

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Z e m ě d ě l s k á f a k u l t a



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**KOMPATIBILITA VYBRANÝCH DRUHŮ ENTOMOPATOGENNÍCH
HUB S PARAZITOIDEM ENCARSIA FORMOSA**

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Specializace: Rostlinolékařství

Vedoucí práce: prof. ing. Zdeněk Landa, CSc.

Autor: Kristýna Štěpánová

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

.....
Kristýna Štěpánová

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

Dále děkuji pracovním Katedry rostlinné výroby, oddělení ochrany rostlin, Marii Nýdlové a Olze Divišové za pomoc a technickou asistenci při zakládání pokusů.

Zvláště bych chtěla poděkovat mé rodině za všestrannou podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu studia na vysoké škole.

Kristýna Štěpánová

OBSAH

1. ÚVOD	2
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1. Entomopatogenní houby	3
2.2. Klasifikace entomopatogenních hub	3
2.3. Obecná charakteristika vztahů entomopatogenních hub k hostitelům	5
2.4. Vývojový cyklus entomopatogenních hub - Deuteromycotina	6
2.5. Vliv prostředí na vývoj entomopatogenních hub	9
2.6. Nejvýznamnější rody a druhy entomopatogenních hub – Deuteromycotina	10
2.7. Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub	12
2.7.1. Rod <i>Aschersonia</i>	12
2.7.2. Rod <i>Beauveria</i>	17
2.7.3. Rod <i>Metarhizium</i>	18
2.7.4. Rod <i>Paecilomyces</i>	20
2.7.5. Rod <i>Lecanicillium</i>	22
2.8. Biologická ochrana proti molicím - entomopatogenní houby	24
2.9. Biologická ochrana proti molicím - parazitoidi a predátoři	25
2.10. <i>Encarsia formosa</i>	28
3. MATERIÁL A METODIKA	35
3.1. Druhy entomopatogenních hub používané v pokusech	35
3.2. Příprava konidiové suspenze	36
3.3. Chov parazitoida <i>Encarsia formosa</i> používaného v pokusech	36
3.4. Chov molice skleníkové (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>) používané v pokusech	36
3.5. In vitro testy	36
3.6. In vivo testy	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	41
4.1. Standardní laboratorní test – GI	41
4.2. Standardní laboratorní biotest – FDGI	45
4.3. Standardní laboratorní biotest – FDGI	52
4.4. Standardní biotest využívající tritrofický systém	58
5. ZÁVĚR A DISKUSE	65
6. SEZNAM LITERATURY	69
7. PŘÍLOHY	74

1. ÚVOD

V ochraně rostlin pěstovaných v konvenčních systémech jednoznačně převažuje aplikace syntetických pesticidů. Opakovaná velkoplošná používání těchto pesticidů vede k celé řadě negativních jevů. Mnohdy dochází k nevhodným, opakovaným aplikacím, k zasažení necílových organismů, ke kontaminaci prostředí a následné kumulaci reziduí ve vodě, v půdě, v rostlinách a živočišných organismech, k pronikání reziduí do potravních řetězců.

Vývoj účinných látek je dlouhodobý a finančně velmi náročný. Cílem vývoje je eliminovat výše uvedená rizika. S rozšiřováním poznatků o působení účinných látek, vzrůstá povědomí o riziku aplikace pesticidů. Zároveň jsou zpřesňovány a dále propracovány jednotlivé systémy ochrany rostlin zahrnující též mechanické, agrotechnické, bioracionální a v neposlední řadě také biologické metody regulace populací škůdců. Také v definování a vymezení systémů ochrany rostlin dochází ke změnám a diverzifikaci, v případě integrované ochrany rostlin došlo v průběhu doby k vymezení „konvenční integrované ochrany rostlin“ a tzv. „biointenzivní“. Biointenzivní integrovaná ochrana se odklání od vzorců konvenční ochrany rostlin a od využívání chemické ochrany směrem k biologickým metodám regulace populací škůdců.

V současné době vystupují při regulaci populací škodlivých organismů do popředí principy trvale udržitelných systémů, jejichž nedílnou součástí je respektování ochrany životního prostředí, krajiny a zdraví lidí. Jednou z cest snahy o snížení cizorodých látek do prostředí je využití přirozených vztahů mezi organismy. Parazitace, predace, saprotrofismus a ostatní vztahy se běžně vyskytují v agroekosystémech, často však zůstávají skryty pozornosti člověka.

Zejména v posledních letech se v biologické ochraně prosazují biologické přípravky na bázi patogenních mikroorganismů. Mezi tyto mikroorganismy patří entomopatogenní viry, bakterie, entomoparazitické hlístice a entomopatogenní houby. Tato diplomová práce je zaměřena na studium vedlejších účinků vybraných druhů entomopatogenních hub na interakční systém „parasit – hostitel“, s cílem naznačit úroveň vzájemné (in)kompatibility. Pro tuto studii byl – jako modelový – vybrán interakční systém zahrnující parasitoida *Encarsia formosa* a významného škůdce skleníkových plodin molice skleníkovou *Trialeurodes vaporariorum*.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. 1. Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou nejdéle známé 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 symbionty. Růst a vývoj entomopatogenních hub je velmi výrazně limitován abiotickými faktory, zejména relativní vzdušnou vlhkostí (dále r.v.v.) a teplotou. Zejména úzká závislost na r.v.v. výrazně predeterminuje autekologické charakteristiky a epizootické mechanismy entomopatogenních hub v biocenózách a agrobiocenózách.

2. 2. Klasifikace entomopatogenních hub

Vyšší taxony hub prošly celou řadou revizí. Ještě v uplynulém desetiletí byly nejčastěji a obecně používané následující vyšší taxony: *Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes* (Fungi Imperfecti, např. Gäumann 1964 podle Landa 1994). Z několika odlišných revizí se pro klasifikaci entomopatogenních hub nejvíce ujal upravený klasifikační systém Ainswortha (Ainsworth 1973). V tomto klasifikačním systému jsou nejvyššími taxony hub *Myxomycota* a *Eumycota*. V *Myxomycota* jsou zastoupeny houby vytvářející plasmodiální formy. V *Eumycota* pak druhy, které zpravidla vytváří 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 zastoupena v *Zygomycotina* (*Zygomycetes: Entomophthorales*), v *Ascomycotina* (*Pyrenomycetes: Sphaeriales; Laboulbeniomyces: Laboulbeniales*) a v *Deuteromycotina* (*Hyphomycetes: Moniliales*), (Landa 1994). Umělá pomocná skupina *Deutromycotina* je členěna na pomocné třídy, řády, čeledi a rod pouze na základě morfologické podobnosti nepohlavního rozmnožování, nikoli podle vývojového systému (Váňa 1996). Z hlediska praktické biologické ochrany mají dominantní význam zástupci několika klíčových rodů *Deuteromycetes* (*Hyphomycetes: Moniliales*), (Landa 1998). V následujících tabulkách je uveden přehled hlavních taxonů hub spolu s rody, ve kterých jsou zastoupeny druhy entomopatogenní (McCoy et al. 1988; Samson et al. 1988) ,(Landa 1994).

Tabulka 1. Přehled klasifikace entomopatogenních hub (Landa 1994)

Subphylum	Classis	Ordo	Genus
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Coclomycidium</i> <i>Myiophagus</i>
	Chytridiomycetes	Blastocladales	<i>Coelomomyces</i>
	Oomycetes	Leganidiales	<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>
Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Blastotendrion</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Mycoderma</i> <i>Saccharomyces</i>
		Ascophaerales	<i>Ascophaera</i>
		Sphaeriales	<i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i> <i>Nectria</i> <i>Hypocrella</i> <i>Calonectria</i>
	Laboulbeniomycetes	Laboulbeniales	<i>Filariomyces</i> <i>Hesperomyces</i> <i>Trenomycetes</i>
	Loculoascomycetes	Myriangiales	<i>Myriangium</i>
	Loculoascomycetes	Pleosporales	<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>Paraisaria</i>
			<i>Pleurodemosporea</i>
<i>Polycephalomyces</i>			
<i>Pseudogibellula</i>			

	Coelomycetes	Sphaeropsidales	<i>Sorospora</i> <i>Sporothrix</i> <i>Stilbella</i> <i>Tilachlidium</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Lecanicillium</i> <i>Aschersonia</i> <i>Tetranacrium</i>
Mycelia sterilia			<i>Aegerita</i>
Basidiomycotina	Phragmo-basidiomycetes	Septobasidiales	<i>Filobasidiella</i> <i>Septobasidium</i> <i>Uredinella</i>

2. 3. Obecná charakteristika vztahů entomopatogenních hub k hostitelům

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 sporami nebo konidiiemi (*Zygomycotina*), konidiiemi nebo blastosporami (*Deuteromycotina*), zoosporami (*Mastigomycotina*) a askosporami (*Ascomycotina*). V některých případech byla zjištěna iniciace nákazy i jinými infekčními propagulemi (sklerotia, sporochia), (McCoy et al. 1988), (Landa, Oborník 1997). Vstupní branou infekce je převážně kutikula hmyzu. V některých případech proniká patogen do těla hostitele prostřednictvím přirozených otvorů (ústní orgány, tracheální systém, řitní otvor). Transovariální přenos hub nebyl doposud prokázán s výjimkou *Coelomycidum stimulii* u muchniček a v případě některých mutualistických kvasinek (Tarrant, Soper 1986).

Entomopatogenní houby parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu. Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na druzích patřících do řádů ploštice (*Hemiptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*) (Landa 1998). 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). Parazitická valence entomopatogenních se pohybuje v rozmezí od druhové specializace (některé druhy z Entomophthorales) až po širokou polyfagii (Deuteromycotina). Většina druhů široce polyfágních entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus*, *Lecanicillium lecanii* a další) může obecně parazitovat na velmi širokém spektru hostitelů. S širokou polyfagií je často spojena tvorba druhově identických nicméně značně různorodých kmenů (izolátů), které mohou vykazovat i úzkou

hostitelskou specializací (McCoy et al. 1988). Typickým příkladem je tvorba velmi specifických patotypů u polyfágních hub *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *L. lecanii*, u kterých je hostitelské spektrum kmene výrazně predeterminováno druhem hostitele, z kterého byl konkrétní patotyp izolován (Fargues 1976). Druhovú specifitu entomopatogenních hub ve vztahu k hostitelům je nejčastěji podmíněna fyziologickým stavem hostitele, vlastnostmi kutikuly hostitelského druhu a nutritivní specializací (nároky) patogena (McCoy et al. 1988). Druhovú specifitu entomopatogenních hub je nepřímo ovlivněna i abiotickými faktory, které jsou typické pro ekologickou niku hostitele. V komplexu interakcí, které podmiňují šíří spektra hostitelských druhů hrají významnou úlohu i obranné systémy hostitele. Z obranných systémů hmyzu se v obraně proti houbovým nákazám nejčastěji uplatňují tři typy obranných reakcí, které byly pozorovány v hmyzím hemocelu: 1) fagocytóza, 2) buněčná enkapsulace a 3) humorální enkapsulace (např. Charnley 1984).

2. 4. Vývojový cyklus entomopatogenních hub - Deuteromycotina

Vývoj každého z druhů entomopatogenních hub má svá logická specifika, která jsou souhrnem interspecifických vztahů v konkrétním systému "patogen - hostitel". Nicméně, entomopatogenní houby mají charakter konzervativní skupiny patogenů a na souhrn jejich interakcí s hostiteli lze aplikovat obecný model. Vývoj těchto hub na hostitelích lze rozdělit do tří fází, které zahrnují primární interakce mezi patogenem a hostitelem a vývoj patogena od prvního kontaktu s hostitelem do ukončení vývojového cyklu:

1. Přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele
2. Penetrace patogena kutikulou do tělní dutiny hostitele, interní proliferace a vytváření povrchové myceliální sítě (parazitická fáze vývojového cyklu)
3. Vývoj patogena až do fáze produkce nových konidií (saprophytická fáze vývojového cyklu)

Šíření konidií a mechanismus zajišťující primární kontakt konidií s hostitelem jsou procesy zpravidla nahodilé, které jsou ve většině případů zprostředkovány pomocí abiotických faktorů. K šíření konidií nejčastěji dochází větrem nebo vodou (déšť, pohyb vody v půdě, vodní páry). Častým mechanismem šíření houbových nákaz v populacích hostitelů je kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo tzv. autodisseminací, při které dochází k šíření nákazy uvnitř populace v souvislosti s vnitropopulačními procesy (McCoy et al. 1988; Landa 1998). Doposud je známo jen málo příkladů šíření konidií entomopatogenních hub pomocí biotických vektorů (např. roztoči, hád'átky a hmyzem). Jedním z příkladů šíření houbové nákazy prostřednictvím dalšího článku v epizootickém řetězci je šíření hub z rodu *Aschersonia* v populacích molíc v

citrusových výsadbách prostřednictvím mykofágních roztočů z rodu *Acalvolia* (Osborne, Landa 1992).

Vlastní proces adheze konidie k povrchu těla hostitele je procesem pasivním, ve kterém sehrává klíčovou úlohu povrchová struktura konidií. Konidie některých druhů entomopatogenních hub jsou pro fázi primárního kontaktu s hostitelem vybaveny želatinovým nebo mucilagenním povrchem, pomocí kterého vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hned při prvním kontaktu (např. *Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii* aj.) (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 hydrofobními povrchy (konidie – kutikula hmyzu), pomocí elektrostatických sil nebo molekulárními interakcí mezi látkami, které jsou přítomny jak na povrchu konidií tak na povrchu kutikuly hostitele (McCoy et al. 1988). Z látek, které byly zjištěny na povrchu konidií nebo kutikuly hostitele se při primární adhezi uplatňují např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny, steroly a polární lipidy (Landa 1998). Specifická výbava konidií a fyzikálně chemické parametry kutikuly hostitele vytvářejí prekondici možnému vzniku nákazy a jsou klíčovými prvky v patogenezi entomopatogenních hub. Rozdíly v povrchové struktuře a biochemickém složení konidií jsou nejčastěji zjišťovány při rozlišování různých patotypů téhož druhu patogena (Boucias et al. 1988; Tanada, Kaya 1993). S adhezí přímo souvisí i klíčení konidií. Některé povrchové substance na konidiích a kutikule hostitele se účastní jak adheze tak i indukce klíčivosti konidií (např. glykoproteiny a celý komplex uhlohydrátů), (Boucias, Pendland 1984).

Klíčení konidií je prvou aktivní fází interakce patogena s hostitelem. Většina druhů entomopatogenních hub produkuje konidie dostatečně vybavené k vyklíčení bez nutnosti přijímat externí živiny. Klíčení konidií tak převážně závisí na vnějších abiotických faktorech (r.v.v., teplota), méně pak na světelných podmínkách a na externích živinách. Klíčení konidií může být stimulováno nebo inhibováno některými látkami, které jsou přítomny na povrchu kutikuly hostitele nebo na konidii samotné. V první fázi klíčení dochází k výraznému zvětšení konidie (bobtnání) a ke komplexní přestavbě stěny konidie, po které následuje tvorba primárního klíčku. Od určité fáze naklíčení začíná primární klíček sloužit jako penetrující hyfa. V této fázi je již patogen zpravidla závislý na externím nutričním zdroji a dochází k utilizaci látek přítomných v kutikule hostitele (Boucias et al. 1988). Častým jevem spojeným s přeměnou klíčku na penetrující hyfu je tvorba apresorií. V místech kontaktu apresorií s kutikulou je běžně zaznamenávána výrazná enzymatická aktivita. Ze strany hostitele je průběh penetrace kutikuly invazní hyfou ovlivněn stavbou a složením kutikuly (stupeň sklerotizace, antifungální aktivita,

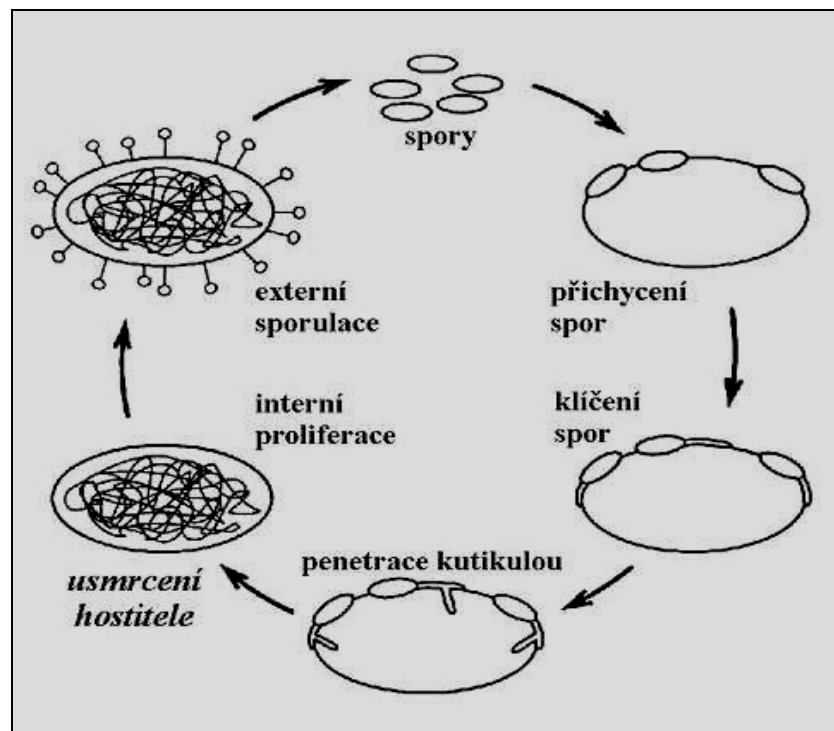
biochemické složení). Patogen uplatňuje při penetraci kombinaci biochemických (enzymy) a fyzikálně mechanických (tlak penetrující hyfy) prvků. V první fázi penetrace se více uplatňují biochemické prvky, v posloupných sekvencích jsou produkovány lipázy -> proteázy -> a chitinázy (Samšiňáková et al. 1977). Na koncích penetrujících hyf byly nejčastěji zjišťovány enzymy ze skupin proteáz, aminopeptidáz, lipáz, esteráz a N-acetyl-glucosamidáz (chitináz), (Ratault, Vey 1977). Koncová špička invazní hyfy proniká enzymaticky narušenou kutikulou hostitele a tlakem proráží kutikulu v enzymaticky narušeném místě penetrace. Častým místem penetrace jsou méně sklerotizované části na povrchu těla (Landa 1998).

Po penetraci invazní hyfy do tělní dutiny hostitele nastupuje vlastní parazitická fáze vývoje patogena. V této fázi vývojového cyklu patogen rychle kolonizuje tělní dutinu hostitele a využívá látky vázané v tělních tkáních (Weiser 1966). Za tímto účelem tvoří většina entomopatogenních hub různé typy heterogenních tenkostěnných tělísek (blastospory, kvasničná tělíska, hyfální tělíska a fragmenty), která se rychle množí pučením. Kromě těchto tělísek jsou v hemolymfě hostitelů často zjišťovány i volné protoplasty (Samson et al. 1988). Kromě formování uvedených typů tělísek je pro tuto fázi vývoje entomopatogenních hub typická i zvýšená produkce různých primárních a sekundárních metabolitů. Obecnou funkcí metabolitů je uvolňování a účast v procesu využívání živin z tkání hostitele (primární metabolity), potlačení imunitních obranných reakcí hostitele a vytváření prostředí nevhodného pro kolonizaci napadeného hostitele jinými druhy patogenních nebo saprofytických mikroorganismů (sekundární metabolity), (McCoy et al. 1988; Tanada, Kaya 1993). Interakce mezi hostitelem a patogenem mají převážně akutní charakter (nákaza končící usmrcením hostitele), poměrně výjimečně jsou chronické mykózy. Z uvedeného je zřejmé, že usmrcení hostitele patogenem je způsobeno 1) potravní deficiencí hostitele, 2) invazí patogena do tělních tkání hostitele a jejich destrukcí a 3) produkcí toxinů. Smrtí hostitele končí parazitická část cyklu a vývojový cyklus je uzavřen fází saprofytickou.

V saprotrofní fázi vývojového cyklu tvoří většina entomopatogenních hub myceliální masu uvnitř tělní dutiny usmrceného hostitele (mumifikace hostitele). Z myceliální masy pak na povrch těla mumifikovaného jedince prorůstá mycelium, na kterém se tvoří druhově specifické konidiofory, jejichž přítomnost signalizuje počátek poslední části vývojového cyklu patogena - konidiogenezi. V této fázi jsou nejpatrnější morfologické rozdíly mezi jednotlivými druhy entomopatogenních hub (konidiofor - tvar a velikost konidií - uspořádání konidií atd.). Druhy entomopatogenních hub vyskytujících se a působících převážně v půdě (např. *M. anisopliae*, *B. bassiana*) zpravidla vytvářejí husté povrchové mycelium tvořené krátkými hyfami a krátké konidiofory, na kterých jsou konidie produkovány v obrovské masě

po celém povrchu těla. Entomopatogenní houby parazitující na škůdcích nadzemních částí rostlin (např. *L. lecanii*, *P. fumosoroseus*) vytvářejí bohaté vzdušné mycelium, které se rozrůstá i do okolí usmrceného hostitele. Konidie jsou produkovány v útvarech, které usnadňují šíření nákazy kontaktem (mucilagenní hmotou pokryté balíčky konidií u *L. lecanii*) nebo šíření nákazy prostřednictvím vody a větru (silně hydrofobní konidie v dlouhých řetízcích u *P. fumosoroseus*), (Hall 1981; Osborne, Landa 1992; Tanada, Kaya 1993 a další).

Obrázek 1: Obecné schéma vývojového cyklu entomopatogenních hub (Landa 1998)



2. 5. Vliv prostředí na vývoj entomopatogenních hub

Vnější prostředí má na průběh infekce a vývoj patogena velmi výrazný vliv. V pořadí klesající relevance se nejvýrazněji uplatňují vlhkost a teplota, menší význam mají ostatní složky prostředí (složení a pohyb vzduchu, světlo a fotoperioda). Faktory prostředí ovlivňují zejména šíření konidií, klíčení 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 hub se pohybuje v rozmezí 20 – 30 °C. Klíčení konidií probíhá nejrychleji při teplotách okolo 25 °C. Konidie deuteromycet v dormantním stavu však snadno přežívají i dlouhodobé zmrazení a krátkodobě i teploty v rozmezí 45 – 55 °C (McCoy *et al.* 1988). Klíčovým faktorem prostředí je

vlhkost. Většina konidií entomopatogenních deuteromycet klíčí pouze při r.v.v. vyšší než 90 %, ale přímé smočení konidií ve vodě může klíčivost inhibovat (Landa 1994). Obdobně i v období sporulace výrazně stoupají nároky na vysokou r.v.v. a většina entomopatogenních hub dobře sporuluje pouze při r.v.v. nad 92,5 % (Walstad *et al.* 1970). V případě nevhodných vlhkostních poměrů v prostředí vytváří většina entomopatogenních hub uvnitř těla infikovaného hostitele rezistentní hyfy a saprofytickou fázi vývoje kompletizuje až při vhodných podmínkách. Nižší r.v.v. je v řadě případů výhodná pro fázi šíření konidií zejména pak u těch druhů hub, které produkují konidie s hydrofobním povrchem bez mucilagenního pokryvu (např. *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus* a jiné druhy hub), (Gottwald, Tedders 1982). V souhrnu interakcí "patogen - % r.v.v." se více prosazuje vliv mikroklimatu než hodnoty zjištěné v makroklimatickém okruhu. Příkladem jsou odlišné poměry na povrchu listu v místě přímé interakce "patogen - hostitel" než obecné hodnoty naměřené v okolním prostředí. V porovnání s ostatními faktory prostředí je vlhkost jednoznačně faktorem nejvýznamnějším (Landa 1994).

Přímý vliv světla na průběh infekce a vývoj entomopatogenních hub není doposud podrobně znám už z toho důvodu, že světelné parametry korelují s dominantními faktory (r.v.v.; teplota) a hodnotit odděleně účinek světla od těchto faktorů je poměrně složité. Světlo negativně ovlivňuje životnost konidií v prostředí zejména podílem paprsků UV spektra. Krátké ultrafialové paprsky mají výraznou fungicidní účinnost a ovlivňují životnost konidií v průběhu jejich šíření v prostředí, fázi vzniku nákazy a také klíčivost konidií. V některých případech bylo prokázáno, že světlo indukuje výrazně vyšší produkci konidií a také produkci některých doprovodných substancí (např. *A. aleyrodus*, viz podrobněji dále), (Landa *et al.* 1989; Osborne, Landa 1992). Většina druhů entomopatogenních hub, které se vyskytují v populacích škůdců na nadzemních částech rostlin vykazuje pozitivní fototaxi, která se projevuje v charakteru kultur na povrchu těla usmrceného hostitele. Orientace hyf v myceliu, postavení kondioforů a orientace nových konidií jsou vlivem světla silně ovlivněny (McCoy *et al.* 1988; Tanada, Kaya 1993).

2.6. Nejvýznamnější rody a druhy entomopatogenních hub – Deuteromycotina

V *Deuteromycotina* je zastoupena převážná část rodů/druhů entomopatogenních hub, které mají prakticky nebo potenciální význam v biologické ochraně rostlin. S ohledem na praktické využití jsou jednoznačně nejvýznamnější skupinou *Deuteromycet* druhy patřící do třídy *Hyphomycetes*, řádu *Moniliales*. Nákazy vyvolané těmito houbami se obecně nazývají „muskardiny“. Druhou nejvýznamnější skupinou entomopatogenních hub tvoří druhy patřící do řádu *Entomophthorales* (*Zygomycotina*; *Zygomycetes*). V porovnání s předchozí skupinou však jde převážně o obligátní patogeny hmyzu a jejich praktické využití naráží na problém umělých

kultivací. Většinu druhů patřících do *Entomophthorales* nelze kultivovat běžnými kultivačními metodami. Entomopatogenní houby z řádu *Entomophthorales* se proto prosazují jako přirozeně se vyskytující bioagens, které vyvolávají spontánní epizootie v populacích škůdců. V následující tabulce jsou uvedeny pouze vybrané rody a druhy nejvýznamnějších vláknitých entomopatogenních hub (Landa 1994).

Tabulka 2. Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub (Hyphomycetes, Moniliales), (Landa 1994)

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

Houby jsou nejčastější zaznamenanou skupinou patogenů. Dominantní postavení mají druhy zastoupené v řádech *Entomophthorales* (obligátně entomopatogenní houby) a *Moniliales* (převážně fakultativně entomopatogenní vláknité houby). Z rodů řádu *Entomophthorales* jsou nejvíce detekovány houby rodu *Entomophthora*, *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Neozygites*,

Zoophthora, *Erynia*, *Empusa* a *Culicicola*, z řádu *Moniliales* rody *Aschersonia*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Pleurodesmospora* (Poinar, Poinar 1998).

Tabulka 3. Klíč rodů nejznámějších akarifágních hub (Poinar a Poinar 1998)

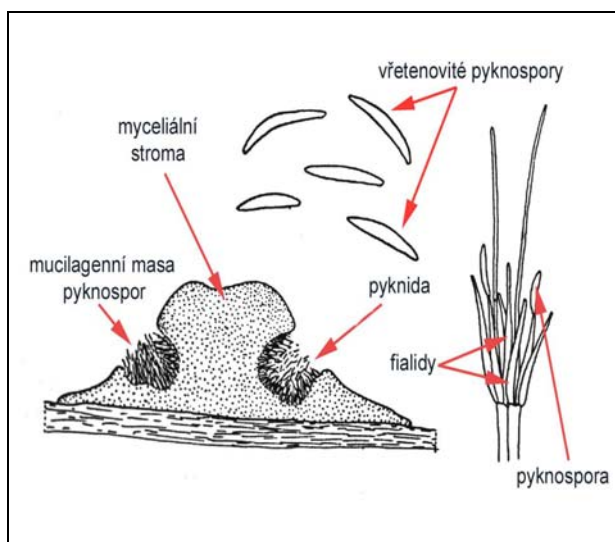
1.	Mycelium nepřehrádkované; velké konidie, na jednom konci s adhezí plochou; konidiofory obvykle jednobuněčné	<i>Entomophthora</i>
1.	Mycelium přehrádkované; malé konidie, bez adhezího disku; konidiofory obvykle vícebuněčné	2
2.	Podlouhlé konidiofory, často prodlužují délku těla hostitele; fialidy vznikají samostatně na konidioforu	<i>Hirsutella</i>
2.	Konidiofory často nejsou protáhlé, fialidy často v hroznech	3
3.	Konidie kryté mucilagenním povrchem, vyvíjejí se v hroznech na konci fialid, které tvoří přesleny	<i>Lecanicillium</i>
3.	Konidie nepatrně kryté mucilagenním povrchem, vznikají samostatně nebo v řetězcích na konci fialid	4
4.	Konidie globoidního tvaru, vznikají samostatně na fialidách, které svým sklonem vytvářejí charakteristickou „cik-cak“ formu	<i>Beauveria</i>
4.	Elipsoidní konidie, vznikají v řetězcích na rovných konidioforech	<i>Paecilomyces</i>

2. 7. Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub

2.7.1. Rod *Aschersonia*

V rámci rodu *Aschersonia* (Deuteromycotina, Coelomycetes) je doposud evidováno přes 50 druhů hub úzce specializovaných na červce (Coccidea) a molice. Přírozený výskyt těchto hub je exkluzivně vázán na subtropické a tropické oblasti. V souvislosti s úzkou specializací jsou v rámci rodu *Aschersonia* odlišovány druhy, které parazitují výhradně na červcích (skupina *Lecaniicolae*), a druhy parazitující výhradně na molicích (skupina *Aleyrodicolae*). Do skupiny *Aleyrodicolae* patří kromě nejrozšířenějšího druhu *A. aleyrodis* Webber i druhy *A. flava*, *A. goldiana*, *A. flavocitrina*, *A. placenta*, *A. viridans* a další. Houby z rodu *Aschersonia* představují anamorfní stádium jehož perfektní teleomorfní stádium patří do rodu *Hypocreella* (Ascomycotina, Sphaeriales). Z hlediska potenciálního využití v biologické ochraně proti molicím je jednoznačně nejvýznamnějším a nejstudovanějším druhem houba *Aschersonia aleyrodis*, která je běžnou

součástí entomopatogenní mykoflóry v agroekosystémech citrusových sadů. Poprvé byla zjištěna a popsána na počátku století po izolaci z molice citrusové *Dialeurodes citri* v průběhu přirozené epizootie v citrusových sadech na Floridě (Fawcett 1908; Petch 1921). Kromě molice citrusové byla následně zjištěna i na dalších druzích molic, z nichž mezi nejvýznamnější patří *T. vaporariorum*, *T. abutiloneus*, *B. tabaci*, *B. giffardi*, *D. citrifolii*, *Aleurocanthus woglumi* a *Tetraleurodes acaciae*.



Taxonomie houby *Aschersonia aleyrodis*

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota*

Pomocná třída: *Coelomycetes*

Řád: *Sphaeropsidales*

Rod: *Aschersonia*

Druh: *Aschersonia aleyrodis*

V přirozených agroekosystémech je nákaza iniciována a šířena v populacích molic prostřednictvím pyknospor. Pyknospory *A. aleyrodis* jsou jednobuněčné, fusiformní, vřetenovitého tvaru, se zřetelnými inkluzemi v protoplasmě (3 - 5 inkluzních kapek uvnitř vyzrálých pyknospor) a jsou produkovány phialidami ve formě mucilagenní masy. Phialidy jsou uloženy v pyknidách, které se formují v hustém myceliálním stromatu na povrchu usmrčeného hostitele (Samson, Rombach 1985). Běžnou součástí mucilagenní masy pyknospor je β -karoten, který způsobuje nejen typické zbarvení samotné masy pyknospor, ale je i příčinou načervenalého zbarvení infikovaných larev (Landa *et al.* 1989). Význam přítomnosti β -karotenu v mucilagenní mase pyknospor není doposud uspokojivě vysvětlen. Pravděpodobná úloha β -karotenu je v ochraně pyknospor proti negativním účinkům slunečního záření (Osborne, Landa 1992).

Průběh infekce molice houbou *A. aleyrodis* probíhá podle klasického schématu, jak bylo popsáno v předcházející části. Po kontaktu pyknospory s povrchem těla hostitele se pyknospora přichytí na povrch těla pomocí povrchové mucilagenní hmoty a během 24 hodin klíčí. Primární hyfy penetruje exoskeletem hostitele do tělní dutiny, kde jsou v následné fázi vývoje produkována heterogenní hyfová tělíska, která postupně vyplňují tělní dutinu. V té fázi vývojového cyklu patogena je již larva hostitele usmrčená, zcela mumifikovaná a zároveň končí parazitická fáze vývoje patogena a vývojový cyklus přechází do konečné, saprofytické fáze

vývojového cyklu. V této fázi se již dají infikované larvy snadno odlišit od larev zdravých. Původně průhledný povrch těla larvy dostává mléčné, mírně načervenalé zbarvení. Saprophytická fáze vývojového cyklu začíná momentem prorůstání mycelia na povrch těla usmrčené larvy a vytvářením phialid v pyknidách, které se ve formě přesně lokalizovaných okrouhlých zón objevují na povrchu stromatu. V období maximální produkce masy pyknospor se již infikovaná larva zřetelně odlišuje od larvy zdravé. Masa pyknospor je zřetelně vybarvena (červená, oranžová, žlutá) a infikace larvy je vizuálně zřejmá a zřetelná. V praktické determinaci kmenů/druhů hub z rodu *Aschersonia* je vzhledem k barvě pyknidiální masy užívána i praktická terminologie, v rámci které je pro označení kmene používán (v kombinaci s informací o areálu výskytu) převažující typ zbarvení. V literatuře je tak možné narazit na označení typu "kubánská červená", "kubánská žlutá", "vietnamská oranžová", "čínská červená" apod. (Procenko 1967; Landa 1983).

A. aleyrodis infikuje téměř výhradně larvální stádium molice. Infekce dospělců tímto patogenem jsou zjišťovány jen výjimečně (Osborne, Landa 1992). Infikace hostitele ve stádiu vajíčka nebyla doposud prokázána. Nejcitlivější vůči infekci jsou larvy 1. - 2. instaru. Citlivost larev vyšších instarů mírně klesá, nicméně i na synchronizovaných populacích larev 4. instaru lze vyvolat vysokou frekvenci nákazy (Landa 1984; Fransen 1987; Osborne, Landa 1992).

Význam *A. aleyrodis* (ale i jiných zástupců z rodu *Aschersonia*) jako stabilizujícího prvku agrobiocenóz citrusových výsadeb v subtropických a tropických oblastech je znám již od počátku století, a i v současnosti patří k nejznámějším příkladům samovolné účinnosti bioagens, nevyžadujícího umělé introdukce inokulativního nebo inundativního charakteru. Z tohoto pohledu jsou nejdůležitější studie, které téměř kontinuálně již od roku 1908 probíhají v citrusových výsadbách na Floridě (Fawcett 1908; Fawcett 1910; Petch 1921; McCoy 1985 a další). Prvé pokusy zaměřené na záměrné introdukce tohoto bioagens do agroekosystému skleníků byly úspěšně realizovány v SSSR (Procenko 1967; Primak, Chižik, 1975; Solovej, Kolcov 1976) a následně i řadě dalších zemí. V ČR byla *A. aleyrodis* poprvé testována již v roce 1976 a v provozních pokusech byla odzkoušena v letech 1981 - 1982 (Landa 1983; 1984). V Evropě byl tento patogen odzkoušen ve sklenících v Nizozemí (Ramakers, Samson 1984), Švédsku, Velké Británii a Bulharsku (Samson, Rombach 1985). Přes řadu velmi pozitivních zkušeností z účinností tohoto patogena není doposud jeho používání běžnou záležitostí a stále má více méně pokusný charakter. Hlavní příčiny tohoto stavu lze definovat následovně:

1. Problematická velkokapacitní produkce standardní biomasy pyknospor
2. Perfektně komercializovaný systém biologické ochrany založený na introdukcích parazitoida *Encarsia formosa*

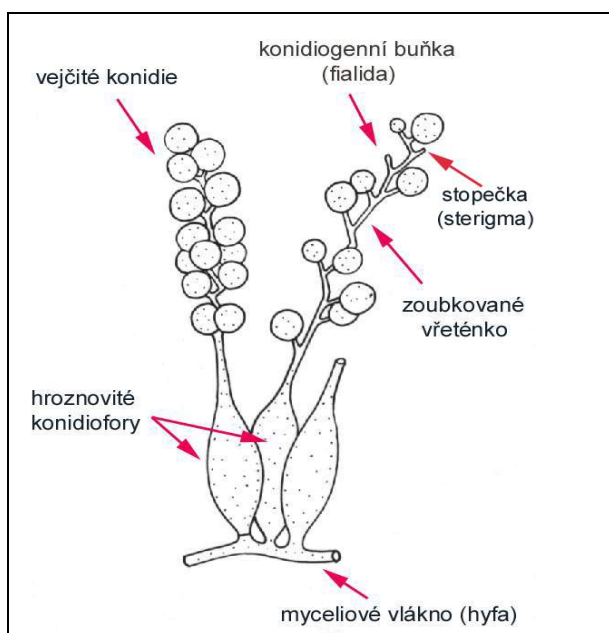
3. Vysoké náklady spojené s registrací biopreparátů na bázi entomopatogenních hub

A. aleyrodis patří mezi fakultativní patogeny, které je možno kultivovat na různých živných půdách a substrátech. Nicméně, v porovnání s jinými druhy entomopatogenních hub, (zejména pak s hlavními zástupci vláknitých deuteromycet) je kultivace *A. aleyrodis* spojena s řadou problémů (Landa 1984, Fransen 1990). *A. aleyrodis* byla dosud produkována pouze formou povrchových resp. stacionárních kultivací na umělých živných půdách a substrátech. Při kultivaci formou povrchových kultur na umělých živných půdách byl nejrychlejší radiální růst mycelia a nejvyšší sporulace zaznamenány na SDA (Sabourand-Dextrose Agar) a na PDA (Potato-Dextrose Agar). Podstatně nižší sporulace byla zjištěna při povrchové kultivaci na sladinkovém a kukuřičném agaru (Landa, Jiranová 1989). Kromě odlišností v kvantitativních parametrech vykazovaly kultury patogena kultivované na uvedených živných mediích i výrazné morfologické odlišnosti. Z nejvýznamnějších lze uvést počet a velikost pyknid (přímo korelující s produkcí pyknospor) a intenzitu vybarvení kultur v důsledku přítomnosti β -karotenu (Landa et al. 1989). Obdobné rozdíly byly zjištěny i při kultivaci *A. aleyrodis* na přirozených rostlinných substrátech (např. pšenice, rýže, drcená kukuřice, drcená bobová a hrachová zrna, pohanka, proso apod.). Nejvyšší produkce pyknospor byla zjištěna při kultivaci na prosu a rýži (Landa 1983; Landa, Jiranová 1989). Laboratorní a poloproduční kultivace zaměřené na levnou produkci relevantního množství pyknospor *A. aleyrodis* na přirozených substrátech byly realizovány i v zahraničí. Jako nejvhodnější se ukázala být sterilizovaná pšeničná a rýžová zrna (Procenko 1967) nebo proso (Fransen 1987). Doposud však není veřejně známá a dostupná standardní technologie produkce *A. aleyrodis*, která by mohla být základem pro vývoj biopreparátu na bázi tohoto patogena. V ČR byla produkce *A. aleyrodis* zajišťována pouze pro pokusné účely a celková produkce pyknospor nikdy nepřesáhla možnost jednorázově aplikovat patogena na ploše přesahující 1 ha. V roce 1994 se o produkci *A. aleyrodis* pokusila firma Koppert BV (Nizozemí), která na trh uvedla experimentální vzorek biopreparátu na bázi houby *A. aleyrodis*. Technologický postup produkce pyknospor není znám. Biopreparát má podobu úzkých podlouhlých granulí, ve kterých jsou pyknospory finalizovány spolu s neznámým rozpustným nosičem. Koncentrace pyknospor v granulích je velmi vysoká a pohybuje se řádově na úrovni $1.2 - 2.7 \times 10^{10}$ v 1 gramu biopreparátu. Nicméně vitalita pyknospor byla velmi nízká a biopreparát nikdy nebyl zaveden na trh. V principu se až doposud jedná o jediný případ naznačující, že byla zavedena produkce *A. aleyrodis* v míře přesahující laboratorní rozměry.

Tabulka 4. Přehled entomopatogenních hub z rodu *Aschersonia* (Fransen 1990)

Aschersonia sp.	Druh hostitele	Oblast výskytu
<i>A. aleyrodis</i>	<i>T.vaporariorum, B.tabaci, D. citri, D. citrifolii,..</i>	<i>Florida, Puerto Rico, Kuba, Venezuela, Mexiko</i>
<i>A. andropoginis</i>	<i>Bemisia giffardi</i>	<i>Florida, Brazílie, P.Rico</i>
<i>A. aurantiaca</i>	<i>Paraleyrodes perseae</i>	<i>Florida, Surinam, Panama</i>
<i>A. blumenaviensis</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Brazílie</i>
<i>A. brunnea</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Brazílie</i>
<i>A. columnifera</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Florida</i>
<i>A. fimbriata</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Mauritius</i>
<i>A. goldiana</i>	<i>T. vaporariorum, D.citri</i>	<i>Florida, Brazílie, Puerto Rico, Venezuela</i>
<i>A. intermedia</i>	<i>A. woglumi</i>	<i>Chile</i>
<i>A. taitensis</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Tahiti</i>
<i>A. viridans</i> (*)	<i>D.citri, D.citrifolii</i>	<i>Kuba</i>
<i>A. acutispora</i> (+)	<i>nespecifikován</i>	<i>Austrálie</i>
<i>A. badia</i> (+)	<i>nespecifikován</i>	<i>Sri Lanka, Filipíny, Vietnam</i>
<i>A. crenulata</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Západní Afrika</i>
<i>A. confluens</i>	<i>T. vaporariorum, B. tabaci</i>	<i>Indie, Sri Lanka, Filipíny</i>
<i>A. duplex</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Austrálie, Nový Zéland</i>
<i>A. flava</i>	<i>T. vaporariorum</i>	<i>Sri Lanka</i>
<i>A. hypocreoidea</i>	<i>Acudaleyrodes africana</i>	<i>Japonsko, Sri Lanka, Filipíny</i>
<i>A. papillata</i>	<i>T. vaporariorum</i>	<i>Sri Lanka</i>
<i>A. placenta</i>	<i>D. citri, D. cardamomi, Aleurotrachelus camellia</i>	<i>Indie, Jáva, Sri Lanka</i>
<i>A. samoensis</i>	<i>nespecifikován</i>	<i>Sri Lanka, Samoa</i>
<i>A. tamurai</i>	<i>T. vaporiorum, D. citri</i>	<i>Japonsko</i>

2.7.2 Rod *Beauveria*



Taxonomie hub rodu *Beauveria*

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Beauveria*

Rod *Beauveria* reprezentují převážně široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která se vyskytují v půdě (např. při přezimování), (Landa 1998). Její výskyt na škůdcích kolonizujících výhradně nadzemní části rostlin je velmi řídký (Weiser 1966). Nejvýznamnější zástupci rodu *Beauveria* jsou *B. bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Bals.) Vuill. a *B. tenella* (Bals.) Vuill. V sortimentu hostitelů jsou zastoupeni zástupci z řádů rovnokřídlí (*Orthoptera*, např. krtonožky), brouci (*Coleoptera*, např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoha dalších druhů), larvy a kukly motýlů (*Lepidoptera*) a dvoukřídlého hmyzu (*Diptera*). Byly izolovány také kmeny vykazující vysokou virulenci na zástupcích stejnokřídlého hmyzu (*Homoptera*, např. na molicích a mšicích), (Landa 1998).

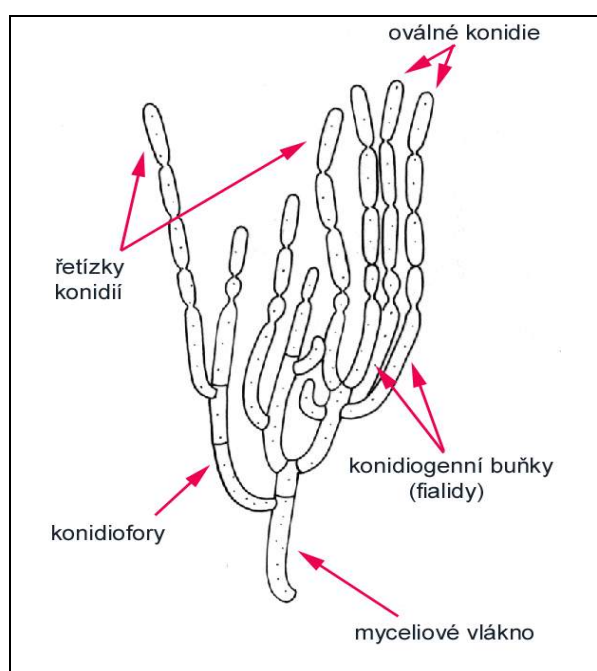
V přírodě přetrvává druh *B. bassiana* v povrchových vrstvách půdy jako mycelium jednak na uhynulých jedincích infikovaného hmyzu, jednak na organických zbytcích (saprofytická fáze). Jako hostitel houby *B. bassiana* bylo zaznamenáno přes 200 druhů hmyzu z devíti řádů (především *Lepidoptera* a *Coleoptera*). Navzdory velkému množství hostitelů byly pouze zřídka sledovány epizootie způsobené houbou *B. byssiana* u přirozených populacích škůdců (Feng *et al.* 1994).

Na umělých živných půdách i na přirozeném hostiteli vytváří mycelium mléčně bílé barvy. Konidie jsou globoidního až subgloboidního tvaru, velikost $2,0 - 3,0 \times 2,0 - 2,5 \mu\text{m}$. Konidiogenní struktury tvoří husté shluky, hrozny. Optimální teplota růstu je $23 - 26 \text{ }^\circ\text{C}$, maximální teplota pro růst mycelia je $28 - 31 \text{ }^\circ\text{C}$ (Dirlbeková 1991).

B. bassiana je možno snadno kultivovat na pevných i tekutých živných půdách. Pro masovou produkci jsou využívány dvoufázové a submerzní technologie kultivace. Při submerzní kultivaci vzniká často směs blastospor a konidií. Konidie vznikají téměř stejně rychle jako blastospor, jsou však stálější (Feng *et al.* 1994). V České republice byla vyvinuta metoda průmyslového zpracování. Kultivace aktivních částic hub, tj. konidií, se provádí v polyetylenových polštářích metodou vzdušné povrchové kultivace (doba inkubace 12 dní, teplota 27 °C). Z jednoho kultivačního polštáře o užitkové ploše 1000 cm² se získá suchý preparát o váze 10 g, který obsahuje 10¹² konidií. Padesát gramů čistých konidií stačí na ošetření 1 ha pole zamořeného škůdcem (např. mandelinkou bramborovou). Pro finalizaci preparátu se smíchávají granule s plnidly a smáčedly na výsledný 10 % preparát, vše se rozmělní na jemný prášek, který se ředí vodou na vhodné koncentrace 10⁷ až 10¹¹ konidií dle typu a instaru škůdce. Výsledný mykoinsekticid byl nazván BOVEROL. BOVEROL, ač primárně určen k boji s larvami mandelinky bramborové, je použitelný proti řadě dalších škůdců, jako např. *Ostrinia nubilalis*, *Cydia pomonella*, další druhy obalečů u ovocných kultur, proti ponravám chroustů, larvám nosatců na kořenech užitkových rostlin atd. (Samšišáková, Kálalová 1983). BOVEROL v současné době není uveden seznamu registrovaných přípravků (Anonym 2003b).

V zahraničí je k dispozici řada biopreparátů na bázi *B. bassiana* a *B. brongniartii*, které jsou používány zejména v lesnictví a okrasném zahradnictví. Proti širokému sortimentu škůdců rychlené zeleniny a okrasných květin se používá přípravek MYCOTROL firmy Mycotek (Landa 1998).

2.7.3. Rod *Metarhizium*



Taxonomie houby *Metarhizium anisopliae*

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Metarhizium*

Druh: *Metarrhizium anisopliae*

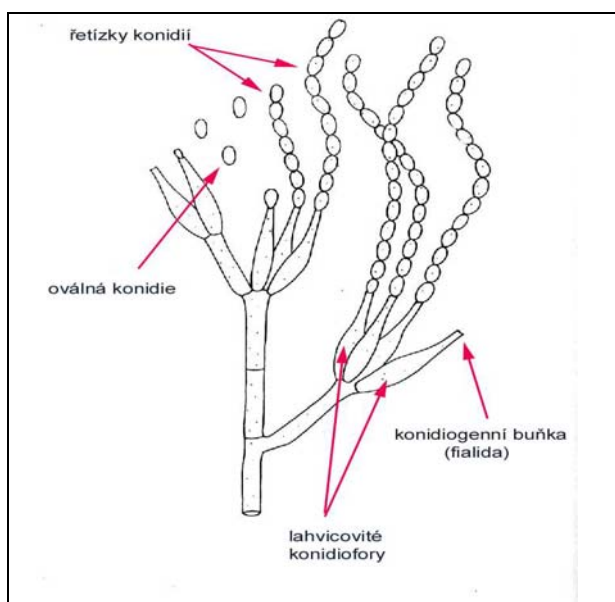
M. anisopliae (Metsch.) Sorok. a *M. flavoviridae* W. Gams & Rozsypal reprezentují široce polyfágní houby, které jsou převážně vázány na půdní hmyz (rovnokřídlí, brouci a dvoukřídlí), (Landa 1998). Spolu s *B. bassiana* patří *M. anisopliae* mezi nejrozšířenější druhy entomopatogenních hub. *M. anisopliae* bylo jako patogen zaznamenáno na více než 200 druzích hmyzu (Veen *et al.* 1968). Nákazy vyvolané *M. anisopliae* jsou označovány jako zelené muskardiny, protože infikovaný jedinec prorůstá hustou, tmavě zelenou masou mycelia a konidií (Hrdý *et al.* 1991).

Houby rodu *Metarhizium* se běžně vyskytují v půdách oblasti mírného pásma, subtropů a tropů. Podobně jako *B. bassiana* jsou běžnou složkou půd i na území ČR, kde působí jako přirození regulátoři v populacích půdního hmyzu (Landa 1998). *M. anisopliae* je houba ekologicky vázaná na vlhké, teplé prostředí, proto je nejčastěji u půdních stadií hmyzu (Weiser 1966). Její teplotní optimum leží při 20 až 25 °C. Termofilní *M. anisopliae* je nesporná ve srovnání s *B. bassiana* a *P. farinosus*. Při 10 °C potřebuje *M. anisopliae* téměř dvojnásobek času na zahájení sporulace než *B. bassiana*. Různé studie ukázaly, že *B. bassiana* a *P. farinosus* jsou schopny klíčit a růst dobře a takto infikovat hostitele při teplotách pod 10 °C, zatímco *M. anisopliae* toho schopno není (Vänninen *et al.* 1995).

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 náležité vlhkosti prostředí. Hyfy prorůstají pokožkou ven a na povrchu tvoří bílé až narůžovělé mycelium. Radiálně vyrůstají z povlaku hyf krátké konidiofory těsně přimknuté k sobě do nápadnějších svazečků. Z nich vyrůstají konidie. Jsou tyčinkovité 3,5 μm a 6,5 až 7,2 μm dlouhé, jsou v řetízcích přimknuty k sobě, takže na povrchu hostitele jsou nápadné špalíčky. Jsou zelenošedé až olivově zelené (Weiser 1966).

Biopreparáty na bázi *Metarhizium anisopliae* jsou velkoplošně aplikovány zejména v zemích Jižní Ameriky (Brazílie, Argentina, Kolumbie), (Landa 1998). Hrdý *et al.* (1991) uvádí použití *M. anisopliae* jako mykoinsekticidu ve Francii v dávce 1 – 2 kg/ha proti plošticím a broukům.

2.7.4. Rod *Paecilomyces*



Taxonomie rodu *Paecilomyces*

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Paecilomyces*

Entomopatogenní houba *Paecilomyces fumosoroseus* (WIZE) Brown & Smith (Deuteromycotina, Hyphomycetes) patří v porovnání s ostatními druhy entomopatogenních hub (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* aj.) k doposud poměrně málo studovaným druhům. K explozi zájmu o tohoto patogena došlo v souvislosti s výrazným vzestupem škodlivosti molice *B. tabaci* v polních agroekosystémech na jihu USA. Od roku 1987 byly v populacích molice bavlníkové na různých hostitelských rostlinách/lokality na Floridě zaznamenávány pravidelné spontánní epizootie vyvolané tímto patogenem a v roce 1988 byl odisolován kmen *P. fumosoroseus* (dále též PFR), který vykázal schopnost vyvolávat dramatické epizootie nejen v populacích molice bavlníkové, ale i dalších druhů škůdců. Tento nález inicioval intenzivní výzkum, který vyústil v neobvykle rychlý vývoj biopreparátu na bázi PFR, který je pod obchodním názvem PFR 97 WDG - Apopka® přihlášen k registraci v řadě zemí světa, včetně ČR.

P. fumosoroseus je kosmopolitně rozšířený druh široce polyfágní entomopatogenní houby. Patogen byl popisován a evidován pod řadou různých jmen (např. *Isaria fumosoroseus* WIZE, *Spicaria aphodii* Vuill.; *Spicaria cossus* Portier & Sartory; *Penicillium hibernicus* Kennelly & Grimes; *Penicillium isarioides* Inagaki; aj.) (Samson, Rombach 1985; Osborne, Landa 1992).

Rod *Paecilomyces* byl definován a popsán Bainierem jako rod blízký příbuzný rodu *Penicillium*. Hlavním znakem odlišujícím druhy patřící do rodu *Paecilomyces* od druhů zahrnutých pod rod *Penicillium* je odlišnost v pigmentech a tvaru konidioforů. Druhy patřící 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 phialidy uchycené na relativně dlouhých krčcích. Poslední revizi rodu provedl Samson (1974), který rozdělil blízké příbuzných 31 druhů hub do dvou sekcí - *Paecilomyces* a *Isarioidea*. V rámci této revize bylo PFR zařazeno do skupiny *Isarioidea* spolu s řadou dalších, převážně entomofágních a nematofágních druhů hub (např. *P. varioti*, *P. lilacinus*, *P. farinosus*, *P. amoeneroseus*, *P. javanicus*, *P. ramosus*, *P. coleopterorium*, *P. tenuipes*, *P. cicadae*, *P. cinnamomeus* aj.). Taxonomie rodu je však stále nejasná a pravidelně se objevují revize rodu (Humber 1999).

Na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách vytváří PFR zprvu bílé vatovité kolonie, které později mění barvu do odstínů narůžovělé, nafialovělé až šedofialové barvy. Změna barvy kolonií přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Starší, plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter kolonie se mění v prašný, s povrchem zcela pokrytým obrovským množstvím konidií. Hlavní determinační znaky druhu jsou detekovány na morfologických strukturách sporulujících kultur. V koloniích PFR se v průběhu konidiogeneze tvoří elipsoidní konidiospory, které jsou v podobě dlouhých řetízků postupně produkovány na koncích phialid. V koloniích PFR se na vzdušném myceliu nejprve vytvářejí konidiofory, které jsou na hyfách umístěny přeslenovitým způsobem, obdobně jako u *L. lecanii*. Na koncích konidioforů se následně formují konidiogenní phialidy (3 – 6 phialid na 1 konidioforu), na kterých se vytvářejí oválné konidie. Konidie se na koncích phialid oddělují postupně, nejmladší konidie je vždy v kontaktu s phialidou a odtlačuje starší konidie dál do tvořícího se řetízku. V jednom řetízku konidií přichyceném na konidiogenní phialidě může být přítomno i více než 50 konidií (Samson 1974, Osborne & Landa 1992). Povrch kultur PFR, a zvláště pak povrch jednotlivých konidií je silně hydrofobní. Po přelití povrchu kolonie PFR vodou, plavou uvolněné konidie (zpravidla stále udržující formu kompaktních řetízků) po povrchu vody kde tvoří prašnou, nesmáčenlivou vrstvu a jsou snadno rozprášeny i při malém pohybu vzduchu (viz. obr. 7 v publikaci Osborne & Landa 1992).

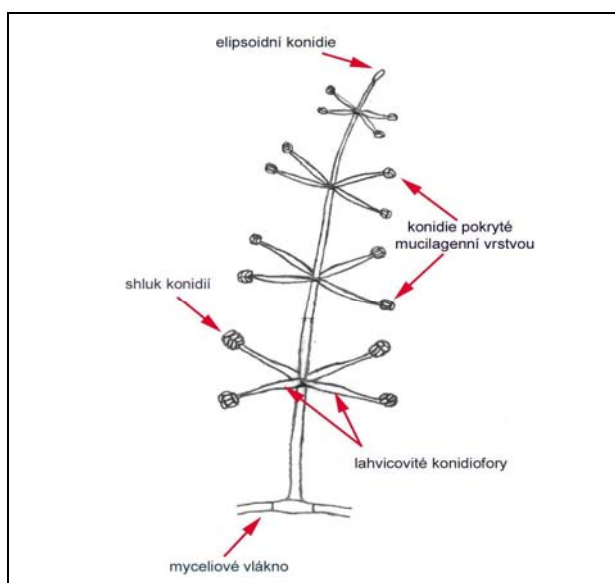
PFR je kosmopolitní široce polyfágní houbový patogen. Většina záznamů týkajících se izolace PFR z různých druhů hmyzích hostitelů (v přirozených podmínkách) uvádí mezi nejčastějšími hostiteli různé zástupce z řádů Lepidoptera, Diptera a Coleoptera (např. Bajan 1973; Furges, Robert 1980; Maniania, Fargues 1984; Poprawski *et al.* 1985, Rodriguez-Rueda, Fargues 1980, Zimmerman 1986). Poprvé bylo PFR zjištěno jako patogen přirozeně se vyskytující v populacích molice až v roce 1983, kdy se v populacích molice *T. vaporariorum* ve sklenicích v oblasti Pekingu objevily velmi silné spontánní epizootie, které dočasně zcela decimovaly populace tohoto škůdce. Tento kmen PFR byl odizolován a jako vysoce virulentní

vůči molici skleníkové byl označen jako subspecies trinominálním označením "beijingensis", tedy jako *P. fumosoroseus* var. *beijingensis* (Fang *et al.* 1983).

Druhým případem přirozené epizootie způsobené PFR v populacích molic je již zmíněný periodický výskyt PFR v populacích molice *Bemisia tabaci* na Floridě (Osborne 1990, Osborne *et al.* 1990b). Odizolovaný kmen byl označen jako PFR 97 - kmen Apopka (Apopka - jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen PFR 97 v roce 1987 poprvé zachycen a odizolován Dr. Lance S. Osbornem). Kmen PFR 97 způsobil rozsáhlé epizootie v populacích molice bavlníkové jak ve sklenicích, tak i na polních kulturách. Další pokusy s tímto kmenem prokázaly široce polyfágní základ kmene a vysokou virulenci i vůči mšicím, třásněnkám, larvám některých druhů motýlů, larvám a kuklám vrtalek, a dokonce i vynikající účinnost vůči svlušce chmelové. Na rozdíl od *L. lecanii* je PFR schopno vyvolávat i nákazu vajíček molic a svlušek.

Monosporový izolát původní kultury PFR 97 je v současnosti uložen jak v Centrální US sbírce mikroorganismů, tak i v kolekci mikroorganismů University Florida Gainesville (UFG). V roce 1989 byla uzavřena licenční smlouva mezi Universitou Florida a americkou firmou W.R.Grace & Co. - Conn., v rámci které byla všechna práva na používání kmene PFR 97 předána uvedené firmě a UFG je firmou sponzorována v účasti na vývoji biopreparátu na bázi tohoto kmene. Od roku 1990 se na projektu vývoje tohoto biopreparátu podílí i naše pracoviště (Oddělení ochrany rostlin KRV ZF JU). Následující části své habilitační práce budu věnovat některým aspektům tohoto projektu, s důrazem na historii vývoje a praktické využití biopreparátu na bázi PFR 97, který je dnes již dobře znám pod obchodním názvem "PFR 97 WDG - Apopka®".

2.7.5. Rod *Lecanicillium*



Taxonomie houby *Lecanicillium lecanii*

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné oddělení: *Deuteromycota*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod: *Lecanicillium*

Druh: *Lecanicillium lecanii*

L. lecanii je velmi dobře známá polyfágní entomopatogenní houba. Spontánní epizootie způsobené tímto patogenem jsou nejčastěji zaznamenávány v populacích hmyzu řádu Homoptera, zvláště pak v populacích různých druhů mšic, molice a červců. U těchto hostitelů napadá patogen všechna vývojová stádia kromě vajíček (molice), která jsou infikována jen výjimečně (Landa 1994). V přirozených podmínkách, se můžeme s *L. lecanii* setkat kromě řádu Homoptera i u jiných druhů patřící do řádu Coleoptera, Hymenoptera, Heteroptera, Lepidoptera a Diptera (Landa 1983). Spektrum *L. lecanii* však není omezeno pouze na hmyz. Spontánní epizootie způsobené *L. lecanii* byly zjištěny i v populacích některých druhů roztočů (např. na zástupcích svilušek Tetranychidae a vlnovníků z čeledi Eryophidae). 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 (např. *Uromyces dianthi*, *U. appendiculatus*, *Puccinia graminis* aj.) (Landa 1994).

Hlavním determinačním znakem *L. lecanii* je typická forma sporulace. V průběhu konidiogeneze se na vzdušném myceliu vytvářejí dlouhé, úzké, lahvicovité konidiofory, na jejichž koncích se postupně tvoří elipsoidní konidie $3,5 - 5,0 \mu\text{m} \times 1,0 - 1,5 \mu\text{m}$. 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. Konidiospory 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 1983). Konidiospory se v prostředí šíří pomocí větru a vody, kontaktem hostitele s jiným infikovaným jedincem a pravděpodobně jsou šířeny i jinými druhy členovců (Samson a Rombach 1985). V hustých populacích nejvýznamnějších hostitelů (mšice, molice) má pravděpodobně největší význam šíření prostřednictvím kontaktu zdravých jedinců s jedinci infikovanými, na jejichž povrchu těla se vytvořila plně sporulující kultura patogena. Zejména v populacích mšic bylo zjištěno velmi rychlé šíření nákazy, v krátké době po spontánním objevení se primární infekce.

Klíčení konidií *L. lecanii* probíhá pouze při vlhkostech nad 90% r.v.v. a prorůstání mycelia na povrch těla a konidiogeneze probíhají pouze při vlhkostech nad 75% r.v.v. (Landa 1994). Nároky patogena na vlhkost v období po proniknutí do organismu a tvorby blastospor nebyly doposud specifikovány, nicméně lze předpokládat, že v této fázi vývoje bude závislost patogena na vnějších poměrech nižší. Optimální teploty zajišťující nejrychlejší vývoj patogena leží v rozmezí 23 – 28 °C., nicméně teplotní rozmezí, ve kterém může být realizován celý

vývojový cyklus je podstatně širší (8 – 32 °C), (Samson & Rombach 1985; Hall 1985). Na rozdíl od hub z rodu *Aschersonia* nevykazuje *L. lecanii* tak vysoké požadavky na světlo v žádné z jeho forem (intenzita, resp. fotoperioda). Kultury tohoto patogena sporulují i ve tmě. Ze základní charakteristiky vztahů *L. lecanii* k abiotickým faktorům je zřejmé, že využití tohoto agens v praktické ochraně rostlin je těmito faktory predeterminováno pouze pro teplé a vlhké mikroklima skleníků (Landa 1994).

Praktický význam *L. lecanii* nejlépe potvrzuje skutečnost, že tento bioagens je již několik let v řadě zemí k dispozici ve formě plně komercializovaného, registrovaného biopreparátu. V současnosti je nejvíce rozšířeno používání dvou biopreparátů na bázi houby *L. lecanii*, které jsou pod obchodním názvem VERTALEC[®] (výrazně zvýšená patogenita proti mšicím) a MYCOTAL[®] (kmen, který byl odizolován z molice skleníkové), uvedeny v nabídce bioagens holandské firmy Koppert BV (Landa 1994).

2. 8. Biologická ochrana proti molicím - entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby tvoří výlučnou, nicméně druhově velmi diverzní skupinu patogenů molic. Výlučnost této asociace je dána jak uniformní a konzervativní morfologií a bionomií molic, tak i odlišnostmi v epidemiologických cyklech jednotlivých skupin entomopatogenních mikroorganismů. Entomopatogenní houby jako jediné patogenní mikroorganismy (s výjimkou parazitických háďátek, která však reprezentují odlišnou ekologickou niku) pronikají do těla hostitelů aktivně přes kutikulu. Výlučnost této formy primární kolonizace hostitele získává na významu v souvislosti se způsobem příjmu potravy hostitelem. Molice přijímají potravu pomocí bodavě savého ústního ústrojí přímo z pletiv listů, což de facto znemožňuje jejich infikaci entomopatogenními viry a bakteriemi, u kterých převažuje perorální forma pronikání do hostitele. Kromě toho podporuje výlučnou asociaci hub s molicemi i produkce medovice, která sama o sobě slouží jako plnohodnotné živné médium a většina entomopatogenních deuteromycet, které se na molicích vyskytují, se může vyvíjet i na samotné medovici. Tento saprofytický způsob projevu entomopatogenních hub zvyšuje možnost primárního uchycení se hub v areálu shodném s výskytem populací molic. V mnoha případech byla v mrtvých larvách a dospělých molic zjištěna přítomnost bakterií, ale v žádném z případů nebyl prokázán přímý patogenní vztah vůči hostiteli (Fransen 1990)

Doposud bylo zaznamenáno 26 rodů hub, z nichž 8 bylo prokazatelně vázáno na molice na úrovni primárních patogenů. V ostatních případech nebyla patogenita spolehlivě prokázána (nález na mrtvém hostiteli). Sortiment entomopatogenních hub molic je nutné rozdělit na dvě skupiny. Prvou skupinu tvoří úzce specializované houby patřící do rodu *Aschersonia*. Druhá

skupina pak zahrnuje všechny ostatní druhy/rody hub, jejichž výskyt byl doposud na molících zaznamenán. Toto dělení nemá jiný než praktický účel a je použito s cílem zdůraznit význam unikátní asociace mezi molícemi a přísně selektivními entomopatogenními houbami z rodu *Aschersonia*. Stručný přehled zástupců obou skupin je uveden v následujících tabulkách.

Tabulka 5. Příklady druhů entomopatogenních hub zjištěných na molících (Fransen 1990)

Rod / druh patogena	Rod / druh hostitele
<i>Acremonium sp.</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
<i>Aegeria webberi</i>	<i>Dialeurodes citri</i> , <i>D. citrifolii</i> <i>Aleurocanthus spiniferus</i> , <i>A. woglumi</i>
<i>Aphanocladium album</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Beauveria bassiana</i> (*)	<i>T. vaporariorum</i> , <i>D. citri</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Aleurodicus cocois</i>
<i>Cladosporium aphidis</i>	<i>Aleurochiton aceris</i>
<i>Erynia radicans</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
<i>Fusarium scripi</i> (<i>F. aleyrodis</i>)	<i>Dialeurodes sp.</i>
<i>Fusarium verticilloides</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Microcera sp.</i> (? <i>Fusarium</i>)	<i>D. citrifolii</i> , <i>D. citri</i>
<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	<i>D. citri</i>
<i>Paecilomyces farinosus</i> (*)	<i>B. tabaci</i>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (*)	<i>T. vaporariorum</i> , <i>B. tabaci</i>
<i>Sporotrichum sp.</i> (? <i>Beauveria</i>)	<i>D. citri</i>
<i>Trichothecium roseum</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Lecanicillium fusisporum</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Lecanicillium lecanii</i> (*)	<i>D. citri</i> , <i>B. tabaci</i> , <i>T. vaporariorum</i>

2. 9. Biologická ochrana proti molícím - parazitoidi a predátoři

S molícemi je asociována celá řada parazitoidů a predátorů, patřících do třídy Insecta. Nejvýznamnější skupinu tvoří drobné parazitické vosičky (Hymenoptera, Aphelinidae), zastoupené v rodech *Encarsia*, *Eretmocerus* a *Prospaltella*. Z predátorů mají praktický význam dravá sluněčka z rodu *Delphastus* a dravé plošnice z rodu *Macrolophus*. V praktické biologické ochraně skleníkových plodin proti molícím prozatím dominují záměrné inundativní introdukce parazitoida *Encarsia formosa* Gahan, zároveň se však výrazně zvyšuje zájem o zavedení i

dalších druhů bioagens, zejména pak uvedených predátorů, kteří vykazují menší druhovou specializaci a jsou schopni účinně regulovat i populace molice *B. tabaci*, vůči které vykazuje parazitoid *E. formosa* jen velmi nízkou účinnost.

Praktické používání parazitoida *E. formosa* proti molici *T. vaporariorum* představuje jeden z nejúspěšnějších modelů aplikované biologické ochrany. Poprvé byla metoda inundativní introdukce tohoto parazitoida do skleníků použita již v roce 1927 (Speyer 1927) a vzestup skleníkových ploch ošetřených tímto parazitoidem stoupal až do 50. let. K depresi produkce a introdukcí došlo v období let 1945 – 1965 (bouřlivý rozvoj výroby a používání syntetických insekticidů). K renesanci produkce, distribuce a introdukcí *E. formosa* došlo na konci 60. let. V současnosti je tento parazitoid jedním z nejpoužívanějších bioagens (roční produkce 800 – 1 200 milionů). *E. formosa* je úzce specializovaným druhem, který je potravně a celým vývojem vázán na larvy molice skleníkové a některých dalších druhů molic, včetně molice *B. tabaci*. Samička parazitoida klade vajíčka převážně do larev 2. – 3. instaru. Z nakladeného vajíčka se líhne apodní eucephalní larva, která prodělává celý další vývoj uvnitř těla hostitele (3 larvální instary a kukla). Dospělci parazitoida se živí na larvách L1 a L4, alternativní potravou může být i medovice. Rozmnožování parazitoida je převážně partenogenetické, v populacích dospělců dominují samičky. Populační dynamika parazitoida je při teplotách nad 20°C rychlejší než populační dynamika hostitele (biotický potenciál: sexuální index 1, plodnost 80 – 120 vajíček na samičku, vývojový cyklus 22 – 24 dnů). *E. formosa* je produkován v masových chovech a k použití je distribuován ve stádiu parazitovaných puparií (kukla parazitoida uvnitř usmrceného hostitele). Parazitovaná puparia jsou zpravidla nalepená v přesných dávkách (± 100 parazitovaných puparií) na papírové kartičky. V průběhu introdukce jsou kartičky s parazitovanými pupariemi podle určeného schématu rozvěšovány v porostech rostlin. Z parazitovaných puparií se líhnou samičky, které mají vynikající vyhledávací schopnost a i na značnou vzdálenost detekují larvy molic vhodné k parazitaci (např. Vet *et al.* 1980; Stenseth 1985). V ČR byl parazitoid *E. formosa* pokusně používán od roku 1974 a na komerční bázi od roku 1982. Celý systém produkce, finalizace, distribuce a introdukcí byl vypracován, odzkoušen a metodicky řízen pracovníky katedry ochrany AF VŠZ Praha (Bartoš *et al.* 1990).

Trh s parazitoidem *E. formosa* představuje jednu z nejvýznamnějších příjmových položek firem produkujících bioagens pro biologickou ochranu proti skleníkovým škůdcům. Svou hodnotou jej předčí pouze příjmy z prodeje dravého roztoče *Phytoseiulus persimilis* a příjmy z prodeje, resp. pronájmu kolonií čmeláka *Bombus terrestris* (Poznámka: produkce a prodej tohoto opylovače jsou jednoznačně nejlukrativnější položkou v celém sortimentu bioagens používaných ve sklenících). Je proto logické, že nejvýznamnější producenti bioagens se

brání vnitřní konkurenci svých produktů a orientují se na propagaci a stabilizaci jedné skupiny bioagens – parazitoidů a predátorů. Používání těchto makroorganizmů je založeno na podobných metodických postupech a po tržní stabilizaci jednoho druhu, lze poměrně snadno zavádět další druhy bioagens, vzhledem k analogiím v jejich používání. Hlavním důvodem však je samotná účinnost parazitoida, zejména při použití v ochraně skleníkových okurek a rajčat, které jsou hlavními tržními plodinami tohoto systému. Dobře zavedený trh nenutí výrobce bioagens k výraznějším změnám a zavádění druhů nových. Určitý posun v náhledu na "dominantní" postavení parazitoida *E. formosa* lze zaznamenat v posledních letech. Příčinou jsou následující důvody:

a) Praktické využívání tohoto parazitoida se téměř výhradně omezuje na rychlenou zeleninu a využití této biometody v ochraně okrasných květin je téměř nulové. Příčinou je podstatně nižší ekonomický práh škodlivosti molice skleníkové na okrasných květinách (např. gerbera, chryzantéma, poinsettia, ibišek a další). Účelem a cílem smíšeného systému „parazitoid – hostitel“ je snaha dosáhnout dlouhodobé stabilizace četnosti populací obou druhů, kdy četnost škůdce nepřekročí tolerovatelnou úroveň a četnost parazitoida zajistí regulaci případných (často běžných) výkyvů v četnosti škůdce. Jinak řečeno, v tomto systému je škůdce stále přítomen a v případě molice skleníkové může i při malých četnostech dojít na okrasných rostlinách k poškození

b) Introdukce molice *B. tabaci* do skleníků v Evropě a stále stoupající význam tohoto škůdce radikálně mění situaci, protože parazitoid *E. formosa* vůči tomuto škůdci vykazuje velmi malou účinnost. Kromě toho je většina nejvýznamnějších producentů orientována na celosvětový trh a operuje i v oblastech, kde se vyskytuje řada dalších druhů molic, vůči kterým je účinnost parazitoida *E. formosa* zcela nedostatečná (např. Španělsko, Portugalsko, Libanon, Kuvajt, Japonsko a řada dalších zemí). Získání těchto trhů je pro producenty bioagens nejdůležitějším úkolem a cílem současnosti. Tyto momenty se zdají být (z hlediska zájmu producentů o nové druhy bioagens proti molicím) určující (Eyal, firma W.R.Grace & Co. - Conn., USA - ústní sdělení)

c) Entomopatogenní houba *A. aleyrodis* vykazuje vysoký stupeň selektivity jak vůči všem ostatním druhům bioagens komerčně využívaným v biologické ochraně proti skleníkovým škůdcům, tak dokonce i vůči *E. formosa*, což poskytuje unikátní možnost kombinovat tohoto patogena s ostatními druhy bioagens, včetně *E. formosa*. Mechanismus selektivního působení této houby není podrobně znám, nicméně bylo prokázáno, že tento patogen neinfikuje parazitované larvy molice skleníkové. Selektivní systém vzájemných interakcí je doplněn i

chováním parazitoida, který neklade vajíčka do infikovaných larev molice skleníkové (Landa 1983; 1984; Fransen 1987). Z těchto důvodů je zájem o zavedení biopreparátu na bázi *A. aleyrodis* zaměřen na možnost, využít selektivního účinku patogena při korektivních zásazích (ohniskové či celoplošné přemnožení škůdce), v těch případech, kdy v daném ekosystému již byly provedeny introdukce i dalších druhů bioagens. Tento aspekt také nabývá na významu, protože jsou známy systémy, v rámci kterých je do jednoho skleníku uměle introdukováno 6, 7 i více druhů bioagens. Korekční zásah neselektivním chemickým přípravkem by takovéto komplexní a druhově velmi diverzní systémy nezbytně decimoval a selektivní chemické přípravky proti molicím doposud na trhu k dispozici nejsou.

2. 10. Parazitoid *Encarsia formosa*



Obrázek 2: (Hoddle 2007)



Obrázek 3: (Hoddle 2007)

Encarsia formosa je velmi dobře známý a často používaný parazitoid molice ve skleníku. Parazitická vosička pochází z tropické nebo subtropické oblasti. Ačkoli přesný původ je neznámý, pravděpodobně pochází ze stejných oblastí jako její hostitel *Trialeurodes vaporariorum*. V současnosti můžeme parazitickou vosičku nalézt v Evropě, Austrálii, Novém Zélandu, Kanadě a USA. *Encarsia formosa* patří do čeledi *Aphelinidae*, řádu blanokřídlí (Calais, Ravensberg 1992).

Encarsia formosa je celosvětově užívaný parazitoid na ochranu skleníkových plodin proti molicím. Komerční používání začalo v Evropě v roce 1920, ale do roku 1945 zájem ubýval kvůli vývoji pesticidů. Po roce 1970 bylo její používání opětovně spuštěno a v roce 1993 bylo rozšířeno ze 100 hektarů skleníkových plodin na 4800 hektarů (van Lenteren, Woets, 1988; Hoddle *et al.*, 1998).

Porovnání skleníkových oblastí v různých částech světa s oblastmi používajícími biologická regulační média ukazují, jakou většinu obvyklé praxe *Encarsia formosa* zastává v Evropě, Rusku. Největší koncentrace skleníkové produkce, ve které není *Encarsia formosa*

využívána ve větším rozsahu, jsou v Severní Americe, Asii a zvláště pak v Japonsku (Hoddle et al. 1998). Jsou to oblasti, kde by bylo vhodné použití *Encarsia formosa* zvýšit. *Encarsia formosa* byla původně popsána ve skleníku na muškátech (pelargónie sp.) v roce 1924 ze vzorků nějaké neidentifikované molice ve státě Idaho v USA (Gahan 1924). Morfologické popisy a celý životní cyklus popsal Speyer (1927).

Hostitelské rostliny

Mezi hlavní skleníkové plodiny, na kterých je *Encarsia formosa* využívána, můžeme zahrnout rajče, fazol, okurku setou, okrasné květiny a spoustu dalších druhů. Parazitoid je také užívaný nebo testovaný na lilkovitých rostlinách, gerberách, pryšci mexickém a jahodníku. Prakticky není nic známo o životním prostředí *Encarsia formosa* ve venkovních zemědělských systémech (Hoddle et al. 1988).

Morfologie

Encarsia formosa měří asi 0,6 mm, má černou hlavu, hrud', žluté břicho a zadeček. Samec je zcela černý a o něco větší než samička. Populace se skládá z méně než 1 – 2 % samců. Dospělý hmyz se živí medovicí a látkami z těla larev molice. *Encarsia formosa* dává přednost druhému larválnímu stádiu, ale živí se i na ostatních vývojových stádiích (Malais 1992).

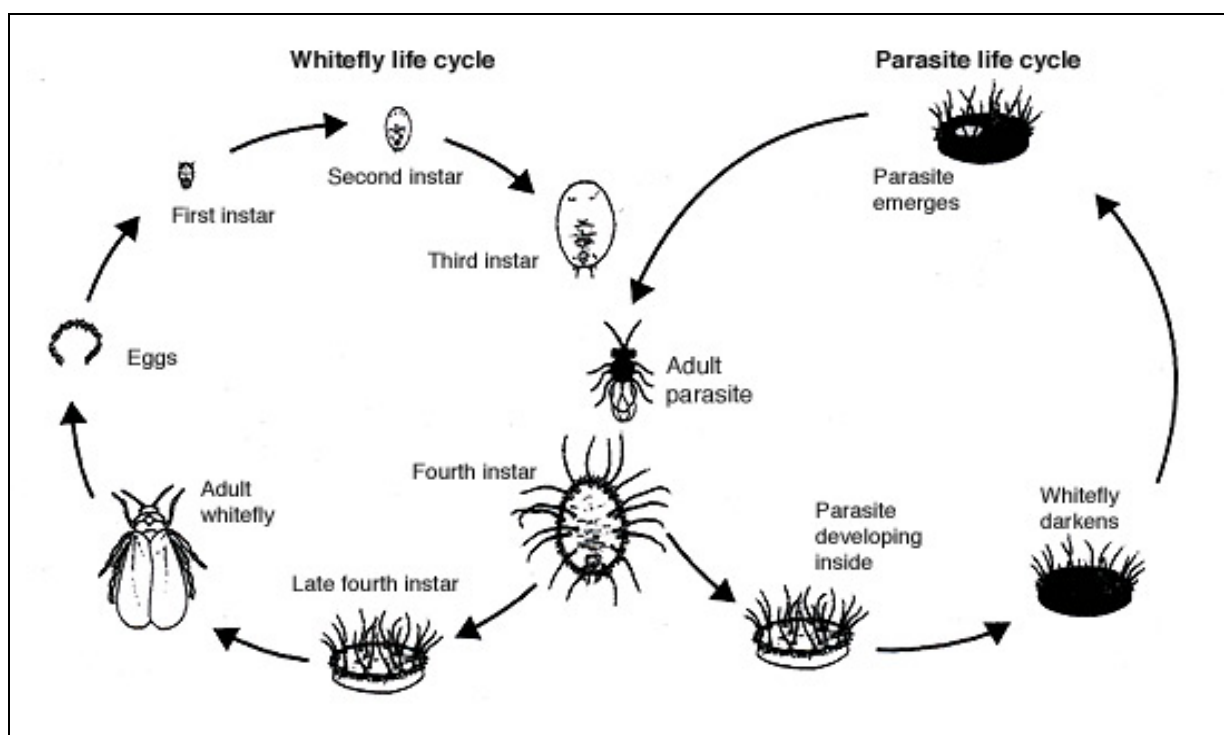
Životní cyklus

Pro úspěšnou reprodukci ve sklenících musí *Encarsia formosa* lokalizovat potenciální hostitele, zhodnotit jeho kvalitu a využít nymfy vhodné k výživě nebo parazitaci. Následující vydání do přirozeného prostředí hostitele (skleník), *E. formosa* používá vizuální a čichové podněty k objevení zamořené hostitelské rostliny (Guerrieri 1997). Rychlost s jakou vyhledá hostitele je závislá na schopnosti pohybu parazitoida, velikosti molice a množstvím hostitelů na listu. Rychlost *Encarsia formosa* je redukována listovou nervaturou, vysokou hustotou chloupků na listech a nadměrnou produkcí medovice. Setkání s nymfami vhodnými k výživě a parazitaci ovlivňuje klesající teplota, nízký atmosférický tlak a mnoho malých vajíček (Hoddle et al. 1998).

Encarsia formosa je osamělý endoparazitoid, který naklade 8 až 10 vajíček za den. Množství nakladených vajíček klesá se stářím parazitické vosičky. Dospělci získávají energii a živiny z medovice, kterou produkují molice. Dále se živí hemolymfou z nymf, do kterých provrtá otvor jako při kladení vajíčka, ale žádné vajíčko neuloží.

Encarsia formosa se živí všemi vývojovými stupni *Trialeurodes vaporariorum* kromě vajíčka. Preferuje sekundární nymfy a kuklu. Kukla a všechny nymfální stadia *Bemisia tabaci* jsou užívány pro výživu. *Encarsia formosa* zraní nymfy nebo kuklu, sondováním zjistí, zda může klást vajíčka anebo začít výživu ze zranění, které zvětší svými čelistmi. Sondování následované výživou parazitoida způsobí usmrcení hostitele. Nymfy, které mají být využity pro výživu, nemohou sloužit pro kladení vajíček (Hoddle et al. 1998).

Obrázek 4: Schéma vývojového cyklu molice a *Encarsia formosa* (Hoddle 1998)



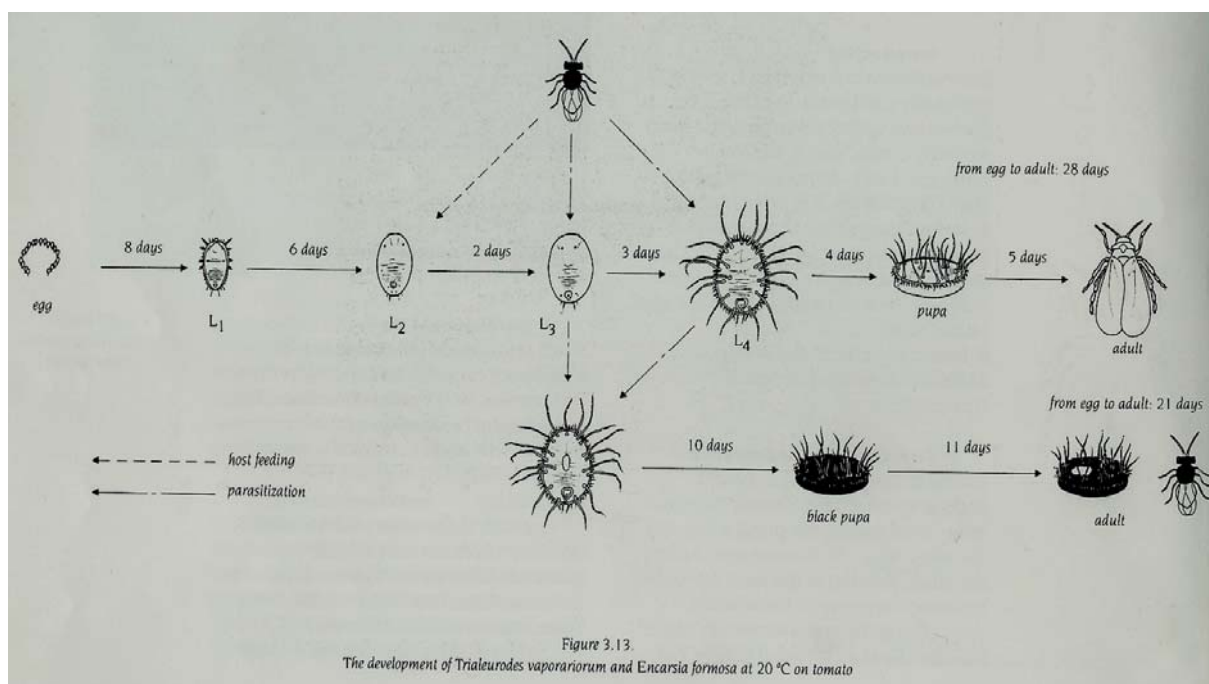
Encarsia formosa klade vajíčka do nymf všech vývojových stupňů *Trialeurodes vaporariorum* s výjimkou pohyblivého stadia nymf 1. instaru. Na rozdíl od *T. vaporariorum*, je účinnost proti *Bemisia tabaci* obecně podstatně menší. *E. formosa* dává přednost třetímu a časnému čtvrtému stádiu nymfy *Trialeurodes vaporariorum* i *Bemisia tabaci*. Rychlost úspěšného vývoje parazitoida je nejvyšší v těchto stádiích vývoje. *Encarsia formosa* neklade vajíčka až v 50 procentech preferovaných stádiích vhodných hostitelů, i když je zcela zdravé a není infikované nebo porušené výživou. Tito hostitelé mohou být infikováni při pozdějším kontaktu. Nenaklazení vajíčka v těchto hostitelích může vyplývat z obranného pohybu molice (Hoddle et al. 1998).

Samička *E. formosa* může naklást až pět vajíček denně a za celý život v průměru naklade 60-80 vajíček. Damička se živí medovicí molice a nymfami 1. instaru (denně může

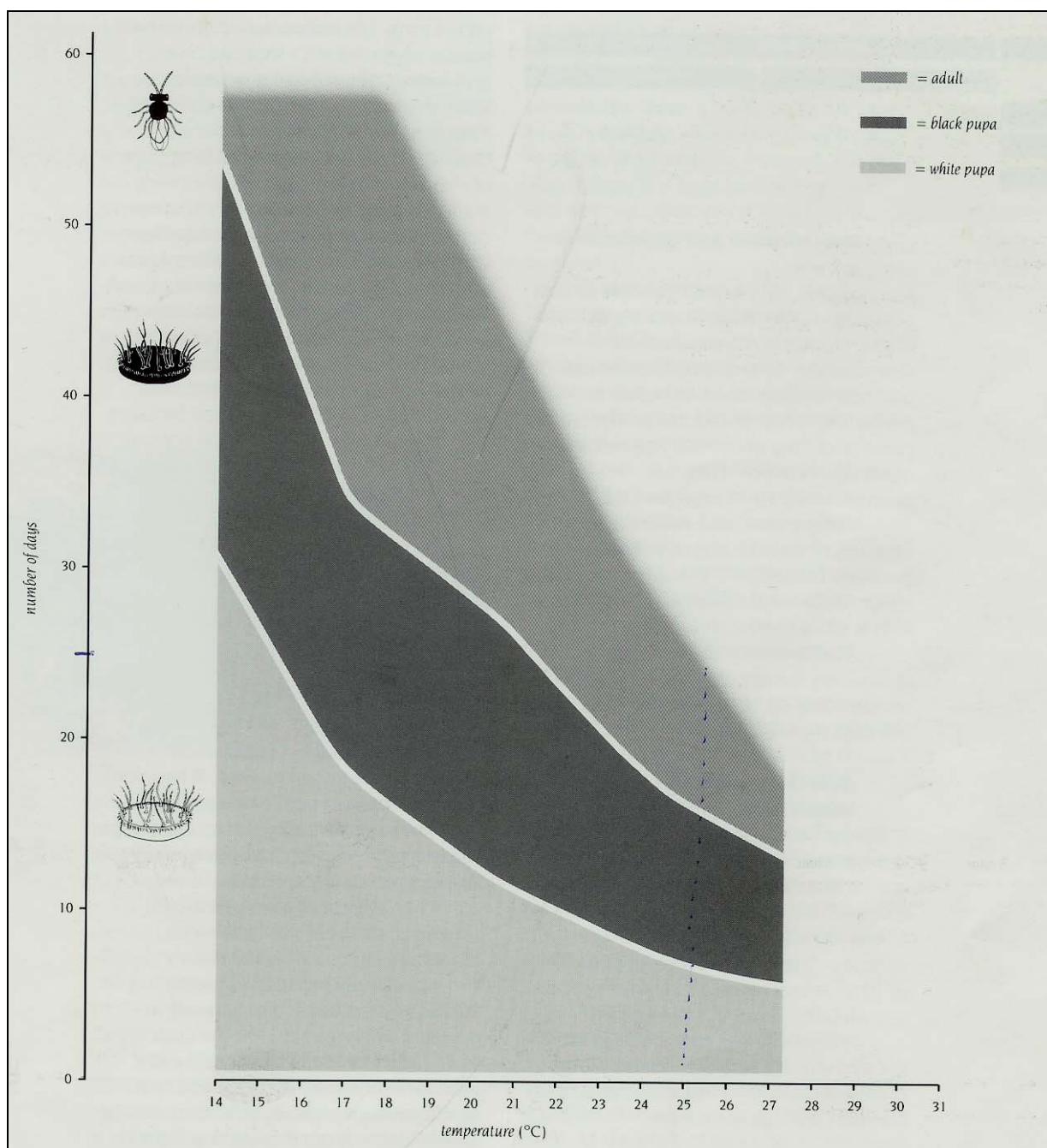
zkonsumovat až tři nymfy *T. vaopraiorum*, tzn. že při průměrné délce života dospělého - 12 dní - usmrtí v průměru 30 nymf). Před líhnutím dospělá samička vykousne na hřbetní straně usmrcené nymfy 4. instaru výletový otvor. Při teplotě 21°C (ve třetím stadiu nymfy *Trialeurodes vaporariorum*) vylétne dospělec za 25 dnů.

Encarsia formosa se rozmnožuje partenogeneticky thelytokií, to znamená, že do hostitele klade samička neoplozená vajíčka z nichž se líhnou apodní eucephalní larvy, které se v hostiteli kuklí a z kukel se líhnou výhradně samičky. Samečci se vyvíjejí příležitostně a jsou také endoparazitoidi molice. Páření *Encarsia formosa* bylo popsáno, ale samci nejsou schopni úspěšně oplodnit samičku (Kajita, 1989; Zchori-Fein et al. 1992).

Obrázek 5: Schéma délky vývoje molice skleníkové a *Encarsia formosa* při teplotě 20 °C na rajčeti (Malais 1992)



Obrázek 6: Schéma závislost teploty na délce vývoje molic a *Encarsia formosa* (Malais 1992)



Reprodukce parazitce.poplace

Populace *Encarsia formosa* sestává téměř výhradně ze samiček. Samci se v populacích vyskytují jen velmi zřídka a zpravidla pouze v případě silné parazitce hostitelské populace. Samička *Encarsia formosa* v nejvýhodnějších podmínkách může naklást až 300 vajíček. Každý den naklade přibližně 10 -15 vajíček. Teplota a vlhkost mají pro reprodukci malý význam. Teplota mezi 18 a 27°C má zanedbatelný účinek, zatímco vlhkost mezi 50% a 85% je nejvíce příznivá. Délka života samičky rapidně klesá se stoupající teplotou. V 30°C se

samička dožívá jen několika málo dnů (Malais 1992).

Chov parazitické vosičky *Encarsia formosa*

Encarsia formosa je drobná vosička velikosti pouze 0,6 mm. Hlava a hrud' jsou černé, zadeček žlutý a křídla průhledná. Je to specializovaný parazitoid molice skleníkové. Pro vlastní chov je nutné namnožit molici skleníkovou. Hostitelskými rostlinami jsou například tabák nebo rajče, které jsou ve stadiu 6. až 7. listu přeneseny do silně zamořeného prostoru molicí skleníkovou, která naklade vajíčka. Rostliny s vajíčky se přenesou do čistého skleníku, kde probíhá vývoj až do stádia 2. a 3. instaru. Potom je aplikována *Encarsia formosa* – buď pomocí násady černých parazitovaných puparií od distributora nebo přenesením rostlin do skleníku se silnou populací parazitoida. Dochází k parazitování larev molice a po asi 20 až 25 dnech (podle teploty) se objevují první dospělci *Encarsia formosa*. Délka vývoje *Encarsia formosa* závisí na průměrné teplotě. Při 18 °C trvá vývoj asi 36 dní, při 25 °C již pouze 17 dní. Vývoj parazitoida je o ¼ až 1/3 rychlejší než vývoj molice skleníkové. Obchodně je distribuce zajišťována ve formě parazitovaných černých puparií lepených na kartonové destičky. Introdukce je jednoduchá – kartičky s černými puparií se rozvěsí přímo na rostliny. Tento materiál je možné objednat na našem trhu u kteréhokoliv distributora bioagens (Dirlbek 1996).

Tabulka 6. Registrované přípravky v ČR na bázi *Encarsia formosa* (Anonym 2)

<i>Účinná látka</i>	<i>Přípravek</i>	<i>Oblast použití</i>	<i>Použití</i>
<i>Encarsia formosa</i>	Biola – agens EF (parazitoid)	Zelenina skleníková, zejména okurka, rajče, paprika, citrusy, okrasné rostliny i ve sklenících, skleníkové kultury	Molice, molice skleníková, molice bavlníková částečně
<i>Encarsia formosa</i>	<i>Encarsia formosa</i> (parazitoid)	Zelenina skleníková okurka, rajče, paprika, okrasné rostliny	Molice, molice skleníková, molice bavlníková částečně

Tabulka 7: Přehled použití přípravků na bázi parazitické vosičky *Encarsia formosa* (Biocont Laboratory, spol. s r.o.)

<i>Plodina</i>	<i>Škůdce</i>	<i>Dávka</i>	<i>Poznámka</i>
Okrasné rostliny	Molice skleníková	0,5 - 1ks/m ² preventivně nebo 6 - 10 ks/m ² kurativně	rozvěšování destiček
Okurka	Molice skleníková	0,5 - 1ks/m ² preventivně nebo 6 - 10 ks/m ² kurativně	rozvěšování destiček
Paprika	Molice skleníková	0,5 - 1ks/m ² preventivně nebo 6 - 10 ks/m ² kurativně	rozvěšování destiček
Rajče	Molice skleníková	0,5 - 1ks/m ² preventivně nebo 6 - 10 ks/m ² kurativně	rozvěšování destiček
Skleníky	Molice skleníková	0,5 - 1ks/m ² preventivně nebo 6 - 10 ks/m ² kurativně	rozvěšování destiček

3. MATERIÁL A METODIKA

3. 1. Druhy entomopatogenních hub používané v pokusech

V pokusech byly testovány vybrané kmeny entomopatogenních hub *Aschersonia* sp., *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* a *Paecilomyces fumosoroseus*. Pro účely pokusů byly používány druhy z mykologické sbírky katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích. Všechny druhy hub v této sbírce byly dlouhodobě uchovány ve formě suchých alginátových pelet s biomasou partikulárního kmene zmrazené při teplotě -20 °C až -24 °C.

Tabulka 8. Testované druhy hub – označení ve sbírce, původ a počet jedinců v testu

Druh	Označení ve sbírce	Původ	Izolace (rok)
<i>Aschersonia</i> sp.	Aa New	USA	2006
<i>Beauveria bassiana</i>	01	USA	2006
	PK PŮV	Penšín	2005
<i>Beauveria brongniartii</i>	M 092	Pístina	2001
<i>Lecanicillium lecanii</i>	I9	ČR-Šumava	1999
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M 192	Chýnov	2001
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR 97 2B	USA	1987

Při této formulaci je biomasa patogena (ať již konidie, mycelium nebo blastospory získané submerzní kultivací) inkorporována spolu s aditivy do alginátových pelet. Alginátové pelety se získávají tak, že se připraví základní směs biomasy patogena s inertním anebo nutritivním aditivem, do které se přidá Na – alginát (sodná sůl kyseliny albinové). Směs s Na – alginátem se postupně nakapává do roztoku chloridu vápenatého, kde se tvoří kuličky, které se nechají vydrtit po dobu 1 – 2 hodin. Vytvrzené kuličky se omyjí vodou a vysuší na drobné „alginátové pelety“, které umožňují dlouhodobé uchování kmenů hub v mykologických sbírkách.

Aktivace pelet jednotlivých kmenů byla prováděna v Petřino misce na povrchu 2 % vodního agaru. Pelety exponované vysoké vlhkosti poutají vodu (bobtnají) a po 5 – 7 dnech jsou k dispozici konidie na povrchu reaktivizovaných pelet. Konidie získané z vysporulovaných pelet byly použity pro inokulaci na povrch standardního živného média PDA („Potato Dextrose Agar“), které bylo připraveno ze standardního polotovaru fi. DIFCO (39 g × 1000 ml⁻¹ destilované vody). Vysterilované médium bylo rozlito do sterilních

plastikových Petřino misek o průměru 90 mm a po vychladnutí média byla na povrch inokulována houba ve formě separačních čar. Petřino misky byly po inokulaci uloženy do termostatu, který byl temperován na $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Houby byly kultivovány po dobu 14 dnů. Čisté kultury testovaných kmenů byly následně použity k pokusům.

3.2. Příprava konidiové suspenze

Povrch plně vysporulované kultury jednotlivých kmenů hub byl přelit sterilním roztokem destilované vody s přidavkem detergentu 0,05 % Tween 80. Koncentrace konidií v takto získané suspenzi byla spočítána pomocí počítačí komůrky – hemocytometru (Neubauerova vylepšená komůrka) a následně adjustována na standardní titr $1,00 \times 10^7$ konidií v 1 ml suspenze.

3.3. Chov parazitoida *Encarsia formosa* používaného v pokusech

V pokusech byla použita populace parazitické vosičky *Encarsia formosa* udržována pomocí kontinuálního chovu na různých druzích hostitelských rostlin, převážně na fazolu obecném (*Phaseolus vulgaris*) a tabáku (*Nicotiana tabacum*). Původní populace *Encarsia formosa* byla získána z komerční firmy Biocontrol Vodňany. Z tohoto zdroje byl chov v případě potřeby doplňován. Populace byla udržována v klimatizovaných místnostech KRV ZF JU (24 °C , fotoperioda 16/8)

3.4. Chov molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) používané v pokusech

V pokusech byla používána populace udržována pomocí kontinuálního chovu na různých druzích hostitelských rostlin, převážně na okurce seté (*Cucumis sativus*) a fazolu obecném (*Phaseolus vulgaris*). Původní populace molice skleníkové byla v roce 1998 získána z produkčního chovu firmy Biocontrol Vodňany (Ing. J. Plíva). Z tohoto zdroje byla populace molice skleníkové v případě potřeby i doplňována. Chov molice byl udržován v klimatizovaných místnostech KRV ZF JU ($24 \pm 2\text{ °C}$, fotoperioda 16/8).

3.5. In vitro testy

Standardní laboratorní test – GI (Germination Index, index klíčivosti)

Kvalita sporových i blastosporových suspenzí byla vyhodnocována pomocí laboratorního testu. Hodnotícím parametrem kvality bioagens byla klíčivost konidií a následný vývoj patogena. Pro tento účel byl používán standardní postup (Landa *et al.* 1994) označovaný jako GI test. Při tomto testu jsou kapky suspenzí nanášeny na povrch 2% vodního

agaru, který je v tenké vrstvě přelit přes povrch sterilního podložního mikroskopického sklíčka. Po zaschnutí kapek bylo sklíčko umístěno do vlhké komůrky (sterilní Petriho miska se zvlhčeným sterilním filtračním papírem na dně) a vzorek byl inkubován při teplotě 25 ± 1 °C v termostatu. Klíčivost a vývoj patogena jsou hodnoceny v pravidelných intervalech (24, 48 a 72 hodin). Při hodnocení byl používán světelný mikroskop. V zónách kapek byl hodnocen vývoj konidií v náhodně vybraných zorných polích mikroskopu. Při hodnocení byla využívána následující hodnotící indexová stupnice (GI).

Po zaznamenání individuálních indexů hodnocené populace byl stanoven průměrný G index a směrodatná odchylka výběru. Klíčivost (%) byla stanovena z podílu konidií s G indexem 0 (neklíčí) a všech ostatních indexů (G index 0,5 a vyšší).

Tabulka 9. Hodnotící indexová stupnice (GI)

G index	Charakteristika
0	Na konidiích nejsou zřejmé morfologické změny
0,5	Konidie jsou zřetelně protáhlejší, nabobtnalé; na konidii je zřetelný jednostranný klíček velikosti v poměru přibližně 1:0,5 k matečné konidii
1,0	Velikost klíčku na konidii je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie
1,5	Primární klíček je 2 – 3 krát delší než matečná konidie; na matečné konidii jsou zřejmé 2 kratší klíčky
2,0	Klíček je více než 3 krát tak dlouhý jako matečná konidie; sekundární větvení na jednom z klíčků; na matečné konidii jsou 2 dlouhé klíčky
2,5	Počátek sporulace (hodnoceno v několika částech zorného pole, sporadický výskyt struktur spojených se sporulací)
3,0	Plná sporulace (hodnoceno v několika částech zorného pole, pravidelný výskyt struktur se sporulací)

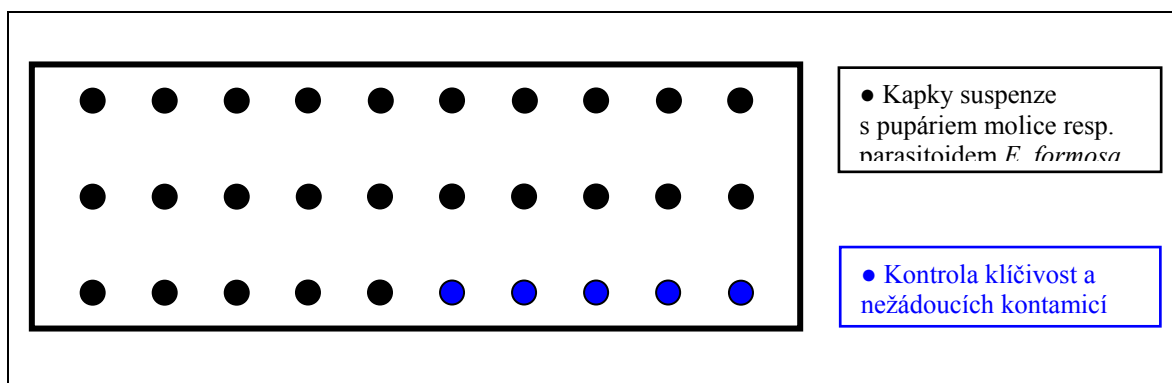
3.6. In vivo testy

a) Standardní laboratorní biotest – FDGI (Fungus Development and Growth Index - index vývoje a růst houby

Při hodnocení virulence konidií hub a v pokusech zaměřených na kompatibilitu hub a parazitoida *Encarsia formosa* byl použit laboratorní *in vivo* biotest na nymfách 4. instaru molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*). Princip biotestu spočívá v expozici nymf 4. instaru testovanému vzorku patogena v podmínkách sterilní vlhké komůrky a následnému hodnocení průběhu vývoje patogena pomocí indexové stupnice charakterizující klíčové fáze vývoje entomopatogenních hub obecně. Při tomto biotestu byly nymfy 4. instaru molice skleníkové, resp. parazitovaná pupária parazitoida *E. formosa* odebrány speciálně upravenou jehlou z povrchu spodní strany listů rostlin (okurka, fazol), přeneseny do kapky suspenze

konidií (adjustované na standardní titr $1,00 \times 10^7/\text{ml}$) na sterilním podložním sklíčku. Na každé sklíčko bylo umístěno 30 kapek (3 řady po 10 kapkách) a do 25 kapek byla umístěna vždy jedna nymfa molice nebo parazitované pupárium (5 kapek zůstává prázdných a slouží jako kontrola umožňující zachycení nežádoucích kontaminací). Sklíčka s nymfami v kapkách byla uzavřeny do vlhké komůrky (Petriho miska s vlhkým filtračním papírem na dně) a celý komplet byl uložen do termostatu. V pravidelných intervalech (každých 24 hodin) byla sklíčka vyjmuta z komůrek a každá kapka s nymfou byla individuálně vyhodnocena (světelný mikroskop). Pro každou hodnocenou suspenzi nebo pokusnou variantu byly zakládány 2 vlhké komůrky (50 nymf/hodnocený vzorek). Vývoj uvedených druhů entomopatogenních hub byl vyhodnocován ve 24 hodinových intervalech po dobu 3 – 5 dnů. Pro hodnocení byla využívána, pro tento účel speciálně navržená, indexová stupnice (Landa *et al.* 1994). Při hodnocení byl každé nymfě v jedné interakční zóně přidělen příslušný index a průběh vývoje patogena na hostiteli byl vyhodnocován formou denních průměrných indexů vývoje (FDG index \pm SEM).

Obrázek 7: Schéma umístění kapek suspenze na podložním sklíčku



Tabulka 10. Hodnotící stupnice FDG index \pm SEM

Fáze vývoje	FDG index	Charakteristika
Dormantní konidie (konidie bez zjevných změn)	0	Na konidiích nejsou zřejmé žádné morfologické změny; konidie v interakční zóně mají uniformní tvar
Aktivizace konidií (patogen není přímo asociován s hostitelem)	0,5	Na konidiích v interakční zóně kapky jsou zřetelné změny (velikost, tvar.); v hodnocené populaci jsou přítomny naklíčené konidie, klíček je drobný, jednostranný; velikostí nepřesahuje velikost matečné konidie
	1,0	Průměrná velikost klíčku konidií klíčících v interakční zóně dosahuje velikosti matečné Ovidie

Tvorba mycelia (parazitická fáze vývojového cyklu)	1,5	Na povrchu nymf jsou přítomna hyfová vlákna, která jsou prokazatelně v přímém kontaktu s tělem hostitele
	2,0	Nymfa je porostlá hustým myceliem
Sporulace (saprofytická fáze vývojového cyklu)	2,5	Na myceliu jsou zjištěny morfologické struktury související s počátkem sporulace
	3,0	Na myceliu jsou zjištěny morfologické struktury související s plnou sporulací

b) Standardní biotest využívající tritrofický systém „rostlina – molice skleníková – parazitoid *E. formosa*“

Kompatibilita vybraných kmenů entomopatogenních hub s parazitoidem *E. formosa* byla testována pomocí interakčního systému sestávajícího ze synchronizované populace molice skleníkové parazitované parazitoidem *Encarsia formosa*. Pro tyto pokusy byly z rostlin fazolu obecného umístěných v chovech molice skleníkové, resp. v udržovacím chovu parazitoida *E. formosa* odebírány listy, na kterých byla dominantně přítomna neparazitovaná (bílá) nebo parazitovaná (černá) puparia molice skleníkové. Listy s pupárii byly namáčený do suspenze konidií vybraných kmenů entomopatogenních hub a po následném oschnutí povrchu byly umístěny do vlhkých komůrek (plastové krabice se zvlhčeným filtračním papírem na dně). Krabice s listy byly umístěny do klimatizované skříně temperovaných na $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (fotoperioda 16/8 hod). Po 5ti dnech byly listy z krabic vyndány a pomocí binokulárního mikroskopu byly pokusy vyhodnoceny. Při hodnocení byla každá z larev zařazena do příslušné skupiny, přičemž byly zvláště zaznamenávány larvy živé, vylíhlá puparia, larvy (zjevně) infikované a larvy prokazatelně mrtvé, které však nevykazovaly přímou přítomnost patogena, nicméně jejichž usmrcení byla patogenem pravděpodobně způsobeno (atypické barvy, změny tvaru apod.).

V závěrečné sérii pokusů byly použity standardní in vivo testy využívající kompletní tritrofický systém, ale s namáčením celých rostlin do suspenze vybraných kmenů hub. Pro tyto účely byly rostliny fazolu obecného předpěstovány do stádia plně vyvinutých děložních listů a v této fázi byly na 24 hod exponovány samičkám molice skleníkové. Po 24 hodinách byly samičky molic odebrány pomocí exhaustoru a rostliny byla na dobu 8-10 dnů umístěny do izolátorů zamezujících kolonizaci molicemi nebo parazitoidem *E. formosa*. Po 8-10 dnech byly rostliny z izolátorů přemístěny do místnosti s parazitoidem *E. formosa*, kde byly ponechány až do doby, kdy byla na povrchu rostlin zaznamenána přítomnost černých puparií

indikujících přítomnost parasitoida ve fázi kukly uvnitř hostitele. V této fázi byly rostliny namáčeny do suspenzí konidií vybraných kmenů entomopatogenních hub a po ošetření byly umístěny do plastových izolátorů a na dobu 5 dnů přemístěny do klimatizovaného boxu. Po 5 dnech inkubace byly z rostlin odstříženy listy a stav populace molice skleníkové resp. parasitoida *E. formosa* byl vyhodnocen pomocí binokulárního mikroskopu. Při vyhodnocování biotestu byla hodnocena pouze pupária, která byla tříděna do kategorií živá, vylíhlá, mrtvá a infikované.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. Standardní laboratorní test – GI (Germination Index, index klíčivosti)

Klíčivost vybraných druhů entomopatogenních hub

Základní údaje k pokusu:

- byly použity 14denní kultury druhů (*Aschersonia sp.*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Lecanicilium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumoroseus*).
- byly připraveny standardní suspenze konidií testovaných druhů ($1,00 \times 10^7$ v 1 ml suspenze)
- suspenze jednotlivých variant byly naneseny ve formě kapek na sterilní podložní skříčko s 2 % agarem, skříčka byla uložena v termostatu
- z každé varianty bylo vyhodnoceno 100 konidií a byl vypočítán průměrný index klíčivosti se směrodatnou odchylkou

Tabulka 11: Klíčivost vybraných druhů entomopatogenních hub po 24 hodinách

a) *Beauveria bassiana* 01

Konidie č.									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Klíčivosti. 100 %					Průměrný index vývoje: GI 1,5 ± 0,0000				

b) *Beauveria bassiana* PK PŮV

Konidie č.									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0
1,5	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0
1,5	1,0	1,5	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
1,0	1,5	1,5	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,0	1,5
1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0	1,5
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0
1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0
1,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0
1,5	1,5	1,0	1,5	1,5	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0
Klíčivost: 100 %					Průměrný index vývoje: GI 1,19 ± 0,2357				

c) *Beauveria brongniartii* M 092

Konidie č.									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
0	1,0	0	0	1,0	1,5	1,5	1,5	0,5	1,0
0	1,0	0	0	1,0	1,5	1,5	1,5	0,5	1,0
0	1,0	0	0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,0	1,0
1,5	1,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	0	1,0	1,0
1,5	1,5	0,5	0	0,5	1,0	1,5	0	0,5	1,5
1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	0,5	0	0,5
0,5	0,5	0	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	1,5	0,5
0,5	0,5	0	1,0	0	0,5	1,0	0	1,5	0,5
0	0	0,5	0,5	0	1,0	1,5	1	0,5	0,5
1,0	1,0	1,0	0	0,5	1,5	1,0	1,0	1,0	0,5
Klíčivost: 79 %					Průměrný index vývoje: GI 0,75 ± 0,3333				

d) *Lecanicillium lecanii* I9

Konidie č.									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Klíčivost: 100 %					Průměrný index vývoje: GI 2,00± 0,0				

e) *Metarhizium anisopliae* M 192

Konidie č.									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
0	0,5	0	1,5	1,5	1,0	2,0	0	1,5	0
0	0	0	0,5	1,5	1,5	0	0	0,5	0
0	0	0	0	2	0,5	0,5	0,5	0	0
0	0	0,5	0	0,5	0,5	1,0	0,5	0	0
0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0,5
0	0	0	0	0	1,5	0,5	0	0,5	0,5
0	0	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0
0	0	2,0	1,5	0	1,5	0	0,5	0,5	0
0	0	0,5	0	0	0	0	0	0,5	0,5
0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,5
Klíčivost: 40 %					Průměrný index vývoje: GI 0,27 ± 0,3843				

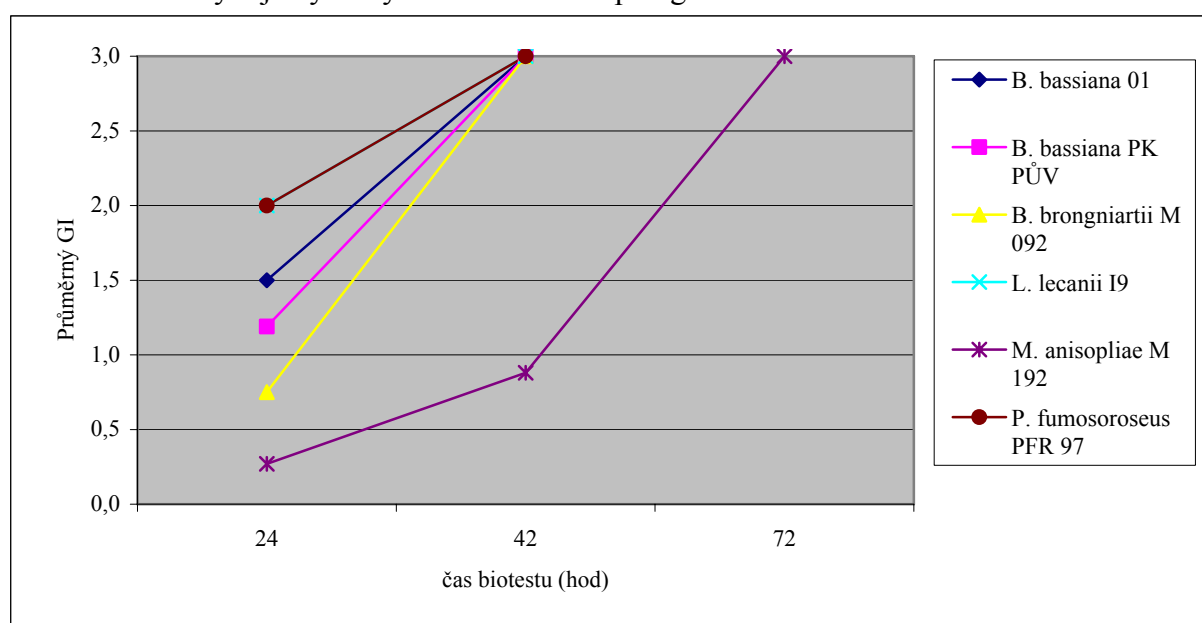
f) *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B

Konidie č.									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Klíčivost: 100 %					Průměrný index vývoje: GI 2,00 ± 0,0				

Tabulka 12: Hodnocení vitality kmenů použitých v pokusech (klíčivost a vývoj, in vitro test, 24 hod).

Druh	Kmen	GI ± STDV	Klíčivost %
<i>Beauveria bassiana</i>	01	1,5±0,0	100
<i>Beauveria bassiana</i>	PK PŮV	1,19±0,2357	100
<i>Beauveria brongniartii</i>	M 092	0,75±0,3333	79
<i>Lecanicillium lecanii</i>	I9	2,00±0,0000	100
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M 192	0,27±0,3843	40
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR 97 2B	2,00±0,0	100

Graf 1: Průběh vývoje vybraných druhů entomopatogenních hub



Zhodnocení pokusu:

Všechny hodnocené kmeny vykázaly v in-vitro testu klíčivosti vysokou vitalitu a 100% klíčivost převážně již po 24 hodinách, výjimečně po 48 hodinách. Výjimku představoval pouze kmen M 192 houby *Metarhizium anisopliae*, který se vyvíjel zřetelně pomaleji. Kmen houby *Beauveria bassiana* 01 dosáhl v intervalu 24 hodin indexu klíčivosti 1,5 zatímco kmen *Beauveria bassiana* PK PŮV dosáhl pouze 1,19. Oba kmeny dosáhly plné sporulace (GI – 3,0) za 48 hodin. Kmen *Beauveria brongniartii* M 092 dosáhl po 24 hodinách průměrného indexu klíčivosti 0,75 a stádia plné sporulace dosáhl také po 48 hodinách. U konidií *Metarhizium anisopliae* M 192 byl zaznamenán velmi pozvolný nárůst indexu klíčivosti (0,24 po 24 hod, a 0,88 po 48 hod), ale po 72 hod. i tento kmen dosáhl fáze plné sporulace. Nejrychlejší vývoj vykázaly oba kmeny hub *P. fumosoroseus* a *L. lecanii*. U kmenů hub *Lecanicillium lecanii* I9 a *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B došlo v intervalu 24 hodin k dosažení fáze tvorby mycelia (GI 2,0) a plné sporulace po 48 hod.

4.2. Standardní laboratorní biotest – FDGI (Fungus development and growth index)

Vývoj vybraných druhů entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové

Základní údajek pokusu:

- larvy odebrány z listů, které byly omyty ve vlažné vodě s přípravkem jaru, aby byla odstraněna medovice
- po oschnutí jsou puparia molice skleníkové přenesena do kapky suspenze konidií testovaného druhu patogena na sterilní podložním sklíčku
- na každé sklíčko je nanášeno 30 kapek testované suspenze
- do 25 kapek je sterilní jehlou přeneseno puprium molice skleníkové, 5 kapek slouží jako kontrola klíčivosti
- sklíčka jsou vložena do vlhké komůrky, do plastického sáčku a uložena do termostatu (vytemperovaného na požadovanou teplotu)
- vyhodnocení probíhá pomocí světelného mikroskopu
- každému puparium molice skleníkové je přiřazen příslušný index FDGI (0 – 3, v intervalu 0,5), který charakterizuje klíčivou fázi vývoje houby

Tabulka 13: Klíčivost vybraných druhů entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové

Beauveria bassiana PK PŮV

Nymfa č.	Trvání biotestu (hod.)		
	24	42	72
1.	0	0,5	1,0
2.	0	1,0	1,5
3.	0	1,5	1,5
4.	0	0,5	1,0
5.	0	1,0	1,5
6.	0	1,5	2,5
7.	0	1,5	1,5
8.	0	1,0	1,5
9.	0	1,5	2,0
10.	0	1,5	1,5
11.	0	1,5	2,0
12.	0	1,5	2,0
13.	0	1,5	1,5
14.	0	0,5	1,5
15.	0	1,5	2,0
16.	0	1,5	2,0
17.	0	1,5	2,0
18.	0	1,5	1,5
19.	0	2	2,5
20.	0	1,5	1,5
21.	0	2,0	3,0
22.	0,5	1,5	2,0
23.	0	1,5	2,5
24.	0	1,5	2,0
25.	0	1,0	1,5
Průměr	0,02	1,34	1,80
stdv	0,0979	0,3929	0,4690

Beauveria brongniartii M 092

Nymfa č.	Trvání biotestu (hod.)		
	24	42	72
1.	0,5	1,5	2,0
2.	0	1,0	1,5
3.	0,5	1,5	2
4.	0	1,0	1,5
5.	1,0	1,5	2,0
6.	1,5	1,5	1,5
7.	0	1,0	1,5
8.	0,5	1,0	1,5
9.	1,0	1,0	1,5
10.	1,0	1,5	1,5
11.	0,5	1,0	1,5
12.	0,5	1,0	2,0
13.	0,5	1,0	1,5
14.		1,0	1,5
15.	0,5	1,0	1,5
16.	0,5	1,0	1,5
17.	0,5	1,5	2,0
18.	1,0	1,5	2,0
19.	1,0	1,5	1,5
20.	0	1,5	2,0
21.	0	1,5	1,5
22.	0	1,5	1,5
23.	1,0	1,0	1,5
24.	0,5	1,0	1,5
25.	1,0	1,5	2,0
Průměr	0,56	1,24	1,66
stdv	0,4161	0,2498	0,2332

Lecanicillium lecanii I9

Nymfa č.	Trvání biotestu (hod.)		
	24	42	72
1.	0,5	1,0	1,5
2.	0,0	1,0	1,5
3.	0,5	1,0	1,5
4.	0,0	1,0	1,5
5.	0,0	1,0	1,5
6.	0,5	1,5	2,0
7.	0,0	1,0	1,5
8.	0,5	1,5	2,0
9.	0,5	1,0	2,0
10.	0,5	1,5	2,5
11.	0,5	1,5	1,5
12.	0,5	1,5	1,5
13.	0,5	1,0	1,5
14.	0,5	1,5	1,5
15.	0,5	1,5	2,0
16.	0,0	1,0	2,0
17.	0,5	1,5	1,5
18.	0,5	1,5	1,5
19.	1,0	1,0	1,5
20.	0,0	1,0	1,5
21.	0,5	1,5	1,5
22.	0,0	1,5	1,5
23.	1,0	1,5	1,5
24.	0,0	1,5	1,5
25.	0,5	1,5	2,0
Průměr	0,38	1,28	1,66
stdv	0,2925	0,2481	0,2727

Metarhizium anisopliae M 192

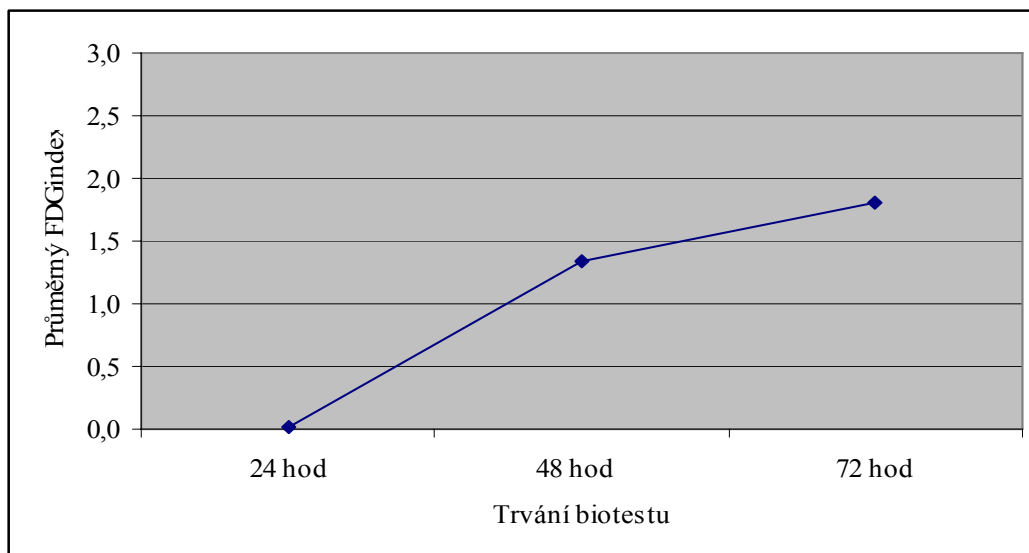
Nymfa č.	Trvání biotestu (hod.)		
	24	42	72
1.	0,0	0,5	1,0
2.	0,0	0,5	1,0
3.	0,0	0,5	1,0
4.	0,0	0,5	1,0
5.	0,0	0,5	1,0
6.	0,0	0,5	1,0
7.	0,0	0,5	1,0
8.	0,5	1,0	1,5
9.	0,5	1,0	1,5
10.	0,5	1,0	1,5
11.	0,0	0,5	1,0
12.	0,0	0,5	1,0
13.	0,0	0,5	1,0
14.	0,0	0,5	1,0
15.	0,0	0,5	1,0
16.	0,0	0,5	1,0
17.	0,0	0,5	1,0
18.	0,5	1,0	1,5
19.	0,5	1,0	1,5
20.	0,5	1,0	1,5
21.	0,0	0,5	1,0
22.	0,5	1,0	1,5
23.	0,5	1,5	2,0
24.	0,5	1,0	1,5
25.	0,0	0,5	1,0
Průměr	0,18	0,70	1,20
stdv	0,2400	0,2828	0,2828

Paecilomyces fumosoroseus PFR 97 2B

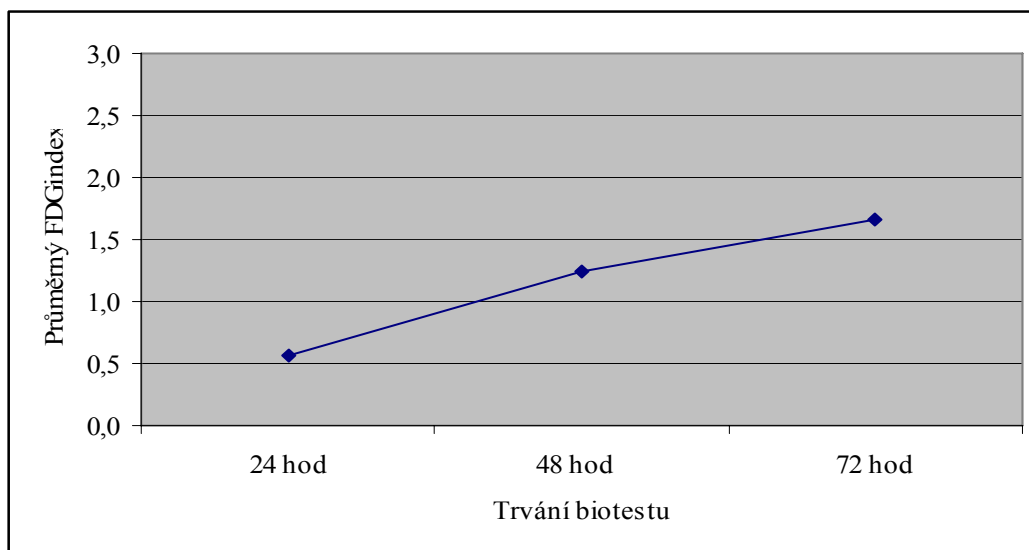
Nymfa č.	Trvání biotestu (hod.)		
	24	42	72
1.	0,0	0,5	1,0
2.	0,0	1,0	1,5
3.	0,0	1,5	2,0
4.	0,0	1,5	1,5
5.	0,0	1,0	1,5
6.	0,5	1,5	1,5
7.	0,0	1,0	1,5
8.	0,0	1,0	1,5
9.	0,0	1,5	2,0
10.	0,0	0,5	1,5
11.	0,0	1,5	1,5
12.	0,0	1,5	2,5
13.	0,5	1,5	3,0
14.	0,0	1,5	1,5
15.	0,0	1,5	3,0
16.	0,0	1,5	3,0
17.	0,0	1,5	1,5
18.	0,0	2,0	1,5
19.	0,0	1,5	2,0
20.	0,5	1,5	1,5
21.	0,0	1,5	2,0
22.	0,0	1,5	1,5
23.	0,0	1,5	1,5
24.	0,0	1,5	1,5
25.	0,0	1,5	2,0
Průměr	0,06	1,36	1,8
stdv	0,1624	0,3322	0,5291

Graf 2: Vývoj vybraných druhů entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové *Trialeuodes vaporariorum* (standardní laboratorní biotest)

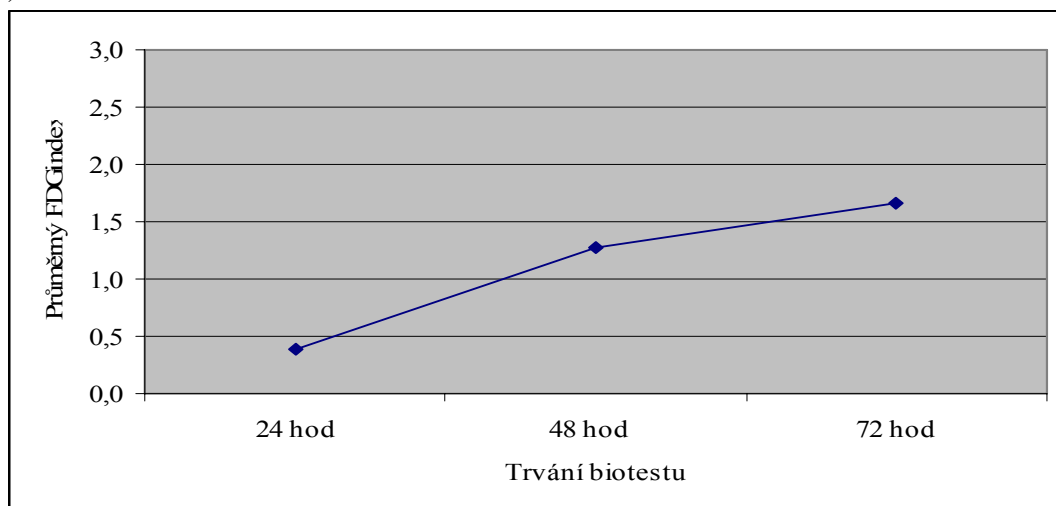
a) *Beauveria bassiana* PK PŮV



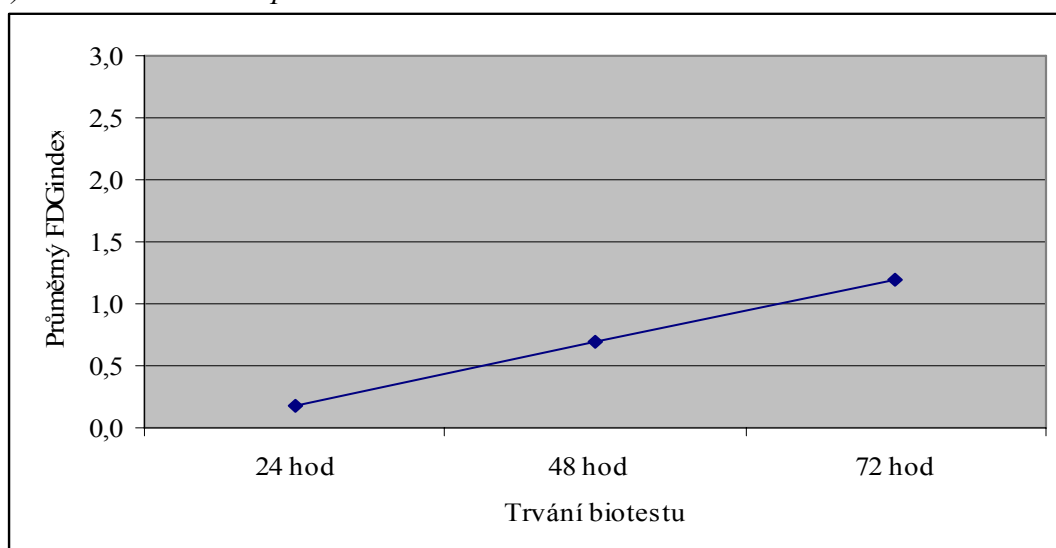
b) *Beauveria brongniartii* M 092



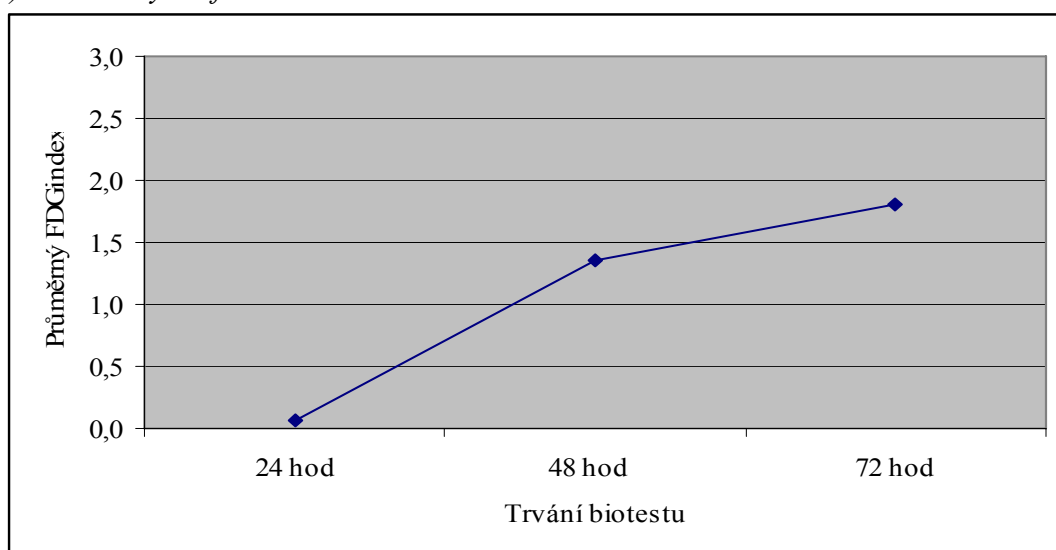
c) *Lecanicillium lecanii* I9



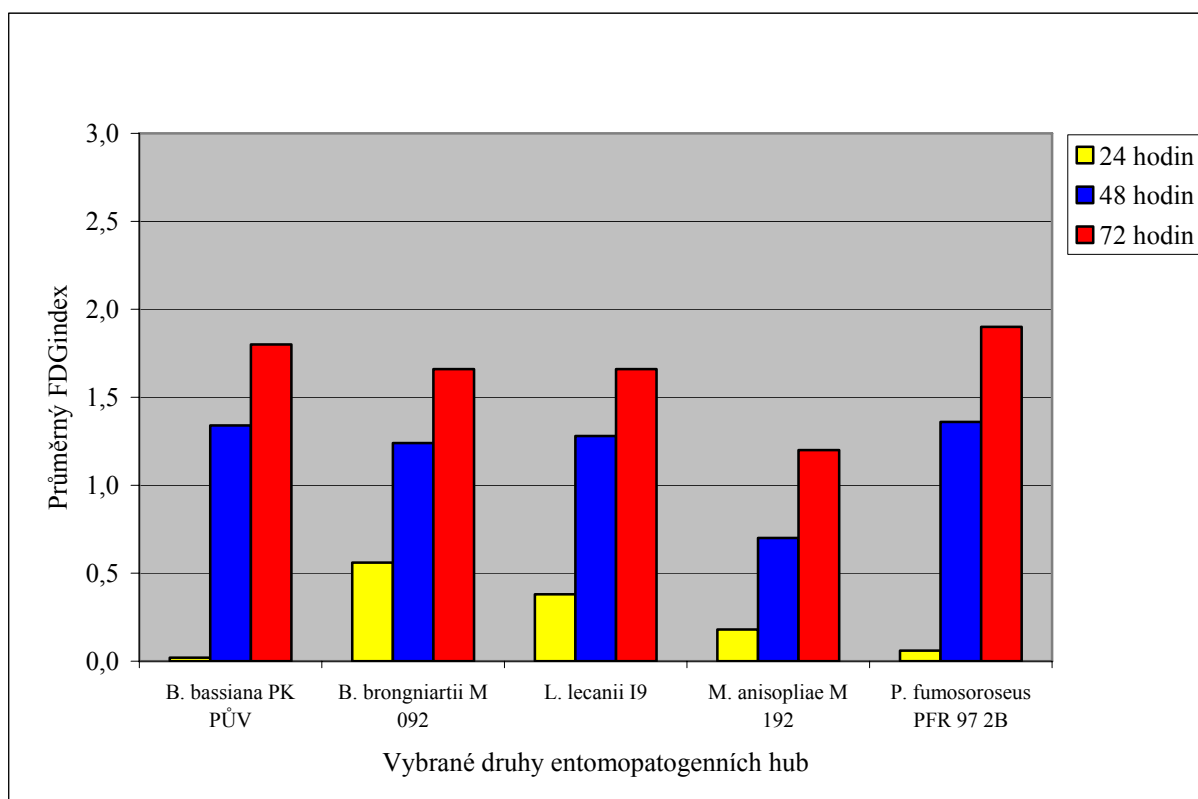
d) *Metarhizium anisopliae* M 192



e) *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B



Graf 3: Porovnání vývoje vybraných druhů entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové *Trialerodes vaporariorum* (standardní laboratorní bitest)



Zhodnocení pokusu:

Celý pokus byl realizován na larvách 4. instaru molice skleníkové. U kmene houby *Beauveria bassiana* PK PŮV v intervalu 24 hodin nebyl zaznamenán nárůst patogena, nicméně po 48 a 72 hodinách se vývoj patogena výrazně urychlil a dosíhl průměrných hodnot 1,34 resp. 1,8. Kmen *Beauveria brongniartii* M 092 dosáhl po 24 hodinách průměrného FDG indexu 0,5 a po 48 hodinách dosahovaly průměrné hodnoty FDG indexu 1,56 (růst mycelia na povrchu hostitele). Po 72 hodin byl zaznamenán další nárůst až na průměrnou hodnotu 1,66. V případě kmene M 192 houby *Metarhizium anisopliae* byl zaznamenán pomalý vývoj hodnot průměrných indexů FDG (0,18 – 24 hod, 0,7 - 48 a 1,2 po 72 hod). U kmenů hub *Lecanicillium lecanii* I9 a *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B došlo v intervalu 48 hodin k nárůstu průměrného FDG index na hodnoty blízké 1,5 a po 72 hod byla zaznamenána průměrná hodnota u kmene *L. lecanii* I9 1,7 a u kmene *P. fumosoroseus* PFR 97 2B FDG index 1,8. V populacích molic ošetřených jak houbou PFR, tak i houbou *L. lecanii* byl po 72 hodinách zaznamenán výskyt nymf porostlých sporulujícím myceliem (FDG index 3,0).

4.3. STANDARDNÍ LABORATORNÍ BIOTEST – FDGI

Kompatibilita vybraných druhů entomopatogenních hub s parazitoidem *Encarsia formosa*

Základní údajek pokusu:

- larvy molice skleníkové infikovány parazitoidem *Encarsia formosa*, odebrány z listů, které byly omyty ve vlažné vodě s přípravkem jaru, aby byla odstraněna medovice
- po oschnutí jsou puparia molice skleníkové s parazitoidem přenesena do kapky suspenze konidií testovaného druhu patogena na sterilní podložním sklíčku
- na každé sklíčko je nanášeno 30 kapek testované suspenze
- do 25 kapek je sterilní jehlou přeneseno puprium molice skleníkové, 5 kapek slouží jako kontrola klíčivosti
- sklíčka jsou vložena do vlhké komůrky, do plastického sáčku a uložena do termostatu (vytemperovaného na požadovanou teplotu)
- vyhodnocení probíhá pomocí světelného mikroskopu
- každému pupariumolice skleníkové je přiřazen příslušný index FDGI (0 – 3, v intervalu 0,5), který charakterizuje klíčovou fází vývoje houby

Tabulka 14: Klíčivost vybraných druhů entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové parazitovaných parazitoidem *Encarsia formosa*

a) *Beauveria bassiana* 01

Nymfa č.	Trvání biotestu		
	24 hod	42 hod	72 hod
1.	0,0	1,0	1,5
2.	1,0	1,5	2,0
3.	0,0	0,5	1,0
4.	0,5	1,0	2,0
5.	0,0	0,5	1,0
6.	0,0	0,5	1,5
7.	0,5	1,0	1,5
8.	0,5	1,0	2,0
9.	0,5	1,0	2,0
10.	0,0	0,5	1,0
11.	0,5	1,0	1,0
12.	0,5	1,0	1,5
13.	0,0	0,5	1,0

b) *Beauveria brongniartii* M 092

Nymfa č.	Trvání biotestu		
	24 hod	42 hod	72 hod
1.	0,0	0,5	1,0
2.	0,5	1,0	1,5
3.	0,5	1,0	1,5
4.	0,0	0,5	1,0
5.	0,5	1,0	1,5
6.	0,5	1,0	1,5
7.	0,5	1,0	1,5
8.	0,0	0,5	1,0
9.	0,0	0,5	1,0
10.	0,0	0,5	1,0
11.	0,5	1,0	1,5
12.	0,5	1,0	1,5
13.	0,0	0,5	1,0

a) *Beauveria bassiana* 01 pokračování

14.	0,5	1,0	1,5
15.	0,0	0,5	1,0
16.	0,0	1,0	1,5
17.	0,5	1,0	1,5
18.	0,5	1,0	1,5
19.	1,0	1,5	2,0
20.	0,5	1,5	2,0
21.	0,0	1,0	1,5
22.	1,0	1,5	2,0
23.	0,5	1,0	1,5
24.	0,5	1,0	1,5
25.	0,5	1,0	1,5
Průměr	0,0	1,0	1,5
stdv	0,3249	0,3136	0,36

b) *Beauveria brongniartii* M 092 pokračování

14.	0,5	1,0	1,5
15.	1,0	1,5	2,0
16.	1,0	1,5	2,0
17.	0,5	1,0	1,5
18.	0,5	1,0	1,5
19.	0,0	0,5	1,0
20.	0,5	1,0	1,5
21.	0,0	0,5	1,0
22.	0,5	1,0	1,5
23.	1,0	1,5	2,0
24.	0,5	1,0	1,5
25.	1,0	1,5	2,0
Průměr	0,42	0,92	1,42
stdv	0,3370	0,3370	0,3370

c) *L. lecanii* I9

Nymfa č	Trvání biotestu		
	24 hod	42 hod	72 hod
1.	1,0	1,5	2,0
2.	0,5	1,0	1,5
3.	0,5	1,0	1,5
4.	1,0	1,5	2,0
5.	0,5	1,0	1,5
6.	1,0	1,5	2,0
7.	1,0	1,5	2,0
8.	1,0	1,5	2,0
9.	1,0	1,5	2,0
10.	1,0	1,5	2,0
11.	1,0	1,5	2,0
12.	0,5	1,0	1,5
13.	1,0	1,5	2,0
14.	1,0	1,5	2,0
15.	0,5	1,0	1,5
16.	1,0	1,5	2,0
17.	1,0	1,5	2,0
18.	1,5	2,0	2,5
19.	1,5	2,0	2,5
20.	1,5	2,0	2,5
21.	1,0	1,5	2,0
22.	1,0	1,5	2,0
23.	1,0	1,5	2,0
24.	1,0	1,5	2,0
25.	1,0	1,5	2,0
Průměr	0,96	1,46	1,96
stdv	0,28	0,28	0,28

d) *M. anisopliae* M192

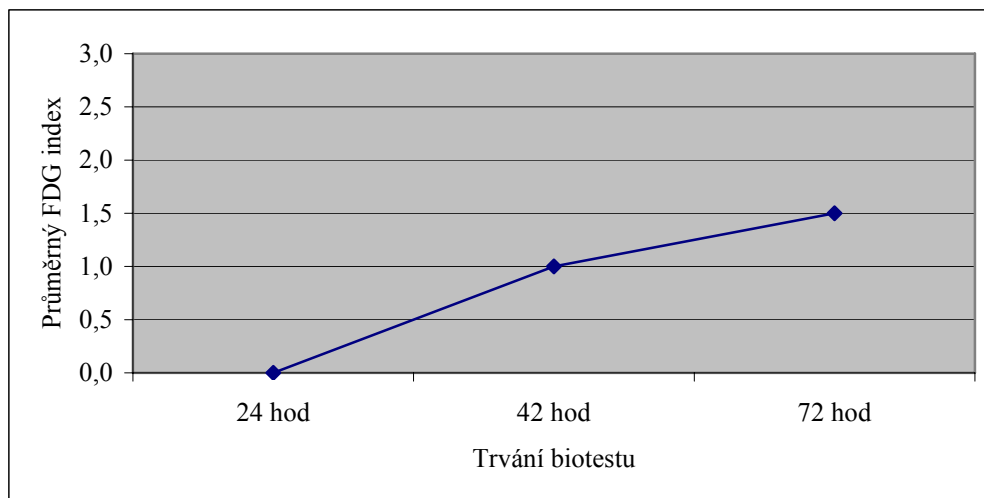
Nymfa č	Trvání biotestu		
	24 hod	42 hod	72 hod
1.	0,0	0,5	1,0
2.	0,0	0,5	1,0
3.	0,0	0,5	1,0
4.	1,0	1,5	2,0
5.	0,0	0,5	1,0
6.	0,0	0,5	1,0
7.	0,5	1,0	1,5
8.	0,0	0,5	1,0
9.	0,5	1,0	1,5
10.	0,5	1,0	1,5
11.	0,0	0,5	1,0
12.	0,5	1,0	1,5
13.	0,0	0,5	1,0
14.	0,0	0,5	1,0
15.	0,0	0,5	1,0
16.	0,0	0,5	1,0
17.	1,0	1,5	2,0
18.	0,0	0,5	1,0
19.	0,0	0,5	1,0
20.	0,5	1,0	1,5
21.	0,0	0,5	1,0
22.	0,5	1,0	1,5
23.	0,0	0,5	1,0
24.	0,0	0,5	1,0
25.	0,0	0,5	1,0
Průměr	0,20	0,70	1,20
stdv	0,3162	0,3162	0,3162

e) *P. fumosoroseus* PFR 97 2B

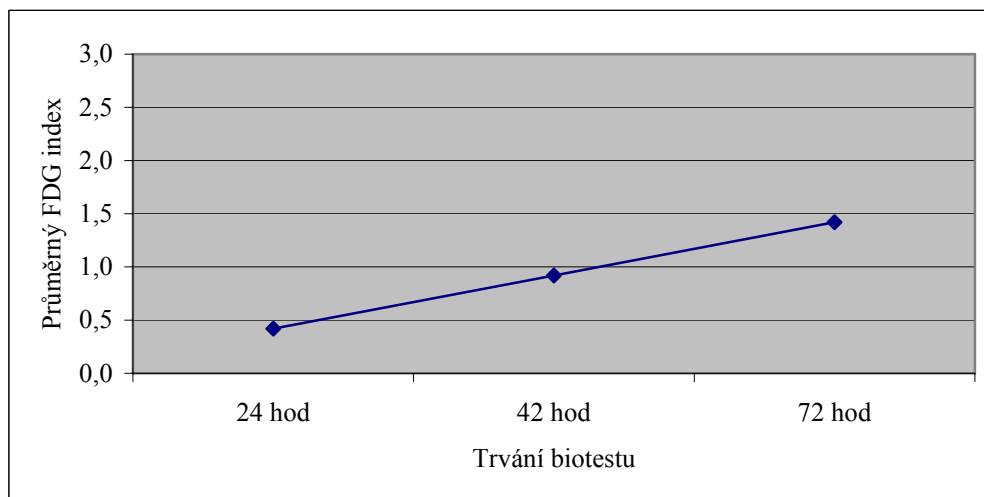
Nymfa č	Trvání biotestu		
	24 hod	48 hod	72 hod
1.	1,0	2,0	2,5
2.	1,5	2,0	2,5
3.	1,5	2,0	2,5
4.	1,5	2,0	2,5
5.	1,0	1,5	1,5
6.	0,5	1,0	1,5
7.	1,5	2,0	2,5
8.	1,5	2,0	2,5
9.	1,5	2,0	2,5
10.	1,5	2,0	2,5
11.	0,5	1,0	1,5
12.	1,0	2,0	2,5
13.	1,0	1,5	2,0
14.	1,5	2,0	2,5
15.	1,5	2,0	2,5
16.	1,0	2,0	2,5
17.	1,5	2,0	2,5
18.	1,0	1,5	2,0
19.	1,5	2,0	2,5
20.	1,5	2,0	2,5
21.	1,5	2,0	2,5
22.	1,0	2,0	2,5
23.	1,5	2,0	2,5
24.	1,0	2,0	2,5
25.	1,5	2,0	2,5
Průměr	1,26	1,86	2,34
stdv	0,32	0,3006	0,3366

Graf 3: Vývoj vybraných druhů entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitovaných paraztoidem *Encarsia formosa*

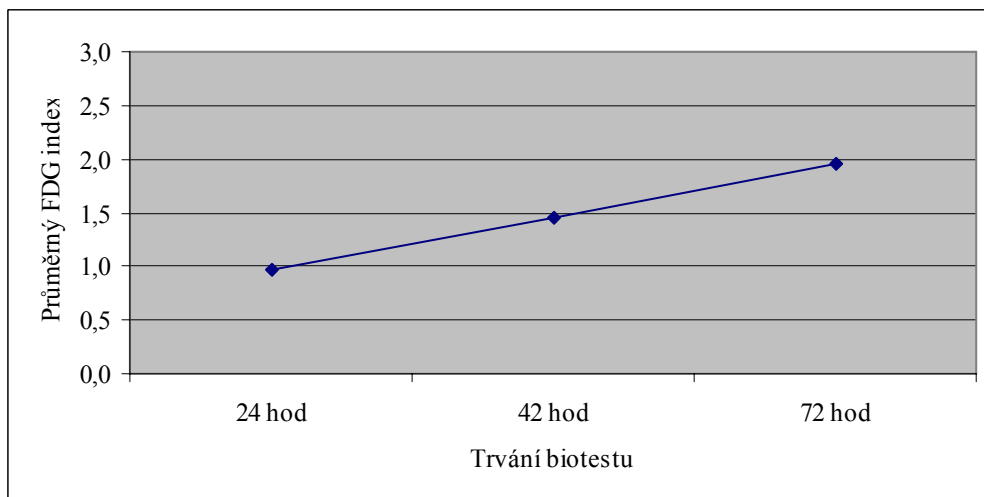
a) *Beauveria bassiana* 01



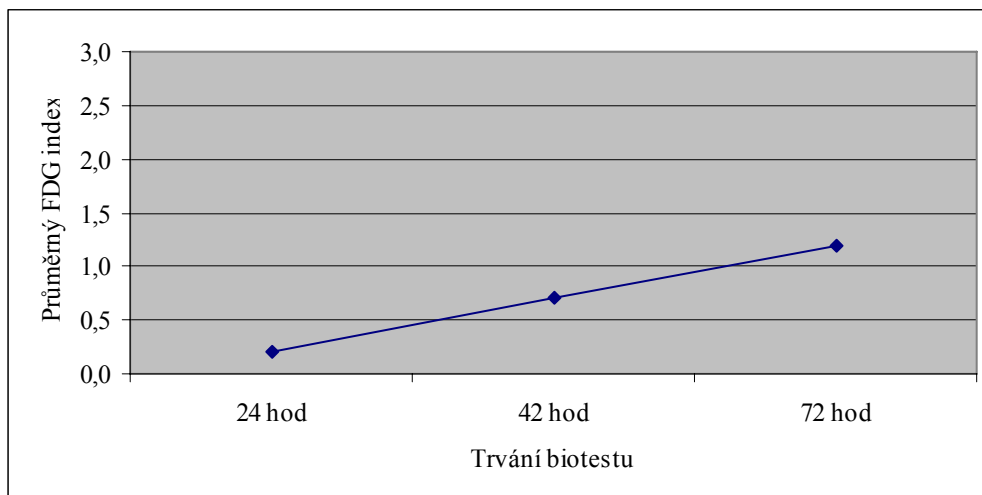
b) *Beauveria brongniartii* M 092



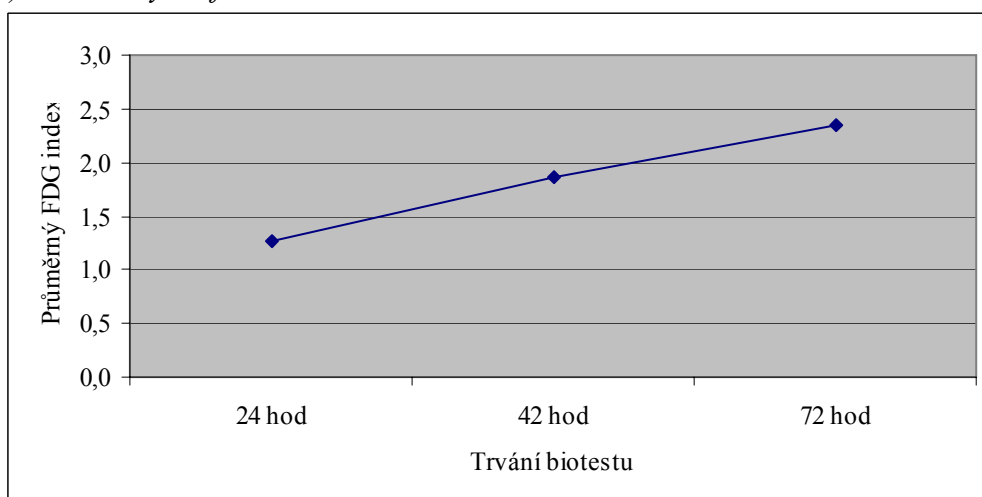
c) *Lecanicillium lecanii* I9



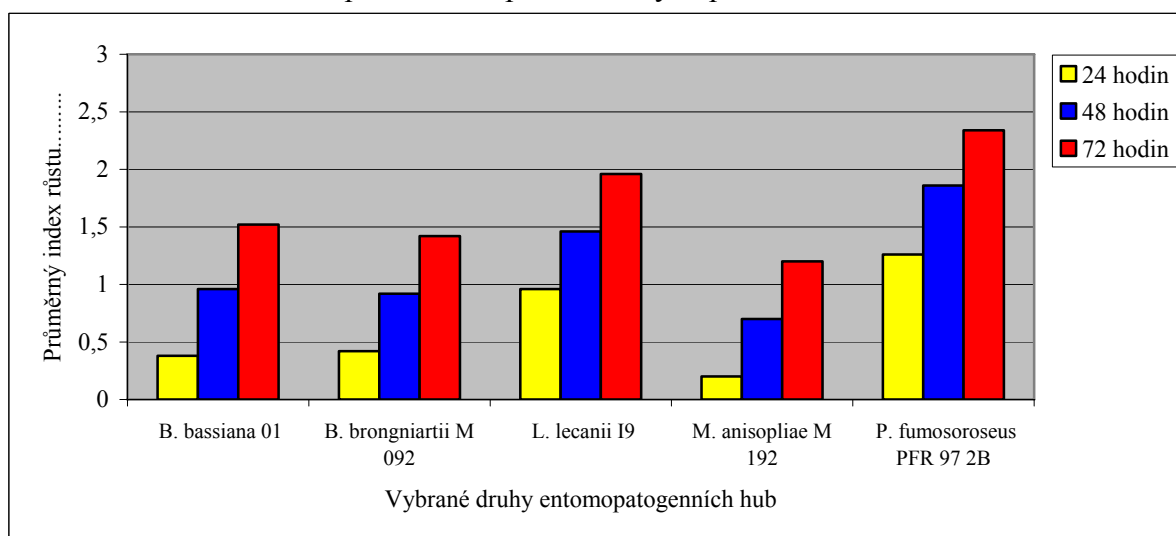
d) *Metarhizium anisopliae* M192



e) *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B



Graf 4: Porovnání vývoje vybraných druhů entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitovaných paraztoidem *Encarsia formosa*



Zhodnocení pokusu:

Tento pokus byl prováděn na larvách 4. instaru molice skleníkové parasitovaných parazitickou vosičkou *Encarsia formosa*. U kmene houby *Beauveria bassiana* PK PŮV v intervalu 24 hodin dosahoval průměrný index 0,38. V intervalu 48 hodin průměrný index vývoje dosáhl hodnoty 0,96. Po 72 hodinách kmen dosáhl průměrného indexu 1,52. Kmen *Beauveria brongniartii* M 092 dosáhl po 24 hodinách indexu vývoje 0,42. Po 48 hodinách hodnoty dosahovaly indexu 0,92. V intervalu 72 hodin byl nárůst až na průměrnou hodnotu 1,42. Po aplikaci konidií *Metarhizium anisopliae* M 192 byl zaznamenán pozvolný růst indexu vývoje. Po 48 hodinách dosáhl tento kmen indexu vývoje pouze 0,7 a po 72 hodinách byl zaznamenán nárůst FDG indexu na hodnotu 1,2. U kmene *Lecanicillium lecanii* I9 dosahovaly hodnoty po 24 hodinách průměrného indexu 0,96. Po 48 hodinách 1,46 a po 72 1,96. *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B došlo v intervalu 24 hodin k nárůstu FDG indexu na průměrnou hodnotu 1,26. Po 48 hodinách dosahovaly hodnoty 1,96 a za 72 hodin byla zaznamenána hodnota 2,34. Všechny hodnocené kmeny vykázaly v testu nárůst na index klíčivosti o hodnotách minimálně 1,5. Tato hodnota způsobuje usmrcení jak larev molice skleníkové tak i parazitoida *Encarsia formosa*.

4.4. STANDARDNÍ BIOTEST VYUŽÍVAJÍCÍ TRITROFICKÝ SYSTÉM „ROSTLINA – MOLICE SKLENÍKOVÁ – PARAZITOID *E. FORMOSA*“

a) Kompatibilita entomopatogenních hub a parazitoida *Encarsia formosa* – standardní laboratorní biotest na listech

Základní údaje k pokusu:

- Listy fazolu obecného průběžně odebírané z rostlin v kontinuálním chovu parazitoida *E. formosa* (listy s dominantní přítomností parasitovaných - nymf 4 instaru), resp. v chovu molice skleníkové (listy s dominantní přítomností nymf 4 instaru)
- Vybrané listy byly omyty sterilním roztokem Tween 80 (0,05%) a po oschnutí byly na 5 sekund ponořeny do suspenze konidií vybraných kmenů hub (všechny suspenze byly adjustované na stejný titr 1.0×10^6 konidií/ 1 ml)
- Po namočení byly listy položeny na filtrační papír a ponechány ve flowboxu do oschnutí a následně byly přemístěny do plastových kontejnerů a položeny na povrch sterilního filtračního papíru

- Vlhké komůrky byly na dobu 5 dnů umístěny do klimatizovaného boxu ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 16/8 hod fotoperioda)
- Po 5ti denní inkubaci byl pomocí binokulárního mikroskopu vyhodnocen stav populací, přičemž byla každá nymfa 4 instaru na listě zařazena do jedné z kategorií 1) živá, 2) vylíhlá, 3) mrtvá a 4) infikovaná

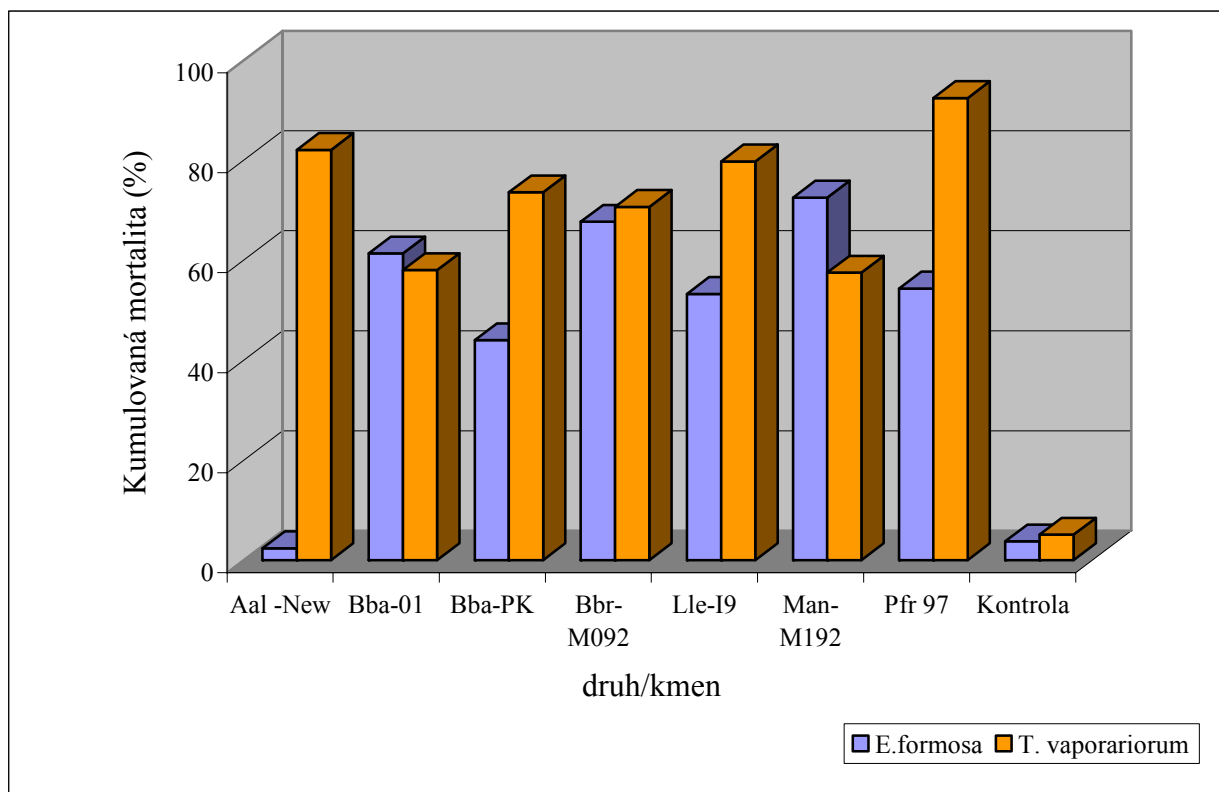
Tabulka 15: Účinnost vybraných druhů entomopatogenních hub na ne parazitovaná pupária molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum*

Druh	Kmen	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> - ne parazitované nymfy 4 instaru					
		Celkem	Živé	Vylíhlé	Mrtvé	Infikované	Mortalita celkem (%)
<i>A. aleyrodis</i>	New	496	73	16	21	386	82,06
<i>B. bassiana</i>	01	350	99	48	17	186	58,00
<i>B. bassiana</i>	PK PŮV	348	37	55	45	211	73,56
<i>B. brongniatii</i>	M 092	208	17	44	25	122	70,67
<i>L. lecanii</i>	I9	321	16	49	9	247	79,75
<i>M. anispliae</i>	M 192	426	78	103	152	93	57,51
<i>P. fumosoroseus</i>	PFR 97	371	7	21	34	309	92,45
Kontrola	Tween	334	106	211	14	3	5,09

Tabulka 15: Účinnost vybraných druhů entomopatogenních hub na pupária molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitovaná parazitoidem *Encarsia formosa*.

Druh	Kmen	<i>Encarsia formosa</i> - parazitované nymfy 4 instaru					
		Celkem	Živé	Vylíhlé	Mrtvé	Infikované	Mortalita celkem (%)
<i>A. aleyrodis</i>	New	380	198	173	9	0	2,37
<i>B. bassiana</i>	01	238	29	63	34	112	61,34
<i>B. bassiana</i>	PK PŮV	282	54	104	7	117	43,97
<i>B. brongniatii</i>	M 092	294	53	42	12	187	67,69
<i>L. lecanii</i>	I9	340	77	82	5	176	53,24
<i>M. anispliae</i>	M 192	262	48	24	159	31	72,52
<i>P. fumosoroseus</i>	PFR 97	254	70	46	5	133	54,33
Kontrola	Tween	294	96	187	8	3	3,74

Graf 5: Porovnání mortality indukované různými druhy/kmeny entomopatogenních hub v populaci ne parazitovaných nymf 4. instaru molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* s mortalitou v populaci nymf parazitovaných parazitoidem *Encarsia formosa*



Zhodnocení pokusu:

S výjimkou kmene M192 houby *Metarhizium anisopliae* vyvolaly všechny další kmeny vybraných druhů entomopatogenních hub vyšší mortalitu v populacích L4 ne parazitovaných než v populaci L4 parazitovaných parazitoidem *E. formosa*. Nejvyšší stupeň kompatibility prokázala houba *Aschersonia aleyrodis*, která v populaci ne parazitovaných nymf vyvolala mortalitu více než 82%, zatímco v populaci nymf parazitovaných parazitoidem *E. formosa* vyvolala mortalitu srovnatelnou s mortalitou v kontrolní variantě, a navíc nebyl zaznamenán žádný výskyt nymf parazitovaných a zároveň infikovaných parazitoidem *E. formosa*. Všechny ostatní kmeny hub indukovaly poměrně vysokou mortalitu L4 parazitovaných parazitoidem *E. formosa* (kumulovaná mortalita v rozmezí 43 – 73%) a to včetně mortality prokazatelně vyvolané patogenem (infekce na povrchu těla), nicméně dle parametrů používaných pro hodnocení kompatibility se jedná o mortalitu na úrovni nízké (25-50%), resp. střední (50-75%).

b) Kompatibilita entomopatogenních hub a parazitoida *Encarsia formosa* – standardní biotest na rostlinách fazolu obecného

Základní údaje k pokusu

- rostliny fazolu obecného byly předpěstovány do stádia plně vyvinutých děložních listů a v této fázi byly na 24 hod exponovány samičkám molice skleníkové.
- po 24 hodinách byly samičky molice odebrány pomocí exhaustoru a rostliny byla na dobu 8-10 dnů umístěny do izolátorů zamezujících kolonizaci dalšími molicemi nebo parazitoidem *E. formosa*.
- po 8-10 dnech byly rostliny z izolátorů přemístěny do místnosti s parazitoidem *E. formosa*, kde byly ponechány až do doby, kdy byla na povrchu rostlin zaznamenána přítomnost černých puparií
- v této fázi byly rostliny namáčeny do suspenzí konidií vybraných kmenů entomopatogenních hub a po ošetření byly umístěny do plastových izolátorů a na dobu 5 dnů přemístěny do klimatizovaného boxu
- po 5 dnech inkubace byly z rostlin odštířeny listy a stav populace molice skleníkové resp. parazitoida *E. formosa* byl vyhodnocen pomocí binokulárního mikroskopu. Při vyhodnocování biotestu byla hodnocena pouze pupária, která byla tříděna do kategorií živá, vylíhlá, mrtvá a infikovaná

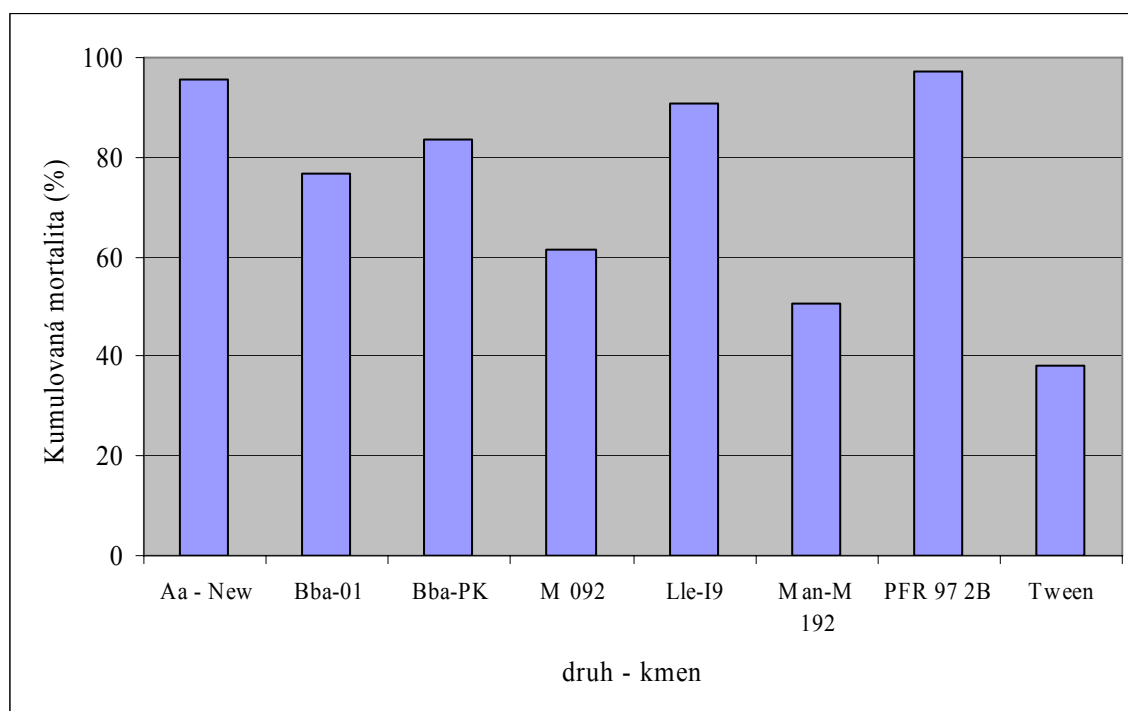
Tabulka 16: Účinnost vybraných kmenů entomopatogenních hub na strukturu populace molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitovaná parazitoidem *Encarsia formosa*.

Druh	Kmen	Celkem	Neparazitované L4			Parazitované L4		Kumulovaná mortalita (%)**
			Živé*	Mrtvé	Infikované	Živé	Infikované	
<i>A. aleyrodis</i>	New	273	12	9	136	116	0	95,60
<i>B. bassiana</i>	01	313	73	18	93	106	23	76,68
<i>B. bassiana</i>	PK	303	50	14	111	82	46	83,50
<i>B. brongniatii</i>	M 092	210	81	3	18	57	51	61,43
<i>L. lecanii</i>	I9	235	22	7	92	41	73	90,64
<i>M. anispliae</i>	M 192	195	96	38	16	33	12	50,77
<i>P. fumosoros.</i>	PFR 97	300	9	3	204	28	56	97,00
Kontrola	Tween	313	194	27	3	87	2	38,02

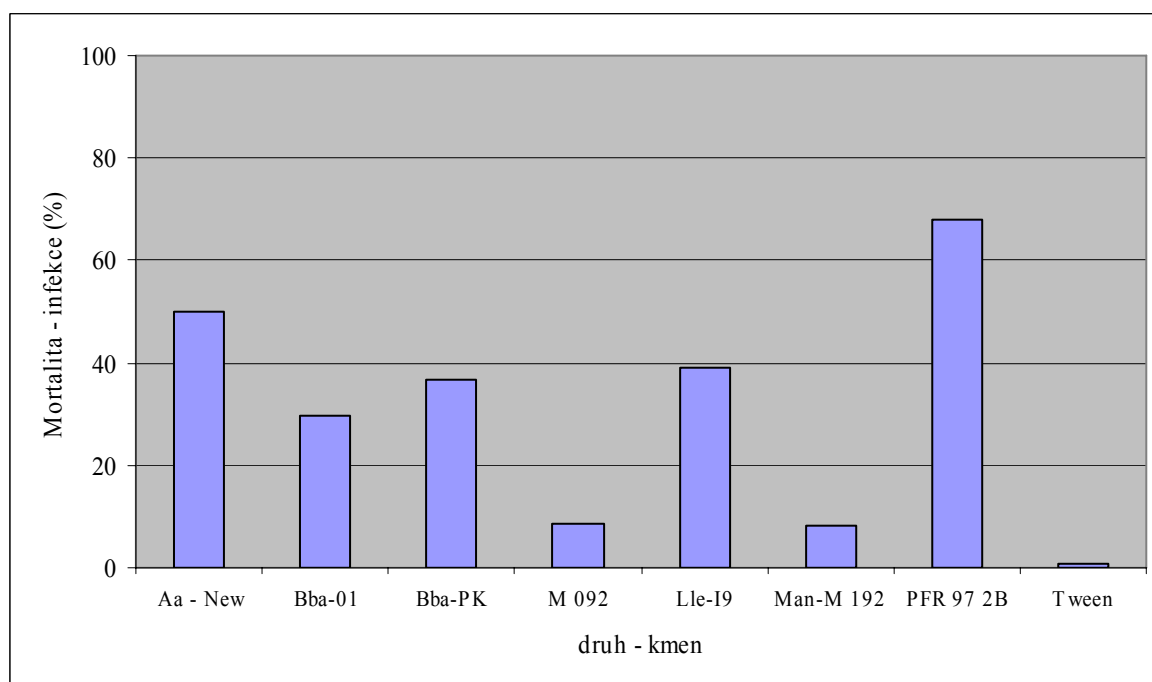
* tato kategorie zahrnuje všechny živé L4 a vylíhlé (=prázdná puparia)

** součet všech larev usmrčených houbami a parazitovaných parazitoidem *E. formosa*

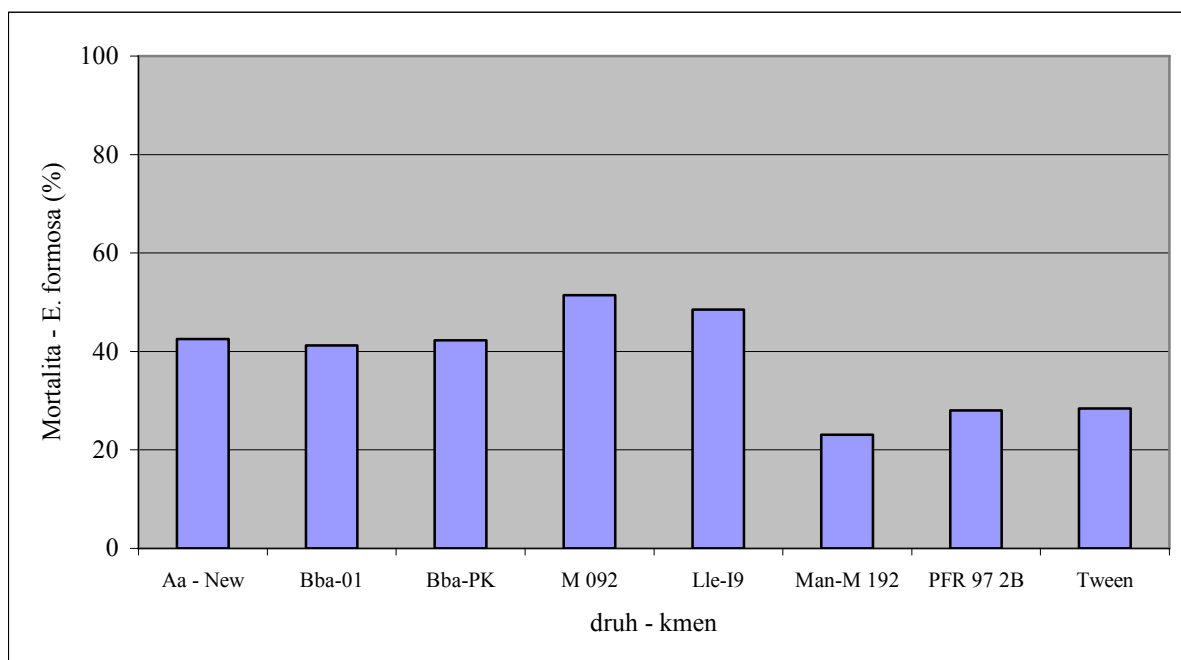
Graf č. 6. Porovnání účinnost vybraných kmenů entomopatogenních hub na strukturu populace molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitovanou parazitoidem *Encarsia formosa*.



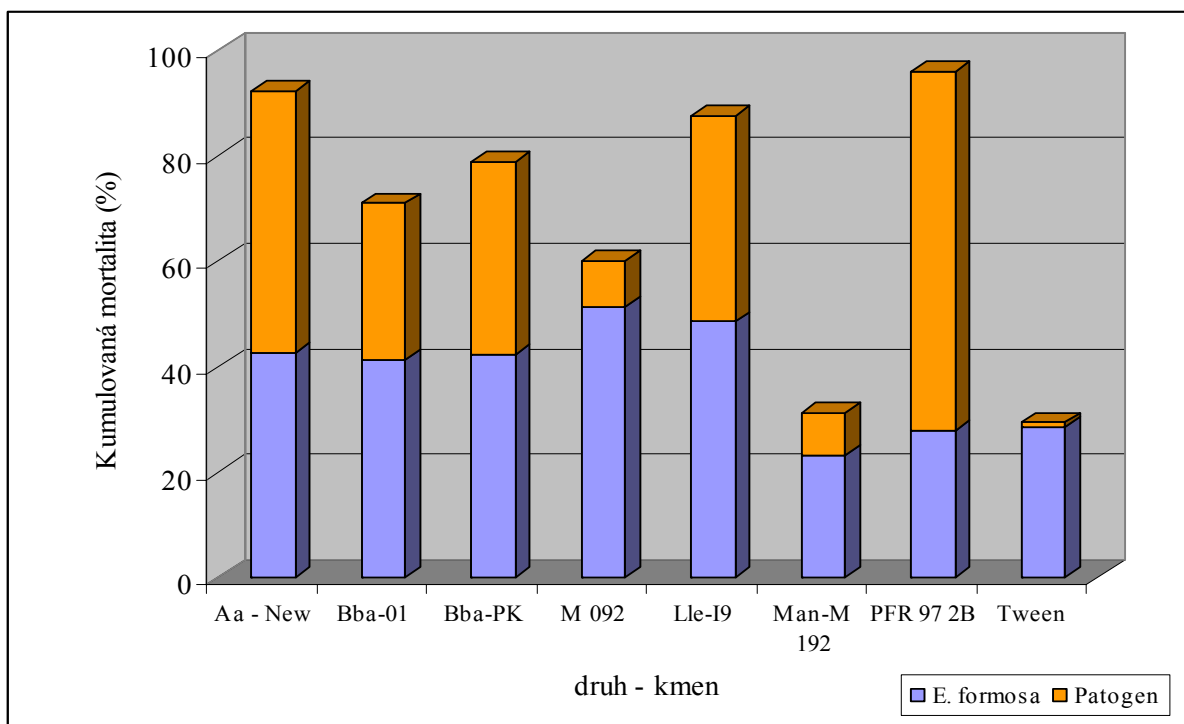
Graf č. 7. Porovnání účinnost vybraných kmenů entomopatogenních hub na strukturu populace molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitovanou parazitoidem *Encarsia formosa* – mortalita indukovaná pouze entomopatogenními houbami (zjevná infekce)



Graf č. 8. Porovnání účinnost vybraných kmenů entomopatogenních hub na strukturu populace molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitovanou parazitoidem *Encarsia formosa* – mortalita indukovaná pouze parazitoidem *Encarsia formosa*



Graf č. 9. Strukturu mortality v populaci molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* parazitované parazitoidem *Encarsia formosa* a souběžně ošetřené vybranými kmeny entomopatogenních hub



Zhodnocení pokusu:

Standardní biotest biotest využívající kompletní tritrofický systém „rostlina – molice skleníková – parazitoid *E. formosa*“ potvrdil výsledky předchozího biotestu. V porovnání s kontrolní variantou (pouze parazitoid *Encarsia formosa*) došlo po aplikaci všech kmenů hub k výraznému navýšení mortality v populacích L4 molice skleníkové. Nejvyšší kompatibilitu s parazitoidem *E. formosa* vykázal kmen Aal-new houby *Aschersonia aleyrodis*, který po aplikaci vyvolal infekci na úrovni 50% a zjevně neovlivnil vývoj parazitoida v parazitovaných pupariích. Obdobnou účinnost a vysokou kompatibilitu vykázal i kmen Lel-I9 houby *Lecanicillium lecanii*. Nejvyšší kumulovanou mortalitu vykázal kmen PFR 97 houby *Paecilomyces fumosoroseus*, nicméně tato mortalita byla vyvolána převážně patogenem a došlo k poměrně významné redukci stupně parazitice. Ostatní kmeny hub *B. bassiana*, *B. brongniartii* a *M. anisopliae* vykázaly střední úroveň kompatibility s parazitoidem *E. formosa*, nicméně významně přispěly k navýšení celkové mortality vyvolané v populaci L4 molice skleníkové.

5. DISKUSE A ZÁVĚRY

Molice skleníková patří mezi významné škůdce skleníkových plodin a kultur. V biologické ochraně proti molici skleníkové je v současné době využívána parazitická vosička *Encarsia formosa*, která klade do larev molice skleníkové vajíčka, a tím ji parazituje. Další možný způsob biologické ochrany proti molici skleníkové jsou entomopatogenní houby, které za určitých okolností vykazují vynikající insekticidní schopnosti. Jejich zavedení do praktické ochrany rostlin by mohlo výrazně ovlivnit účinnost a stabilitu programů biologické a integrované ochrany rostlin.

Všechny experimenty v diplomové práci byly zaměřeny na stanovení účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub na larvální stádium molice skleníkové. V pokusech bylo testováno několik druhů entomopatogenních hub. Výběr byl omezen pouze na druhy, které jsou k dispozici ve sbírce entomopatogenních hub KRV ZF JU v Českých Budějovicích. Při výběru druhů byly (s výjimkou houby *Aschersonia aleyrodidis*) upřednostňovány běžné, přirozeně se vyskytující druhy a při výběru experimentálního souboru kmenů byl zohledňován jejich původ. Cílem bylo vybrat druhy z odlišných geografických oblastí. Vzhledem k náročnosti standartních laboratorních biotestů byl testován omezený počet druhů entomopatogenních hub.

Z hlediska praktické účinnosti hub v biologické ochraně rostlin jsou významné indexy 1,0 a 1,5. Tyto indexy souvisejí se schopností usmrtit patogena (1,0) nebo spíše parazitovat (1,5) hostitele. Obě verze biologického účinku mají svůj význam, nicméně v případě entomopatogenních hub jsou preferovány interakce mající charakter parazitismu, při kterém dochází nejen k jednorázovému účinku (insekticidní účinnost), ale i k vytváření dlouhodobějších mezidruhových vazeb a účinků (sekundární šíření patogena, druhotné a další infekční cykly). Z těchto důvodů bylo v biotestech za klíčovou úroveň účinnosti považováno dosažení indexu 1,5 a více. Dosažení této hodnoty dokazuje, že vlivem houby došlo nejen k usmrcení hostitele, ale i k povrchové proliferaci, která je zpravidla následována dokončením vývoje patogena (konidiogenezi). Tento index byl dosažen ve většině případů za 48 – 72 hodin. Za významné však bylo považováno i dosažení indexu 1,0. Tento index nemusí znamenat smrt hostitele v důsledku parazitické fáze vývojového cyklu. Dalším důležitým ukazatelem je dosažení indexu 2,5 (a více), který svědčí o tom, že patogen je schopen na hostiteli prodělat celý vývojový cyklus včetně sporulace a je tak zabezpečeno jeho další šíření

v populaci hostitele a v prostředí. Index 3,0 byl zpravidla zaznamenáván po delší době než 72 hodin.

V první sérii byla srovnána klíčivost různých druhů entomopatogenních hub. Ze získaných výsledků vyplývá, že většina hub dosáhla po 48 hodinách indexu klíčivosti 3,0. Pouze druh *Metarhizium anisopliae* dosahoval nižších hodnot a jeho růst byl pozvolný. Indexu 3,0 tento druh dosáhl až po 72 hodinách.

Další test prokazoval vývoj entomopatogenních hub na larvách molice skleníkové. U kmene houby *Beauveria bassiana* PK PŮV v intervalu 24 hodin nebyl zaznamenán nárůst patogena, nicméně po 48 a 72 hodinách se vývoj patogena výrazně urychlil a dosíhl průměrných hodnot 1,34 resp. 1,8. Kmen *Beauveria brongniartii* M 092 dosáhl po 24 hodinách průměrného FDG indexu 0,5 a po 48 hodinách dosahovaly průměrné hodnoty FDG indexu 1,56 (růst mycelia na povrchu hostitele). Po 72 hodin byl zaznamenán další nárůst až na průměrnou hodnotu 1,66. V případě kmene M 192 houby *Metarhizium anisopliae* byl zaznamenán pomalý vývoj hodnot průměrných indexů FDG (0, 18 – 24 hod, 0,7 - 48 a 1,2 po 72 hod). U kmenů hub *Lecanicillium lecanii* I9 a *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B došlo v intervalu 48 hodin k nárůstu průměrného FDG indexu na hodnoty blízké 1,5 a po 72 hod byla zaznamenána průměrná hodnota u kmene *L. lecanii* I9 1,7 a u kmene *P. fumosoroseus* PFR 97 2B FDG index 1,8. V populacích molice ošetřených jak houbou PFR, tak i houbou *L. lecanii* byl po 72 hodinách zaznamenán výskyt nymf porostlých sporulujícím myceliem (FDG index 3,0).

Ve třetím testu byla sledována kompatibilita entomopatogenních hub s parazitoidem *Encarsia formosa* na larvách molice skleníkové. U kmene houby *Beauveria bassiana* PK PŮV v intervalu 24 hodin dosahoval průměrný index 0,38. V intervalu 48 hodin průměrný index vývoje dosáhl hodnoty 0,96. Po 72 hodinách kmen dosáhl průměrného indexu 1,52. Kmen *Beauveria brongniartii* M 092 dosáhl po 24 hodinách indexu vývoje 0,42. Po 48 hodinách hodnoty dosahovaly indexu 0,92. V intervalu 72 hodin byl nárůst až na průměrnou hodnotu 1,42. Po aplikaci konidií *Metarhizium anisopliae* M 192 byl zaznamenán pozvolný růst indexu vývoje. Po 48 hodinách dosáhl tento kmen indexu vývoje pouze 0,7 a po 72 hodinách byl zaznamenán nárůst FDG indexu na hodnotu 1,2. U kmene *Lecanicillium lecanii* I9 dosahovaly hodnoty po 24 hodinách průměrného indexu 0,96. Po 48 hodinách 1,46 a po 72 1,96. *Paecilomyces fumosoroseus* PFR 97 2B došlo v intervalu 24 hodin k nárůstu FDG indexu na průměrnou hodnotu 1,26. Po 48 hodinách dosahovaly hodnoty 1,96 a za 72 hodin byla zaznamenána hodnota 2,34. Všechny hodnocené kmeny vykázaly v testu nárůst na index

klíčivosti o hodnotách minimálně 1,5. Tato hodnota způsobuje usmrcení jak larev molice skleníkové tak i parazitoida *Encarsia formosa*.

Součástí experimentální práce byla též studie zaměřená na hodnocení společného působení parazitoida *E. formosa* a vybraných kmenů entomopatogenních hub, která byla zaměřena na definování úrovně kompatibility hub s parazitoidem a to v podmínkách, které měly sice experimentální charakter, ale byly již velmi blízko podmínkám praktických aplikací. V těchto biotestech bylo potvrzeno, že společnou aplikací obou agens – parazitoid a příslušný kmen/druh houby – dochází prakticky vždy k navýšení mortality v populaci L4, které ve vývojovém cyklu molice představují nejodolnější vývojové stádium/stupeň vůbec. Nicméně, v rámci společného působení byly prokázány významné rozdíly. Nejzajímavější výsledky byly získány při společné aplikaci parazitoida a houby *Aschersonia aleyrodis*. Tato houba vyniká velmi selektivním účinkem a v případě aplikace na populaci molice skleníkové parazitované *E. formosa* vyvolává infekci prakticky pouze u neparazitovaných larev. Takovýto stupeň kompatibility nevykázala žádná z dalších entomopatogenních hub použitých v pokusech. Nejvyšší kumulovaná mortalita byla dále zaznamenána po společné aplikaci hub *Lecanicillium lecanii*, resp. *Paecilomyces fumosoroseus* s parazitoidem *E. formosa*, avšak v těchto kombinacích převažoval účinek patogenů a docházelo již k poměrně vysoké mortalitě i v populaci parazitoida (= mortalita indukovaná patogenem). Ostatní druhy hub (*B. bassiana*, *B. brngniartii* a *M. anisopliae*) vykazovaly sice také navýšení účinku (= celková kumulovaná mortalita) ale jejich negativní účinek na populaci parazitoida *E. formosa* byl již vesměs významný a celková mortalita nevykazovala odpovídající nárůst.

Z pokusů je zřejmé, že v programech integrované ochrany rostlin by bylo možné efektivně využívat kombinací dvou různých bioagens, v tomto případě parazitoida *E. formosa* a některých entomopatogenních hub, zejména selektivně působící houby *Aschersonia aleyrodis* a nebo velmi virulentních kmenů hub *Lecanicillium lecanii*, resp. *Paecilomyces fumosoroseus*.

Na základě dosažených výsledků je možno definovat následující nejvýznamnější závěry:

1. Entomopatogenní houby vykazují pravidelně velmi dobrou vitalitu (klíčivost konidií a vývoj v in vitro systémech)
2. Všechny varianty biotestů použitých v experimentální části vykazovaly značný stupeň kompatibility mezi parazitoidem *E. formosa* a entomopatogenními houbami
3. Nejvyšší stupeň kompatibility byl prokázán u kmene Aal-new houby *A. aleyrodis*, který nevyvolal infekci na larvách parazitovaných parazitoidem *E. formosa*.

4. Nejvyšší obecnou virulenci vykazaly kmeny *P. fumosoroseus* a *L. lecanii*, nicméně tato virulence se projevila i v populaci parazitoidea *E. formosa*., protože oba druhy hub vyvolávaly infekci i na parazitovaných pupriích
5. Kmeny hub rodů *Beauveria* a *Metarhizium* vykazovaly nižší virulenci na L4 molice skleníkové a poměrně nízkou kompatibilitu s parazitoidem *E. formosa*.
6. Pro programy IOR lze jako nejvhodnější jednoznačně doporučit kombinaci houby *A. aleyrodis* a parazitoidea *E. formosa* jako kombinaci vysoce virulentního kmene patogena s vysokým stupněm kompatibility s parazitoidem.

6. SEZNAM LITERATURY

- Bajan, C., 1973: *Paecilomyces fumoso-roseus* (WIZE) - pathogenic agent of Colorado beetle (*Letinotarsa decemlineata* Saz). *Ekologia Polska*, 24: 705 - 712.
- Balakrishnan, S., Nene, Y.L., 1983: A note on the mode of penetration of the fungus *Paecilomyces farinosus* Brown and Smith into the whitefly *Bemisia tabaci*. *Science and Culture*, 46: 231 - 232.
- Bartoš, J., Táborský, V., Landa, Z., 1990: Integrovaná ochrana rostlin. Metodiky ÚVTIZ, MZ ČR, 11 : 1 - 40.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Largo, J.P., 1988: Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Mikrobiology*, 54:1795 – 1805.
- Dilbek, J., Jindra, Z., Kabíček, J., Laštovka, P., 1996: Chov dřevých roztočů a hmyzu. *Náš chov*, 11: 19 – 21.
- Dirlbeková, O., 1991: Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (I. Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.) *Studie VTR, ÚVITZ, Ř. Rostl. Výr.*, 1991, 11: 10 – 21.
- 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.
- Fawcett, H.S., 1908: Fungi parasitic upon *Aleyrodis citri*. University of Florida, Experimental studies, 1: 1 - 41.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G., 1994: Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3 - 34
- Fransen, J.J., 1987: *Aschersonia aleyrodis* as a microbial control agent of greenhouse whitefly. Ph.D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, Department of Entomology, 167 pp.
- Fransen, J.J., 1990: Natural enemies of whiteflies - Fungi, pp. 187 - 209, In: Gerling, D.(Ed.): *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*. Atheneum Press, Newcastle upon Tyne.
- Gahan, A.B., 1924: Some new parasitic Hymenoptera with notes on several described forms. *Proc. U.S. Nat. Mus.* 65 #2517 Art. 4: 1-23.
- Gäumann, E., 1964: *Die Pilze*, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.

- 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. *Environ. Entomol.* 11: 1274-1279.
- Guerrieri, E., 1997: Flight behavior of *Encarsia formosa* in response to plant and host stimuli. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82: 129-133.
- Hall, R.A., 1976: A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *J. Invert. Pathology*, 27: 41 - 48.
- Hall, R.A., 1981: The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales, pp. 483 - 498, .In: Burges, H.D., (Ed.) *Microbial Control of Pests and Plant diseases, 1970 - 1980*. Academic Press, London.
- Hall, R.A., 1985: Whitefly control with fungi, pp. 116 - 118, In: Hussey, N.W., Scopes, N., (Eds.): *Biological pest control - the glasshouse experience*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Hoddle, M.S., R.G. VanDriesche, and J.P. Anderson, 1998: Biology and use of the Whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. *Annual Review of Ent.* 43: 645-669.
- Charnley, A.K., 1984: Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review, pp. 229 - 270, in: Anderson, J.M., Rayner, A.D.M., Walton, D.W.H., (Eds.): *Invertebrate - Microbial Interactions*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kajita, H., 1989: Mating and oviposition of three *Encarsia* species (Hymenoptera:Aphelinidae) on the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). *Appl. Entomol. Zool.* 24:11-19.
- Landa, Z., 1983: Integrovaná ochrana proti molici skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* Westwood ve sklenících. Kandidátská dizertační práce, AF VŠZ Praha, 204 pp.
- Landa, Z., 1984: Ochrana proti molici skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* v programech integrované ochrany skleníkových okurek. *Sborník ÚVTIZ, Praha, XIV.*, 11:215 - 228.
- Landa, Z., 1994: Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JU, České Budějovice, 96 stran
- Landa, Z., 1998: Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *Agro-ochrana a výživa rostlin*, 10: 7 - 12
- Landa, Z., Jiranová, R., 1989: Entomopathogenic fungi as an additional selective pest suppressing agents of greenhouse whitefly populations in greenhouse cucumbers. *Proc. Conf. "Biopesticides - theory and practice"*, September 25. - 28., České Budějovice, pp. 120 - 130.

- Landa, Z., Jiranová, R., 1989b: A laboratory improvement of an entomopathogenic fungi and use of selected strains in IPM programme for greenhouse cucumbers. Ann. Rep. Agric. University České Budějovice, 95 pp.
- Landa, Z., Jegorov, A., Mat'ha, V., Novák, J. 1989: Light induced production of carotenoids by the entomogenous fungus *Aschersonia aleyrodis*. Proc. Conf. "Biopesticides–theory and practice", September 25.- 28.1989, České Budějovice, 110 - 119.
- Landa, Z., Oborník, M., 1997: Entomopatogenní houy. Sborník konference: Současný stav a perspektivy biologické ochrany rostlin – Praha 20. 11. 1997, Česká spol. rostlinolékařská, str. 7 –12
- Landa, Z., Osborne, L.S., Polez, F., Eyal, J., 1994: A Bioassay for Determining Pathogenicity of Entomogenous Fungi on Whiteflies. *Biological Kontrol*, 4: 341 – 350.
- Malais, M., Ravensberg, W.J., 1992: The biology of glasshouse pests and their natural enemies, knowing and recognizing. Kopert B.V., Berel en Rodenrijs, Netherlands, 109 str.
- McCoy, C.W., 1981: Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*, pp.499 - 512, In: Burges, H.D., (Ed.) *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970 - 1980*. Academic Press, London.
- McCoy, C.W., Samson, R.A., Boucias, D.H., 1988: Entomogenous fungi, pp.151 - 236. In: Ignoffo, C.M.,(Ed.) *CRC Handbook of Natural Pesticides*. CRC Press, Boca Raton, Vol. 5., A
- Osborne, L.S., 1990: Biological control of whiteflies and other pests with a fungal pathogen. United States Patent Number 4.942 030.
- Osborne, L.S., Hoelmer K. A., Yokomi, R.K., 1990: Foliage disorder in Florida associated with feeding of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, pp. 49 – 52 In: Yokomi, R.K., Narayanan, K.R., Schuster, D.J. (Eds.): *Sweetpotato whitefly mediated vegetable disorders in Florida*. Proc. Workshop TR&EC University of Florida, Homestead, February 1.- 2.
- Osborne, L.S., Storey, G.K., McCoy, C., W., Walter, J.F., 1990b: Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Proc. 5th. Int. Colloquim on Invertebrate Pathology and Biological Control, Adelaide, Australia, August 20-24, 386 - 390 pp.
- Osborne, L.S., Landa, Z., 1992: Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*, Vol. 75, No. 4: 456 - 471.
- Petch, T., 1921: Studies in entomogenous fungi; II. The genera *Hypocrella* and *Aschersonia*. Royal Botanical Garden, Peradeniya Annals, 7: 167 - 278.

- Poinar, G., Poinar, R., 1998: Parasites and pathogens of mites. *Annual Review of Entomology*, 43: 449 – 469.
- Poprawski, T.J., Marchal, M., Robert, P.H., 1985: Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera, Curculionidae) early stage to five entomopathogenic Hyphomycetes. *Environ. Entomology*, 14: 247 - 253.
- Primak, T.A., Chižik, R.I., 1975: Vozmožnosti ispolzovanija griba *Aschersonia aleyrodis* protiv tepličnoj bělokriľke. *Zašč. Rastenij*, 22: 53 - 56.
- Procenko, E.P., 1967: Griby z roda *Aschersonia*. *Sb. Kar. Rastenij, Kolos*, 19: 147 - 215.
- Ramakers, P.J.M., Samson, R.A., 1984: *Aschersonia aleyrodis*, a fungal pathogen of whitefly. II. Application as a biological insecticide in glasshouses. *J. Appl. Entomology*, 97: 1 - 8.
- Ratault, C., Vey A., 1977: Production d'esterase et de N-acétyl-D glucosaminidase dans le tegument du coléoptère *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Entomophaga*, 22: 289 - 294.
- Rodriguez-Rueda, D., Fargues J., 1980: Pathogenicity of entomopathogenic hyphomycetes, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Nomuraea rileyi*, to eggs of Noctuids, *Mamestra brassicae* and *Spodoptera littoralis*. *J. Invert. Pathology*, 36: 399 - 408.
- Samson, R.A., 1974: *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6: 1 - 43.
- Samson, R.A., Rombach, M.C., 1985: Biology of the fungi *Verticillium* and *Aschersonia*, pp.34 - 42, In: Hussey, N.W., Scopes, N., (Eds.): *Biological pest control - the glasshouse experience*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Samson, R.A., Evans, H.C., Latgé, J.P., 1988: *Atlas of Entomopathogenic fungi*. Springer Verlag, Berlin.
- Samšňáková, A., Kálalová, S., 1983: Výroba a použití houbového preparátu v zeměděľství proti hmyzím škůdcům. In: *Sborník referátů z IX. Československé konference o ochraně rostlin v Brně*, 30. 8. – 1. 9., str. 197.
- Samšňáková A., Bajan, C., Kálalová S., Kmitowa R., Wojciechowska, M., 1977: The effect of some entomogenous fungi on the Colorado beetle and their enzymatic activity. *Bull. Acad. Pol.Sci., Cl., II.*, 25: 521 - 526.
- Satke, J., Bíbová, H., Harazim, P., 1992: Utilizace aminokyselin při biosyntéze cyklosporinu. *Sborník „II. Symposium Cyclosporin a Consupren“*, str. 39.
- Sawai, K., Okuno, T., Terada, Y., Farada, Y., Sawamura, K., Sasaki, H., Takao, S., 1981: Isolation and properties of two antifungal substance from *Fusarium solani*. *Agric. Biol. Chem.* 45: 1223 – 1228.

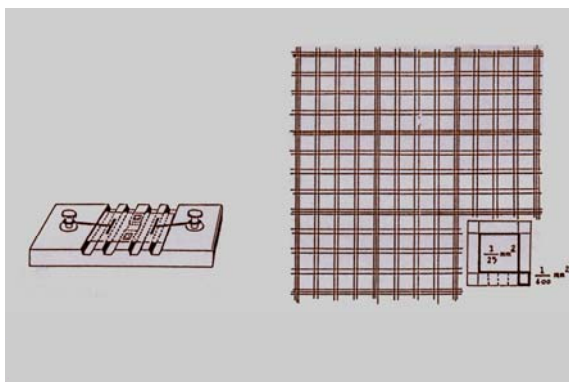
- Solovej, E.F., Kolcov, P.D., 1976: Dějstvije gribov iz roda *Aschersonia* na oranžerejnuju belokrilku. *Mikologija i Fytopatologija*, 10: 425 - 429.
- Speyer, E.R., 1927: An important parasite of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood). *Bulletin of Entomological Research* 17: 301-08.
- Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993: Amicrobial and microbial agents, pp. 52 - 82, in: Tanada, Y., Kaya, H.K., (Eds.): *Insect pathology*. Academic Press.
- Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993: Fungal infections, str. 319 – 387, In: Tanada, Z., Kaya, H.K., (Eds.) *Insect Patology*. Academic Press inc. California & Academic Press Limited London.
- Tarrant, C.A., Soper, R., 1986: Evidence for the vertical transmission of *Coelomycidium simulii* (Myceteae [Fungi]: Chytridiomycetes), p. 212, in: Samson, R.A., Vlcek J.M., Peters, D., (Eds.) *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. Found 4th. Int. Colloq. Inverteb. Pathology, Wageningen, Netherland.
- Van Lenteren, J.C., and J. Woets, 1988: Biological and integrated control in greenhouses. *Ann. Rev. of Ent.* 33: 239-269.
- Weiser, J., 1966: Houbová onemocnění hmyzu, pp. 232 - 324, in: Weiser, J.: *Nemoci hmyzu*, Academia, Praha.
- Weiser, J., 1991: Mikrobiální insekticidy, pp. 30 - 43, In: Hrdý, I. (Ed.) *Biopesticidy v zemědělství*. MZ ČR, Praha.
- Zchori-Fein, E., R.T. Roush, M.S. Hunter, 1992: Male production induced by antibiotic treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), an asexual species. *Experientia* 48:102-105.
- Zimmermann, G., 1986: The "Galeria bait method" for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Entomology*, 12: 213 - 215.

7. PŘÍLOHY

Grafický list 1: STANDARTNÍ METODA PŘÍMÉHO STANOVENÍ POČTU JEDNOTEK



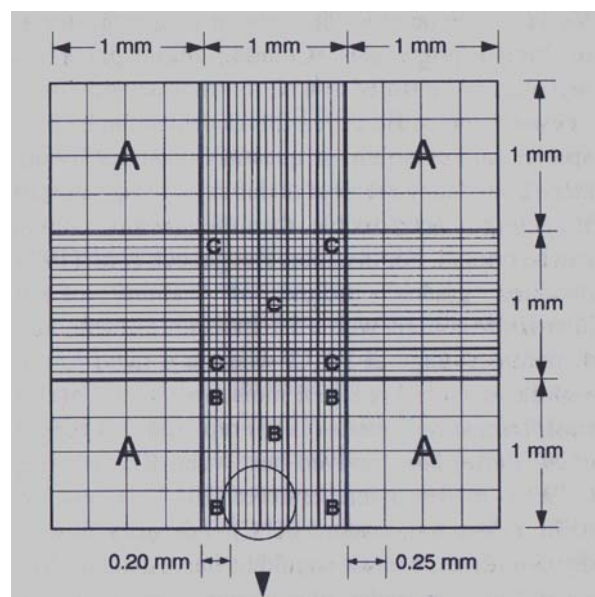
Počítací komůrka



Burkerova počítací komůrka

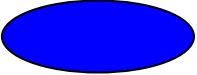
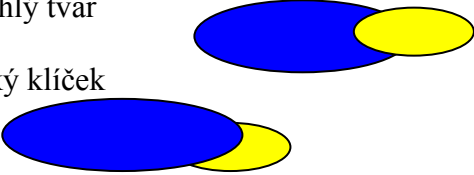
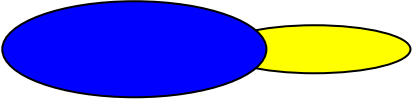
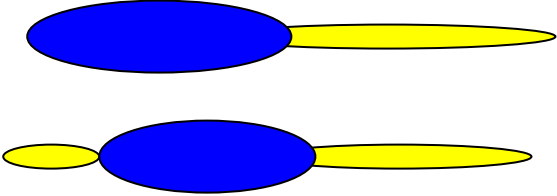
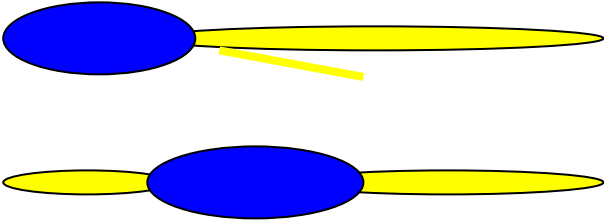
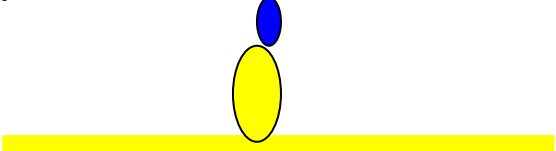
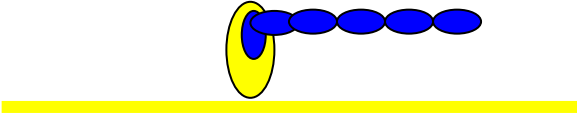
Stanovení počtu jednotek ve specifickém poli hemocytometru

- komplex komůrky
- nanesení suspenze
- sedimentace
- vybrání vhodného pole (A – B – C)
- ± 50 jednotek v jednom počítaném poli
- rozdíl mezi poli max. 15%
- počítání opakovat 2x (horní a dolní počítací pole komůrky)



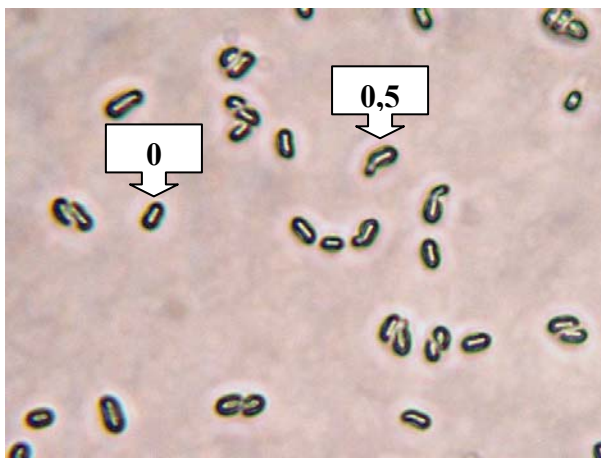
Neubauerova počítací komůrka

Grafický list 2: HODNOCENÍ KLÍČIVOSTI ENTOMOPATOGENNÍCH HUB

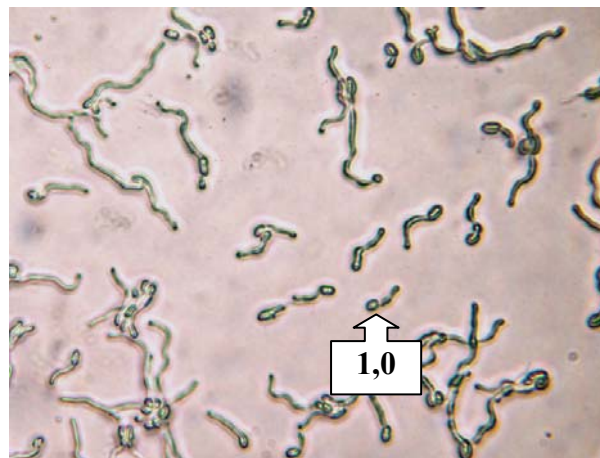
Základní tvar	Charakteristika	GI
	Na konidii nejsou patrné žádné morfologické změny, konidie ve vzorku mají uniformní tvar	0
Protáhlý tvar Krátký klíček 	1. Konidie je zřetelně protáhlejší 2. Jednostraný klíček v poměru přibližně 1:0,5	0,5
Konidie : klíček = 1:1 	Velikost klíčku je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidii	1,0
	1. Klíček je 2-3x delší než matečná konidie 2. Na matečné konidii jsou zřejmě 2 kratší klíčky	1,5
	1. Klíček je více než 3x tak dlouhý jako matečná konidie 2. Sekundární větvení 3. Dva dlouhé klíčky	2,0
Hyfa – konidiofor – konidie 	Na hyfách jsou zjištěny konidiofory bez nových konidií nebo s 1 konidií	2,5
Hyfa – konidiofor – řetízek konidií 	V hodnoceném vzorku jsou zjištěny konidiofory, na kterých jsou krátké řetízky konidií, alespoň 5 konidií v řetízku	3,0

Grafický list 3:

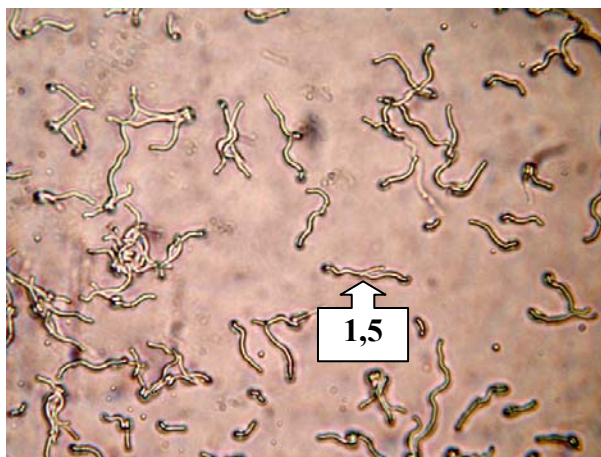
Fotodokumentace k hodnotící indexové stupnici standardního testu klíčivosti a vývoje entomopatogenních hub v podmínkách *in vitro* kultivace



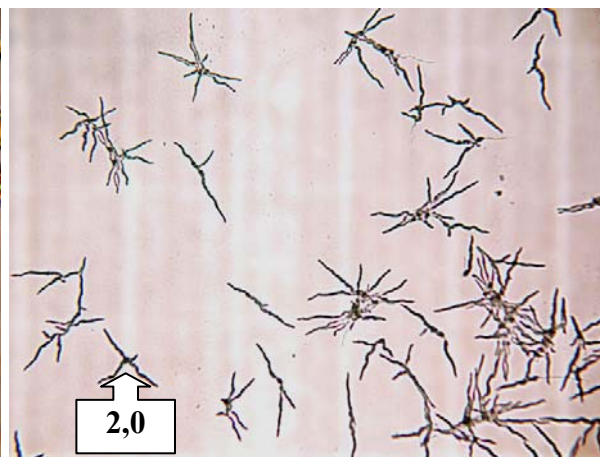
GI 0,5 – index je přidělován v případě, kdy na konidii jsou zřejmé tvarové změny, zejména pak zřetelný primární klíček (populace konidií *P. fumosoroseus* vykazující GI 0 – 0,5)



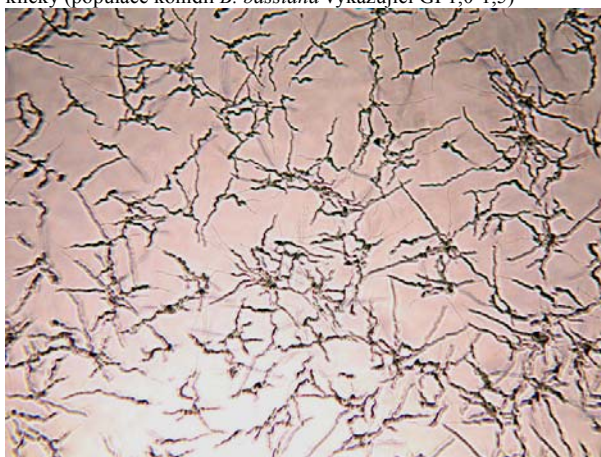
GI 1,0 - index je přidělován v případě, že klíček dosahuje velikosti blízké velikosti matečné konidie (populace konidií *P. fumosoroseus* vykazující GI 0,5 – 1.5)



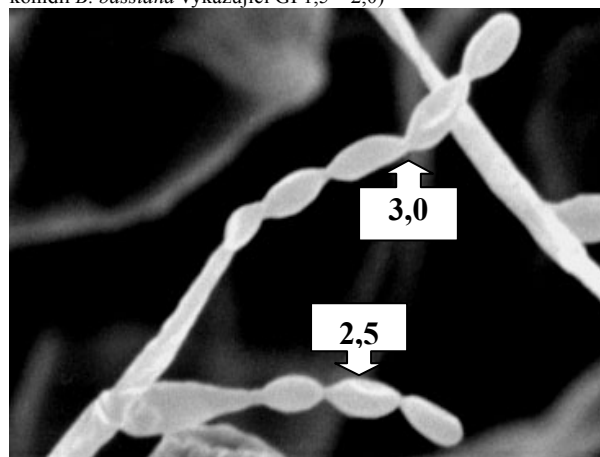
GI 1,5 - index je přidělován v případě, že klíček dosahuje velikosti 2-5 x větší než matečná konidie, případně na konidii jsou přítomny 2 klíčky (populace konidií *B. bassiana* vykazující GI 1,0-1,5)



GI 2 - index je přidělován v případě, že jsou vytvořeny 2 a více dlouhých klíčků, resp. je již vytvořena primární kolonie (populace konidií *B. bassiana* vykazující GI 1,5 – 2,0)



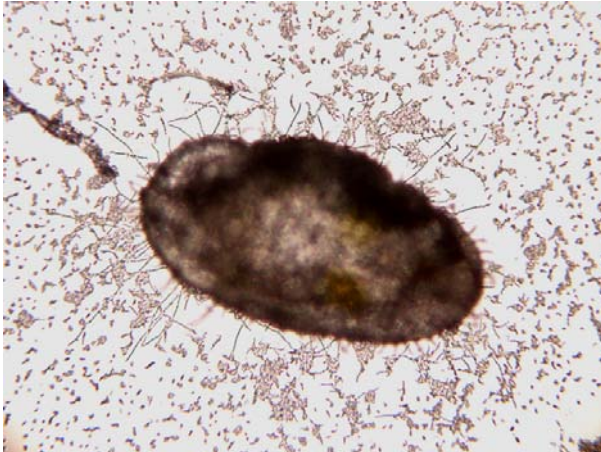
GI 2,0 - index je přidělován i v případě, že hodnocená populace má již charakter myceliální sítě (populace konidií *B. bassiana* vykazující GI 2,0)



GI 2,5 resp. 3,0 – index je hodnocené populaci přidělován v případě, kdy jsou kdekoli v hodnoceném zorném poli zaznamenány sporující struktury (*P. fumosoroseus*, GI 2,5 = počátek sporulace, 1-4 konidie v řetízku, GI 3,0 – plná sporulace, 5 a více konidií v řetízku)

Grafický list 4:

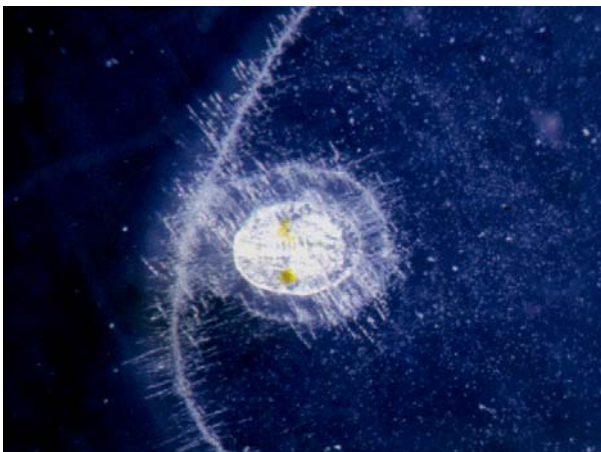
Nejvýznamnější fáze hodnocení vývoje entonopatogenních hub pomocí *in vivo*“ biotestu na pupariích molice *Trialeurodes vaporariorum* (digitální fotografie, světelný resp. stereoskopický mikroskop)



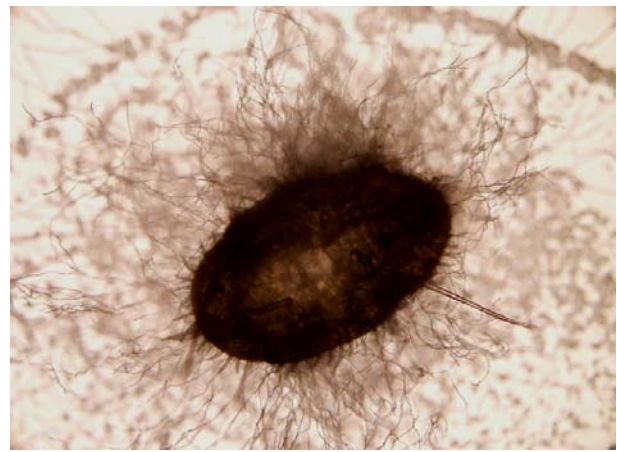
Počátek tvorby mycelia (FDGI-1,5): Na obvodu těla puparia molice jsou zaznamenána krátká hyfová vlákna mající prokazatelně přímý kontakt s hostitelem



Počátek tvorby mycelia (FDGI-1,5): Na povrchu těla puparia jsou zaznamenána krátká hyfová vlákna



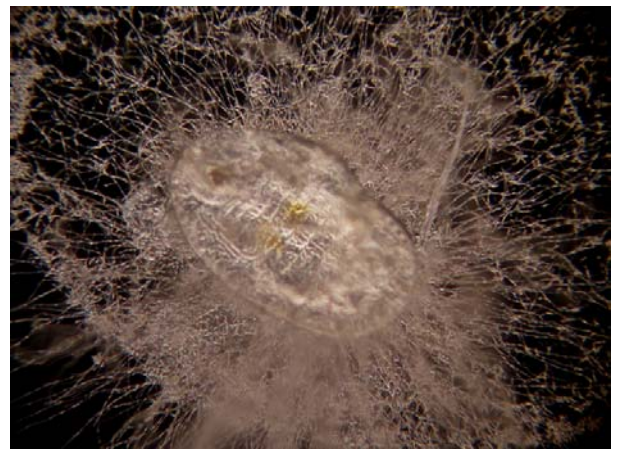
Masivní růst mycelia (FDGI 2,0): Okolí a povrch puparia jsou porostlé hustým myceliem (stereoskopický mikroskop)



Masivní růst mycelia (FDGI 2,0): Okolí a povrch puparia jsou porostlé hustým myceliem (světelný mikroskop)



Sporulace (FDGI 2,5 a 3,0): Na vzdušném myceliu porůstajícím povrch puparia je zaznamenána sporulace (počátek sporulace – 2,5; plná sporulace 3,0)



Sporulace (FDGI 2,5 a 3,0): Na vzdušném myceliu porůstajícím povrch puparia je zaznamenána sporulace (počátek sporulace – 2,5; plná sporulace 3,0)

Abstract

This M.Sc. thesis is aimed to describe level of the compatibility between various strains of several entomopathogenic fungi with parasitoid wasp *Encarsia formosa*. From many species of entomopathogenic fungi *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* were the species which were tested in experiments. It was found, that *A. aleyrodis* is very selective, because it infects only unparasitized nymphs of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. All other strains of tested fungi were much less selective, however their efficacy always increased total efficacy when compared with the efficacy of parasitoid alone. It was concluded, that fungi *A. aleyrodis*, *L. lecanii* and *P. fumosoroseus* posse's big potential for construction of IPM programs.

Anotace

Tato diplomová práce je zaměřena na problematiku compatibility vybraných druhů/kmenů entomopatogenních hub a parazitické vosičky *Encarsia formosa*. Z mnoha druhů entomopatogenních hub byly vybrány kmeny druhů *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* a *Paecilomyces fumosoroseus*. Bylo potvrzeno, že entomopatogenní houba *Aschersonia aleyrodis* vykazuje výrazný selektivní účinek a infikuje pouze neparazitované nymfy molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum*. Všechny ostatní kmeny/druhy entomopatogenních hub vykázaly nižší selektivitu, nicméně jejich účinek vždy vykázal nárůst mortality v populaci molic parazitovaných parazitoidem *E. formosa*. Z výsledků lze vyvodit závěr, že pro účely programů integrované ochrany rostlin jsou nejvhodnější kmeny hub *A. aleyrodis*, *L. lecanii* a *P. fumosoroseus*.