počátku testu aditivní vztahy a to jak u kombinace s *B. bassiana* tak *I. fumosorosea*. Rozdílnost v účinnosti mezi oběma variantami je vysvětlitelná zvláště pohlédneme-li na strukturu populace. Díky namnoženému houbovému inokulu v půdě, byly larvy vystavovány výraznému infekčnímu tlaku a tím pádem se v prekolonizované variantě vyskytuje nejen vyšší mortalita, ale z více než 90% se na této mortalitě podílely právě entomopatogenní houby. Struktura populace u varianty bez prekolonizace po 7 dnech po ošetření kombinací bioagens prokázala vyšší podíl hlístovek na celkové mortalitě larev. Barbercheck and Kaya (1990) ve své studii potvrdili ten samý závěr. V pokusu byl testován vliv simultánní aplikace *S. feltiae* nebo *H. heliothidis* s houbou *B. bassiana* na larvy *G. mellonella*. 3 dny od iniciace testu převažovaly v populacích larev jedinci infikovaní výhradně hlístovkami. Tento jev je snadno vysvětlitelný biologickými atributy, kterými hlístovky obecně oplývají. Díky jejich schopnosti napadat a usmrtit svého hostitele v poměrně krátkém časovém intervalu je tato schopnost řadí mezi silné kompetitory v porovnání s houbami, u kterých infekce probíhá nesrovnatelně pomaleji. Důležitým faktorem, který hraje v kolonizaci hostitele hlístovkami jsou symbiotické bakterie. Ty produkují po proniknutí do hostitele celou řadu toxinů a látek antibiotické povahy, jež

dokáží potlačit růst a vývoj dalších možných konkurenčních mikroorganismů. Také Barbercheck and Kaya (1990) potvrdili antagonistický vztah mezi symbiotickými bakteriemi *Xenorhabdus nematophilus* a *X. luminescens* (syn. *Photorhabdus luminescens*) a houbou *B. bassiana*. Primární forma bakterií signifikantně ovlivnila růst entomopatogenní houby. V závěru testu se po 14 dnech podíl hub v kombinovaných pokusech navýšil, zvláště ve variantě s *B. bassiana* je tento posun patrný. Tento průběh infekce by mohl být vysvětlen tím, že hlístovky realizovaly svůj potenciál v prvních fázích testu a jejich účinnost pak setrvala na stejné úrovni až do konce. Houby na druhé straně dokázaly využít potenciálu larev hlísticemi nenapadenými a doslova „vyčtyat“ zbylé zdravé larvy potemníka moučného.

Lze tedy konstatovat ze zjištěných výsledků, že mezi houbami a hlístovkami převažovaly spíše vztahy antagonistické. Neznamená to však, že by bylo vhodné vyhnout se kombinaci těchto dvou skupin bioagens v případě praktických aplikací. Díky rychlému účinku hlístovek by se tohoto efektu dalo využít v rychlém kurativním zásahu proti danému škůdci. Hlístovky by tak mohly působit na počátku ochranného opatření a houby by pak poskytovaly následnou perzistentní ochranu. A ačkoliv by došlo pravděpodobně ke kompetici obou bioagens v prostředí, dokázaly by poskytnout dlouhotrvající a efektivní ochranu.

V návaznosti na předchozí studii byl proveden experiment, jenž byl založen na přímých interakcích obou entomopatogenních agens. Kromě simultánní aplikace byl zvolen i model s různými časovými rozestupy mezi iniciací houbové infekce a introdukce hlístovky. V pokusech byly sledovány kromě kvantitativních charakteristik (celková mortalita a LT_{50}) také kvalitativní (vliv hlístovek na vývoj entomopatogenních hub). Vliv *S. carpocapsae* na vývoj entomopatogenních hub byl zaznamenáván pomocí stupnice FDI. Snahou tohoto experimentu bylo detailněji nahlédnout do interakčního systému houba/hlístice/hostitel a určit, zda se tento systém mění v závislosti na načasování, resp. zda se kompetice obou patogenů ve společném hostiteli mění ve prospěch jednoho či druhého patogena v závislosti na odstupu mezi jednotlivými aplikacemi. Přínosem této části je i poměrně detailní pozorování vývoje infekce v čase.

Z hodnot LT_{50} pro kombinaci s *B. bassiana* se jasně prokázal vliv simultánní aplikace na zkrácení periody infekce. Hodnota letálního intervalu se v porovnání s aplikacemi samostatných agens viditelně zkrátila. Podobné výsledky prezentují i Acevedo et al. (2007). Se zvyšujícím se odstupem od iniciace infekce houbou a následnou introdukcí hlístovky se interval pro infekci prodlužoval. Barberecheck and Kaya (1990) ve svém pokusu prokázali signifikantní vliv oddělených aplikací hub a hlístovek na rychlost vývoje infekce na larvách *G. mellonella*. Hlístovky byly aplikovány v rozestupu od nultého do pátého dne od iniciace houbové infekce a s prodlužujícím se rozstupem se rychlost infekce signifikantně prodloužila. Stejně tak Zayed et al. (2007) uvádí urychlení infekce v podobě navýšení mortality larev *G. mellonella* po společné aplikaci hlístovek *H. bacteriophora* nebo *Steinernema* sp. v kombinaci s *B. bassiana*. U *I. fumosorosea* se tento trend tak výrazně neprojevil. Zde byl naopak detekován výrazný negativní vliv simultánní aplikace na hodnotu LT_{50} , jež dosahovala vyšších hodnot v porovnání se samostatnými aplikacemi jednotlivých agens. Tato negativní interakce by mohla být způsobena určitým druhem toxinů, které jsou entomopatogeny produkovány po iniciaci infekce. Altre and Vandenberg (2001) prokázali, že některé kmeny *I. fumosorosea* jsou schopny penetrovat do hemocelu hostitele během 22 hodin. V této době je penetrující hyfa schopna produkovat řadu inhibičních látek, které by mohly působit antagonisticky s látkami, jež produkují symbiotické bakterie entomopatogenních hlístovek. Tak by mohlo dojít ke vzájemné redukci těchto toxických látek v hostiteli a tím i ke snížení potenciálu k usmrcení hostitele (Akhurst 1982; Webster et al. 2002).

Kromě výše zmiňovaných kvantitativních charakteristik byl sledován i vliv hlístovky na vývoj entomopatogenních hub. Z celkového množství dosud publikovaných prací se jen velmi malá část zabývá touto problematikou. Z výsledků této studie vyplývá, že hlístovky významně ovlivnily vývoj obou studovaných druhů hub. Tento efekt je nejvíce patrný v simultánní aplikaci, kdy byly shodně u obou variant detekovány v převážné většině případů larvy jen se slabým porůstáním mycelia na povrchu. Obecně lze říci, že v raných fázích houbové infekce nebyly houby schopny konkurovat napadení hlístovkami. Téměř na 60% hmyzích larev u *I. fumosorosea* a 40% u *B. bassiana* byl úspěšně realizován vývoj hlístovek, zbytek larev vykazoval symptomy typické pro infekci symbiotickými bakteriemi rodu *Xenorhabdus*. I přes to se však na larvách vykazujících symptomy infekce způsobené výhradně hlísticemi, objevovaly známky slabého růstu mycelia. K podobným závěrům došel Zayed et al. (2003), kteří detekovali pátý den po společné infekci slabý růst mycelia *B. bassiana* na larvách infikovaných hlístovkami. Tým autorů Barbercheck and Kaya (1990) prokázal, že houby nebyly schopny realizovat svůj vývoj v prostředí již od počátku testu kolonizovaným hlístovkami. Se zvyšujícím se časovým odstupem od iniciace houbové infekce a následné introdukce hlístovek se tento poměr však obracel ve prospěch houbového patogena. Tento poznatek potvrzuje i tato studie, neboť už po 24 hodinách byly houby schopny realizovat vývoj na stupeň 2,15 u *B. bassiana*. *I. fumosorosea* se v konkurenčním prostředí dokázala prosadit až při odstupu 96 hodin, kdy hodnota FDI dosáhla 2,10. *B. bassiana* celkově prokázala vyšší schopnost konkurence, neboť zaznamenala počátky vzniku reprodukčních útvarů na povrchu mycelia již při 48 hod odstupu. V populaci larev se vyskytovalo jen 30% larev vykazujících úspěšnou infekci hlísticemi. Ve variantě s 96 hodinovým odstupem se larev se zjevnou infekcí hlístovkami objevilo už jen 10%. *B. bassiana* v této variantě zaznamenala na většině larev plně sporulující mycelium a přiblížila se tak hodnotám dosaženým v samostatné aplikaci. *I. fumosorosea* se prokázala jako druhem méně konkurence schopným. Její vývoj výrazně ovlivněn přítomností hlístic po celou dobu testu. Zároveň však nebyl prokázán významnější výskyt larev s úspěšnou infekcí *S. carpocapsae*. Z celkového počtu usmrcených larev se u varianty 96 hod jen u 10% z nich uvolňovaly infekční larvy do okolí. Tato situace je pravděpodobně zapříčiněná antagonistickým působením mezi oběma patogeny. Hlístovky mohly sice úspěšně proniknout do předem fungální infekcí oslabené larvy *T. molitor* a mohly dokonce do určité míry kooperovat ve společném prostředí, ale díky již poměrně pokročilé kolonizaci hostitele houbou, nemohly realizovat svůj vývoj do konce (Kaya 2002). Důležitou roli při tom mohly hrát opravdu látky produkované samotnou houbou, neboť některé houby rodu *Paecilomyces* resp. *Paecilomyces lilacinus* je považován za nematofágní druh (Dube and Smart 1985; Bonants et al. 1995; Al-Raddad 1995) s produkcí řady lytických látek, jež pomáhají tomuto druhu při pronikání do vajíček fytoparazitických nematod (Khan et al. 2003).

Z výsledků vyplynulo, že houby jsou schopny konkurovat nejen ve společném prostředí (viz. část diskuze zabývající se účinností kombinace hub a hlístovek v půdním substrátu), ale jsou schopny za jistých okolností konkurovat i ve společném hostiteli i s tak agresivními kompetitory, jakými hlístovky bezesporu jsou, díky schopnosti kolonizovat rychle svého hostitele a pomocí antibiotické aktivity symbiotických bakterií vyloučit houby či jakékoliv jiné možné mikroorganismy z osídleného prostředí. Na základě těchto výsledků lze také říci, že ne všechny entomopatogenní druhy hub se chovají ve společném prostředí s hlístovkou stejně a že existují pravděpodobně jisté skryté mechanismy, které řídí vztahy mezi jednotlivými druhy entomopatogenů uvnitř společného hostitele.

7 ZÁVĚRY

1. Vitalita hlístovky *S. feltiae* nebyla ovlivněna studovanými druhy pesticidů.
2. V testech virulence vykázaly výrazný negativní účinek účinné látky fenpyroximate a tebufenpyrad.
3. Všechny druhy entomopatogenních hlístovek prokázaly vysokou účinnost vůči larvám *G. mellonella*.
4. Larvy *T. molitor* vykázaly vyšší odolnost vůči testovaným druhům hlístovek, nejnižší účinnost proti tomuto škůdci zaznamenala *S. arenarium*.
5. V profylaktické aplikaci reagovala zvýšením účinnosti *S. feltiae*, naopak sníženou účinnost zaznamenal druh *S. carpocapsae*.
6. Výsledky studie sledující vliv teploty na účinnost *S. feltiae* a *S. carpocapsae* ukázaly, že oba druhy vykazují při 25°C srovnatelnou účinnost, v nižších teplotách se projevila jednoznačně účinnější *S. feltiae*.
7. Nízká vlhkost má výrazný vliv na účinnost *S. feltiae* a *S. carpocapsae*. Při zpětném dovlhčení se účinnost vůči larvám *G. mellonella* u obou druhů hlístovek navýšila. U *T. molitor* se tento trend neprojevil.
8. *S. feltiae* vykazovala vyšší toleranci vůči nízké vlhkosti v porovnání se *S. carpocapsae*.
9. Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* prokázala vyšší účinnost v biotestech proti larvám *T. molitor* v porovnání s *B. bassiana*.
10. Byl potvrzen výrazný pozitivní vliv prekolonizace půdního substrátu na účinnost entomopatogenních hub.
11. Oba druhy testovaných entomopatogenních hub se byly schopny namnožit v nepřítomnosti hostitele.
12. Při kurativní aplikaci entomopatogenních hub v kombinaci se *S. carpocapsae* byly zaznamenány v počátku testu převážně antagonistické vztahy mezi oběma bioagens. Na konci byly zaznamenány spíše interakce aditivní. Na celkové mortalitě se podílely v první fázi hlístovky. Později došlo k výraznému navýšení podílu fungální infekce.
13. V profylaktickém použití obou entomopatogenních agens byly zaznamenány u všech kombinací aditivní interakce. Na celkové mortalitě se po dobu celého testu podílely výhradně entomopatogenní houby.
14. V pokusech zaměřených na obecnou charakteristiku interakcí mezi *B. bassiana* a *S. carpocapsae* simultánní aplikace viditelně urychlila průběh infekce. Ostatní kombinace

spíše prodlužovaly dobu k usmrcení hostitele. Se zvyšujícím se odstupem od společné aplikace se vývoj přibližoval hodnotám samostatné aplikace *B. bassiana*.

15. *S. carpocapsae* v kombinaci s *I. fumosorosea* zpomalila průběh infekce. *S. carpocapsae* výrazně ovlivnila průběh vývoje *I. fumosorosea* na larvách *T. molitor*.

8 SUMMARY

The present definition of Integrated Pest Management (IPM) increases emphasis on exploitation biological and biorational methods regulating pest populations. The combination of two naturally occurring entomopathogens is impletion of the idea of biointensive IPM. Implementation of biological methods based on combination of biological agent used for the practical plant protection requires loads of knowledge and experience. The aim of this work is extend the knowledge about interactions between entomopathogenic fungi and nematodes. Primary hypothesis of this doctoral work comes out from the fact, that most of the practical applications of bioagents are oriented to the areas curative effects. Only some works have studied effect of prophylactic using especially in case of entomopathogenic nematodes.

Major goals are defined subsequently:

- Verify kompatibility of *S. feltiae* with commercially accessible pesticides
- Compare the efficacy of chosen species of entomopathogenic nematodes *Steinernema spp.* in curative and prophylactic application
- Determine the influence of temperature and moisture on the efficacy of chosen species of entomopathogenic nematodes
- Compare of the efficacy of chosen species of entomopathogenic fungi on mortality of *T. molitor*.
- Asses the effect of soil colonisation by entomopathogenic fungi with evaluation of ability to multiply in environment and without present insect host.
- Compare interaction among various species of entomopathogenic fungi and nematodes and determine, whether interaction turns dependence on combination of kinds of agens plus timing of application.
- Basic characteristic of system fungi/nematode/host

The survival and infectivity of infective juvenils *Steinernema feltiae* were determined after the exposition to 6 insecticides (a.i. kinoprene, lufenuron, metoxyfenozide, piperonyl-butoxide, pyriproxyfen, tebufenozide) 7 acaricides (a.i. azocyclotin, clofentezin, diafenthuiuron, etoxazole, fenbutatinoxide, fenpyroximate, tebufenpyrad) and 4 fungicides (a.i. captan, fenhexamid, kresoxim-methyl, nuarimol) in laboratory condition. *S. feltiae* was tolerant to all tested insecticides and fungicides, mortality varied between 2.26-18.68 % and 7.04-8.86% respectively during 72 hours. Acaricides a.i. fenpyroximate and tebufenpyrad influented considerably ability of *S. feltiae* to infect larvae of *Tenebrio molitor*. Tebufenpyrad caused 95% and fenpyroximate 85% reduction in *S. feltiae* virulence. These results suggest that *S. feltiae* can be applied in combination with all tested pesticides except the acaricides a.i. tebufenpyrad and fenpyroximate. Larvae of *G. mellonella* recorded higher susceptibility to the tested nematodes in attempts conducted in the soil substrate compared with larvae of *T. molitor*. LD₅₀ for *G. mellonella* ranged in intervals 61.78 to 129.75 IJs and for *T. molitor* from 110.64 to 2735.73 IJs. Larvae of *T. molitor* recorded high resistance against *S. arenarium*, on the other side showed high susceptibility to *S. carpocapsae*. In the prophylactic application test the soil substrate was colonised by chosen species of the nematode in advance and than the mortality of *T. molitor* larvae was determined. The significant effect of pre-colonisation was confirmed (p<0.05). *S. feltiae* increased the efficacy, whereas *S. carpocapsae* recorded significant decreasing of efficacy. *S. arenarium* recorded only slight growth of efficacy in both tested concentrations. In bioassays conducted under different temperatures significant impact of shifting temperature on the efficacy of both

nematodes species was confirmed. The efficacy decreased with decreasing temperature. The lowest larvae mortality was recorded at temperature 10°C. *S. carpocapsae* respond to decrease of temperature more sensitive than *S. feltiae*. This species showed even higher efficacy at 15°C than at 25°C and kept high efficiency also in the lowest tested temperature. Both nematode species recorded significant reduction of efficacy under the moisture stress. *G. mellonella* mortality was significantly low in regime with 6% (v:v) moisture after 7 days ($p < 0.05$). When was the level of moisture topped on optimum 12% (v:v), the efficacy increased after 14 days. *S. feltiae* recorded significantly higher efficacy than *S. carpocapsae* ($p < 0.05$). Both tested species recorded in the moisture stressing condition even higher larvae mortality than in optimal moisture level after 21 days. This effect was not detected in the test with *T. molitor*.

In the bioassay were also tested two species of entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *I. fumosorosea*. Both species recorded similar efficacy in the lower conidia concentration applied into the soil substrate after 7 days. In the higher concentration, *I. fumosorosea* showed significantly higher *T. molitor* mortality compared to *B. bassiana*. Fungal Development Index (FDI) confirmed the same results that were presented above. In higher concentrations the differences after 14 days were detected. FDI for all tested concentrations recorded statistically significant difference between both species ($p < 0.05$). In general *I. fumosorosea* achieved higher efficacy against *T. molitor* larvae than *B. bassiana*. In the prophylactic application test evaluated effect of pre-colonisation soil substrate on the efficacy of *B. bassiana* as well as *I. fumosorosea*. The significant effect of pre-colonisation was confirmed at both fungi species in all tested concentrations ($p < 0.05$). The most detectable effect was recorded especially in the first week of the test with *B. bassiana*. The effect of increased efficacy in pre-colonised variants came down and the differences between both variants especially in the higher spore concentrations became indistinct after 14 days. The significant difference was detected only at lower concentrations (10^3 and 10^4). Also FDI recorded significant differences between variants ($p < 0.05$). Pre-colonized variants index development drowe at intervals from 2.39-3.00, whereas in non-precolonised variants from 0.65-2.88. Also *I. fumosorosea* responded to the pre-colonization by very fast growth in efficacy as well as in FDI. In the test of impact of pre-colonization on the ability of *B. bassiana* as well as *I. fumosorosea* to multiply in soil substrate was found, that Colony Forming Units (CFU) increased in comparison to CFU recorded 1 day after the application. After 14 days test showed significant growth of the number of CFU at all tested concentrations as compared to numbers gained 1 day after application into the soil ($p < 0.05$). The increase is detectable especially at concentration 10^3 , where the number of CFU rose up significantly. Higher concentrations did not recorded this general mark - up.

In the part concerned on the interactions between entomopathogenic fungi and nematodes in the soil substrate the impact of combination and portion of each single agent on mortality of *T. molitor* larvae was studied. In addition the effect of pre-colonization of soil environment by both entomopatogens on above mentioned characteristics was observed. Application of *B. bassiana* or *I. fumosorosea* in combination with *S. carpocapsae* resulted in increasing of efficacy especially at pre-colonised variants compared to curative ones. Among each variants statistical differences ($p < 0.05$) were detected. The proportions of each entomopathogenic agents on mortality in simultaneous application shifted in time. At the beginning of the test, nematodes in curative application took up generally higher proportion of larvae mortality than fungi (more than 75%). At the end of the test the situation turned and more than half of the efficacy was replaced by fungi. In the prophylactic variant nematodes were suppressed by fungi to the level less than 10%. The interactions among each applied agents in different time resulted in antagonism after 7 days of the test. Only pre-colonised

variants recorded additive interactions. After 14 days more or less additive interactions were confirmed except two models.

In the test observing straight interactions between fungi and nematodes LT_{50} values showed that simultaneous application of *B. bassiana* and *S. carpocapsae* accelerated the process of infection compared to the single agents. Other combination rather extended time to kill the host. There was observed also impact of nematodes on the development of *B. bassiana* infection on larvae of *T. molitor*. Results showed that with the raising exposition to the fungal pathogen and following nematode application increased FDI. The value of variant after 96 hours reached similar results of FDI like single exposition to *B. bassiana* at the end of the test. *I. fumosorosea* recorded different reaction in the presence of the entomopathogenic nematode. Simultaneous application of both entomopathogens slow down the process of infection. The fastest LT_{50} reached single application of *S. carpocapsae*. FDI parameters noted significant influence of application of *S. carpocapsae* on *I. fumosorosea* development especially in early phase, when larvae infected by fungus get to the contact with nematodes directly after application. FDI reached levels of 1.80, whereas single application of *I. fumosorosea* got to the phase 2.60 after 14 days. During the test the variable differences in efficacy especially at variants 48 and 96 were detected. Other variants showed rather antagonism in combination.

Briefly summarized from the observed results. There were predominant rather antagonistic interactions between fungi and nematodes. This observation does not mean that we should avoid the combination of both groups of entomopathogens in practical applications. Because of the fast effect of nematodes we could use this benefit in fast curative hit against the target pest. Nematodes can offer effective protection at the beginning of the program and fungi would then act as a long-term persistent agents in the second protection step. Although both entomopathogen could get probably into the competition but on the other side, they could provide prolonged and efficient protection.

9 SEZNAM LITERATURY

Abbott W.S. (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 265-267.

Acevedo J.P.M., Samuels R.I., Machado I.R., Dolinski C. (2007) Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 96: 187–192.

Agra Gothama A.A., Lawrence G.W., Sikorowski P.P. (1996) Activity and persistence of *Steinernema carpocapsae* and *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae on soybean. *J. Nematol.*, 28: 68–74.

Akbar W., Lord J.C., Nechols J.R., Thomas M. (2005) Efficacy of *Beauveria bassiana* for Red Flour Beetle When Applied with Plant Essential Oils or in Mineral Oil and Organosilicone Carriers *J. Econ. Entomol.*, 98 (3): 683-688.

Arkhurst R.J. (1990) Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. In: Laird M., Lacey L.A., and Davidson E.W. (eds.) Safety of Microbial Insecticides. CRC Press. Boca Raton, FL pp. 233-240.

Arkhurst R.J. (1982) Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 3061–3065.

Al-Raddad A.M. (1995) Interaction of *Glomus mosseae* and *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica* of tomato. *Mycorrhiza*, 5 (3): 233-236.

Altre J.A., Vandenberg J.D. (2001) Penetration of Cuticle and Proliferation in Hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates That Differ in Virulence against Lepidopteran Larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 78: 81–86.

Altre J., Vandenberg J. (2001) Comparison of blastospores of two *Paecilomyces fumosoroseus* isolates: in vitro traits and virulence when injected into fall armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.*, 98: 170–175.

Alumai A., Grewal P. S. (2004) Tank-mix compatibility of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*, with selected chemical pesticides used in turfgrass. *Biocontr. Sci. Tech.*, 14: 725-730.

Alvinerie M., Dupuy J., Eeckhoutte C., Sutra J.F., Kerboeuf D. (2001) In vitro metabolism of moxidectin in *Haemonchus contortus* adult stages. *Parasitol. Res.*, 87: 702–704.

Amarasinghe L.D., Hominick W.M., Briscoe B.R., Reid A.P. (1994) Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *J. Helminthol.*, 68: 277–286.

Anderson, R.M., May R.M. (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85: 411–426.

Anonym (2009)

(http://www.beckerunderwood.com/library/Nematodes_Chemical_Compatibility_05%2007%202008.pdf) (online 2. 3. 2009)

Ansari M.A., Shah F.A., Butt T.M. (2008) Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus* control. *Entomol. Exp. App.*, 129: 340–347.

Ansari M.A., Shah F.A., Tirry L., Moens M. (2006) Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biol. Control*, 39: 453 - 459.

Ansari M.A., Tirry L., Moens M. (2004) Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biol. Control*, 31: 172 – 180.

Ansari M.A., Tirry L., Moens M. (2005) Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *BioControl*, 50: 465 - 475.

Ansari M.A., Tirry L., Moensa M. (2006) Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biol. Control*, 39: 453–459.

Arthurs S., Thomas M.B. (2001) Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78 (2): 59-65.

Barbercheck M.E., Wang J., Hirsh I.S. (1995) Host plant effects on entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 66: 169–177.

Barbercheck, M.E., Kaya, H.K. (1990) Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 55: 225–234.

Batta Y.A. (2007) Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. App. Microbiol.*, 103: 1406 - 1414.

Baur M.E., Kaya H.K., Gaugler R., Tabashnik B. (1997) Effects of adjuvants on entomopathogenic nematode persistence and efficacy against *Plutella xylostella*. *Biocontr. Sci. Technol.*, 7: 513–525.

Begley J.W. (1990) Efficacy against insects in habitats other than soil. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Gaugler R., Kaya H.K. (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 215-231.

Be´lair G., Boivin G. (1995) Evaluation of *Steinernema carpocapsae* Weiser for control of carrot weevil adults, *Listronotus oregonensis* (LeConte) (Coleoptera: Curculionidae), in organically grown carrots. *Biocontrol Sci. Technol.*, 5: 225–231.

- Bidochka M.J., St Leger R.J., Roberts D.W. (1997) Induction of novel proteins in *Manduca sexta* and *Blaberus giganteus* as a response to fungal challenge. *J. Invertebr. Pathol.*, 70: 184-189.
- Boemare N. (2002) Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Entomopathogenic nematology. Gaugler R (ed.). CABI, Oxford, UK, pp 35–56.
- Boemare N.E., Arkhurst R.J. (1988) Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp (Enterobacteriaceae). *J. Gen. Microbiol.*, 134: 751–761.
- Bohan D.A, Hominick W.M. (1996) Investigations on the presence of an infectious proportion amongst populations of *Steinernema feltiae* (Site 76 strain) infective stages. *Parasitology*, 112: 113–118.
- Bohatá A., (2005) Využití entomopatogenních a mykoparazitických hub v ochraně sazenic rychlené zeleniny a okrasných květin. Disertační práce. 173 pp.
- Bonants P.J.M., Fitters P.F.L., Thijs H.A (1995) A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiol.*, 141: 775-784.
- Boucias D.G., Pendland J.C., Latge J.P. (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticule. *App. Environ. Microbiol.*, 54: 1795-1805.
- Boucias D.G., Pendland J.C., Latge J.P. (1991) Attachment of mycopathogens to cuticule: the initial event of mycoses in arthropod hosts. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press. Cole, G.T. Hoch, H.C. (eds.), New York pp. 101–128.
- Bovien P. (1937) Some types of association between nematodes and insects. *Vidensk Medd Dan Naturhist Foren Kbhobenhavn*, 101:1–114.
- Bracken G.K. (1990) Susceptibility of first-instar cabbage maggot, *Delia radicum* (L.) (Anthomyiidae: Diptera) to strains of the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* Filipjev, *S. bibionis* (Bovien), *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, and *H. heliothidis* (Khan, Brooks, and Hirschmann). *Can. Entomol.*, 122: 633–639.
- Brown I.M., Shapiro-Ilan D.I., Gaugler R.R. (2006) Entomopathogenic nematode infectivity enhancement using physical and chemical stressors. *Biol. Control*, 39: 147–153.
- Bruck D.J., Lewis L.C. (2002) Whorl and pollen-shed stage application of *Beauveria bassiana* for suppression of adult western corn rootworm. *Ent. Exp. App.*, 103: 161 - 169.
- Bruck D.J., Walton V.M. (2007) Susceptibility of the filbertworm (*Cydia latiferreana*, Lepidoptera: Tortricidae) and filbert weevil (*Curculio occidentalis*, Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 96: 93- 96.

- Burman M. (1982) *Neoaplectana carpocapsae*: Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica*, 28:62-70.
- Butt T.M. (2002) Use of Entomogenous Fungi for the Control of Insect Pests. In: The Mycota XI. Agricultural applications. Kempken F. (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 110-134.
- Butt T.M., Goettel M.S. (2000) Bioassays of Entomopathogenic Fungi. In: Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. Navon A., Ascher K.R.S. (eds.), CAB International, Wallingford, UK pp. 95-140.
- Cabanillas H. E., Raulston J.R. (1994) Pathogenicity of *Steinernema riobraviss* against corn earworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). *Fund. App. Nematol.*, 17: 219–223.
- Campbell J., Lewis E., Yoder F., Gaugler R. (1995) Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae and Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in Turfgrass. *Biol. Control*, 5: 598–606.
- Campbell J.F., Gaugler R. (1997) Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum? *Fundam. App. Nematol.*, 20: 393- 398.
- Campbell J.F., Kaya H.K. (2000) Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.). *Behaviour*, 137: 591–609.
- Castineiras A., Pena J.E., Duncan R., Osborne L. (1996) Potential of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as biological control agents of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Flor. Entomol.*, 79: 458–461.
- Clark T.B., Kellen W.R., Fukuda T., Lindegren, J.E. (1968) Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, 11: 1-7.
- Converse V., Miller R. W. (1999) Development of the One-on-One Quality Assessment Assay for Entomopathogenic Nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 74(2): 143-148.
- Daane, K.M., Williams, L.E. (2003) Manipulating vineyard irrigation amounts to reduce insect pest damage. *Ecol. Appl.*, 13: 1650–1666.
- De Faria M.R., Wraight S.P. (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*, 43: 237–256.
- De Nardo E.A.B., Grewal P.S. (2003): Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematode: Steinernematidae) with Pesticides and Plant Growth Regulators Used in Glasshouse Plant Production. *Biocontrol Sci. Technol.*, 13(4): 441-448.
- Del Pino F.G., Morton A. (2005) Efficacy of entomopathogenic nematodes against neonate larvae of *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae) in laboratory trials. *BioControl*, 50(2): 307-316.

- Del Pino, F.G., Jove M. (2005) Compatibility of entomopathogenic nematodes with fipronil. *J. Helminthol.*, 79: 333-337.
- Dirlbeková O. (1991) Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (I. Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.) Studie VTR, ÚVTIZ, Ř. Rostl. Vyr. 11: 10 - 21.
- Doberski J.W. (1981) Comparative laboratory studies On three Fungal Pathogens of the Elm Bark Beetle *Scotylus scotylus*: Effect of Temperature and Humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 37: 195-200.
- Draganova S. (2006) Bioassays with isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Paecilomyces farinosus* (Holm.) Brown & Smith against *Ips sexdentatus* Boerner And *Ips acuminatus* Gyll. (Coleoptera: Scolytidae). *Plant Sci.*, 44: 24-28.
- Dube B., Smart Jr. G.C. (1987) Biological Control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *J. Nematol.*, 19 (2): 222–227.
- Dutky, S. R. (1937) Investigations of the diseases of the immature stages of the Japanese beetle. Ph.D. dissertation. Rutgers University, New Brunswick, NJ.
- Eidt D.C., Thurston G.S. (1995) Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworm (Coleoptera: Elateridae) and other soil pests. *Can. Entomol.*, 127: 423–429.
- Ekesi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A. (2003) Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *J. Invertebr. Pathol.*, 83: 157–167.
- Emelianoff V., Chapuis E., Le Brun N., Chiral M., Moulia C., Ferdy J.-B. (2008) A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts. *Evolution*, 62: 932 - 942.
- Endo B.Y., Nickle W.R. (1994) Ultrastructure of the buccal cavity region and oesophagus of the insect parasitic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematologica*, 40: 379–398.
- Epsky N.D., Walter D.E., Capinera, J.L. (1988) Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 821–825.
- Fan X., Hominick W.M., (1991a) Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two Steinernema species (Nematoda: Steinernematidae). *Rev. Nemat.*, 14: 407 - 412.
- Fan X., Hominick W.M., (1991b) Efficiency of the Galleria (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil. *R. Nemat.*, 14: 381 - 387. (Abstract in English)
- Fargues J., Goettel M.S., Smith N., Ouedraogo A., Rougier M. (1997) Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 83 (3): 383-392.

- Fargues J., Goettel M.S., Smits N., Ouedraogo A., Vidal C., Lacey L.A., Lomer C.J., Rougier M. (1996) Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathol.*, 135: 171-181.
- Fargues J., Robert P.-H., Reisinger O. (1979) Formulation des productions de masse de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 11: 247-257. (In French, English abstract)
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994) Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Sci. Technol.*, 4: 3-34.
- Ferron P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.*, 23: 409-442.
- Forst S., Clarke D. (2002) Bacteria-nematode symbiosis. In: Entomopathogenic Nematology. Gaugler, R. (ed.), CABI Publishing, Cambridge MA, USA pp. 57-77.
- Forst S., Neelson K. (1996) Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.*, 60: 21-43.
- Führer E., Rosner S., Schmied A., Wegensteiner R. (2001) Studies on the significance of pathogenic fungi in the population dynamics of the lesser spruce sawfly, *Pristiphora abietina* Christ. (Hym., Tenthredinidae). *J. App. Entomol.*, 125: 235 - 242.
- Fujiie A., Yokohama T. (1998) Effects of ultraviolet light on the entomopathogenic nematode, *Steinernema kushidai* and its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus japonicus*. *Appl. Ent. Zool.*, 33: 263-269.
- Fujiie A., Yokoyama T., Fujikata M., Sawada M., Hasegawa M. (1993) Pathogenicity of an entomogenous nematode, *Steinernema kushidai* mamiya (Nematode, Steinernematidae), on *Anomala cuprea* (Coleoptera, Scarabeidae). *Jap. J. App. Entomol. Zool.*, 37: 53-60.
- Gaugler R., Bednarek A., Campbell J. (1992) Ultraviolet inactivation of heterorhabditid and steinernematid nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 59 (2): 155-160.
- Gaugler, R., Costa S.D., Lashomb J. (1989) Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculations. *Environ. Entomol.*, 18: 412-417.
- Georgis R., Manweiler S.A. (1994) Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. In: Agricultural Zoology Reviews. K. Evans (ed), Intercept, Andover. pp. 63-94.
- Gibb T.J., Buhler W.G. (1998) Infectivity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) in sterilised and herbicide - treated soil. *J. Entomol. Sci.*, 33: 152-157.
- Gillespie J.P., Bailey A.M., Cobb B., Vilcinskis A. (2000) Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch. Insect Biochem.*, 44: 49-68.
- Gilmore S.K., Potter D.A. (1993) Potential role of Collembola as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes. *Pedobiologia*, 37: 30-38.

- Gindin G., Geschtovt N.U., Raccach B., Barash I. (2000) Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica*, 28 (3): 229-239.
- Glaser R.W., H. Fox. (1930) A nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). *Science*, 70: 16-17.
- Glazer I. (1992) Survival and efficacy of *Steinernema carpocapsae* in an exposed environment. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2: 101–107.
- Glazer I. (2002) Survival Biology. In: Entomopathogenic Nematology. R. Gaugler (ed.), CABI. pp. 169-180.
- Gordon R., Chippett J., Tilley J. (1996) Effects of two carbamates on infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* all strain and *Steinernema feltiae* Umea strain. *J. Nematol.*, 28: 310-317.
- Gottlieb D. (1976) Production and role of antibiotics in soil. *J. Antibiot.*, 29: 987-1000.
- 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.
- Grant J. A., Villani M. G. (2003) Effects of Soil Rehydration on the Virulence of Entomopathogenic Nematodes. *Environ. Entomol.* 32 (5): 983- 991.
- Grewal P.S., Gaugler R., Kaya H.K. (1993) Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematoda: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 22-28,
- Grewal P.S., Selvan S., Gaugler R. (1994) Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *J. Therm. Biol.*, 19: 245-253.
- Grewal P.S., Smith C. (1995) Insect-parasitic nematodes for mushroom pest control. *Mushroom News*, 14: 15-25.
- Griffin C.T., Downes, M.J. (1991) Low temperature activity in *Heterorhabditis* sp.(Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica*, 37: 83–91.
- Groden E., Lockwood J.L. (1991) Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *J. Invertebr. Pathol.*, 57: 7-16.
- Hall R.A. (1981) The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Burges H.D. (ed.), Academic Press, London pp. 483-498.
- Han R.C., Ehlers R.-U. (2001) Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the in vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS Microbiol Ecol.*, 35: 239–247.

- Hara A.H., Kaya H.K. (1982) Effects of selected insecticides and nematicides on the in vitro development of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *J. Nematol.*, 14: 486-491.
- Hara A.H., Kaya K.K., Gaugler R., LeBeck L.M., Mello C.L (1993) Entomopathogenic nematodes for biological control of the leafminer, *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Entomophaga*, 38: 359-369.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C., Pegler D.N. (eds.) (1995) Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, UK.
- Head J., Walters K. F. A., Langton S. (2000) The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. *BioControl*, 45: 345-353.
- Head J., Walters K.F.A. (2003) Augmentation biological control utilizing the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. Proc. First Int. Symp. Biol. Control, Hawaii, USA pp. 136-140.
- Head J., Walters K.F.A., Langton S. (2000) The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. *BioControl*, 45: 345-353.
- Hicks B.J., Watt A.D., Cosens D. (2001) The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Forest. Ecol.Manag.*, 149: 275 - 281.
- Hirte W.F., Glathe I., Adam H. (1989) Production and application of microbial preparation with *Aschersonia* spores. *Zentrallbl. Microbiol.*, 144: 155-162.
- Horňák P. (2004) Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdních ekosystémech. Disertační práce. České Budějovice pp. 108.
- Hominick W.M., Reid A.P. (1990) Perspectives on entomopathogenic nematology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Gaugler R., Kaya H.K. (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 327-345.
- Hominick W.M., Reid A.P., Bohan D.A., Briscoe B.R. (1996) Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the Convention on Biological Diversity. *Biocontr. Sci. Technol.*, 6: 317-331.
- Humber R.A. (1997) Fungi: Identification. In: Manual of Techniques in Insect Pathology, Lacey L.A. (ed.) pp. 123-150.
- Chandler D., Hay D., Reid A.P. (1997) Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Appl. Soil Ecol.*, 5: 133-141.
- Chen S., Li J., Han X., Moens M. (2003) Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. *BioControl*, 48: 713-724.
- Cheng C.C, Hou R.F. (1997) Influence of soil texture and presence of roots on host finding by *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Invertebr. Pathol.*, 58: 279-280.

Cherkupally S. R., Avula S., Adki N. (2005) Synthesis, Nematicidal and Antimicrobial Properties of Bis-[4-methoxy-3-[3-(4-fluorophenyl)-6-(4-methylphenyl)-2(aryl)-tetrahydro-2Hpyrazolo[3,4-d]thiazol-5-yl]phenyl]methanes. *Chem. Pharm. Bull.*, 57(7): 685—693.

Choo H.Y., Kaya H.K., Huh J., Lee D.W., Kimm H.H., Lee S.M., Choo Y.M. (2002) Entomopathogenic nematodes (*Steinenema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*) and fungus *Bauveria brongniartii* for biological control of white grubs, *Ectinopholia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf course. *BioCon.*, 47: 177 - 192.

Choo H.Y., Kim H.W. Lee D.W., Park Y.D. (1996) Microbial control of fly maggots with entomopathogenic nematodes and fungus in outhouses of farmhouses. *Kor. J. App. Entomol.*, 35: 80–84.

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

Inglis P.W., Tigano M.S. (2006) Identification and Taxonomy of Some Entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) Isolates Using rDNA-ITS Sequences. *Gen. Molec. Biol.*, 29: 132-136.

Ishibashi N., Takii S. (1993) Effects of insecticides on movement, nictation and infectivity of *Steinernema carpocapsae*. *J. Nematol.*, 25: 204-213.

Jaffee B.A., Muldoon A.E., Tedford E.C. (1992) Trap production by nematophagous fungi growing from parasitized nematodes. *Phytopathology*, 82: 615–620.

Jagdale G.B., Casey M.L., Grewal P.S., Lindquist R.K. (2004) Effects of application rate and timing, potting medium and host plant on efficacy of *Steinernema feltiae* against fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. *Biol. Control*, 29: 296–305.

Jagdale G.B., Grewal P.S. (2007) Storage temperature influences desiccation and ultra violet radiation tolerance of entomopathogenic nematodes. *J. Therm. Biol.*, 32: 20–27.

Johnigk S.A., Ehlers R.U. (1999) *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology*, 1 (7-8): 717-726.

Joshi L., St. Leger R.J. (1999) Cloning, expression and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *J. Biol. Chem.*, 274: 9803-9811.

Kakouli-Duarte T., Hague N.G.M. (1999) Infection, development, and reproduction of the entomopathogenic nematode *Steinernema arenarium* (Nematoda: Steinernematidae) in the black vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematology*, 1: 149 - 156.

Katsurada W. (2009) Nematicidal pyrazoles
<http://www.freepatentsonline.com/y2003/0028034.html> (online 1. 12. 2009).

- Kavková M., Čurn V. (2005) *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia*, 159: 53-63.
- Kaya H.K. (1990) Soil ecology. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Gaugler, R. and Kaya, H.K. (eds), CRC Press, Boca Raton, Florida pp. 93–115.
- Kaya H.K. (2002) Natural enemies and other antagonists. In: Entomopathogenic Nematology. Gaugler, R. (ed.), CABI, New York pp. 189–204.
- Kaya H.K., Koppenhöfer A.M. (1996) Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontr. Sci. Tech.*, 6: 357–371.
- Kaya H.K., Koppenhöfer A.M., Johnson M. (1998) Natural enemies of entomopathogenic nematodes. *Japan.J. Nematol.*, 28: 13–21.
- Kaya H.K., Stock S.P. (1997) Techniques in insect nematology. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey L. A. (ed.), Academic Press, San Diego, CA pp. 281 - 324.
- Kaya, H.K., Burlando, T.M. (1989) Development of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in diseased insect hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 53: 164–168.
- Keller S., Zimmermann G. (1989) Mycopathogens of soil insects. In: Insect-Fungus Interactions. Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (eds.), Academic Press, London pp. 239-270.
- Kendrick M. (2000) The Fifth Kingdom, 3rd ed. Mycologue Publications, Sidney, Australia.
- Kerboeuf D., Soubieux D., Guilluy R., Brazier J.-L., Riviere J.-L. (1995) In vivo metabolism of aminopyrine by the larvae of the helminth *Heligosomoides polygyrus*. *Parasitol. Res.*, 81: 302–304.
- Khan A., Williams K., Molloy M. P., Nevalainen H. (2003) Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein. Expres. Pur.*, 32: 210–220.
- Kim H.W., Choo H.Y. Kaya, H.K. Lee D.W., Lee S.M., Jeon H.Y. (2004) *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) as a biological control agent against the fungus gnat *Bradysia agrestis* (Diptera: Sciaridae) in propagation houses. *Biocontr. Sci. Technol.*, 14: 171–183.
- Klein M.G. (1990) Efficacy against soil inhabiting pests. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Gaugler R., Kaya H.K. (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida pp. 195–231.
- Koppenhöfer A.M. (2000) Nematodes. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Lacey L.A., Kaya H.K. (eds.). Kluwer Publishers, UK pp. 283-297.

- Koppenhöfer A.M., Baur M.E., Stock S.P., Choo H.Y., Chinnarsri B. Kaya H.K. (1997) Survival of entomopathogenic nematodes within host cadavers in dry soil. *App. Soil. Ecol.*, 6: 231-240.
- Koppenhöfer A.M., Kaya H.K. (1997) Additive and Synergistic interactions between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biol. Control*, 8: 131–137.
- Koppenhöfer A.M., Kaya H.K. (1998) Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* (DD-136). Proceedings of the Association for Plant protection of Kyushu 31 pp. 186-190.
- Koppenhöfer A.M., Wilson M.J., Brown I.M., Kaya H.K., Gaugler R.R. (2000) Biological control of white grubs (Scarabidae) in California; in anticipation of Japanese Beetle (*Popillia japonica*) introduction. *J. Econ. Entomol.*, 93: 71–80.
- Koppenhöfer, A.M., Cowles, R.S., Cowles, E.A., Fuzy, E.M. & Kaya, H.K. (2003) Effect of neonicotinoid synergists on entomopathogenic nematode fitness. *Entomol. Exp. App.*, 106: 7–18.
- Kotze A.C. (1997) Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *Int. J. Parasitol.*, 27: 33–40.
- Kotze A.C., Dobson. R.J., Chandler D. (2006) Synergism of rotenone by piperonal butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro: Potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Vet. Parasitol.*, 136: 275–282.
- 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. *J. App. Entomol.*, 128: 384 - 389.
- Krasomil-Osterfeld K.C. (1995) Influence of osmolarity on phase shift in *Photorhabdus luminescens*. *App. Environ. Microbiol.*, 61:3748–3749.
- Krishnayya P.V., Grewal P.S. (2002) Effect of neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Biocontrol Sci. Tech.*, 12: 259-266.
- Kung S. P., Gaugler R., Kaya H.K. (1991) Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *J. Invertebr. Pathol.*, 57: 242-249.
- Kung S.P., Gaugler R., Kaya H.K. (1990) Soil type and entomopathogenic nematode persistence. *J. Invertebr. Pathol.*, 55: 401-406.
- Lacey L.A., Arthurs S.P., Unruh T.R., Headrick H., Fritts Jr., R. (2006) Entomopathogenic nematodes for control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple and pear orchards: effect of nematode species and seasonal temperatures, adjuvants, application equipment and post-application irrigation. *Biol. Control*, 37: 214–223.

Lacey L.A., Fransen J.J., Carruthers R. (1996) Global Distribution of Naturally Occurring Fungi of Bemisia, their Biologies and Use as Biological Control Agents. In: Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management, (eds.) Gerling D., Mayer R.T., Andover, UK pp. 401-433.

Lacey L.A., Knight A., Huber J. (2000) Microbial control of lepidopteran pests of apple orchards. In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Lacey, L.A., Kaya, H.K. (eds.), Kluwer Academic Dordrecht, The Netherlands pp. 557–576.

Lacey L.A., Wraight S.P., Kirk, A.A. (2008) Entomopathogenic Fungi for Control of Bemisia spp.: Foreign Exploration, Research and Implementation', in Classical Biological Control of Bemisia tabaci in the USA. In: A Review of Interagency Research and Implementation (eds.) Gould J.K., Hoelmer K., J. Goolsby., Dordrecht Springer pp. 33-69.

Lamberty M., Ades S., Uttenweiler-Joseph S., Brookhart G., Bushey D., Hoffmann J.A., Bulet P. (1999) Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *J. Biol. Chem.*, 274: 9320-9326.

Landa Z. (2002) Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Trvalo udržatelné technologie v záhradníctve. M., Hričovský (eds.), Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre: 225-280.

Landa Z., Osborne L.S., Lopez F., Eyal J. (1994) A Bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biol. Control*, 4: 341-350.

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

Liu H., Skinner M., Parker B.L. (2003) Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana* against tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hem., Miridae). *J. App. Entomol.*, 127: 299 - 304.

Liu H., Skinner M., Parker B.L., Brownbridge M. (2002) Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.*, 95: 675 - 681.

Lohmeyer K.H., Miller J.A. (2006) Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, 99: 1943 - 1947.

Lord J.C. (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J. Invert. Pathol.*, 89: 19–29.

Luangsaard J.J., Hywel-Jones N.L., Manoch L., Samson R.A. (2005) On the Relationships of Paecilomyces sect. Isarioidea species. *Mycologic. Res.*, 109: 581-589.

Luangsaard J.J., Hywel-Jones N.L., Samson R.A. (2004) The Polyphyletic Nature of Paecilomyces Sensu Lato Based on 18S-generated rDNA Phylogeny. *Mycologia*, 96: 773-780.

- Luz C., Tai M.H.H., Santos A.H., Rocha L.F.N., Albernaz D.A.S., Silva H.H.G. (2007) Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *J. Medical. Entomol.*, 44: 799 - 804.
- Mahr S. (1997) Know your friends - The entomopathogen *Beauveria bassiana*. Midwest Biological Control (<http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf410.html>) (on-line 12. 4. 2009)
- Majchrowicz I., Poprawski T.J., Maniania N.K., Robbert P.H. (1990) Effects of entomopathogenic and opportunistic fungi on *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) at low relative humidity. *Environ. Entomol.*, 19: 1163-1167.
- Mamiya Y. (1989) Comparison of infectivity of *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae) and other steinernematid and heterorhabditid nematodes for three different insects. *App. Entomol. Zool.*, 24: 302-308.
- McCoy C.W., Quintela E.D., Faria M.R. (2002) Environmental persistence of entomopathogenic fungi. In: Factors affecting the survival of entomopathogens. Baur, M.E., Fuxa, J.R. (eds.), Southern Cooperative Series Bulletin 400.
- McCoy C.W., Samson R.A., Boucias D.H. (1988) Entomogenous fungi. In: Ignoffo CRC Handbook of Natural Pesticides. C.M. (ed.), CRC Press, Boca Raton pp. 151 – 236.
- Meekes E.T.M., Fransen J.J., van Lenteren J.C. (2002) Pathogenicity of *Ashersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. *J. Invert. Pathol.*, 81: 1-11.
- Meikle W.G., Mercadier G., Rosengaus R.B., Kirk A.A., Derouané F., Quimby P.C. (2005) Evaluation of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Deuteromycota:Hyphomycetes) obtained from Formosan subterranean termites (Isop., Rhinotermitidae). *J. App. Entomol.*, 129: 315 - 322.
- Menti H., Wright D.J., Perry, R.N. (1997) Desiccation survival of populations of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. *J. Helminthol.*, 71: 41–46.
- Mesquita A.L.M., Lacey L.A., Mercadier G., Leclant F. (1996) Entomopathogenic activity of a whitefly-derived isolate of *Pecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphidodae) with a description of an effective bioassay method. *European J. Entomol.*, 93: 69–72.
- Miduturi J.S., Moens M., Hominick W.M., Briscow B.R., Reid A.P. (1996) Naturally occurring entomopathogenic nematodes in the province of West-Flanders, Belgium. *J. Helminthol.*, 70: 319-327.
- Mietkiewiski R.T., Pell J.K., Clark S.J. (1997) Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: field and laboratory comparisons. *Biocontr. Sci. Technol.*, 7: 565-575.
- Michalakia M.P., Athanassiou C.G., Steenberg T., Buchelos C.Th. (2007) Effect of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown and Smith (Ascomycota: Hypocreales) alone

or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Biol. Control*, 40: 280–286.

Milner R.J., Staples J.A., Lutton G.G. (1997) The effect of humidity on germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.*, 69 (1): 64-69.

Molyneux A.S., Bedding R.A. (1984) Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica*, 30: 358–365.

Molyneux A. S. (1985) Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Rev. Nematol.*, 8: 165-170.

Mráček Z., Webster J.M. (1993) Survey of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* (Rhabditida, Nematoda) in western. *Can. J. Nematol.*, 23: 423–437.

Mráček Z., Weiser J. (1988) Parazitické hlístice hmyzu. Academia pp. 258.

Müller-Kögler E, Zimmermann G. (1986). Zur Lebensdauer von *Beauveria bassiana* in kontaminiertem Boden unter Freiland- und Laboratoriumsbedingungen. *Entomophaga*, 31: 285-292.

Mulock B.S., Chandler L.D. (2001) Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biol. Control*, 22: 16 - 21.

Nguyen K.B., Smart Jr. G.C. (1994) *Neosteinerema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *J. Nematol.*, 26: 162-174.

Nguyen K.B. (2009) Steinernema, Neosteinerema species, names and authorities. (<http://entnemdept.ufl.edu/nguyen/morph/namespp.HTM>) (Online 6.7. 2009)

Nguyen K.B. (1988) A new nematode parasite of mole crickets: Its taxonomy, biology, and potential for biological control. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville.

Nguyen K.B., Smart Jr. G.C. (1992) Life cycle of *Steinernema scapterisci*. *J. Nematol.*, 24: 160-169.

Nickle W.R. (1984) Plant and insect nematodes. New York: Marcel Dekker.

Noma T., Strickler K. (2000) Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding and oviposition. *Environ. Entomol.*, 29: 394 - 402.

Obornik M., Jirku M., Dolezel D. (2001) Phylogeny of Mitosporic Entomopathogenic Fungi: Is the Genus *Paecilomyces* polyphyletic?. *Can. J. Microbiol.*, 47: 813-819.

Oetting R.D., Latimer, J.G. (1991) An entomogenous nematode *Steinernema carpocapsae* is compatible with potting media environments created by horticultural practices. *J. Entomol. Sci.*, 26: 390–394.

- Ogura N. (1993). Control of scarabaeid grubs with an entomogenous nematode, *Steinernema kushidai*. *Jpn. Agric. Res. Q.*, 27: 49–54.
- Osborne L.S., Landa Z. (1992) Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomol.*, 75 (4): 456-471.
- Parkman J.P., Hudson W.G., Frank J.H., Nguyen K.B., Smart Jr., G.C. (1993) Establishment and persistence of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida, Steinernematidae) in field populations of *Scapteriscus* spp. mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae). *J. Entomol. Sci.*, 28: 182–190.
- Pereira R.M., Stimac J.L., Alves S.B. (1993) Soil antagonism affecting the dose-response of workers of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, 61: 156-161.
- Pickett J.A., Rasmussen H.B., Woodcock C.M., Matthes W., Napier J.A. (2003) Plant stress signalling: understanding and exploiting plant-plant interactions. *Biochem. Soc. Trans.*, 31: 123–127.
- Pilz C., Wegensteiner R., Keller S. (2007) Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *J. App. Entomol.*, 131: 426 - 431.
- Poinar G.O. (1979) Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, 165 - 176.
- Poinar G.O. Jr. (1990) Taxonomy and biology *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Gaugler R., Kaya, H.K. (eds), CRC Press, Boca Raton, Florida pp. 23–61.
- Poprawski T.J., Greenberg S.M., Ciomperlik M.A. (2000) Effect of Host Plant on *Beauveria bassiana*- and *Paecilomyces fumosoroseus*-Induced Mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.*, 29 (5): 1048-1053.
- Poprawski T.J., Jones W.J. (2001) Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosoroseus* against two populations of Bemisia whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Mycopathologia*, 151: 11-20.
- Renn N. (1998) Routes of penetration of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* attacking larval and adult houseflies (*Musca domestica*). *J. Invertebr. Pathol.*, 72: 281–287.
- Rovesti L., Deseö, K.V. (1990) Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *Steinernema feltiae* (Nematoda, Steinernematidae). *Nematologica*, 36: 237–245.
- Rovesti L., Heinzpeter E. W., Tagliente F., Deseö K. V. (1988) Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica*, 34: 462-476.

Rovesti L. (1989): Response of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. to chemical pesticides. Proceeding of the International Conference, Biopesticides, Theory and Practice pp. 186-190.

Rovesti L., Deseö K.V. (1991) Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis heliothidis*. *Nematologica*, 37: 113–116.

Samson R.A., Rombach M.C. (1985) Biology of the fungi *Verticillium* and *Aschersonia*. In: Biological pest control - the glasshouse experience. Hussey N.W., Scopes N. (eds.), Cornell University Press, Ithaca, New York pp. 34 – 42.

Serwe-Rodriguez J., Appleman B., Bornstein-Forst S. (2004) Effect of host dessication on development, survival and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 85: 175-181.

Shapiro-Ilan D.I., Gardner W.A., Fuxa J.R., Wood B.W., Nguyen K., Adams B., Humber R.A., Hall M.J. (2003) Survey of entomopathogenic nematodes and fungi endemic to pecan orchards of the southeastern United States and their virulence to the pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.*, 32: 187 - 195.

Shapiro-Ilan D.I., Jackson M., Reilly C.C., Hotchkiss M.W. (2004) Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol. Control*, 30: 119 - 126.

Shapiro-Ilan D.I., Schroeder P.C., Ferguson C.S., Shelton A.M., Wilsey W.T., Hoffmann M.P., Petzoldt C. (1996) Greenhouse and field evaluations of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for control cabbage maggot (Diptera: Anthomyiidae) on cabbage. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1109–1115.

Shi W., Feng, M. (2004) Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biol. Control*, 30: 165–173.

Shibata E. (2000) Bark borer *Semanotus japonicus* (Col., Cerambycidae) utilization of Japanese cedar *Cryptomeria japonica*: a delicate balance between a primary and secondary insect. *J. App. Entomol.*, 124: 279–285.

Shields M.S., Lingg A.J., Heimsch R.C. (1981) Identification of a *Pencillium urticae* metabolite which inhibits *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 374-377.

Schalk J.M., Bohac J.R., Dukes P.D., Martin W.R. (1993) Potential of nonchemical control strategies for reduction of soil insect damage in sweet potato. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 118: 605-608.

Smart G.C. Jr. (1995) Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *J. Nematol.*, 27: 529–34.

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

- Siebeneicher S.R., Vinson S.B., Kenerley C.M. (1992) Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 280-285.
- Steiner G. (1929) *Neoaplectana glaseseri* n.g., n. Sp. (Oxyuridae), a new nemtic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.) *J. Wash. Academ. Sci.*, 19: 436-440.
- Steinhaus E.A. (1958) Stress as a factor in insect disease. Proceedings International Congress of Entomology, Tenth Congress (Montreal), 4: 725-730.
- Stock S.P., Koppenhöfer A.M. (2003) *Steinernema scarabaei* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) from New Jersey. *Nematology*, 5: 191-204.
- Storey, G.K., Gardner W.A., Tollner E.W. (1989) Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia in soil of two tillage systems. *Environ. Entomol.*, 18: 835–839.
- Strasser H., Vey A., Butt T.M. (2000) Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactivity metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontr. Sci. Technol.*, 10: 717-735.
- Studdert J.P., Kaya H.K. (1990) Water potential, temperature and soil type on the formation of *Beauveria bassiana* soil colonies. *J. Invertebr. Pathol.*, 56: 380-386.
- Sussman A.S. (1965) Dormancy of soil microorganisms in relation to survival. In: Ecology of soil-borne plant pathogens. Baker K.F., Snyder W.C. (eds.), Univ. of California Press Berkeley pp. 99-100.
- Tanada Y., Kaya H.K. (1993) Fungal infections. In: Insect pathology. Tanada Y., Kaya H.K. (eds.), Academic Press Inc. California and Academic Press Limited London pp. 319-387.
- Thompson S.R., Brandenburg R.L., Roberson G.T. (2007) Entomopathogenic fungi detection and avoidance by mole crickets. *Environ. Entomol.*, 36: 165 - 172.
- Toepfer S., Gueldenzoph C., Ehlers R.-U., Kuhlmann U. (2005) Screening of entomopathogenic nematodes for virulence against the invasive western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe. *Bul. Entomol. Res.*, 95: 473-482.
- Toepfer S., Peters A., Ehlers R.-U., Kuhlmann U. (2008) Comparative assessment of the efficacy of entomopathogenic nematode species at reducing western corn rootworm larvae and root damage in maize. *J. Appl. Entomol.*, 132: 227–348.
- Toledo J., Williams T., Perez C., Liedo P., Valle J.F., Ibarra J.E. (2009) Abiotic factors affecting the infectivity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) on larvae of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) *Biocontr. Sci. Technol.*, 19 (9): 887 – 898.

- Townsend M.L., Johnson D.T., Steinkraus D.C. (1998) Laboratory studies of the interactions of environmental conditions on the susceptibility of green June beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) to entomopathogenic nematodes. *J. Entomol. Sci.*, 33: 40-48.
- Triplehorn C.A., Johnson N.F. (2005) Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects, sixth ed. Thompson Brooks/Cole, Belmont, CA.
- Trudel R., Lavallée R., Guertin C., Côté C., Todorova S.I., Alfaro R., Kope H. (2007) Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col., Curculionidae). *J. Appl. Entomol.*, 131: 90 - 97.
- Vänninen I. (1995) Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycol. Res.*, 100 (1): 93-101.
- Vänninen I., Hokkanen H., Tyni-Juslin J. (1999) Attempts to control cabbage root flies *Delia radicum* L. and *Delia floralis* (Fall.) (Dipt., Anthomyiidae) with entomopathogenic fungi: laboratory and greenhouse tests. *J. Appl. Entomol.*, 123: 107 - 113.
- Vänninen, I., Tynijuslin J., Hokkanen H. (2000) Persistence of *augmented Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *BioControl*, 45: 201–222.
- Vega F.E. (2005) The entomopathogen *Isaria fumosoroseus*.
(<http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf403.html>, 6.6.2009) (on-line 12. 3. 2009).
- Vega F.E. (2008) Insect pathology and fungal endophytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 98: 277-279.
- Vega F.E., Lacey L.A., Reid A.P., Hérard F., Pilarska D., Danova E., Tomov R., Kaya H.K. (2000) Infectivity of a Bulgarian and an American strain of *Steinernema carpocapsae* against codling moth. *BioCon.*, 45: 337–343.
- Veremtchuk, G.V., Issi I.V. (1970) On the development of the microsporidian of insects in the entomopathogenic nematodes *Neaplectana agriotis* Veremtchuk (Nematodes: Steinernematidae). *Parazitologiya*, 4: 3–7. (In Russian, English abstract)
- Vey A., Hoagland R., Butt T.M. (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (eds.), CAB International, Wallingford, Oxon, UK pp. 311-345.
- Vidal C., Fargues J., Lacey L.A. (1997) Intraspecific variability of *Isaria fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *J. Invertebr. Pathol.*, 70: 18 - 26.
- Vidal C., Fargues J., Lacey L.A., Jackson M.A. (1997) Climatic Constraints for Fungal Biopesticides In: Use Of Entomopathogenic Fungi In Biological Pest Management Research. Ekesi E., Maniania N.K. (eds.) pp. 39-55.
- Vilcinskas S.A., Matha V., Gotz P. (1997) Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *J. Insect Physiol.*, 43: 475-483.

- Walstad J.D., Anderson R.F., Stambaugh W.J. (1970) Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 221-226.
- Wardlow L.R., Piggott S., Goldsworthy R. (2001) Foliar application of *Steinernema feltiae* for the control of flower thrips. Medeelingen Faculteit Landbouwkundige Toegepaste Biol. Wetenschappen Univ. Gent 66 pp. 285–291.
- Webster J.M., Chen G., Hu, K., Jianxiong L. (2002) Bacterial metabolites. In: Entomopathogenic Nematology. Gaugler, R. (ed). CABI, New York pp. 99–114.
- Weiser J. (1966) Houbové onemocnění hmyzu. In: Nemoci hmyzu. Weiser J. (ed.), Academia, Praha pp. 232 – 234.
- Wekesa V.W., Maniania N.K., Knapp M., Boga H.I. (2005) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Exp. App. Acarol.*, 36: 41-50.
- Wharton D.A. (1986) A Functional Biology of Nematodes. Croom Helm, London: 192.
- Williams E.C., Walters K.F.A. (2000) Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* against leafminers on vegetables. *Biocontr. Sci. Techn.*, 10: 61–70.
- Womersley C. (1987) A reevaluation of strategies employed by nematode anhydrobiotes in relation to their natural environment. In: Vista on Nematology: A Commemoration of the 25th Anniversary of the Society of Nematology. Veech J.A., Dickson D.W. (eds.), Maryland pp. 165-173.
- Womersley C.Z., Higa L.M. Wharton D.H. (1998) Survival biology. In: Thy Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-Parasitic Nematodes. Perry R.N., Wright D.J. (eds.), CABI International, Walingford pp. 271-302.
- Wouts W.M. (1979) The biology and life cycle of a New Zealand population of *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). *Nematologica*, 25:191-202.
- Wouts W.M. (1980) Biology, life cycle and redescription of *Neoaplectana bibionis* Bovien, 1937 (Nematoda: Steinernematidae). *J. Nematol.*, 12: 62 - 72.
- Wraight S.P., Carruthers R. I., Jaronski S. T., Bradley C. A., Garza C. J., Galaini-Wraight S. (2000) Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Control*, 17: 203–217.
- Zayed A., Shamseldean M., Aleem K.M.A., Fergany Y.A. (2003) Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* Sp. *Efflatounia*, 3: 15–24.
- Zimmermann G. (2008) The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species komplex (formerly *Paecilomyces fumosorosea*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol. Sci. Tech.*, 18 (9): 865-901.

10 PŘÍLOHY

10.1 Přehled grafických listů

- Grafický list 1: Seznam přípravků na bázi entomopatogenních hub registrovaných proti hmyzím škůdcům a roztočům ve vybraných zemích Evropy a USA.
- Grafický list 2: Hodnotící indexová stupnice biotestu vývoje EPF na larvách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*).
- Grafický list 3: Prezentace metodického postupu v testech kompatibility pesticidů a *S. feltiae*
- Grafický list 4: Prezentace metodických postupu při získávání půdního výluhu
- Grafický list 5: Projevy infekce způsobené různými druhy entomopatogenních agens

Grafický list 1. Seznam přípravků na bázi entomopatogenních hub registrovaných proti hmyzím škůdcům a roztočům ve vybraných zemích Evropy a USA (de Faria and Wraight 2007)

Název přípravku/druh EPF	Cílový organismus (řád/čeleď)	Firma
<i>Beauveria bassiana</i>		
Boverol (Boverol-Spofa)	Coleoptera (Chrysomelidae)	Fytovita, ČR
Boverosil	Coleoptera (Curculionidae)+ další skladištní škůdci	NI
Ostrinil	Lepidoptera (Crambidae)	Natural Plant Protection (Francie)
Trichobass-L	Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Lepidoptera (Castnidiidae, Pieridae), Hemiptera (Aleyrodidae), Thysanoptera (Thripidae)+ Acari (Tetranychidae)	Trichodex S.A. (Španělsko)
Trichobass-P	Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Aleyrodidae) + Acari (Tetranychidae)	Trichodex S.A. (Španělsko)
Baits Motel Stay	Hymenoptera (Formicidae)	GlycoGenesys, Inc. (USA)
Awhile-Rest		GlycoGenesys, Inc. (USA)
Forever		GlycoGenesys, Inc. (USA)
Botanigard Es	Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae)	Mycotech Corp. (USA)
Botanigard 22 Wp	Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae, Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae)	Mycotech Corp. (USA)
Corn Gard	Lepidoptera (Crambidae)	Mycotech Corp. (USA)
Mycotrol Es	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae, Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae), Lepidoptera (Crambidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae),	Mycotech Corp. (USA)
Mycotrol-O	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae Cicadellidae, Fulgoridae Aleyrodidae,	Mycotech Corp. (USA)

	Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae), Lepidoptera (Crambidae, Noctuidae, Pieridae, Plutellidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae)	
Mycotrol Of	Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae)	Mycotech Corp. (USA)
Mycotrol Of	Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae)	Mycotech Corp. (USA)
Mycotrol Wp	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae), Lepidoptera (Crambidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae),	Mycotech Corp. (USA)
Naturalis L (=Feromone Naturalis L-225)	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Diptera (Ephydriidae, Mycetophilidae, Sciaridae, Tipulidae), Hemiptera (Lygaeidae, Miridae, Cercopidae, Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Hymenoptera (Formicidae), Thysanoptera (Thripidae), Lepidoptera (Crambidae, Gelechiidae, Geometridae, Noctuidae, Tortricidae), Orthoptera (Acrididae, Gryllotalpidae)+ Acari (Eriophyidae, Tetranychidae) + Crustacea + Diplopoda	Troy Biosciences Inc. (USA)
Naturalis L-Home & Garden	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Diptera (Tipulidae), Hemiptera (Lygaeidae, Miridae, Cercopidae, Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Hymenoptera (Formicidae), Thysanoptera (Thripidae), Lepidoptera (Crambidae, Geometridae, Noctuidae), Orthoptera (Acrididae, Gryllotalpidae)+ Acari (Tarsomelidae, Tetranychidae) + Crustacea + Diplopoda	Troy Biosciences Inc. (USA)
Naturalis-O	Coleoptera (Chrysomelidae,	Troy Biosciences

	Curculionidae), Hemiptera (Miridae, Cicadellidae, Aleyrodidae, Aphididae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae), Lepidoptera, Thysanoptera (Thripidae)	Inc. (USA)
Organigard Emulsifiable Suspension Mycoinsecticide	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae, Cicadellidae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae), Lepidoptera (Crambidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae)	Mycotech Corp. (USA)
<i>Beauveria brongniartii</i>		
Melocont-Pilzgerste (=Beauveria Brong)	Coleoptera (Scarabaeidae)	Kwizda Agro GmbH (Rakousko)/Agrifutur s.r.l. (Itálie)
Beauveria Brongniartii	Coleoptera (Scarabaeidae)	LBBZ Arenberg (Švýcarsko)
Myzel Beauveria Schweizer	Coleoptera (Scarabaeidae) Coleoptera (Scarabaeidae)	Eric Schweizer Samen AG (Švýcarsko)
Engerlingspilz	Coleoptera (Scarabaeidae)	Andermatt Biocontrol AG (Švýcarsko)
<i>Hirsutella thompsonii</i>		
Mycar	Acari	Abbott Laboratories (USA)
<i>Isaria fumosorosea</i>		
Preferal (=Preferred)	Hemiptera (Aleyrodidae)	Biobest n.v. (Belgie)
Pfr-97 20% Wdg	Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae), Thysanoptera (Thripidae) + Acari (Tetranychidae)	Certis, Inc. (USA)
<i>Lecanicillium longisporum</i>		
Vertalec	Hemiptera (Aphididae)	Koppert Biological Systems (Nizozemí)
<i>Lecanicillium muscarium</i>		
Mycotal	Hemiptera (Aleyrodidae), Thysanoptera (Thripidae)	Koppert Biological Systems (Nizozemí)
<i>Lecanicillium sp.</i>		
Microgremin Plus	Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae), Thysanoptera (Thripidae)+ Acari (Tetranychidae)	Omya (Schweiz) AG (Švýcarsko)
<i>Metarhizium anisopliae</i>		
Granmet-P	Coleoptera (Curculionidae,	Kwizda Agro

	Scarabaeidae, Nitidulidae)	GmbH (Rakousko)/Agrifut ur s.r.i. (Itálie)
Bio 1020	Coleoptera (Curculionidae)	Bayer AG (Německo)
Metarhizium Andermatt	Coleoptera (Scarabaeidae)	Andermatt Biocontrol AG (Švýcarsko)
Metarhizium Schweizer	Coleoptera (Scarabaeidae)	Eric Schweizer Samen AG (Švýcarsko)
Bio-Blast	Isoptera (Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Termopsidae)	EcoScience Corporation (USA)
Biological Termiticide Bio-Patch Cockroach Control Chamber Taenure	Blattodea (Blattellidae, Blattidae)	
	Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Diptera (Ephydriidae, Mycetophilidae, Sciaridae, Tipulidae), Thysanoptera (Thripidae)	Novozymes Biologicals Inc. (USA)
Granular Bioinsecticide		BioSciences Inc. (USA)
Taerain	Hemiptera (Aleyrodidae), Thysanoptera (Thripidae)+ Acari (Tetranychidae)	Earth BioSciences Inc. (USA)
Tick-Ex Ec	Acari (Ixodidae)+ Coleoptera (Scarabaeidae)	Novozymes Biologicals Inc. (USA)
Tick-Ex G	Acari+ Coleoptera (Scarabaeidae)	Novozymes Biologicals Inc. (USA)

Grafický list 2. Hodnotící indexová stupnice biotestu vývoje EPF na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) (upraveno dle Horňák 2004)



Na larvách nejsou vidět známky infekce (FDI 0)



Na larvách se objevují drobné melanizační skvrny, postupně po celém povrchu, ještě se nespojují (FDI 0,5)



Větší melanizační skvrny, které se mohou začít spojovat, skvrny jsou černé, larva je mrtvá (FDI 1,0)



Mezi hrudními končetinami larev se objevuje vláknité mycelium, pouze jednotlivé hyfy (FDI 1,5)



Mycelium začíná tvořit vatovité struktury, zatím nemá vyvinuté fruktifikační orgány (FDI 2,0)



Na konci hyf mycelia se začínají objevovat sporulující konidiofory, počínající sporulace (FDI 2,5)



Larva je pokrytá plně sporulujícím myceliem, které tvoří nové konidie ve velkém počtu (FDI 3,0)

Prezentace symptomů vyvolaných EPN *S. carpocapsae*

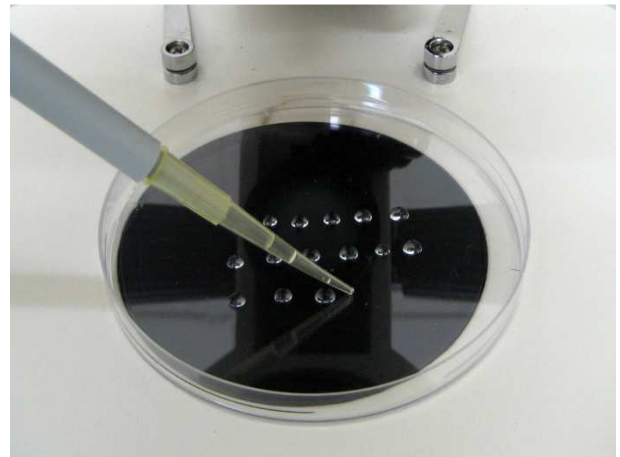


Larva je mrtvá, měkká na dotyk, zbarvení v odstínech světle až tmavohnědé barvy

Grafický list 3. Prezentace metodického postupu v testech kompatibility pesticidů a *S. feltiae*



In vitro test kompatibility *S. feltiae* s vybranými druhy pesticidů



Aplikace kapek suspenze hlístovky a pesticidu pro pozorování vitality



Čištění a filtrace infekčních larev před použitím v *in vivo* testech virulence



In vivo test na larvách *T. molitor* (ověření kompatibility v testech virulence)



Inkubační komůrky v testech přímých interakcí houba/hlístice



Inkubace komůrek v termostatu

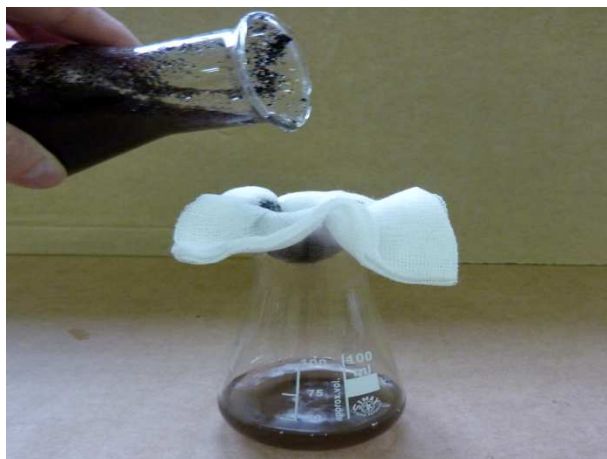
Grafický list 4. Prezentace metodických postupu při získávání půdního výluhu



Suspenze Tweenu a půdního substrátu



Erlenmayerovy baňky s výluhy na reciproké třepačce



Filtrace výluhu přes sterilní gázu



Aplikace naředěného výluhu na Petriho misky s živnou půdou a přídatkem Sylitu



Roztírání 0,5 ml výluhu pro rovnoměrné rozprostření suspenze po ploše agarizovaného živného média



Kolonie *I. fumosorosea* po 7 dnech inkubace při 25°C v termostatu

Grafický list 5. Projevy infekce způsobené různými druhy entomopatogenních agens



Larvy *T. molitor* porostlé *B. bassiana* (FDI 3,0)



Larvy *T. molitor* porostlé *I. fumosorosea* (FDI 3,0)



Larvy *T. molitor* napadené hlístovkou *S. carpocapsae* (uvolňující se infekční larvy z těla usmrcené larvy)



Larva *T. molitor* porostlá *I. fumosorosea* (FDI 3,0)



Detail infikované larvy *T. molitor* hlístovkou *S. carpocapsae* se svlečkou porostlou *I. fumosorosea*



Dualní infekce houbou *I. fumosorosea* (FDI 2,0) s uvolňujícími se infekčními larvami *S. carpocapsae* do okolí mrtvé larvy *T. molitor*

