

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Agropodnikání

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea*
biologická charakterizace

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

Autor bakalářské práce: Šárka Oušková

České Budějovice

duben 2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Šárka OUŠKOVÁ
Osobní číslo: Z11147
Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Agropodnikání
Název tématu: Entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea* - biologická charakterizace
Zadávací katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

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

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

V literárním přehledu by měly být zahrnuty následující klíčové body:


- 1) Entomopatogenní houby.
- 2) Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub.
- 3) *Isaria fumosorosea*.
 - Taxonomické zařazení.
 - Morfologická charakteristika.
 - Vývojový cyklus.
 - Kmeny entomopatogenní houby *I. fumosorosea*.
 - Rozšíření - geografie.
 - Sortiment hostitelů.
 - Vztah k abiotickým faktorům.
 - Biopreparáty na bázi *I. fumosorosea*.
 - Vliv *I. fumosorosea* na necílové organizmy.

Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:


Weiser J., 1966: Nemoci hmyzu. Nakladatelství Akademia.
Goettel M.S., Inglis G.D., Wraight S.P. 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.): Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, 255-282.
Butt T.M., Goettel M.S. 2000: Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.
Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001: Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.
Bailey A., et al., 2010: Biopesticides. CAB International Cambridge.
Publikace získané retrospektivní a průběžnou rešerší v bibliografické databázi CAB.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání bakalářské práce: 28. března 2013
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2014


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

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


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

V Českých Budějovicích dne 28. března 2013

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích 11. 4. 2014

.....

Oušková Šárka

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za cenné připomínky a odborné rady, kterými přispěla k vypracování této bakalářské práce.

Poděkování patří zároveň mé rodině a přátelům za veškerou podporu a motivaci během mého studia.

Abstrakt

Entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea* patří mezi druhy entomopatogenních hub, které jsou využívány v biologické ochraně rostlin. Druh *I. fumosorosea* má široký hostitelský okruh hmyzu, u kterého je schopna vyvolat onemocnění. Nejčastěji infikuje skleníkové škůdce, zejména mšice, třásněnky a červce. *I. fumosorosea* je patogenem, který se zejména přirozeně vyskytuje v populacích molíc, zejména molice skleníkové *T. vaporariorum* a molice bavlníkové *B. tabaci*. Bakalářská práce je zaměřena na podrobný popis houby *I. fumosorosea* a také charakteristiku dalších významných rodů entomopatogenních hub (*Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*) včetně detailního popisu vývojového cyklu entomopatogenních hub. V práci jsou podrobně popsány komerčně dostupné biopreparáty (PFR-97™, PreFeRal® a PreFeRal™, NoFly™) koncipované na bázi této entomopatogenní houby, jejich výhody či nevýhody, účinnost a všeobecné uplatnění biopreparátů na evropském trhu.

Klíčová slova: integrovaná ochrana rostlin, biologická ochrana, entomopatogenní houby, *Isaria fumosorosea*, biopreparát

Abstract

Entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* is among the species of entomopathogenic fungi used in biological control. Species *I. fumosorosea* has wide host range of insects in which is able to cause the primary diseases. Fungus *I. fumosorosea* most often infects greenhouse pests, such as aphids, thrips and mealybugs. *I. fumosorosea* is a pathogen, which naturally occurs in whiteflies populations, especially greenhouse whitefly *T. vaporariorum* and cotton whitefly *B. tabaci*. The Bachelor's thesis is focused on a detailed description of the fungus *I. fumosorosea* and also characteristics of the other major genera of fungi (*Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*) including description of development cycle of entomopathogenic fungi. The thesis also contains a detailed description of the commercially available biological products based on *I. fumosorosea* (PFR-97™, PreFeRal® a PreFeRal™, NoFly™) and their advantages and disadvantages, efficacy and general application of biological products on European market.

Key words: integrated pest management, biological control, entomopathogenic fungi, *Isaria fumosorosea*, biopreparate

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	10
2.1 Integrovaná ochrana rostlin	10
2.2 Biologická ochrana rostlin	11
2.2.1 Definice biologické ochrany rostlin	11
2.2.2 Strategie biologické ochrany rostlin	11
2.3 Kategorie přirozených nepřátel	13
2.4 Entomopatogenní houby	13
2.4.1 Charakteristika entomopatogenních hub	13
2.4.2 Vývojový cyklus entomopatogenních hub	14
2.4.3 Podmínky pro vývoj nálezů entomopatogenních hub	17
2.5 Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub	19
2.5.1 Houby rodu <i>Aschersonia</i>	19
2.5.2 Houby rodu <i>Metarhizium</i>	20
2.5.3 Houby rodu <i>Lecanicillium</i> spp.	21
2.5.4 Houby rodu <i>Beauveria</i>	22
2.5.5 Houby rodu <i>Hirsutella</i>	24
2.5.6 Houby rodu <i>Nomuraea</i>	24
2.5.7 Houby rodu <i>Isaria</i> a <i>Paecilomyces</i>	24
2.6 Nejvýznamnější druh <i>Isaria fumosorosea</i>	26
2.6.1 Hostitelské spektrum	26
2.6.2 Rozšíření	26
2.6.3 Taxonomické zařazení	27
2.6.4 Morfologická charakteristika	28
2.6.5 Průběh nákazy na molících	29
2.7 Další významné druhy rodu <i>Isaria</i> a <i>Paecilomyces</i>	31
2.7.1 <i>Isaria farinosa</i>	31
2.7.2 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	32
2.8 Kultivace entomopatogenních hub	33
2.9 Biopreparáty na bázi entomopatogenní houby <i>Isaria fumosorosea</i>	35
2.9.1 PreFeRal [®] WG a PreFeRal [™]	36
2.9.2 PFR-97 [™] 20% WDG	38
2.9.3 NoFly [™] WP	39

2.10	Trh mikrobiálních pesticidů	40
2.10.1	Evropský trh mikrobiálních pesticidů v Evropě	40
2.10.2	Trh mikrobiálních pesticidů v Nizozemsku	41
2.11	Využití biopesticidů na bázi makroorganismů i mikroorganismů	42
2.12	Kvalita kontroly entomopatogenních hub	43
2.13	Vedlejší účinky na přirozené nepřátele a necílové organismy	44
3.	Diskuze	46
4.	Závěr	49
5.	Seznam použité literatury	50

1. Úvod

V Evropě je v současné době trend opouštět zaběhlý konvenční systém hospodaření, ve kterém byly používány k regulaci škodlivých činitelů převážně pesticidy. Používáním pesticidů docházelo v minulosti ke znečišťování životního prostředí a ohrožení nejen zdraví živočichů, ale i lidí. V posledních letech tak vzrostl zájem o alternativní metody ochrany, které jsou využívány v rámci integrované ochrany rostlin. Integrovanou ochranu rostlin lze definovat jako systém regulace četností populací škodlivých činitelů, který využívá všech metod jejich regulace s ohledem na ekologické, ekonomické, toxikologické a hygienické požadavky, se záměrem udržet populace škodlivých činitelů na tolerovatelné úrovni, při preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace populační hustoty škodlivých činitelů. Integrací všech dostupných metod dochází k zamezení vzniku rezistence u škodlivých organismů, současně je zvyšována účinnost ochranných opatření a rizika pro životní prostředí jsou minimální. V systému integrované ochrany rostlin je důležité dodržování stanovených zásad, jako je například střídání plodin, použití vhodných pěstitelských postupů, zamezení šíření škodlivých organismů, ochrana a podpora důležitých užitečných organismů, sledování výskytu škodlivých organismů pomocí vhodných metod, využívání prahových hodnot škodlivých činitelů a využívání antirezistentních strategií. Na základě výsledků sledování musí registrovaný uživatel rozhodnout, jaké opatření použije. Od 1. ledna 2014 je dodržování zásad integrované ochrany rostlin pro všechny profesionální uživatele povinné. Významnou úlohu zastává Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, který monitoruje a vyhodnocuje četnosti výskytu škodlivých organismů.

Velmi důležitou složkou integrované ochrany rostlin je biologická ochrana. Jde o systém ochrany rostlin, který využívá k regulaci škodlivých organismů jejich přirozené nepřátele. Mezi přirozené nepřátele hmyzu se řadí parazitoidi a predátoři a z patogenních entomopatogenních mikroorganismů se jedná o viry, bakterie, houby a hlístice.

Tato bakalářská práce je literární kompilací zabývající se využitím entomopatogenních hub v biologické ochraně rostlin. Součástí bakalářské práce je popis vývojového cyklu entomopatogenních hub včetně faktorů důležitých pro vyvolání infekčního onemocnění hmyzu a část práce je zaměřena na charakteristiku jednotlivých druhů hub. Nejzrozsáhlejší část bakalářské práce je věnována

významnému druhu entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*. V práci jsou podrobně popsány biopreparáty koncipované na bázi této entomopatogenní houby, jejich výhody či nevýhody, účinnost a všeobecné uplatnění biopreparátů na evropském trhu. Závěr práce je soustředěn na kompatibilitu entomopatogenních hub s přirozenými nepřáteli nebo necílovými organismy.

2. Literární přehled

2.1 Integrovaná ochrana rostlin

Systém upřednostňující přirozenější alternativy ochrany rostlin a zároveň snižující závislost na pesticidech. Jádrem celého systému je efektivní ochrana před chorobami, škůdci a plevele, která zajišťuje stabilní výnos a kvalitní produkci zemědělských produktů. Důraz je kladen na snížení rizik dopadu vlivu pesticidů na lidské zdraví a životní prostředí. Jde o soubor vzájemně se doplňujících biologických, chemických, agrotechnických a fyzikálních metod, které dlouhodobě regulují populace škodlivých činitelů ve svém komplexu bez nežádoucích vedlejších ekologických a toxikologických vlivů (Anonym 1).

Představuje strategii ve spojení prostředí a populační dynamiky škůdců, kde jsou využívány všechny dostupné regulační postupy, včetně biologických, chemických a fyzikálních, s cílem udržet populační hustotu škodlivých činitelů pod hodnotami způsobující ekonomické poškození (Pell *et al.* 2002).

V současné době je známo několik desítek definic integrované ochrany rostlin, které se liší nejen v obecných formulacích, ale i hlavních cílech. Základní principy integrované ochrany rostlin byly definovány na počátku 60. let minulého století jako alternativní řešení vůči explozivnímu nárůstu spotřeby a globální aplikaci syntetických pesticidů, především nové generace organických insekticidů.

FAO definuje integrovanou ochranu rostlin jako systém regulace četností populací škodlivých činitelů, s ohledem na ekologické, toxikologické, ekonomické a hygienické požadavky, se záměrem udržet populace na tolerované úrovni při využívání přirozených metod regulace (Landa 2002).

K zamezení výskytu škodlivých organismů nebo jejich potlačení napomáhá střídání plodin, používání odolných, tolerantních odrůd, používání certifikovaného osiva, vyvážené hnojení, zavlažování a odvodňování, zamezení šíření škodlivých organismů hygienickými opatřeními – pravidelným čištěním strojů a zařízení (Anonym 1).

V roce 2009 byla přijata členy Evropské unie směrnice 2009/128/ES, která stanovuje rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů (dále jen směrnice). Směrnice je v současné době součástí národní legislativy, neboli je součástí novely rostlinolékařského zákona č 199/2012 Sb § 5, kde je integrovaná ochrana rostlin definována jako: „Opatření integrované ochrany rostlin udržují používání přípravků a ostatních metod ochrany rostlin na úrovních,

keré lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit, přičemž je kladen důraz na růst zdravých plodin při co nejmenším narušení zemědělských a lesních ekosystémů.“ V této novele jsou také definovány povinnosti profesionálních uživatelů přípravků na ochranu rostlin a povinnosti Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu (ÚKZÚZ). Problematice zásad integrované ochrany rostlin a odkazu na prováděcí předpis je věnován odstavec 3 ve vyhlášce č. 205/2012 o obecných zásadách IOR. Od 1. ledna 2014 je dodržování zásad pro všechny profesionální uživatele povinné. Ministerstvo zemědělství (Mze) připravilo v souladu s požadavkem směrnice návrh Národního akčního plánu k zajištění udržitelného používání pesticidů (NAP). Úkolem NAP je snížit rizika vycházejících z používání přípravků na ochranu rostlin v oblastech ochrany zdraví lidí, vod a životního prostředí, zdokonalení využívání přípravků bez omezení rozsahu zemědělské produkce a kvalit rostlinných produktů (Anonym 2).

2.2 Biologická ochrana rostlin

2.2.1 Definice biologické ochrany rostlin

Biologická ochrana rostlin je taková ochrana, která je prováděná biologickými prostředky. Cíleně využívá přirozených nepřátel k potlačení škodlivých organismů. Cílem je regulace četnosti populací škodlivých činitelů na tolerovanou úroveň – pod prahem škodlivosti (Landa 2002). Cílem biologické ochrany není úplné vymýcení populací škodlivých činitelů, ale regulace jejich četnosti na přijatelnou úroveň. Biologická ochrana je významnou součástí integrované ochrany rostlin. Vychází z obecného poznatku, že mezi hostitelem, patogenem a vnějším prostředím existuje přirozená rovnováha v rámci daného ekosystému. Základem úspěšného využívání biologické ochrany proti škodlivým organismům je výběr vhodného přípravku do daného prostředí. Vystihnout dobu aplikace, provést ji správnou aplikační technikou, posoudit míru poškození porostu a vybrat správnou strategii v boji proti škodlivým činitelům (Van Driesche; Heinz 2004).

2.2.2 Strategie biologické ochrany rostlin

2.2.2.1 Inokulativní introdukce

Endemický nebo neendemický druh predátora, parazitoida a/nebo patogenního mikroorganismu je v malém počtu záměrně nasazován do nové oblasti rozšíření škodlivého organismu, případně znovu nasazován do oblasti, kde se již

dříve vyskytoval. Cílem je účelná adaptace, rozšíření introdukovaného druhu a jeho uchycení a namnožení v daném prostředí. Tato strategie je závislá na podpoře národních a mezinárodních institucí včetně karanténních zařízení. V řadě případů byl výsledek inokulativní introdukce nového druhu bioagens do oblasti zavlečení škůdce výsoce účinný (Van Driesche; Heinz 2004).

Příkladem inokulativní introdukce je zavádění odolných populací dravého roztoče *Typhlodromus pyri* proti sviluškám do ovocných sadů a vinic. Inokulativní introdukce má výrazně ekologický proces s minimálním podílem technologických prvků jako je například biotechnologie pro introdukce malého množství jedinců, nízkokapacitní chovy a odběr bioagens pro introdukce v místě jejich přirozeného výskytu (Pultar 2003).

2.2.2.2 Inundativní introdukce

Hlavním principem je vysazení přirozených nepřátel za účelem posílení již existující populace. Provádí se jednorázově a přirození nepřátelé se vysazují ve velkém množství, aby v období rychlého růstu populace škůdců včas zasáhli. Cíleně se využívá na druhy škůdců jednoletých plodin. Tato strategie má výrazně technologický charakter. Důležité jsou masové chovy parazitoidů a predátorů, biotechnologie produkce mikroorganismů a dostupnost biopreparátů. Příkladem inundativní introdukce je zavádění parazitické vosičky *Trichogramma evanescens* do populace zavíječe kukuřičného (Bale *et al.* 2008).

2.2.2.3 Sezonní inokulativní introdukce

Metoda využívaná v biologické ochraně plodin pěstovaných ve skleníkách proti škůdcům jako je například sviluška chmelová, molice skleníková, molice bavlníková, různé druhy třásněnek a mšic. Cílem je okamžitý ochranný efekt a regulace populací více generačních druhů škůdců během vegetace. Přirození nepřátelé jsou produkovány v masových chovech nebo sbírány a nasazovány periodicky během pěstitelské sezóny (Landa 2002).

Příkladem sezonní inokulativní introdukce je zavádění parazitické vosičky *Encarsia formosa* proti molici skleníkové a molici bavlníkové. Dalším příkladem je vysazování dravých roztočů z čeledi Phytoseidae proti sviluškám nebo vysazování parazitické vosičky *Aphidius colemani* určené k regulaci populací mšic ve skleníkách (Van Lenteren *et al.* 2000).

2.2.2.4 Ochrana a podpora přirozených nepřátel

Strategie zaměřená na konzervaci původních populací přirozených nepřátel v zájmovém prostředí. Strategie má výrazně ekologický charakter. Důležitá je řada agroekologických a agronomických opatření (zvýšení diverzity prostředí propojením stabilních biokoridorů, zakládání remízků, vysévání kvetoucích rostlin) (Landa 2002).

2.3 Kategorie přirozených nepřátel

Makroorganismy chápeme jako přirozené nepřátele, živé organismy. Do makroorganismů řadíme predátory, parazitoidy a parazity z kmene členovci *Arthropoda*, kteří aktivně reagují na prostředí a přítomnost potenciálních škůdců, kteří poškozují pěstované nebo rostlinné produkty (Landa 2002).

Predátor - organismus, který konzumuje jiné organismy, svou kořist usmrtí bezprostředně po napadení, během života usmrtí několik jedinců, osidluje stejnou ekologickou niku jako kořist.

Parazitoid - organismus vázaný alespoň částí svého vývoje na tělo hostitele, kterého na konci vývoje vždy usmrtí, během vývoje zabije vždy jednoho hostitele, osidluje jinou ekologickou niku než hostitel.

Parazit - organismus, který žije uvnitř těla (endoparazit) nebo na povrchu jiného organismu (ektoparazit) tzv. hostitele a přijímá živiny z jeho těla, poškozuje ho, aniž by byl hostiteli nějak užitečný, nepůsobí hostiteli okamžitou smrt.

Entomopatogenní mikroorganismy jsou specifické organismy (bakterie, houby, viry, háďata), které v přírodě vyvolávají primární onemocnění hmyzu a následné hynutí škůdců. Pro účelné použití jsou izolovány a technologicky namnoženy tak, aby je bylo možno použít pro aplikaci proti živočišným škůdcům (Landa 2002; Kaya, Lacey 2007).

2.4. Entomopatogenní houby

2.4.1 Charakteristika entomopatogenních hub

Houby představují velmi heterogenní skupinu heterotrofních eukaryotických organismů, u nichž došlo během evolučního procesu k vytvoření adaptačních

mechanismů, díky kterým se mohou přizpůsobit i velmi diverznímu prostředí. Představují polyfyletickou skupinu organismů, jejíž členové vytvářejí důležité symbiotické vztahy s živočichy, s cévnatými rostlinami a převážnou většinu patogenů hospodářky využívaných rostlin (Bruns *et al.* 1991).

Celá řada entomopatogenních hub je v přírodě relativně běžná. Často vyvolávají přirozené epizootie v populacích hmyzu, čímž se řadí mezi významné mikroorganismy regulující hmyzí populace. Většina entomopatogenních hub patří mezi fakultativní nebo obligátní patogeny hmyzu, ale některé mohou za určitých okolností fungovat i jako symbionty (Landa 1994).

Weiser (1966) uvádí, že u houbových nákaz hmyzu ve srovnání s ostatními entomopatogenními mikroorganismy hraje významnou úlohu vliv vnějšího prostředí, stav hostitele a dávka houbového inokula. Mezi entomopatogenními houbami jsou jak vysoce specifické druhy (jeden hostitel, či vývojové stádium), tak i méně specifické (celá řada druhů, rodů, čeledí hmyzu). Mezi specifické druhy patří například houby rodu *Aschersonia*, které jsou schopny infikovat buď molice, nebo červce. Mezi polyfágní druhy lze zařadit houbu *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium muscarium*. Entomopatogenní houby mají schopnost pronikat do hostitele přímo přes kutikulu, a/nebo využívají k pronikání do hostitele přirozených otvorů. Je známo kolem 750 druhů hub, které jsou schopné infikovat hmyz a způsobit mu úhyn (Nielsen *et al.* 2007). V současné době je kolem 25 druhů využíváno komerčně v biologické ochraně rostlin (Charnley 1997).

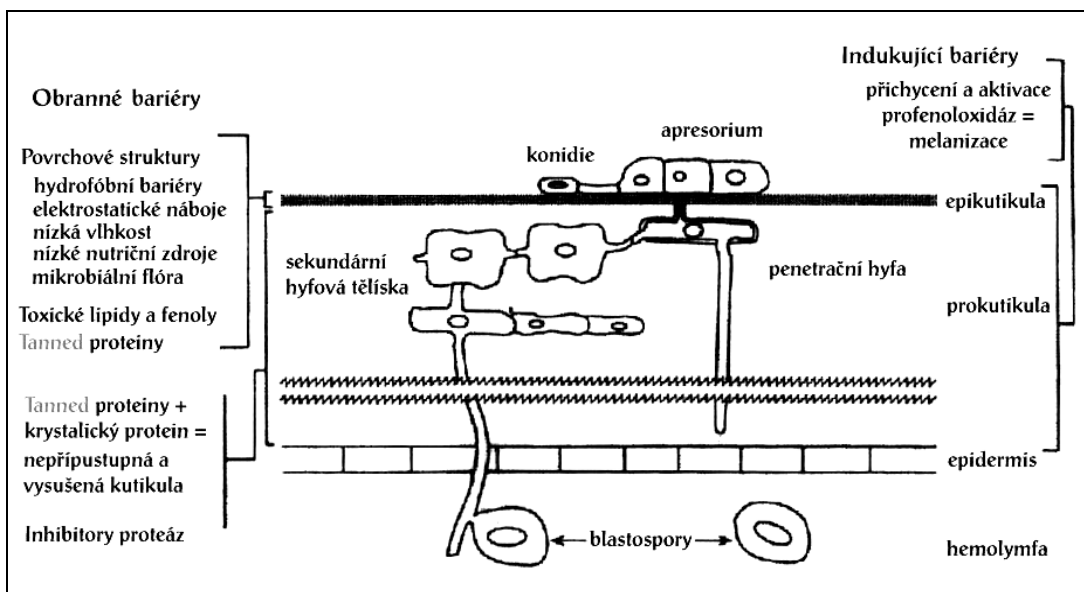
2.4.2 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Vznik infekce a její průběh je ovlivňován vlastnostmi patogena a hostitele. Houbové onemocnění iniciují konidie. Základním předpokladem vzniku houbového onemocnění je přichycení konidií na povrch těla hostitele. Konidie některých druhů hub jsou pro tento proces vybaveny adhezivními látkami, kterými vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele při prvním kontaktu. Druhy entomopatogenních hub jako je *Isaria fumosorosea* produkují suché, silně hydrofobní konidie, rozdílně uspořádaného povrchu. Primární adheze konidií probíhá buď vzájemným působením mezi dvěma hydrofobními povrchy (kutikula hmyzu a konidie), nebo pomocí molekulárních interakcí a elektrostatických sil přítomných na povrchu kutikuly hostitele i konidií. V místě dotyku se houba začne vyvíjet (Samson *et al.* 1988).

Ve fázi klíčení konidie nepotřebuje získávat externí živiny, využívá své zásobní látky. Konidie jsou tak ke klíčení energeticky vybaveny. Pro klíčení konidií jsou však limitující podmínky prostředí, jako je teplota a relativní vzdušná vlhkost. Při vysoké relativní vzdušné vlhkosti konidie přijímá vodu a dochází k nabobtnání. Konidie začne formovat primární klíček. Na špičce primárního klíčku se vytváří další penetrační struktury (např. apresorium). Apresorium je polštářkovitý útvar produkující enzymy, které narušují kutikulu hmyzu. Následně se z apresoria začne vytvářet penetrační hrot, kterým houbový organismus proniká do nitra těla hostitele. Kutikula obsahuje látky, jako jsou volné aminokyseliny a peptidy, které slouží pro rozpoznání hub, jejich přichycení a klíčení. Houba přijímá živiny, které jsou součástí kutikuly a poté i živiny z vnitřních orgánů a tkání hostitele (Landa 2002).

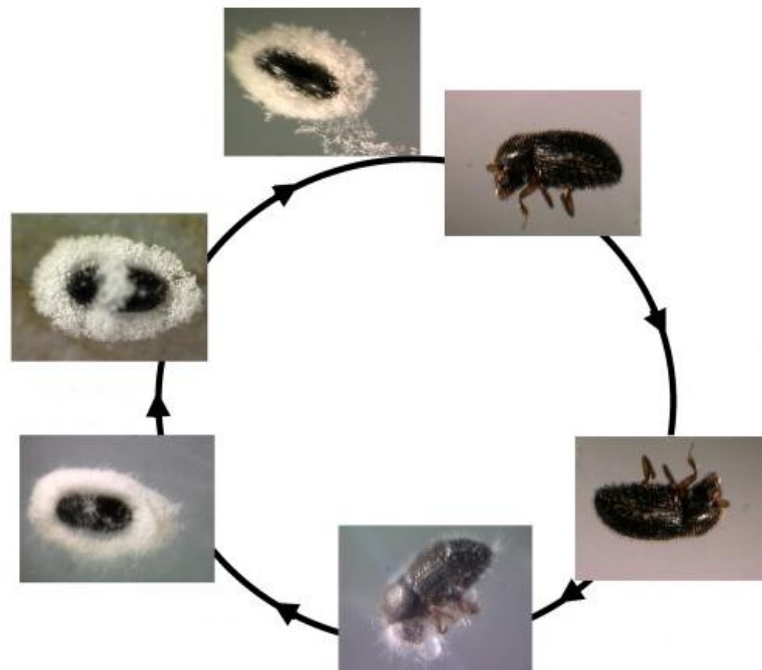
Klíčení a úspěšnou infekci ovlivňuje řada faktorů, např. optimální teplota a vlhkost, ale také vnímavý hostitel a jeho vývojové stadium (Hajek, St. Leger 1994). Dalšími možnostmi nálezů je pronikání infekce přes ústní ústrojí hmyzu, kterým se dostává až do zažívacího traktu. Dále mohou pronikat do hostitele přes dýchací otvory, řitní otvor, otvor pohlavního aparátu nebo přes různá poranění hmyzu. Ve většině případů jde však o aktivní pronikání entomopatogenních hub přes kutikulu (Weiser 1966; Landa 1994; Zimmermann 2007).

Obr. č. 1: Parazitická fáze vývojového cyklu entomopatogenních hub – proces od naklíčení konidie přes proniknutí patogena do těla s následným vývojem uvnitř hostitele (Hajek, St. Leger 1994).



Jak je uvedeno výše, houby pronikají do těla pomocí penetračního hrotu. Po proniknutí dojde k tvorbě invazivních hyf, které rychle kolonizují tělní dutinu. Uvnitř těla se začínají vytvářet hyfová tělíska (blastospory), která se množí pučením v hemocelu. Houbový organismus však musí po proniknutí do těla hmyzu překonat jeho imunitní obranné mechanismy. Imunitní obranné mechanismy překonává patogen produkcí toxinů a jiných sekundárních metabolitů. Usmrcení hostitele patogenem je způsobeno kombinací několika dějů, včetně potravní deficiencí hostitele, invazí patogena do tělních tkání hostitele a jejich destrukcí. Smrtí hostitele dochází k ukončení parazitické fáze patogena a začíná fáze saprotrofní (Inglis *et al.* 2001).

Obr. č. 2: Saprotrofní fáze vývojového cyklu entomopatogenních hub – proces od usmrcení hostitele a následné proliferace entomopatogenní houby na povrch patogena až po úplnou sporulaci na jeho těle (podle Posada, Vega 2005).



Smrt hostitele je způsobena většinou kombinací působení sekundárních metabolitů, fyzickým bráněním cirkulace hemolymfy, utilizací tkání a poškozením orgánů (Goettel, Inglis 1997). Za vhodných podmínek dochází bezprostředně po usmrcení hostitele k prorůstání houby na povrch těla usmrceného hostitele (tzv. proliferace) a na vzdušném myceliu se vytvářejí fruktifikační orgány charakteristické pro daný druh. Saprotrofní fáze patogena končí úplnou sporulací, tedy tvorbou

nových „sekundárních“ konidií (Osborne, Landa 1992; Tanada, Kaya 1993). Nově vytvořené konidie jsou v dormantním stavu a jsou schopny si udržet vitalitu až po dobu několika měsíců. Dočasná dormance konidií je ukončena šířením a adhezí konidií na povrchu těla nového vhodného hostitele. K šíření patogena dochází pomocí konidií šířených nejčastěji pasivně (voda, proudění vzduchu) nebo přímým kontaktem zdravých jedinců s jedinci infikovanými (Osborne, Landa 1992; Tanada, Kaya 1993).

2.4.3 Podmínky pro vývoj nákaz entomopatogenních hub

Přirozené epizoozie se vyskytují nejčastěji během vlhkých podmínek. Účinnost entomopatogenních hub závisí na přítomnosti patogenních druhů a/nebo virulentních kmenů v populaci hmyzu, na vnímavém stádiu v populaci a na vhodných podmínkách prostředí. Zejména pak na relativní vzdušné vlhkosti a teplotě. Jedná-li se o infekci půdních škůdců, důležitým faktorem vedle vlhkosti a teploty půdy je důležitá i půdní struktura. Entomopatogenní houby tak mohou eradikovat např. populace mšic, larvy dvoukřídlého hmyzu škodících na kořenech, housenky, koníky a populace třásněnek. Mohou tak být důležitým přirozeným faktorem v populacích škůdců hospodářských plodin (Coombs, Coombs 2003).

Ve skleníkových podmínkách může celý vývojový cyklus prodělat houbový organismus v průběhu 3-5 dnů. V podmínkách mírného pásma, tj. vegetačního období prodělá houbový organismus vývoj od klíčení po sporulaci v rozmezí 7-21 dnů (Hall 1981). Klíčení konidií představuje nejkritičtější fázi vývojového cyklu. Klíčící konidie vyžadují relativní vzdušnou vlhkost nad 90% a i vyšší teplota působí příznivě na ostatní fáze vývoje. Pouze při průniku patogena do těla hostitele nejsou nároky na vlhkost tak vysoké. Optimální teploty jsou definovány v rozmezí 20-30°C, ale některé druhy entomopatogenních hub mohou krátkodobě přežívat i vyšší teploty kolem 40-45°C a naopak jiné druhy dokonce i nízké teploty i dlouhodobé zmrazení (Tanada, Kaya 1993).

2.4.3.1 Abiotické faktory ovlivňující vývoj a účinnost entomopatogenních hub

Nejvýrazněji ovlivňují účinnost a průběh infekcí entomopatogenních hub především teplota, vlhkost a sluneční záření. Všechny tyto faktory mají vliv na klíčení konidií, pronikání invazní hyfy přes kutikulu do hostitele, proliferaci na povrch hostitele i následné šíření hub v prostředí (Drummond *et al.* 1987; Tanada,

Kaya 1993; Inglis *et al.* 2001). Všechny entomopatogenní houby, synchronizují svůj životní cyklus se stádií hmyzích hostitelů a podmínkami prostředí (Shah, Pell 2003).

2.4.3.1.1 Teplota

Teplota představuje velmi důležitý faktor, který může ovlivnit vývojový cyklus a účinnost entomopatogenních hub. Teplota v rozmezí 20°C-25°C vyhovuje většině druhů entomopatogenních hub. Infekce a následné onemocnění může proběhnout i při teplotě v rozmezí 15°C-30°C. Při teplotách nad 30°C může docházet ke zpomalení růstu mycelia a při teplotě 37°C k jeho úplnému zastavení. Vhodná teplota půdy pro houby přežívající v ní, závisí na kmenu entomopatogenní houby, na přítomnosti přirozených nepřátel, půdním druhu a typu (Inglis *et al.* 2001).

Vidal *et al.* (1997) prováděli studii na odlišných izolátech *I. fumosorosea* proti molici *B. argentifolii*, kde zkoumali vliv teplotních podmínek na jejich účinnost a rychlost růstu. Izoláty byly získané ze dvou různých oblastí. Z oblasti jihu USA, kde jsou suché i vlhké subtropické oblasti a izoláty z oblasti západní Asie, kde je vlhká tropická oblast. Rozmezí teplot pro vývoj izolátů bylo široké (8-35°C), kdy ideální růst probíhal při teplotách 25-28°C. Nejlepší odolnost vůči vysokým teplotám vykazaly indické kmeny.

2.4.3.1.2 Vlhkost

Relativní vzdušná vlhkost je významným a nezbytným faktorem pro klíčení konidií entomopatogenních hub, které rostou při vlhkosti nad 90% a pro rozvoj infekce v populaci škůdce (Hall 1981). Vlhkost má vliv i na přežívání hub a jejich odolnost. Některé druhy hub dobře snáší i vysoké teploty při vyšší vlhkosti vzduchu nebo snadné kondenzaci vody, kdy dochází k minimálním ztrátám vody. Entomopatogenní houby v případě nepříznivých podmínek vytváří uvnitř těla napadeného hostitele pouze mycelium a saprotrofní fázi vývoje dokončují za příznivých podmínek (Drummond *et al.* 1987). Studium průběhu houbové nákazy a zlepšení podmínek umožnilo po aplikaci mykoinsekticidů rozvoj sekundární infekce. Vývoj entomopatogenních hub vlivem vlhkosti lze cíleně ovlivňovat v určité míře například přidáním olejových substancí do kapalného prostředí konidií. Olej způsobuje lepší přilnavost k tělu hostitele, vytváří příznivé podmínky pro klíčení konidií a zamezuje jejich rychlému odumírání (Butt 2002).

2.4.3.1.3 Sluneční záření

Pro většinu entomopatogenních hub je sluneční záření podstatným faktorem pro přežívání konidií a jejich uvolňování. Konidie však mohou být poškozeny zejména ultrafialovým zářením (hlavně paprsky UVB spektra, 285-320nm), které je škodlivější než viditelné a infračervené záření (Fargues *et al.* 1997). Ultrafialové záření působí nepříznivě na chromozomální strukturu DNA všech mikroorganismů (Ingoffo, Garcia 1978), zatímco přirozené sluneční záření příznivě ovlivňuje odolnost entomopatogenních hub. Velmi důležitý je i obsah pigmentu, například pigmentované konidie jsou odolnější ke slunečnímu záření než konidie méně pigmentované. Citlivost jednotlivých druhů entomopatogenních hub ke slunečnímu záření byla odlišná. Nejmenší odolnost vůči slunečnímu záření byla zaznamenána u houby *I. fumosorosea* a *B. bassiana*, oproti tomu konidie *M. flavoviridae* prokázaly větší odolnost (Ingoffo 1992).

2.5 Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub

2.5.1 Houby rodu *Aschersonia*

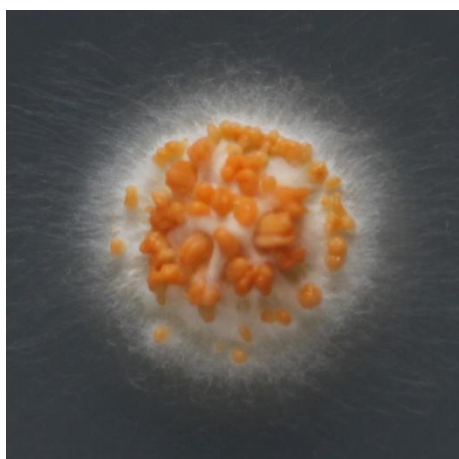
Houba *A. aleyrodis* Webber, *A. goldiana* a *A. placenta* se řadí mezi nejvýznamnější druhy (Landa 2002). Houby rodu *Aschersonia* se přirozeně vyskytují v tropických a subtropických oblastech a jejich okruh hostitelů se úzce zaměřuje na molice a červce. V rámci rodu *Aschersonia* je zaznamenáno přes 50 druhů hub. Určité rody *Aschersonia* infikují pouze červce (skupina *Lecaniicolae*), a jiné druhy infikují výhradně molice (skupina *Aleyrodiocolae*). Nejstudovanějším druhem proti molicím je houba *A. aleyrodis*, která má podstatné využití v biologické ochraně. Tato houba byla používána v citrusových sadech, kde úspěšně snižovala četnost populací molice citrusové ve spojení s predátory a parazitoidy (Zhu *et al.* 2008).

A. aleyrodis přenáší onemocnění hlavně na nymfální stádia molic, kdy jsou nymfy nejnáchylnější k infekci. U dospělců dochází k nákaze jen výjimečně (Meekes *et al.* 2000).

Teplota ovlivňuje průběh vývojového cyklu. Vývoj probíhá při optimálních teplotách 25-28°C. Při teplotách nad 32°C a teplotách pod 12°C dochází ke zpomalení až úplnému zastavení vývojového cyklu. Důležitá je i relativní vzdušná vlhkost nad 75%, která podmiňuje rozvoj nákazy *A. aleyrodis*. Počáteční příznaky nákazy se projevují 3-4 den po napadení pyknosporami. Celý vývojový cyklus

probíhá v rozmezí 5-7 dnů při optimálních podmínkách (Osborne, Landa 1992; Landa 1994).

Druhy hub rodu *Aschersonia* jsou po celém světě důležitým prostředkem ke snížení populací molíc. Nákaza populací molíc probíhá pyknosporami. *A. aleyrodis* má pyknostry jednobuněčné, větvenitého tvaru, které se vyvíjejí z konidiogenních buněk „fialid“. Fialidy jsou umístěny v pyknidách, které jsou uspořádány na povrchu usmrčeného hostitele. Součástí pyknostry je β -karoten, který podmiňuje zbarvení pyknostry, způsobuje načervenalou barvu nakažených nymf a chrání pyknostry proti nepříznivým vlivům slunečního záření (Osborne, Landa 1992; Chaverri *et al.* 2008).



Kultura houby *Aschersonia aleyrodis* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Larvy molice bavlníkové *Bemisia tabaci* infikované houbou *Aschersonia aleyrodis* (Foto: KRV, ZF, JU)

2.5.2 Houby rodu *Metarhizium* (Sorokin)

Poprvé byla entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae* identifikována na vrubounovitých broucích. Houba *Metarhizium anisopliae* může nakazit až stovku druhů hmyzu z odlišných řádů rovnokřídlých, polokřídlých, brouků, dvoukřídlých, motýlů a blanokřídlých. Druh *M. anisopliae* je pokládán za polyfyletický na základě genetických analýz. Kmeny tohoto rodu jsou rozděleny do 4 poddruhů : *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *Acridum* (Zimmermann 1993).

Optimální teplota pro *Metarhizium anisopliae* se pohybuje v rozmezí 20-25 °C. Obvykle se objevuje u stádií hmyzu vyskytujících se poblíž. K naze dochází přes kutikulu hostitele nebo prostřednictvím střev (Weiser 1966). Nakažený jedinec

M. anisopliae postupně porůstá hustým myceliem tmavě zelené barvy. Konidiofory vytvářejí husté, bohatě rozvětvené, mnohoramenné útvary podobné svícňům.

Mycelium zcela pokrývá napadeného hostitele, konidiofory jsou v kompaktních shlucích, jednotlivé konidiofory se široce větví a připomínají svícny. Konidiogenní buňky tvoří husté hymenium. Konidie jsou jednobuněčné, cylindrické nebo vejčité a tvoří se v řetízkách. Velikost konidií je až 9 μ m (Humber 1997).



Středová kultura houby *M. anisopliae* na živné půdě (Foto: KRV, ZF, JU)



Infikovaná larva potměníka moučného *T. molitor* houbou *M. anisopliae* (Foto: KRV, ZF, JU)

2.5.3 Houby rodu *Lecanicillium* spp.

Lecanicillium spp. jsou velmi rozšířené entomopatogenní houby dříve známé pod názvem *Verticillium lecanii*. Rod *Verticillium* obsahoval široké spektrum druhů a parazitoval na širokém spektru hostitelů, jako jsou bezobratlí, hád'átka, rostliny a houby. V roce 2001 Zare a Gams provedli revizi tohoto druhu použitím rDNA sekvence a druhy infikující hmyz zařadili do nového rodu *Lecanicillium*. Tento rod zahrnuje druhy *Lecanicillium attenuatum*, *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium longisporum*, *Lecanicillium muscarium* nebo *Lecanicillium nodulosum*, které byli dříve klasifikovány jako *Verticillium lecanii*. *Lecanicillium* spp. jsou široce polyfágní druhy patogena se schopností žít se i odumřelým organickým materiálem. Patogeny nejčastěji napadají populace hmyzu řádu stejnokřídlých, především mšice, molice a červce (Hall 1976). Méně častými hostiteli jsou zástupci řádů rovnokřídlých, ploštic, motýlů, brouků, blanokřídlých a třásnokřídlých. Houby se vyskytovaly i mimo hmyzí populace například u některých druhů populací roztočů (Osborne, Landa 1992).

Optimální podmínky pro klíčení konidií je relativní vzdušná vlhkost 85-90% a teplota 15-25°C. Vytváří bílé mycelium. Konidie jsou drženy při sobě pomocí mucilagenní hmoty, která dodává konidiím výbornou schopnost se přichytit k tělu hostitele. Houba napadá hmyz, který infikuje hyfami, proniká přes kutikulu hostitele a uvnitř těla zničí vnitřní orgány. Tím dochází k usmrcení hostitele. Ultrafialové záření způsobuje poškození spor *Lecanicillium spp.*. Tyto druhy entomopatogenních hub produkují během vývojového cyklu insekticidní toxiny například bassianolide a kyselinu dipikolinovou (Cloyd 2005). Druh *Lecanicillium sp.* vykazuje i mykoparazitický status, kdy je schopen parazitovat na padlí a rzích (Kavková, Čurn 2005).

Mycelium je bílé nebo krémové. Na vzdušném myceliu se vytvářejí dlouhé úzké konidiofory. Konidiofory jsou v přeslenech a z jednoho místa vyrůstají proti sobě 2, 3 až 4 konidiofory. Na konci každého konidioforu se postupně tvoří elipsoidní konidie. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidiofory jsou vytvářeny postupně a nová konidie odtlačuje dříve vytvořenou konidii do shluku, který má podobu kuličky. V závěru sporulace se kuličky pokrývají mucilagenní hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Hall 1985).



Středová kultura entomopatogenní houby *L. muscarium* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Infikované puparium molice skleníkové entomopatogenní houba *Lecanicillium muscarium* (Foto: KRV, ZF, JU)

2.5.4 Houby rodu *Beauveria* (Vuillemin)

Nejvýznamnějšími druhy rodu *Beauveria* jsou *B. bassiana*, *B. brongniartii* a *B. tenella* (Zimmermann 2007). Tyto entomopatogenní houby se běžně nacházejí v půdě, kde cizopasí na půdním hmyzu, převážně na přezimujících stádiích. Mezi

hostitelskými druhy jsou zástupci z řádů rovnokřídlých (krtonožky), dvoukřídlých, brouků (larvy a kukly chroustů, mandelinky bramborové), larvy a kukly motýlů (Humber 1997).

Druh *B. bassiana* Vuillemin objevil Agostino Bassi v roce 1834. Vyskytuje se přirozeně v půdě i na některých rostlinách. Byla izolována z velkého množství druhů hmyzu. Využívá se k ochraně více jak 70 druhů hmyzích škůdců (Aleshina 1980).

Nakažený jedinec porůstá hustě bílým myceliem, proto se nákaze přezdívá „bílá muskardina“ (Weiser 1966). Pro houbu *B. bassiana* jsou typické světle nažloutlé až načervenalé kolonie s bezbarvou až narůžovělou spodní stranou. Konidiogenní buňky mají kulatou nebo lahvicovitou bazální část, na konidiogenní buňce se formuje rachys, na kterém jsou konidie v cik-cak postavení (Zimmermann 2007). Na každém zubu rachysu se vyvíjí nepřehrádkované konidie. Plně vysporulovaná kultura vytváří bílé shluky podobné bílým sněhovým koulím. Shluky tvoří nahloučené konidiofory s konidii (Humber 1997).

Infekci i klíčení konidií ovlivňuje celá řada faktorů, například optimální teplota a vlhkost, stádium a vnímavost hostitele ale i kutikulární lipidy (Zimmermann 2007). Houba proniká do těla hostitele přes méně sklerotizovaná místa pokožky. V místě kontaktu dochází k počátečnímu vývoji, kdy spora nabobtná a vypouští klíček. Klíček proniká do těla hostitele. Dalšími možnými způsoby jsou nákazy přes ústní otvor a střevo, přes stigmata hmyzu a pohlavní orgány (Weiser 1966).



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



Dospělec lýkožrouta smrkového infikovaný entomopatogenní houbou *Beauveria bassiana* (Foto: KRV, ZF, JU)

2.5.5 Houby rodu *Hirsutella* (Patouillard)

Do rodu *Hirsutella* se zařazuje přibližně 50 druhů hub, z nichž mezi nejvýznamnější patří druh *Hirsutella thompsonii*, která byla popsána v roce 1950 Fisherem (Van Der Geest *et al.* 2000). *Hirsutella thompsonii* je vysoce patogenní vůči sviluškám a vybraným druhům fytofágních roztočů. Při testování svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) byly k nákaze náchylní jak dospělci, tak i larvy a infekce se šířila do těla hlavně v oblasti končetin (Van Der Geest *et al.* 2000). Některé druhy rodu *Hirsutella* se vyznačují schopností růstu na umělých živných médiích. Tyto druhy entomopatogenních hub jsou pokládány za přirozené nepřátele škodlivých roztočů, jelikož uvolňují látku hirsutellin, který se vyznačuje silnými cytotoxickými a insekticidními vlastnostmi (Maimala *et al.* 2002).

Nákazu způsobují konidie, které se snadno přichycují na kutikulu hostitele. Průnik spor přes kutikulu trvá minimálně 4 hodiny. Při vysoké relativní vlhkosti kolem 98% a teplotě 25-30°C konidie mohou klíčit a pronikat tak do těla hostitele, kde se hyfy postupně rozrůstají. Mycelium po usmrcení hostitele vychází z těla ústním, řitním nebo pohlavním otvorem. Celý vývojový cyklus je ukončen po 60-72 hodinách. (Van Der Geest *et al.* 2000).

2.5.6 Houby rodu *Nomuraea* (Maublanc)

Rod *Nomuraea* je svým vývojem závislý na larvách různých druhů motýlů. Zahrnuje úzce zaměřené patogeny. Nejvýznamnějším zástupcem je *Nomuraea rileyi*.

Infekce se projevuje hustě bílým myceliem na povrchu hostitele, které následně mění svou barvu na světle zelenou postupným vytvořením konidií. Konidie klíčí na hostiteli při vysoké relativní vlhkosti a teplotě 25°C. Průnik do tělní dutiny probíhá šestý den po aplikaci konidií. Hyfová tělíska jsou krátká, silná a vznikají pučením hyf. Po usmrcení hostitele prorůstají hyfy na povrch těla.

Tento druh entomopatogenních hub způsobuje až 90% úmrtnost u larválních stadií škůdců převážně v subtropických a mírných oblastech (Boucias *et al.* 2000).

2.5.7 Houby rodu *Isaria* a *Paecilomyces*

Nejvýznamnějšími druhy, které náleží do rodu *Isaria*, jsou *I. fumosorosea*, *I. farinosa*, *I. tenuipes* a *I. javanica*. Tyto druhy dříve náležely do rodu *Paecilomyces*. Na základě nedávných fylogenetických studií, ve kterých byly posuzovány polyfyletické vztahy v rámci rodu *Paecilomyces* byly tyto druhy přeřazeny do

nového rodu *Isaria* (Luangsa-Ard *et al.* 2004). V současné době jsou v rodě *Paecilomyces* zařazeny následující asi nejvíce známé druhy *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii* a *P. carneus*. Druh *Paecilomyces lilacinus* byl ale v roce 2011 přejmenován na *Purpureocillium lilacinum* (Luangsa-Ard *et al.* 2011).

Tabulka č. 1: Hlavní synonyma pro druhy hub rodu *Isaria* a *Paecilomyces* dle (Anonym 3; Zimmermann 2008).

Druh	Synonyma
<i>Isaria fumosorosea</i> Wize (1904)	<i>Spicaria fumosorosea</i> (Wize) Vassiljevsky (1929) <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (Wize) A.H.S. Br. & G. Sm., (1957) <i>Spicaria aphodii</i> Vuill., (1910) <i>Monilia aquatilis</i> Malguth, (1928) <i>Paecilomyces hibernicus</i> Kennelly & Grimes, (1930) <i>Paecilomyces hibernicum</i> Kennelly & Grimes (1930) <i>Paecilomyces isarioides</i> N. Inagaki, (1962)
<i>Isaria farinosa</i> (Holmsk.) Fr. (1832)	<i>Ramaria farinosa</i> Holmsk., (1781) <i>Clavaria farinosa</i> (Holmsk.) Dicks., (1790) <i>Corynoides farinosa</i> (Holmsk.) Gray, (1821) <i>Spicaria farinosa</i> (Holmsk.) Vuill., (1911) <i>Penicillium farinosum</i> (Holmsk.) Biourge, (1923) <i>Paecilomyces farinosus</i> (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm., (1957) <i>Isaria psychidae</i> Pole-Evans, (1912) <i>Penicillium alboaurantium</i> G. Sm., (1957) <i>Penicillium albo-aurantium</i> G. Sm. (1957)
<i>Isaria tenuipes</i> Peck (1879)	<i>Paecilomyces tenuipes</i> (Peck) Samson, (1974) <i>Spicaria heliothis</i> Charles, (1938)
<i>Isaria javanica</i> (Friedrichs & Bally) Samson & Hywel-Jones, (2005)	<i>Spicaria javanica</i> Bally, Meded. (1923) <i>Paecilomyces javanicus</i> (Friedrichs & Bally) A.H.S. Br. & G. Sm., (1957)
<i>Paecilomyces carneus</i> (Duché & R. Heim) A.H.S. Br. & G. Sm., (1957)	<i>Spicaria carnea</i> Duché & R. Heim, (1931) <i>Spicaria decumbens</i> Oudem., (1902) <i>Penicillium nopporoense</i> Y. Sasaki & Nakane, (1943) <i>Penicillium nopporoensum</i> Y. Sasaki & Nakane, (1943) <i>Spicaria carnosus</i> J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster, (1957)
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson, (1974)	<i>Penicillium lilacinum</i> Thom, (1910) <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson, (2011) <i>Penicillium amethystinum</i> Wehmer <i>Spicaria rubidopurpurea</i> Aoki, (1941)

2.6 Nejvýznamnější druh *Isaria fumosorosea* Wize (1904)

2.6.1 Hostitelské spektrum

Houba *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) má široký hostitelský okruh, u kterého je schopna vyvolat onemocnění. Byla zjištěna na více než 40 druzích hmyzu (Hoddle 2004). Podmiňuje nákazy na zástupcích z mnoha řádů hmyzu (rovnokřídlých, třásnokřídlých, polokřídlých, brouků, motýlů, dvoukřídlých), na fytofágních roztočích (například sviluškovití – Tetranychidae) a některých druhů háďátek (cystotvorná háďátka z rodů *Globodera*, *Heterodera*). Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* je tedy široce polyfágní entomopatogenní, akarifágní a nematofágní druh houby (Osborne, Landa 1992; Hoddle 2004).

Zimmermann (2008) uvádí ve své práci celou škálu hostitelů, které jsou infikovány houbou *I. fumosorosea* a zároveň houbou *I. farinosa*. Častými hostiteli druhu *I. fumosorosea* uvádí různé druhy molic, mšic, třásněnek a červců, ale také mandelinku bramborovou a zavíječe kukuřičného. Mezi hostitele *I. farinosa* běláška zelného, mandelinku bramborovou, klikoroha borového nebo zavíječe kukuřičného (Zimmermann 2008). Prenerová (2007) izolovala *Isarii farinosa* z larev ploskohřbetky.

Isaria fumosorosea se může projevit také jako mykoparazit napadající například konidie padlí okurkového (Kavková, Čurn 2005). Izoláty *I. fumosorosea* byly získány nejen z napadených těl bezobratlých, ale i z vody, vzduchu, půdy, rostlin a dalších hub (Zimmermann 2008).

2.6.2 Rozšíření

Je to kosmopolitně rozšířený druh, který se nachází v zemědělských i nezemědělských půdách a zároveň se vyskytuje na nadzemních částech rostlin. V roce 1983 byl v Číně, oblasti Pekingu zaznamenán první výskyt houby *I. fumosorosea* v populaci molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum*. Tento nalezený vysoce virulentní kmen vykazoval velmi silné epizootie, které zdecimovali molici skleníkovou ve skleníkových kulturách (Fang *et al.* 1983). Podruhé se významná přirozená epizootie způsobená houbou *I. fumosorosea* vyskytla na Floridě v populacích molice tabákové *Bemisia tabaci* (Osborne *et al.* 1990). Odizolovaný kmen byl označen jako Apopka 97 (Apopka – jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen Apopka 97 poprvé zachycen a odizolován). Kmen Apopka 97 se ukázal jako vysoce virulentní a po aplikaci způsobil rozsáhlé infekce v populacích *B. tabaci* a

T. vaporariorum nejen ve skleníkách, ale i v polních kulturách (Osborne, Landa 1992). V současné době jsou na bázi kmene Apopka 97 vyráběny komerční biopreparáty (Faria, Wright 2007).

2.6.3 Taxonomické zařazení

Entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea* se zařazuje do říše hub - do oddělení pravých hub (forma pohlavního rozmnožování) nebo pomocného oddělení hub nedokonalých, tzv. mitosporické houby (=Deuteromycota) (forma nepohlavního rozmnožování). Ve většině systémů mitosporických hub zahrnuje pomocná třída Hyphomycetes jen jediný pomocný řád *Moniliales* (Váňa 1998).

Tabulka č. 2: Taxonomické zařazení druhu *Isaria fumosorosea* na základě anamorfního stádia (Váňa 1998) a telemorfního stádia (Sung *et al.* 2007).

Anamorfní stádium	Teleomorfní stádium
Pomocné pododdělení: <i>Deuteromycota</i> Pomocná třída: <i>Hyphomycetes</i> Pomocný řád: <i>Moniliales</i> - Rod: <i>Isaria</i> Druh: <i>Isaria fumosorosea</i>	Oddělení: <i>Ascomycota</i> Třída: <i>Sordariomycetes</i> Řád: <i>Hypocreales</i> Čeleď: <i>Cordycipitaceae</i> Rod: <i>Isaria</i> Druh: <i>Isaria fumosorosea</i>

Tabulka č. 3: Souhrn významných telemorf a anamorf entomopatogenních hub rodu *Hypocreales* (Sung *et al.* 2007).

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

V systému řazení teleomorfy byly v posledních letech prováděny změny (Sung *et al.* 2007). Čeleď Clavicipitaceae byla reklasifikována, došlo k jejímu rozdělení na tři samostatné čeledi Clavicipitaceae, Cordycipitaceae a Ophiocordycipitaceae. Do druhé jmenované čeledi je řazen i rod *Isaria* a tato čeleď byla ustanovena na základě typu představovaného rodem *Cordyceps*, zahrnuje většinu jeho druhů, které formují mohutná stromata, uvnitř nichž jsou uloženy plodnice peritecia.

Tabulka č. 4: Současná klasifikace některých druhů dříve zařazených v rodu *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* založená na fylogenetické studii řádu *Hypocreales* (Luangsa-Ard *et al.* 2004; Sung *et al.* 2007).

Čeleď	Rod	Druh
Clavicipitaceae	<i>Paecilomyces</i>	<i>P. carneus</i> , <i>P. marquandii</i>
Cordycipitaceae	<i>Isaria</i>	<i>I. amoenorosea</i> , <i>I. cateniannulata</i> , <i>I. cateniobliqua</i> , <i>I. cicadae</i> , <i>I. coleopterora</i> , <i>I. farinosa</i> , <i>I. fumosorosea</i> , <i>I. ghanensis</i> , <i>I. tenuipes</i>
Ophiocordycipitaceae	<i>Paecilomyces</i>	<i>P. lilacinus</i>

2.6.4 Morfologická charakteristika

Isaria fumosorosea nejdříve vytváří na těle hostitele bílé vatovité mycelium. Postupně dochází ke změně barvy mycelia z bílé barvy do narůžovělého, nafialovělého až šedofialového odstínu. Odstín barvy mycelia se mění v závislosti na stupni vývoje kultury, zejména sporulaci. Povrch těla infikovaného hostitele je zcela pokryt značným množstvím konidií a díky tomu se vatovité mycelium přeměňuje v prašné (Landa *et al.* 1994).

Houby *I. fumosorosea* vytváří nejprve na hyfách přeslenovitě uspořádané konidiofory. Konidiofory jsou vzpřímené 100 µm dlouhé v průměru 1,0 – 2,5 µm. Na každém konidioforu se postupně utváří 3 - 6 konidiogenních buněk (fialid). Konidiogenní buňky jsou lahvicovitěho tvaru se zduřelou bází a výrazným krčkem. Průměr krčku na vrcholu má v průměru 0,5 µm. Z konidiogenních buněk se pučením vytváří konidie oválného tvaru, které jsou vřetenovité, průhledné až mírně narůžovělého či fialového odstínu. Velikost konidií je 2,5 – 4,0 x 1,4 - 2,2 µm. Starší konidie jsou odtlačeny do tvořících se řetězů mladšími konidiemi, které jsou ve

spojení s fialidou. V nově utvořeném řetízku se může vyskytovat i více než 50 konidií se silně hydrofobními povrchy (Osborne, Landa 1992).

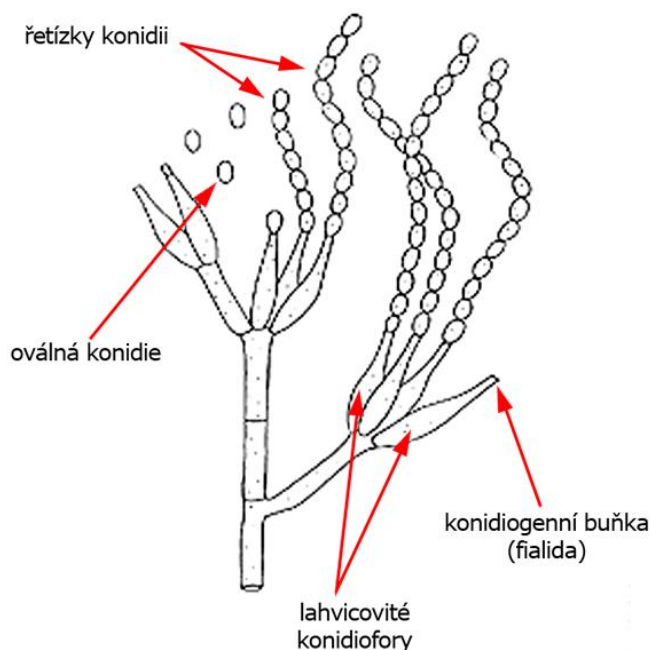


Středová kultura entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



Dospělec molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* infikovaný houbou *Isaria fumosorosea* (Foto: KRV, ZF, JU)

Obr. č. 3: Morfologické struktury entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*



2.6.5 Průběh nákazy na molicích

Vnímavost hostitele k infekci houbovým patogenem může ovlivnit mnoho faktorů. Jedná se o kmen houby, fyziologický stav hostitele, výživu, obranné mechanismy, kutikulární a epikutikulární mikroorganismy stejně jako mnoho dalších faktorů jako například prostředí (Goettel, Inglis 1997). Aplikace entomopatogenních

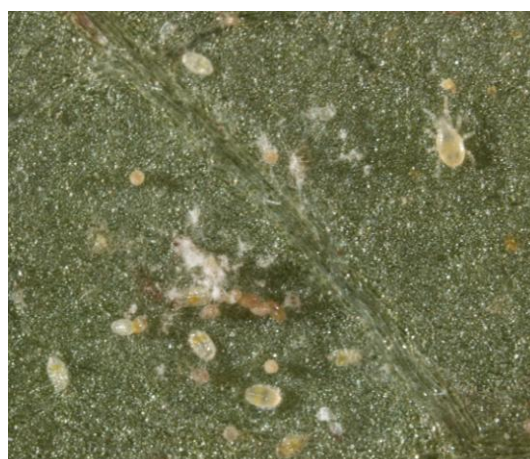
hub neposkytuje vždy zaručené potlačení hmyzích škůdců. Faktory zodpovědné za iniciaci a rozvoj epizoozie v hmyzí populaci jsou silně komplexní, vyvolávající interakce mezi patogenem, hostitelským hmyzem, prostředím a časem. Porozumění této dynamice interakcí je velmi důležité a osvětlení faktorů, které limitují iniciaci a rozvoj choroby umožňuje překonat překážky a dosáhnout efektivní ochrany plodin proti hmyzím škůdcům (Inglis *et al.* 2001).

Houba *Isaria fumosorosea* je patogenem, který se přirozeně vyskytuje v populacích molic, zejména molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) a molice bavlníkové (*Bemisia tabaci*). Molice bavlníková i skleníková jsou velmi vnímavými hostitelskými druhy. *Isaria fumosorosea* může prodělavat vývojový cyklus na všech vývojových stádiích obou druhů molic.

První příznaky onemocnění u molic způsobené houbou *I. fumosorosea* se v příznivých podmínkách mohou objevit od 48 do 72 hodin a k plné sporulaci na těle molic může docházet již 5. den nebo 7. den od počátku infekce. Pro klíčení konidií po jejich uchycení na povrchu hostitele je důležitá relativní vzdušná vlhkost nad 95% minimálně po dobu 10 až 12 hodin. Optimální teplota pro vývoj houby *I. fumosorosea* je v rozmezí od 20 do 30°C. Nicméně 25°C je nejpříznivější. Při teplotách vyšších než 30°C dochází ke zpomalení růstu a vývoje *I. fumosorosea* mnohem rychleji než u teplot nižších pod 8°C (Vidal *et al.* 1997).



Sporulace houby *Isaria fumosorosea* na povrchu těla molice *Bemisia tabaci* (Foto: KRV, ZF, JU)

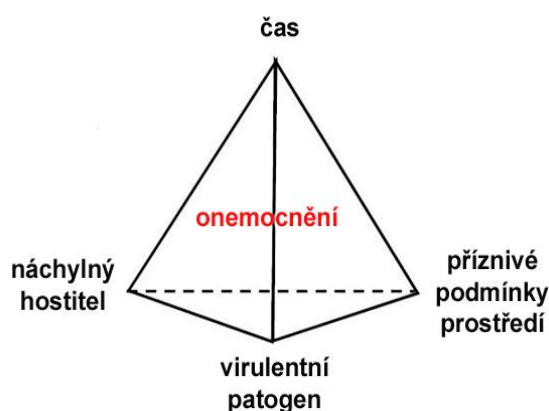


Populace molice bavlníkové *B. tabaci* infikované *I. fumosorosea* (Foto: KRV, ZF, JU)

Od ostatních druhů entomopatogenních hub má *Isaria fumosorosea* infekční cyklus v podstatě rychlejší. Ve srovnání s druhem *Lecanicillium muscarium* je infekční cyklus *I. fumosorosea* kratší o 1 až 3 dny a druh *Aschersonia aleyrodis* se vyvíjí o 4 až 7 dní pomaleji než druh *I. fumosorosea* (Landa, Jiranová 1988).

Isaria fumosorosea vytváří vedle konidií produkovaných na vzdušném myceliu i blastosporu kulovitě až prodlouženého eliptického tvaru, které vznikají při parazitické fázi v hemolymfě molice. V laboratořích lze docílit produkce blastospor při růstu *I. fumosorosea* v submerzní kultuře, což se využívá v praktické biologické ochraně rostlin. V současné době jsou některé biopreparáty koncipovány na bázi blastospor. Příkladem je biopreparát PFR 97 20% WG na bázi houby *Isaria fumosorosea*, kmen Apopka 97. Bylo zjištěno, že blastosporu klíčí na povrchu molice rychleji než konidie. Mají rychlejší účinnost na molice a jsou životaschopnější (Osborne, Landa 2002).

Obr. č. 4: Pyramida onemocnění v populaci molice



Pro vznik onemocnění hmyzu jsou nezbytné tři důležité komponenty: náchylný hostitel, virulentní patogen a příznivé podmínky prostředí. Faktor času hraje důležitou roli v načasování střetu infekčních propagulí patogena s citlivým stádiem vývojového cyklu molice skleníkové, délku trvání vysoké relativní vzdušné vlhkosti spolu s příznivou teplotou v prostředí, délku období vhodného pro sporulaci a šíření spor v populaci škůdce.

2.7 Další významné druhy rodu *Isaria* a *Paecilomyces*

2.7.1 *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr.

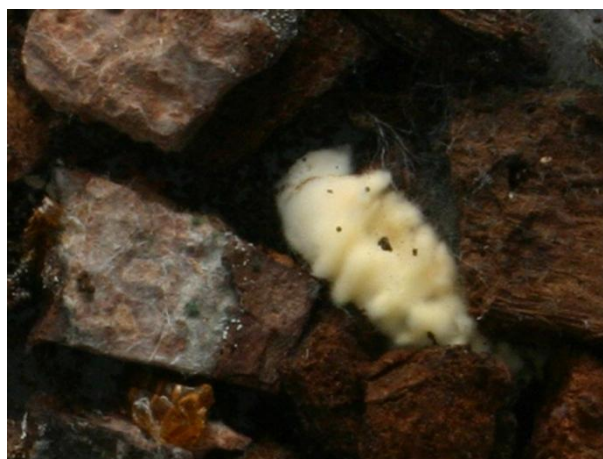
Entomopatogenní houba *Isaria farinosa* má široké spektrum hostitelských druhů. Nejčastějšími hostiteli *I. farinosa* jsou zástupci řádů motýlů, brouků, blanokřídlých, ale i dvoukřídlých, stejnokřídlých a ploščic. Houba *I. farinosa* je běžně izolována z různých druhů hmyzích hostitelů, ale především z určitých stádií hmyzu. Obvykle jde o hmyz žijící v lesní půdě, kde jsou pro rozvoj mykóz velmi

příznivé abiotické podmínky. Nicméně, je izolována i z hmyzu žijícího na nadzemních částech rostlin resp. smrků (Prenerová 1991).

Doberski (1981) uvedl, že relativní vzdušná vlhkost 70 – 100% je velmi důležitá pro rozvoj houbového onemocnění hmyzu po aplikaci *I. farinosa*. Falcon, Agudelo (1983) však zjistili, že tato entomopatogenní houba je schopna vyvolat houbové onemocnění i při relativní vzdušné vlhkosti nižší než 70%, ale nedochází k prorůstání mycelia na povrch usmrceného hostitele.



Středová kultura houby *I. farinosa* na živné půdě PDA (Foto: KRV, ZF, JU)



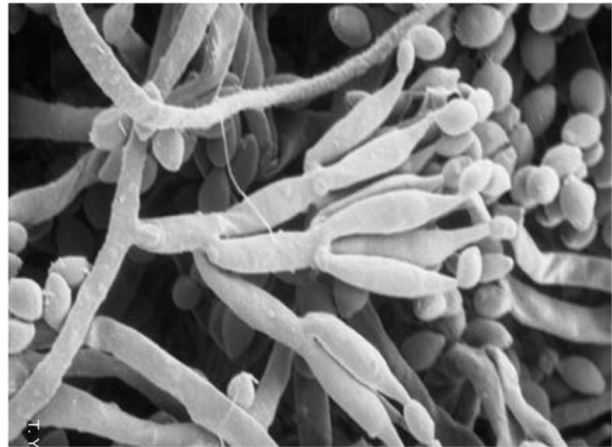
Larva potměníka *T. molitor* infikovaná entomopatogenní houbou *I. farinosa* (Foto: KRV, ZF, JU)

2.7.2 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (1974)

Luangsa-Ard et al. (2011) přejmenovali druh *Paecilomyces lilacinus* na *Purpureocillium lilacinum*. Vědecká komunita doposud nový název úplně nepřijala. První kmen *P. lilacinum* byl izolován v Peru z vajíček půdních háčkovitých hárátek rodu *Meloidogyne*, nicméně druh *P. lilacinum* může způsobit onemocnění i jiných druhů nematod žijících volně v půdě. Houba *P. lilacinum* může za příznivých podmínek vyvolat onemocnění i u pohyblivých stádií vývojového cyklu nematod nebo u volně žijících samiček. Proti vajíčkům háčátek prokázala však nejvyšší účinnost. Houba je běžně izolována i z larev různého druhu hmyzu. Bioagens *P. lilacinum* má výborné využití proti houbě *Rhizoctonia solani*, která je původcem celé řady onemocnění u kulturních rostlin. V laboratorních podmínkách houba *P. lilacinum* produkuje látky, které způsobují zpomalení růstu patogena *R. solani* (Jacobs et al. 2003).



Středová kultura nematofágní houby *P. lilacinum* (Foto: KRV, ZF, JU)



Konidiofory s lahvicovitými konidiogenními buňkami houby *Purpureocillium lilacinum* (Foto: KRV, ZF, JU)

2.8 Kultivace entomopatogenních hub

Většina entomopatogenních hub náležejících do řádu Hyfomycetes jsou fakultativní patogeny a je možné je relativně snadno pěstovat v čistých kulturách na definovaných živných médiích. Na rozdíl od jiných patogenů rostou houby dobře na jednoduchých a levných médiích. Tato schopnost společně s relativně širokým hostitelským spektrem dělá z houbových patogenů vhodné kandidáty pro komerční použití (Goettel, Inglis 1997).

Produkce je jedním z kritických bodů vývoje houbových biopreparátů (Jackson *et al.* 2010). Statut fakultativních parazitů umožňuje produkci biomasy infekčních jednotek (konidií resp. blastospor) pomocí velkokapacitních biotechnologií, což je základní technologický předpoklad pro vývoj a tržní realizaci standardního biopreparátu. Je třeba najít vysoce virulentní kmeny, aby bylo možno realizovat výsledný produkt. Produkce stálého inokula vybraného kmene je zásadní věc pro úspěšné zavádění houbových bioagens. Produkce musí být i ekologicky výhodná (Butt 2002).

Obr. č. 5: Různé kmeny entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* izolované ze škůdců na Floridě, USA (foto: KRV, ZF, JU).



Pro produkci konidií se používají povrchové kultury, které se mohou realizovat na pevných nebo tekutých živných půdách. Pro produkci většího množství konidií se používají levnější přirozené substráty jako je rýže, otruby, kroupy nebo obiloviny (Goettel, Inglis 1997).

Submerzní kultivace se používá pro produkci mycelia, blastospor a v některých případech i konidií. Blastospory jsou buňky podobné konidiím, ale s tenčí stěnou. Blastospory entomopatogenních hub jsou produkovány ve fermentačních biotechnologiích (submerzní kultivace v tekuté živné půdě) a využívají fenoménu změny morfologické formy patogena po proniknutí do semi-aerobních podmínek tělní dutiny (Goettel, Inglis 1997).

Obr. č. 6: Produkce *I. fumosorosea* pomocí povrchové kultivace na přirozeném substrátu (foto: KRV, ZF, JU).



2.9 Biopreparáty na bázi entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*

V současné době jsou ve světě produkovány a distribuovány biopreparáty vyrobené na bázi entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* (Zimmermann 2007). Faria, Wright (2007) ve své práci uvádí 10 přípravků, které jsou vyráběny zejména v Mexiku, Indii, USA a Kolumbii.

Tabulka č. 5: Entomopatogenní druhy (Ascomycota: Hypocreales) inkorporovaných do biopreparátů a jejich status komerčního využití (Faria, Wraight 2007)

Druh entomopatogenní houby/varietà	Počet produktů	Komerční status		
		Aktivní	Neaktivní	Nezjištěno
<i>Aschersonia aleyrodis</i>	1 (0.6%)	0	1	0
<i>Beauveria bassiana</i>	58 (33.9%)	45	9	4
<i>Beauveria brongniartii</i>	7 (4.1%)	5	0	2
<i>Hirsutella thompsonii</i>	3 (1.8%)	1	1	1
<i>Isaria fumosorosea</i>	10 (5.8%)	7	1	2
<i>Isaria sp.</i>	1 (0.6%)	1	0	0
<i>Lecanicillium longisporum</i>	2 (1.2%)	2	0	0
<i>Lecanicillium muscarium</i>	3 (1.8%)	3	0	0
<i>Lecanicillium sp.</i>	11 (6.4%)	10	0	1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	58 (33.9%)	44	10	4
<i>Metarhizium anisopliae var. acridum</i>	3 (1.8%)	3	0	0
<i>Nomuraea rileyi</i>	1 (0.6%)	0	0	1

Tabulka č. 6: Biopreparáty na bázi entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a *Isaria spp.* uvedené na trh (Faria, Wraight 2007).

Země původu registrace/trh	Komerční název	Formulace přípravku	Cílový organismus (řád a čeleď)	Firma
EU, Japan	PreFeRal, (=Preferred)	B/WG	Hemiptera (Aleyrodidae)	Biobest n.v. Belgium (licence, Certis, USA)
India	Priority	A/WP	Acari (Eriophyidae, Tetranychidae)	T.Stanes a Company Limited, India
Mexiko	Pae-Sin	C/WP	Hemiptera (Aleyrodidae)	Agrobiologicos del Noroeste S.A. de C.V. (Agrobionsa), Mexiko
Mexiko	Pae-Sin	C/OD	Hemiptera (Aleyrodidae)	Agrobiologicos del Noroeste S.A. de C.V. (Agrobionsa), Mexiko
Mexiko	<i>P. fumosoroseus</i>	A/NI	Hemiptera (Aleyrodidae)	Centro de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG), Mexiko
USA, Mexiko	PFR-97 20% WDG	B/WG	Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae), Thysanoptera (Thripidae) + Acari (Tetranychidae)	Certis, Inc., USA
Kolumbie	Ago Biocontrol, Paecilomyces 50	A/NI	Coleoptera + Nematoda	Ago Biocontrol, Kolumbie
Kolumbie	Fumosil	A/NI	Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae), Thysanoptera (Thripidae)	Productos Biolo' gicos Perkins Ltda, Kolumbie
Kolumbie	Successor	A/NI	Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae), Thysanoptera (Thripidae) + Acari (Tetranychidae)	Live Systems Technology S.A., Kolumbie
Venezuela	Bemisin	C/NI	Hemiptera (Aleyrodidae)	Probioagro, Venezuela
Isaria sp. (dříve Paecilomyces sp.)				
India	PaciHit Rich	NI (liquid suspension)	Hemiptera (Aleyrodidae), Thysanoptera (Thripidae) + Nematoda	Plantrich Chemicals a Biofertilizers Ltd, India

2.9.1 PreFeRal® WG a PreFeRal™

Mykoinsekticidní přípravky pod obchodním názvem PreFeRal® WG a PreFeRal™ jsou vyráběny společností Certis USA LLC. Přípravek s označením PreFeRal® WG je distribuován po celé Evropě společností Biobest Belgium N.V.

(Faria, Wraight 2007) a přípravek s obchodním názvem PreFeRal™ je distribuován po USA společností SePro.

Přípravky PreFeRal obsahují spory kmene Apopka 97 entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*. Kmen Apopka 97 byl objeven profesorem entomologie Lancem S. Osbornem, Ph.D. působícího na Floridské univerzitě, MREC (Mid-Florida Research and Education Center in Apopka).

Oba přípravky PreFeRal obsahují 20 % aktivní složky, tj. druh *Paecilomyces fumosoroseus* (současně *Isaria fumosorosea*) kmen Apopka 97. Inertní složka přípravků tvoří 80% a obsahuje smáčedla, UV protektanty a zároveň nutriční složku, která slouží po aplikaci k rychlejšímu růstu a vývoji entomopatogenní houby. Přípravek PreFeRal® WG obsahuje minimálně CFU („kolonie tvořící jednotky) 2×10^9 životaschopných spor v 1 gramu přípravku a přípravek PreFeRal™ obsahuje minimálně CFU 1×10^9 životaschopných spor v 1 gramu přípravku.

PreFeRal® WG je biologický insekticid používaný především proti molcím, vyznačující se obecně vynikajícím účinkem proti skleníkovým škůdcům. Kmen je vysoce virulentní a může infikovat všechna vývojová stádia (vajíčko, larvu, kuklu, dospělé). Vývoj houby byl více sledován na škůdcích skleníkové zeleniny (Lacey, Kaya 2007). PreFeRal® WG slouží k ochraně okrasných rostlin, rajčat nebo okurek proti hmyzím škůdcům. Největší účinnosti přípravku se dosahuje při skleníkové teplotě 20 – 28°C a relativní vzdušné vlhkosti vyšší než 80% po dobu minimálně 12 hodin denně. PreFeRal® WG je kontaktní přípravek, který zajišťuje pokrytí nejen vrchní strany listů, ale i jejich spodní strany. Velmi důležitá je technika aplikace s dostatečným množstvím vody. Objem vody závisí na růstové fázi pěstovaných rostlin. Optimální pH vody by mělo být v rozmezí pH 4 až pH 7. Na vzrostlé rostliny se doporučuje aplikovat biopreparát rozpuštěný ve 2000 až 3000 litrů.ha⁻¹, zatímco na sazenice je doporučené množství vody 1 000 litrů.ha⁻¹. Aplikace by měla být zahájena při prvním náznavu přítomnosti škůdců a měla by být prováděna v pozdních odpoledních hodinách nebo brzy navečer. První výskyty škůdců mohou být sledovány pomocí žlutých lepkavých desek. Účinnost biopreparátu PreFeRal® WG může být ovlivněna v případě použití fungicidů. Doporučená doba mezi aplikací PreFeRal® WG a následným ošetřením fungicidními přípravky je minimálně 7 dnů (Anonym 4).

Tabulka č. 7: Výhody přípravku PreFeRal® WG (Anonym 5)

- biologický insekticid vysoce účinný na molici skleníkovou (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)
- virulentní proti všem vývojovým stádiím molice skleníkové
- není škodlivý pro lidi, savce, rostliny a celkově nezatěžuje životní prostředí
- není škodlivý pro užitečný hmyz, včetně opylovačů
- může být využíván v integrované ochraně rostlin

Tabulka č. 8: Výhody přípravku PreFeRal™ (Anonym 5)

- biologický insekticid s účinností stejně dobrou nebo lepší než tradiční insekticidy
- široké spektrum účinnosti proti škůdcům vyskytujících se jak na spodní straně listu, tak i na svrchní straně listu
- vysoká účinnost na půdní hmyz
- patentovaný a vysoce virulentní kmen Apopka 97
- obsahuje blastospory, které klíčí rychleji než konidie a způsobují rychlejší průběh infekce
- významný mechanismus účinku - vysoce efektivní, nevyvolává rezistenci v populaci škůdců
- snadné použití (rozpuštění a/nebo míchání se substrátem díky formulaci WDG)
- nulový nebo malý vliv na užitečný hmyz

2.9.2 PFR-97™ 20% WDG

Produkt PFR-97™ 20% WDG je mikrobiální insekticid, který je vyráběn společností Certis USA LLC. a zároveň je touto firmou distribuován po celém USA jako společnost SePro distribuující přípravek PreFeRal™. Aktivní složkou přípravku PFR-97™ 20% WDG je také kmen Apopka 97 entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* (současně *Isaria fumosorosea*). Produkt je používán k regulaci škůdců na těchto plodinách: jádroviny, peckoviny, citrusy, hroznové víno, ořechy, jahody, listová zelenina, melouny, tykve, byliny, koření a fazole.

Produkt infikuje nejen škůdce ve fyloplánu, ale je schopen infikovat stádia hmyzu žijících i v půdním prostředí. Z tohoto důvodu je přípravek doporučen míchat v určitém množství s pěstebním substrátem a slouží k regulaci například půdních larev nosatcovitých brouků nebo vývojových stádií třásněnek, které prodělávají vývoj v půdě. Kmen Apopka 97 reguluje ve fyloplánu zejména populace molice, mšic, třásněnek, křísů, vrtalek, červců, roztočů popřípadě dalších škůdců. Produkt je

kompatibilní s opylovači i predátory a parazitoidy využívajících se v biologické ochraně rostlin.

Přípravek PFR-97™ 20% WDG je nejúčinnější, pokud se aplikuje před nebo při prvním výskytu hmyzích škůdců. Účinnost nastává v průběhu několika dní. Aplikaci je potřeba zahájit předtím, než populace hmyzu dosáhne kritického čísla. Monitorování škůdců je nejdůležitějším momentem pro efektivní využití nejen produktu PFR-97™ 20% WDG.

Produkt může být použit s některými insekticidy, ale nesmí se používat v kombinaci s fungicidy. Doporučená doba mezi aplikací PFR-97™ 20% WDG a fungicidů je minimálně 5 dnů. Neefektivněji jsou rostliny ochráněny při opakovaných týdenních aplikacích produktu PFR-97™ 20% WDG. Doporučuje se aplikovat třikrát po sobě, tj. 7., 14. a 21. den. Aplikace musí být prováděna v pozdních večerních hodinách nebo brzy ráno, kdy je hmyz neaktivní, teploty nedosahují vysokých hodnot a je zaručena vyšší relativní vzdušná vlhkost. Při dodržení těchto zásad, má přípravek nejvyšší účinnost (Anonym 6).

Velmi zajímavá je skutečnost, že v současné době se produkt využívá i v teplejších oblastech Kalifornie, kde relativní vzdušná vlhkost je velmi nízká a produkt přesto vykazuje vysokou účinnost proti cílovým škůdcům. Teplé podmínky Kalifornie způsobují značný nárůst populací roztočů a hmyzích škůdců. Produkt je využíván zejména proti roztočům na jahodách a révě vinné. Zároveň je produkt používán k regulaci mšic, molic, třásněnek a mer na zelenině, zejména pak na okurkách. Přípravek je velmi efektivní a způsobuje infekce všech vývojových stádií škůdců. Produkt je prodáván i do různých pěstitelských oblastí po celém USA. Přípravek je vhodný jak pro konvenční systémy pěstování plodin, tak i pro systémy ekologického zemědělství (Anonym 7).

2.9.3 NoFly™ WP

Mykoinsekticidní přípravek pod obchodním názvem NoFly™ WP je vyráběn španělskou společností Futureco Bioscience. Biopreparát je koncipován na bázi *Isaria fumosorosea* FE 9901. Přípravek obsahuje 18% aktivní složky, tj. druh *Isaria fumosorosea* kmen FE 9901. Inertní složka přípravku tvoří 82% a obsahuje opět smáčedla, UV protektanty a zároveň nutriční složku, která slouží po aplikaci k rychlejšímu růstu a vývoji entomopatogenní houby. Přípravek NoFly™ WP obsahuje v 1 gramu minimálně 2×10^9 CFU („kolonie tvořící jednotky“).

NoFly™ WP je určen pro biologickou ochranu molíc, třásněnek, mšic a červců. Aplikace je možná na všechny fáze životního cyklu škůdce – vajíčka, nymfy i dospělé. Infekční cyklus *Isaria fumosoroseus* je velmi rychlý. První příznaky onemocnění způsobené *I. fumosoroseus* na uvedených cílových organismech se v optimálních podmínkách projevují v průběhu 24 – 48 hodin po kontaktu konidií s hmyzem. Jakmile *I. fumosoroseus* přijde do styku s hmyzem, přichytí se a pronikne přes kutikulu hostitele. Během 24 hodin proběhne namnožení houbového mycelia a blastospor uvnitř těla. Postupně dochází k utilizaci tkání a vnitřních orgánů. Po 48 hodinách se objevuje mycelium na povrchu hmyzu a ke sporulaci dochází po 72 hodinách. Usmrcení hostitele probíhá v rozmezí 5 – 7 dnů.

Entomopatogenní houba *I. fumosoroseus* nezpůsobuje žádné negativní účinky na užitečném hmyzu včetně včel a čmeláků. Zbytky po aplikaci přípravku NoFly™ WP nepředstavují žádná rizika v půdě, vodě ani ve vzduchu. Z tohoto důvodu je přípravek NoFly™ WP ideální pro využití v rámci integrované ochrany rostlin (Anonym 8).

2.10 Trh mikrobiálních pesticidů

2.10.1 Evropský trh mikrobiálních pesticidů v Evropě

Prodej biopreparátů zahrnující makroorganismy, mikroorganismy a feromony se v Evropě v roce 2000 odhadoval na částku ve výši 97 milionů dolarů, což činí přibližně 2% z celkového evropského trhu s pesticidy (Frost, Sullivan 2001). Autoři předpokládali každoroční růst prodeje o 11,7%, což by představovalo obrát 210 milionů dolarů v roce 2007. Podíl produktů na bázi *Bacillus thuringiensis* klesl v rámci trhu v roce 2000 z odhadovaných 90% na 72,4% v roce 2005. Největší nárůst prodeje byl zaznamenán však u produktů na bázi entomopatogenních hlístic a entomopatogenních virů (bakuloviry). Guillon (2004) publikoval, že v roce 2004 se v Evropě prodaly biopreparáty na bázi bakterií, hub a virů v hodnotě 31 milionů dolarů. Podle průběžných výsledků prodeje byl celkový evropský trh s biopreparáty v roce 2005 odhadován na 135 milionů dolarů. Největším individuálním evropským trhem s biopesticidy je Španělsko, následované Francií a Itálií. Lisansky (1997) tvrdí, že potenciál prodeje zůstává stále vysoký a celkový trh by mohl vzrůst až na 200 milionů dolarů do roku 2015.

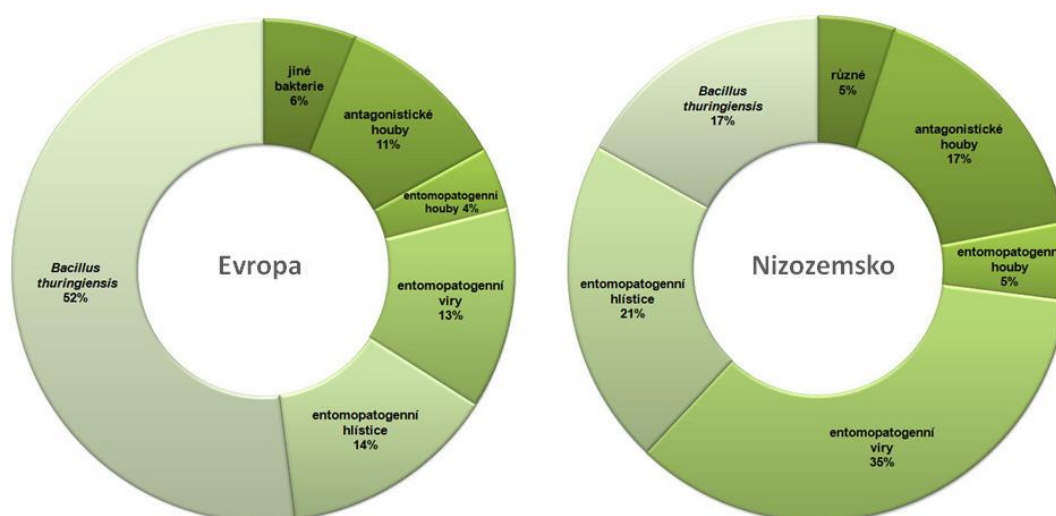
2.10.2 Trh mikrobiálních pesticidů v Nizozemsku

Sdružení agrochemických společností v Nizozemsku, poskytuje údaje o použití přípravků na ochranu rostlin. Jde o množství spotřebovaných účinných látek v kg. V roce 2007 byla spotřeba biologických insekticidů kolem 0,7% z celkového počtu použitých insekticidů.

Tabulka č. 9: Odhadované tržby mikrobiálních produktů určených k regulaci škůdců v Nizozemsku v roce 2008

Typ patogena	Prodej	Škůdci	Produkty	Použití
<i>Bacillus thuringiensis</i>	€ 1,0 mil.	Housenky	Delphin, Dipel, Turex, Xentari, Scutello	skleníková zelenina a okrasné květiny
Entomopatogenní hlístice	€ 1,0 mil.	třásněnky, smutnice, lalokonosci, slimáci	Bionem, Entonem, Larvanem, Nemasys, Nematop, Nemaplus, Nema-green, Nemaslug	skleníkové okrasné květiny, školka, polní zelenina
Entomopatogenní viry	€ 1,5 mil.	Obaleči	Carpovirusine Plus, Cyd – X, Madex	jabloně, hrušně
Entomopatogenní houby	€ 0,3 mil.	molice, třásněnky	Botanigard, Mycotal, Preferal	skleníkové plodiny
Antagonistické houby	€ 1,5 mil.	kořenové choroby	Contans, Mycostop, Trianum	skleníkové plodiny, polní zelenina
Různé	€ 0,3 mil.	nespecifické	Bio 1020, Cerall, Dutch Trig, Spod - X	různé plodiny

Graf č. 1: Kategorie biopreparátů na bázi mikroorganismů používaných v Evropě (nalevo) a v Nizozemsku (napravo) v roce 2008



V Nizozemsku představuje roční prodej pesticidů přibližně 330 milionů €. Jen prodej biologických pesticidů představuje 5 – 6 milionů €. Nizozemsko se řadí tak na 4. až 5. místo na evropském trhu s biopesticidy. Použití entomopatogenních bakterií se v posledních několika letech snížilo v důsledku vývoje nových chemických látek určených k eradikaci housenek motýlů (Nefyto 2008).

2.11 Využití biopesticidů na bázi makroorganismů i mikroorganismů

Silné a slabé stránky jsou na seznamu faktorů, které určují úspěch či neúspěch použití biopesticidů v rámci programů integrované ochrany rostlin. Šance na úspěšné použití biopesticidů je závislá nejen na produktu, ale také na podmínkách prostředí při aplikaci na cílové škodlivé činitele. Vnitřní a vnější faktory jsou často odkazovány na SWOT analýzu (silné stránky, slabé stránky, příležitosti a hrozby). SWOT analýza může být zpracována pro jakýkoliv produkt a identifikuje vnitřní a vnější faktory, které mají příznivý i nepříznivý vliv na úspěšné použití.

Tabulka č. 10: Silné a slabé stránky použití biopreparátů na bázi mikroorganismů

Silné stránky	Slabé stránky
<ul style="list-style-type: none"> ✓ specifické hostitelské spektrum ✓ jedinečný mechanismus účinku (EPN*) ✓ vynikající nástroj pro systémy IOR ✓ nulová rezidua ✓ nulová ochranná lhůta nebo minimální interval mezi aplikací a sklizní ✓ po aplikaci mohou pracovníci hned pracovat v dané plodině ✓ kompatibilita biopreparátů s přirozenými nepřáteli a opylovači ✓ kompatibilita s jinými mikrobiálními biopesticidy ✓ malá pravděpodobnost (cross-) rezistence ✓ skvělé přípravky v rámci antirezistentní strategie ✓ bezpečný pro lidi, životní prostředí a rostliny ✓ schváleno pro ekologické zemědělství 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ účinnost pozvolná a proměnlivá ✓ relativně vysoká konečná cena ✓ úzké spektrum cílových organismů ✓ pomalá rychlost usmrcení a závislost na různých stádiích škůdců ✓ citlivost na abiotické faktory ✓ limitovaná stabilita při skladování (uskladnění musí být při nízkých teplotách) ✓ složitější aplikační technologie, nutný postřik ✓ neslučitelnost s chemickými pesticidy ✓ důležitá znalost použití biopreparátů, vyžadují poradenství ✓ často fungují pouze jako součást programů IOR

* EPN – entomopatogenní hlístice

SWOT analýza tak určuje šanci pro dosažení úspěchu. Poskytuje více informací a větší přehled o výrobku. Nevýhodou těchto faktorů je, že jsou pouze kvalitativní a mohly by vést k subjektivním názorům. Pro každý produkt by měla být provedena samostatná SWOT analýza. Seznam slabých stránek biopesticidů na bázi mikroorganismů je dlouhý a neměl by být přehlížen. Naopak biopesticidy mají i

jedinečné silné stránky, pro které se mohou využít v praxi. Některé nedostatky mohou být přeměněny v silné stránky, například užší hostitelské spektrum zabezpečuje bezpečné používání a díky této vlastnosti se mohou kombinovat s přirozenými nepřáteli (Ravensberg 2010).

Tabulka č. 11: Kompatibilita biopesticidu PFR 97 20% WG s přirozenými nepřáteli a opylovači

Přirození nepřátelé	Kategorie	Škůdci	Toxicita
<i>Bombus spp.</i>	opylovač	-	A*
<i>Amblyseius californicus</i>	roztoč	roztoči	1
<i>Amblyseius cucumeris</i>	roztoč	třásněnky	1
<i>Amblyseius degenerans</i>	roztoč	křísy	1
<i>Amblyseius swirskii</i>	dravý roztoč	křísy	1
<i>Encarsia formosa</i>	parazitická vosička	molice	1
<i>Eretmocerus spp.</i>	parazitická vosička	molice	1
<i>Trichogramma spp.</i>	parazitická vosička	motýli	1
<i>Phytoseiulus persimillis</i>	roztoč	roztoči	1
<i>Orius spp.</i>	predátor	třásněnky	1
<i>Dacnusa sibirica</i>	predátor	vrtalky	1
<i>Diglyphus isaea</i>	parazitická vosička	vrtalky	1
<i>Hypoaspis spp.</i>	parazitická vosička	smutnice	1
<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	roztoč	mšice	1
<i>Feltiella acarisuga</i>	predátor	roztoči	1
<i>Chrysopa Carda</i>	predátor	mšice	1
<i>Macrolophus caliginosus</i>	predátor	molice	1
<i>Aphidius spp.</i>	predátor	mšice	1
<i>Coleoptera</i>	predátor	mšice, molice	1
<i>Anthocoris nemoralis</i>	-	křísy	1
<i>Nematodes</i>	-	půdní škůdci	1

*Před aplikací musí být hnízdo zavřené, jinak může hrozit infekce čmeláků

Kategorie	Toxicita	Úmrtnost
1	Není	< 25%
2	Mírně	25 – 50%
3	Středně	50– 75%
4	Toxický	> 75%

2.12 Kvalita kontroly entomopatogenních hub

Biopesticidy na bázi entomopatogenních hub by měly být registrovány a kvalitně popsány. Výsledky testů jednotlivých přípravků mají být v souladu s předem stanoveným zaměřením. Základní parametry houbových přípravků podléhají kontrole kvality počtu aktivních propagulí, biologické aktivitě a mikrobiální čistotě.

Houbových produktů pro biologickou ochranu je celá škála. Výroba biopreparátů na bázi hub je realizována v laboratorních podmínkách a výrobních halách. U všech těchto produktů je potřebné kontrolovat parametry jakosti i v průběhu procesu produkce, aby byla zaručena efektivnost a bezpečnost výrobku na trhu (Landa 1994). Jenkins, Grzywacz (2003) vydali doporučení pro kontrolu minimální kvality houbových produktů, včetně aspektů týkající se technologií a tím i kontrolu produktu. Při testování produktů se kontroluje úroveň mikrobiálních kontaminantů, životaschopnost spor, účinnost a obsah vlhkosti.

Zjišťování počtu spor v 1 gramu produktu na bázi hub je poměrně snadné. Primární onemocnění škůdců mohou iniciovat konidie, blastosporý nebo fragmenty mycelia. Stanovuje se CFU (tvorba kolonií) a zároveň se stanovuje procentuální životaschopnost infekčních propagulí. Jenkins, Grzywacz (2000) stanovili, že produkt musí obsahovat minimálně 85% životaschopných propagulí v době aplikace. Kvalita produktu je dána zejména skladováním, kdy je doporučeno, aby byly produkty skladovány při nízkých teplotách, tj. do 8°C.

Rychlost klíčení je kvalitativní parametr, který se stanovuje pomocí mikroskopu, kdy je suspenze preparátu nanášena na umělou živnou půdu nebo na bakteriologický agar. U biopreparátů na bázi hub se stanovuje procento mikrobiální kontaminace, které by nemělo přesáhnout zpravidla 20%. Stanovují se znečišťující látky, jiné houbové patogeny a bakterie. Přijatelná hodnota nečistot se posuzuje podle konkrétního druhu biopreparátu a podle povahy kontaminace. Vždy však záleží na obecných standardech a požadavcích registrace (Jenkins, Grzywacz 2003).

2.13 Vedlejší účinky na přirozené nepřátele a necílové organismy

Kompatibilita biopreparátů na bázi mikroorganismů s přirozenými nepřáteli a opylovači je důležitým předmětem výzkumu. Zároveň je třeba sledovat vliv aplikace biopreparátů na necílové organismy a sledovat i jejich vedlejší efekt, který může být někdy pro systém pěstování plodin efektivní. Výzkumu se věnovalo v minulosti poměrně málo pozornosti na rozdíl od testování chemických účinných látek na necílové organismy. Kompatibilita chemických pesticidů s přirozenými nepřáteli byla rozsáhle testována pro začlenění komponentů do programů IOR. Testování účinků pesticidů na necílové organismy je nutné pro účely registrace v Evropě. Důležité je testování nežádoucích účinků na dravé roztoče, parazitické vosičky a na včely. Dříve byly prováděny testy jen s pesticidy pro polní využití, ale v současné

době se staly standardem pro programy IOR ve skleníkách, kde je kompatibilita běžně sledována. Provádí se kompatibilita pesticidů/biopreparátů s predátory i parazitoidy a zároveň i se čmeláky, kteří se běžně ve skleníkách používají k opylování pěstovaných plodin (Schorbach 2006).

Entomopatogenní houby mají široké hostitelské spektrum a může docházet k přímému infekčnímu onemocnění přirozených nepřátel. Zejména kmeny druhu *Metarhizium anisopliae* a *Beauveria bassiana* mají relativně široký rozsah hostitelských druhů. Testování negativních vedlejších účinků je nepostradatelné pro použití v rámci integrované ochrany rostlin. Goettel *et al.* (1990) přezkoumal účinky entomopatogenních hub na necílové organismy a dospěl k závěru, že entomopatogenní houby pro ně představují minimální riziko. Jacobson (2000) provedl podrobnou studii o kombinovaném použití dravých roztočů a produktů na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* (BotaniGard[®] 22WG a Naturalis-L) a zjistil, že dravý roztoč *Amblyseius cucumeris*, který se používá pro regulaci populace třásněnky západní *Frankliniella occidentalis*, nebyl houbou *B. bassiana* infikován. Draví roztoči jsou méně citliví než většina jiných přirozených nepřátel.

V Nizozemsku byl schválen biopreparát Botanigard[®] 22WG (*Beauveria bassiana*) pro použití při pěstování skleníkových plodin. Na etiketě produktu je uvedena informace, která uvádí, že po aplikaci entomopatogenní houby v podmínkách, kde je vysoká relativní vlhkost, nelze vyloučit možnost nákazy užitečného hmyzu. Vliv přípravku na užitečný hmyz by měl být stále monitorován, aby se předešlo nevhodnému vzájemnému použití dvou komponentům biologické ochrany rostlin. Při použití produktu Mycotal (*Lecanicillium muscarium*) a PreFeRal (*Isaria fumosorosea*) bylo prokázáno, že tyto produkty jsou neškodné pro přirozené nepřátele (Sterk *et al.* 2003). Na stránkách firmy Biobest lze dohledat kompatibilitu přirozených nepřátel s entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* (houba je v manuálu vedena stále pod názvem *Paecilomyces fumosoroseus*) (Anonym 9).

3. Diskuze

Pod pojmem ochrana rostlin se rozumí ochránění kulturních, zejména zemědělských plodin a lesních dřevin před původci onemocnění rostlin, škůdci a plevelnými rostlinami. Všeobecně tedy ochrana rostlin zahrnuje soubor opatření k potlačování škodlivých organismů pomocí nepřímých metod, jako jsou agrotechnika, osevní postupy, odolné odrůdy a pomocí přímých metod zahrnujících v současnosti zejména pesticidy. Integrovanou ochranu rostlin lze pak definovat jako systém ochrany používající všechny ekonomicky, ekologicky a toxikologicky přijatelné metody pro udržení škodlivých organismů pod hladinou škodlivosti, s přednostním využitím přirozených omezujících faktorů (Anonym 10). Používání a kombinování všech dostupných metod ochrany rostlin skýtá naději pro zlepšení životního prostředí i zlepšení kvality produktů, které budou o mnoho zdravější než produkty, které byly získávány doposud z klasického způsobu hospodaření.

Kvalita produktů bude minimálně srovnatelná s produkty, které jsou získávány z tzv. integrované produkce. Integrovaná produkce (IP) je definována jako způsob zemědělského hospodaření, pomocí kterého jsou produkovány vysoce kvalitní potraviny a další zemědělské produkty. Kvalitní potraviny resp. zemědělské produkty jsou získávány způsobem, kdy se upřednostňuje využívání přírodních zdrojů a regulačních mechanismů, které nahrazují znečišťující vstupy a zajišťují hospodaření v souladu se zásadami trvale udržitelného rozvoje. Mezi základní komponenty systémů integrované produkce patří zachování nebo zlepšování půdní úrodnosti, zachování a podpora rozmanitosti životního prostředí a ohled na etické a sociální požadavky. Integrovaná produkce je zaměřena na vysoce kvalitní produkci a to především pomocí ekologicky založených metod a postupů, které jsou pro lidské zdraví neškodné. Celková hodnota kvality zemědělských produktů je dána nejen jejich specifickými vnitřními a vnějšími charakteristikami a nezávadností potravin (=kvalita produkce), ale i všemi metodami trvale udržitelného zemědělství (=ekologická kvalita), dále příslušnými standardy živočišné produkce (=etická kvalita) a adekvátními pracovními podmínkami lidí pracujících v zemědělství (=sociální kvalita) (Boller *et al.* 2004).

Vzhledem k možným rizikům plynoucím z používání pesticidů by měly být před chemickými metodami upřednostněny biologické, fyzikální a jiné nechemické metody, pokud uspokojivě zajistí ochranu před škodlivými organismy. Vodní

prostředí je na pesticidy zvláště citlivé. Je proto nezbytné věnovat zvláštní pozornost zamezení znečišťování povrchových vod a podzemních vod. Použití pesticidů může být zvláště nebezpečné i ve velmi citlivých oblastech, jako jsou například lokality Natura 2000, veřejné parky a zahrady, sportoviště, rekreační plochy, školní pozemky a dětská hřiště, a v těsné blízkosti zdravotnických zařízení. V těchto oblastech by mělo být používání pesticidů omezeno na minimum nebo zakázáno. Pokud se pesticidy používají, měla by být stanovena vhodná opatření pro řízení rizik a v první řadě by mělo být zvažováno používání pesticidů představujících nízké riziko a metod biologické ochrany (Anonym 11). V nejširším možném pojetí, jsou do kategorie „biologická ochrana“ zahrnovány nejen metody záměrně využívající různé skupiny a druhy přirozených nepřátel a antagonistů, ale i metody bioracionální, agrotechnické, případně i genetické. Nicméně, současné systémy delimitace metod ochrany rostlin zdůrazňují zúžené pojetí a definují biologické metody jako metody, jejichž principem je záměrné využívání přirozených nepřátel s cílem omezovat výskyt, šíření a vývoj původců onemocnění rostlin, škůdců a plevelných rostlin. Cílem biologické ochrany není úplné vymýcení jednotlivých populací škůdců, pouze regulace jejich četnosti na přijatelnou úroveň (Landa 2002).

V biologické ochraně rostlin se jeví perspektivně využití entomopatogenních hub. Je známo přibližně 750 druhů entomopatogenních hub, které jsou schopné vyvolat infekci u hmyzu a tím způsobit jeho následný úhyn (Van Driesche, Heinz 2004). Na bázi entomopatogenních hub je vyrobena celá škála biopreparátů, které se dnes ve světě běžně používají k regulaci populací škůdců nejen ve skleníkách, ale i v polních podmínkách. V současné době se v biologické ochraně rostlin komerčně využívá kolem 25 druhů entomopatogenních hub (Nielsen *et al.* 2007). Entomopatogenní houby se běžně v přírodě vyskytují a často vyvolávají přirozené epizootie v populacích hmyzu, čímž jsou důležitými mikroorganismy regulujícími populace hmyzích škůdců (Landa *et al.* 2013). Úspěšnost použití entomopatogenních hub je závislá na různých ekologických faktorech například na přenosu patogena v prostředí a rezistenci hostitele, na rychlosti usmrcení a především na příznivých abiotických podmínkách (Inglis *et al.* 2001).

Houba *I. fumosorosea* je široce polyfágní druh entomopatogenní houby, který má široký hostitelský okruh. Houba je schopna vyvolat onemocnění na hmyzu, fytofágních roztočích, některých druzích háďátek. Nejvýznamnějšími hostiteli *I. fumosorosea* jsou však skleníkoví škůdci, jako jsou molice, mšice, trásněnky a

červci. Houbové patogeny mají schopnost redukovat populace molíc v širším rozmezí jednotlivých abiotických faktorů. Mnohé laboratorní i polní studie prokázaly, že vysoká relativní vzdušná vlhkost není až tak nezbytná pro rozvoj infekce v populaci škůdce. Mnoho entomopatogenních hub nachází dostačující vlhkost pro klíčení a penetraci do těla hostitele při vytvoření mikroklimatu uvnitř pater listů nebo uvnitř populace hmyzu. Tento fenomén byl zaznamenán při infekci larev molíc houbou *B. bassiana* a *I. fumosorosea* (dříve *P. fumosoroseus*) (Drummond *et al.* 1987). Landa *et al.* (1994) zaznamenal významnou variabilitu časového vývoje několika kmenů v rámci entomopatogenní houby *I. fumosorosea*. Největší virulence k molici bavlníkové *B. tabaci* byla zaznamenána u kmene Apopka 97. Kmen Apopka 97 vykazoval vysokou virulenci i k molici *Trialeurodes vaporariorum*. Biopreparát je využíván jako komponent integrované ochrany rostlin ve sklenících. Obě studie byly realizovány v optimálních podmínkách pro vývoj houby. Zatím je známo velmi málo informací o schopnosti kmene účinkovat i v suboptimálních podmínkách pro vývoj patogena, zejména pak v nízké relativní vzdušné vlhkosti. Vysoká relativní vzdušná vlhkost je důležitá a rozhodující na začátku parazitické fáze, kdy dochází k pronikání infekčních struktur do hostitele a zároveň ve fázi saprotrofní, kdy patogen proliferuje z vnitřku hostitele na povrch, kde plně sporuluje na mrtvém hostiteli (Drummond *et al.* 1987). Po proniknutí do těla hostitele nemá entomopatogenní houba až tak výrazné nároky na vlhké prostředí, protože vlhkost zajišťuje hemolymfa hmyzu. V nepříznivých podmínkách mohou houby zůstat v dormantním stavu uvnitř mrtvého hostitele po dobu několika dnů a v případě zlepšení podmínek dochází k jejich probuzení a následné proliferaci a sporulaci na povrchu těla hostitele (Landa, Osborne 1992).

Biopreparáty na bázi entomopatogenní houby *I. fumosorosea* jsou ve velkém měřítku aplikovány například v USA (PFR-97 20% WDG), Mexiku (Pae-Sin), Evropě (PreFeRal), Střední Americe (Fumosil, Bemisin) a Indii (PaciHit Rich). Ve světě je evidováno přibližně 171 biopreparátů na bázi entomopatogenních hub. Druh *Isaria fumosorosea* je součástí 10 biopreparátů vyráběných ve světě, což představuje 5.8% z celkového počtu těchto produktů (Faria, Wraight 2007). V současné době však není v České republice registrován žádný biopreparát na bázi entomopatogenní houby *I. fumosorosea* ani jiných druhů. Lze doufat, že biopreparáty najdou v budoucnosti své místo na trhu a budou v ČR používány jako komponenty integrované ochrany rostlin.

4. Závěr

Bakalářská práce je literární kompilací vypracovanou na základě odborné literatury zabývající se způsoby využití entomopatogenních hub v biologické a integrované ochraně rostlin proti škůdcům. V bakalářské práci je popsán vývojový cyklus jednotlivých druhů entomopatogenních hub, jejich hostitelské spektrum a optimální podmínky pro vývoj infekčního onemocnění.

Významná část je zaměřena na kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea*. Houba *I. fumosorosea* má široký hostitelský okruh a je schopna vyvolat onemocnění na více než 40 druzích hmyzu. Zároveň je houba schopna vyvolat onemocnění na fytofágních roztočích, některých druzích háďátek a zároveň se chová jako mykoparazit, který napadá rzi a padlí. Houba *I. fumosorosea* je tedy široce polyfágní entomopatogenní, akarifágní, nematofágní i mykoparazitický druh.

Na bázi *I. fumosorosea* jsou vyráběny biopreparáty a distribuovány téměř po celém světě. Biopreparáty vykazují vysokou účinnost proti významným, zejména skleníkovým škůdcům. Po aplikaci této houby nebyly zjištěny žádné negativní účinky na přirozené nepřátele, opylovače a necílové organismy. Díky této skutečnosti nalézá druh *I. fumosorosea* uplatnění v biologické ochraně rostlin. Biologická ochrana resp. integrovaná ochrana rostlin by se bez využití skupiny entomopatogenních hub v současné době neobešla. Pro úspěšné používání biopesticidů na bázi hub jsou důležité znalosti nejen o vývojovém cyklu hub a podmínkách prostředí, ale i o bionomii škůdců, proti kterým je přípravek aplikován. Na základě znalostí a zkušeností lze docílit úspěšného používání entomopatogenních hub v regulaci populací škůdců. Nejvýznamnějšími hostiteli *I. fumosorosea* jsou mšice, třásněnky a červci, ale i mandelinka bramborová. Houba *I. fumosorosea* je patogenem, který se zejména přirozeně vyskytuje v populacích molic, zejména molice skleníkové a molice bavlníkové. Molice jsou velmi vnímavými hostitelskými druhy a *I. fumosorosea* může prodělavat vývojový cyklus na všech vývojových stádiích obou druhů molic.

Biopreparáty na bázi *I. fumosorosea* našly již uplatnění v některých státech EU. V současné době však není v České republice registrován žádný biopreparát na bázi entomopatogenní houby. Nicméně se dá předpokládat, že v budoucnosti najdou biopreparáty na bázi entomopatogenních hub uplatnění i v ČR.

5. Seznam použité literatury

- Agudela F., Falcon L.A. (1983): Mass production infectivity and application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 42: 124-132.
- Aleshina O.A. (1980): Composition and prospects for study of the entomopathogenic fungi of the USSR. *Review of Applied Entomology*, 68: 83-84.
- Bale J.S., van Lenteren J.C., Bigler F. (2008): Biological Control and Sustainable Food Production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363 : 761-776.
- Boller E.F., Avilla J., Joerg E., Malavolta C., Wijnands F.G., Esbjerg P. (2004): Integrated Production Principles and Technical Guidelines, (3rd Edition). IOBC WPRS Bulletin, Bulletin OILB srop Vol. 27 (2): 1-49.
- Boucias G., Tigano M. S., Sosa-Gomez D.R., Glare T. R., Inglis P.W. (2000): Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomurea rileyi*, *Biological Control*, 19: 124 – 138.
- Bruns T. D., White T. J, Taylor J. W. (1991): Fungal molecular systematic. *Annual Review of Exil. Syst.*, 22: 525-564.
- Butt T.M. (2002): Use of Entomopathogenous Fungi or the Control of Insect Pests. *In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): The Mycota XI.-Agricultural Applications.* Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 111-134.
- Cloyd R. (2005): The Entomopathogen *Verticillium lecanii*. (on-line available <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf612.html>, 12/12/2005).
- Cooms J., Cooms R.F. (2003): A dictionary of biological control and integrated pest management. 3rd edition. CPLPress. Newbury. UK, pp. 310.
- Doberski J.W. (1981): Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *scolytus scolytus* pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus* to larvae and adults of *Scolytus scolytus*. *Journal Of Invertebrate Pathology*: pp. 188-194.
- Drummond J., Heale J.B., Gillespie A.T. (1987): Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecani* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*, 111: 193-201.
- Fang Q.X., Gong Y.Z., Zhou Y.Y., Hu Y.M., Yang S.F. (1983): *Paecilomyces fumosoroseus* var. *beijingensis* n. var. *Acta Mycologica Sinica*, 2: 168 – 172.
- 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.
- Faria M. R., Wraight S. P. (2007): Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. – *Biological Control*, 43: 237 – 256.
- Frost, Sullivan (2001): European Biopesticides Market. *Report 3905-14. London*

- Goettel M.S., Inglis G.D. (1997): Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic press. San Diego, USA, pp. 213–249.
- Goettel M.S., Poprawski T. J., Vandenberg J.D., Li Z., Roberts D.W. (1990): Safety to nontargets of fungal biocontrol agents. In: M. Laird, L.A. Lacey and E.W. Davidson (eds), Safety of microbial insecticides. CRC Press, Boca Raton. pp. 209- 231.
- Guillon M. (2004): Current world situation on acceptance and marketing of biological control agents (BCAs). www.ibma.ch. Cited May 7, 2009.
- Hajek A.E., St. Leger R.J. (1994): Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Anu. Rev. Entomol., 39: 293-322.
- Hall R.A. (1976): A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. Journal of Invertebrate Pathology, 27: 41-48.
- Hall R.A. (1981): The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges H.D. (Ed.): Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London, pp. 483-498.
- Hall R.A. (1985): Whitefly control with fungi. In: Hussey, N.W., Scopes, N. (Eds). Biological test control-the greenhouse experience. Cornell University Press. Ithaca. New York, pp. 116–118.
- Hoddle M.S. (2004): Biological control of whiteflies ornamental crops. In: Heinz K.M., van Driesche R.G., Parrella P. (Eds.): Biocontrol in protected culture. Ball Publishing, Batavia, pp. 149-170.
- Humber R.A. (1997): Fungi: Identification. In: Lacey L.A. (Ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London, pp. 153-185.
- Charnley A.K. (1997): Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds): The Mycota IV.-Environmental and Microbial Relationships. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 185-201.
- Chaverri P., Liu M. Hodge K.T.A. (2008): A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*, *Molleriella*, and *Samuelsia* gen. nov (*Ascomycota*, *Hypocreales*, *Clavicipitaceae*), and their aschersonia-like anamorphs in the Neotropics. Studies in Mycology, 60: 1-66.
- Ignoffo C.M. (1992): Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida entomol. 75(4): 516-525.
- Ignoffo C.M., Garcia C. (1978): UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. Environ. Entomol., 7 (2): 270-272.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. (2001): Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, pp. 23-69.
- Jacobs H., Gray S.N., Crump D.P. (2003): Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. Mycol. Res., 107: 47-56.

- Jacobson R.J. (2000): Cucumbers: The development of remedial treatments for the control of western flower thrips within IPM programmes. Final report of contract work undertaken for HDC project PC 129, April 2000, pp. 20.
- Jenkins N.E., Gzzywacz D. (2000): Quality control of fungal and viral biocontrol agents - assurance of product performance. *Biocontrol Sci. Technol.* 10: 753-777.
- Jenkins N.E., Grzywacz D. (2003): Towards the standardisation of quality control of fungal and viral biocontrol agents. In: J.C. van Lenteren (ed), *Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures*. CAB International, Wallingford. pp. 247-263.
- 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., Lacey L.A. (2007): Introduction to Microbial Control. In: Kaya H.K., Lacey L.A. (eds.): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 3-7.
- Landa Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JU, České Budějovice: pp. 19-33.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenicích a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): *Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve*. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre: pp. 225-280.
- Landa Z., Jiranová R. (1988): A laboratory improvement of entomopathogenic fungi and use of selected strains in IPM programme for greenhouse cucumbers. *Annual Report Agric. University, České Budějovice*, pp. 95.
- 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.
- Landa Z., Šimková J., Bohatá A., Skalický A., Kalista M. (2013): Entomopatogenní houby v kontextu strategie biologické ochrany rostlin – zhodnocení jejich výskytu v konvenčním a ekologickém zemědělství. *Rostlinolékař*, pp. 5.
- Lisanski S.G. (1997): Microbial biopesticides. In: H.F. Evans (ed), *Microbial insecticides: novelty or necessity?* BCPC Symposium Proceedings No. 68, Coventry, April 16-18, 1997. BCPC, Farnham. pp. 3-10.
- Luangsa-Ard J., Houbraken J., Van Doorn T., Hong S.B., Borman A. M., Hywel-Jones N.L., Samson R.A. (2011): *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiological Letter*, 321(2): 141-149.
- Luangsa-Ard J.J., Hywel-Jones N.L., Samson R.A. (2004): The Polyphyletic Nature of *Paecilomyces* Sensu Lato Based on 18S-generated rDNA Phylogeny. *Mycologia*, 96: 773-780.
- Maimala S., Tartar A., Boucias D.G., Chandrapatya A. (2002): Detection of the toxin Hirsutellin A from *Hirsutella thompsonii*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 80: 112 – 126.
- Meeke E.T.M., Van Voorst S., Joosten N.N., Fransen J.J., Van Lenteren J.C. (2000): Persistence of the fungal whitefly pathogen, *Aschersonia aleyrodis*, on three different plant species, *Mycological research*, 104: 1234-1240.

- Nefyto (2008): Samenvatting van de afzet (per actieve stof) van gewasbeschermingsmiddelen, www.nefyto.nl. Cited June 14.
- Nielsen CH., Jensen A. B., Eilenberg J. (2007): Survival of entomophthoralean fungi infecting aphids and higher flies during unfavorable conditions and implications for conservation biological control. – In: Ekesi S. & Manianina N. K. (ed.): Use of entomopathogenic fungi in biological pest management, Research Signpost, India, pp. 13 – 18.
- Osborne L.S., Landa Z. (1992): Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomology*, 75 (4): 456-471.
- Osborne L.S., Storey G.K., McCoy C.W., Walter J.F. (1990): Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Proc. 5th Int. Colloquium on Invertebrate Pathology and Biological Control, Adelaide, Australia, pp. 386-390.
- Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E., Steinkraus D.C. (2002): Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In: T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford. 71-153.
- Prenerová (2007): S tudium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycetes) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvních instarů. Výzkumný projekt grantové služby LČR, pp. 42.
- Prenerová E. (1991): Studium využitelnosti entomopatogenní houby *P. farinosus* pro biologický boj s ploskohřbetkou smrkovou. *Kandidátská disertační práce*.
- Pultar (2003): Základní metodiky použití biologické ochrany rostlin v temperovaných prostorách. In: Honěk A., Martinková Z., Stejskal V. (Eds.): *Predátoři a parazitoidi v biologické ochraně polních kultur, skleníků a skladovaných komodit*. VURV, Praha-Ruzyně, pp. 18-36.
- Ravensberg W. (2010): The development of microbial pest control products for control of arthropods: a critical evaluation and a roadmap to Access. PhD Thesis Wageningen University, Wageningen, NL, pp. 348.
- Samson R.A., Evans H.C., Latge J.P. (1988): *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 187.
- Shah F.A., Pell J.K. (2003): Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 61(5-6): 413-423.
- Schnorbach H.J. (2006): Considerations of side-effects on beneficial organisms during development in the agrochemicals industry. *IOBC/WPRS Bull*. 29(10): 113.
- Sterk G., Jans K., Put K., Wulandari O.V., Uyttebroek M. (2003): Toxicity of chemical and biological plant protection products to beneficial arthropods. Colloque international tomate sous abri, protection intégrée - agriculture biologique, Avignon, France, pp. 113-118.
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung, J.M., Luangsa-Ard J. J., Shrestha B., Spatafora J.W. (2007): Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi, *Studies in Mycology*, 57: 5 – 59.

- Tanada Y., Kaya H.K. (1993): Fungal infections. In: Tanada Y., Kaya H.K. (Eds.): Insect pathology. Academica Press Inc. California and Academica Press Limited London, pp. 319-387.
- Van Der Geest L.P.S., Elliot S.L., Breeuwer J.A.J., Beerling E.A.M. (2000): Diseases of mites, *Experimental and Applied Acarology*, 24: 497-560.
- Van Driesche R.G., Heinz K.M. (2004): Biological control as a component of IPM systems. In: Heinz, K.M., Driesche, R.G., Parrella, M.P. (Eds.): *Biocontrol in protected culture*. Ball Publishing, Singapore: pp. 171-184.
- Van Lenteren J.C. (2000): A Greenhouse without Pesticides: Fact or Fatnasy. *Crop Protection*, 19 : 375-384.
- Váňa J. (1998): Systém a vývoj hub a houbových organismů, Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha, pp. 164.
- Vega F.E., Posada F.J. (2005): A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science* 5:37.
- Vidal C., Fargues J., Lacey L.A. (1997): Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: 18 - 26.
- Weiser J. 1966: Nemoci hmyzu, Academia, Praha, pp. 232 – 324.
- Zare R., Gams W. (2001): A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium*. *Nova Hedwigia*, 73: 1-50.
- Zhu Y., Pan J., Qiu J., Guan X. (2008): Optimization of nutritional requirements for mycelial growth and sporulation of entomogenous fungus *Aschersonia aleyrodis* Webber. *Brazilian Journal of Mikrobiology*, pp. 39.
- Zimmermann G. (1993): The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *J. Pest. Sci.*, 37: 375-379.
- Zimmermann G. (2007): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. – *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553-596.
- 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.

Seznam anonymních zdrojů

- Anonym 1: [online]. [cit. 2014-02-15]. Dostupné z:
<http://www.agromanual.cz/cz/atlas/vykladovy-slovník/integrovaná-ochrana-rostlin.html?asort=>
- Anonym 2 : [online]. [cit. 2014-02-12]. Dostupné z:
<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/integrovaná-ochrana-rostlin/>
- Anonym 3: [online]. [cit. 2014-02-26]. Dostupné z:
<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic>
- Anonym 4: [online]. [cit. 2014-02-18]. Dostupné z:
<http://www.biobest.be/producten/161/3/0/0/>

- Anonym 5: [online]. [cit. 2014-02-20]. Dostupné z:
<http://www.sepro.com/default.php?page=preferal>
- Anonym 6: [online]. [cit. 2014-02-25]. Dostupné z:
http://www.certisusa.com/pest_management_products/bioinsecticide/pfr-97_microbial_insecticide.htm
- Anonym 7: [online]. [cit. 2014-04-9]. Dostupné z:
http://www.certisusa.com/news/news_10022012_PFR-97_Bioinsecticide_Begins_Commercial_Use_in_California_Agriculture.htm
- Anonym 8: [online]. [cit. 2014-02-25]. Dostupné z:
<http://naturalindustries.com/commercial/Docs/2012/noflylabel.pdf>
- Anonym 9: [online]. [cit. 2014-04-9]. Dostupné z:
<http://www.biobest.be/neveneffecten/3/none/>
- Anonym 10 : [online]. [cit. 2014-04-8]. Dostupné z:
<http://www.ceskapozice.cz/domov/ekologie/zemedelstvi-bez-zbytecnych-pesticidu-i-je-pry-mozne>
- Anonym 11: [online]. [cit. 2014-04-8]. Dostupné z:
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0128&from=CS>