

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra rostlinné výroby



Diplomová práce

**POVRCHOVÁ KULTIVACE ENTOMOPATOGENNÍCH HUB  
NA PŘIROZENÝCH SUBSTRÁTECH**

Autorka DP: LENKA TOMKOVÁ

Obor studia: Všeobecné zemědělství

Specializace: Rostlinolékařství

Vedoucí DP: PROF. ING. ZDENĚK LANDA, CSC.

Katedra rostlinné výroby ZF JU

Sekce rostlinolékařství

květen

2006

*Prohlášení:*

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu použité literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne: 2. května 2006

*Poděkování:*

Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji Ing. Andree Bohaté, Ph. D., Marii Nýdlové a Olze Divišové za technickou a praktickou pomoc při zakládání a vyhodnocování pokusů.

## OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	2
2.1. Integrovaná ochrana rostlin.....	2
2.2. Biologická ochrana rostlin.....	4
2.3. Entomopatogenní houby.....	7
2.4. Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub.....	15
2.5. Kultivace entomopatogenních hub.....	24
2.6. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub.....	25
3. MATERIÁL A METODIKA.....	28
3.1. Kmeny hub používané v pokusech.....	28
3.2. Kultivační média a přirozené substráty.....	29
3.3. Aktivace hub z alginátových pelet.....	30
3.4. Obecné metodické aspekty.....	31
3.5. Charakteristika metodických aspektů hlavních studií projektu.....	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....	35
4.1. Radiální růst entomopatogenních hub na povrchu agarizovaných živných médií.....	35
4.2. Produkce konidií entomopatogenních hub na povrchu agarizovaných živných médií.....	40
4.3. Produkce konidií entomopatogenních hub na přirozených substrátech.....	43
4.4. Ověření nízkoobjemové produkce entomopatogenních hub.....	47
5. DISKUZE A ZÁVĚRY.....	49
6. SEZNAM LITERATURY.....	53
7. PŘÍLOHA - GRAFICKÉ LISTY.....	60

## 1. ÚVOD

V ochraně rostlin v současné době jednoznačně převládá snaha o využití všech metod tzv. integrované ochrany rostlin. Záměrem integrované ochrany rostlin je udržet četnost populací škůdců a patogenů na tolerovatelné úrovni, při záměrném preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace populace škůdců. Klade se důraz na správnou agrotechniku, na využití odolných odrůd, na mechanické, fyzikální, biologické a genetické metody atd. Klasická chemická ochrana se stala součástí komplexu všech uvedených ochranných opatření. Dříve používané klasické chemické pesticidy, které byly donedávna hlavní prostředky pro boj se škůdci, konkurenty a nemocemi rostlin sebou přinesly celou řadu negativních jevů např. toxicitu některých používaných látek, kulminaci jejich reziduí v potravním řetězci, vznik rezidiálních populací cílových organismů, zasažení necílových organismů atd.

Zejména v posledních letech se v biologické ochraně prosazují biologické přípravky na bázi patogenních mikroorganismů. Mezi ně patří entomopatogenní viry, bakterie, hlístice a houby. V sortimentu druhů hub ne jejichž bázi jsou koncipovány současné mykopreparáty mají největší význam zástupci rodů *Aschersonia*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea* a *Paecilomyces*. Řada druhů entomopatogenních hub je asociována i se skupinami hmyzu, u kterých se jiné druhy patogenů nevyskytují (např. viry, bakterie *vers.* mšice, molice...aj.). Také mohou vyvolávat onemocnění u těch stádií hmyzu, které ostatní skupiny patogenů nenapadají. Biotechnologie masové produkce hub využívají buď fenoménu sporulace na vzdušném myceliu (povrchové kultury, výslednou infekční jednotkou je spora) nebo produkce blastospor a tekutém živném živném mediu (submerzní kultivace).

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost levných, nízkokapacitních biotechnologií zaměřených na produkci uniformní biomasy vybraných druhů/kmenů mitosporických entomopatogenních hub.

## 2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

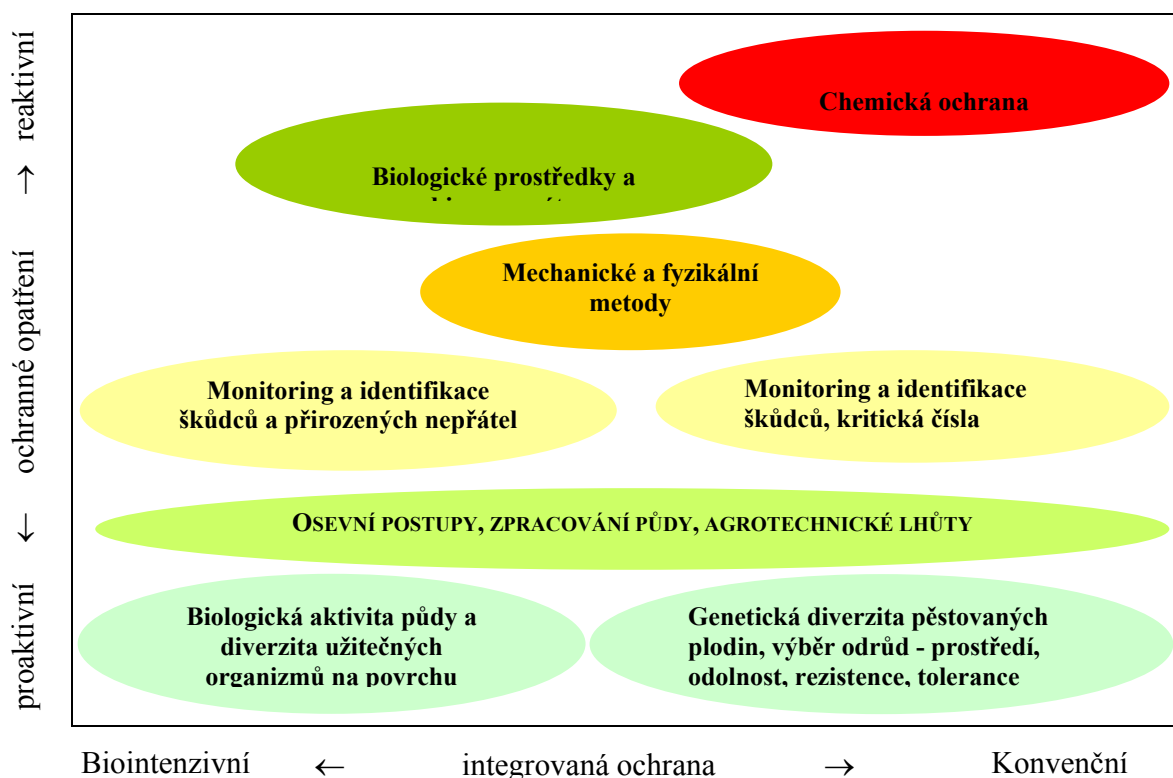
### 2.1. Integrovaná ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin (IOR) představuje strategii, ve které jsou v socioekonomickém kontextu farmářského systému, spojení prostředí a populační dynamiky škůdců, využívány všechny dostupné regulační postupy, včetně fyzikálních, chemických a biologických, s cílem udržení populační hustoty škodlivých činitelů pod hladinou způsobující ekonomické poškození (Pell *et al.* 2001). V oblasti praktické metodologie IOR jsou však záměrně upřednostňovány a účelově kombinovány nechemické metody regulace četnosti populací škůdců, zejména pak metody biologické, agrotechnické, genetické a bioracionální. V tomto kontextu jsou příkladem praktické realizace IOR programy, ve kterých je např. biologická ochrana kombinována s využíváním rezistence hostitelských rostlin. Oba uvedené mechanismy regulace populací škůdců jsou obecně považovány za kompatibilní, protože na rezistentních rostlinách bývá pomalejší sezónní populační dynamika škůdců, čímž se zároveň zvyšuje regulační kapacita biologického agens a pravděpodobnost, že v daném systému bude populace cílového druhu škůdců udržena pod hladinou škodlivosti (Bergman, Tingey 1979; Boethel, Eikenbary 1986; Krips *et al.* 1999).

V současnosti je známo několik desítek definic IOR, které se liší nejen v obecných formulacích, ale i v hlavních cílech. Stávající definiční kontinuum IOR osciluje od jednoduchých, pragmatických a úzce orientovaných definicí (definice zaměřené na základní principy programů IOR zemědělských plodin a kultur) až po verze definujících IOR velmi široce (definice více orientované na praktické i obecné aspekty životního prostředí, trvale udržitelný rozvoj, alternativní a ekologické systémy hospodaření apod.). V posledních letech lze v definičním kontinuu IOR zaznamenat zřetelnou tendenci detailnější diferenciaci IOR, což vyústilo v zavedení termínů „konvenční“ a „biointenzivní“ IOR (Dufour 2001). Nové pojetí a vnitřní diverzifikace IOR představuje velmi významný posun v oblasti teorie a praxe IOR. V tomto pojetí je jednoznačně a výrazně zvýšen důraz na formální i obsahové aspekty IOR, přičemž klíčový diferenciační význam sehrává metodologie IOR. Základní rozdíly substrategií (konvenční resp. biointenzivní) IOR lze nejpřesněji definovat pomocí termínů „proakce resp. prevence“ (biointenzivní IOR) a „reakce resp. kurace“ (konvenční IOR). Druhým klíčovým aspektem je úroveň akceptace syntetických pesticidů. Definice biointenzivní IOR používání syntetických pesticidů nepřipouští, naproti tomu definice konvenční IOR používání syntetických pesticidů

připouští a v extrémní verzi staví syntetické pesticidy na roveň ostatním metodám regulace a ani neformuluje princip cílené preference metod nechemických (Dufour 2001). Významné rozdíly mezi konvenční a biointenzivní IOR lze zaznamenat v mnoha aspektech, nicméně velmi dobře se tyto rozdíly demonstrují na odlišnostech v pojetí a postavení biologické ochrany rostlin. Biologická ochrana rostlin je běžnou až obligátní součástí všech definicí IOR. V konvenční IOR je biologická ochrana chápána velmi široce a zahrnuje i (bio)technologické prvky, včetně záměrné produkce parazitoidů, predátorů a patogenních mikroorganismů a standardní finalizace a formulace biopreparátů a biologických prostředků určených k masovým introdukcím bioagens do zájmových agroekosystémů. Oproti tomu, v pojetí biointenzivní IOR je biologická ochrana chápána výhradně v kontextu záměrné podpory přirozeně se vyskytujících druhů a jejím cílem je dosáhnout stavu, kdy podpora přirozených nepřátel prostředí zajistí obecnou stabilitu agroekosystému. Nehledě na poměrně značné rozdíly a významné odlišnosti, obě strategie IOR zpravidla spojují důraz na preferenci biologických metod regulace četnosti populací škůdců a supresi šíření a vývoje původců onemocnění rostlin.

Schéma 1. Schematické znázornění hlavních rozdílů mezi konvenční a biointenzivní integrovanou ochranou rostlin (*upraveno podle Dufour 2001*)



## 2.2. Biologická ochrana rostlin

Biologická ochrana rostlin je nejčastěji definována jako záměrné využívání živých přirozených nepřátel nebo antagonistických organismů s cílem snížit populační hustoty škodlivých činitelů, živočichů nebo rostlin na ekonomicky přijatelnou úroveň (Landa *et al.* 2002). Biologická regulace je buď výsledkem činnosti člověka nebo přírodních sil. Biologická ochrana může být použita buď pro supresi škodlivých činitelů rostlin a potravin, nebo pro obnovení přírodních systémů napadených adventivními druhy<sup>1</sup> (van Driesche, Bellows 1993).

V současnosti je známo několik, paralelně využívaných definic „Biologické ochrany rostlin“, lišících se rozsahem v pojetí pojmu „biologický“. 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 akcentují výrazně 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.

Kategorie "*přirozený nepřítel*" je kategorií pragmatickou a účelovou, jejíž zavedení akcentuje antagonistické prvky v souhrnu interakcí dvou druhů. Poněkud abstraktní kategorie "*přirozený nepřítel*" je v oblasti praktické terminologie zjednodušeně konkretizována prostřednictvím následujících známých pojmů:

- a) parazit<sup>2</sup> (parazitoid)
  - druh, který je na svého hostitele vázán potravně
  - druh, který je na svého hostitele zároveň vázán alespoň částí svého vývoje
- b) predátor (dravec)
  - druh, který je na svou oběť vázán pouze potravně a jehož vývoj není vázán na vlastní oběť, nicméně osidluje s obětí shodný biotop
  - v průběhu vývoje zpravidla usmrtí více jedinců oběti

---

<sup>1</sup> Adventivní = jakýmkoliv způsobem odjinud zavlečený do určité geografické oblasti; nepůvodní (neindigenní) pro oblast, do které byl zavlečen (Landa *et al.* 2002)

<sup>2</sup> v praktické biologické ochraně rostlin je preferováno záměrné využívání parazitů, jejichž interakce s hostitelem resultuje v usmrcení, resp. úplnou supresi cílového druh, pro takto zúženou skupinu parazitů je používán pojem „parazitoid“



c) patogenní mikroorganismus

- obligátní nebo fakultativní patogen, který je schopen vyvolat onemocnění svého hostitele
- v širším slova smyslu jsou do této kategorie zahrnovány i druhy, jejichž interakce s okolními druhy má charakter antagonizmu, kompetice nebo inhibice

*Strategie biologické ochrany rostlin*

Výše uvedená kategorizace přirozených nepřátel vymezuje i základní metodologickou výbavu, kterou má biologická ochrana k dispozici. Základní metody, které jsou v rámci biologické ochrany rostlin využívány, jsou členěny s ohledem na způsob a podmínky, za jakých je přirozený nepřítel introdukován do zájmového agroekosystému a běžně jsou delimitovány následujícím způsobem:

a) Inokulativní introdukce (tzv. klasická biologická ochrana)

- neindigenní nebo indigenní druh parazita, predátora nebo patogenního mikroorganismu je v malém počtu záměrně introdukován do nového areálu rozšíření škodlivého organismu
- cílem je zajistit dlouhodobý efekt po uchycení, adaptaci, namnožení a rozšíření introdukovaného druhu
- vyžaduje národní a mezinárodní infrastrukturu, včetně karanténních zařízení
- výrazně ekologický charakter a velmi malý podíl technologických prvků (nízkokapacitní chovy a biotechnologie pro introdukci malého množství jedinců)

Import přirozených nepřátel (strategie biologické ochrany pro kterou je standardně používán termínem „Klasická biologická ochrana“) je používán v případě, že je přirozený nepřítel introdukován do nového areálu (exotického) druhu škůdce, který byl zavlečen do nové oblasti (areálu), ve které se uchýlil a etabloval se do role škůdce. I z nedávné historie je známa řada případů, kdy introdukce nového druhu bioagens do oblasti zavlečení škůdce byla vysoce účinná.

b) Inundativní (augmentativní) introdukce

- indigenní nebo neindigenní druh je sbírán nebo masově produkován a jednorázově nebo periodicky introdukován do agroekosystému s cílem dosáhnout okamžitého ochranného efektu.
- introdukce je zpravidla cílena na univoltinní druhy škůdců na jednoletých plodinách

- introdukovaný druh se v prostředí zpravidla neuchytí a jeho introdukce musí být v následných pěstitelských cyklech opakovány
- výrazně technologický charakter (podmínkou jsou masové chovy makroorganismů a umělé produkce/kultivace mikroorganismů, řízená distribuce standardních prostředků/přípravků)

c) Sezónní inokulativní introdukce

- přirození nepřátelé jsou sbíráni nebo masově produkováni a jednorázově nebo periodicky introdukováni do krátkodobých plodin (6-12 měsíců)
- cílem je nejen okamžitý ochranný efekt, ale i dlouhodobější regulace populací multivoltinních druhů škůdců (po celou dobu pěstitelského cyklu, účinnost i na generace cílového škůdce, které se realizují až po introdukci)
- strategie má výrazně technologický charakter, nutným předpokladem jsou masové chovy a umělé produkce/kultivace, komerčně je tato strategie realizována standardními prostředky a přípravky biologické ochrany)

Metoda opakovaných introdukcí v průběhu jedné vegetace je téměř výhradně využívána v komplexní biologické ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin, jiné aplikace jsou pouze výjimečné (*příklad: parazitoid *Encarsia formosa*, dravý roztoč *Phytoseiulus persimilis* a další druhy parazitoidů a predátorů produkováných a distribuovaných pro účely biologické ochrany skleníkových plodin*)

d) Podpora, ochrana a konzervace přirozených nepřátel

- záměrná podpora, ochrana a konzervace přirozených nepřátel v zájmovém prostředí
- zvýšení účinnosti indigenních druhů přirozených nepřátel
- výrazně ekologický charakter

Cílená podpora, ochrana a konzervace přirozených nepřátel patří mezi kritické prvky biologické ochrany, zejména v technologiích ekologického zemědělství. V principu jde o všechna opatření, která nejen podporují výskyt, vývoj a populační dynamiku přirozených nepřátel (potrava, zimoviště, atraktance na cílový biotop... apod.), ale zejména, které eliminují přímé negativní vlivy na výskyt, vývoj a populační dynamiku autochtonních populací přirozených nepřátel. Lze

konstatovat, že minimalizace negativních vlivů na přirozené nepřátele je principiálním prvkem této strategie a je v obecné rovině významnější než podpora či konzervace.

### 2.3. Entomopatogenní houby

Houby jsou polygeneticky rozmanitou skupinou eukaryotických heterotrofních mikroorganismů rozmnožujících se buď sexuálně nebo asexuálně (Inglis *et al.* 2001; Goettel *et al.* 2000). Zvláštní skupinu hub představují druhy, které mohou vyvolávat primární onemocnění různých vývojových stádií hmyzu (tzv. houby entomopatogenní) (Landa 1998). Entomopatogenní houby jsou nejdéle známou a nejčastěji determinované entomopatogenní mikroorganismy asociované s hmyzem, protože jejich růst na povrchu těla různých druhů hostitelů je na rozdíl od ostatních skupin entomopatogenních mikroorganismů snadno vizuálně patrný. Většina entomopatogenních hub patří mezi obligátní nebo fakultativní patogeny hmyzu, ale některé mohou za určitých okolností fungovat i jako symbionti (Landa 1994). Poměrně velkou skupinu entomopatogenních hub tvoří druhy, které kromě hmyzu rostou i na mrtvém substrátu organických zbytků a jejich patogenita pro hmyz je jen jednou možností jejich existence (většina komerčně využívaných hub) (Weiser 1966).

Entomopatogenní houby působí převážně jako ektoparaziti hmyzu. Endoparazitický status entomopatogenních hub je poměrně výjimečný (pouze některé druhy z *Deuteromycotina* a převážná část zástupců z řádu *Laboulbeniales*). Hmyzí hostitel je zpravidla infikován sporiemi nebo konidiiemi (*Zygomycotina*), konidiiemi nebo blastosporami (*Deuteromycotina*), zoosporami (*Mastigomycotina*) a askosporami (*Ascomycotina*) (McCoy *et al.* 1988). Nejčastěji infikovaným vývojovým stádiem hmyzu jsou larvy. Méně často jsou infikovány kukly a dospělci hmyzu, vajíčka hmyzu jsou houbami infikována jen velmi vzácně (Tanada, Kaya 1993). Entomopatogenní houby parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu. Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na družích patřících do řádů ploštice (*Hemiptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*) (Tanada, Kaya 1993).

Parazitická valence entomopatogenních hub se pohybuje v rozmezí od druhové specializace (některé druhy *Entomophthorales*) až po polyfagii (*Deuteromycotina*). Většina druhů široce polyfágních druhů entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*,

*Metharizium anisopliae*, *Peacilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus*, *Lecanicillium lecanii* a další) může obecně parazitovat na velmi širokém spektru hostitelů (McCoy *et al.* 1988).

V současnosti je evidováno více než 700 druhů entomopatogenních hub zastoupených v 85 rodech (Tanada, Kaya 1993).

Tabulka 1. Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub (*Hyphomycets*, *Moniliales*) (Landa 1994)

Genus	Species	Obecná charakteristika
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	včela medonosná
	<i>A. parasiticus</i>	komáři z rodu <i>Culex</i>
	<i>A. versicolor</i>	produkce různých aflatoxinů
<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i> *	široce polyfágní entomopatogenní druhy
	<i>B. brongniartii</i> *	<i>Orthoptera</i> , <i>Hemiptera</i> , <i>Coleoptera</i> ,
	<i>B. tenella</i>	<i>Lepidoptera</i> , <i>Hymenoptera</i> , <i>Diptera</i>
	a další druhy	
<i>Hirsutella</i>	<i>H. thompsonii</i> *	akarifágní houba, <i>Tetranychus urticae</i> , <i>Phyllocoptura oleivora</i>
<i>Metharizium</i>	<i>M. anisopliae</i> *	široce patogenní entomofágní druhy
	<i>M. flavoviridae</i>	<i>Orthoptera</i> , <i>Hemiptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> , <i>Hymenoptera</i> , <i>Diptera</i>
<i>Nomuraea</i>	<i>N. rileyi</i> *	housenky <i>Lepidoptera</i>
	<i>N. atypicola</i>	
<i>Peacilomyces</i>	<i>P. fumosoroseus</i> *	široce polyfágní entomofágní, akarifágní a
	<i>P. farinosus</i> *	nematofágní druhy, <i>Orthoptera</i> , <i>Thysanoptera</i> ,
	<i>P. lilacinus</i>	<i>Homoptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> , , <i>Diptera</i> ,
	<i>P. variotii</i>	roztoči <i>Tetranychidae</i>
	a další druhy	hád'átka <i>Globodera</i> , <i>Heterodera</i>
<i>Tolypocladium</i>	<i>T. cylindrosporum</i> *	<i>Diptera</i> , <i>Culicidae</i>
<i>Lecanicillium</i>	<i>L. lecanii</i> *	široce polyfágní entomopatogenní druh
	<i>V. fusisporum</i>	<i>Thysanoptera</i> , <i>Homoptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> , <i>Diptera</i>

\* komerční biopreparáty nebo jejich vývoj

#### Klasifikace entomopatogenních hub

Podle klasifikačního systému Ainswortha (Ainsworth 1973) jsou nejvyššími taxony hub *Myxomycota* a *Eumycota*. V *myxomycota* jsou zastoupeny houby vytvářející plasmodiální formy. V *Eumycota* jsou zastoupeny houby, které zpravidla vytvářejí mycelium a netvoří formy plasmodiální. Všechny entomopatogenní houby patří do *Eumycota*, kde jsou zastoupeny

v podkmenech: *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* a *Deuteromycotina*. Většina entomopatogenních hub je pak zastoupena v *Zygomycotina* (*Zygomycetes*: *Entomophorales*), v *Ascomycotina* (*Pyrenomycetes*: *Sphaeriales*, *Laboulbeniomycetes*: *Laboulbeniales*) a v *Deuteromycotina* (*Hypnomyces*: *Moniliales*) (Goettel *et al.* 2000).

Další členění *Deuteromycotina* je do 3-4 skupin (pomocných tříd, někdy na úrovni podtříd). Charakteristikou podtřídy *Hypnomyces* je absence uzavřených konidiomat (acervuli, pyknidy). Konidie vznikají přímo na myceliu nebo na konodioforech, které se tvoří volně na myceliu nebo se seskupují v koremie (synnemata) či sporodochia. U řady zástupců jsou přítomny chlamydospory (Váňa 1998).

Z hlediska praktického využití entomopatogenních hub v praktické biologické ochraně rostlin mají dominantní význam různé druhy hub zastoupené v řádech *Entomophorales* a *Moniliales* (převážně fakultativně entomopatogenní vláknité houby) (Landa 1994; Inglis *et al.* 2001). Entomopatogenní houby zastoupené v řádu *Entomophorales* reprezentují převážně obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán výhradně na živého hostitele (Papierok, Hajek 1999; Pell *et al.* 2001).

Tabulka 2. Přehled klasifikace entomopatogenních hub (McCoy *et al.* 1988, Samson *et al.* 1988)

Subphylum	Classis	Ordo	Genus
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Coccolomyxidium</i> <i>Myiophagus</i>
	Chytridiomycetes	Blastocladias	<i>Coelomomyces</i>
	Oomycetes	Laganidiales	<i>Leganidium</i>
	Oomycetes	Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i> <i>Couchia</i>
Zygomycotina	Zygomycetes	Mucorales	<i>Sporodiniella</i>
	Zygomycetes	Entomophthorales	<i>Conidibolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Massospora</i> <i>Meristacrium</i> <i>Neozygites</i>

Tabulka 2 – pokračování

Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Blastotendrion</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Mycoderma</i> <i>Saccharomyces</i>
	Plectomycetes Pyrenomycetes	Ascopherales Sphaeriales	<i>Ascophaera</i> <i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i> <i>Nectria</i> <i>Hypocrella</i> <i>Calonectria</i>
	Laboulbeniomycetes	Laboulbeniales	<i>Filariomyces</i> <i>Hesperomyces</i> <i>Trenomyces</i>
	Loculoascomycetes Loculoascomycetes	Myriangiales Pleosporales	<i>Myriangum</i> <i>Podonectria</i>
Deuteromycotina	Hyphomycetes	Moniliales	<i>Akanthomyces</i> <i>Aspergillus</i> <i>Beauveria</i> <i>Culicinomyces</i> <i>Engyodontium</i> <i>Fusarium</i> <i>Gibellula</i> <i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Parasaria</i> <i>Pleurodemospora</i> <i>Polycephalomyces</i> <i>Pseudogibellula</i> <i>Sorospora</i> <i>Sporothrix</i> <i>Stilbella</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Lecanicillium</i> <i>Aschersonia</i> <i>Tetranacrium</i>
	Coelomycetes		<i>Aegerita</i>
Mycelia sterilia Basidiomycotina	Phragmo- basidiomycetes	Septobasidiales	<i>Filobasidiella</i> <i>Septobasidium</i> <i>Uredinella</i>

### *Vývojový cyklus*

Hlavní fáze generalizovaného vývojového cyklu entomopatogenních hub lze definovat následujícím způsobem (Osborne, Landa, 1992):

1. Přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele
2. Pronikání patogena do tělní dutiny, interní proliferace a vytváření povrchové myceliální sítě (parazitická fáze vývojového cyklu)
3. Externí sporulace a tvorba konidií nové generace (saprofytická fáze vývojového cyklu)

Šíření konidií v prostředí a mechanismy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem jsou procesy převážně nahodilé, které jsou zprostředkovány pomocí abiotických nebo biotických faktorů (Gindin *et al.* 2000; Landa 1998). Z abiotických faktorů se na šíření konidií prostředím nejčastěji podílí vzduch a voda (vítr, déšť, pohyb vody v půdě, vodní páry) (Roy, Pell 2000). Úspěšnost těchto přenosů je tedy do značné míry závislý na klimatických podmínkách, na množství houbového inokula, ale i na hustotě hostitele (Samson *et al.* 1988). Běžným mechanismem šíření houbových nákaz v populacích hmyzu je kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo tzv. autodisseminace, při které dochází k šíření konidií uvnitř populace v souvislosti se specifickými vnitropopulačními procesy (migrace, kopulace, kladení vajíček...). Doposud je známo jen málo šíření konidií entomopatogenních hub pomocí jiných biotických vektorů (např. roztoči, háďátky, jinými druhy hmyzu), nicméně i tyto mechanismy se při šíření hub v některých případech významně uplatňují (Osborne, Landa 1992; Landa 1998).

Vlastní proces adheze konidie k povrchu těla hostitele je procesem pasivním, ve kterém sehrává klíčovou úlohu povrchová struktura konidií. Konidie některých druhů entomopatogenních deuteromycetes jsou pro fázi primárního kontaktu s hostitelem vybaveny želatinovým nebo mucilagením povrchem, pomocí kterého vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hned při prvním kontaktu (např. *Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis*) (Tanada, Kaya 1993). V jiných případech jsou produkovány suché konidie se silně hydrofobním a rozmanitě strukturním povrchem. Přichycení těchto konidií je zajišťováno interakcí mezi dvěma hydrofóbními povrchy (konidie – kutikula), pomocí elektrostatických sil nebo molekulárními interakcemi mezi látkami, které jsou přítomny jak na povrchu konidie tak na povrchu kutikuly hostitele (Landa 1994; Sosa-Gomez *et al.* 1997; Altre *et al.* 1999; Vestergaard *et al.* 1999).

Klíčení konidií je první fází interakce patogena s hostitelem. Většina druhů entomopatogenních hub produkuje konidie, které jsou energeticky dostatečně vybaveny

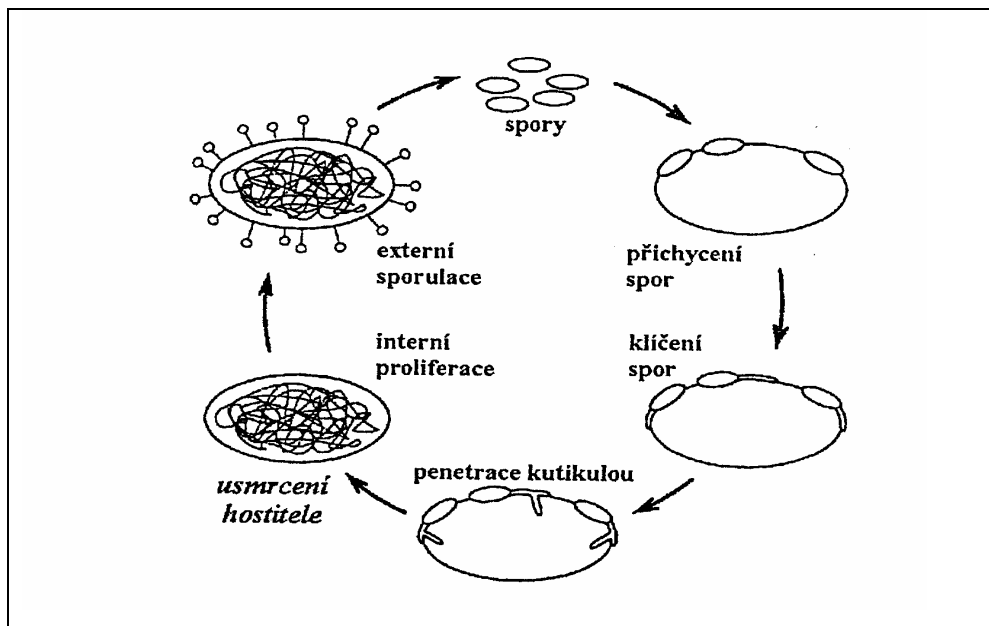
k vyklíčení, bez nutnosti absorbovat externí živiny. Klíčení konidií tak převážně závisí na biotických faktorech, zejména relativní vzdušné vlhkosti a teplotě. V první fázi dochází k výraznému zvětšení klíčící konidie (bobtnání), které je doprovázeno komplexní přestavbou stěny konidie a následnou tvorbou primárního klíčku. Houba začíná přijímat látky, které jsou zprvu součástí kutikuly, následně pak absorbuje živiny i z vnitřních orgánů a tkání hostitele. Za tímto účelem proniká přímou penetrací nebo prostřednictvím přirozených otvorů do tělní dutiny napadeného hostitele. Při přímé penetraci kutikulou uplatňují houby kombinaci biochemických a fyzikálně mechanických prvků (Butt *et al.* 1998; Landa 1998; Altre *et al.* 1999). Houbové nákazy suchozemských druhů jsou ve většině případů spojené s pronikáním houbových vláken kutikulou. Druhým místem, kterým proniká infekce do hmyzu, je ústní ústrojí. Třetím místem infekce jsou stigmata hmyzu. Čtvrtým místem vstupu nákazy do těla hmyzu je otvor pohlavního aparátu a konečně pátou branou pro vstup infekce je řitní otvor (Weiser 1966; Osborne, Landa 1992; Vilcinskas, Götz 1999).

Po proniknutí patogena do těla dutiny, dochází zpravidla k rychlé kolonizaci jednotlivých tělních tkání a orgánů. Pro tuto fázi vývojového cyklu je typický přechod je forem hub na rychle se dělicí a pomnožující tělíska tzv. hyfová resp. kvasniční tělíska, blastospory. Tato tělíska se rychle namnožují a ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele. Mumifikací hostitele končí druhá, parazitická fáze vývojového cyklu a nastupuje finální fáze - tvorby povrchového mycelia a sporulace. Patogen prorůstá na povrch usmrceného hostitele a postupně vytváří hustou myceliální síť, která prorůstá celý povrch těla. Na vzdušném myceliu se postupně vytváří konidiofory, na kterých se ve finální fázi vývojového cyklu formují nové konidie (Inglis *et al.* 2001).

V optimálních podmínkách (např. teplé mikroklima skleníků a foliových krytů) může být celý vývojový cyklus realizován v průběhu 3-5 dnů, v běžných podmínkách vegetačního období mírného pásma probíhá v rozmezí od 7-21 dnů (Osborne, Landa 1992; Landa 1998).



Obr.1. Schéma vývojového cyklu entomopatogenních hub (Zvára *et al.* 1998)



#### *Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub*

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

#### *Biotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub*

Patogenita je schopnost patogena vyvolat onemocnění v hmyzí populaci a jako taková je závislá na mnoha různých faktorech jako je fyziologie daného hostitele (např. obranné mechanismy), fyziologie entomopatogenní houby (např. produkce enzymů a sekundárních metabolitů) a na podmínkách vnějšího prostředí. Houby, oproti ostatním entomopatogenním

mikroorganismům, mají zpravidla poměrně široké spektrum hostitelů (McCoy 1988; Inglis *et al.* 2001). Hostitelské spektrum entomopatogenních hub se významně liší v závislosti na druhu houby. Například houba *Aschersonia aleyrodis* infikuje pouze zástupce z čeledi Aleyrodidae a *Nomuraea rileyi* téměř výhradně infikuje housenky motýlů čeledi Noctuidae. Naproti tomu druhy patřící do rodů *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* a *Tolypocladium* jsou zpravidla široce polyfágní a mohou parazitovat na zástupcích patřících do různých řádů hmyzu (McCoy *et al.* 1988; Landa, Osborne 1992).

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

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

#### *Abiotické faktory ovlivňující vývoj a účinnost entomopatogenních hub*

Abiotické faktory mají velmi významný vliv na účinnost entomopatogenních hub, a tím i na průběh infekce v populacích škůdců. V pořadí klesající relevance se nejvýrazněji uplatňují vlhkost a teplota, menší význam mají ostatní fenomény prostředí (složení a pohyb vzduchu, světlo a fotoperioda). Tyto faktory prostředí ovlivňují zejména šíření konidií, penetraci invazní hyfy kutikulou a sporulaci. Vývoj entomopatogenních hub ve fázi kolonizace tělní dutiny je abiotickými faktory ovlivňován méně výrazně (Tanada, Kaya 1993). Optimální teplotní zóna aktivity většiny entomopatogenních deuteromycet se pohybuje v rozmezí 20-30°C, krátkodobě mohou přežívat i vysoké teploty (40-50°C). Většina entomopatogenních hub je dokonale

adaptována i na dlouhotrvající nízké teploty a přežívá i dlouhodobé zmrazení (Landa, Osborne 1992; Inglis *et al.* 2001).

Klíčovým faktorem pro rozvoj nákazy v populaci škůdce je vlhkost, zejména pak relativní vzdušná vlhkost (RH %). Vysoká relativní vzdušná vlhkost je nezbytná pro klíčení, neboť většina konidií entomopatogenních hub klíčí při vlhkosti vyšší než 90 % (Hall 1981). V přirozeném prostředí dochází k vytvoření těchto vlhkostních podmínek během dne několikrát, při poklesech a vzestupech teploty, při čemž si každý živý organismus vytváří na povrchu pokožky vrstvičku nasycenou vodními parami (Weiser 1966). Nároky na relativní vzdušnou vlhkost zpravidla výrazně stoupají i v období sporulace. Většina entomopatogenních hub dobře sporuluje při relativní vzdušné vlhkosti nad 95% (Hall 1981). V případě nevhodných podmínek vytváří většina entomopatogenních hub uvnitř těla infikovaného hostitele pouze hyfy (resp. mycelium) a saprotrofní fázi vývoje houba kompletizuje až za vhodných podmínek (Gottwald, Tedders 1982; Drummond *et al.* 1987). Podmínky ovlivňující sporulaci jsou klíčovými faktory, které ovlivňují šíření hub. Sekundární infekce je limitována dostatečně vysokou vlhkostí prostředí (Arthurs, Thomas 2001).

Konidie všech entomopatogenních hub mohou být poškozeny vlivem slunečního záření, zejména pak podílem ultrafialových paprsků UVB spektra (285-320nm) a UVA spektra (320-400nm). Viditelné a infračervené záření je méně škodlivé než UV záření (Fargues *et al.* 1997a).

#### 2.4. Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub

##### *Rod Beauveria*

Rod *Beauveria* reprezentují převážně široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu resp. na stádiích hmyzu, které se vyskytují v půdě (např. při přezimování) (Vanninen *et al.* 2000; Keller *et al.* 2003). V sortimentu hostitelů jsou zastoupeny zástupci z řádů rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoha dalších druhů), larvy a kukly motýlů a dvoukřídlého hmyzu. Byly izolovány také kmeny vykazující vysokou virulenci na zástupcích stejnokřídlého hmyzu (Inglis *et al.* 1996; Landa 1998; Wraight *et al.* 1998).

Pro rod *Beauveria* VUILL. jsou důležité znaky (Humber 1997):

1. bohaté mycelium uvnitř i na povrchu hmyzu, rozmnožovací orgány jsou na povrch hmyzu
2. kolonie barvy bílé, krémové, oranžové nebo růžové
3. kolonie se oddělují jednotlivě na sympodiální ose vyrůstající z fialid umístěných na konidioforech jednotlivě nebo v přeslenech.

U všech druhů rodu *Beauveria* se tvoří na konidioforech fialidy velmi proměnlivého tvaru, od téměř kulovitých nebo lahvicovitých až po protáhlé větvičky nelišící se v průměru od normálních hyf. Z vrcholů fialid vyrůstají kratší nebo delší, vždy velmi tenké stopečky, zvané sterigmata. Na vrcholu sterigmatu vzniká konidie. Brzo po jejím utváření začne vyrůstat o něco výše nad tímto vrcholovým sterigmatem sterigma boční. Starší (dříve vytvořené) se vychýlí na stranu, aby udělalo místo příštímu sterigmatu. Tímto způsobem vzniká charakteristicky lomení tvz. „cik-cak“ osa, která nese konidie (Samšínková 1963).

Hmyz napadený houbou rodu *Beauveria* je po uhnutí ve vlhkém prostředí porůstán bílým povlakem hustého mycelia, na kterém se ve fázi sporulace objeví bílé kulovité vzdušné konidie (Humber 1997; Rod *et al.* 2005).

Vedle druhu *B. bassiana* bylo popsáno dalších šest druhů hub rodu *Beauveria*, a to *B. brongniartii*, *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. vermiconia*, *B. velata* a *B. caledonica* (Driver, Milner 1998).

#### *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

*B. bassiana* byla jednou z prvních poznanych hmyzích nákaz. Již od 16. století byla nákaza v chovech bource morušového. Choroba byla označována jako „mal de segno“ nebo „calcino“, na území Francie byla známá pod názvem „muscardine“. Parazitický původ tohoto onemocnění housenek bource morušového prokázal na počátku třicátých let 19. století Agostigo Bassi. Determinaci entomopatogenní houby provedl v roce 1835 Guiseppe Baldami Crivelli a zařadil ji do rodu *Botrytis* (*Botritis paradoxa*), později změnil označení na *Botritis bassiana* na počest jejího objevitele. V roce 1912 revidoval systematické zařazení Vuillemin a do dnešní doby je respektováno jeho zařazení do rodu *Beauveria* a označení druhu *B. bassiana* (Dirlbeková 1991).

Houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii* jsou ve středoevropských ekosystémech jedněmi z nejhojněji zastoupených druhů entomopatogenních mikroorganismů

(Rod *et al.* 2005). K infekci hmyzu dochází jak povrchem kutikuly, tak stigmaty. Kromě těchto hlavních způsobů infikuje *B. bassiana* hmyz též per os, zvláště druhy s kousavým ústním ústrojím (Feng *et al.* 1994).

V místě, kde větší svazek pronikl do kutikuly, se pozvolna vytváří černý nepravidelný terčík, reakce fenoloxidázy na přístup vzduchu zvenčí. Houbová vlákna, která pronikla do těla hmyzu, se po určitém růstu oddělují od základu, který zůstal v pokožce, a ten se postupně vyčerpává a odumírá. Hyfová tělíska, která pronikají do těla hmyzu, jsou zprvu velmi krátká, kvasinkovitého tvaru. Vznášejí se v hemolymfě a jsou roznášena po celém těle, kde je všude napadají lymfocyty, fagocytují je, ale samy hynou. Počet lymfocytů a megalocytů, tukové těleso se více a více resorbuje, ač z něj jsou zachována jen slupkovité shluky buněk. Ve stádiu, kdy lymfocyty jsou zničeny, hmyz hyne (Weiser 1966).

Uvnitř těla vznikají válcovité konidie, endokonidie (blastospory), měří obvykle 2-3 x 7  $\mu\text{m}$ . Na fruktifikujících vláknecích vyrůstají porůznu po dvou i více na krátké stopce. Z endokonidií narůstají další hyfy a na těch se po určitém růstu tvoří opět endokonidie. Narůstající hyfy vyplní tělo hmyzu (Weiser 1966).

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

Pokud k uhynutí hmyzu dojde v půdě, z mrtvého hmyzu prorůstá mycelium půdou do okolí a pokud během svého růstu narazí na jiný hmyz dojde k jeho napadení. Uhyne-li napadený hmyz na povrchu půdy, pokryje se povrch uhynulého hmyzu hustým spirálujícím myceliem, ze kterého se uvolňují vzdušné konidie schopné další infekce, nebo schopné delší dobu přetrvávat v suchém prostředí (Rod *et al.* 2005).

*B. bassiana* tvoří vlákna 3 až 5  $\mu$  široká, průhledná a přepažovaná. Její konidiofory jsou jednoduché nebo větvené, válcovité až lahvicovité, 2,5 až 5,5 x 1,5 až 2,5  $\mu$  až 15,5 až 25,5 x 1,5 až 3  $\mu$  veliké. Vehikuly jsou kulovité, 1,5 až 5 veliké, průměrně 2,5  $\mu$ . Sporogenní buňky jsou většinou kulovité, 1,5 až 3  $\mu$  široké, jindy válcovité, 7 až 10 x 1 až 2  $\mu$  veliké. Lahvicovité buňky jsou 7,5 až 15,0 x 1 až 3  $\mu$  veliké. Spory jsou kulovité (1 až 4  $\mu$  v průměru) až vejčité (1,5 až 5,5 x 1 až 3  $\mu$ ). Plně vyzrálá houba tvoří těsné kulovité shluky spor, konidioforů a hyf (Weiser 1966).

V přírodě přetrvává druh *B. bassiana* v povrchových vrstvách půdy jako mycelium

jednak v uhynulých jedincích infikovaného hmyzu, jednak na organických zbytcích (saprofytní fáze). Jako hostitel *B. bassiana* bylo zaznamenáno přes 200 druhů hmyzu z devíti řádů (především Lepidoptera a Coleoptera). Navzdory velkému množství hostitelů byly pouze zřídka sledovány epizootie způsobené houbou *B. bassiana* u přirozených populací škůdců (Feng *et al.* 1994).

Ve střední Evropě jsou komerčně produkovány tři preparáty a bázi hub rodu *Beauveria*. Na bázi *B. bassiana* je to český přípravek BOVEROL. Ve Švýcarsku je produkován přípravek na bázi *B. brongniartii*, kmene Bb 96, používaný proti larvám chroustů. V rakousku byly z půd s hojným výskytem ponrav chroustů izolovány kmeny IMBST 95.031 a 95.041 používané v preparátu MELOCONT PILZGESTE také proti ponravám chroustů (Rod *et al.* 2005).

BOVEROL se dodává ve formě suchého prášku obsahující vzdušné konidie. Tento prášek se před aplikací v menším množství vody rozetře v husou kaši, poté se doplní vodou na předepsaný objem postřikové kapaliny a aplikuje se postřikem. Podmínkou dobré účinnosti je, aby hmyz s konidiami na povrchu byl delší dobu v prostředí s velmi vysokou vlhkostí (Rod *et al.* 2005). Přípravky ENGERLINGSPILZ a MELOCONT-PILZGERSTE jsou formulovány jako obilná zrna porostlá myceliem houby. Tyto přípravky se při aplikaci zapraví do půdy (secím strojem, rotavátorem), kde dojde ke styku s houbou a tím k infekci hmyzu (např. ponravy chroustů). Podmínkou dobré účinnosti je dostatečná vlhkost půdy po dobu několika týdnů po aplikaci (Rod *et al.* 2005).

### *Rod Metarhizium*

*M. anisopliae*, *M. flavoviridae* reprezentují široce polyfágní houby, které jsou převážně vázány na půdní hmyz (rovnokřídli – *Orthoptera*, brouci - *Coleoptera* a dvoukřídli – *Diptera*). Nákazy vyvolané metarhizii jsou označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem. Tyto houby se běžně vyskytují v půdách oblasti mírného pásma, subtropů a tropů. Podobně jako *B. bassiana* jsou běžnou složkou půd na celém území ČR, kde působí jako přirození regulátoři v populacích hmyzu (Landa 1998).

### *Metarhizium anisopliae*

Rozvoj infekce v hostiteli probíhá tak, že ze spor vyklíčí během 24 hodin na jednom pólu klíček, který se zavrtá do pokožky hmyzu a proniká do těla. V těle hostitele se rozrůstá a dělí, spleť vláken mycelia prorůstá všechny orgány tak dlouho až vyplní celé tělo hmyzu a tkáně

hmyzu zmizí, stráveny parasitem. Hyfy prorůstají pokožkou ven a na povrchu tvoří bílé až narůžovělé mycelium. Radiálně vyrůstají z povlaku krátké konidiofory, těsně přimknuté k sobě do nápadnějších svazečků. Z nich se vyvíjejí konidie. Jsou tyčinkovité, 3,5  $\mu$  široké a 6,5 až 7,2  $\mu$  dlouhé. Jsou zelenošedé až olivově zelené. Kolem hmyzu napadeného zelenou muskardinou se nejprve v půdě vytvoří bílé mycelium, uvnitř kterého se vyvíjejí plodonosná vlákna. Když tento hmyz s tímto obalem se dostane na povrch půdy a změní se vlhkost prostředí, bílá myceliová vrstva praská a objeví se zelenavé konidie (Weiser 1966).

Myceliová vlákna v těle hostitele jsou 3 až 4  $\mu$  široká a až 20  $\mu$  dlouhá, dělena v krátké buněčné úseky, s četnými tukovými kapkami a jemnou granulací plasmy. Na povrchu vyrůstající vlákna jsou tenčí, pouze 2 až 3  $\mu$  silná (Weiser 1966).

K infekci hostitele dochází v převážné většině případů povrchem kutikuly. Spory jsou mastné, nesmáčenlivé, dobře lnou k povrchu pokožky. Klíčící spory vypouštějí vlákno do pokožky, v místech průniku dochází k určitému zduření (Weiser 1966).

Nákaza u hmyzu probíhá 4 až 6 dní, podle velikosti a druhu hmyzu a infekční dávky. Během této doby nakažený jedinec postupně ztrácí pohyblivost, nepřijímá potravu, objevují se hnědé skvrny na pokožce. V konečném stádiu hostitel nereaguje na podráždění a pozvolna hyne. K dalšímu rozvoji mycelia a fruktifikaci dochází jen při náležitě vlhkosti prostředí. *Metarhizium anisopliae* je houba je vázaná na mírné a vlhké klima. Její tepelné optimum leží při 20 až 25 °C vyžaduje vysokou vlhkost – nad 90 %. Proti vyšším teplotám je málo odolná (Weiser 1966).

Biopreparáty na bázi *Metarhizium* jsou velkoplošně aplikovány zejména v zemích Jižní Ameriky (Brazílie, Argentina, Kolumbie) (Landa 1998).

### *Rod Paecilomyces* Bainier

Rod *Paecilomyces* byl definován a popsán Bainierem (1907) jako rod blízké příbuzný rodu *Penicillium*. Hlavní rozdíly mezi zástupci rodu *Paecilomyces* a *Penicillium* je odlišnost v pigmentech a tvaru konidioforů. Druhy řazené do rodu *paecilomyces* postrádají schopnost syntetizovat zelené pigmenty (odtud odvozeno i časté označení jako žluté, resp. fialové muskardiny) a v průběhu konidiogeneze vytvářejí krátké cylindrické fialidy uchycené na relativně dlouhých krčcích. Revizi rodu provedl Samson (1974). Rozděлил 31 druhů hub rodu *Paecilomyces* do dvou sekcí – *Paecilomyces* a *Isarioidae* (Landa 1994).

### *Paecilomyces fumosoroseus*

*P. fumosoroseus* (Wize) A. H. S Brown & G. Sm., *P. farinosus* (Holm ex Gray) A. H. S. Brown & G. Sm., *P. lilacinus* (Thom) Samson representují široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích z mnoha řádů hmyzu) *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), fytofágních roztočích (např. sviluškovití – tetranychidae) a některých druzích hád'átek (cystotvorná hád'átka rodů *Globodera*, *Heterodera*) (Landa 1998).

Poprvé bylo *P. fumosoroseus* zjištěno jako patogen přirozeně se vyskytující v populacích molice až v roce 1983, kdy se v populacích molice *T. vaporariorum* ve sklenících v oblasti Pekingu objevily velmi silné spontánní epizootie, které dočasně zcela zdecimovaly populace tohoto škůdce. Tento kmen byl odizolován a jako vysoce virulentní vůči molici skleníkové byl označen jako subspecies trinomálním označením „beijingensis“, tedy jako *P. fumosoroseus* var. *beijingensis* (Fang et al. 1983).

Houba *P. fumosoroseus* vykazuje nejen status entomopatogenní a akarifágní houby, ale za určitých okolností vykazuje i status mykoparazita. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na rzích a na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového (Landa 1998).

Na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách vytváří *P. fumosoroseus* zprvu bílé vatovité kolonie, které mění později barvu do odstínů narůžovělé, nafialovělé až šedofialové barvy. Změny barvy kolonií přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Starší, plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter kolonie se mění v prašná, s povrchem zcela pokrytým obrovským množstvím konidií (Landa 1994).

Hlavní determinační znaky jsou detekovány na morfologických strukturách spirálujících kultur. V koloniích *P. fumosoroseus* se v průběhu konidiogeneze tvoří elipsoidní konidiofory, které jsou v podobě dlouhých řetízků postupně produkovány na koncích fialid. V koloniích *P. fumosoroseus* se na vzdušném myceliu nejprve vytvářejí konidiofory, které jsou na hyfách umístěny přeslenovitým způsobem. Na koncích konidioforů se následně formují konidiogenní fialidy (3-6 fialid na 1 konidioforu), na kterých se vytvářejí oválné konidie. Konidie se na koncích fialid oddělují postupně, nejmladší konidie je vždy v kontaktu s fialidou a odtlačují starší konidie dál do tvořícího se řetízku. V jednom řetízku konidií přichycením na konidiogenní fialidě může být přítomno i více než 50 konidií (Samson 1974, Osborne, Landa 1992). Povrch kultur *P. fumosoroseus*, a zvláště pak povrch jednotlivých konidií je silně hydrofobní. Po přelítí



kolonie *P. fumosoroseus* vodou , plavou uvolněné konidie ( zpravidla stále udržují formou kompaktních řetízků) po povrchu vody kde tvoří prašnou, nesmáčenlivou vrstvu a jsou snadno rozprášeny i při malém pohybu vzduchu (Osborne, Landa 1992).

Infekční cyklus *P. fumosoroseus* je obzvláště rychlý ve srovnání s jinými entomopatogenními houbami. V pokusech bylo prokázáno, že infekční cyklus *P. fumosoroseus* je o 1-3 dny kratší než u *Lecanicillium lecanii* a o 4-7 dnů kratší než u *Aschersonia aleyrodis*. První symptomy jsou patrné již za 24-48 hodin po kontaktu konidií s hmyzem. Konidie se přichytávají na dorzální stranu a hyfy jsou přítomny uvnitř těla hostitele do 24 hodin. Mycelium je přítomno na povrchu těla za 48 hodin a sporulace nastupuje po 72 hodinách. První vizuální příznaky infekce v optimálních podmínkách mohou být zaznamenány již od 48-72 hodin (myceliální růst na povrchu hostitele) a maximální sporulace objevuje od 5-7 dnů (Landa, Jiranová 1998).

Tento druh je již využíván v praktické ochraně rostlin. Americká firma ThermoTrilogy Corporation vyrábí a distribuuje biopreparát PFR 97 WDG – APOKA, který je pod obchodním názvem PREFERAL distribuován také belgickou firmou Biobest v Evropě (Landa 1998). Apoka – jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen PFR 97 v roce 1987 poprvé odizolován Dr. Lance S. Odbornem (Landa 1994). Tento preparát je používán v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květina proti širokému sortimentu škůdců (mšice, molice, červci, třásněnky a další). V ČR je pokusně používán v ochraně jehličnanů proti kůrovcům z rodu *Ips* (např. *I. typographus*) a v ochraně brambor proti mandelince bramborové (Landa 1998).

Monosporový izobát původní kultury PFR 97 je v současnosti uložen jak v Centrální US sbírce mikroorganismů (ATCC č. 20874), tak i v kolekci mikroorganismů University Florida Gainesville (UFG) (Landa 1994).

Kmen PFR 97 byl podroben také běžným *in vitro* testům na toleranci vůči pesticidům. Byla shledána vysoce tolerantní k širokému spektru fungicidů , které jsou běžně používány ve sklenících na okrasné rostliny (Osborne *et al.* 1990). *P. fumosoroseus* je vzhledem ke svým vlastnostem vhodnou možností pro rozšíření programů integrované ochrany rostlin, zejména v řízeném prostředí skleníků. V její prospěch mluví i výsledky testů toxicity, kompatibility s přirozenými nepřáteli a minimální nebezpečí pro životní prostředí (Osborne, Landa 1992).

V rámci sortimentu testovaných hostitelských rostlin nebyl zjištěn ani jeden případ výrazně negativní reakce hostitelské rostliny na interakci s PFR 97. Pouze u zelí a kvěťáku byl

zjištěn mírně retardující vliv na vzcházení, při použití PFR 97 formou pravidelných zálivek klíčnicích a vzcházejících rostlin. Ani v případě velmi citlivých okrasných rostlin nabyly zjištěny fyto toxické účinky, které by negativní ovlivnily kosmetickou nebo komerční kvalitu rostlin. Biopreparáty na bázi PFR 97 lze považovat za bezpečné a z hlediska případné toxicity za bezproblémové (Landa 1994).

#### *Rod Lecanicillium*

*Lecanicillium lecanii* (Deuteromycotina, Hyphomycets) je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, který byl poprvé popsán po izolaci z červce *Coccus viridis*. V minulosti byl tento patogen evidován pod různými jmény (např. *Cephalosporium lecanii*, *C. aphidicola*). Revizi taxonomie rodů *Lecanicillium* a *Cephalosporium* provedl Gams (1971), který odstranil, do té doby užívaná synonyma a všechny uvedené duhy zařadil do rodu *Lecanicillium*. Za hlavní slučovací kritérium použil morfologickou podobnost spirálujících kultur, které vytvářejí dlouhé konodiofory, vyrůstající na vzdušném myceliu, na jejichž koncích se vytvářejí konidiospory ve formě „kuliček“, pokrytých na povrchu mucilaginózní vrstvou (Landa 1994).

*L. lecanii* představuje široce polyfágní entomopatogenní druh patogena, který je používán v biologické ochraně proti drobným savým škůdcům (např. třásněnkám, mšicím a molicím škodícím na rychlené zelenině a okrasných květinách pěstovaných ve sklenících) (Landa 1998).

U hmyzu řádu Homoptera napadá patogen všechna vývojová stádia kromě vajíček (molice), která jsou infikována jen výjimečně. Méně časté jsou záznamy týkající se výskytu *L. lecanii* v populacích hostitelů patřících do jiných řádů hmyzu, nicméně v sortimentu hostitelů patogena byly zaznamenáni zástupci řádů *Orthoptera*, *Heteroptera*, *Thysanoptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera* a *Hymenoptera*. Také u těchto hostitelů napadá *L. lecanii* přednostně larvy, méně pak dospělce, případně larvy (Landa 1994).

Spektrum parazitismu *L. lecanii* však není omezeno pouze na hmyz. Spontánní epizootie způsobené *L. lecanii* byly zjištěny i v populacích některých druhů roztočů. Kromě parazitické asociace s uvedenými skupinami členovců bylo zjištěno, že se *L. lecanii* vyskytuje i jako ektoparazit na některých druzích fytopatogenních hub. Příkladem této ektoparazitické formy vývoje *L. lecanii* je výskyt na uredosporách různých druhů rzí (Landa 1994).

Hlavním determinačním znakem *L. lecanii* je typická forma sporulace. V průběh konidiogeneze se na vzdušném myceliu vytvářejí dlouhé, úzké, lahvicovité konidiofory na jejichž koncích se postupně tvoří elipsoidní konidie. Konidiofory jsou na myceliu umístěny v přeslenech a z jedné zóny protilehle vyrůstají 2,3 až 4 konidiofory. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidiofory jsou vytvářeny postupně a vždy nová, mladší konidiospora odtlačuje dříve vytvořenou konidiosporu do postupně se tvořícího shluku, který má podobu kuličky. V závěrečné fázi sporulace se kuličky pokrývají mucilagenní hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Landa 1994).

Patogeneze má klasický průběh. Nákaza je iniciována kontaktem konidií s povrchem těla hostitele. Povrch konidií je silně adhezní a po přichycení na povrchu těla se jich hostitel jen velmi těžko zbavuje. Konidie *L. lecanii* klíčí při vhodných podmínkách poměrně rychle. Optimální podmínky k růstu a sporulaci *L. lecanii* jsou při teplotách 15-28 °C a relativní vlhkosti vzduchu nad 80 % (Rod *et al.* 2005). Klíček konidie penetruje kutikulou hostitele a po proniknutí se v tělní dutině tvoří hyfová tělíska, která se následně rozpadají na primární blastospory. Blastospory jsou tenkostěnné, oválné, tvarově velmi heterogenní a rychle se množí pučením. Základní podmínky tvorby blastospor jsou semiaerobní podmínky a tekuté prostředí. Vzhledem ke svému tvaru a povrchové plasticitě snadno blastospory pronikají ke všem tkáním hostitele a v průběhu 2-3 dnů po iniciaci zcela vyplňují tělo hostitele. V této fázi je již hostitel usmrcen a další vývoj patogena má opět charakter saprofytického růstu. Počátkem saprofytické fáze vývojového cyklu je prorůstání mycelia na povrch těla usmrceného hostitele. Hostitel je porůstán a zcela pokryt dlouhým, hustým myceliem bílé barvy, které se rozrůstá i po povrchu listu a v okolí infikovaného jedince vytvářejí „infekční zónu“, která má podstatně větší plochu než je dáno velikostí hostitele. Na vzdušném myceliu pak probíhá finální vývojová fáze – konidiogeneze, která končí vytvořením velkého množství konidiosporových kuliček, ve kterých je v průměru 16-24 oválných konidiospor (Landa 1994).

V sortimentu dostupných biopreparátů mají již tradiční místo biopreparáty firmy KOPPERT N.V., které jsou známí pod obchodními názvy MYCOTAL (určen k ochraně skleníkových plodin proti molici skleníkové a molici bavlníkové), VERTALEC (kmen vysoce virulentní na různé druhy mšic) a TRIPTAL (kmen *L. lecanii* s vysokou účinností na hmyz třásnokřídlí, např. třásněnka zahradní a třásněnka západní (Landa 1998).

## 2.5. Kultivace entomopatogenních hub

Rozsáhlou a velmi významnou skupinu entomopatogenních hub představují druhy, které ztratily schopnost produkovat sexuální spory nebo je produkují jen výjimečně. Tato skupina hub je zahrnována do oddělení Deuteromycota, třídy *Hyphomycetes*, řádu *Moniliales* (Inglis *et al.* 2001). Z hlediska praktické biologické ochrany má tato skupina největší význam. K nejznámějším vláknitým deuteromycetám patří houby rodů *Beauveria*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* a *Tolypocladium*. V těchto rodech je zastoupena řada druhů, z nichž přibližně 25 je v současnosti již využíváno ve formě standardních biopreparátů při biologické regulaci populací škůdců zemědělských plodin a kultur. Na rozdíl od obligátně parazitických druhů hub (např. *Entomophthorales*), představují vláknité deuteromycety parazity fakultativní. Většina hub této skupiny může realizovat kompletní vývojový cyklus i v alternativních systémech bez přímé vazby na živého hostitele (např. saprotrofní cyklus na odumírající organické hmotě různého původu, včetně umělých živných půd a substrátů) (McCoy *et al.* 1988; Humber 1997; Charnley 1997). Na umělých půdách a přirozených substrátech jsou vláknité houby schopny vyprodukovat velké množství vzdušných konidií (Samšišňáková *et al.* 1981).

Pro výrobu biopreparátů popřípadě pro reintrodukcii kmenů do prostředí jsou vhodné kmeny přednostně vybírány ze souboru izolátů, získaných monitoringem v přirozeném prostředí a na základě polyfaktoriální charakteristiky. Polyfaktoriální charakteristika zohledňuje významné biologické vlastnosti kmenů. Pro úspěšnou kontrolu hmyzí populace je nezbytný výběr vhodného kmene, který je schopný penetrovat a infikovat jedince. Důležitost vybraného kmene spočívá zejména (Meekes *et al.* 2002; Gindin *et al.* 2000):

1. ve vysoké virulenci vybraného kmene proti cílovému škůdci
2. v rychlosti vývoje vybraného kmene po aplikaci na cílového škůdce
3. ve schopnosti kmene odolávat podmínkám prostředí, ve kterém se cílový škůdce nachází.

Polyfaktoriální charakteristika zohledňuje také vlastnosti produkční. Pro produkci houbového patogena jsou důležitá tato kritéria (McCoy *et al.* 1975; Samšišňáková *et al.* 1981):

1. 1) výběr kmene schopného produkce velké masy virulentních spor
2. 2) výběr vhodného živného média resp. přirozeného substrátu zvyšujícího optimální produkci spor

3. 3) produkce kmene za nízkou cenu
4. 4) vhodný proces a stabilita finální formulace, včetně podmínek skladování.

## 2.6. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Účinnou složku většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří spory nebo blastospory. Spory jsou produkovány v „*in vitro*“ systémech kultivací na povrchu pevných nebo tekutých živných půd, případně na přirozených substrátech (Grajek 1994; Wright, Carruthers 1999). Tenkostěnné blastospory jsou produkovány pomocí fermentačních biotechnologií (submerzní kultivace v tekutém živném médiu) (Goettel, Roberts 1991; Wright, Carruthers 1999).

Z hlediska kvantitativního je největší množství biopreparátů na bázi spor entomopatogenních hub produkováno pomocí *in vitro* produkčních systémů využívajících různé přirozené pevné substráty, nejčastěji semena různých druhů rostlin (rýže, proso, kukuřice, pšenice, ječmen a další) (Vyas *et al.* 1991). Příkladem jsou velko i nízkoobjemové produkce hub *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* v Číně a zemích Jižní Ameriky (Brazílie, Venezuela) (Charnley 1989; Wright, Carruthers 1999). Tyto technologie jsou zpravidla dvoufázové. V první fázi je vyprodukováno čisté, koncentrované inokulum, kterým je ve druhé fázi ošetřen sterilní nebo semisterilní substrát. Produkt je k jednoduše finalizaci připraven po 2-3 týdnech kultivace a formulaci tvoří různě upravený (např. mletý) komplex „patogen-substrát“ (Feng *et al.* 1994; Grimm 2001). Tyto technologie produkce vláknitých hub jsou v současnosti upřednostňovány i proto, že jsou často koncipovány na bázi záměrného využívání obnovitelných přírodních zdrojů, případně i odpadních organických produktů (Dangar *et al.* 1991; Rani, Susamma-Mathai 1999; Gopalakrishnan *et al.* 1999).

Takto konstruované biopreparáty jsou zpravidla dostatečně funkční a finančně dostupné, nicméně bývají zpravidla nestandardní v klíčových kvalitativních a kvantitativních parametrech a jejich registrace ve vyspělých zemích je vzhledem k vysokým nárokům registračních procesů prakticky nemožná (Domsch *et al.* 1980; Butt *et al.* 1999).

Podstatně standardnější biopreparáty lze získat pomocí povrchových kultivačních technologií (Ibrahim, Low 1993). Vedle produkce konidií je povrchová kultivace na pevných médiích používána pro běžné udržování izolátu tzv. matečné kultury. Jedno z nejrozšířenějších

používaných médií pro kultivaci hub je médium Sabouraud Dextrose Agar doplněné o kvasničný extrakt. Vedle tohoto média se pro kultivaci vláknitých hub používá i Corn Meal agar, Czapeck-Dox, malt extrakt, Potato dextrose agar a Sabouraud maltoso agar (Goettel, Inglis 1997). Povrchové kultivace hub na pevných médiích jsou obvykle realizovány na agarovém médiu uvnitř skleněných láhví nebo v Petriho miskách. Povrch živného média nebo přirozený substrát je za sterilních podmínek naočkován suspenzí konidií nebo blastospor, získaných pomocí submerzních kultivací v tekutém živném médiu. Počáteční růst mycelia je rychlejší při použití blastospor. Nainokulovaný substrát resp. Petriho misky se inkubují při 25 - 27°C pod různým světelným režimem. Pro redukcí dehydratace media mohou být Petriho misky hermeticky uzavřené parafilmem. Po 7-10 dnech jsou kultury plně vysporulované. Konidie se získají z povrchu přímo buď seškrábnutím při použití sterilního skalpele „policeman“ nebo smytím konidií sterilní destilovanou vodou (Goettel, Inglis 1997). Ve větším měřítku jsou pro produkci konidií používány levnější výživné substráty jako rýže, otruby nebo obilná zrna. Navlhčený substrát je autoclárován v širokohrdlých nádobách, plastických sáčcích nebo cínových miskách. Po schlazení je substrát nainokulovaný konidiovou nebo blastosporovou suspenzí a inkubován při pokojové teplotě. Použití rýže v polypropylenových plastických sáčcích je aktuálně nejpoužívanější metoda pro produkci *M. anisopliae* a *Metarhizium flavoviride* (Goettel, Inglis 1997).

K nejpropracovanější a nejrozšířenější povrchové kultivační technologii patří tzv. „pytlová metoda“ (u nás známá také jako „Kýbalova metoda“), při které jsou masy spor entomopatogenních hub produkovány v aerobní prostředí na myceliu porůstajícím povrch sterilního tekutého živného média, které je uzavřeno ve sterilních PVC pytlích. Kompletní biomasa (mycelium a spory) je po usušení finalizována mletím a smísením s inertním nosičem (siloxid, jemně mletá křemelina) do ve vodě suspendovatelných prášků. Touto metodou byl i v ČR produkován doposud jediný tržně dostupný biopreparát na bázi houby *B. bassiana* mající obchodní název BOVEROL (Samšínáková *et al.* 1981; Weiser 1991).

Některé druhy entomopatogenních hub je možno produkovat jako submerzní kultury. Submerzní kultivace entomopatogenních hub lze v principu považovat za technologické analogie přirozených procesů vývoje entomopatogenních hub na hmyzích hostitelích, kdy v klíčové parazitické části vývojového cyklu patogen proniká do tělní dutiny hostitele a v semi-aerobních podmínkách v tekutém prostředí (hemolymfa) vytváří zvláštní tenkostěnné, jednobuněčné,

tvarově a velikostí poměrně nestabilní útvary nazývané blastospory (někdy též hyfová tělíska, „yeast like bodies“ a pod.) (Charnley 1984; Humber 1997). Fermentační technologie umožňují produkovat velké množství uniformní biomasy tvořené převážně blastosporami, s příměsí myceliálních částic a fragmentů (Lopez *et al.* 2000). Submerzní kultury se poměrně snadno finalizují a formulují do standardní formy biopreparáty. Vývoj biotechnologií orientovaných do oblasti velkokapacitních submerzních kultivací vláknitých hub lze bez nadsázky považovat za nejvýznamnější fenomén vývoje standardních mykoinsekticidů a mykofungicidů. Většina v současnosti komerčně dostupných preparátů na bázi hub je konstruována na bázi blastospor, resp. biomasy získané pomocí submerzních kultivací (Wright, Carruthers 1999).

Tabulka 3. Příklady registrovaných biopreparátů na bázi mitosporických hub.

Stát	Název	Druh houby	Cílový organismus	Plodina
USA	Mycotrol <sup>®</sup>	<i>B. bassiana</i>	molice, mšice,	rajčata , okrasné
	Botanigard <sup>®</sup>		třásněnky	rostliny
USA	Naturalis <sup>®</sup>	<i>B. bassiana</i>	savý hmyz	bavlna, skleníkové kultury
USA	BioBlast <sup>®</sup>	<i>M. anisopliae</i>	termity	domácnosti
USA/Evropa	PFR-97 <sup>TM</sup> <sup>®</sup>	<i>P. fumosoroseus</i>	molice, třásněnky	skleníkové kultury
UK, Evropa	Preferal			skleníkové
	Vertalec <sup>®</sup>	<i>L. lecanii</i>	mšice	kultury
UK, Evropa	Mycotal <sup>®</sup>	<i>L. lecanii</i>	molice, třásněnky	skleníkové kultury
Jižní Afrika	Green Muscle <sup>®</sup>	<i>M. anisopliae</i>	sarančata	Přírodní parky
Reunion	Betel <sup>®</sup>	<i>B. bassiana</i>	larvy listorohých brouků	cukrová třtina
Švýcarsko	Engerlingspilz <sup>®</sup>	<i>B. brogniartii</i>	larvy chroustů	pastviny
Švýcarsko	Beauveria	<i>B. brogniartii</i>	larvy chroustů	pastviny
	Schweizer <sup>®</sup>			
Francie	Ostrinol <sup>®</sup>	<i>B. bassiana</i>	zavíječ kukuřičný	kukuřice
Austrálie	BioGreen <sup>®</sup>	<i>Metarhizium</i> <i>flavoviride</i>	larvy chroustů	pastviny, trávníky
Austrálie	BioGreen <sup>®</sup>	<i>Metarhizium</i> <i>flavoviride</i>	larvy chroustů	pastviny, trávníky

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1. Kmeny hub používané v pokusech

##### *Beauveria bassiana*

Kmeny Pm a Pk entomopatogenní houby *B. bassiana* byly společně odizolovány z pozemku v lokalitě Pěňčín (Prostějov) pomocí metody živé nástrahy „*Galleria bait metod*“. Směsný vzorek kmenů byl kultivován na živné půdě PDA. Pro separaci obou kmenů byla použita metoda CFU, kdy po 10 dnech získány monosporové izoláty jednotlivých kmenů. Kmen, který vykazoval myceliální charakter, byl označen Pm (myceliální). Druhý kmen naopak vykazoval vyšší sporulaci a tvořil ve srovnání s kmenem Pm kompaktní mycelium, proto získal označení Pk (kompaktní). Oba monosporové izoláty byly uloženy ve sbírce na katedře rostlinné výroby a následně byly tyto kmeny použity v pokusech.

Kmen M408 byl odizolován pomocí „*Galleria bait metod*“ v rámci monitoringu entomopatogenních hub v regionu Jižní čechy, který byl realizován v roce 2001-2002. Kmen M408 je uložen také ve sbírce.

##### *Lecanicillium lecanii*

Kmen I9 byl odizolován pomocí metody „*Galleria bait metod*“ při plošném monitoringu entomopatogenních hub v půdě na lokalitách souvisejících s výskytem lýkožrouta smrkového *Ips typographus* L. v oblasti NP a CHKO Šumava.

##### *Paecilomyces fumosoroseus*

Ve všech pokusech byl výhradně použit kmen PFR 97 Apopka (Apopka - jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen v roce 1987 izolován, referenční typový kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 20874). Kmen PFR 97 je od roku 1994 využíván jako účinný agens biopreparátu PFR 97<sup>TM</sup> 20 %WDG a generického biopreparátu, který je zejména v Evropě registrován pod obchodním názvem PreFeRal<sup>TM</sup>. Oba biopreparáty obsahují 20 % submerzní biomasy (blastospory) kmene PFR 97 ( $2,0 \times 10^9$  CFU/g<sup>-1</sup>) a 80 % interních přísad. Pro pokusy byl použit kmen PFR 97, který byl v roce 1993 poskytnout oddělení rostlinolékařství KRV ZF JU firmou Hermo Trilogy (dnes Certis USA) a od té doby je používán pro experimentální účely v rámci řady výzkumných, magisterských a doktorandských projektů.



Tabulka 4. Základní charakteristiky kmenů entomopatogenních hub použitých v pokusech

Druh	Kód	Původ (oblast)	Plodina	Izolace <sup>3</sup>
<i>Beauveria bassiana</i>	M408	Brno 2003	Ozimý ječmen	<i>G. mellonella</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	Pk	Pěnčín 2005	Ozimá pšenice	<i>G. mellonella</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	Pm	Pěnčín 2005	Ozimá pšenice	<i>G. mellonella</i>
<i>Lecanicillium lecanii</i>	I9	Šumava 1999	Lesní porost	<i>G. mellonella</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	P4	Pěnčín, 20005	Ozimá pšenice	<i>G. mellonella</i>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR 97	USA 1987	Citrus	reizolace

### 3.2. Kultivační média a přirozené substráty

Pro porovnání množství vyprodukovaných konidií jednotlivých kmenů byly použity různé druhy živných médií. Produkce konidií byla sledována i na živných půdách s různým obsahem živin C:N. Pro optimalizaci C-zdroje v produkčním médiu byla použita glukóza v různé koncentraci od 10 g.l<sup>-1</sup> do 40 g.l<sup>-1</sup>. Pro optimalizaci komplexního N-zdroje byl použit pepton v koncentraci od 5 g.l<sup>-1</sup> do 20 g.l<sup>-1</sup>. Hodnota pH médií nebyla před sterilizací upravena. Do testovaných médií bylo dodáno 20 g.l<sup>-1</sup> bakteriologického agaru.

Tabulka 5. Standardní agarizovaná živná média použitá v pokusech

Živná půda	Zkratka
Sabourard dextrose agar	SDA
Potato dextrose agar	PDA
Corn meal agar	CMA
Tryptic soy agar	TS
YM agar	YM
Malt extrakt agar	MALT
Agar se sladinovým extraktem	SLA

<sup>3</sup> *G. mellonella* – kmen houby byl odchycen pomocí metody GBM (= Galleria Bait method); reizolaci – kmen získán izolací z komerční šarže biopreparátu Preferal

Tabulka 6. Poměry zdrojů C a N použité ve studiích zaměřených na vliv podílu C a N na růst a sporulaci entomopatogenních hub

Půda č.	Pepton (g . l <sup>-1</sup> )	Glukóza (g . l <sup>-1</sup> )
1.	10	10
2.	10	20
3.	10	30
4.	10	40
5.	5	40
6.	10	40
7.	15	40
8.	20	40

Vedle jednotlivých živných půd byly testovány pro kultivaci konidií jednotlivých druhů/kmenů hub i přirozené substráty (kroupy, rýže, proso, kukuřice a vločky). Různé množství kmenů hub i přirozených substrátů bylo naváženo do Erlenmayerových baněk o různém objemu. Substrát v Erlenmayerových baňkách byl sterilizován ve Stericelu po dobu 90 minut při teplotě 121 °C. Po vychladnutí byla provedena inokulace jednotlivých kmenů entomopatogenních hub.

### 3.3. Aktivace hub z alginátových pelet

Kmeny hub jsou uloženy v mykologické sbírce na katedře rostlinné výroby a dlouhodobě uchovávány ve formě alginátových pelet. Při této formulaci je biomasa patogena inkorporována spolu s aditivou do alginátových pelet. Pro účely pokusů byl použit následující postup reaktivace a kultivace hub. Pelety jednotlivých kmenů byly t mrazícího boxu umístěny na povrch 2 % vodní agar v Petřino misce a tato vlhká komůrka s peletami byla umístěna do termostatu (25 °C, fotoperioda 0/24). Pelety exponované vysoké vlhkosti přijímají vodu (bobtnají) a zpravidla v průběhu 5-7 dnů je povrch aktivovaných pelet pokryt plně sporulujícím myceliem patogena. Z aktivovaných pelet se jednou pasáží převede na plotny s agarizovým živným médiem PDA, a tím jsou získány matečné kultury kmenů.

### 3.4. Obecné metodické aspekty

#### *Příprava konidiové suspenze*

Pro pokusy byly používány konidiové suspenze v 0,05 % Tween 80. Konidiová suspenze byla získána přelitím povrchu plně sporulujících kultur sterilním roztokem Tween 80. Koncentrace konidií byla určována pomocí počítačící komůrky – hemacytometru a následně adjustována na požadovaný titr, zpravidla na hodnotu  $1,0 \times 10^7$  konidií/1 ml.

#### *Stanovení radiálního růstu*

Cílem tohoto testu bylo zaznamenat dynamiku růstu kultur jednotlivých druhů/kmenů hub kultivovaných formou středových kultur na povrchu agarizovaných médií. Radiální průměr byl měřen nejméně u 4 kultur od každé varianty a to tak, že každá středová kultura se měří 2 krát. Z měřených dat se vypočítá průměr.

#### *Stanovení výtěžnosti na umělém médiu a přirozeném substrátu*

Cílem testu je stanovit množství vyprodukovaných konidií při kultivaci entomopatogenních hub na umělém živném médiu nebo na sterilním přirozeném substrátu. Stanovení výtěžnosti se provádí pomocí hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka).

#### *Statistické hodnocení použití v pokusech*

Získaná data byla vyhodnocena v programu Statistika 6.0. Pro hodnocení rozdílu v růstu kmenů na živných médiích a rozdílu byla použita ANOVA hierarchická. Současně byla stanovena směrodatná odchylka STD a provedeno porovnání s pomocí Tukeyho testu pro hladinu významnosti  $p \leq 0,05$ .

### 3.5. Charakteristika metodických aspektů hlavních studií projektu

#### *Radiální růst středových kultur entomopatogenní houby *B. bassiana* kmenů Pm6 a Pk4.*

Radiální růst *B. bassiana* kmenů Pm6 a Pk4 byl zjišťován na živných médiích PDA, SLA, SDA, YM, MALT, TS, CMA. Cílem testu bylo zjištění průměru středových kultur vyprodukovaných při kultivaci hub na různých živných půdách. Konidiová suspenze byla

nanesena pomocí inokulační kličky ve formě kapky do středu Petriho misky. Po zaschnutí kapky byly Petriho misky vloženy v plastických sáčkích do termostatu (25 °C). Hodnocení a měření průměru středových kultur bylo prováděno po 7, 14 a 21 dnech. Pokus probíhal vždy ve čtyřech opakováních, na každé misce byly změřeny dvě hodnoty a výslednou hodnotou je jejich průměr.

#### *Radiální růst středových kultur entomopatogenní houby B. bassiana kmenů Pm9, Pk5.*

Radiální růst *B. bassiana* byl zjišťován u kmenů Pm9 a Pk5 na živných médiích o různém složení, u kterých byly rozdílné poměry mezi N a C (viz tabulka 6). Cílem tohoto testu bylo zjištění průměru středových kultur vyprodukovaných při kultivaci houby na těchto půdách. Postup shodný s předchozí studií

#### *Výtěžnost konidií po kultivaci na různých typech medií*

Byla zjišťována výtěžnost *B. bassiana* z 21 denní kultury kmenů Pm6, Pk4 na živných médiích: PDA, SLA, SDA, YM, MALT, TS, CMA. Tento test byl proveden za účelem zjištění množství konidií vyprodukovaných na různých živných médiích. Po úplné sporulaci bylo živné medium i s houbou homogenizováno v mixéru s 200 ml vody. Z takto vzniklé konidiové suspenze byla vypočítána produkce konidií pomocí hemacytometru.

#### *Výtěžnost konidií B. bassiana po kultivaci na živných půdách o různém složení (C:N)*

Byla zjišťována výtěžnost z 21 denních kultur vyprodukovaných na živných médiích, která mají odlišné složení – různý poměr C : N. Půdy jsou označené čísly 1-8. Po úplné sporulaci bylo živné médium i s houbou homogenizováno v mixéru s 200 ml vody. Z této suspenze byla vypočítána produkce konidií pomocí hemacytometru.

#### *Výtěžnosti konidií na různých typech pevných substrátů*

Výtěžnost konidií *B. bassiana* kmen M 048 byla sledována po kultivaci na různých pevných substrátech (kroupy, proso, kukuřice, rýže a vločky). Substrát byl navážen 2 x po 10 gramech u krup, prosa, rýže, vloček a u kukuřice 4 x 10 gramů. Poté byl substrát převeden do Erlenmayrevých baněk, kde byl inokulován sterilní konidiovou suspenzí. Z této baňky jsem vždy nanesla po 25 partikulích na Petriho misku s 2 % agarem. Těchto misek jsem měla od každého substrátu čtyři kusy. Celkem tedy byla zjišťována výtěžnost ze 100 partikulí od každého

substrátu. Po 14 dnech kultivace jsem tyto partikule vymyla a rozmíchal ve 100 ml vody kromě prosa, do kterého bylo přidáno pouze 25 ml vody. Poté jsem stanovila výtěžnost ze 100 partikulí.

*Stanovení výtěžnosti L. lecanii na různých pevných substrátech (kroupy, rýže, proso a vločky).*

Do Erlenmayerových baněk jsem navázila vždy po 10 g ržech krup, rýže, vloček a prosa. Do druhého dne jsem je nechala vysterilizovat. Po vysterilizování jsem přidala 5 ml suspenze *L. lecanii* o známém titru a nechala jsem tuto směs kultivovat 14 dní. Po sedmi dnech se do první poloviny kultur přidala 100 ml vody. Směs jsem přecedila přes sítko a z přeceděné suspenze jsem vypočítala produkci konidií pomocí hemacytometru. Tento postup se opakoval opět po 7 dnech.

*Stanovení výtěžnosti u hub L. lecanii, P. fumosoroseus a B. bassiana (Pk,Pm) na rýži a kroupách.*

Ke 100 gramům vysterilizovaných krup a rýže jsem přidala po 50 ml roztoku s houbou (houbu jsem přelila 0,05 % Tween 80) o známém titru. Takto nainokulovaný substrát jsem nechala 14 dní kultivovat. Po této době jsem do každé baňky s nainokulovaným substrátem přidala 300 ml vody, důkladně promíchala a pak přecedila přes sítko. Z přeceděné suspenze jsem stanovila produkci spor.

*Nízkokapacitní produkce konidií hub Metarhizium anisopliae a Paecilomyces fumosoroseus – ověření produkčnosti standardního postupu povrchové kultivace na sterilních ječných kroupách*

Pro ověření produkčnosti konidií hub *M. anisopliae* a *P. fumosoroseus* byl použit standardní postup povrchové kultivace na povrchu sterilních ječných krup. Sterilní ječné kroupy ve skleněných baňkách (200 g krup/1 baňku) byly inokulovány suspenzí hub v poměru 1 ml inokula na 2 g sterilních krup (100 ml/1baňka) a po 24 hodinové inkubaci byly kroupy převedeny do PVC krabic a inkubovány po dobu 10 dnů při teplotě  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Po ukončení kultivace byly produkce z jednotlivých šarží (400-800 g) zpracovány následujícím postupem:

- konidie byly opakovaně (3-5x) smyty z povrchu krup každé ucelené šarže (=základní suspenze)
- pomocí počítací komůrky byl stanoven titr základní suspenze a celkový výnos konidií resp. výtěžnost konidií na 1 g ječných krup

- ze základní suspenze byl odstředěným na centrifuze (3000 rpm, 15 minut) získán konidiový koncentrát, jehož kvantitativní charakteristiky byly stanoveny obdobným způsobem jako v případě základní suspenze (tj. ml koncentrátu, počet konidií/1 ml koncentrátu, výtěžnost konidií/1 g ječných krup...)
- pro obě verze hodnocení (výtěžnost odvozená od základní suspenze resp. od konidiového koncentrátu) byl stanoven i aplikovaný parametr – množství konidiové suspenze o titru  $1,0 \times 10^6$ /1 ml (koncentrace obvyklá pro provozní aplikace)

#### 4. VÝSLEDKY

##### 4.1. Radiální růst entomopatogenních hub na povrchu agarizovaných živných médií

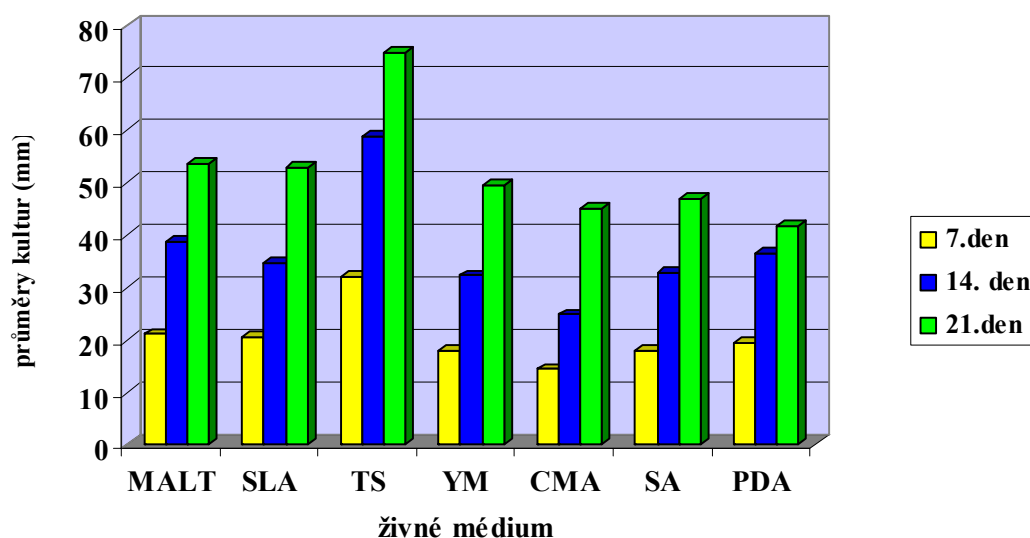
Pokus č.1. Radiální růst středových kultur *B. bassiana* kmenů Pm6, Pk4 na různých druzích živného media

Cílem testu bylo stanovení průměru středových kultur vyprodukovaných při kultivaci hub na různých živných půdách.

Tabulka 7: Radiální růst středových kultur entomopatogenní houby *B. bassiana* kmen Pm6 - průměry porostlé plochy v mm po 7, 14 a 21 dnech.

Médium	Průměr kultur v mm ±STD		
	7.den	14. den	21.den
MALT	21,10 ±0,65	38,60 ±1,85	53,50 ±1,06
SLA	20,50 ±1,50	34,50 ±2,66	52,80 ±1,92
TS	31,90 ±0,54	58,70 ±0,90	74,60 ±0,54
YM	18,10 ±0,22	32,20 ±0,44	49,50 ±2,76
CMA	14,40 ±0,54	24,80 ±0,75	45,00 ±0,61
SDA	18,10 ±2,94	32,70 ±3,38	46,90 ±1,43
PDA	19,50 ±1,73	36,60 ±2,30	41,80 ±4,72
Statistické údaje	F=70,01889 p=0,000000 DF=6, 28	F= 135,2595 p=0,000000 DF=6, 28	F= 108,7253 p=0,000000 DF=6, 28

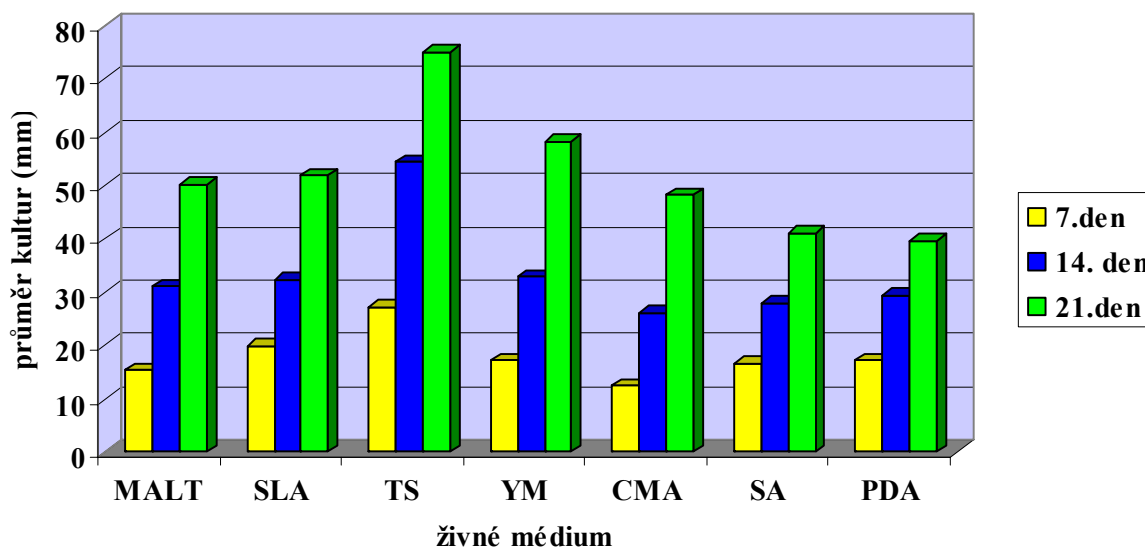
Graf č.1: Radiální růst středových kultur na různých živných médiích kmene Pm6 po 7, 14 a 21 dnech.



Tabulka 8. Radiální růst středových kultur entomopatogenní houby *B.bassiana* kmen Pk4 - průměry porostlé plochy v mm po 7,14 a 21 dnech.

Médium	Průměr kultur v mm ±STD		
	7.den	14. den	21.den
MALT	15,30 ±0,67	31,00 ±0,79	50,30 ±2,41
SLA	19,80 ±0,75	32,30 ±0,44	51,80 ±2,30
TS	27,30 ±1,30	54,40 ±0,82	75,00 ±1,00
YM	17,20 ±0,75	32,90 ±0,65	58,30 ±1,71
CMA	12,40 ±0,54	26,10 ±0,22	48,20 ±1,60
SDA	16,60 ±0,41	28,00 ±2,97	41,00 ±0,93
Statistické údaje	F=188,6380 p=0,000000 DF=6, 28	F= 267,8071 p=0,000000 DF=6, 28	F= 256,7675 p=0,000000 DF=6, 28

Graf č.2: Radiální růst středových kultur na různých živných médiích kmene Pk4 po 7, 14 a 21 dnech



#### Zhodnocení pokusu:

Vyhodnocení je po 7, 14 a 21 dni hierarchicky od nejlepšího k nejhoršímu. Po 7, 14 a 21 dni byl vyhodnocen u obou kmenů *B. bassiana* jako nejlepší substrát TS. Poté se výsledky u kmenů liší. 7 den vyhodnocování u kmene Pm6 následují po substrátu TS substráty MALT, SLA, PDA, YM, SDA, CMA. U kmene Pk4 to jsou substráty SLA, YM, PDA, SDA, MALT, CMA. Po 14 dnu vyhodnocování u kmene Pm6 byly výsledky rozdílné, po substrátu TS následovaly



substráty MALT, PDA, SLA, SDA, YM, CMA. U kmene Pk4 byly výsledky téměř shodné jako po 7 dni vyhodnocování, pouze substrát MALT se v řadě posunul – TS, SLA, YM, MALT, PDA, SDA, CMA. Po 21 jsou výsledky opět rozdílné, kmen Pm6 – TS, MALT, SLA, YM, SDA, CMA, PDA. Kmen Pk4 – TS, YM, SLA, MALT, CMA, SDA, PDA.

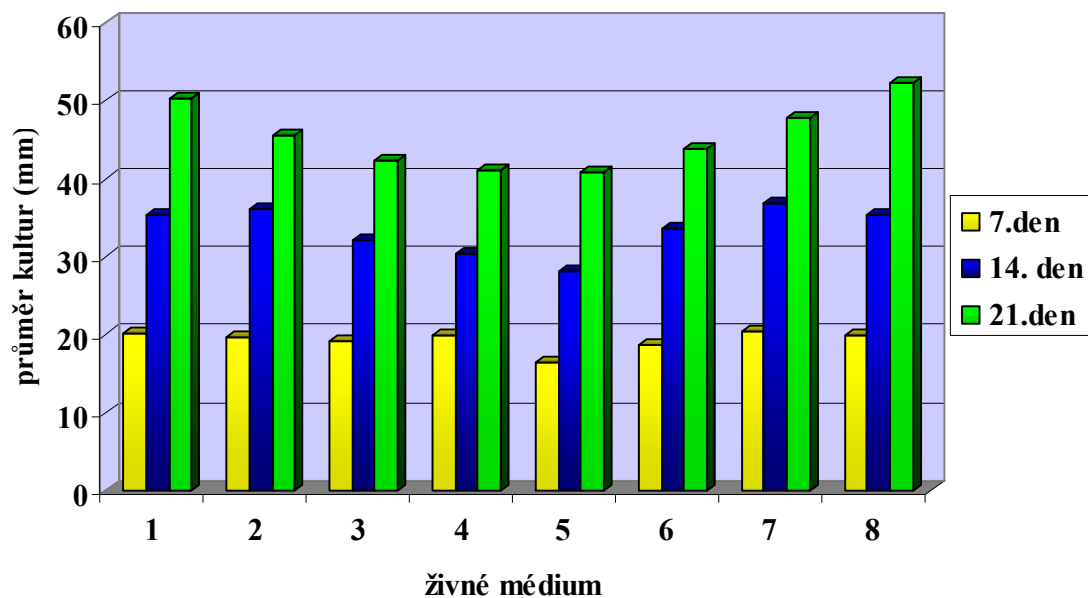
Pokus č.2. Radiální růst středových kultur *B. bassiana* kmenů Pm9, Pk5 po 7, 14 a 21 dnech na půdách o různém složení.

Cílem testu bylo zjištění průměru středových kultur vyprodukovaných při kultivaci hub na půdách s rozdílným poměrem C a N. Zjišťování rozměrů bylo prováděno po 7,14 a 21 dnech.

Tabulka 9. Radiální růst středových kultur Bba Pm9 na půdách o různém složení - průměry porostlé plochy v mm po 7, 14 a 21 dnech.

Médium	Průměr kultur v mm ±STD		
	7.den	14. den	21.den
1	20,125 ±1,436	35,375 ±2,015	50,375 ±1,796
2	19,750 ±0,288	36,125 ±1,652	45,500 ±2,483
3	19,125 ±0,853	32,125 ±2,015	42,375 ±3,473
4	20,000 ±0,707	30,375 ±1,600	41,000 ±1,870
5	16,500 ±0,707	28,125 ±0,853	40,750 ±1,554
6	18,750 ±1,500	33,500 ±1,354	43,875 ±2,174
7	20,500 ±1,000	36,750 ±2,986	47,750 ±1,258
8	19,875 ±0,629	35,250 ±0,957	52,250 ±1,258
Statistické údaje	F=6,874951 p=0,000155 DF=7, 24	F= 11,43376 p=0,000003 DF=7, 24	F= 16,79833 p=0,000000 DF=7, 24

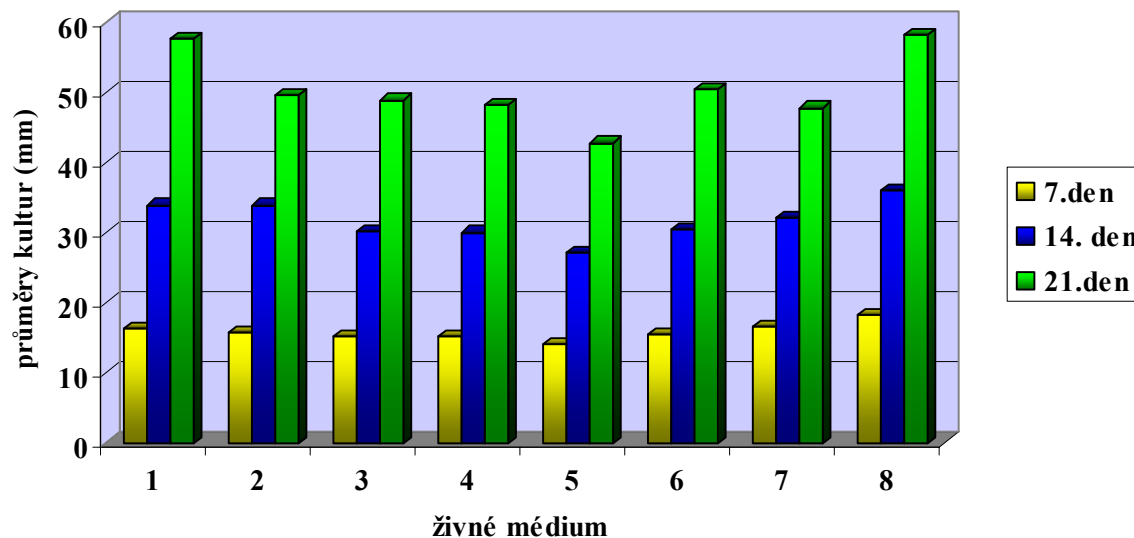
Graf č.3: Radiální růst středových kultur Bba Pm9 na půdách o různém složení - průměry porostlé plochy v mm po 7,14 a 21 dnech.



Tabulka 10. Radiální růst středových kultur Bba Pk5 na půdách o různém složení po 7,14 a 21 dnech.

Médium	Průměr kultur v mm ±STD		
	7.den	14. den	21.den
1	16,250 ±0,645	33,875 ±1,376	57,500 ±4,983
2	15,750 ±0,500	33,875 ±3,449	49,500 ±2,081
3	15,250 ±0,500	30,125 ±1,108	48,875 ±1,701
4	15,250 ±1,190	30,000 ±3,488	48,125 ±2,393
5	14,000 ±0,816	27,125 ±2,015	42,750 ±0,645
6	15,500 ±0,707	30,500 ±1,290	50,500 ±1,471
7	16,625 ±0,946	32,125 ±1,250	47,750 ±0,288
8	18,125 ±0,250	35,875 ±0,250	58,125 ±1,796
Statistické údaje	F=10,46996 p=0,000006 DF=7, 24	F= 7,254179 p=0,000105 DF=7, 24	F= 19,24852 p=0,000000 DF=7, 24

Graf č.4: Radiální růst středových kultur Bba Pk5 na půdách o různém složení po 7,14 a 21 dnech.



Půda č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Pepton/glukóza	10/10	10/20	10/30	10/40	5/40	10/40	15/40	20/40

#### Zhodnocení pokusu:

Vyhodnocení je po 7, 14 a 21 dni sestaveno hierarchicky od nejlepšího k nejhoršímu. Po 7 dni je u kmene Pm9 projevila jako nejlepší půda č. 1 pak následují půdy č.7, 4, 8, 2, 3, 6 a jako nejhorší půda č.5. Po 14 dni je jako nejlepší vyhodnocena půda č. 7 a poté následují půdy č. 2, 1, 8, 6, 3, 4 a jako nejhorší půda č.5. Po 21 dni je vyhodnocena jako nejlepší půda č. 8 následují půdy č. 1, 7, 2, 6, 3, 4 a opět je vyhodnocena jako nejhorší půda č.5.

U kmene Pk4 se jako nejlepší půda projevila půda č.8 a to ve všech třech měření. Jako nejhorší půda se projevila půda č. 5 a to opět ve všech třech měřeních. 7 den vyhodnocování po půdě č.8 následují půdy č. 7, 1, 2, 6, 3, 4. Po 14 dnu jsou to půdy č.1, 2, 7, 6, 3, 4 a po 21 dni půdy č.1, 6, 2, 3, 4, 7.

#### 4.2. Produkce konidií entomopatogenních hub na povrchu agarizovaných živných médií

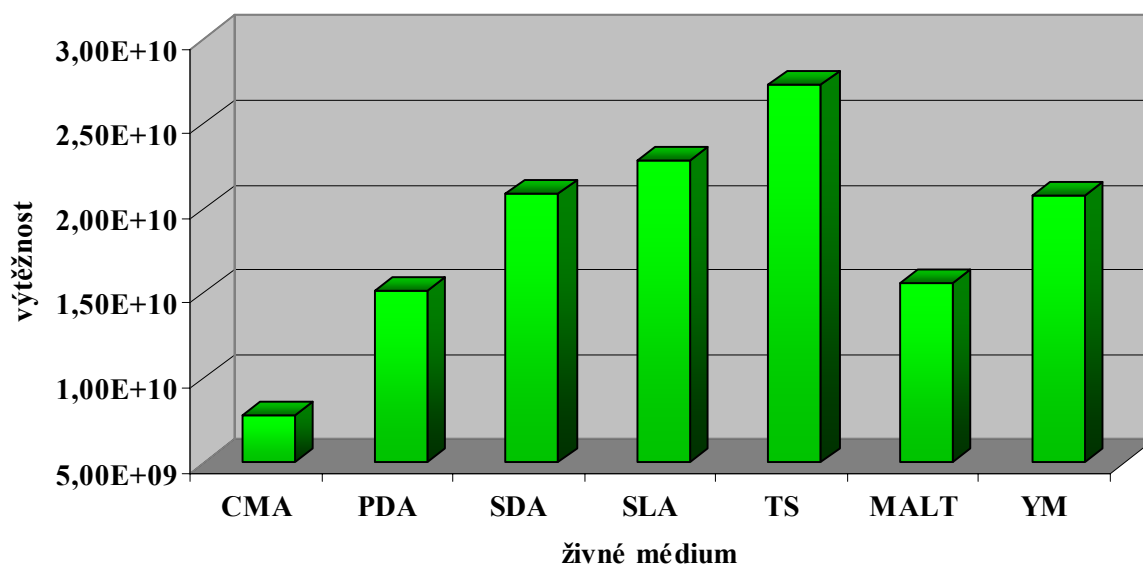
Pokus č. 3. Výtěžnost *B. bassiana* kmene Pm6 a Pk4 na různých živných půd.

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých typech živných půd.

Tabulka 11. Výtěžnost *B. bassiana* kmen Pm6 na různých typech živných půd (konidií/1 kultura)

Médium	CMA	PDA	SDA	SLA	TS	MALT	YM
Výtěžnost	$7,75 \times 10^9$	$1,51 \times 10^9$	$2,09 \times 10^{10}$	$2,28 \times 10^{10}$	$2,73 \times 10^{10}$	$1,56 \times 10^{10}$	$2,08 \times 10^{10}$

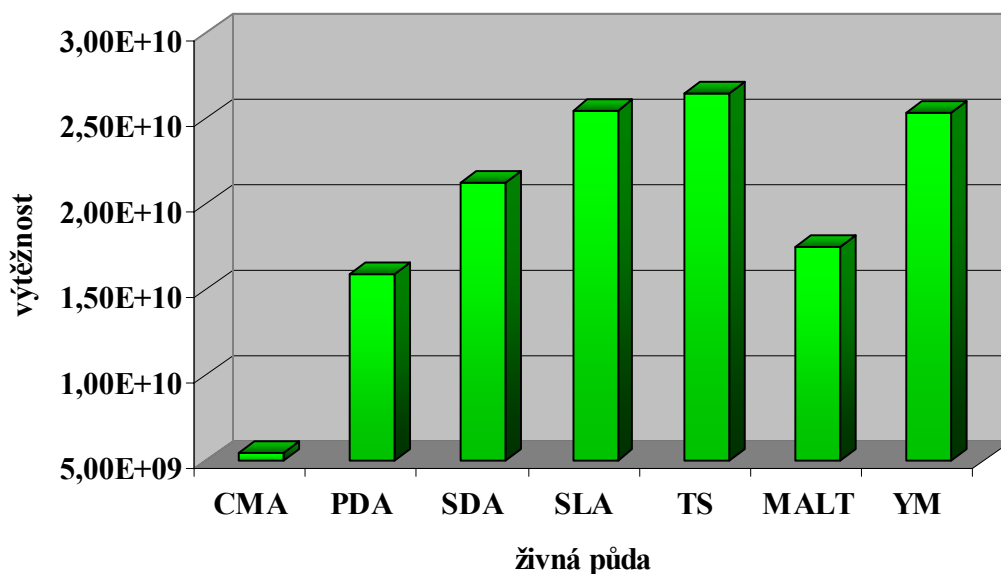
Graf č.5: Výtěžnost Bba Pm6 na různých typech živných půd (konidií/1 kultura)



Tabulka 12. Výtěžnost *B. bassiana* kmen Bba Pk4 na různých živných půdách (konidií/1 kultura)

Médium	CMA	PDA	SDA	SLA	TS	MALT	YM
Výtěžnost	$5,50 \times 10^9$	$1,60 \times 10^{10}$	$2,13 \times 10^{10}$	$2,54 \times 10^{10}$	$2,65 \times 10^{10}$	$1,75 \times 10^{10}$	$2,54 \times 10^{10}$

Graf č.6: Výtěžnost Bba Pk4 na různých živných půdách (konidií/1 kultura)



*Zhodnocení pokusu:*

U kmene Bba Pm6 se jako nejlepší živná půda projevil substrát TS. U kmene Bba Pk4 byl také jednoznačně vyhodnocen jako nejlepší substrát TS. Jako jednoznačně nejhorší živný substrát, na kterém bylo dosahováno nejnižších výtěžností u obou kmenů byl vyhodnocen substrát CMA. U kmene Pm6 byla výtěžnost živné půdy TS o 62,8 % vyšší než u živné půdy CMA. U kmene Pk tomu bylo o 79,25 %.

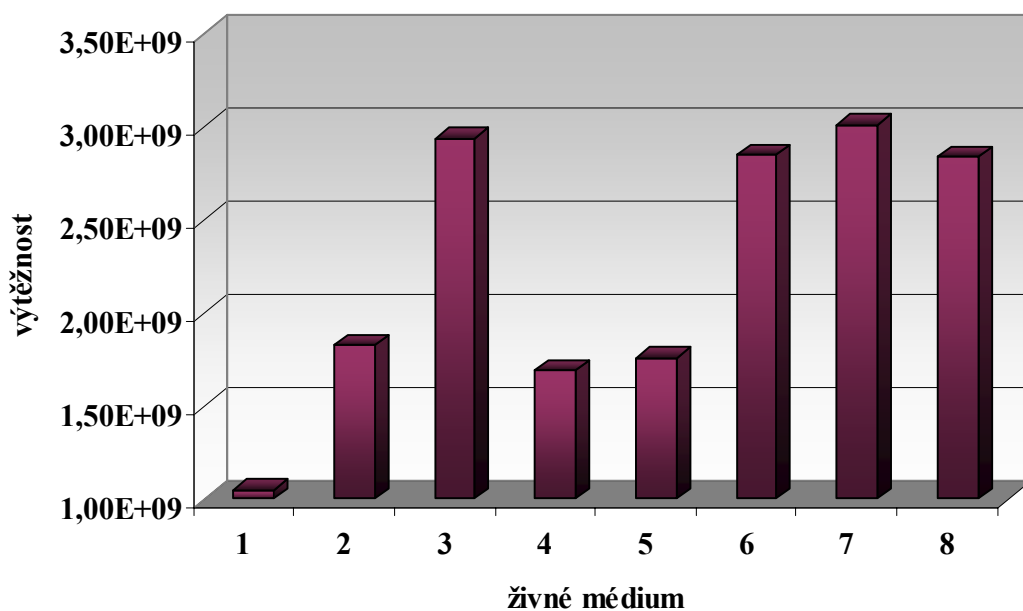
Pokus č.4. Výtěžnost *B. bassiana* kmenů Pm9 a Pk5 na živných půdách o různém složení.

Cílem tohoto testu bylo zjistit produkci spor entomopatogenní houby *B. bassiana* na půdách, které měly různý poměr C:N.

Tabulka 13: Výtěžnost *B. bassiana* kmen Bba Pm9 na půdách o různém složení (konidií/1 kultura).

Médium	1	2	3	4	5	6	7	8
Výtěžnost	1,05x10 <sup>9</sup>	1,83 x10 <sup>9</sup>	2,94 x10 <sup>9</sup>	1,69 x10 <sup>9</sup>	1,76 x10 <sup>9</sup>	2,85 x10 <sup>9</sup>	3,01 x10 <sup>9</sup>	2,84 x10 <sup>9</sup>

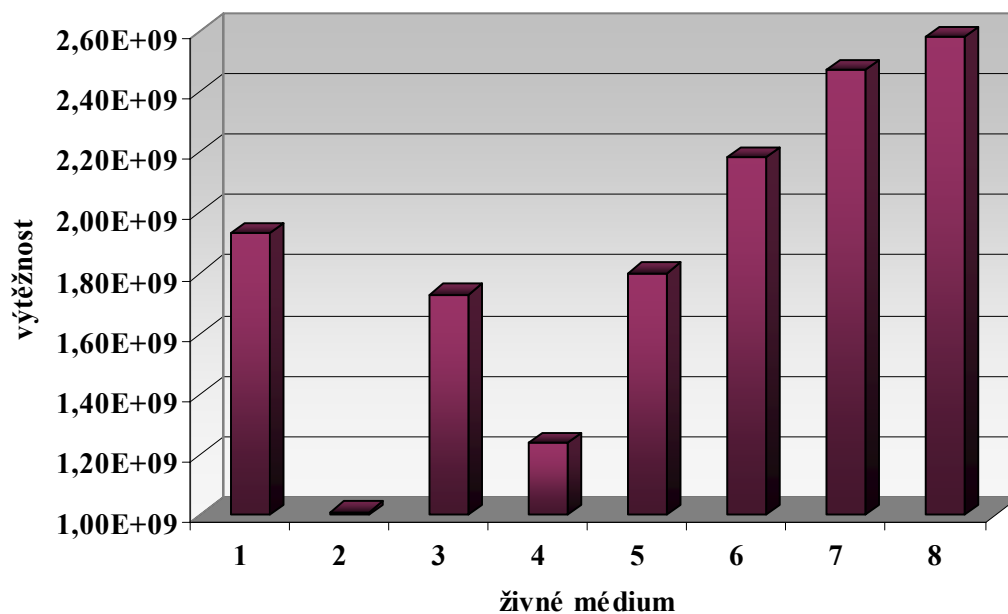
Graf č.7: Výtěžnost Bba Pm9 na půdách o různém složení (konidii/1 kultura).



Tabulka 14. Výtěžnost *B. bassiana* Bba Pk5 na půdách o různém složení (konidii/1 kultura).

Médium	1	2	3	4	5	6	7	8
Výtěžnost	1,93x10 <sup>9</sup>	1,01x10 <sup>9</sup>	1,73x10 <sup>9</sup>	1,24x10 <sup>9</sup>	1,80x10 <sup>9</sup>	2,18x10 <sup>9</sup>	2,47 x10 <sup>9</sup>	2,58x10 <sup>9</sup>

Graf č.8: Výtěžnost Bba Pk5 na půdách o různém složení.



#### Zhodnocení pokusu:

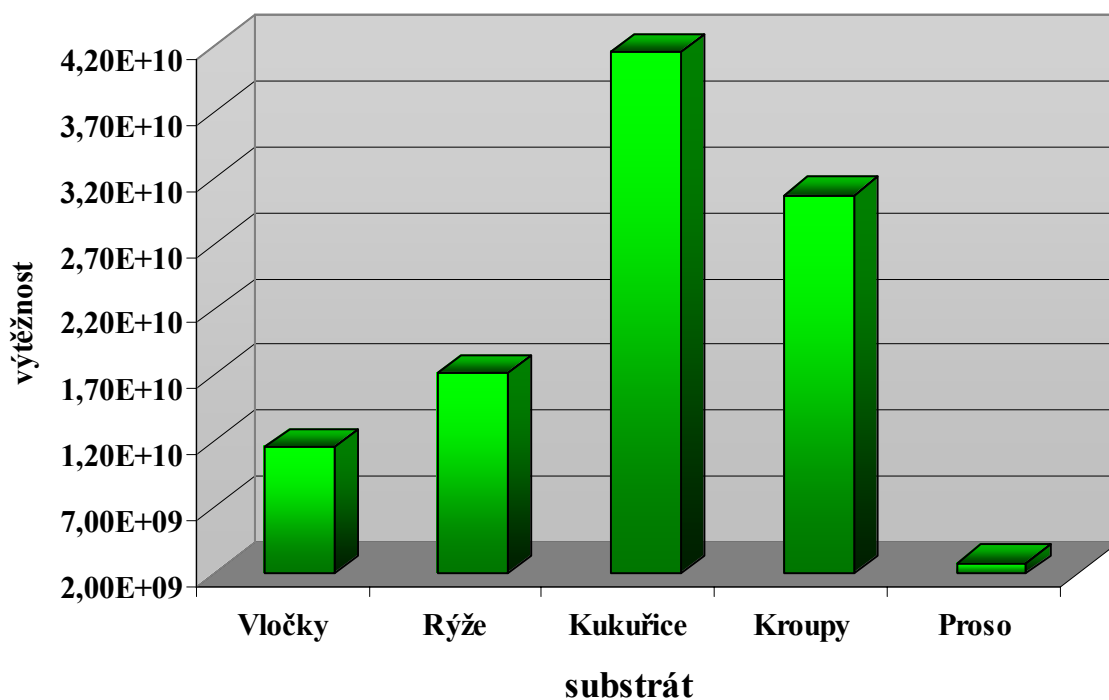
U kmene Bba Pm9 se jako nejlepší živná půda projevila půda č.7. U kmene Bba Pk5 byla jednoznačně vyhodnocena jako nejlepší živná půda č.8. Jako jednoznačně nejhorší živná půda, na které bylo dosahováno nejnižších výtěžností byla vyhodnocena u kmene Pm9 půda č.1 a u kmene Pk5 půda č.2.

#### 4.3. Produkce konidií entomopatogenních hub na přirozených substrátech

Pokus č.5. Výtěžnost *B. bassiana* kmene M408 na partikulách různých přirozených substrátů (kroupy, proso, kukuřice, rýže a vločky).

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor na pevných substrátech po 14 dnech kultivace.

Graf č.9: Výtěžnost kmene Bba M408 při kultivaci na různých substrátech.



Tabulka 15. Výtěžnost *B. bassiana* kmen Bba M408 při kultivaci na různých substrátech.

substrát	Vločky	Rýže	Kukuřice	Kroupy	Proso
výtěžnost	$1,16 \times 10^{10}$	$1,72 \times 10^{10}$	$4,16 \times 10^{10}$	$3,07 \times 10^{10}$	$2,82 \times 10^9$

*Zhodnocení pokusu:*

Jako nejlepší pevný substrát pro kultivaci entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene M408 byla vyhodnocena kukuřice. Naopak jako nejhorší pevný substrát bylo prokazatelně vyhodnoceno proso. Výtěžnost na substrátu kukuřice byla o 93,22 % vyšší než u prosa.

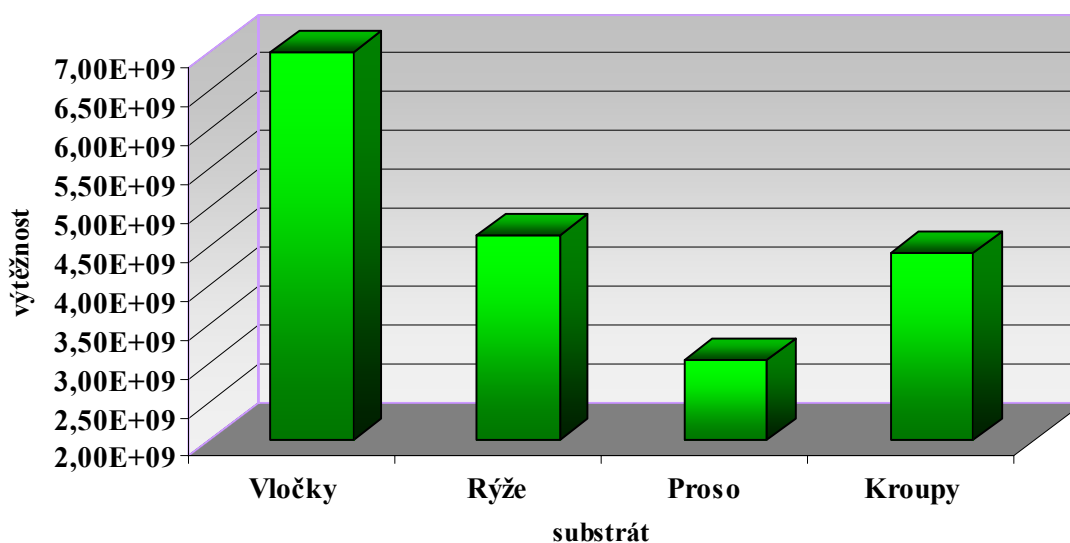
Pokus č.6. Stanovení výtěžnosti *L. lecanii* na různých pevných substrátech (kroupy, rýže, proso a vločky).

Cílem toho testu bylo zjištění produkce spor, kdy byl přirozený substrát přelit suspenzí o titru  $9,95 \times 10^6$ . Výtěžnost byla stanovována po 7 a 14 dnech.

Tabulka 16. Výtěžnost *L. lecanii* na různých substrátech po 7 dnech.

Substrát	Vločky	Rýže	Proso	Kroupy
Výtěžnost	7,00E+09	4,65E+09	3,03E+09	4,40E+09

Graf č. 10: Výtěžnost *L. lecanii* na různých substrátech po 7 dnech.

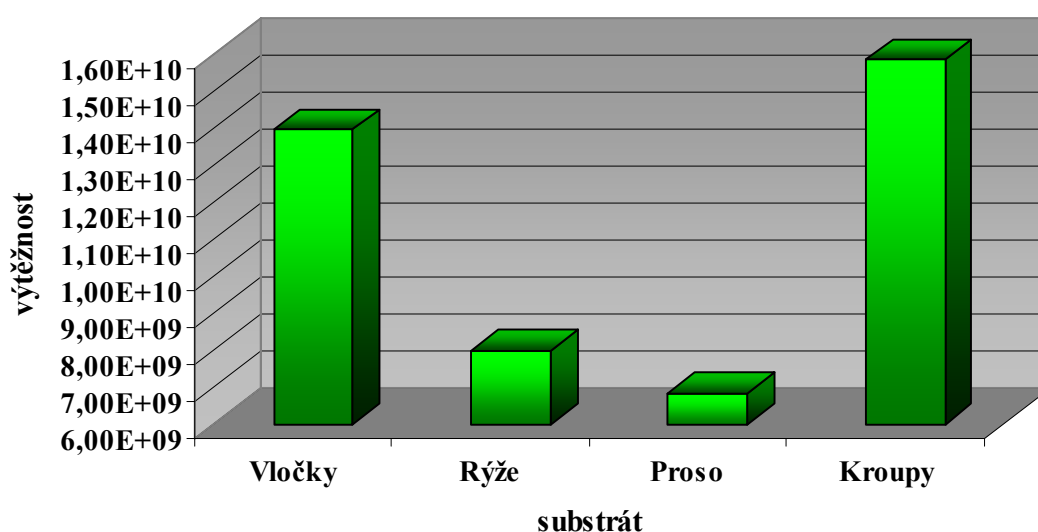




Tabulka 17 : Výtěžnost *L. lecanii* na různých substrátech po 14 dnech.

Substrát	Vločky	Rýže	Proso	Kroupy
Výtěžnost	$1,39 \times 10^{10}$	$7,98 \times 10^9$	$6,83 \times 10^9$	$1,58 \times 10^{10}$

Graf č.11: Výtěžnost *L. lecanii* na různých substrátech po 14 dnech.



#### Zhodnocení pokusu:

Nejlepších výsledků po sedmi dnech bylo dosahováno na pevném substrátu vloček a nejhorších výsledků bylo dosahováno na pevném substrátu prosa, kdy výtěžnost na vločkách byla o 57 % vyšší než na prosu. Po čtrnácti dnech bylo opět vyhodnoceno jako nejhorší pevný substrát proso, ale jako nejlepší pevný substrát byly tentokrát vyhodnoceny kroupy. Výtěžnost bylo u krup o 57 % vyšší než u prosa.

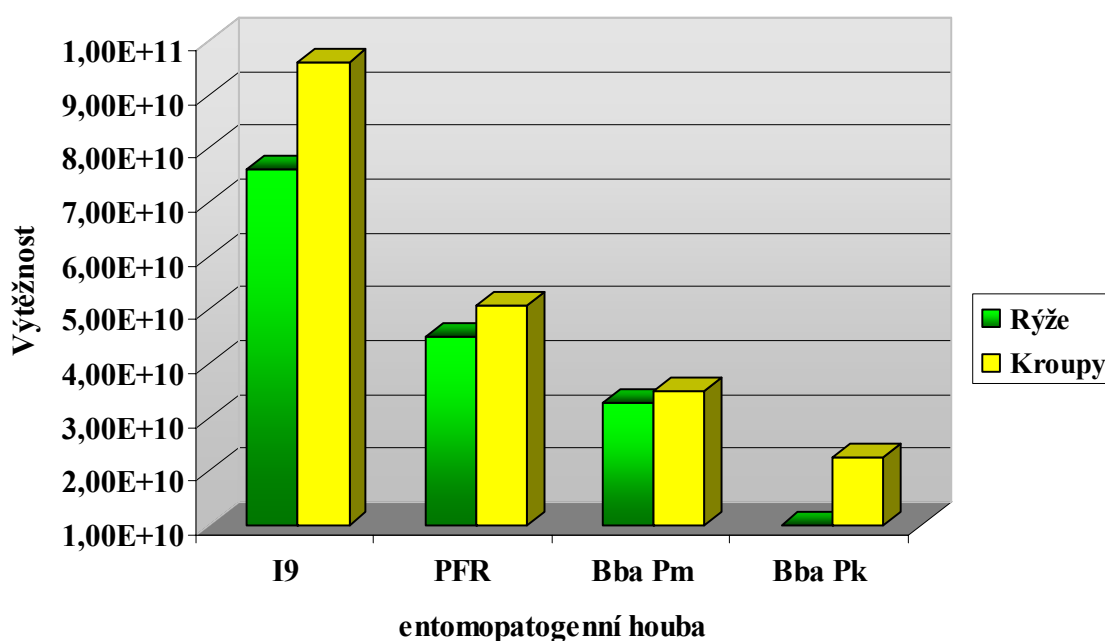
Pokus č.7. Stanovení produkce spor *L. lecanii*, *B. bassiana* a *P. fumosoroseus* při povrchové kultivaci na kroupách a rýži.

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor entomopategenních hub, kdy byl přirozený substrát přelit suspenzí o známém titru: *L. lecanii* -  $2,45 \times 10^6$ , *P. fumosoroseus*-  $5,85 \times 10^6$ , *B. bassiana* Pk-  $8,25 \times 10^5$  a *B. bassiana* Pm -  $2,28 \times 10^6$ .

Tabulka 18. Výtěžnost entomopatogenních hub na substrátu krup a rýže.

Druh - kmen	Rýže	Kroupy
<i>L. lecanii</i>	$7,63 \times 10^{10}$	$9,61 \times 10^{10}$
<i>P. fumosoroseus</i>	$4,49 \times 10^{10}$	$5,09 \times 10^{10}$
<i>B. bassiana Pm</i>	$3,26 \times 10^{10}$	$3,50 \times 10^{10}$
<i>B. bassiana Pk</i>	-	$2,25 \times 10^{10}$

Graf č.12: Výtěžnost entomopatogenních hub na substrátu krup a rýže.



*Zhodnocení pokusu:*

Nejvyšší výtěžnosti bylo dosahováno na kroupách u houby *L. lecanii* kmene I9. Tato výtěžnost byla o 47 % větší než u kmene PFR P9, o 64 % větší než u kmene Bba Pm a o 77 % větší než u kmene Bba Pk. U rýže bylo opět nejlépe vyhodnoceno *L. lecanii*. U tohoto kmene bylo dosahováno větší výtěžnosti než u kmene PFR o 41,2 % a než u kmene Bba Pm o 57,3 %.

#### 4.4. Ověření nízkoobjemové produkce entomopatogenních hub

Pokus č. 8. Produkce konidií houby *M. anisopliae* kmen Man P4 při kultivaci na ječných kroupách

Cílem pokusu bylo ověřit standardnost produkce konidií houby *M. anisopliae* připovrchové kultivaci na sterilních ječných kroupách. Pokus byl realizován opakovaně (3 šarže) v různých objemech (400-700 g krup). Po 10 denní kultivaci byly konidie smyty a výtěžnost byla vyhodnocena přepočtem na 1 g substrátu a zároveň i s ohledem na další kvantitativní parametry. Základní suspenze byla odstředěna a zahuštěný koncentrát konidií byl vyhodnocen obdobně jako základní suspenze.

Tabulka 19. Povrchová kultivace entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* kmen Man P4 (substrát – sterilní ječné kroupy)

Parametr produkce	1. šarže	2. šarže	3. šarže
Substrát (g)	400	700	500
Základní suspenze (ml)	2000	4000	2000
Titř suspenze - Konidií/1ml	$2,10 \times 10^8$	$2,42 \times 10^8$	$2,73 \times 10^8$
Celkem konidií	$4,20 \times 10^{11}$	$9,68 \times 10^{11}$	$5,46 \times 10^{11}$
Výtěžnost konidií /1g substrátu	$1,05 \times 10^9$	$1,38 \times 10^9$	$1,09 \times 10^9$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ konidií/1ml (l)	420	968	546
Konidiový koncentrát (ml)	500	1000	600
Titř koncentrátu (konidií/1ml)	$7,91 \times 10^8$	$8,82 \times 10^8$	$8,34 \times 10^8$
Celkem konidií v koncentrátu	$3,96 \times 10^{11}$	$8,82 \times 10^{11}$	$5,01 \times 10^{11}$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ konidií/1ml (l)	396	882	500
Výtěžnost koncentrátu (%)	94,17	91,12	91,66

*Zhodnocení pokusu:*

Tři šarže houby *Metarhizium anisopliae* kmen Man P4 v objemech 400-700 g byly vyprodukovány na levném a snadno dostupném substrátu (sterilní ječné kroupy). Výtěžnost konidií přesahovala  $1,0 \times 10^9$  konidií z 1 g krup, což reprezentuje základní orientační poměr 1 g substrátu = 1 litr suspenze o titru  $1,0 \times 10^6$  konidií / 1 ml. Při zpracování základní suspenze do formy koncentrátu došlo ke ztrátám nepřesahujícím 10%.

Tabulka 20. Povrchová kultivace entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 (substrát – sterilní ječné kroupy)

Parametr produkce	1. šarže	2. šarže	3. šarže
Substrát (g)	600	600	800
Základní suspenze (ml)	2000	2000	3000
Titř suspenze - konidií/1ml	$1,82 \times 10^8$	$2,06 \times 10^8$	$1,96 \times 10^8$
Celkem konidií	$3,64 \times 10^{11}$	$4,12 \times 10^{11}$	$5,88 \times 10^{11}$
Výtěžnost konidií/1g substrátu	$6,07 \times 10^8$	$6,87 \times 10^8$	$7,35 \times 10^8$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ konidií /1ml (l)	364	412	588
Konidiový koncentrát (ml)	300	400	600
Titř koncentrátu (konidií/1ml)	$1,12 \times 10^9$	$9,82 \times 10^8$	$9,24 \times 10^8$
Celkem konidií v koncentrátu	$3,36 \times 10^{11}$	$3,93 \times 10^{11}$	$5,54 \times 10^{11}$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ konidií/1ml (l)	336	393	554
Výtěžnost koncentrátu (%)	92,39	95,34	94,30

*Zhodnocení pokusu:*

Tři šarže houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 v objemech 600-800 g byly vyprodukovány na sterilních ječných kroupách. Výtěžnost konidií dosahovala úrovně v rozmezí  $6,07- 7,35 \times 10^8$  konidií z 1 g krup, což reprezentuje základní orientační poměr 1 g substrátu = 700 ml suspenze o titru  $1,0 \times 10^6$  konidií / 1 ml. Při zpracování základní suspenze do formy koncentrátu došlo ke ztrátám nepřesahujícím 8 %.

## 5. DISKUZE A ZÁVĚRY

Entomopatogenní houby jsou dnes často využívány v biologické ochraně rostlin k potlačení výskytu řady škůdců. Cílem této diplomové práce bylo ověření možnosti využití nízkokapacitních biotechnologií zaměřených na produkci uniformní biomasy vybraných kmenů entomopatogenních hub pomocí povrchové kultivace na umělých živných půdách a přirozených substrátech.

Již dříve byly některé kmeny testovány podobnými pokusy. Cílem bylo získat informace o možnosti jejich kultivace pomocí jednoduchých nízkoobjemových technologií. S výsledky těchto předešlých pokusů byly srovnávány výsledky dosažené v této práci.

Kamp a Bidochka (2002) se ve své práci zabývali hodnocením základních růstových parametrů hub *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* a *Beauveria bassiana* (kmen Bb 252; USDA kolekce entomopatogenních kultur, Ithaca, NY) a obdobně jako v této diplomové práci využili pro parametrizaci kmenů standardní laboratorní testy - radiální růst a výtěžnost konidií. V některých metodických aspektech se sice liší (výsledky hodnotili po 14 dnech - v mém pokusu je tomu po 7, 14 a 21 dnech; používali stejná média, kromě živného média TS; kultury byly kultivovány po dobu 14 dní při teplotě 27 °C a při fotoperiodě 12/12.), nicméně výsledky jejich studií lze konfrontovat s výsledky této práce.

Produkce spor je ovlivněna složením kultivačního média, což má za následek variabilitu jak v počtu vyprodukovaných spor, tak i ve velikosti středové kultury (Grendene *et al.* 2002; Kamp, Bidochka 2002). Kamp, Bidochka (2002) zaznamenali 14 den po inokulaci kmene 252 houby *B. bassiana* na různé vrstvy vybraných živných médií významné rozdíly ve velikosti středových kultur. Nejmenší středovou kulturu vytvořil kmen 252 kultivovaný na 3 mm vrstvě živného média CMA, naopak největší středové kultury (o velikosti 50 mm) byly zaznamenány na živných půdách MEA (malt extrakt agar = SLA v české verzi) a NA (nutrient agar). Nejintenzivnější radiální růst byl zaznamenán na povrchu YPDA (yeast peptone dextrose agar), kde kultury dosahovaly průměru až 60 mm. Současně byla zaznamenána i korelace mezi radiálním růstem a vrstvě živného média.

Srovnáme-li výše uvedené výsledky s výsledky dosaženými v pokusu č.1 zjistíme, že kmen Bba (Pm6) dosahuje nižších průměrů středových kultur na stejných živných půdách v porovnání s velikostmi kultur uvedených v předchozí studii. Konkrétní hodnoty jsou: SDA -

32,7 mm, MALT - 36,8 mm, CMA - 24,8 mm, YM - 32,2 mm , PDA -36,6 mm. Fenomén vlivu vrstvy živné půdy na radiální růst sledován nebyl. Z výsledků lze předpokládat, že rozdíly v obou studiích jsou způsobeny kultivací dvou odlišných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*. Mezi jednotlivými kmeny entomopatogenních hub je zjištěna velká variabilita ve sledovaných parametrech (Fargues *et al.* 1997b; McCoy *et al.* 1988).

Kamp a Bidochka (2002) zjistili, že při kultivaci houby *B. bassiana* na PDA byla pozorována nejvyšší produkce konidií ( $21,84 \times 10^7$ ) ve srovnání s ostatními komerčně dostupnými živnými půdami. Na živné půdě CMA vyprodukoval kmen  $3,29 \times 10^7$  konidií v 1 ml. Na ostatních živných půdách vyprodukoval kmen výrazně nižší počet konidií (MALT -  $1,89 \times 10^7$ , SDA -  $0,97 \times 10^7$ , YM -  $0,06 \times 10^7$ ). Kamp a Bidochka (2002) dále zaznamenali, že rozdílné hodnoty ve výtěžnosti konidií *B. bassiana* mohou být ovlivněny i výškou vrstvy živného média v Petriho misce. Nejvyšší produkci konidií zaznamenali na 2 mm vrstvě PDA ( $2,2 \times 10^6$  konidií na  $\text{mm}^2$ ), zatímco na 4 mm vrstvě PDA dosahovala výtěžnost houby *B. bassiana* pouze  $7,83 \times 10^5$  konidií na  $\text{mm}^2$ . Tento jev pravděpodobně souvisí s tím, že při použití tenčí vrstvy živné půdy má houba nedostatek živin, což obvykle stimuluje konidiogenezi.

V pokusu č. 3 byly obdobně zjišťována produkce konidií ze středových kultur rostoucích na různých typech živných médií. Obě studie se od sebe lišily v době sklizně konidií. Produkce konidií v diplomové práci byla hodnocena po 21 dnech. Nejvyšší koncentrace konidií byla získána ze středové kultury na živné půdě MALT, kde výtěžnost dosahovala  $2,9 \times 10^8$  konidií v 1 ml. Na ostatních živných půdách vyprodukoval kmen téměř o 1 řád nižší počet konidií (SDA -  $4,4 \times 10^7$ , CMA -  $1,7 \times 10^7$ , YM -  $4,2 \times 10^7$ , PDA -  $3,6 \times 10^7$ ).

V dalších pokusech byl porovnáván růst středových kultur a výtěžnost konidií kmenů Bba Pm a Bba Pk entomopatogenní houby *B. bassiana* na živných médiích o různém poměru zdroje dusíku (pepton) a uhlíku (glukózy). Při hodnocení vlivu zdrojů C a N byly zjištěny velmi výrazné rozdíly jak ve velikosti kolonií (radiální růst) tak i v produkci konidií. Největší středové kultury vytvořily oba kmeny na půdě s nejvyšším obsahem C i N (C:N – 20g:40g) (58,1 mm – Bba Pm a 52,3 mm - Bba Pk) a s nejnižším obsahem C i N (C:N – 10g:10g) (57,5 mm – Bba Pm a 50,4 mm - Bba Pk). Kmen Bba Pk vyprodukoval ve srovnání s kmenem Bba Pm i největší množství konidií na živných půdách s tímto složením. Naopak nejmenší středové kultury obou kmenů byly zaznamenány na živných půdách s nejnižším obsahem peptonu (5g) a nejvyšším množstvím glukózy (40g). Nejnižší produkce konidií ze středové kultury kmene Bba Pm byla zjištěna na

živné půdě s obsahem C:N v množství 10g:10g a u kmene Bba Pk byla zaznamenána nejnižší výtěžnost konidií ze středová kultury na půdě s obsahem 20g uhlíkatého zdroje a 10g dusíkatého zdroje.

Dále byly v diplomové práci provedeny studie zaměřené na produkci konidií kmenů různých druhů entomopatogenních hub na vybraných přirozených substrátech. Produkce spor byla porovnávána na přirozeném substrátu - kukuřici, rýži, prosu, ovesných vločkách a ječných kroupách. V první fázi byly parametry produkce konidií stanovovány v rámci přesných laboratorních testů na individuálních partikulích jednotlivých druhů substrátu (100 partikulí). Z výsledků vyplývá, že největší množství konidií vyprodukoval kmen M408 houby *B. bassiana* na partikulích kukuřice. Vysoká produkce konidií byla zaznamenána i při kultivaci kmene na ječných kroupách, zatímco na vločkách a rýži byla zjištěna nižší produkce. Nejmenší počet konidií vyprodukoval kmen M048 kultivovaný na prosu. Výtěžnost konidií z partikulí prosa byly výrazně nižší ve srovnání s výtěžností konidií z kukuřice. Landa (1994) uvádí, že produkčním limitem (s ohledem na množství produkovaných konidiospor) v principu není živný substrát, ale spíše charakter substrátu. Při inokulaci vícevrstevného substrátu (např. sterilní rýžová zrna) probíhá mohutná sporulace na kultuře rostoucí na povrchu substrátu, uvnitř substrátu převažuje myceliální masa. Tento fenomén pravděpodobně odráží spíše prostorové požadavky patogena. Nízká produkce konidií na povrchu partikulí prosa je pravděpodobně způsobena tím, že povrch semen prosa je ve srovnání s povrchem kukuřice mnohonásobně menší.

Samuels a Coracini (2004) se zabývali možnostmi produkovat entomopatogenní houbu *B. bassiana* na přirozeném substrátu - rýži. Konidiovou suspenzí houby *B. bassiana* inokulovali 25 g rýže a po 15 dnech kultivace získali z 1g substrátu  $1,84 \times 10^8$  konidií. Obdobné množství konidií z 1g rýže bylo získáno v pokusu č.7. Na 1 g rýže byla zaznamenána produkce s hodnotou  $1,72 \times 10^8$  konidií.

V následných studiích bylo množství vyprodukovaných konidií ověřováno pomocí nízkoobjemových produkcí. Pro pokusy byly vybrány kmeny dalších entomopatogenních hub *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* a *Metarhizium anisopliae*. Produkce konidií testovaných hub byla stanovena na jednotku substrátu (1 g). Po inokulaci většího množství přirozených substrátů (100 g) vyplývá, že největší množství vyprodukovaných konidií bylo zjištěno z 1 g krup ( $1,58 \times 10^{10}$ ). Z 1 g ovesných vloček bylo získáno nižší množství  $1,39 \times 10^{10}$

konidií. Nejmenší množství konidií v přepočtu na 1 g bylo vyprodukováno na přirozeném substrátu – rýži ( $7,98 \times 10^9$ ) a prosa ( $6,83 \times 10^9$ ).

Z dalších studiích zaměřených na ověření nízkoobjemové produkce vyplývá, že ječné kroupy představují univerzální substrát, který je obecně vhodný přirozený substrát pro produkci všech vybraných entomopatogenních hub.

Hlavní výsledky diplomové práce lze stručně shrnout do následujících bodů a konstatování:

1. Všechny testované druhy mitosporických entomopatogenních hub lze snadno kultivovat pomocí jednoduchých nízkoobjemových technologií při využití levných živinných zdrojů.
2. Velikost středových kultur i produkce konidií je ovlivněna složením standardních živných médií resp. živných médiích s různým zdrojem C:N (glukózy:peptonu).
3. Produkce uniformní biomasy entomopatogenních hub je reálná a pro produkci lze využívat relativně levné přirozené substráty (rýže, kroupy, ovesné vločky, proso, kukuřice).
4. Ječné kroupy představují univerzální substrát, který je obecně vhodný, levný a snadno dostupný pro produkci všech vybraných entomopatogenních hub.
5. Výsledky DP naznačují možnost využít obdobné kultivační a produkční postupy pro produkci uniformní biomasy hub určené pro použití v biologické ochraně rostlin, zejména pak v systémech integrované produkce nebo v ekologickém zemědělství.



## 6. SEZNAM LITERATURY

- Ainsworth G.C., 1973: Introduction and keys to higher taxa, Vol. IV.A: 1-7, in: Ainsworth G.C., Sparrow F.K., Sussman A.S., (Eds.) *The Fungi – An Advanced Treatise. Academic Press, New York.*
- Altre J.A., Vandenberg J.D., Cantone F.A., 1999: Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73 (3): 332-338.
- Arthurs S., Thomas M.B., 2001: Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78 (2): 59-65.
- Bergman J.M., Tingey W.M., 1979: Aspects of interaction between plant genotypes and biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 25: 275-279.
- Boethel D.J., Eikenbary R.D., 1986: Interactions of Plant Resistance and Parasitoids and Predators of Insects. *Ellis Horwood, Chichester, 224 pp.*
- Butt T.M., 2002: Use of Entomopathogenic Fungi for the Control of Insect Pests. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): *The Mycota XI.-Agricultural Applications. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 111-134.*
- Butt T.M., Goettel M.S., 2000: Bioassays of Entomopathogenic Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.*
- Butt T.M., Segers R.J., Leal S.C.M., Kerry B.R., 1998: Variation in the subtilisins of fungal pathogens of insects and nematodes. In: Bridge P., Couteaudier Y., Clarkson J. (Eds.): *Molecular Variability of Fungal Pathogens. CAB International, Wallingford, UK, 149-169.*
- Dangar T.K., Geetha L., Jayapal S.P., Pillai G.B., 1991: Mass production of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* in coconut water wasted from copra making industry. *Journal of Plantation Crops*, 19, 1(1): 54-69.
- Dirnbeková O., 1991: Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.). *Studie VTR, ÚVTIZ, Řada rostlinná výroba, 11:10-21.*
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H., 1980: Compendium of soil fungi. Vol. 1. *Academic Press, New York, 859.*

- Driver F., Milner R.J., 1998: PCR Applications to the Taxonomy of Entomopathogenic Fungi. *In*: Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander R.P., (Eds.): Applications of PCR in Mycology. *CAB International, Wallingford, UK, 153-186.*
- 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.*
- Dufour R., 2001: Biointensive integrated pest management (IPM). *Attra*, [cit. 2006-05-03], available on <http://attra.ncat.org/attra-pub/PDF/ipm.pdf>.
- Elliot S.L., Sabelis M.W., Janssen A., van der Geest L.P.S., Beerling E.A.M., Franssen J., 2000: Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology Letters, 3: 228-235.*
- 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., Rougier M., Goujet R., Smith N., Coustere Ch., Itier B., 1997a: Inactivation of Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by Near-Ultraviolet (UVB and UVA) and Visible Radiation. *Journal of Invertebrate Pathology, 69: 70-78.*
- Fargues J., Goettel M.S., Smith N., Ouedraogo A., Rougier M. 1997b: Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia, 83(3): 383-392.*
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.C., 1994: Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Science and Technology, 4: 3-34.*
- Gindin G., Geschtovt N.U., Raccach B., Barash I., 2000: Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica, 28 (3): 229-239.*
- Goettel M.S., Inglis G.D., 1997: Fungi: Hyphomycetes. *In*: Lacey L.A. (Eds): Manual of techniques in insects pathology. *AP London, 213-249.*
- 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.*
- Gopalakrishnan C., Anusuya D., Narayanan K., 1999: In vitro production of conidia of entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus* (Holmskiold) Brown and Smith. *Entomon., 24(4): 389-392.*

- Gottwald T.R., Tedders W.L., 1982: Study on the conidia release by the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) from adult pecan weevil (Coleoptera, Curculionidae) cadavers. *Environmental Entomology*, 11: 1274 - 1279.
- Grajek W., 1994: Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. *Folia-Microbiologica*. 1994, 39(1): 29-32.
- Grimm C., 2001: Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop-Protection*. 2001, 20(7): 623-630.
- Grendene A., Minardi P., Giacomini A., Squartini A., Mariano P., 2002: Characterization of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*: comparison between moréno-physiological and molecular analyse. *Mycological Research*, 106 (7):796-807.
- Hall R.A., 1981: The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges H.D. (Ed.): Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. *Academic Press, London*, 483-498.
- Humber R.A., 1997: Fungi: Identification. In: Lacey L.A. (Ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. *Academic Press, London*, 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*, 185-201.
- Charnley A.K., 1989: Mycoinsecticides: present use and future prospects. In: *Progress and prospects in insect control. BCPC Monograph 43:165-181.*
- Charnley, A.K., 1984: Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: Anderson, J.M., Rayner, A.D.M., Walton, D.W.H. (Eds.): *Invertebrate-Microbial Interactions. Cambridge University Press. Cambridge*, 229-270.
- Ibrahim Y.B., Low W., 1993: Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest-Management*. 39(3): 288-292.
- 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.

- Inglis G.D., Johnson D.L., Goettel M.S., 1996: Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 6 (1): 35-50.
- Kamp A.M., Bidochka M.J., 2002: Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Mikrobiology*, 35: 74-77.
- Keller S., Kessler P., Schweizer C., 2003: Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 48 (3): 307-319.
- Krips O.E., Willems P.E.L., Dicke M., 1999: Compatibility of host plant resistance and biological control of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* in the ornamental crop *Gerbera*. *Biological Control* 16: 155 - 163.
- Landa Z., 1998: Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *Agro*, 10: 7 – 12.
- Landa Z., 1994: Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin. Habitační práce, ZF JU, České Budějovice, 96.
- Landa Z., Jiranová R., 1988: A laboratory improvement of entomopatogenic fungi and use of selected strains in IPM programme for greenhouse cucumbers. *Annual Report Agric. University, České Budějovice*, 95.
- Landa Z., Bobková P., Bohatá A., 2002: Rostlinolékařská terminologie 13. Biologická ochrana. *Plant Protection Science*, 38 (3), I-XXXIV.
- Lopez E.V., Chavarria H.N., Fernandez S.P., Torre M., 2000: Fermentation processes for bioinsecticide production - An overview. *Recent Research Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 3:1-20.
- McCoy C.W., Hill A.J., Kanavel R.F., 1975: Large-scale production of the fungal pathogen *Hirustella thompsonii* in submerged culture and its formulation for application in the field. *Entomophaga*, 20:229-240.
- McCoy C.W., Samson R.A., Boucias D.H., 1988: Entomogenous fungi. In: Ignoffo C.M. (Ed.): CRC Handbook of Natural Pesticides. *CRC Press, Boca Raton*, 5: 151 – 236.
- Meeke E.T.M., Fransen J.J., van Lenteren J.C., 2002: Pathogenicity of *Ashersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 81: 1-11.

- 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. 5<sup>th</sup> Int. Colloquium on Invertebrate Pathology and Biological Control, Adelaide, Australia*, 386-390.
- Papierok B., Hajek A.E., 1999: Fungi – Entomophthorales. *In: Lacey L.A. (Ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, Chapter V, 2: 188-212.*
- Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E., Steinraus D.C., 2001: Biology, Ecology and Pest Management Potential of Entomophthorales. *In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 71-153.*
- Rani O.P.R., Susamma-Mathai S., 1999: Mass production of entomogenous fungus *Fusarium pallidoroseum* (Cooke) Sacc in naturally available solid and liquid media. *Insect Environment*. 5(2): 59-60.
- Rod J., Hluchý M., Zavadil K., Prášil J., Somssich I., Zacharda M., 2005: Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy. *Biocont laboratory, s.r.o., Brno, 392.*
- Roy H.E., Pell J.K., 2000: Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 737-752.
- Samson R.A., 1974: *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6:1- 43.
- Samson R.A., Evans H.C., Latgé J.P., 1988: Atlas of Entomopathogenic fungi. *Springer Berlin Heidelberg, New York, 187.*
- Samšišňáková A., Kálalová S., Vlček V., Kybal J., 1981: Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 169-174.
- Samšišňáková A., 1963: Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* (Bals.-Cril.) Vuill. a její submersní kultivace. Doktorská disertační práce, Entomologický ústav ČSAV, Praha, 128 s.
- Sosa-Gomez D.R., Boucias D.G., Nation J.L., 1997: Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezera viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69: 31-39.

- 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*, 319-387.
- Váňa J., 1998: Systém a vývoj hub a houbových organismů. Skriptum, Karolinum, Praha, 111.
- Van Driesche R.G., Bellows T.S., 1993: Steps in Classical Biological Control. *Thomas Say Publications in Entomology, ESA, Lanham, MD, USA*.
- Vanninen I., Tyni-Juslin J., Hokkanen H., 2000: Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in finnish agricultural soils. *Biocontrol*, 45 (2): 201-222.
- Vega F.E., Dowd P.F., McGuire M.R., Jackson M.A., Nelsen T.C., 1997: *In vitro* effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 70 (3): 209-213.
- Vestergaard S., Butt T.M., Bresciani J., Gillespie A.T., Eilenberg J., 1999: Light and Electron Microscopy Studies of the Infection of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7: 25-33.
- Vilcinskas A., Götz P., 1999: Parasitic fungi and their Interactions with the Insect Immune System. *Institute of Zoology, Free University of Berlin, Königin-Luise, Germany*, 270-274.
- Vyas R.V., Yadav D.N., Patel R.J., 1991: Mass production of entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* on solid substrates. *Indian Journal of Experimental Biology*. 29(8): 795-797.
- Weiser J., 1966: Houbové onemocnění hmyzu. In: Weiser J. (Ed.): Nemoci hmyzu. *Academia, Praha*, 232 – 234.
- Weiser J., 1991: Mikrobiální insekticidy. In: Hrdý I. (Ed.): Biopesticidy v zemědělství. *MZe ČR, Praha*, 30-43.
- Wraight S.P., Carruthers R.I., Bradley C.A., Jaronski S.T., Lacey L.A., Wood P., Galaini-Wraight S., 1998: Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71 (3): 217-226.
- Wright S.P., Carruthers R., 1999: Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests in field crops. In: Biopesticides – use and delivery. Hall F.R., Menn J.J. (Eds.), *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 233-270.

Zvára J., Tábořský V., Kohout V., Zelený J., Šula J., Landa Z., Oborník, M. 1998: Fytofarmacie.  
*Zemědělská fakulta JU, České Budějovice, 125.*

## 7. PŘÍLOHY – GRAFICKÉ LISTY



Grafický list 1. Testování vlivu složení živné půdy na radiální růst a produkci konidií jednotlivých druhů entomopatogenních hub.



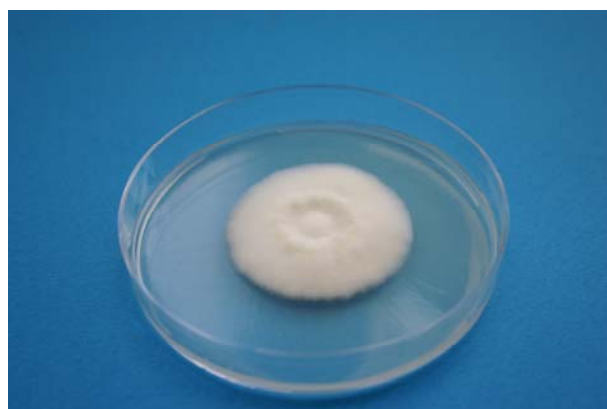
*B. bassiana* – kmen Bba Pk4 (PDA)



*B. bassiana* – kmen Bba Pk5 (PDA)



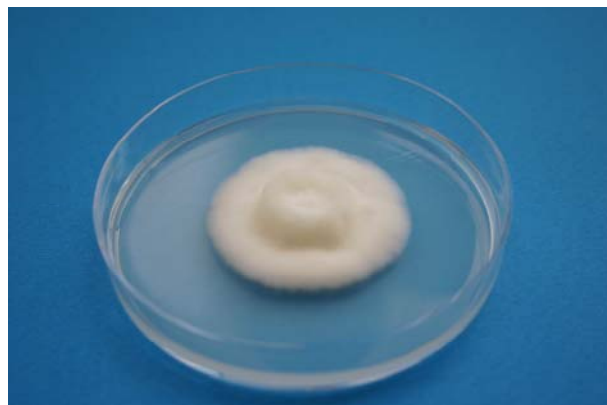
*B. bassiana* – kmen Bba Pm6 (PDA)



*B. bassiana* – kmen Bba Pn6 (PDA, profil)



*B. bassiana* – kmen Bba M408 (PDA)



*B. bassiana* – kmen Bba M408 (PDA)

*Pomocí standardních in vitro testů byl sledován vliv složení živných půd na radiální růst a sporulaci středových povrchových kultur různých druhů (kmenů) entomopatogenních hub. Bylo prokázáno, že složení živných půd oba parametry ovlivňuje velmi výrazně a tak při testování vlivu poměru donorů C a N, tak i při porovnání standardních mykologických živných půd, které jsou ve formě polotovarů dostupné na českém trhu.*

Grafický list 2. Fotodokumentace k experimentům zaměřeným na produkci konidií houby *Paecilomyces fumosoroseus* na povrchu přirozených substrátů



Porovnání povrchového růstu *P. fumosoroseus* na povrchu zrn rýže, pšenice, prosa a ječných krup



*P. fumosoroseus* plně spirálující na povrchu zrn rýže – detail povrchu substrátu



Produkce konidií houby *P. fumosoroseus* na povrchu sterilní rýže v nízké vrstvě v PVC krabici – 100 g přirozeného substrátu



*P. fumosoroseus* plně spirálující na povrchu zrn rýže – detail povrchu substrátu



Produkce konidií houby *P. fumosoroseus* na povrchu sterilní rýže ve vyšší vrstvě v PVC pytlíku – 200 až 400 g přirozeného substrátu

*Při kultivaci entomopatogenních hub na povrchu přirozených substrátů lze využít různé produkční postupy mající jeden společný princip – kultivace hub na povrchu sterilních substrátů inokulovaných suspenzí matečného kmene. V pokusech bylo prokázáno, že kvalita substrátu ovlivňuje výtěžnost konidií podstatně významněji než vlastní postup a forma kultivace. V pokusech bylo zároveň ověřeno, že pomocí jednoduchých a levných postupů lze produkovat i poměrně značené množství velmi vitálních konidií.*